

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.

République Algérienne Démocratique & Populaire.

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

جامعة حسيبة بن بوعلي- الشلف.

Université Hassiba BEN BOUALI –CHLEF.

كلية العلوم و علوم الهندسة.

Faculté des Sciences & Sciences de l'ingénieur.

دائرة هندسة الطرائق.

Département de Génie des procédés.

Mémoire de magister

Présenté par : Mr Djafer. Abdrrahmane

Ingénieur d'état U.H.B.C

Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Génie des procédés.

Option : Eau et environnement.

Thème :

étude d'un bioréacteur à cellules immobilisées en vue l'épuration biologique des eaux usées domestiques

Soutenu le : 28 Mai 2006 devant le jury composé de :

ABDI.B

Maître de conférence à UHB.Chlef

Président

KOUADRI MOSTEFA. S

Maître de conférence à UHB.Chlef

Examineur

Bensebia .B

Chargé de cours à UHB.Chlef

Examineur

Mahmoudi .L

Chargé de cours à UHB.Chlef

Co-encadreur

ACHOUR. D

Maître de conférence à UHB.Chlef

Encadreur

Promotion: 2006

REMERCIEMENTS

Ce projet de magistère a été réalisé à l'Université de Hassiba Ben Bouali de chlef. Sa réalisation a été rendue possible grâce à l'appui de plusieurs personnes et organismes, que je tiens à remercier chaleureusement.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de recherche Monsieur D. ACHOUR, Je le remercie d'abord pour avoir accepté de me compter parmi ses étudiants gradués. Je le remercie également pour l'attention assidue qu'il m'a accordée durant la réalisation de ce modeste travail et me faire profiter de son expérience.

Je remercie également, mon co-encadreur monsieur L. MAHMOUDI, à qui je présente l'expression de ma profonde gratitude pour sa rigueur dans le suivi constant de mon travail, ses conseils qu'il m'a prodigué tout au long de la réalisation des expérimentations, ainsi que pendant les étapes de l'analyse des résultats et de la rédaction.

Je remercie très vivement monsieur B. Abdi maître de conférences à l'université de Hassiba Ben Bouali de chlef, de l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger mon travail et de présider le jury de ce mémoire.

Je suis très reconnaissant à mademoiselle S. Kouadri Moustafai maître de conférences à l'université de Hassiba Ben Bouali de chlef, d'avoir bien voulu examiner ce travail et d'honorer de sa présence l'exposé de ce mémoire.

Je remercie également monsieur A. Aouabed maître de conférences à l'université de Blida, d'avoir accepté d'honorer mon jury par sa participation.

Que monsieur B. Bensebia chargé de cours à l'université de Hassiba Ben Bouali de chlef, soit vivement remercié pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger.

Je remercie mon cousin H. Elhameur qui a grandement collaboré à ce projet de recherche et qui a toujours été très disponible pour répondre à mes questions. Ses commentaires toujours pertinents qui m'ont amené à maintes reprises à repousser mes connaissances.

Par ailleurs, je tiens à remercier H. Benyamina, technicien au laboratoire de chimie au Département de génie de procédés, pour m'avoir aidée à régler les inévitables problèmes d'ordre technique ou pratique.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide irremplaçable et précieuse de l'ensemble des personnels du laboratoire de contrôle de la qualité chlef et de l'A.D.E, plus particulièrement H. Boudjelhtia, B. Benyamina, A. Djâada, M. Drizi, M. Atba, A. Saïah, F.Z. Cherid, A. Tahar Taïba, Med. Bensaou et Koudri ainsi que H. Kelouche, L. Chabeli, M.M. Djaffar, Je les remercie d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour réaliser ce travail.

Que toutes les personnes (dont le nombre est très élevé pour les citer ici) qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à l'aboutissement de ce travail, trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents qui ont fait tout pour me pousser à atteindre ce niveau et qui ont toujours rayonné mon chemin dans les moments les plus sombres de ma vie, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

A ma femme de m'avoir soutenu et encouragée durant les moments les plus difficiles de la poursuite de mes longues études et à mes filles Asma et Amina.

A mon cher frère El Habib qui a été toujours derrière moi pour m'encourager, ces enfants (Ibtisem, Lamia, Ahlem, Aia) et mes chères sœurs (Louiza, Djamila, Atika, laila) et leurs enfants.

A toute ma famille et mes amis en particulier (Merouane).

A mes collègues de travail qui m'ont aidée à un moment ou à un autre et avec qui j'ai eu des discussions fort intéressantes en particulier Heuss Ahmed et Boutbel Med et mon oncle Djafer Lahcen.

A toutes les promotions de post graduation (Eau et Environnement, Génie chimique, Hydraulique de l'année 2003.

Table des matières

Introduction Générale.....	10
----------------------------	----

Première Partie : Synthèse Bibliographique

CHAPITRE I. Principes de l'épuration des eau résiduaires

I.1. Différents modes d'épuration	12
I.1.1. Principales filières de traitement des eaux résiduaires.....	13
I.2. Traitements biologiques des eaux résiduaires	14
I.2.1. Principes fondamentaux de l'épuration biologique.....	14
I.3. Les technologies de traitement par des cultures bactériennes fixées	17
I.3.1. Les lits bactériens	17
I.3.1.1.Principe de fonctionnement et constitution.....	17
I.3.2. Les bio filtres	18
I.3.2.1.Principe de fonctionnement	18
I.3.3.Les avantages et les inconvénients des lits bactériens	19
I.3.3.1.Avantages.....	19
I.3.3.2.Inconvénients.....	19

CHAPITRE II : Le Biofilm

II.1. Définition	21
II.2. Structure et organisation	21
II.3. Formation du biofilm	22
II.3.1. Le transport des cellules vers la surface.....	22
II.4. Composition microbiologique des biofilms	30
II.4.1. Les protozoaires.....	31
II.4.2. Les levures et moisissures.....	31
II.4.3. Les bactéries.....	32
II.4.4. Les entérobactéries.....	32
II.4.5. Les coliformes totaux	32
II.4.6. Les streptocoques.....	32
II.4.7. Les bacilles sporules anaérobies (clostridium)	33
II.5. Facteurs régissant l'activité microbienne	33
II.6. Conditions dynamiques de formation du biofilm	33
II.6.1. L'écoulement du liquide.....	33
II.6.2. Les transferts dans les biofilms	36
II.6.2.1. Le transfert de solutés.....	36
II.6.2.2. Le transfert d'oxygène.....	38

II.6.3. Régulation physique de la croissance des biofilms.....	41
II.7. Résistance des biofilms.....	42
II.7.1. La couche muqueuse d'exopolysaccharides.....	42
II.7.2. La nature des micro-organismes des biofilms.....	43
II.7.3. Les facteurs extrinsèques et la résistance des biofilms.....	43

Deuxième Partie: Etude Expérimentale

CHAPITRE III : Matériels et méthodes

III.1. Matériels.....	47
III.1.1. Choix du support.....	47
III.1.2. Origine.....	47
III.1.2.1. Caractéristique physico-mécanique et composition chimique	47
III.2. Eau usée d'ensemencement.....	48
III.3. Dispositif expérimental.....	50
III.3.1. Préparation du garnissage support.....	51
III.3.2. L'eau à traiter	51
III.3.3. Préparation du milieu synthétique.....	52
III.3.4. L'inoculum	52
III.3.5. Préparation du biofilm.....	52
III.4. Conduite de l'expérience et méthodes analytiques	52
III.4.1. Paramètres d'étude et de contrôle	52
III.4.2. La demande biochimique en oxygène (DBO)	53
III.4.3. La conductivité électrique.....	53
III.4.4. Le pH.....	53
III.4.5. Les pertes de charge.....	54
III.5. Analyse microbiologique.....	54
III.5.1. Les coliformes.....	54
III.5.2. Les bactéries sporulées anaérobies sulfite-réducteur (ASR) totaux	54
III.5.3. Levures et moisissures.....	54
III.6. Etude d'optimisation.....	55

Chapitre 4 : Résultats et discussions

IV. Etude de la phase transitoire du bioréacteur.....	57
IV.1. Evolution de la DBO.....	57
IV.2. Evolution des pertes de charges dans le bioréacteur.....	59
IV.3. Evolution du pH.....	61
IV.4. Evolution de la conductivité électrique.....	63
IV.5. Relation entre les paramètres de performances du bioréacteur et discussions des résultats des différentes charges d'effluents	64
IV.5.1 La relation entre l'abattement de la DBO et la perte de charge.....	64
IV.5.2 Relation entre le pH et la conductivité électrique	69
IV.6. Effet de choc	71

CHAPITRE 5 : Etude d'optimisation des paramètres de fonctionnement du bioréacteur

V.1. Optimisation du temps de séjour.....	75
IV.2. Optimisation de la vitesse d'écoulement.....	76
IV.3. Etude de la phase transitoire.....	77
IV.4. Evolution de l'abattement de la DBO (%) et la perte de charge en fonction du temps à vitesse constante et Ts variable	80
V.5. Evolution de l'abattement de la DBO (%) et la perte de charge en fonction du temps à Ts constant et vitesse variable.....	81
Conclusion Générale	84
Référence bibliographique	88
Annexe	95

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristique physico- mécanique.....	47
Tableau 2 : Composition chimique.....	47
Tableau 3: Les caractéristiques physico-chimiques de l'effluent d'El Hassania.....	49
Tableau 4: La microflore présente de l'effluent d'El Hassania.....	49
Tableau 5: Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau de robinet d'El Hassania	49
Tableau 6: La composition chimique de l'effluent synthétique.....	51
Tableau 7: Evolution de l'abattement de la DBO (%) pour les différente charges en Fonction de l'évolution du biofilm.....	57
Tableau 8: Evolution de la perte de charge ($\Delta P/L$) pour les différentes charges d'effluents en fonction de l'évolution du biofilm.....	59
Tableau 9: Les variations du pH en fonction de l'évolution du biofilm pour les différente charges d'effluents	61
Tableau 10: Evolution de la conductivité en fonction de l'évolution du biofilm pour les différente charges d'effluents	63
Tableau 11 : Evolution de la densité cellulaire en fonction du temps.....	66
Tableau 12 : Evolution des différents paramètres dans l'effet de choc.....	71
Tableau 13 : Evolution des différents paramètres de fonctionnement du bioréacteur en fonction du temps à T_s variable et vitesse constante.....	78
Tableau 14 : Evolution des différents paramètres de fonctionnement du bioréacteur en fonction du temps à T_s constant et vitesse variable.....	79

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes réactionnels de la métabolisation aérobie de la pollution carbonée.....	15
Figure 2 : Les différentes phases de la métabolisation anaérobie de la pollution carbonée.....	16
Figure 3 : Représentation schématique du biofilm bactérien.....	22
Figure 4 : Adsorption des composés organiques sur la surface.....	24
Figure 5 : Les différentes étapes de fixation des cellules bactériennes sur une surface.....	25
Figure 6 : courbe de croissance d'un biofilm bactérien.....	27
Figure 7 : Illustration des quatre phases constitutives d'un milieu poreux non saturé colonisé..	34
Figure 8 : Évolution de concentration en substrat dans un système de biofilm.....	36
Figure 9 : Représentation de la tortuosité d'un pore.....	39
Figure 10 : Schématisation des différents flux d'oxygène entre air atmosphérique et biofilm..	40
Figure 11 : Représentation d'un biofilm non saturé.....	41
Figure 12 : Les éléments constituant du dispositif expérimental.....	50
Figure 13 : Evolution de l'abattement de la DBO (%) en fonction du temps pour différentes charges de l'effluent.....	58
Figure 14 : Evolution de la perte de charge en fonction du temps pour différente charge de l'effluent.....	60
Figure 15 : Evolution du pH en fonction du temps pour différentes charges de l'effluent.....	61
Figure 16 : Evolution de la conductivité électrique du milieu en fonction du temps pour différentes charges de l'effluent.....	64
Figure 17 : Evolution de l'abattement de la DBO et la perte de charge en fonction du temps suivant l'évolution du biofilm (15600 mg/l)	65
Figure 18 : Evolution de l'abattement de la DBO et la perte de charge en fonction du temps suivant l'évolution du biofilm (2100 mg/l)	65
Figure 19 : Evolution de l'abattement de la DBO (%) et de la perte de charge en fonction de l'évolution du biofilm (450 mg/l)	66
Figure 20 : Evolution du pH et la conductivité électrique avec l'évolution du biofilm en fonction du temps (S_1)	69
Figure 21 : Evolution du pH et la conductivité électrique avec l'évolution du biofilm en fonction du temps (S_2)	69
Figure 22 : Evolution du pH et la conductivité électrique avec l'évolution du biofilm en	

fonction du temps (S_3)	69
Figure 23 : Evolution des différents paramètres dans l'effet de choc.....	72
Figure 24 : Evolution du rendement l'abattement de la DBO (%) en fonction du temps de séjours pour une vitesse $V = 2.6$ ml /min.....	75
Figure 25 : Evolution du rendement de l'abattement de la DBO (%) en fonction de la vitesse pour un temps de séjours $T_s = 7$ min.....	76
Figure 26 : Evolution l'abattement de la DBO (%) et la perte de charge en fonction du différent temps de séjours à une vitesse $V = 2.6$ m1/min.....	81
Figure 27 : Evolution l'abattement de la DBO (%) et la perte de charge en fonction du temps en jours pour différentes vitesses et un $T_s = 7$ min	82

LISTE DES NOTATIONS ET SYMBOLES UTILISES

q	Débit spécifique de l'alimentation	[L.T ⁻¹]
K	Conductivité hydraulique	[L.T ⁻¹]
H	Charge hydraulique totale	[L]
θ	La teneur en eau	-
D	Coefficient de diffusion au point considéré	[L ² .T ⁻¹]
D _w	Coefficient de diffusion du substrat dans l'eau	[T ⁻¹ .L ²]
S*	Concentration en substrat sur la surface de biofilm	[M.L ⁻³]
S	Concentration de substrat dans la phase liquide en bloc	[M.L ⁻³]
N	Flux de substrat dans la couche laminaire	[M.L ⁻² .T ⁻¹]
J	Flux diffusif d'oxygène par unité de surface	[M.L ⁻² .T ⁻¹]
C	Concentration d'oxygène dans la phase gazeuse	[M.L ⁻³]
R	Vitesse de consommation du biofilm	[L.T ⁻¹]
δC	Gradient de concentration dans la direction	[M.L ⁻³]
S ₁	Concentration de substrat dans l'effluent 1	[M.L ⁻³]
S ₂	Concentration de substrat dans l'effluent 2	[M.L ⁻³]
S ₃	Concentration de substrat dans l'effluent 3	[M.L ⁻³]
S ₄	Concentration de substrat dans l'effluent 4	[M.L ⁻³]
ΔP ₁	Perte de charge de l'effluent 1	[L]
ΔP ₂	Perte de charge de l'effluent 2	[L]
ΔP ₃	Perte de charge de l'effluent 3	[L]
ΔP/H ₁	Perte de charge de l'effluent 3 pour une hauteur de 8cm	[L]
ΔP/H ₂	Perte de charge de l'effluent 3 pour une hauteur de 16cm	[L]
ΔP/H ₃	Perte de charge de l'effluent 3 pour une hauteur de 25cm	[L]
ΔP _v	Perte de charge à vitesse constante	[L]
Con	Conductivité	[ms.cm ⁻¹]
R	Coefficient de corrélation	-

L : La longueur en mètre M : La Masse en Kg T : Le temps en seconde

Première partie
Synthèse bibliographique

Chapitre I
Principes de l'épuration des
eaux résiduaires

Les rejets des eaux usées domestiques constituent actuellement une préoccupation majeure du citoyen. L'impact de ces rejets sur l'environnement et sur la santé humaine est alarmant. La pollution des eaux, des sols, la désertification, l'émergence de maladies nouvelles sont autant de maux attribués à la nature et au volume de ces effluents qui ne cesse d'augmenter.

A l'échelle de deux communes, Chlef et Chettia, la quantité d'eaux usées d'origines domestiques rejetées dans la rivière sans traitement est estimée à 6 millions de mètre cube pour l'année 2004. Cette quantité représente 30 % de la totalité des eaux destinées à l'irrigation de la moyenne Cheliff (OPIC ,2004).

La totalité de ces eaux est évacuée dans la nature sans traitement. Les stations d'épuration existantes sont à l'arrêt ou en dysfonctionnement. Les causes majeures sont le coût onéreux de l'opération de traitement, d'une part, et d'autre part la maîtrise de leur fonctionnement en terme de compétence, de pièces de rechange et de réactifs. Les stations existantes fonctionnent de la façon suivante : les eaux usées subissent un traitement primaire de dégrillage et de décantation suivit d'un traitement secondaire qui consiste à les débarrasser des matériaux en suspension par coagulation-floculation et enfin un traitement tertiaire ou de finition dont l'objectif est de produire une eau qui répond aux normes de rejet de ces eaux. Cette dernière opération englobe une série d'étapes qui sont : la filtration, l'adsorption sur charbon actif , l'échange d'ions et enfin une séparation membranaire. La mise en oeuvre de ce traitement de finition génère des coûts élevés en terme économique. Un tel système de traitement ne fait que transférer la pollution de l'eau et non pas à l'éliminer. Les lits bactériens fixes sont l'une des alternatives qui peuvent remplacer les procédés physico-chimiques et les traitements biologiques conventionnelles. Le lit fixe bactérien est l'une des opérations qui offre beaucoup d'avantages dans son utilisation. Parmi ses avantages : sa facilité de mise en œuvre, son économie qui ne nécessite aucun apport d'énergie ou de recours à l'importation et son volume d'occupation faible. De plus les conditions climatiques sont très favorables à l'adoption de tel système.

Dans ce contexte nous envisageons de réaliser une étude portant sur l'utilisation d'un bioréacteur à lit fixe dans le traitement secondaire ou tertiaire des eaux usées domestiques.

L'étude porte sur :

- L'efficacité d'abattement de la DBO pour différentes charges en matière organique.
- L'étude microbiologique du biofilm dans sa biodiversité.

- Le comportement du lit vis à vis des effets de chocs (concentrations de la charge organique).
- L'étude d'optimisation du bioréacteur.

CHAPITRE 1.

Introduction

L'objectif du traitement des eaux résiduaires est l'obtention d'une eau épurée qui satisfait aux normes de rejet édictées par la législation et pouvant par la suite être évacuée sans danger dans le milieu naturel ou bien être utilisée dans le cadre des mesures nécessaires à une bonne gestion de l'eau (recyclage), irrigation, milieu industriel etc.....

Selon la nature et l'importance de la pollution, différents procédés peuvent être mis en oeuvre pour l'épuration des eaux résiduaires urbaines et industrielles en fonction des caractéristiques de celles-ci et du degré d'épuration désiré.

Pour un même type de pollution, on peut aussi envisager des solutions diverses. Le choix de celles à retenir doit faire intervenir non seulement des considérations d'ordre technique liées par exemple à l'efficacité relative des divers procédés possibles, mais aussi un point de vue économique portant aussi bien sur l'estimation des frais d'investissement, que sur les frais de fonctionnement et d'exploitation.

Enfin, la solution choisie doit être suffisamment souple pour permettre des aménagements ultérieurs tenant compte de l'évolution rapide des techniques de dépollution.

I. Principes de l'épuration des eau résiduaires

I.1. Différents modes d'épuration

Les différents procédés de traitements sont classés selon l'origine, la nature de la pollution (organique ou minérale) et sa forme (soluble, colloïdale et en suspension). En fait, il est rare que l'on trouve un seul type de pollution dans un rejet qui a une composition très hétérogène. Le plus souvent, on a à faire d'une part à un mélange de produits organiques et minéraux et d'autre part ces produits sont généralement présents sous les trois formes: soluble, colloïdale et en suspension.

L'élimination de la production polluante conduit toujours – en fonction des caractéristiques physico-chimiques des rejets et du degré d'épuration souhaité – à la conception d'une chaîne de traitement constituée d'une succession d'opérations unitaires ou de stades de traitement entre lesquels il peut, dans la pratique, exister des interactions.

I.1.1. Principales filières de traitement des eaux résiduaires

On distingue classiquement la succession des stades de traitements suivants (Kurbiel J., 1991).

I.1.1.1. Traitement de dégrossissage ou prétraitement

Il a pour objet de séparer les matières les plus grossières et les éléments susceptibles de gêner les étapes ultérieures de traitement. Il comprend les opérations de dégrillage, tamisage, dessablage et déshuilage. Pour les rejets industriels, il est souvent souhaitable d'assurer leur homogénéisation de composition au niveau d'un bassin tampon de tête, qui permet par ailleurs d'éviter les variations du débit hydraulique et d'assurer si nécessaire une préneutralisation.

Le prétraitement existe quelle que soit la filière utilisée, mais peut être réduit dans certains cas au simple dégrillage.

I.1.1.2. Traitement primaire

C'est une séparation physique, liquide solide, dont l'objectif est de retenir le maximum de matières en suspension présentes dans les eaux usées. Les matières en suspension que l'on peut habituellement éliminer par décantation font l'objet classiquement du traitement primaire.

Certains types de stations ne comportent pas de traitement primaire.

I.1.1.3. Traitement secondaire

Il fait généralement appel aux procédés biologiques dans lesquels on fait consommer la plus grande partie des matières organiques présentes dans les eaux usées par des bactéries aérobies ou anaérobies.

I.1.1.4. Traitement tertiaire ou de finition

C'est un traitement complémentaire permettant d'obtenir une qualité d'effluent traité supérieure à celle obtenue par les procédés biologiques classiques. Il s'agit en fait d'affiner l'eau en poussant l'épuration le plus loin possible. Le traitement tertiaire est alors un affinage qui peut être obtenu par différentes techniques (microtamisage, filtration sur sable, biofiltration ou lagunage, adsorption sur charbon actif...).

I.1.1.5. Filières de traitement des boues d'épuration

Une filière de traitement et d'élimination finale des boues est constituée par un enchaînement d'opérations élémentaires assurant une fonction bien déterminée et au niveau de laquelle il existe un grand nombre d'options. Pour l'élimination finale des boues déshydratées, on

peut envisager la mise en décharge, la valorisation agricole (ou un autre type de valorisation) et l'incinération.

I.2. Traitements biologiques des eaux résiduaires

L'élimination de la pollution organique carbonée et azotée (sous forme colloïdale ou en solution), lorsqu'elle présente une biodégradabilité satisfaisante, est essentiellement le fait des procédés biologiques d'épuration. Ils constituent le mode de traitement le plus utilisé des eaux résiduaires urbaines et de bon nombre d'eaux résiduaires industrielles, en raison de leur efficacité et de leur rusticité. Communément appelés traitements secondaires, les procédés biologiques sont généralement mis en oeuvre dans une chaîne de traitement d'eaux résiduaires. Ils se situent à l'aval, d'une part, des prétraitements assurant la séparation des matières volumineuses denses (déchets, graviers, sables) et gênantes (huiles, graisses...) et, d'autre part, des traitements de décantation primaire ou physico-chimiques dont l'objet est d'assurer l'élimination partielle, voire totale, de la pollution particulaire et, si nécessaire, de celle qui possède un caractère toxique. Notons également que dans certains cas, l'épuration biologique peut avoir pour but d'affiner la qualité de l'eau dans le cadre d'un traitement de finition ou tertiaire qui porte sur la réduction de la pollution résiduelle aussi bien carbonée qu'azotée.

I.2.1. Principes fondamentaux de l'épuration biologique

I.2.1.1. Définition des phénomènes biologiques

La décomposition de l'ensemble des matières organiques (protéïques, lipidiques ou glucidiques), formées d'un éventail de produits dont la complexité va en croissant, est le résultat de la vie des micro-organismes autotrophes et hétérotrophes, qui se développent spontanément dans les eaux résiduaires en milieu anaérobie ou aérobie.

Ces bactéries utilisent comme substrat préférentiel les matières organiques carbonées biodégradables qui sont mesurées par la DBO₅.

Selon que la combustion intracellulaire, ou oxydation, se produit aux dépens de l'oxygène dissous dans l'eau (processus aérobie) ou que, au contraire, il y a transfert de l'hydrogène du combustible brûlé, à un accepteur d'hydrogène autre que l'oxygène moléculaire (processus anaérobie), la nature des produits de dégradation élémentaires ou déchets sera différente : CO₂, H₂O ou NO₃ en aérobiose ; CO₂, CH₄, NH₃ et acides gras en anaérobiose (Mottier V., 2000).

I.2.1.2. Élimination de la pollution organique par voie aérobie

Elle s'effectue dans un réacteur où l'on met en contact les microorganismes épuratrices avec l'eau à épurer. Si la masse bactérienne est en suspension dans un bassin aéré, on parlera de

procédés à cultures libres type boues activées si la biomasse est fixée ou retenue sur ou par un support solide on parlera de procédés à cultures fixées type lit bactérien ou biofiltre bactérien.

Biologiquement parlant, les mêmes phénomènes aérobie interviennent dans les deux types de réacteurs. On peut considérer que le processus d'épuration aérobie s'effectue en trois étapes essentielles successives :

- § adsorption et absorption des matières polluantes solubles et colloïdales de l'effluent par les cellules bactériennes ;
- § oxydation biochimique et dégradation enzymatique des matières ainsi fixées. Cette opération fournit l'énergie aux micro-organismes (catabolisme), qui sera nécessaire à la synthèse cellulaire et à la multiplication des micro-organismes (anabolisme), aboutissant à un accroissement de la masse cellulaire totale ;
- § autodestruction de la matière cellulaire (respiration endogène).

Les micro-organismes impliqués sont du type facultatif, hétérotrophe ; ils utilisent à la fois le carbone organique comme source d'énergie et comme source pour la synthèse cellulaire.

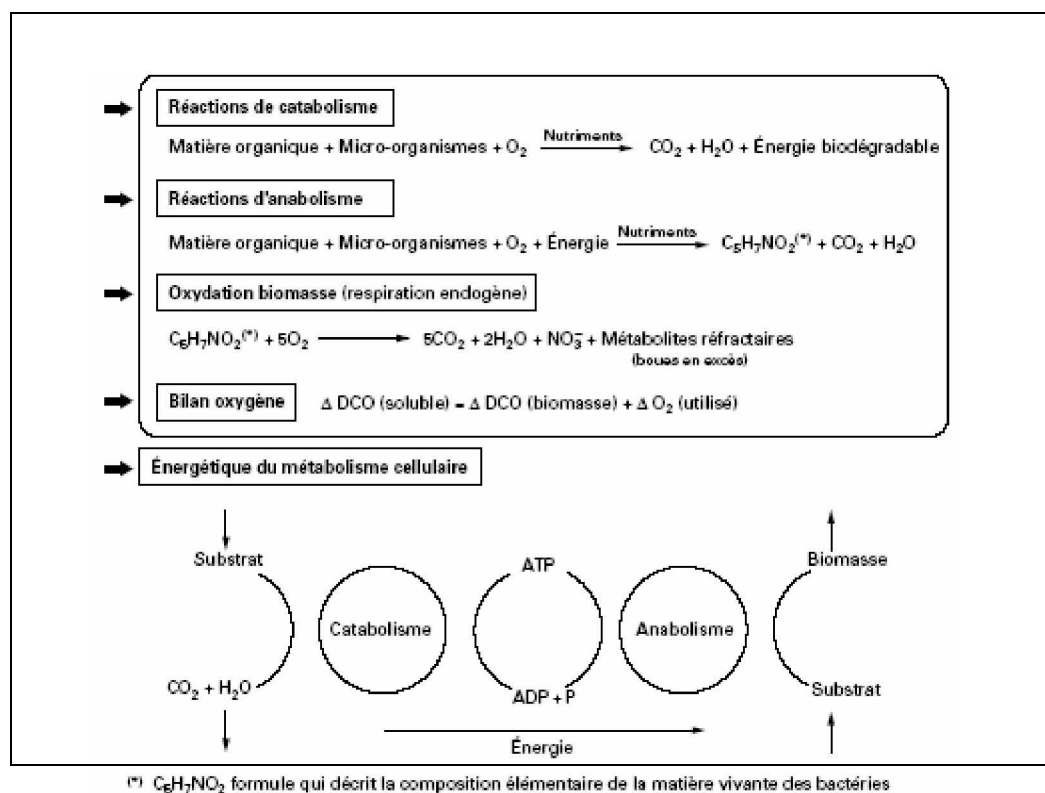


Figure 1 : Mécanismes réactionnels de la métabolisation aérobie de la pollution carbonée

I.2.1.3. Élimination de la pollution organique par voie anaérobie

La dégradation en milieu anaérobie de la pollution organique (appelée fermentation méthanique) s'effectue en deux étapes principales (figure 2) :

- § Une phase acide de liquéfaction (hydrolyse) des composés organiques aboutissant à la formation d'acides gras volatils (AGV) ;
- § Une phase de gazéification ou méthanogénèse dont les produits finaux sont le méthane (CH_4) et le dioxyde de carbone (CO_2). À chaque phase de fermentation intervient un groupe spécifique de micro-organismes. On distingue plus particulièrement :
 - § Les bactéries de fermentation, responsables de l'hydrolyse de la matière organique (protéines, lipides, polysaccharides) et de leur dégradation en acides gras volatils (essentiellement acides acétique, propionique et butyrique), en alcool (éthanol), en H_2 et CO_2 ;
 - § Les bactéries acidogènes « produisant les H^+ » et utilisant les substrats précédents pour produire des acétates, de l'hydrogène et quelquefois du CO_2 ;
 - § Les bactéries méthanogènes qui produisent le biogaz ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) à partir des substrats élaborés dans les phases précédentes.

Les bactéries anaérobies strictes, assurent la bonne marche d'un réacteur anaérobie. Leur temps de génération s'avérant dix fois inférieur à celui des acidogènes, elles constituent le facteur limitant de la méthanisation (Andreoni. V ,1989).

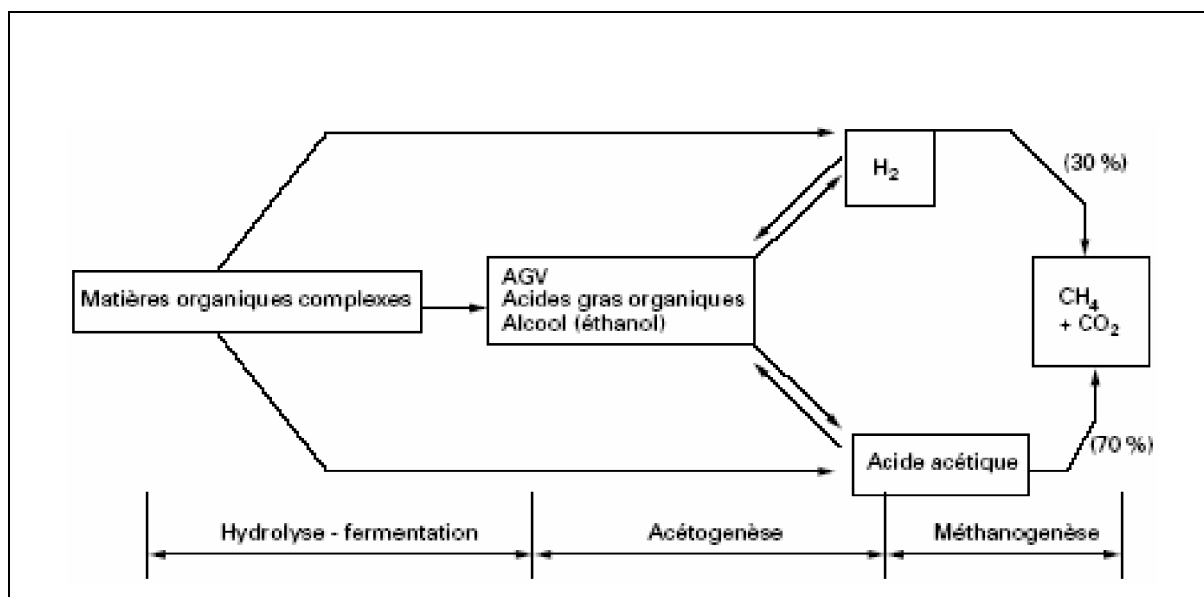


Figure 2 : Les différentes phases de la métabolisation anaérobie de la pollution carbonée

I.3. Les technologies de traitement par des cultures bactériennes fixées

Les procédés biologiques à cultures bactériennes fixées dérivent d'une intensification des processus naturels d'épuration et de filtration par le sol. Le plus ancien de ces procédés est celui du lit bactérien (Boeglin J.C., 1997).

I.3.1. Les lits bactériens

I.3.1.1. Principe de fonctionnement et constitution

Le principe consiste à faire passer l'eau à traiter, préalablement décantée, sur un garnissage poreux ou caverneux accumulé sur une hauteur convenable et qui sert de support aux micro-organismes épurateurs. La microflore se développe à la surface du support sous forme de pellicules membraneuses très riches en colonies microbiennes.

La pollution contenue dans l'eau et l'oxygène de l'air diffusent à travers le film biologique jusqu'aux micro-organismes épurateurs tandis qu'inversement les sous-produits et le dioxyde de carbone s'éliminent dans les fluides en circulation.

Le film biologique comporte des bactéries hétérotrophes généralement proches de la surface et des autotrophes (bactéries nitrifiantes) près du support.

On distingue deux grandes familles de lits bactériens (Boeglin J.C., 1997).

I.3.1.2. Lits bactériens à support naturel

Ils sont constitués par des matériaux à base de scories, de pouzzolane, de coke, de mâchefers, etc., de faibles dimensions (4 à 8 cm) accumulés sur une hauteur de 1 m (minimum) à 4 à 5 m (maximum).

I.3.1.3. Lits bactériens à garnissage plastique

De surface spécifique élevée (80 à 220 m²/m³), ces remplissages, constitués de matériaux synthétiques (PVC, polystyrène) empilés en « vrac » ou sous forme de plaques ondulées ou de tubes cloisonnés, sont très légers ($\rho = 40$ à 80 kg/m³) et possèdent un fort pourcentage de vides (94 à 98 %).

I.3.2. Les biofiltres

I.3.2.1. Principe de fonctionnement

Les techniques par cultures fixées sur milieu granulaire fin sont d'un développement récent essentiellement sous forme de lits fixes (DegrémonT.1989). Le développement actuel de cette technique vise à réaliser simultanément, dans le même ouvrage, la réaction biologique de dégradation de la pollution par la biomasse épuratrice et la clarification par filtration de l'effluent traité.

I.3.2.2. Les biométhaniseurs à cultures fixées

Dans ces techniques, on s'efforce de fixer la culture bactérienne anaérobie sur un support solide de façon à permettre la montée en concentration de la biomasse active dans le réacteur sans nécessiter de clarification séparée, ni de recyclage.

Deux technologies ont été développées celle du lit fixe ou filtre anaérobie et celle du lit mobile. Ces dernières années ont vu le développement de divers procédés de méthanisation par cultures fixées en lit fixe. Ces procédés utilisent divers matériaux supports de granulométrie et indice de vide très variables.

Les matériaux plastiques, les plus couramment utilisés, sont comparables à ceux utilisés sur les lits bactériens aérobies à remplissage plastique. L'alimentation du réacteur peut être prévue soit à flux ascendant, soit à flux descendant avec recyclage de l'effluent filtré si nécessaire pour améliorer l'hydraulique du réacteur. Ce dernier comporte un dispositif de répartition de l'effluent à traiter adéquat ainsi qu'un système d'élimination périodique de la boue en excès. Le procédé de méthanisation en lit mobile ou fluidisé utilise des cultures bactériennes anaérobies fixées sur un support mobile.

La technologie consiste à fixer les bactéries sur un matériau support granulaire mis en expansion ou en fluidisation dans le réacteur, par le courant ascendant du liquide à traiter. Le matériau support minéral (argile expansée cuite à haute température ,la Biolite). L'intérêt de cette technologie réside dans la colonisation très rapide du matériau, la possibilité de maintien dans le réacteur d'une concentration en biomasse fixée très importante tout en assurant un contact très intime entre la biomasse et l'effluent.

I.3.3. Les avantages et les inconvénients des lits bactériens

Il est intéressant de situer les avantages et les inconvénients des lits bactériens par rapport aux procédés par boues activées.

I.3.3.1. Avantages

- § Système d'épuration robuste et simple nécessitant peu d'entretien et de contrôle ;
- § Compacité des ouvrages pour les lits à remplissage plastique, peu sensibles au colmatage par ailleurs ;
- § Faible dépense d'énergie au pompage (alimentation, recyclage).

I.3.3.2. Inconvénients

- § Performances épuratoires moins élevées que les systèmes à boues activées ;
- § Pour les lits classiques surtout : sensibilité au colmatage d'où nécessité de prétraitements particulièrement performants et d'une décantation efficace ;
- § Risques de sources d'odeurs non négligeables et de pullulation d'insectes divers.

Chapitre II
Le Biofilm

CHAPITRE 2.

Introduction

Dans la nature la microflore planctonique existante dans un écosystème représente 5 à 10% de la microflore totale. Celle qui est attachée est majoritaire (90 à 95%). Cet attachement est un comportement essentiellement écologique.

Dans un milieu aqueux, la plupart des micro-organismes peuvent se fixer sur presque chaque surface submergée. La croissance cellulaire et l'attachement de ces micro-organismes sur la surface suivie par la production d'exopolysaccharides, mènent finalement à la formation des biofilms. Cette capacité des bactéries de s'organiser et de se fixer sur une surface leur confère des avantages qui renforcent la compétitivité des bactéries fixées vis-à-vis des populations planctoniques (Guy M., 1985)

II.1. Définition

Le biofilm est défini comme étant une communauté microbienne adhérente à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires (Characklis et Marshall 1990). Carpentier (1999) précise que cette surface doit être au moins humide.

Ces films biologiques sont essentiellement constitués de cellules microbiennes, d'exopolymères (exopolysaccharides) et d'eau. Ils se présentent sous forme d'un gel de d'exopolysaccharides à l'intérieur duquel se trouvent les microorganismes.

II.2. Structure et organisation

La structure spatiale du biofilm a été décrite comme une monocouche de cellules incluses dans une matrice homogène et gélatineuse avec une densité, une porosité et une épaisseur spécifique. (Figure 3)

L'observation des biofilms au moyen de techniques récentes, non destructives, comme la microscopie confocale à balayage laser révèle une architecture bien particulière: ils sont constitués très souvent d'amas de bactéries enrobées dans la matrice d'exopolymères et sont parcourus d'un réseau de canaux dans les quel le milieu peut circuler (Palmer et al., 1997). Ces canaux assurent le transport de nutriments, de déchets, d'enzymes, de métabolites et d'oxygène. (Dupont, 1997).

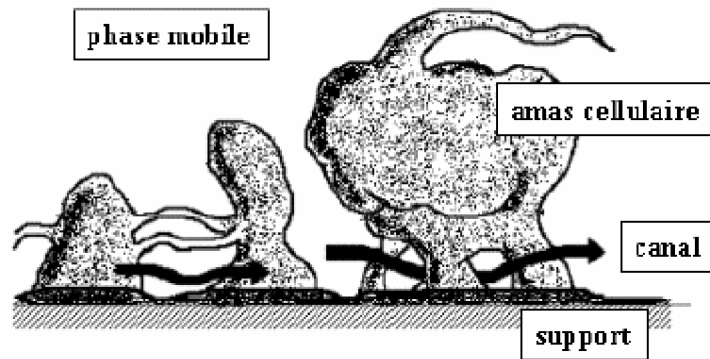


Figure 3 : Représentation schématique du biofilm bactérien

II.3. Formation du biofilm

La formation du biofilm est un phénomène complexe se déroulant en plusieurs étapes influencées par des facteurs autant physico-chimiques que biologiques. Le nombre d'étapes présentées dans la littérature varie en fonction des auteurs et du niveau de détail auquel ils décrivent le phénomène. Trois étapes majeures peuvent être retenues :

- Transport des cellules vers la surface.
- Adhésion.
- Croissance.

II.3.1. Le transport des cellules vers la surface

Le transport des cellules vers la surface s'effectue selon divers mécanismes et leurs combinaisons. Ce sont principalement les conditions hydrodynamiques qui régissent ce transport (Crague, 1993). En environnement non agité, la gravité et la sédimentation jouent le plus grand rôle. En conditions d'écoulement laminaire, la diffusion moléculaire devient le facteur prédominant. Les mouvements convectifs interviennent dans les conditions d'écoulements turbulents. La mobilité propre des cellules ne jouerait qu'un rôle secondaire. Selon les auteurs elle n'interviendrait qu'à proximité des surfaces (Annachatre et Bhamidimarri, 1992) ou seulement en environnement non agité (Criddle, 1991). Les mouvements actifs d'une cellule sont motivés par chimiotaxie positive (vers une source de nourriture) ou négative (depuis une zone de présence d'une substance toxique).

II.3.1.1. L'adhésion des microorganismes aux surfaces

D'après Prigent C. et al.,(1999), l'adhésion des micro-organismes est précédée de l'adsorption de molécules en solution dans le liquide environnant.

Ces molécules sont par exemple, des éléments nutritifs. Elles constituent alors un film conditionnant qui modifie les propriétés physico-chimiques du support et pourrait servir de point d'encrage aux cellules (figure 4).

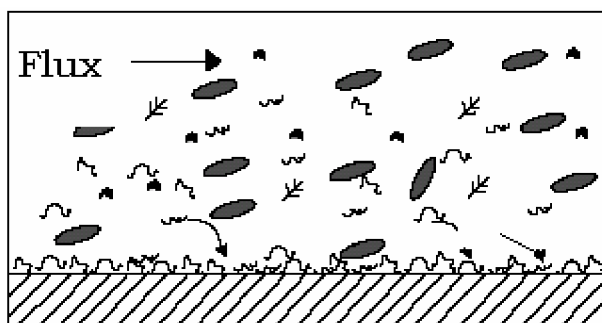


Figure 4 : Adsorption des composés organiques sur la surface (Characklis, 1990)

En conditions naturelles, cette adsorption est très rapide (quelques dizaines de minutes) après la mise en contact de la surface avec le liquide. Lorsque la quantité de nutriments est limitante, les organismes fixés bénéficient donc de conditions plus favorables à leur croissance.

L'adsorption des molécules est régie par les mêmes forces que celles qui gouvernent l'adhésion des microbes (Carpentier, 1999). L'adhésion n'est rendue possible que par l'approche des micro-organismes de la surface. Cette approche relève de la sédimentation sous l'effet des forces de gravité, des forces engendrées par le liquide en mouvement, du thermo- et du chimiotactisme, d'un mouvement perpétuel aléatoire et des mouvements du microbe lorsqu'il est cilié (Boulangé P., 1996; Carpentier, 1999).

Lorsque les micro-organismes sont à une faible distance de la surface (du nanomètre à quelques dizaines de nanomètres), l'adhésion fait intervenir différents types d'interactions que l'on pourrait classer en interactions électrostatiques et non électrostatiques. Les forces électrostatiques se créent lorsque le contact s'établit entre le support et la double couche électrostatique du micro-organisme connecté à des groupes chargés. Elles peuvent être évaluées en déterminant le « potentiel zêta » à partir de mesures électrocinétiques. Le potentiel zêta est le

potentiel de la double couche électrique tout près de la surface d'un solide (Leveau et Bouix, 1999).

Les interactions non électrostatiques sont les forces attractives de Van der Waals, les interactions acido-basiques et métalliques, les liaisons covalentes et les liaisons ioniques. Les interactions acido-basiques (ou polaires) impliquent des groupements donneurs et des groupements accepteurs d'électrons. Elles sont attractives ou répulsives.

II.3.1.2. Théories de l'adhésion

Aujourd'hui, l'adhésion d'un micro-organisme est décrite au moyen de deux théories : la théorie de DLVO (Dergaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948) qui prend en compte les interactions électrostatiques et de Van der waals, mais aucun autre type d'interaction non électrostatique, et la théorie de la mouillabilité qui prend en compte les forces de Van der Waals et les interactions acido-basiques, mais pas les interactions électrostatiques. Celle-ci est donc applicable si le milieu d'attachement contient une forte concentration d'électrolytes. La théorie de la mouillabilité s'inspire de la thermodynamique et prend en considération les forces intermoléculaires agissant au niveau de l'interface solide-micro-organisme. Elle fait appel à des notions comme l'énergie de surface d'un corps et l'hydrophobicité de surface, mesurées à partir de ce que l'on appelle l'angle de contact.

Selon (Ho, 1986; Characklis et Marshall, 1990) l'adsorption des cellules sur le substratum passe par deux étape :

- § Une adsorption réversible lorsque la distance entre la surface et les cellules est grande de l'ordre (5 à 10 nanomètre).
- § Une adsorption irréversible lorsque la distance est très courtes (inférieur à un nanomètre).

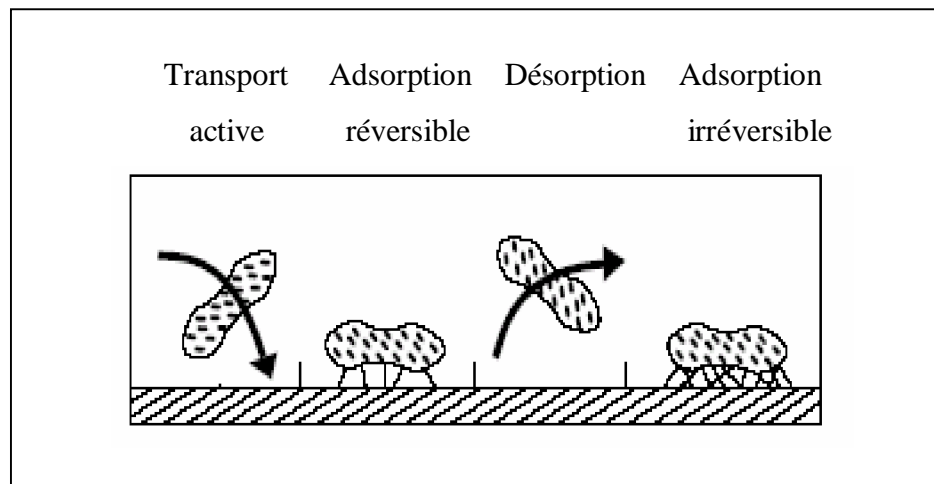


Figure 5 : Les différentes étapes de fixation des cellules bactériennes sur une surface
(Characklis et Marshall, 1990)

II.3.1.3. Les facteurs d'influence sur l'adhésion

Les processus physico-chimiques intervenant dans l'adhésion des microorganismes dépendent du microorganisme, du substratum et du milieu liquide environnant (Boulangé P., 1996).

II.3.1.3.1. L'espèce bactérienne

L'espèce bactérienne a une grande importance dans la capacité d'adhésion des microorganismes sur une surface. La relation entre la force de l'attachement et l'hydrophobicité du microorganisme a été étudiée par de nombreux auteurs. (Marin et al., 1997) ont montré une corrélation entre la solidité de l'attachement et l'hydrophobicité. Pour d'autres auteurs il semble que l'hydrophobicité de surface ne joue un rôle que dans le cas de cellules hydrophobes, alors que l'adhésion d'organismes hydrophiles est dominée par leur potentiel électrocinétique (la mobilité).

La motilité peut aider les cellules pour venir près du substratum, les flagelles ou pili confèrent des avantages à la fixation, en faisant des ponts entre la cellule et la surface (Characklis et Marshall, 1990).

De plus la capacité du microorganismes à synthétiser des macromolécules (les polysaccharides) qui favorisent la fixation des cellules, durant les premiers stades de l'adhésion, ces macromolécules peuvent s'adsorber sur la surface et la recouvrir partiellement ou

complètement, en modifiant son énergie et sa charge de surface (Ho, 1986; Characklis et Marshall;1990 Boulangé P.,1996).

Egalement, l'état physiologique bactériennes et les conditions de culture peuvent avoir un effet sur les mécanismes d'adsorption. La concentration initiale des cellules bactériennes en suspension affecte de surcroît l'ampleur de l'adsorption (Daniels, 1980; Van L. et al., 1987b).

II.3.1.3.2. La nature du support

La nature du support affecte l'adhésion. Gracia et al. (1997), ont montré que les espèces *Staphylococcus aureus* adhère moins bien in vitro au polyméthylmétacrylate (PMMA) et à l'os frais qu'aux alliages d'acier et de titane. Les caractéristiques énergétiques de support dépendent de sa finition et de procédé de nettoyage utilisé.

D'après Boulangé P. et al. (1997), la rugosité et la topographie ont aussi été impliquées. Bien que la rugosité soit un facteur qui pourrait interférer avec le nombre de bactéries adhérentes.

En effet la rugosité et la présence de cavités et de crevasses (rainures) favorisent l'adhésion, car plus la surface est rugueuse et plus les bactéries sont protégées des phénomènes de cisaillement hydraulique (Crague, 1993; Show et Tay, 1999).

II.3.1.3.3. Le milieu environnant

Les caractéristiques physico-chimiques du milieu environnant, les bactéries et le substratum influencent fortement l'adhésion des bactéries, en modifiant les charges ioniques, l'épaisseur de la double couche et l'hydrophobicité du support.

La présence de certains cations, la forme ionique du milieu, le pH et la température sont les paramètres les plus étudiés.

L'addition des cations monovalents (Na^+ et K^+) divalents tels que des ions de Ca^{+2} , Mg^{+2} et trivalents Ga^{+3} , Al^{+3} améliorent l'adsorption des cellules bactériennes qui possèdent des charges extérieures habituellement négatives (Fletcher, 1980a ; MacRae et Evans, 1983 ; Ho, 1986).

L'absence de ces ions divalents ou leur élimination par des complexant peut même interdire la fixation (MacRae et Evans, 1983) ou déterminer le détachement d'un biofilm (Turkhia et al., 1983). Des résultats contradictoires ont été rapportés par Kahane et al. (1979).

Un pH acide favorise l'adsorption des bactéries sur magnétite (MacRae et Evans, 1983). Cependant, dans d'autres situations, un pH neutre favorise la fixation de *E.coli* (Jourdain, 1983).

Selon Jourdain (1983), l'augmentation de la température de quelques degrés Celsius se traduit par l'augmentation de la de fixation des bactéries (gram+ ou gram -).

II.3.1.4. La croissance des biofilms

Plusieurs auteurs ont étudié le développement des biofilms, et ont divisé sa croissance en trois étapes : induction, accumulation et plateau (Bryers et Characklis, 1981; Trulear et Characklis, 1982). L'approche de Belkhadir (1986) et de Nguyen (1989) est intéressante parce que ces auteurs distinguent le comportement de biofilm et l'évolution parallèle de la phase liquide.

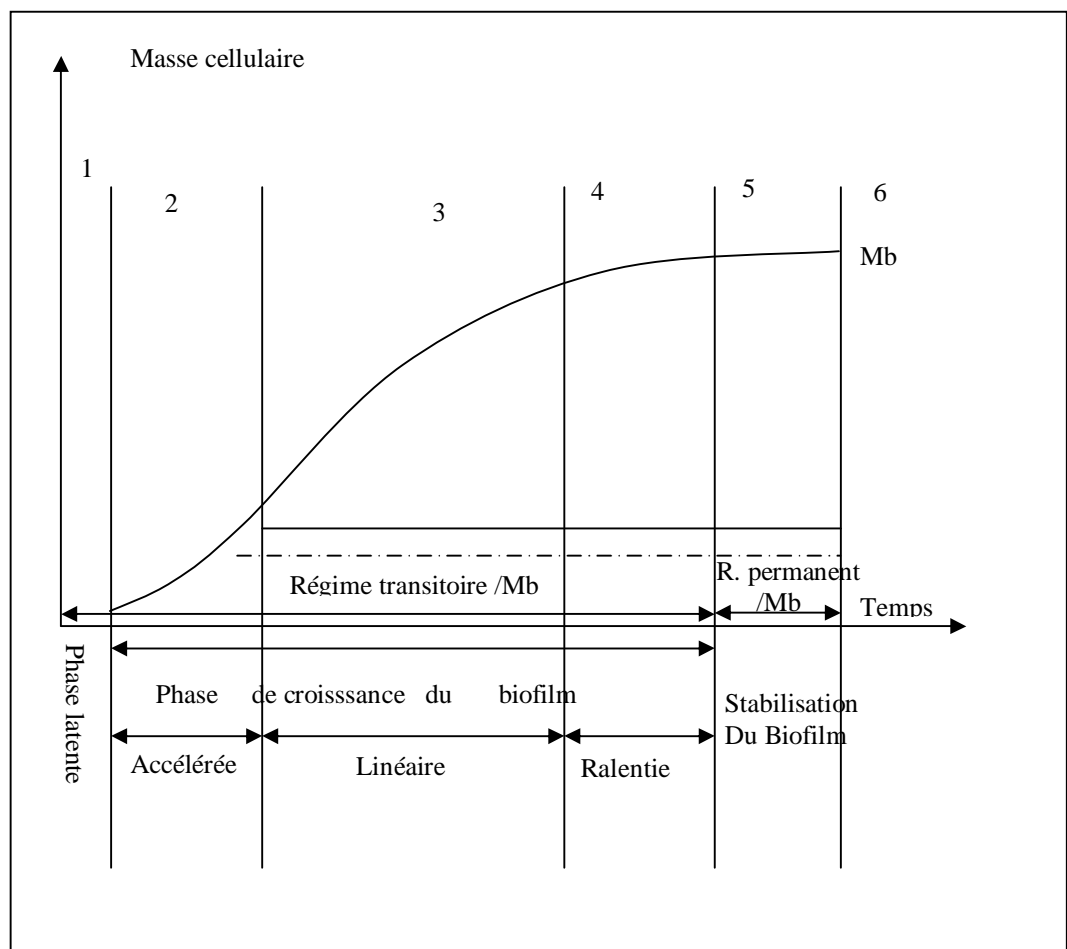


Figure 6 : courbe de croissance d'un biofilm bactérien d'après (Belkhadir 1986)

- **Phase de latence**

Cette phase correspond au début du développement du biofilm qui se fait en deux étapes : une étape passive durant laquelle les composés organiques sont adsorbés sur la surface (Film conditionnant) et une étape active correspond à l'adhérence des bactéries. Du point de vue cinétique, cette phase est particulièrement difficile à contrôler mais il est possible d'observer l'implantation des bactéries dans les pores.

- **Phase dynamique ou phase accélérée de croissance**

Cette phase est caractérisée par:

- o Une diminution importante du substrat et de la concentration d'oxygène dissout à travers le réacteur pour les biofilms aérobies.
- o Production élevée de produits de fermentation pour les biofilms anaérobies (éthanol, acide acétique)
- o Une accumulation de la biomasse immobilisée résulte de la croissance des microcolonies d'une part et la fixation de nouvelles colonies d'autre part. A la fin de cette phase, la surface est totalement couverte par la biomasse et la concentration en substrat à travers le réacteur tend vers une valeur limite.

- **Phase de croissance linéaire**

Cette phase correspond à une évolution et une accumulation de biofilm sur le support à un taux constant et maximal. Durant cette phase la concentration de substrat à la sortie du réacteur est minimale tandis que la concentration du produit ou la demande de l'oxygène sont maximum (biofilms aérobies). Ceci représente un état d'équilibre dans la phase liquide.

- **Phase de décélération**

Une phase de ralentissement, qui correspond à un début d'équilibre du biofilm entre le taux de multiplication et d'accumulation des microorganismes et le taux de son détachement. Ceci met en évidence l'influence des facteurs hydrodynamiques sur le développement du biofilm. Cette phase à une durée relativement courte est habituellement fusionnée dans la phase supplémentaire de stabilisation, particulièrement quand les forces de cisaillement sont élevées.

- **Phase de stabilité**

(Bryers et Characklis, 1981 ; Trulear et Characklis, 1982) ont appelé cette phase (le plateau). Elle est caractérisée par des valeurs constantes et maximales en masse et épaisseur de biofilm. Ceci correspond à l'établissement d'un état d'équilibre en ce qui concerne le biofilm. Cette phase dépend des conditions environnantes telles que la concentration du substrat en alimentation ou les efforts de cisaillement hydrodynamiques.

- **Phase de détachement**

La dernière phase de la croissance du biofilm se poursuit par le phénomène de détachement. Les mécanismes de cet arrachage ne sont pas bien connus tels que la mort d'une couche de cellules intérieure, effort de cisaillement, limitations du substrat, accumulation des métabolites. Le détachement intervient seulement à la fin de croissance afin de modérer l'épaisseur de biofilm.

II.3.1.5. Les polysaccharides et la colonisation de surface

La colonisation d'une surface par les microorganismes est due à des phénomènes biologiques comme la prolifération cellulaire et l'adhésion intercellulaire qui s'accompagnent par la production de polymères exocellulaires.

La plupart des microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme, où ils sont utilisés par la bactérie comme source d'énergie. D'autres sont des composants de la paroi tels que les peptidoglycanes et les acides téichoïques. Enfin, un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule.

Le terme "exopolysaccharides" (EPS) ou "polysaccharides exocellulaires" a été proposé par Sutherland (1972) et (Cerning et al., 1994) comme appellation générale pour ce groupe. Le polysaccharide peut soit être excrété dans le milieu environnant, soit rester lié à la surface de la cellule sous forme de capsule.

Les EPS peuvent être subdivisés en deux groupes: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Les homopolysaccharides sont constitués d'un seul type de monomère saccharidique, les hétéropolysaccharides peuvent contenir plusieurs types de sucres. Parmi les homopolysaccharides, on retrouve les α -glucanes généralement composés des résidus de glucose

liés en α -1,6 et α -1,3; comme les dextrans produits par *Leuconostoc mesenteroides* et les glucanes par *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus*.

Les hétéropolysaccharides sont formés d'unités répétitives, variables dans leur taille (de di- à octasaccharides), mais aussi d'autres groupes peuvent être présents, tels des groupements phosphates, aminos ou acétyles .

Dans l'environnement naturel, les micro-organismes se trouvent souvent en haute densité cellulaire dans un biofilm. La production d'un glycocalyx, qui est composé principalement d'EPS, est essentielle pour la formation d'un biofilm. C'est l'EPS qui rend la bactérie capable de s'attacher aux surfaces et qui la protège contre les surfactants et même les antibiotiques (O'Toole et al., 2000a). De plus, si un biofilm est composé de plusieurs souches, leurs produits métaboliques peuvent servir comme substrat pour une autre et la capacité de s'attacher d'une cellule peut procurer des sites d'attachement à d'autres (Dunne, 2002).

La grande diversité structurale des polysaccharides microbiens témoigne de l'adaptation des microorganismes à des environnements très différents.

II.3.1.6. Les communautés microbiennes des biofilms

D'après Mouton (1999), l'adhésion intermicrobienne peut être homotypique ou hétérotypique. Lorsqu'elle est homotypique, elle assure alors la cohésion entre individus de la même espèce et conduit à la formation de microcolonies au sein d'une communauté. Lorsqu'elle est hétérotypique, elle se produit entre individus de genres ou d'espèces différents et selon qu'elle concerne des bactéries du même genre ou de genres différents, elle est dite intra générique ou inter générique. On retiendra la grande diversité des mécanismes de fixation, en rapport avec l'existence d'un ou de plusieurs moyens de fixation propre à chaque micro-organisme et la grande diversité des bactéries.

L'activité métabolique des bactéries en place modifie l'environnement permettant à de nouvelles bactéries inadaptées au milieu de trouver des conditions propices à leur établissement.

II.4. Composition microbiologique des biofilms

Biologiquement un film mûr est composé d'une communauté assez complexe, ou l'on trouve les organismes suivant (Edeline F.,1993) :

II.4.1. Les protozoaires

Les protozoaires constituent un groupe très hétérogène de protistes eucaryotes unicellulaires ; mobiles. La plupart d'entre eux sont aquatiques non parasites .Ils se nourrissent de bactéries et ont de ce fait, un grand rôle dans la clarté des effluents.

II.4.2. Les levures et les moisissures

Ce sont des organismes eucaryotes uni ou multicellulaires.

II.4.2.1. Les moisissures

Les champignons filamenteux (ou moisissures) sont des hétérotrophes, certains sont symbiotiques ou parasites des végétaux ou des animaux, d'autres sont des saprophytes se développant sur des déchets organiques. Les moisissures sont généralement aérobies, acidophiles (se développant à des pH compris entre 3 et 7) et mésophiles (températures optimales comprises entre 20 et 30°C).

II.4.2.2. Les levures

Selon (Guiraud ,1998) les levures sont des champignons unicellulaires (au moins dans la plus grande partie de leur cycles biologique) constituent un groupe morphologique et physiologique relativement homogène. Leur cellules sont sphériques, elliptiques ou apiculées (en citron) limitées par une paroi riche en polysaccharides antigéniques. La membrane cellulaire est constituée des protéines et de lipides. Le cytoplasme contient des vacuoles, des ribosomes des mitochondries, un ergastoplasme et des réserves (tréhalose, glycogène, etc.).

Les levures sont immobiles ; certaines espèces possèdent une capsule polysaccharidiques. La taille des cellules varie entre 5 et 20 µm. Les levures ont une reproduction de type végétatif et parfois de type sexué .La multiplication végétative s'effectue par bourgeonnement chez la plupart des espèces et par scissiparité chez quelques autres, elle correspond à une mitose. Les cellules peuvent rester accolées et donner naissance à un pseudo mycélium ou même un mycélium.

Les levures sont caractérisées par:

- Un métabolisme exclusivement oxydatif (en aérobiose) ou bien un métabolisme mixte, oxydatif et fermentaire (anaérobiose). Elles assimilent de nombreux substrats carbonés par la voie oxydative conduisant à la formation de CO₂ et H₂O. La voie fermentaire qui n'existe que chez certaines espèces conduit à la formation de l'éthanol et de CO₂ (espèces

appartenant au genre *Saccharomyces*). D'autres espèces accumulent dans le milieu de l'acide citrique à côté de l'éthanol.

- Une tolérance au pH acide (prolifèrent dans une gamme de pH comprise entre 3 et 7,5. D'autres se développent jusqu'à un pH de 1,5).
- Une croissance à des températures optimales voisines de 25 et 28°C (mésophile). Cependant il existe des espèces psychrophiles et thermophiles.
- Une multiplication à une activité de l'eau (a_w) comprise entre (0.92 et 0.65).

II.4.3. Les bactéries

La flore bactérienne constituante des eaux usées est essentiellement d'origines fécales, la microflore fécale est caractérisée par la dominance des Entérobactéries.

Les bactéries sont des organismes unicellulaires, très petits, présentant une nette tendance au nanisme, beaucoup d'entre elles sont munies de cils vibratiles extrêmement délicats s'appelés flagelles permettant à l'organisme de nager dans l'eau. Elles sont de formes très variées, rondes bacilliformes, ou en spirales. Les bactéries sont responsables d'un certain nombre de réactions biochimiques essentielles aux surfaces du globe et en particulier de la plupart des réactions d'oxydo-réduction dont elles tirent leur énergie (Larpent J., 1997).

II.4.4. Les entérobactéries

Les entérobactéries sont une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie. Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*), soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp*).

II.4.5. Les coliformes totaux

Ce sont des entérobactéries, mobiles, capables de provoquer la fermentation du lactose à 30°C avec production de gaz. Les coliformes sont commensal du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Ils représentent à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne.

II.4.6. Les streptocoques

D'après (Merck E., 1986) les streptocoques regroupent de nombreuses espèces. Certaines sont des parasites de l'espèce humaine (streptocoques des groupes A, C et G de Lancefield), d'autres des commensaux de la muqueuse buccale (streptocoques du groupe B et streptocoques non groupables et non hémolytiques) ou de la muqueuse génitale (groupe B) ou de l'intestin (anciens streptocoques du groupe D ou entérocoques considérés maintenant comme faisant partie d'un genre à part, le genre *Enterococcus*). D'autres encore sont des commensaux des animaux ou

des saprophytes. Les streptocoques sont des Cocci de taille et de forme irrégulières, à Gram positif, groupés en chaînettes plus ou moins longues et flexueuses, immobiles, acapsulés, asporulés.

Les streptocoques sont des bactéries à métabolisme anaérobie mais aérobie tolérants et sans catalase (enzyme respiratoire).

II.4.7. Les Bacilles sporulés anaérobies (Clostridium)

Les bacilles sporulés anaérobies appartiennent au genre *Clostridium*. Le milieu naturel des uns est tellurique, pour d'autres, c'est le tube digestif des animaux et de l'homme. La majorité des espèces appartenant à ce groupe sont saprophytes et sont capables d'activités protéolytiques et/ou toxigenes (*Clostridium botulinum*).

Les bactéries du genre *Clostridium* sont à Gram positif, sporogènes et dont la plupart des espèces sont mobiles, par ciliation péritriche et sont strictement anaérobies (Guiraud ,1998).

II.5. Facteurs régissant l'activité microbienne

Pour que les microorganismes puissent vivre et se développer normalement ils doivent trouver :

- Des substances nécessaires à leur croissance en quantités suffisantes.
- Des conditions physico-chimiques favorables (pH, température, a_w , etc.)

II.6. Conditions dynamiques de formation du biofilm

La dynamique de formation de biofilms est un processus complexe qui dépend de plusieurs paramètres tel que l'écoulement du liquide, le transfert de masse, les réactions chimiques et les réactions biochimiques (Brading et al., 1995).

II.6.1. L'écoulement du liquide

L'infiltration-percolation fonctionne selon les propriétés épuratrices des sols. Mais le support de l'épuration est alors un matériau granulaire rapporté, le sable étant le matériau le plus communément utilisé. On caractérise le milieu granulaire selon sa texture, dont dépendent la dimension des pores, leur distribution, leur perméabilité et les capacités d'aération du massif (Guellaf, 1999).

La texture repose sur la répartition des particules en fonction de leur géométrie, c'est à dire, la granulométrie. La forme des grains conditionne leur agencement et ainsi influence la

dimension des pores et le comportement hydraulique du massif. La densité joue également un rôle sur la porosité en influant la compacité des massifs.

En conditions insaturées, le milieu poreux se caractérise par la juxtaposition de trois phases (figure 7). La colonisation du massif ajoute une quatrième phase, le biofilm.

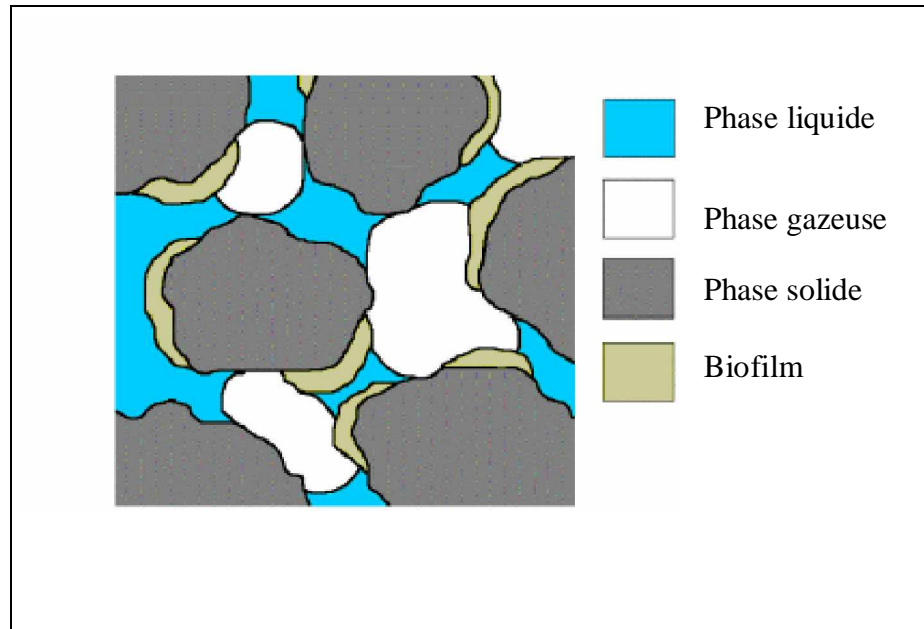


Figure7 : Illustration des quatre phases constitutives d'un milieu poreux

A l'exception du support supposé inerte, le biofilm, la phase liquide et la phase gazeuse sont continuellement en interaction et la configuration qu'occupe chaque phase évolue en permanence (Chachuat, 1998).

II.6.1.1. L'eau dans le milieu poreux

On distingue classiquement trois types d'eau au sein des milieux poreux

- L'eau gravitaire (libre, mobile) circule dans la macroporosité sous l'action de la pesanteur .son écoulement peut être long ou rapide selon l'humidité de massif.
- L'eau de rétention reste dans le sol après drainage de l'eau gravitaire
- L'eau de constitution qui rentre dans la composition chimique de la matrice n'est en principe ni échangeable ni mobilisable.
- Le biofilm se comporte comme une phase liquide immobile (Seguret, 1998) qui s'ajoute à l'eau stagnante.

II.6.1.2. L'écoulement en conditions insaturées

En conditions insaturées, l'eau n'occupe qu'une partie du vide, une fraction qui s'écoule tandis qu'une fraction reste liée au support par capillarité. Le déplacement de la fraction mobile résulte des variations de son potentiel total H (ou charge hydraulique). Ce potentiel se compose notamment du potentiel gravitationnel H_g , déterminé par rapport à un niveau de référence et correspondant à l'énergie nécessaire pour élever une masse d'eau au dessus de ce niveau. S'ajoute au potentiel H_g le potentiel de pression H_p résultant de l'action des forces de capillarité et des forces d'adsorption. La référence retenue est la pression atmosphérique.

Pour les milieux insaturés ce potentiel négatif est appelé succion.

$$H = H_g + H_p \quad (1)$$

Le transfert de l'eau est régi par les phénomènes de convection et de dispersion. La loi de Darcy relie le déplacement de l'eau au gradient de la charge hydraulique.

II.6.1.3. L'écoulement en milieu saturé

La différence fondamentale avec l'écoulement en milieu saturé réside dans le fait que la conductivité hydraulique K dépend ici de la teneur en eau. Le déplacement du biofilm modifie la perméabilité du milieu, à la fois en agissant sur la porosité et sur l'humidité du massif.

$$q = -K(\theta) \frac{\partial H}{\partial Z} \quad (2)$$

Z : la hauteur du massif [L]

La loi de Darcy exprime la relation qui existe entre le débit spécifique d'infiltration et le gradient de charge hydraulique. En milieu saturé, cette relation s'écrit :

$$q = -K_s \cdot \vec{\text{grad}} H \quad (3)$$

q : Débit spécifique de l'alimentation [$L \cdot T^{-1}$]

K_s : Conductivité hydraulique à saturation [$L \cdot T^{-1}$]

H : Charge hydraulique totale [L]

II.6.2. Les transferts dans les biofilms

L'analyse théorique de la cinétique de réaction en films microbiens est plus compliquée que dans les processus de cellules en suspension. En effet, dans le système de cellules en suspension tel que les boues activées, la dégradation est contrôlée seulement par le nombre de réactions métaboliques. Par contre, dans le biofilm, le taux de transfert de substrat et le nombre de réactions métaboliques participent tous les deux au processus de dégradation.

Les Biofilms peuvent affecter le transfert de masse d'un composé d'une manière active ou passive. Dans la manière passive, la substance qui ne réagit pas dans le biofilm trouve une région stagnante de diffusivité différente dans la phase liquide. La diffusion des molécules chargées peut également être affectée par des interactions électrostatiques.

Dans la manière active, un biofilm constitue biologiquement une couche réactive avec le substrat dans l'échange d'électrons. Le transport dans le biofilm se produit par diffusion moléculaire ou par transport convectif (Harremoës, 1978; Characklis et Marshall, 1990; Bryers, 1991; Iwai et Kitao, 1994). Lorsque le biofilm est développé, il y'aura des limitations internes de transfert de masse et de conversion du substrat par les cellules fixées, créant ainsi des gradients spatiaux non linéaires dans la concentration en substrat, le nombre de réaction et même dans la distribution d'espèces bactériennes (Bryers, 1991).

II.6.2.1. Le transfert de solutés

Avant d'être assimilée et dégradée, la pollution présente dans l'effluent sous forme dissoute, doit "atteindre" le biofilm .Pour cela le substrat traverse une couche limite, zone de transition entre écoulement en film liquide et le biofilm (Menoret 2001). Le biofilm échange lentement le substrat avec l'écoulement principal, le flux échangé (entre le biofilm et la phase liquide) dépend du gradient de concentration qui s'établit dans la couche limite (Séguret, 1998).

II.6.2.1.1. Gradient de concentration dans la phase liquide

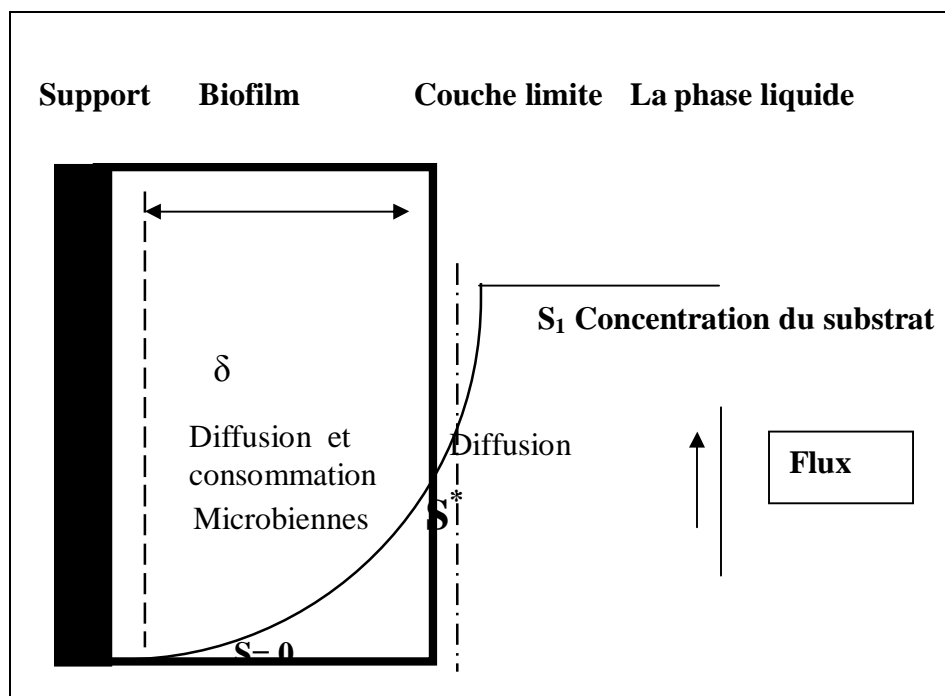


Figure 8 : Évolution de concentration en substrat dans un système de biofilm. Adapté par Van Loosdrecht et de Heijnen (1993).

- S_l : Concentration du substrat dans le liquide
 S^* : Concentration du substrat sur la surface de biofilm,
 S : Concentration en substrat dans le biofilm
 δ : Profondeur de biofilm où le substrat pénètre

L'évolution de la concentration en substrat est indiquée dans la figure 8. Dans la phase liquide et à une distance suffisante de la surface de biofilm, la concentration en substrat (S_l) est uniforme et suit la direction de l'écoulement. A l'interface eau-biofilm, il y a une diminution de turbulence et de la vitesse d'écoulement du liquide, dans cette couche de liquide, appelée "couche limite", la concentration (S_l) du substrat est diminuée et prend une nouvelle valeur notée (S^*), qui est la concentration précise de substrat sur la surface du film ($S_l > S^*$).

Le gradient de concentration dépend du coefficient de diffusion de substrat, généralement dans l'eau (D_w), et de la largeur de la couche liquide. L'épaisseur de la couche de diffusion dépend de différentes conditions, régime d'écoulement (laminaire ou turbulent), la conception de réacteur et la viscosité du liquide.

Selon Iwai et Kitao (1994), Il est possible de déterminer le flux de substrat par diffusion dans un film laminaire (la couche limite) formée par l'eau. Dans ce cas, la quantité de substrat transportée par unité de surface d'une couche et par unité de temps peut être décrit par l'équation.

$$N = -D_w \cdot \frac{dS}{dz} = \frac{-D \cdot (S^* - S_l)}{\delta} \quad (4)$$

N : Flux de substrat dans la couche laminaire [$M \cdot L^{-2} \cdot T^{-1}$]

D_w : Coefficient de diffusion du substrat dans l'eau [$T^{-1} \cdot L^2$]

S_l : Concentration de substrat au sein de la phase liquide [$M \cdot L^{-3}$]

S^* : Concentration en substrat sur la surface de biofilm [$M \cdot L^{-3}$]

δ_f : Epaisseur de la pénétration de substrat dans le biofilm [L]

z : La coordonnée perpendiculaire sur le substratum [L]

D : Coefficient de diffusion du substrat dans la couche limite [$T^{-1} \cdot L^2$]

La valeur d'épaisseur de la couche laminaire peut être calculée par des formules empiriques. Cette valeur dépend (du nombre de Reynolds (Re) et du biofilm (Iwai et Kitao,

1994). Williamson et McCarty (1976) ont déterminé une couche laminaire liquide irréversible à chaque surface de biofilm. Ils ont estimé son épaisseur à 56 μm .

II.6.2.1.2. Gradients de substrat dans le biofilm

Après la couche limite (de frontière), les composants dissous pénètrent dans le biofilm où ils sont habituellement considérés de se déplacer par diffusion. La loi de Fick a été adaptée afin de prendre en compte le volume du liquide inclus dans la matrice de biofilm.

$$N_f = D_f \cdot \varepsilon \cdot dS_f / dz \quad (5)$$

N_f : Flux de substrat par le biofilm [$\text{M.L}^{-2} \cdot \text{T}^{-1}$]

D_f : Coefficient de diffusion du substrat dans le biofilm [$\text{T}^{-1} \cdot \text{L}^{+2}$]

S_f : Concentration en substrat le biofilm [M.L^{-3}]

ε : Fraction du volume de la phase liquide dans le Biofilm [-]

z : La coordonné perpendiculaire sur le substratum [L]

Le coefficient de diffusion de substrat dans le biofilm est fonction du coefficient de diffusion du même composé à la même température, dans l'eau ($D_f = k \cdot D_w$). Cependant, l'évaluation du facteur de proportionnalité (k) est difficile, il change avec la densité, l'épaisseur et la tortuosité du biofilm ainsi que les mouvements turbulents d'écoulement à l'intérieur du biofilm (Characklis et Marshall, 1990; Archangeli, 1994; Zhang et Bishop, 1994; Lewandowski et Stoodley, 1995).

A l'intérieur du biofilm, le substrat est consommé par les micro-organismes, créant un gradient additionnel de concentration. A une certaine distance de la surface du film (d), le substrat est entièrement enlevé par les cellules fixées et sa concentration devient nulle (Van Loosdrecht et Heijnen, 1993; Iwai et Kitao, 1994).

II.6.2.2. Le transfert d'oxygène

II.6.2.2.1. Dans le milieu

Le transfert de l'oxygène par diffusion en milieux poreux s'exprime, comme dans l'atmosphère, grâce à la loi de Fick. Le coefficient de l'oxygène dans l'air D_0 est alors remplacé par un coefficient de diffusion de l'oxygène dans le milieu poreux D .

$$J = -Dx \frac{\partial C}{\partial z} \quad (6)$$

J : Flux diffusif d'oxygène par unité de surface

D: Coefficient de diffusion de l'oxygène dans le milieu poreux

C : Concentration d'oxygène dans la phase gazeuse

Il n'existe pas de loi générale permettant d'obtenir la valeur du coefficient de diffusion D. De nombreux auteurs donnent, selon les conditions expérimentales qu'ils ont rencontrées, des fonctions empiriques permettant d'estimer le coefficient de diffusivité à partir des caractéristiques du milieu poreux (Xu et al., 1992). La diffusivité est le rapport Q entre le coefficient de diffusion d'un gaz dans le milieu poreux et dans l'air.

$$Q = \frac{D}{D_0} \quad (7)$$

Q est fonction de différents paramètres du milieu, plus ou moins mesurables :

- La porosité
- L'humidité
- La tortuosité
- La constrictivité

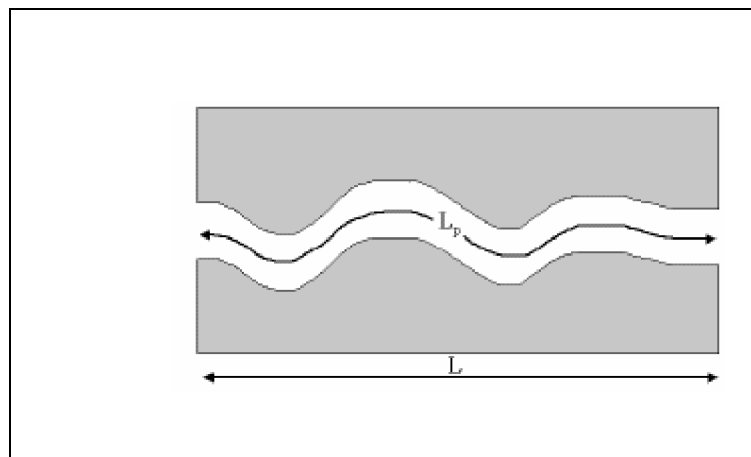


Figure 9 : Représentation de la tortuosité d'un pore

- La tortuosité est le rapport entre la longueur réelle L_p d'un pore et la longueur de l'élément du milieu poreux considéré L .
- La constrictivité caractérise les variations de diamètre de pore.

II.6.2.2.2. Vers le biofilm

Pour la plupart des auteurs, la disponibilité de l'oxygène pour le biofilm passe, comme pour les solutés, par le franchement de la phase stagnante. Eckenfelder (1982) décompose le transfert de l'oxygène depuis la phase gazeuse vers la phase liquide en trois étapes.

- § Une étape très rapide de transfert d'oxygène à la surface de liquide
- § Le franchissement de l'interface liquide-gaz, il est admis que cette étape peut être représentée par la diffusion moléculaire à travers une fine épaisseur de liquide (de l'ordre de quelques molécules d'eau) (Chachaut, 1998).
- § Le transfert de l'oxygène dans la masse du liquide par diffusion et convection. Le franchissement de l'interface liquide-gaz est désigné comme l'étape limite de diffusion du processus suite au franchement de la phase stagnante, l'oxygène peut alors pénétrer dans le biofilm. Les différents d'oxygène existant à l'intérieur du massif filtrant. (Roques, 1979)

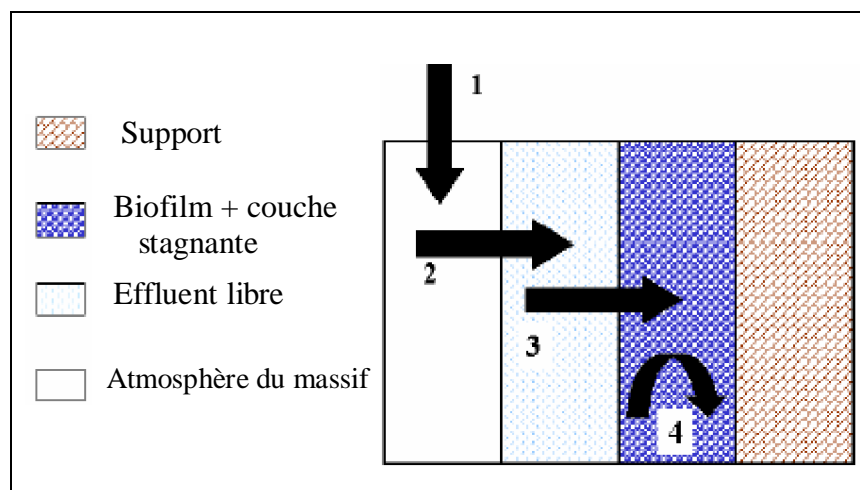


Figure 10 : Schématisation des différents flux d'oxygène entre air atmosphérique et biofilm (Cherier, 1991)

- § Flux d'air atmosphérique
- § Flux de transfert entre atmosphère et phase liquide
- § Flux de pénétration dans le biofilm
- § Flux consommé par l'oxydation aérobie de la pollution organique

Zhu et al. (2001), montrent que dans le cas de la discontinuité de la phase liquide stagnante le transfert direct de l'oxygène de la phase gazeuse au biofilm est possible. La pénétration de l'oxygène dans le biofilm ne serait alors plus limitée par la phase aqueuse. Ces observations sont réalisées avec un biofilm développé au sein d'un lit bactérien utilisé pour le traitement de gaz (composé organique volatil) c'est-à-dire un milieu non saturé, comme c'est le

cas en infiltration percolation. Cependant en infiltration percolation, l'humidité est sans doute supérieure à celle rencontrée dans ce type particulier de lit bactérien.

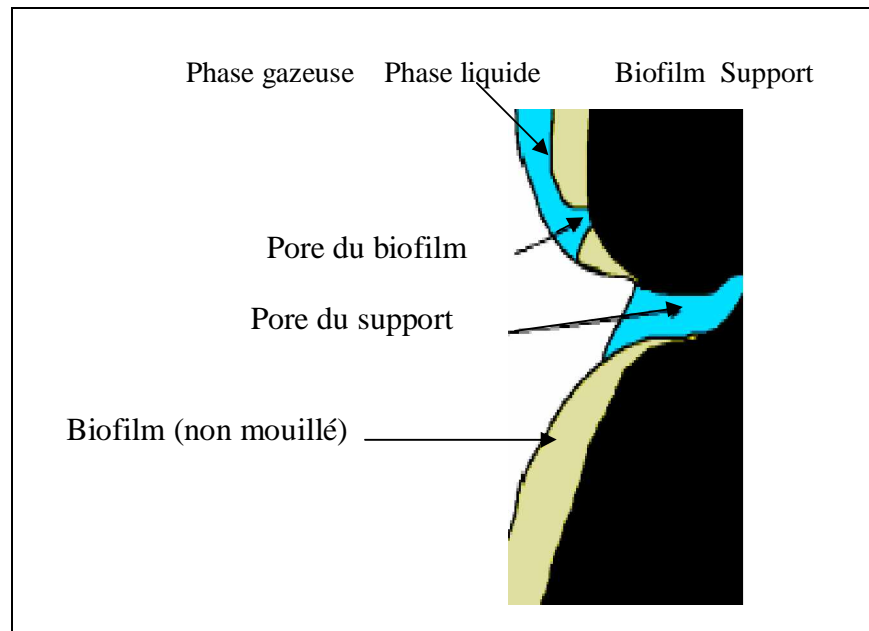


Figure 11 : Représentation d'un biofilm non saturé (d'après Zhu et al. 2001)

La mesure du profil de concentration en oxygène dissous au sein du biofilm à l'aide d'une micro-onde montre la décroissance rapide de la concentration en oxygène dissous (OD) avec l'augmentation de la profondeur.

II.6.3. Régulation physique de la croissance des biofilms

Deux phénomènes de régulation de l'épaisseur du biofilm sont observés :

- § des phénomènes d'érosion, les pertes sont alors localisées à la surface du biofilm.
- § des phénomènes de dépouillement, marqués par des pertes entières de portion de Biofilm.

Des facteurs physiques tels que des facteurs hydrodynamiques (régime turbulent sous l'effet des variations rapides de vitesses d'eau, forces de cisaillement...), mais également sous des facteurs biologiques, tels que la lyse cellulaire, ou la formation de bulles de gaz (en condition anaérobie) peuvent entraîner un déséquilibre de la structure du biofilm et un décrochement d'une partie de celui-ci. Le transport des nutriments et de l'oxygène à l'intérieur du biofilm sont des facteurs importants du décrochage du biofilm. L'existence d'un gradient de diffusion des nutriments est un facteur limitant pour la croissance du biofilm et oriente sa composition en terme de population bactérienne (Finlay J. et al., 2002).

II.7. Résistance des biofilms

L'importance des biofilms est directement liée à leurs propriétés qui leur confèrent une grande résistance. Elle est directement liée à la couche muqueuse et aux microorganismes, elle dépend aussi des facteurs extrinsèques.

II.7.1. La couche muqueuse d'exopolysaccharides

Les micro-organismes inclus dans un biofilm sont beaucoup plus résistants aux désinfectants que lorsqu'ils sont dispersés dans un milieu liquide. En effet, certains auteurs ont montré que la concentration en désinfectant doit être de 10 à 100 fois supérieure. Il semble que la résistance aux désinfectants disparaît rapidement après le détachement des cellules de leur support. Par ailleurs, les désinfectants les plus performants contre les suspensions bactériennes ne sont pas les plus performants contre les bactéries incluses dans un biofilm. C'est le cas des désinfectants tensioactifs (produits à ammonium quaternaire et agents amphotères,). En fin, la résistance aux désinfectants augmente avec l'âge du biofilm.

Le même phénomène est observé pour les antibiotiques. Selon DuPont (1997), cette augmentation de résistance peut être d'un facteur de 1500. Pour Rediske et al. (1999), la dose normale est multipliée de 50 à 500 fois pour éliminer les jeunes biofilms (<24 heures) et par 5000 cette dose dans le cas des biofilms de plus de 48 heures (Cracia et al., 1997).

La matrice de polymères exocellulaires intervient dans la résistance des biofilms aux molécules antimicrobiennes. En effet il a été montré que la résistance au chlore de *Staphylococcus aureus* en suspension augmente lorsque le micro-organisme a préalablement été cultivé dans un milieu favorable à la synthèse de ces polymères. La forte teneur en eau de la couche muqueuse liée aux propriétés hydrophiles des exopolymères explique la résistance à la dessiccation des microbes. Cette couche muqueuse permettrait la survie des bactéries sur des surfaces humidifiées de façon intermittente. Il a été montré que, soumises à un stress hydrique, des bactéries ne produisent plus d'exopolymères que celles qui ne sont pas stressées.

Les polymères chargés négativement serviraient de piège aux cations comme les métaux lourds. Pour ce qui est des nutriments, cette capacité de piège serait due à l'augmentation de l'aire de l'interface solide-liquide après colonisation par un biofilm au relief tourmenté, les interfaces étant des zones de concentration des molécules présentes dans le fluide environnant.

Il est vraisemblable que c'est la présence de protéines exocellulaires qui explique, au moins partiellement, la chute d'activité du chlore qui est neutralisé par ces molécules (Burin C.,2002).

II.7.2. La natures des micro-organismes des biofilms

D'après Carpentier (1999), c'est tout d'abord l'agrégation des bactéries entre elles qui intervient dans la résistance des cellules des biofilms aux agents antimicrobiens. En effet il a été montré par exemple que l'efficacité du chlorure de benzalkonium est plus grande lorsque les agrégats de cellules de *Listeria monocytogenes* ont été éliminés ou dispersés par filtration

D'après Xù et al. (2000), les cellules libres et les cellules adhérentes présentent des états physiologiques différents. Même au sein des biofilm, il existe des gradients de concentration en nutriments correspondant à des gradients de taux de croissance et d'activités physiologiques. Il semble qu'en général il existe une corrélation entre la diminution du taux de croissance dans les biofilms et l'augmentation de résistance.

L'utilisation de nouvelles technologies permet désormais de visualiser ces gradients physiologiques. Ainsi des cellules d'une même espèce microbienne peuvent avoir des états physiologiques très différents, même si la distance les séparant ne dépasse pas 10µm. L'étude des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* a révélé une distribution extrêmement hétérogène de l'activité physiologique. Cette distribution dépendrait de la limitation en nutriments au sein des biofilms. Mais il semble que d'autres facteurs comme les communications entre cellules (Quorum sensing) ou autres mécanismes de régulation permettraient aux cellules de rentrer dans un état de dormance et de protection phénotypique. D'après Boulangé P. (1996), il est probable que la physiologie des cellules localisées dans les couches externes du biofilm soit peu différentes de celles en suspension.

II.7.3. Les facteurs extrinsèques et la résistance des biofilms

D'après Boulangé P. (1996), la résistance du biofilm dépend aussi de la nature du support. Dans les dernières décennies de nombreuses études se sont intéressées à la capacité de différentes surfaces solides à être nettoyées (appelée aussi nettoyabilité), notamment dans le domaine de l'industrie agroalimentaire.

Les surfaces en acier étaient plus faciles à nettoyer que d'autres matériaux comme l'aluminium ou les polymères. Ainsi un nettoyage avec des détergents alcalins peut éliminer 99%

des microorganismes adhérents à des surfaces en acier alors que 20 à 50% des microorganismes sont encore présents sur des polymères après la même opération. De plus la performance des désinfectants est influencée par la température et le temps de contact (Boulangé P ., 1996).

Enfin, la nature du support du biofilm a une influence directe sur la résistance des biofilms aux désinfectants. Par exemple l'acier inoxydable apparaît beaucoup plus facile à désinfecter que bon nombre d'autres matériaux comme l'aluminium, les plastiques ou la céramique (Carpentier, 1999).

Deuxième partie
Etude expérimentale

CHAPITRE III
Matériels et Méthodes

CHAPITRE 3.

III.1. Matériels

III.1.1. Choix du support

Le support utilisé est de la pouzzolane, correspondant à des projections volcaniques scoriacées, essentiellement stromboliennes et basique ayant une composition basaltique, de couleur noire ou rouge selon le degré d'oxydation du fer présent (magnétite ou d'hématite).

Cette roche siliceuse éruptive dans la partie cristalline représente selon le gisement d'où elle est extraite entre 80 et 100% du volume de solide .

Disponible en Algérie est présentant des caractéristique intéressante pour la fixation des cellules par adsorption (Menoret 2001).

III.1.2. Origine

Ce matériau est originaire d'El Kelkoul (Bouhamidi), situé à 25 Km de Béni-Saf (l'Ouest de l'Algérie). Il présente les caractéristiques suivantes (Kadri et al., 2000).

III.1.2.1. Caractéristique physico- mécanique et composition chimique

Tableau 1 : Caractéristique physico- mécanique

Densité	Porosité	pouzzolanté	Résistance Mécanique granulat
1.02	0.45	85%	33.2 (Kg/m ²)

Tableau 2 : Composition chimique

SiO ₂	AL ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	SO ₃	PAF
46.10%	17.5 %	10.5 %	10.5 %	3.8 %	3.4 %	1.50 %	0.4 %	4.41%

III.1.2.2. Porosité du garnissage utilisé

Un milieu poreux est un matériau constitué de particules solides cimentées entres elles et formant un squelette autour du quel subsiste des espaces vides.

L'autre phase qui est fluide occupe le volume poreux constitué par les espaces vides de la phase solide. La porosité (degré de vide) c'est la fraction volumique occupée par le fluide entre les grains.

$$\Phi = \frac{\text{Volume d'eau nécessaire à la saturation}}{\text{Volume du matériau saturé}} \quad (8)$$

III.1.2.3. Densité et masse volumique

La masse volumique apparente d'un matériau est mesurée en effectuant le rapport masse sèche sur volume. Cette mesure prend en compte dans l'estimation du volume, les vides ménagés par la porosité du matériau. La masse volumique s'exprime en Kg.m^{-3} .

L'augmentation de volume et de masse provoquée par l'introduction du matériau dans une éprouvette d'eau permet d'estimer sa masse volumique réelle, c'est à dire le rapport entre masse de matériau sec et le volume qu'il occupe sans prise en compte des vides. La densité s'obtient en faisant le rapport entre la masse volumique réelle du matériau et celle de l'eau.

$$d = \frac{(\Delta \text{ masse } / \Delta \text{ volume})}{\text{masse volumique de l'eau}} \quad (9)$$

d : Densité du matériau [ad]

La densité du matériau dans notre cas est $d = 1.02$

III.1.2.4. Aire spécifique

L'aire spécifique S_p d'un matériau correspond à la surface totale des particules par unité de volume. L'hypothèse de la sphéricité des particules est couramment admise pour estimer S_s .

III.1.2.5. Diamètre des grains

Le diamètre des grains utilisé est compris entre 0,3 et 0,5 cm afin d'éviter le colmatage du bioréacteur et favorise la fixation des cellules.

III.2. Eau usée d'ensemencement

L'eau usée domestique d'El Hassania utilisée dans notre expérience pour la préparation de l'inoculum présente la composition chimique suivante (Tableau 3).

Tableau 3: Les caractéristiques physico-chimiques de l'effluent
d'El Hassania (D.H.W 2002)

Composition	Concentration
DCO	240 mg/l
DBO	77,8 mg/ l
Nitrite NO ₂ ⁻	0,2 mg/l
Nitrate NO ₃ ⁻	4 mg/l
Ammonium NH ₄ ⁻	46,80 mg/l
Orthophosphate PO ₄	15 mg/l
Phosphate total	16,25 mg/l
MES à 150 ° C	171 mg/l
MES à 600 ° C	76 mg/l
MVS	ABS

Tableau 4 : La microflore présente dans l'effluent d'El Hassania

La microflore	Dénombrement
ASR	IND
Coliformes totaux /100ml	NPP 5x10 ³
Streptocoques /ml	NPP 2x10 ²
Levures /ml	40 colonies
Moisissures /ml	50 colonies

Tableau 5 : Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau
de robinet (A.D.E.2004)

Composition	Concentration
TH	146 mg/l
TAC	60,5 mg/ l
Ca ⁺²	128,46 mg/l
Mg ⁺²	18 mg/l
Ammonium NH ₄ ⁻	0,02 mg/l
Nitrite NO ₂ ⁻	0,315 mg/l
Sulfates SO ₄ ⁻²	390 mg/l
Chlorures	250 mg/l
pH	6,5-7

III.3. Dispositif

expérimental

Le dispositif expérimental est un bioréacteur à lit fixe garni. Il est constitué des éléments suivants (figure 12) :

- § Une colonne en PVC transparent, de 80 cm de hauteur, 2,5 cm de diamètre interne et 3 cm de diamètre externe. Quatre niveaux de prélèvement sont réalisés à différentes hauteurs de la colonne, le premier niveau est situé à 8 cm de l'entrée d'alimentation, le second à 16cm, le troisième à 25 cm et le dernier à 35 cm.
- § Le garnissage est la pouzzolane.
- § Une pompe doseuse (de marque PROMINENT électrique E2100) assure, en continu, l'alimentation du bioréacteur en effluent.
- § Un réservoir en PVC de capacité de 10litres relié à la pompe, constitue le stock de l'effluent a traité.
- § Une burette graduée de 0 à 50 ml, est intermédiaire entre la pompe et le bioréacteur, permet d'éliminer les effets du fonctionnement intermittent de la pompe ainsi que la détermination des pertes de charge.
- § Un microscope optique (de marque ZEISS)

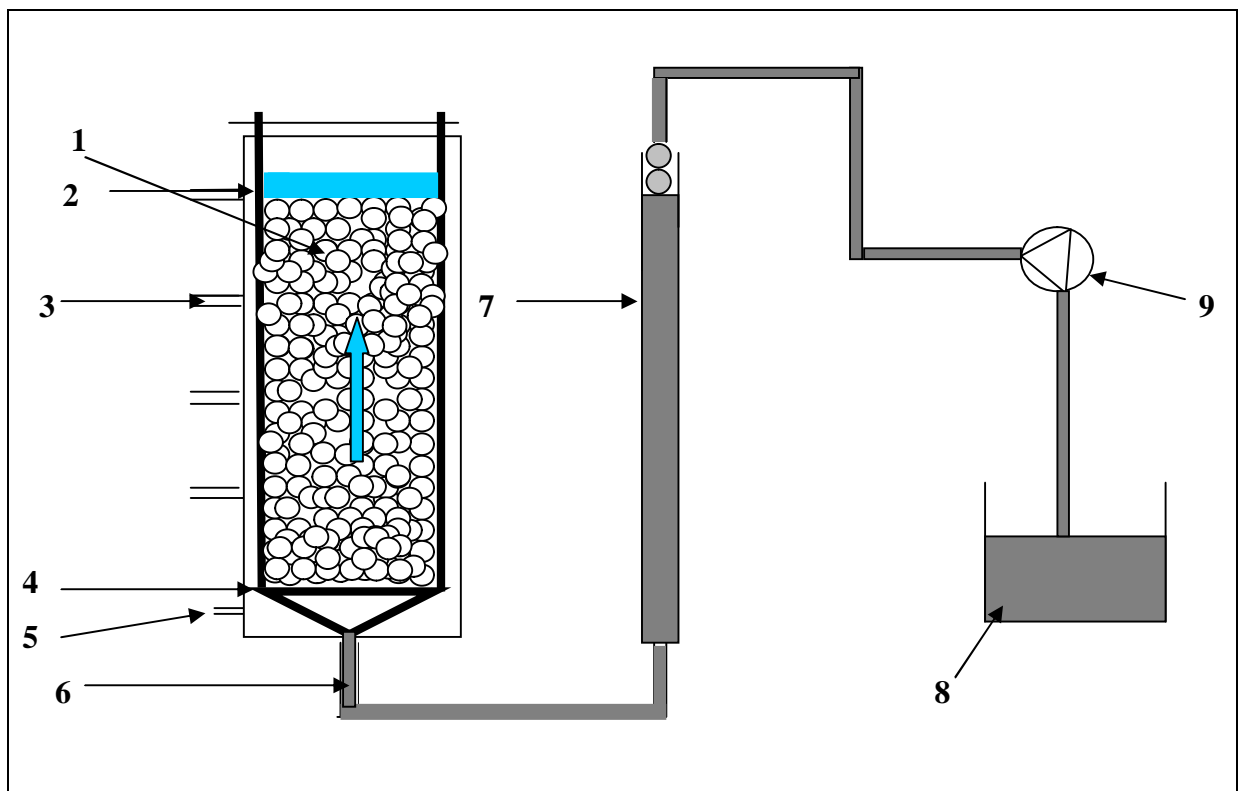


Figure 12 : Les éléments constituant du dispositif expérimental

1. Support

2. Colonne en PVC
3. Sortie du bioréacteur
4. Support de garnissage
5. Entré de l'eau de refroidissement
6. Tuyau de raccordement en PVC
7. Burette gradué (piézomètre)
8. Bac de stockage de l'effluent
9. Pompe doseuse

III.3.1. Préparation du garnissage support

Après plusieurs lavages à l'eau distillée, le support est séché à 102°C dans une étuve pendant toute une nuit, jusqu'à poids constant. Ensuite il est stérilisé à 150°C pendant 30 minutes.

III.3.2. L'eau à traiter

Nous avons utilisé un milieu synthétique présentant une composition similaire a celle des eaux usées domestiques. Le milieu est préparé avec différentes concentrations en sucres et en acides organiques. L'azote et le phosphore sont ajoutés sous forme de sels de nitrate, de peptone et d'ammonium et triphosphate en respectant les rapports $\frac{C}{N} = 10$ et $\frac{C}{P} = 50$. Le tableau 6 rapporte la composition détaillée du milieu synthétique utilisé, selon EKENFELDER (1982) avec les ingrédients que nous avons ajoutées (sucres, sels de nitrate d'ammonium et triphosphates).

Tableau 6 : La composition chimique de l'effluent synthétique

Substance	Composition
Les acides volatils : acide acétique, acide formique, acide propionique	20 mg/l
Les acides non volatils : acide lactique, acide benzoïque, acide citrique, acide glutamique	0.4 g/l
Sucre (saccharose + fructose + glucose + lactose)	0,5 %
L'azote sous formes des sels de nitrate d'ammonium	C/N =10
Phosphore sous forme triphosphate	C/P=50

III.3.3. Préparation du milieu synthétique

L'ensemble des ingrédients du milieu de culture est dissout dans un volume d'eau de robinet (jusqu'à 1 litre) et stérilisé par microfiltration sous vide par passage sur une membrane microporeuse en acétate de cellulose de porosité 0,45 μ m .

III.3.4. L'inoculum

L'eau d'ensemencement est constituée d'une eau usée naturelle prélevée au niveau de l'émissaire du rejet des eaux usées domestiques d'El Hassania donnant sur Oued Tsighaout. Cet inoculum est enrichi par mélange de volumes égaux d'eau usée naturelle et d'effluent synthétique (100/100 ml). Cette étape permet l'obtention d'une biomasse importante par culture aérobie dans un bioréacteur en verre de 500 ml de capacité, ouvert à l'air libre .

L'incubation est effectuée à la température de 26 °C pendant 18 heures (pour l'obtention de cellules en phase exponentielle de croissance). La température est maintenue constante par thermorégulation à l'aide d'un bain marie thermostaté. L'agitation est assurée par un système magnétique composé d'un barreau magnétique introduit à l'intérieur du bioréacteur et tournant à 20 tours/ minute. Cette façon de faire permet simultanément l'agitation et la diffusion de l'oxygène dans le milieu.

III.3.5. Préparation du biofilm

L'inoculum est composé d'une microflore naturelle, variée, essentiellement chimio-organotrophe (bactéries, levures et moisissures) intervenant dans les processus d'épurations biologiques des effluents domestiques. L'implantation de ces microorganismes ainsi que la colonisation du support sont réalisées par l'inoculation d'un mélange de 20 ml de culture activée dans 60 ml de l'effluent synthétique. Ce volume de 80 ml est introduit dans le bioréacteur a lit fixe est laissé en régime statique pendant 24 heures pour obtenir un meilleur taux de fixation et un bon développement microbien .

III.4. Conduite de l'expérience et méthodes analytiques

III.4.1. Paramètres d'étude et de contrôle

- L'expérience est réalisée à la pression atmosphérique et à la température ambiante (variant entre 24 et 26 °C).
- Le temps de séjour est fixé arbitrairement à 25 minutes

L'expérience a été effectuée en utilisant trois types d'effluents :

- Le premier présente une DBO d'entrée initiale de 15600 mg/l et une DCO = 15720 mg/l
- Le second présente une DBO d'entrée initiale de 2100 mg/l et une DCO = 2280 mg/l
- Le troisième présente une DBO d'entrée initiale de 450 mg/l et une DCO = 620 mg/l

Après 48 heures de fonctionnement du dispositifs, par passage de l'effluent dans le bioréacteur, nous avons commencé à étudier les performances et la stabilité du biofilm en suivant, à la sortie du bioréacteur, l'évolution des paramètres suivants:

III.4.2. La demande biochimique en oxygène (DBO)

III.4.2.1. La méthode volumétrique

La biodégradation de la matière organique sous l'action des microorganismes entraîne une consommation d'oxygène ; La mesure de la DBO permet d'évaluer le contenu d'une eau en matière organique biodégradable exprimée en mg/l. Elle est déterminée quotidiennement selon la méthode décrite par RODIER (1984).

Le principe consiste a porté à l'ébullition pendant exactement dix minutes un volume d'eau traitée en présence d'une solution diluée de permanganate de potassium N/80 en milieu sulfurique. Après refroidissement et addition de sel de Mohr jusqu'à décoloration. L'excès en permanganate est dosé par la même solution N/80 jusqu'à réapparition et persistance de la couleur rose.

III.4.2.2. La méthode automatique

Dans ce cas, la DBO_5 est déterminée par incubation de l'échantillon durant une période de 5 jours à une température de 20°C, dans un DBO-mètre de modèle AQUALYTIC. La consommation d'oxygène est donnée par lecture directe sur un afficheur digital.

III.4.3. La conductivité électrique

Elle est mesurée par méthode électrochimique en utilisant un conductimètre de model (Tetra ConR 325). Elle est exprimée en ms/cm .Pour mesurer la conductivité il suffit d'introduire la sonde de l'appareil dans un Erlen-meyer qui contient 100 ml de l'échantillon.

III.4.4. Le pH

Le pH est mesuré par méthode électrochimique à l'aide d'un pH-mètre (modèle HANNA 120) équipé d'une sonde de température.

III.4.5. Les pertes de charge

Les pertes de charges dans le bioréacteur sont déterminées par différence piézométrique. L'indication se traduit par une dénivellation au niveau d'une colonne graduée située entre l'entrée et la sortie du bioréacteur.

III.5. Analyse microbiologique

III.5.1. Les coliformes

Les coliformes sont les entérobactéries provoquant la fermentation du lactose avec production de gaz. Le principe de leur mise en évidence et de leur dénombrement consiste à ensemercer par un volume de l'échantillon, ou de sa dilution, un milieu sélectif dans une série de trois tube (milieu BLBVB) muni d'une cloche de DURHAM (rétention du gaz).Après incubation à 37°C durant une période allant de (24 à 48 heures), le virage de l'indicateur coloré (au jaune) ainsi que la présence de gaz dans la cloche indique leur présence. Le nombre le plus probable (NPP) est déterminé par l'utilisation de la table de Mc Grady.

La composition du milieu de culture utilisée est conforme aux : « standards methods for the examination of water and wastewater (1975) et de l'ISO (1975) et aux normes DIN 10172 et aux normes Algériennes (N.A, 10.96.66) la composition est donnée en annexe. Le milieu sélectif utilisé est le Bouillon lactose au vert brillant et à la bile 2 % (BLBVB).

III.5.2. Les bactéries sporulées anaérobies sulfito-réducteur (SR) totaux

Leur détection et numération est basée sur leur faculté à croître en anaérobie en réduisant les sulfites en sulfures. L'ensemencement d'un milieu viande foie (VF) gélosé en tube et l'incubation à 44 °C pendant 72 heures donnent des colonies entourées d'un halo noir de sulfure. Le comptage de ces colonies détermine leur nombre (N.A 08.97.59).

III.5.3. Levures et moisissures

L'ensemencement du milieu sélectif OGA (oxytétracycline glucose agar) en boîte de Pétri et incubation à 24°C pendant cinq jours permet le dénombrement des colonies de levures et de moisissures. L'addition de l'oxytétracycline élimine la croissance bactérienne en faveur des champignons (N.A 00.99.61) .

III.6. Etude d'optimisation

Nous avons étudié les performances (influence sur le rendement) du bioréacteur en déterminant les conditions optimales de son fonctionnement par:

- § La variation de la hauteur du garnissage : 8,16 et 25 cm.
- § La variation du temps de séjour ; 7 ; 13,4 et 21 minutes.

CHAPITRE IV
Résultats et discussions

CHAPITRE 4.

IV. Etude de la phase transitoire du bioréacteur

La phase transitoire correspond au temps nécessaire à la mise en place du biofilm mûr. C'est à dire le temps nécessaire qui permet au bioréacteur de traiter la charge organique initialement introduite, avec un taux d'élimination important et constant.

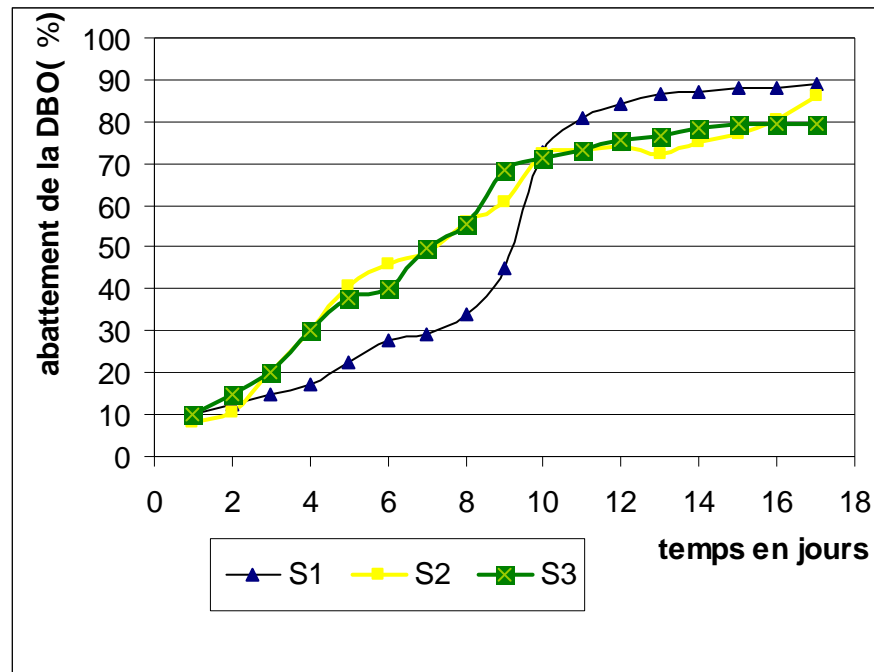
A travers cette étude nous essayons de mettre en évidence les relations qui peuvent exister entre les différents paramètres comme la DBO, le pH, la conductivité électrique et la perte de charge dans le but d'apprécier l'efficacité de fonctionnement du bioréacteur.

IV.1. Evolution de la DBO

Dans une première étape, nous avons déterminé l'évolution du taux d'abattement de la charge organique initialement introduite dans le bioréacteur en fonction du temps. Les résultats trouvés sont indiqués dans le tableau 7 et illustrés dans la figure 13.

Tableau 7: Evolution de l'abattement de la DBO (%) pour les différentes charges en fonction de l'évolution du biofilm

Abattement de la DBO (%)			
Temps (jours)	S ₁ =15600 mg/l	S ₂ = 2100mg/l	S ₃ = 450mg/l
1	10,02	8	10
2	12,58	10,3	15
3	15,06	20	20
4	17,27	30,3	30
5	22,3	40,58	38
6	27,8	46,15	40
7	29,33	48,71	50
8	34,21	55,88	55,55
9	45,02	60,88	68,66
10	72,82	72,22	71,11
11	81,01	73,11	73,33
12	84,01	74,11	75,55
13	86,7	72,22	76,33
14	87,2	75,11	78,5
15	88,23	76,8	79,5
16	88,24	80,3	79,5
17	89,02	86	79,5



$$S_1 = 15600 \text{ mg/l}$$

$$S_2 = 2100 \text{ mg/l}$$

$$S_3 = 450 \text{ mg/l}$$

Figure 13 : Evolution de l'abattement de la DBO (%) en fonction du temps pour différentes charges de l'effluent

L'examen de cette figure montre que, globalement, les niveaux d'abattement dans la DBO augmente de façon proportionnelle en fonction du temps quelque soit la charge initialement utilisée. Les courbes présentent des allures ascendantes jusqu'au neuvième jour du fonctionnement, correspondant à des seuils d'abattement atteignant des rendements allant de 45 à 68 %. Du neuvième au onzième jour l'ascendance dans l'abattement de la DBO pour la charge S_1 présente une accélération importante passant de 46 à 80 %, ceci est probablement dû à la facilité d'adaptation du biosystème a ce niveau de charge organique. Par contre pour les charges S_2 et S_3 et pour la même phase correspondante l'accélération est beaucoup plus faible, elle se traduit par un abattement de la DBO allant de 60 à 72 %. En effet les concentrations élevées en matière organique exercent une pression à l'encontre de l'activation métabolique des cellules. Au delà de cette période le palier correspondant a la phase stationnaire est atteint. Un taux d'élimination limite de 90 % est obtenu pour les charges 1 et 2 par contre pour la charge 3 le rendement n'excède pas les 79.5 %. La phase stationnaire pour la charge une et deux est caractérisée par une évolution en deux temps, en premier, un accroissement accéléré puis dans un second temps, une ascendance faible. Par ailleurs un accroissement en escalier est observé pour la charge trois.

Il est remarquable d'après ces résultats que les cellules fixées présentent un niveau de vitalité appréciable dans un large intervalle de concentration, des plus élevées vers les plus faibles.

IV.2. Evolution des pertes de charges dans le bioréacteur

Les résultats mesurés sont indiqués dans le tableau 8 et reportés dans la figure (14).

Tableau 8: Evolution de la perte de charge (ΔP) pour les différentes charges en fonction de l'évolution du biofilm

La perte de charge (H= 35 cm)			
Temps (jours)	$\Delta P1$ (cm)	$\Delta P2$ (cm)	$\Delta P3$ (cm)
1	1	0	0
2	1	0	0
3	1	0.6	0
4	1	0.7	0
5	1	1	0
6	3	1	0
7	3.7	1	1
8	4.2	1.5	1
9	4.7	2	1
10	5.5	3.5	1
11	7	3.5	1
12	7.5	5	2
13	8	6	2
14	8.6	6	2
15	9	6	2
16	9	7	2
17	9	7	2

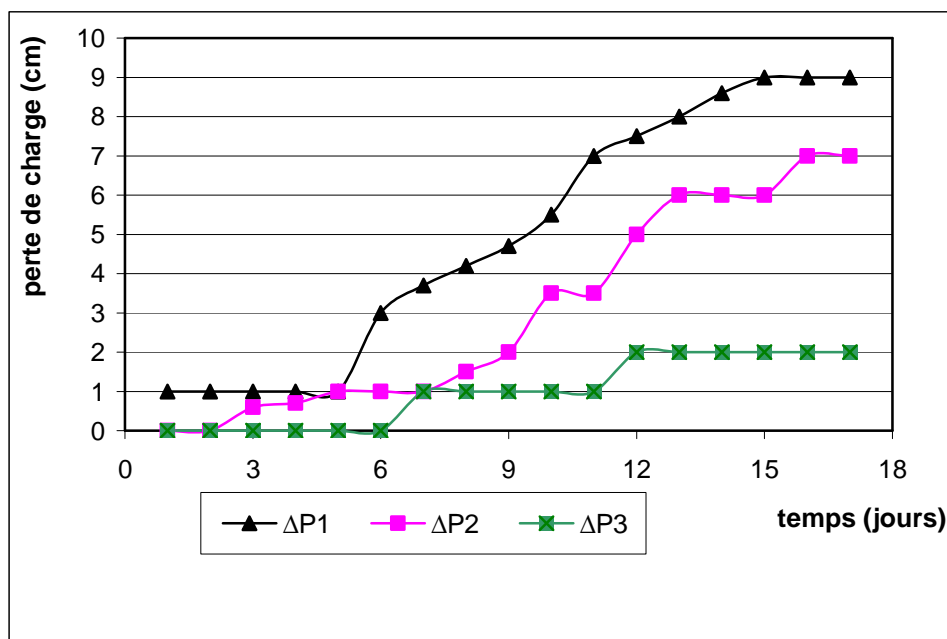


Figure 14 : Evolution de la perte de charge en fonction du temps pour différentes charges de l'effluent

La perte de charge dans le bioréacteur augmente au fur et à mesure avec le taux d'élimination, cela est dû à la fixation et à la croissance des bactéries sur le support qui induit une augmentation de l'épaisseur du biofilm entraînant par conséquent la diminution du volume du vide dans le garnissage. Le développement du biofilm sur le support entraîne la colonisation des espaces d'écoulement. Cette évolution prend de l'ampleur après douze jours de fonctionnement. Plus la biomasse du biofilm est importante, plus les pertes de charges sont élevées.

L'allure des courbes présente un accroissement en escalier plus remarquable pour les charges moyennes et faibles qu'avec la charge concentrée. Cela traduit le phénomène de décrochage – reproduction sommaire et périodique du biofilm.

La phase stationnaire de la perte de charge est obtenue après 12 jours du fonctionnement du bioréacteur et qui est indépendante de la concentration en matière hydrocarbonée. Les pertes de charges les plus élevées enregistrées sont respectivement de 9, 7 et 2 cm pour les charges S_1 , S_2 et S_3 qui sont relativement faibles en les comparant avec les lits à sable.

Au terme de cette étude nous pouvons conclure que ce type de bioréacteur est efficace dans la mesure où les niveaux d'abattement dans la DBO sont élevés et les pertes de charges hydrauliques négligeables.

IV.3. Evolution du pH

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 9 et rapporté dans la figure 15.

Tableau 9 : Les variations du pH en fonction de l'évolution du biofilm pour les trois charges

pH			
Temps (jours)	S ₁ = 15600 mg/l	S ₂ = 2100 mg/l	S ₃ = 450 mg /l
1	5.48	5.9	6.52
2	5.48	5.6	6.48
3	5.28	5.55	6.53
4	5.03	5.5	6.53
5	4.92	5.1	6.45
6	4.82	5	6.42
7	4.72	5.2	6.42
8	4.48	4.8	6.38
9	4.3	4.6	6.38
10	4.19	4.35	6.37
11	4.1	3.98	6.2
12	4	3.95	6.18
13	3.99	3.92	6
14	3.98	3.9	6
15	3.9	3.85	6
16	3.9	3.65	5.9
17	3.98	3.5	5.9

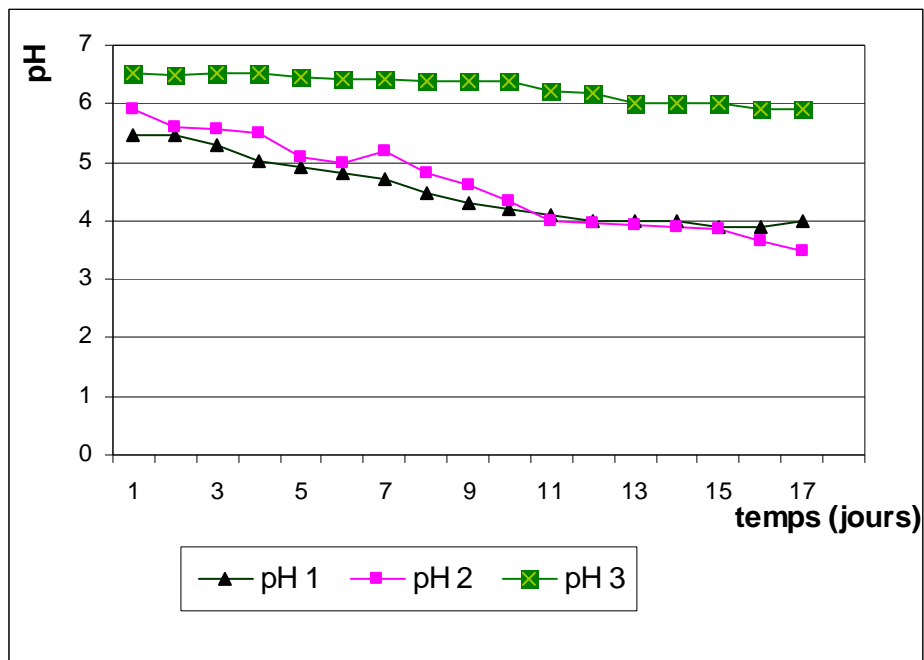


Figure 15 : Evolution du pH en fonction du temps pour différentes charges de l'effluent

Nous remarquons que pour les charges S_1 et S_2 les valeurs du pH régressent de manière significative passant de 7 à 3,2 après 17 jours de fonctionnement. Par contre pour la charge trois les valeurs du pH restent presque inchangées. L'acidification du milieu est liée à la production de molécules acides tel que l'acide carbonique et le cumule des acides gras volatiles issus des processus fermentaires et oxydatifs de la matière organique. En effet avec des concentration élevées de substrat (15600 et 2100 mg/l) la production relative des acides volatils augmente et le pH diminue, cette situation à pour conséquence, la déviation métabolique (réactions d'oxydation) a la fermentions - pH < 4.5- (Bruce E. et al., 2000). Alors qu'avec des concentrations faibles (450 mg) le pH = 6 traduit une biodégradabilité aérobie facultative prédominante, dont les valeurs du pH sont en étroite relation avec l'activité métabolique du microorganisme.

Le traitement des charges carbonées élevées induit l'obtention d'effluents à la sortie du bioréacteur des pH acide (pH < 4) néfastes sur le milieu récepteur naturelle et de se fait inacceptable sur le plan réglementaire et environnementale.

IV.4. Evolution de la conductivité électrique

La mesure de la conductivité électrique nous permet d'apprécier le comportement du microorganisme vis à vis de son milieu et de ses conditions physico-chimiques. Les valeurs mesurées des conductivités sont consignées dans le tableau 10 et illustrées dans la figure 16.

Tableau 10: Evolution de la conductivité électrique en fonction de l'évolution du biofilm

pour les trois charges

La conductivité mS/Cm			
Temps (jours)	S1 = 15600 mg/l	S2 = 2100 mg/l	S3= 450 mg /l
1	3.26	3.16	3.2
2	3.26	3.16	3.2
3	3.23	3.18	3.2
4	3.23	3.18	3.2
5	3.22	3.2	3.2
6	3.25	3.2	2.9
7	3.26	3.29	2.8
8	3.29	3.32	2.7
9	3.3	3.32	2.8
10	3.32	3.37	2.6
11	3.35	3.39	2.5
12	3.41	3.43	2.6
13	3.63	3.52	2.5
14	3.72	3.63	2.7
15	3.78	3.72	2.8
16	3.82	3.77	2.9
17	3.82	3.77	2.8

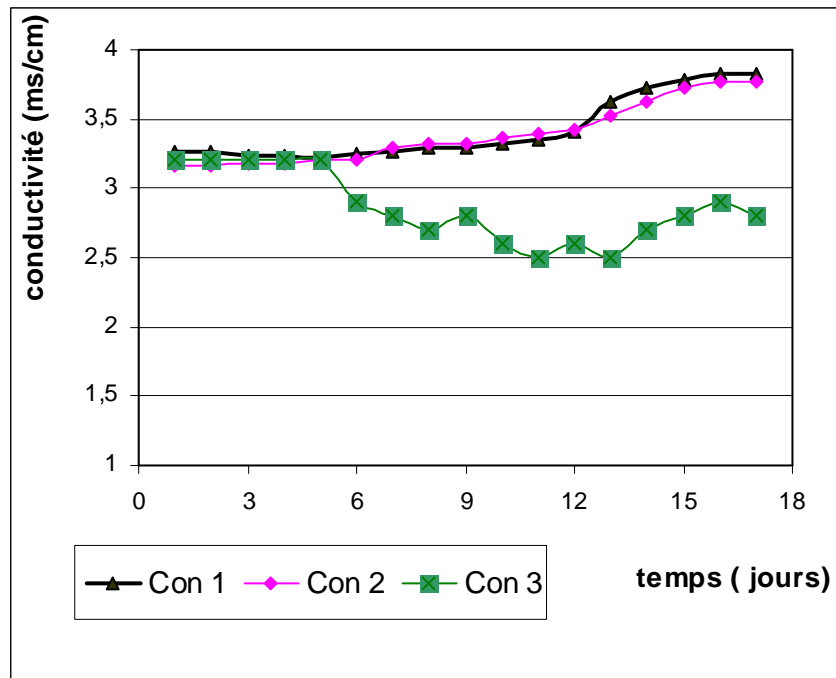


Figure 16 : Evolution de la conductivité électrique du milieu en fonction du temps pour différentes charges de l'effluents

D'après la figure 16, les charges S_1 et S_2 présentent une évolution de la conductivité électrique similaire (superposition des courbes) avec une tendance à la hausse, celle-ci passe de 3 à 3,8 et ce pour une durée de fonctionnement de 17 jours. Cependant pour la charge trois la conductivité montre une baisse allant de 3 à 2,5 mS/cm .

L'augmentation de la conductivité électrique du milieu dans le cas des charges 1 et 2 peut s'expliquer par les phénomènes d'ionisation qui sont prépondérants par rapport à leur élimination. En effet les réactions de protonation génératrices des ions H^+ (issues des fermentations (CO_2 et d'autres acides)) sont dominantes par rapport aux ions entrant dans la production de biofilm. Cependant avec la charge 3 (faible concentration) la conductivité a eu une léger abaissement traduisant ainsi les réactions qui vont au profit de la disparition des ions tel que Ca^{+2} , PO_4^{-2} , NO^{-2} et NH_4^+ etc.

Selon Ho (1986), La maturation du biofilm est caractérisée par la biosynthèse d'exopolysaccharides, structures permettant l'attachement des cellules microbiennes au support et jouant un rôle indispensable dans leur stabilité et leur résistance. Ces structures muqueuses sont fortifiées par la consommation des cations essentiellement bivalents prélevés à partir du milieu.

IV.5. Corrélation entre les paramètres de performances du bioréacteur et discussions des résultats des différentes charges d'effluents

IV.5.1. La corrélation entre l'abattement de la DBO et la perte de charge

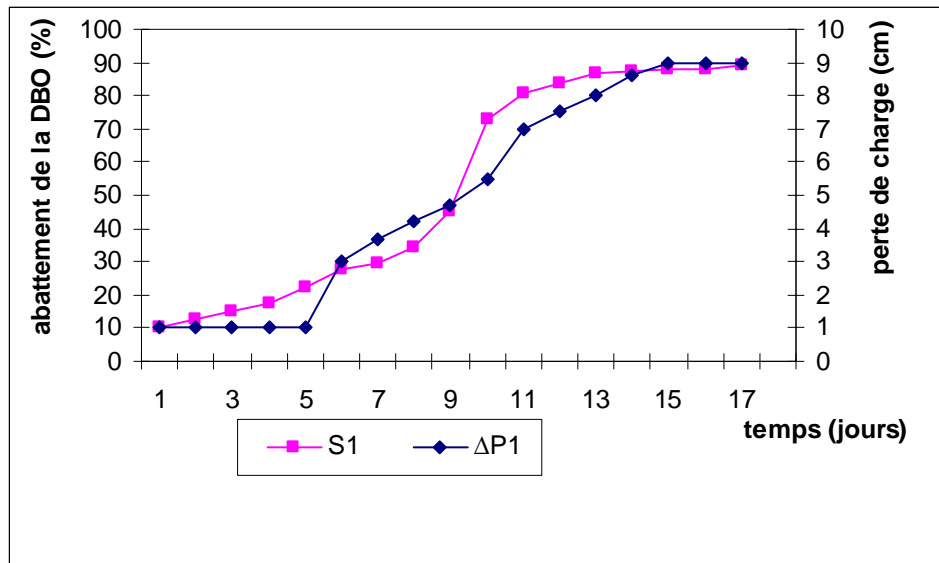


Figure 17 : Evolution de l'abattement de la DBO et la perte de charge en fonction du temps suivant l'évolution du biofilm (15600 mg/l)

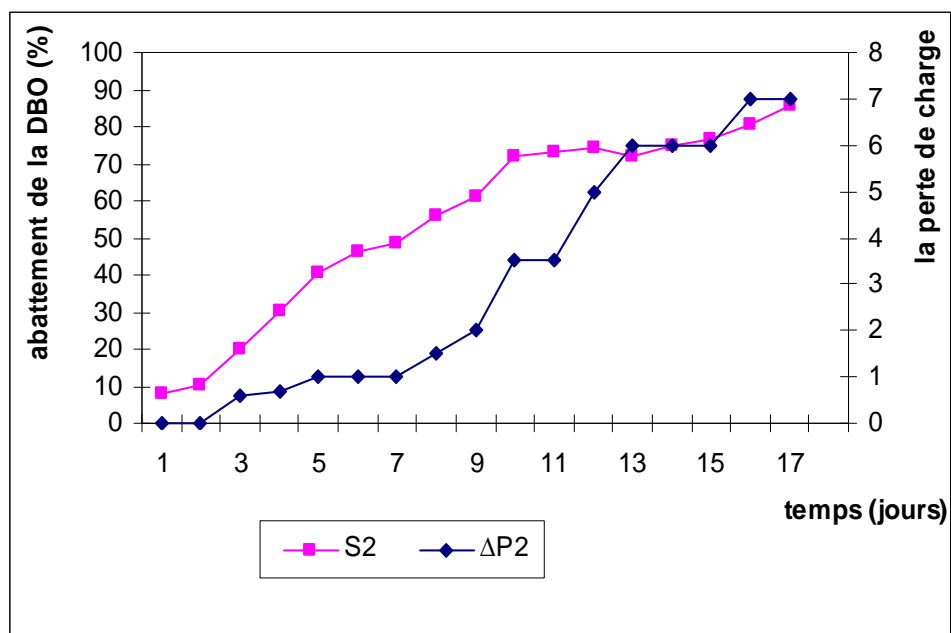


Figure 18 : Evolution de l'abattement de la DBO et la perte de charge en fonction du temps suivant l'évolution du biofilm (2100 mg/l)

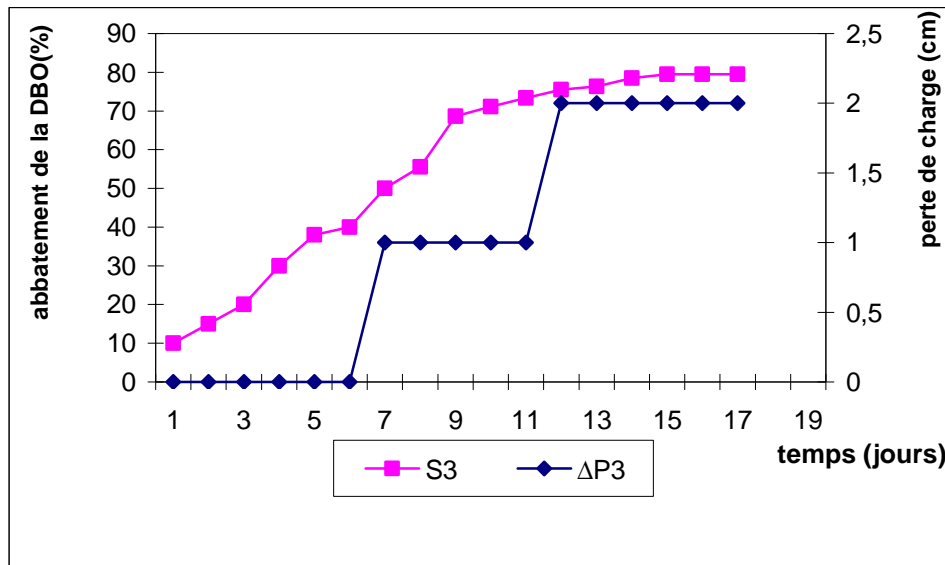


Figure 19 : Evolution de l'abattement de la DBO (%) et de la perte de charge en fonction de l'évolution du biofilm (450 mg/l)

La structure du biofilm dépend des conditions dans le quel il est exposé, le biofilm peut être formes à partir des bactéries hétérotrophes ou autotrophes en fonction de la disponibilité de la matière organique dans l'effluent. Afin d'appréhender l'implantation des populations microbiennes ayant lieu dans le bioréacteur lors de son fonctionnement, nous avons effectuées des analyses microbiologiques sur les différents effluents à la sortie du bioréacteur dont les résultats sont apportés sur le tableau (11).

L'analyse microbiologique révèle que la densité cellulaire exprimée en UFC / ml est d'autant plus élevée que les pertes de charge sont importantes Ceci est vrai dans le cas des charges S_1 et S_2 .

Tableau 11 : Evolution de la densité cellulaire en fonction du temps

Temps (jours)	7	15	21
Levures UFC /ml (S1)	2000	50000	indénombrable
Levures UFC /ml(S2)	700	3500	indénombrable

Le biofilm présente une coloration blanchâtre qui s'intensifie de plus en plus au court du temps dont la microflore constituante est essentiellement levurienne. Les résultats du diagnostic microbiologique révèlent effectivement une diversité de levures. L'isolement sur milieu OGA met en évidence des types de colonies de levures de différentes formes, d'aspect et de pigmentation. L'examen microscopique montre, entre autres, des cellules arrondies, ovoïdes et

allongées. Pour la charge la plus faible 450 mg/l l'analyse microbiologique a montré que la charge microbienne est essentiellement bactérienne. La caractérisation de cette microflore planctonique par culture sur des milieux sélectifs appropriés (VF, VBL, Rothe) a permis de mettre en évidence : les germes bactériens suivants.

- § (Anaérobie sulfite-réducteur (SR) totaux)
- § Les coliformes totaux
- § Les streptocoques fécaux

Durant les dix-sept jours de fonctionnement et pour les trois charges organiques l'augmentation dans le taux d'abattement de la DBO est accompagnée par un accroissement dans les pertes de charges. Cet accroissement présente trois phases dont l'étalement dans la charge une (15600 mg/l) est différent par rapport aux autres. En effet la perte de charge passe par les phases suivantes.

- § Presque invariable durant les 5 premiers jours
- § Augmentation régulière du 5^{ème} au 13^{ème} jour
- § Stationnaire après le 13^{ème} jour

Alors que le taux d'abattement passe par les phases suivantes

- § Augmentation régulière du 1^{ier} au 9^{ème} jour
- § Accroissement accéléré du 9 au 11^{ème} jour
- § Stationnaire à partir du 11^{ème} jours

L'évolution de l'abattement de la DBO est en parfaite corrélation avec les pertes de charge R_1 est égal à 0,98. Pour la charge S_2 (2100 mg/l) la corrélation est plus étroite corrélation $R_2 = 0,98$ d'où on constate deux phases. Une augmentation dans l'abattement de la DBO plus au moins régulière durant les treize premiers jours ensuite stationnaire. La perte de charge représente la même allure que celle de la première charge avec des différences pratiquement négligeable.

Pour la charge la plus faible 450 mg /l nous avons constaté le même comportement que celui signalé ci-dessus. C'est-à-dire que la corrélation est significative $R_2 = 0,91$ entre le taux d'abattement et la perte de charge.

Des études réalisées par plusieurs équipes de recherches dans le domaine à travers le monde aboutissent à des résultats comparables aux nôtres. En effet Hermeth et al (1985), Brox 1988 ont obtenu respectivement les rendements suivants 53 à 72% et 90 à 95 % dans l'abattement de la DBO en utilisant des biofilms à base de levures (le cas des charges S_1 et S_2).

Le rendement obtenu, dans l'élimination de la matière organique pour la charge (S_3) est de 79,5 %. Les recherches réalisées par Fdz-Polanco F. et al.,(1994), Borja et Banks (1995),

Holst et al., (1997) aboutissent à des résultats semblables et qui sont respectivement de, 80 %, 80 % et 95 %.

Les résultats correspondant a l'abatement dans la DCO montrent des niveaux légèrement comparables a ceux trouvés pour la DBO dont le taux d'abatement est de 78 % pour les charges S_1 et S_2 par contre pour la charge S_3 le rendement est de 72 % . Ce dernier est comparable aux celle trouvé par Araujo J.C et al. (1998), dont les valeurs sont comprises entre (70 et 80 %).

L'efficacité du biofilm bactérien par rapport à un biofilm à base de levures révèle que ce dernier et de loin le plus efficient. Wimpenny et al. (2000), dans une étude portant sur la comparaison entre les deux types de biofilms révèlent que les biofilms formés de champignons (levures et moisissures) présentent une supériorité dans l'intensité de leur métabolisme d'une part et une meilleure adaptation que ceux a base de bactéries d'autre part.

De plus les champignons résistent mieux aux effluent concentrés (charge organique élevée) que les bactéries (Lévy Y.,1995).

VI.5.2. Corrélation entre le pH et la conductivité électrique

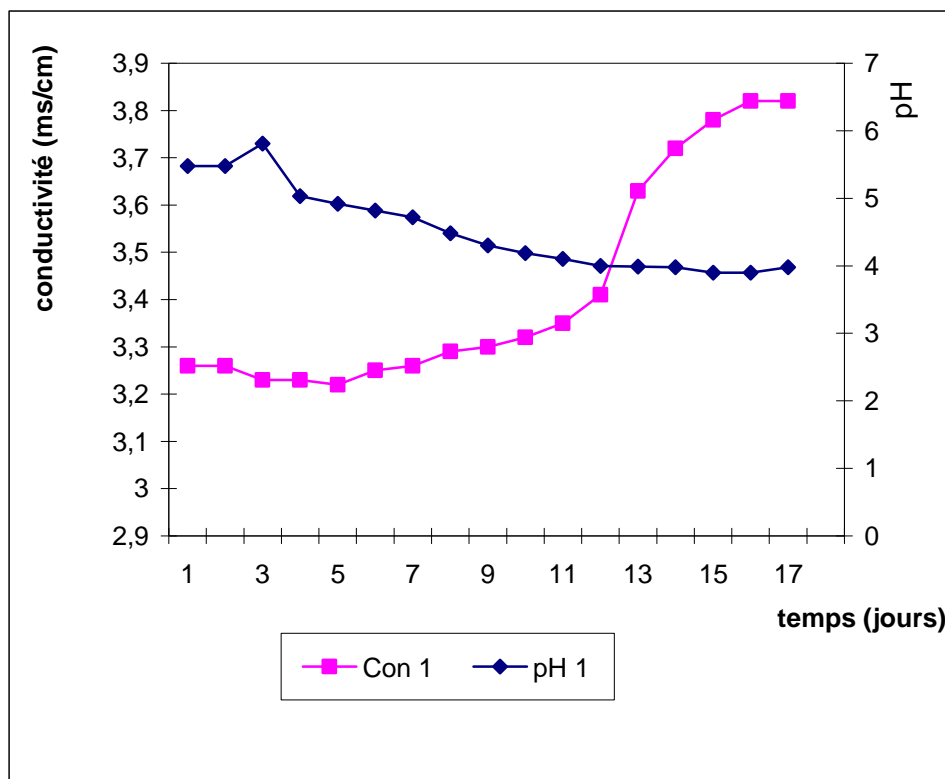


Figure 20 : Evolution du pH et la conductivité électrique avec l'évolution du biofilm en fonction du temps (S_1)

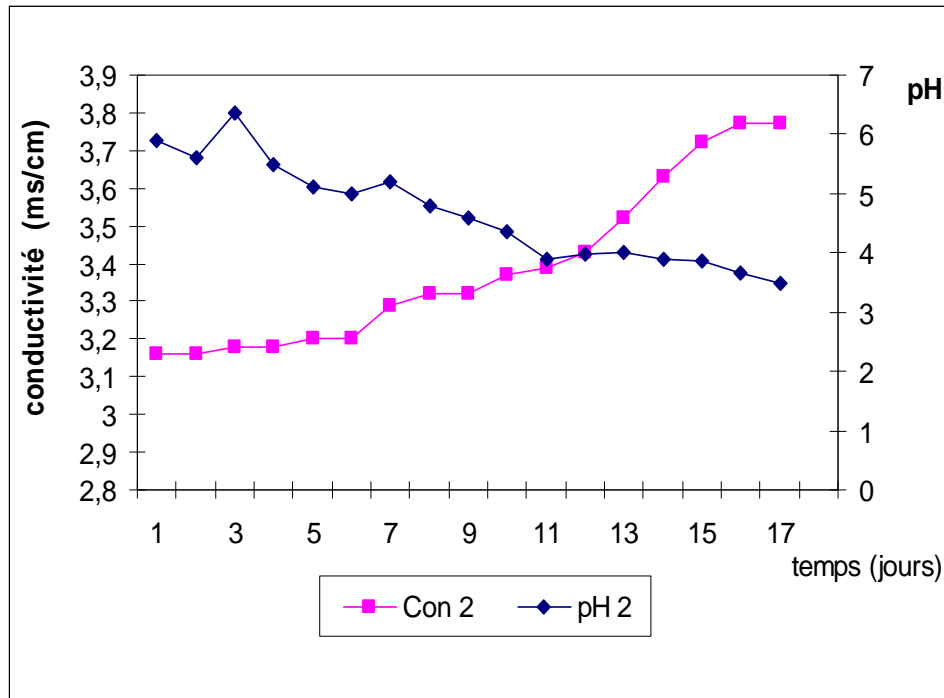


Figure 21 : Evolution du pH et la conductivité électrique avec l'évolution du biofilm en fonction du temps (S₂)

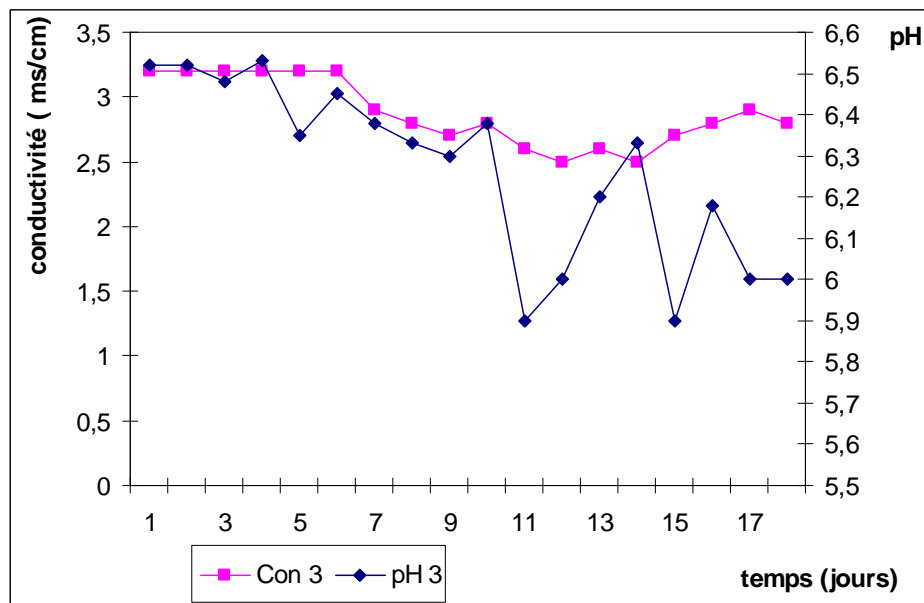


Figure 22 : Evolution du pH et la conductivité électrique avec l'évolution du biofilm en fonction du temps (S₃)

Les figures ci-dessus présentent l'évolution du pH et de la conductivité électrique du milieu mettent en exergue que plus le pH baisse et plus la conductivité électrique augmente. Ces

observations sont valables pour la charge S_1 et S_2 . Par contre pour la charge S_3 la conductivité électrique diminue alors que le pH reste quasi constant.

Le pH et la conductivité électrique du milieu permettent l'appréciation du comportement métabolique des microorganismes fixés. Leur évolution et une mesure indirecte de l'intensité de leur activité. L'acidification du milieu est due essentiellement aux processus fermentaire. En effet les cellules actives participent à la baisse du pH par la genèse d'une force proton motrice créatrice de charges positives à la surface des cellules (Pelmont J., 1994). De plus le même auteur estime que le gain résultant exclusivement de l'activité de la levure se situe, en général, aux environs de 0.5 à 1g/l exprimé en acide sulfurique. Les variations du pH enregistrées dans nos essais se situent dans cet intervalle.

Cependant on observe des types de comportement liés à leur aptitudes à tolérer et/ ou à métaboliser les acides organiques ou les minéraux. A l'état fixé les cellules deviennent plus stables et plus efficaces.

Les variations du pH à la sortie du bioréacteur pour la charge (S_3) sont négligeables. Ceci peut être expliqué par la croissance cellulaire (métabolisme oxydatif) qui prédomine sur le comportement fermentaire des cellules microbienne. De plus la teneur en constituants organiques a une influence directe sur la nature de la microflore ainsi que sur le type métabolique.

La diminution de la conductivité électrique en fonction du développement de biofilm est due à l'utilisation des substances ioniques par les bactéries durant leur croissance (Marbach et al. 1978).

L'évolution du pH par rapport à la conductivité du milieu présente une corrélation négative ($R_1 = -0,72$ et $R_2 = -0,87$) pour la charge une et deux par contre pour la charge trois la corrélation est positive ($R_3 = 0,66$).

IV.6. L'effet de choc

Avec un temps de séjour constant égale à 25 minutes et à une température de 25 °C. On est passé de la concentration 15600 à 31000 mg/ l, les résultats obtenues sont indiqués à la figure 23 et au tableau 12.

Tableau 12 : Evolution des différents paramètres dans l'effet de choc

Temps (h)	Abattement de la DBO (%)	$\Delta Pe/l$ (cm)	Conductivité (ms/cm)	pH
1	0,22	1,7	3,2	6
1,5	0,25	1,5	3,26	5,84
2	0,2	2,3	3,3	5,4
3	40,7	5	3,46	4,98
4	78	6	3,6	4,9
6	79,6	7	3,65	4,88
8	80,6	9	3,68	4,5
10	80,5	9	3,68	4,4

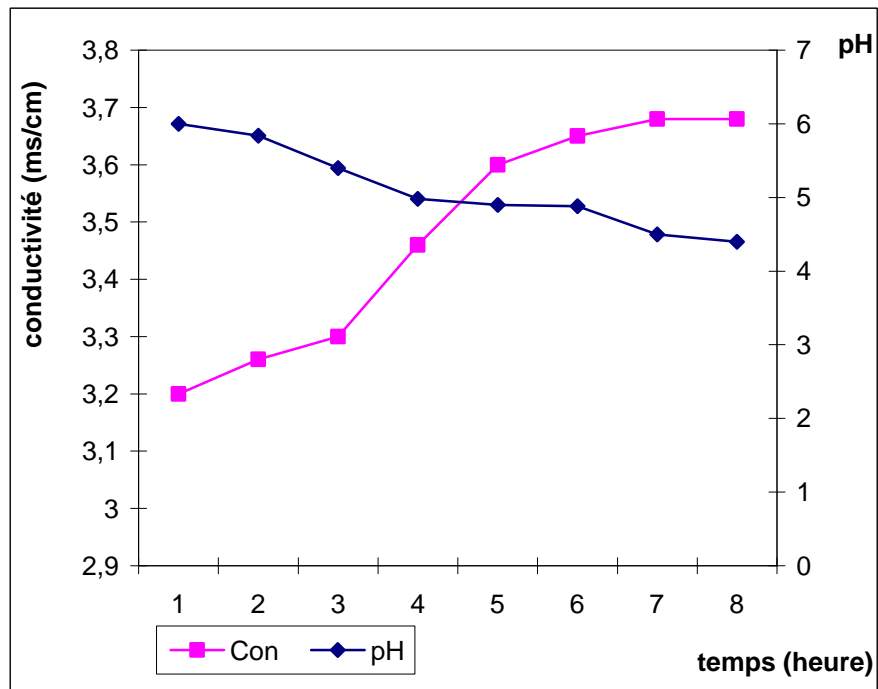
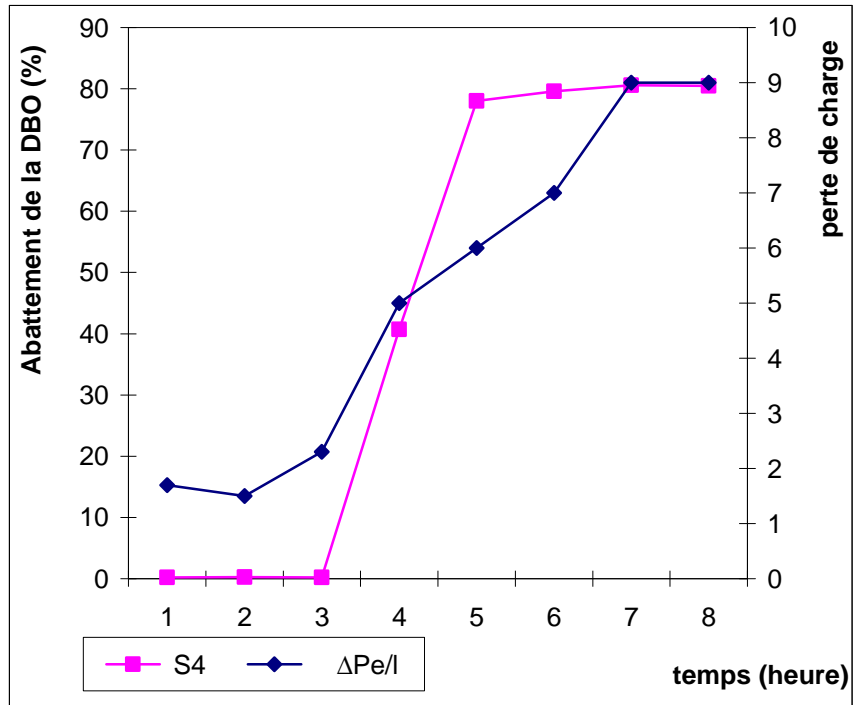


Figure 23 : Evolution des différents paramètres dans l'effet de choc

- **Interprétation**

D'après les résultats obtenus (tableau 12) nous avons observé un arrêt de l'activité microbienne juste après le l'utilisation de la concentration choc. Cette absence apparente d'activité a duré environ 2 heures. La reprise a eu lieu, d'une façon progressive, à partir de la troisième heure de fonctionnement. Nous avons remarqué, par la suite, un accroissement dans l'abattement de la DBO qui s'est stabilisé à la 8^{ème} heure à un taux de 80 %.

CHAPITRE V
Optimisation du fonctionnement
du bioréacteur

Chapitre 5.

IV. Etude d'optimisation des paramètres de fonctionnement du bioréacteur

L'objectif principal de cette étape est d'optimiser les conditions de fonctionnement du bioréacteur qui correspondent au meilleur taux d'élimination de la matière organique, en étudiant l'effet de temps de séjour et l'effet de la vitesse d'écoulement.

L'expérience a été conduite pour la charge de 450 mg/l représentative des effluents domestiques prévalents dans la majorité des rejets domestiques en Algérie.

V.1. Optimisation du temps de séjour

Pour l'étude de l'effet de temps de séjours nous avons fait varier simultanément le temps de séjours et la hauteur du lit tout en maintenant la vitesse d'écoulement constante (débit d'alimentation constant). Les temps de séjours sont respectivement 21, 13,4 et 7 minutes. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 24. La durée de fonctionnement pour chaque étage est en moyenne de 10 jours à la température ambiante (comprise entre 24 et 26°C).

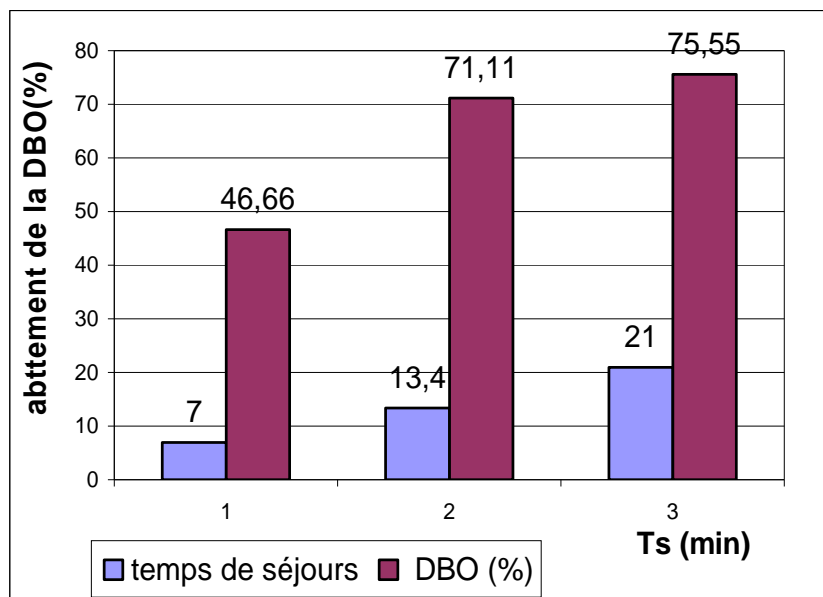


Figure 24 : Evolution du rendement de l'abattement de la DBO (%) en fonction du temps de séjours pour une vitesse $V = 2,6$ ml /min

Les histogrammes mettent en exergue que les niveaux d'élimination dans les rendements d'abattement de la matière organique augmente de façon proportionnelle en fonction du temps de séjours dans le bioréacteur. Le temps

de séjours de 21 minutes est le plus élevé. Il représente la valeur maximale du taux d'abattement de la DBO dans la réduction de la charge organique (75.55%) pour une vitesse de 2,6 ml/min.

V.2. Optimisation de la vitesse d'écoulement

L'étude de l'effet de la vitesse d'écoulement a été faite en maintenant le temps de séjours constant et en variant au même temps la hauteur du lit et la vitesse d'écoulement. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 25.

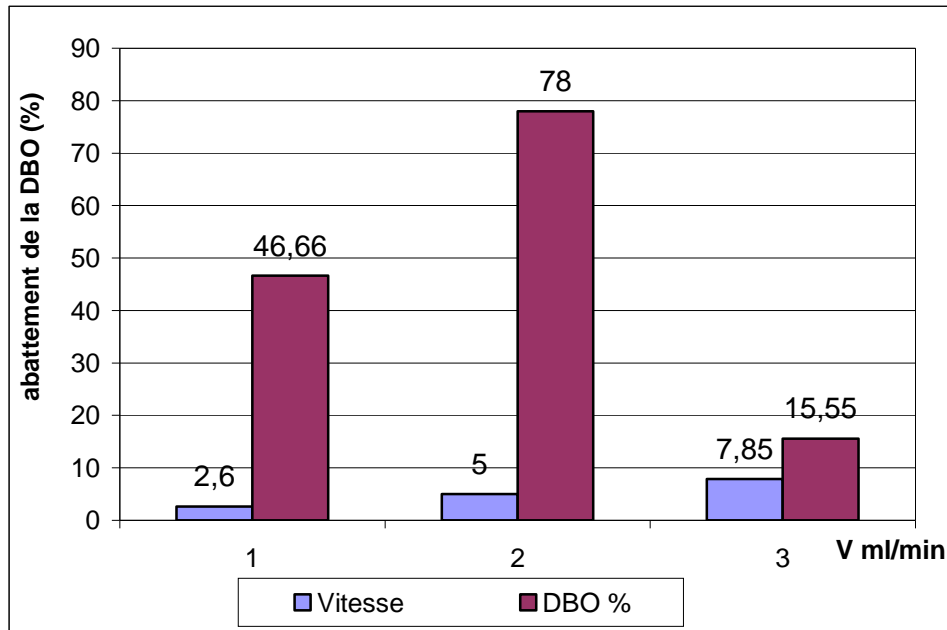


Figure 25 : Evolution du rendement de l'abattement de la DBO (%) en fonction de la vitesse pour un temps de séjours $T_s = 7$ min

Cette figure montre que le taux d'élimination de la DBO varie en fonction de la vitesse d'écoulement. Pour une vitesse de 2,61 ml /min, le rendement atteint est de 46,66 % avec un taux d'élimination de 37,71 mg/min. Par contre pour une vitesse supérieure de 5 ml/min le rendement est compris entre une valeur maximale de 78 % avec un taux d'élimination de 50,14 mg/min. Pour la plus grande vitesse V, égale à 7,85 ml/min, le rendement est le plus faible et la valeur atteinte est de 15,55 % .

A l'issue de cette étude les conditions optimales d'efficacité de fonctionnement préconisées pour la charge organique 450 mg/l sont :

- 7 minutes de séjours
- la vitesse d'écoulement est comprise entre (5 et 7.85) ml/min.

V.3. Etude de la phase transitoire

Nous avons suivi l'évolution des différents paramètres de fonctionnement à la sortie du bioréacteur en modifiant successivement la hauteur du lit après chaque phase stationnaire correspondante.

Les hauteurs du lit utilisées sont: 8, 16 et 25 cm

Chaque nouvelle couche ajoutée prend un certain temps pour être colonisée par des microorganismes. En conséquence le bioréacteur passe dans une phase transitoire jusqu'à l'établissement de la phase stationnaire correspondante à la hauteur du lit utilisée. Les résultats obtenus sont représentés respectivement dans les figures 26 et 27 pour les différents temps de séjours et les différentes vitesses. Les valeurs obtenues sont consignées dans les tableaux 13 et 14.

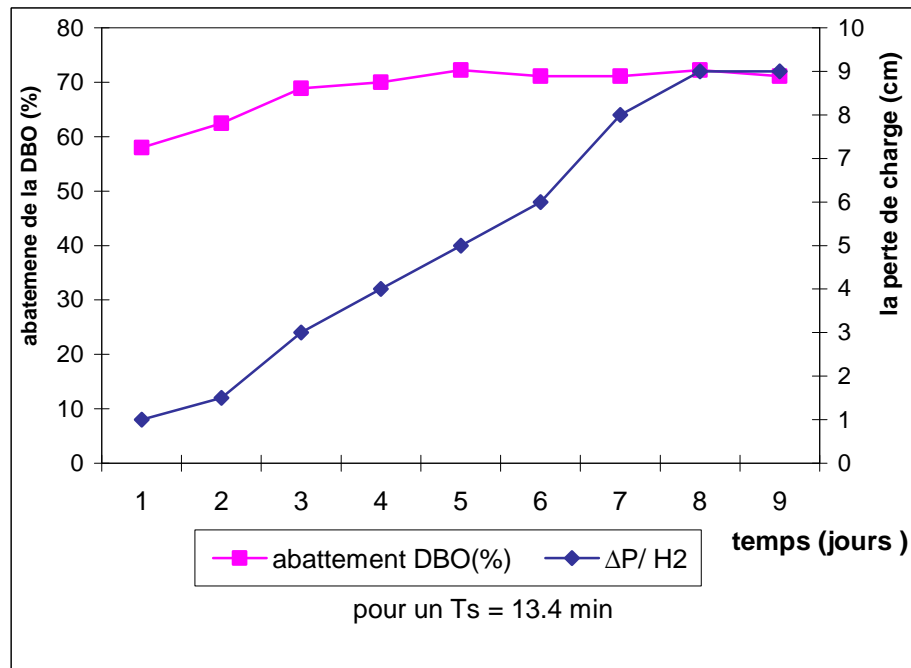
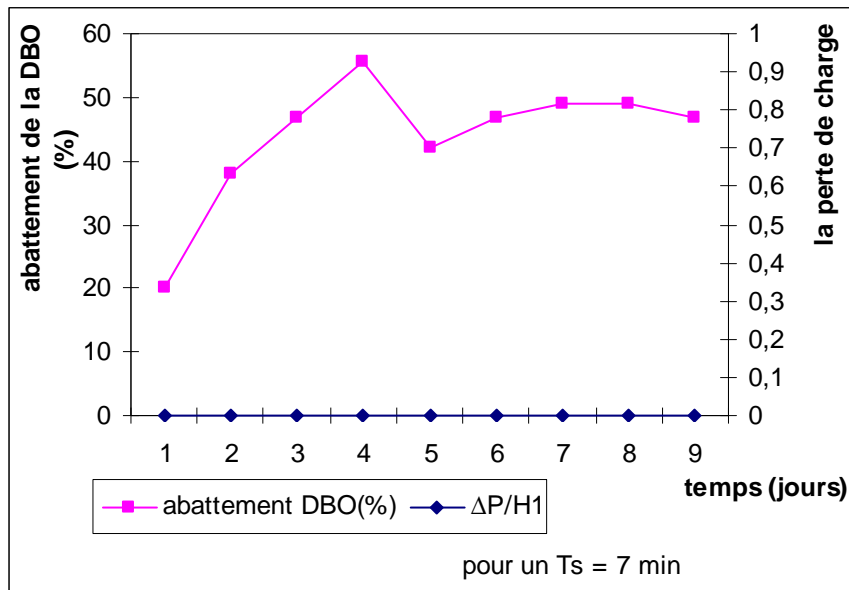
Tableau 13 : Evolution des différents paramètres de fonctionnement du bioréacteur en fonction du temps à Ts variable et vitesse constante

Ts = 7 min et H = 8 cm					Ts = 13,4min et H = 16 cm				Ts = 21 min et H = 25 cm			
Temps (jours)	Abattement De la DBO (%)	$\Delta p/L$	pH	Conductivité ms/cm	Abattement de la DBO (%)	$\Delta p/L$	pH	Conductivité ms/cm	Abattement de la DBO (%)	$\Delta p/L$	PH	Conductivité ms/cm
1	20	0	6,4	3,2	58	0,0625	6,92	3,2	75,55	0,16	6,87	3,2
2	38	0	6,5	3,2	62,44	0,09375	6,88	3,2	76,66	0,12	5,66	3,2
3	46,66	0	6,48	3,2	68,88	0,1875	6,84	3,1	77,77	0,12	6,1	3,1
4	55,55	0	6,53	3,2	70	0,2500	6,74	3,1	68,88	0,08	5,8	3,1
5	42,22	0	6,44	3,2	72,22	0,3125	6,72	3,1	70	0,08	6,31	3,2
6	46,66	0	6,38	3,1	71,11	0,3750	6,6	3,1	68,88	0,04	5,81	3
7	48,88	0	6,4	3,1	71,11	0,5000	6,5	3,1	73,33	0,04	6,13	3
8	48,88	0	6,38	3,1	72,22	0,5625	6,2	3,1	73,33	0,04	6	2,9
9	46,66	0	6,3	3,1	71,11	0,6525	6, 2	3,1	74,44	0,04	5,98	2,9
10	46,66	0	6,3	3,1	72,22	0,6525	6,2	3,1	75,55	0,04	5,96	2,8

Tableau 14 : Evolution des différents paramètres de fonctionnement du bioréacteur en fonction du temps à Ts constant et vitesse variable

V= 2.61 ml/min					V= 5ml/min				V= 7.85ml/ min			
Temps (jours)	Abattement de la DBO (%)	$\Delta p/L$	pH	Conductivité ms/cm	Abattement de la DBO (%)	$\Delta p/L$	pH	Conductivité ms/cm	Abattement de la DBO (%)	$\Delta p/L$	PH	Conductivité ms/cm
1	20	0	6,4	3,2	44,44	0,3125	6,9	3,2	11,11	0,08	6,86	3,2
2	38	0	6,5	3,2	55,66	0,4375	6,3	3,1	12,12	0,08	6,86	3,2
3	46,66	0	6,48	3,2	70	0,5625	6,05	2,9	13,33	0,12	6,79	3,2
4	55,55	0	6,53	3,2	77,77	0,8437	5,86	2,86	15,55	0,24	6,88	3,1
5	42,22	0	6,44	3,2	71,11	0,0625	5,96	2,85	13,33	0,4	6,88	3,1
6	46,66	0	6,38	3,1	73,33	0,3125	5,9	2,84	13,33	0,52	6,7	3,2
7	48,88	0	6,4	3,1	75,55	0,25	5,9	2,83	11,11	0,08	6,5	3,2
8	48,88	0	6,38	3,1	76,66	0,1875	5,92	2,8	13,33	0,16	6,5	3,1
9	46,66	0	6,3	3,1	78	0,1875	5,92	2,78	15,55	0,28	6,7	3,1
10	46,66	0	6,3	3,1	78	0,1875	5,88	2,75	13,33	0,52	6,7	3,1

V.4. Evolution de l'abattement de la DBO (%) et la perte de charge en fonction du temps à vitesse constante et Ts variable



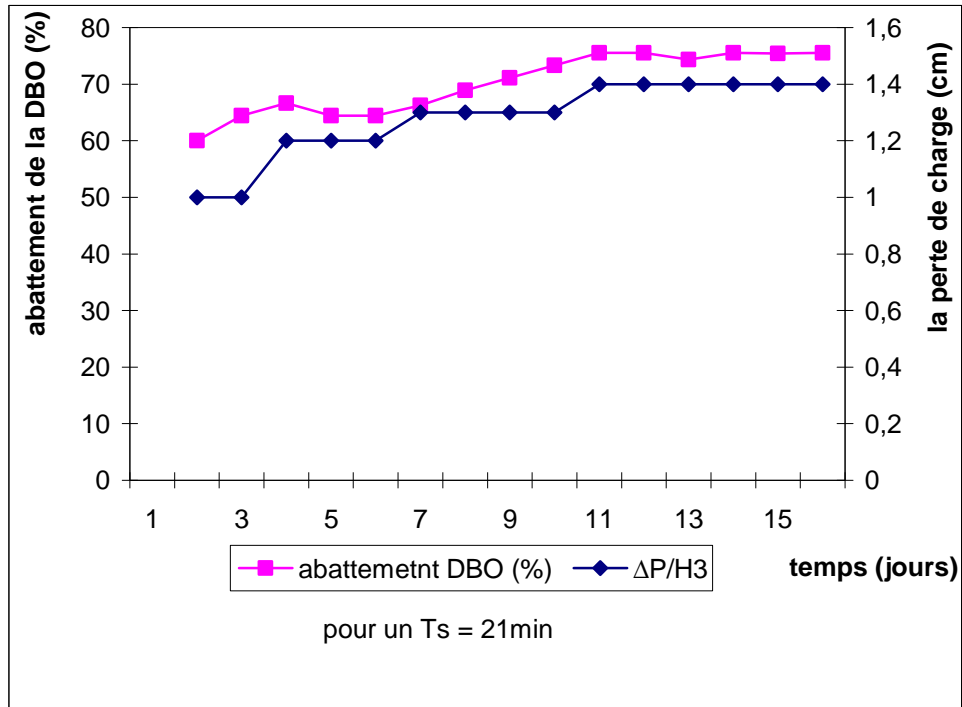
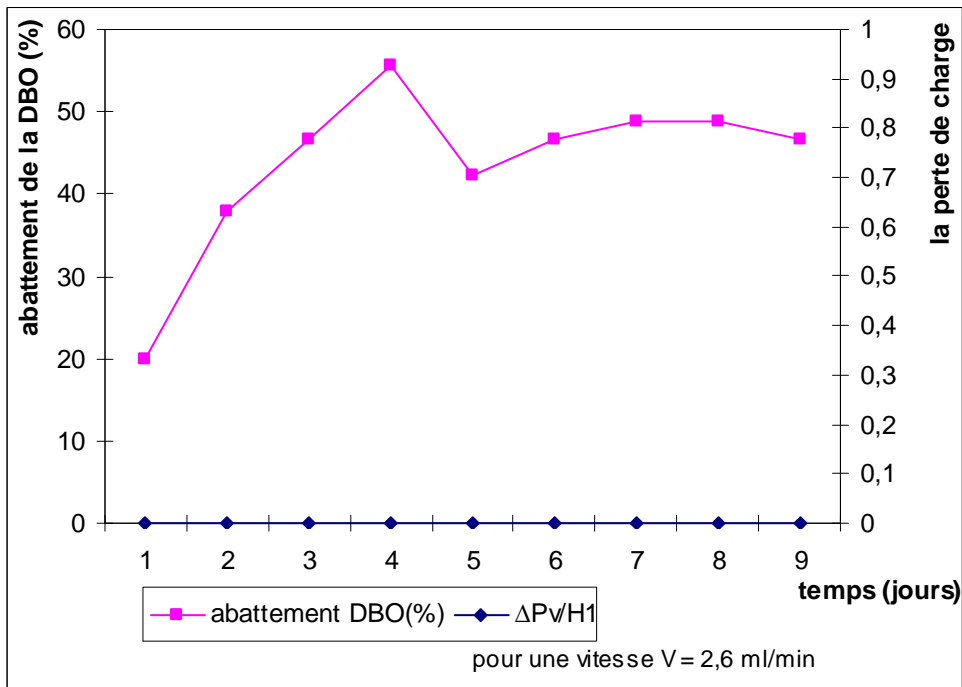


Figure 26 : Evolution de l'abattement de la DBO (%) et de la perte de charge en fonction des différents temps de séjour à une vitesse $V = 2,6 \text{ ml/min}$

V.5. Evolution de l'abattement de la DBO (%) et de la perte de charge en fonction du temps à T_s constant et vitesse variable



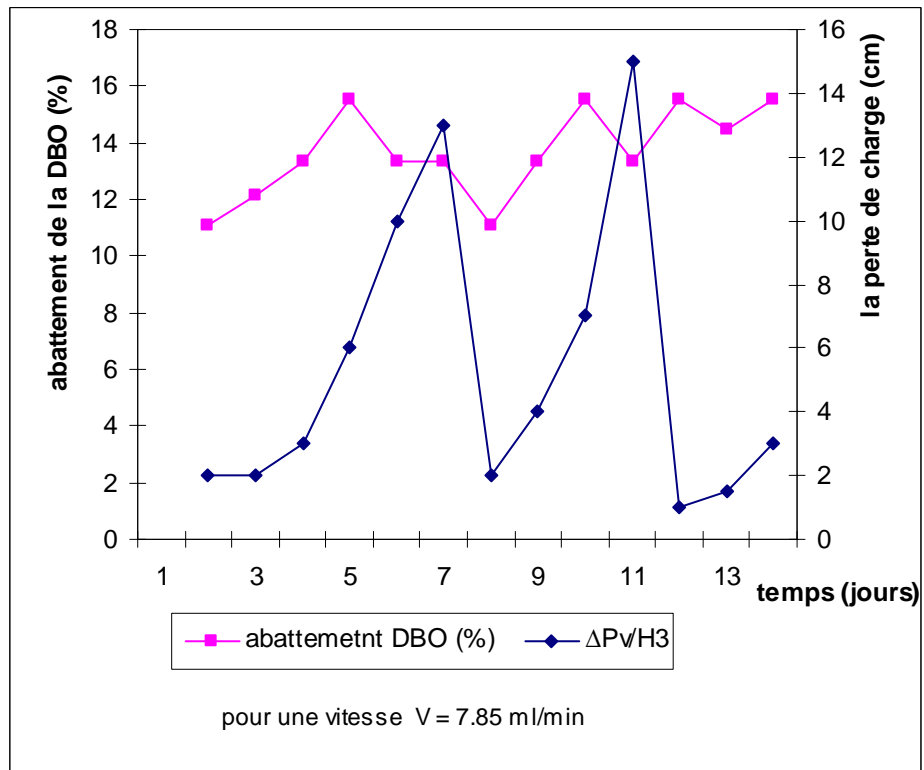
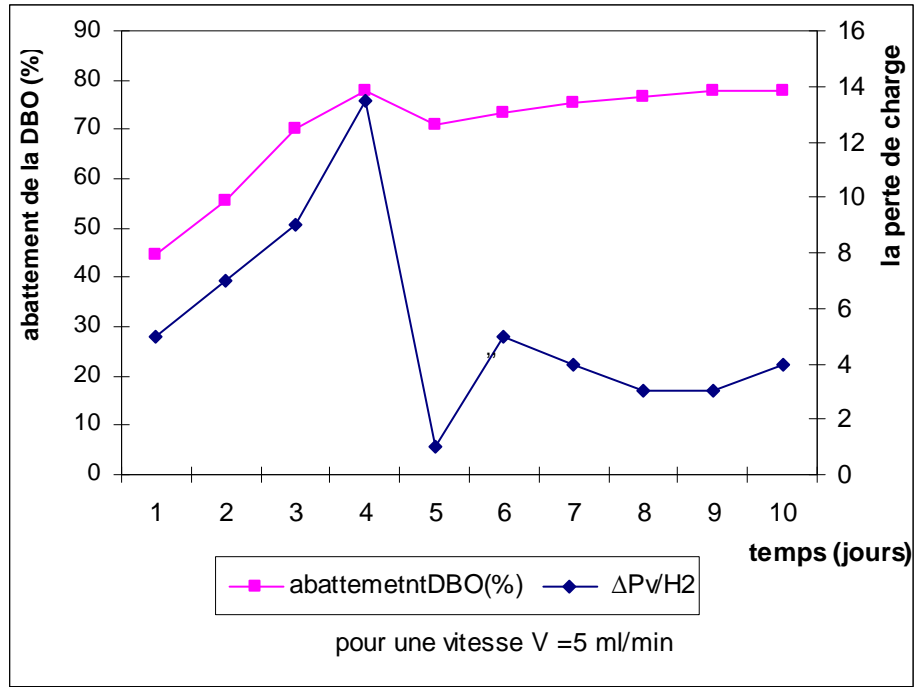


Figure 27 : Evolution l'abattement de la DBO (%) et la perte de charge en fonction du temps en jours pour différentes vitesses et un $T_s = 7min$

Interprétation des résultats

En passant d'une hauteur du lit de 8 à 16 et à 25 cm on a constaté que le bioréacteur passe dans des phases transitoires qui durent environ 5 jours. Cette durée est relativement faible en la comparant avec celle nécessaire au bioréacteur démarrant pour une hauteur correspondante (nouvellement inoculée par une suspension). Ceci traduit la capacité d'envahissement, de fixation et de développement des cellules sur le support.

Les faibles valeurs de la perte de charge indiquée par le piézomètre sont mentionnées sur les tableaux 13 et 14. Elles sont expliquées par la différence entre la phase fluide dans le lit de garnissage et celle dans le piézomètre. En effet dans le lit la phase fluide a une masse volumique apparente qui dépend de la présence des bulles de gaz dans le liquide. Par contre dans le piézomètre il n'y a pas que le liquide d'où une masse volumique plus élevée.

Cette différence dans la masse volumique a engendrée une différence de charge positif qui est soustraite de la perte de charge dynamique ce qui donne par conséquence des valeurs réduites.

Selon les résultats obtenus nous avons constaté que le meilleur rendement d'élimination de la matière organique de la DBO dans notre bioréacteur (78 %) correspond à un $T_s = 7$ min et une vitesse de 5 ml/min). En effet ce rendement est supérieur à celui obtenu pour un $T_s = 21$ min. Cela s'explique par un effet hydrodynamique car le faible temps de séjours à engendrer une augmentation de la vitesse d'écoulement, cette augmentation a permis d'éliminer la couche inactive dans le biofilm par abrasion (détachement dû à la collision des particules du fluide avec des bloc de biofilm) Brading et al, 1995.

De plus l'augmentation de la vitesse d'écoulement a diminué l'épaisseur de l'interface du liquide et le volume du biofilm. Selon Characklis (1990) et Philip S. (2003), cette situation a pour conséquence la création d'une zone de turbulence plus près de la surface du biofilm favorisant le transfert rapide par convection des corps dissous vers les cellules fixées.

Le pH à la sortie du bioréacteur est resté quasiment constant (entre 6 et 5,8). Cet effluent ne nécessiterait aucune correction de pH d'une part et d'autre part il est conforme aux exigences réglementaires préconisées dans ce domaine.

Conclusion générale

Au terme de cette étude les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence les performances épuratoires du bioreacteur à cellules immobilisées.

L'efficacité d'un tel système se traduit par des rendements d'élimination de la charge organique substantielle. En effet les résultats trouvés montrent que pour les charges élevées:

- § l'abattement de la DBO est de 90 % pour les charges concentrées (15600 et 2100 mg/l). Ceci correspond à un taux d'élimination respectif de 33,06 Kg/h.m³ pour la charge S₁ (15600mg/l) et 4,53 kg/h.m³ pour la charge S₂ (2100 mg/l). Ce résultat montre avantageusement l'exploitation de ce type de technologie par rapport aux procédés classiques qui ne dépassent pas dans le meilleur des cas 2 Kg/j.m³ (C. Gomella et H.Guerree, 1983).
- § L'analyse microbiologique de l'effluent a mis en évidence une prédominance levurienne (biofilm blanchâtre à crémeux). De plus l'anoxie à pour conséquence, la déviation métabolique de la respiration (réactions d'oxydation) à la fermentations.
- § Le traitement de ces charges carbonées élevées aboutis à l'obtention de rejets d'eaux ayant un pH acide (pH < 4, cette valeur est inférieur au norme des rejets) pouvant être nuisibles au milieu récepteur nécessitant par conséquent une correction à des valeurs comprises entre 5,5 - 8,5.
- § Durant le fonctionnement du système les alternances entre détachement et formation de biofilm aboutissent à des effets de colmatage négligeables. Les pertes de charge mesurées (comprises entre 28 et 36 cm/m pour les charges 2100 et 15600 mg/l) mettent en évidence ce pouvoir d'auto régulation de l'épaisseur.
- § Notre bioréacteur montre une grande stabilité vis a vis des effets de choc de concentration. En effet en passant d'une concentration de 15,6 g/l à 32.2 g/l. La reprise de ses performances épuratoires est atteinte après une phase de latence qui n'a pas dépassé 4-8 heures.

Pour la charge la plus faible (charge trois 450 mg/l) :

- § Les analyses microbiologiques sur l'effluent (la flore planctonique) à la sortie du bioréacteur, sont constituées principalement de bactéries.

- Un abattement de la DBO moins important par rapport aux charges précédentes, de l'ordre de 80 % avec un taux d'élimination de $20,6 \text{ Kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$. Cette valeur reste toujours dans les normes de fonctionnement d'un lit bactérien (70 et 90 %).
- Un pH quasi invariable dont les valeurs sont supérieures à 5,5, ce qui permet leur rejet sans avoir recours à un ajustement.
- Emission d'odeurs désagréables qui sont dues au processus métabolique anaérobie de la flore bactériennes.
- Pour les pertes de charge et le colmatage on a constaté le même comportement du lit que celui signalé avec les charges concentrées (15600 et 2100 mg/l).

L'étude d'optimisation des paramètres de performances de fonctionnement de notre bioréacteur a été réalisée dans le but de maximiser le taux d'élimination de la matière organique. L'examen des résultats a mis en exergue deux paramètres d'optimisation :

§ Un temps de séjours de 7 minutes

- Une vitesse d'écoulement optimale comprise entre 5 et 7,85 ml/min.

A cette étude d'optimisation la charge éliminée est de $2,91 \text{ kg/h.m}^3$.

A travers ces résultats nous trouvons que l'épuration des eaux résiduaires par le lit bactérien à cellules immobilisées est intéressante. Pouvant remplacer avantageusement les systèmes existants. En plus cette étude a montre que le pouvoir des cellules immobilisées est très performant avec les charges élevées (15600 et 2100 mg/l).

Néanmoins certaines anomalies doivent faire l'objet d'une autre étude à savoir :

- Le problème du pH acide issu de la fermentation (charges élevées)
- Le problème des odeurs avec les lits colonisées par des bactéries

Dans ce contexte nous proposons :

- ✓ De reprendre cette expérience conduite sur le même système mais cette fois ci en conditions d'aération artificielle (oxygénation du lit) pour éliminer les odeurs nuisibles
- ✓ L'utilisation d'un système de réacteurs multi étagé liés en série afin d'éliminer la pollution organique résiduelle et s'approcher de plus en plus au normes de rejets des effluents édicté par la réglementation en vigueur.

A cet effet nous recommandons

- ✓ Le recyclage d'effluent à la sortie pour augmenter le taux d'élimination de la matière organique.

- ✓ Une étude d'approche concernant le biofilm et son comportement microbiologique afin de mieux saisir son fonctionnement au niveau biologique (métabolisation des éléments divers et variés tel que les molécules récalcitrantes et polluantes dans une visée de dépollution.

Bibliographie

- Andreoni V., 1989;** Anaerobic Digestion of Swine Slurry and agro-industrial Wastes in fixed bed up - flow digesters.
Symposium NICE 4-6 avril. Technical Advances in biofilm reactor.
- Annachhatre, A. P., Bhamidimarri, S.M.R., 1992 ;**Microbial attachment and growth in fixed-film reactors: process start-up considerations.
Biotech. Adv., Vol.10, pp.69-91.
- Aaujo J.C ;Campos J.R and Vazoller R.F; 1998,** structure and microbial population activity in anaerobic bed reactor treating synthetic wastewater.
Biofilm journal , Vol 3, pp(bf 98003)
- Archangeli J.-P. ,1994;**Biological degradation of aromatic hydrocarbons in biofilm systems.
Ph. D. Thesis, Technical University of Denmark, Lyngby, DK.
- Belkhadir R., B. Capdeville ,Roques H., 1986 ;** Fundamental descriptive study and modelization of biological film growth - I. Fundamental descriptive study of biological film growth.
Water Research, Vol.22, P. 59-69.
- Boeglin J.C.,1997 ;**Analyse des eaux résiduaires. Mesure de la pollution
Traité Analyse et caractérisation. Techniques de l'Ingénieur (1997).
- Boulangé-Petemarnr L. 1996;** Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces And cleanability.
- Borja R., Banks C.J., 1995;** Response of an Anaerobic Fluidized Bed Reactor Treating Ice-Cream Wastewater to Organic, Hydraulic, Temperature and pH Shocks.
J. Biotechnol, Vol.39, P. 251-259.
- Brading M .C., Hashia R and Chandna S., 1995 ;** Dynamics of bacterial biofilm formation. In: Lappin-Scott HM, Costerton .
JW, editors. Microbial biofilms : Cambridge University Press. P. 46–63.
- Brooks, J.L. 1988 ;** The role of fungi in the sphagnum peat wastewater treatment system.in A potential new role for fungi in a wastewater
MBR biological nitrogen reduction system R.K. Guest and D.W. Smith.
J. Environ. Eng. Sci.,Vol .1, P. 433–437 (2002)
- Bruce L. ;Hermanowicz S.W; Parker D.S.,2002;** Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers
Environmental science & technology , Vol. 36, N° 11, P.2530-2536
- Bryers J. D. 1991;** Understanding and controlling detrimental bioreactor biofilms.
Trends in Biotechnology, Vol .9, P .422-426.

- Bryers J. D. and W. G. Characklis 1981**; Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: overall kinetics.
Water Research, Vol. 15, P .483-491.
- Burin C., 2002** ; les biofilms.
Thèse de doctorat Faculté de Médecine de Créteil France.
- Chachuat B.,1998** ; Traitement d'effluents concentrés par cultures fixées sur gravier.
Rapport de DEA, Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg, P .118.
- Carpentier B.,1999** ; Les biofilms dans l'industrie agro-alimentaire.
Rev. Microbiol., P105-111
- Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M., Topisirovic L., 1994**; Carbon source requirements for
exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*
CG11 and partial structure analysis of the polymer.
Appl Environ Microbiol., Vol. 60,P 3914-3919.
- Characklis, W. G et Marshall. Ed ,1990**; Biofilm processes Biofilms.
J. Wiley & sons. New York, USA. PP. 195–231.
- Cragues, G., 1993** ; Cellules microbiennes fixées et procédés d'épuration des eaux usées.
projet de fin d'étude .Ecole Nationale des Travaux Publics de France, p 50.
- Cherier, G., 1991** ; Infiltration-percolation des eaux résiduaires : critères de dimensionnement et règles de gestion. Thèse en Sciences de l'Eau.
Université de Paris VI France, P 101.
- Christensen, B. E. et Characklis, W. G.,1990**; Physical and chemical properties of biofilms.
Biofilms. Edt. Marshall and Wiley, P 523-584.
- Criddle, C. S., Alvarez, L. A. et McCarty, P. L. ,1991**; Microbial processes in porous media.
Transport Processes in porous media.
Ed. Kluwer Academic Publishers, P. 639-691.
- Daniels S. L., 1980**; Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surfaces.
In: Adsorption of microorganisms to surfaces; G. Bitton and K.C. Marshall.
Edt. J. Wiley & sons, New York, USA.PP: 7-58
- Degrémont, Mémento Technique de l'Eau.**
Edt. Technique et Documentation, Lavoisier 1989.

- Dunne W.M., 2002;** Bacterial adhesion.
Seen any good biofilms lately Clin
Microbiol Rev., Vol. 15, P.155-166.
- DuPont G.A.,1997;**Understanding dental plaque; biofilm dynamics.
J.Vet.Dent., P 91-93
- Edeline F. (1993) ;** L'épuration biologique des eaux .Théorie & technologie des réacteurs.
TEC & DOC Edt. Cebedoc .Lavoisier
- Eckenfelder (1982) ;** Gestion des eaux usées urbaines et industrielles.
Ed. Techniques et documentation, Lavoisier.
- Fdz-Polanco F., Ruggeri B., Sanz I ., 1994;** Behaviour of an Anaerobic/Aerobic Pilot Scale
Fluidized Bed for the Simultaneous Removal of Carbon and Nitrogen.
Water Research, Vol .24,P97-101
- Finlay J. A., Callow M.E., Schultz M.P., Swain G.W., and Callow J .A.,2002;** Adhesion
strength of settled spores of the green alga in Three Models to Relate
Detachment of Low Form Fouling at Laboratory and Ship Scale .
Biofouling, 2003 Vol.19 (Supplement), P 17–26
- Fletcher M.,1980a;** The question of passive versus active attachment mechanism.Cité In : Point
sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air) Guy M. 1985.
Vol 2.2 , PP.5-11
- Gomella C. et Gurrée H., 1983 ;** Les eaux usées dans les agglomérations urbaines ou rurales
Edt. Eyrolles N° 2
- Gracia E., Fernandez A., Convhello P., Laclerigat ., Panlagera L., Seral F., 1997;**
Adherence of staphylococcus slime –producing.
Int.Orthop., Vol .21,P 46-51.
- Guellaf H. ,1999 ;** Les massifs de sable dans les filières « cultures fixées sur supports fins »
:Caractérisation granulométrique, hydraulique et minéralogique. p 114.Cité
In :Traitement d'effluents concentres par cultures fixes sur gravier ou
pouzzolane
Menoret C. Thèse de Doctorat ,Académie de Montpellier 2001
- Guiraud J., 1998 ;** Microbiologie alimentaire
TOC & DOC Edt .dunoud
- Guy M., 1985 ;** Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air)
Vol 2.2, P5-11.
- Ho C. S.,1986,** An understanding of the forces in the adhesion of microorganisms to surfaces.
Process Biochemistry, Vol. 10, P. 148-152.
- Holst T.C., Janssen A ., Guiot S.R., Ballapragda B.S.,1997;** Anaerobic Fluidized Beds:
Ten Years of Industrial Experience.
Proceedings of the 8th International Conference on Anaerobic

Digestion, P.2, 142-149

- Harremoës P. 1978;** Biofilm kinetics. *In: Water pollution microbiology.*
R. Mitchell .Edt., Vol. 2, John Wiley,New York, USA;PP: 71-109.
- Hiremath, A.B., Nimbargi, P.M., and Jayaraj, Y.M., 1985;** Domestic sewage treatment by fungi and biomass production In : A potential new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system. R.K. Guest and D.W. Smith
J. Environ. Eng. Sci., Vol .1,P 433–437 (2002)
- Iwai S.and Kitao T.,1994;** Wastewater treatment with microbial films.
Technomic publishing Co., Inc., Basel, Switzerland.
- Jourdain M.J., 1983 ;** Application d'une méthode électrochimique à l'étude de la fixation des E.coli. Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air) Guy Martin 1985.
Vol 2.2 : PP 5-14
- Kadri A., Bouikni A., Ezziane K., Ghrici M., Hallal A., 2000 ;**Effets des ajouts Minéraux sur la fabrication et la caractérisation des ciments INST Génie civil Chlef
J.0201/04/03/98
- kahane I ., Gat o., Banai M., Bredet W., and Razin S., 1979 ;** Adhernce of mycoplasma galliseticum .
J.Gen. microbiol , Vol .111, PP 217-222
- Kurbiel J., 1991;** Advanced Wastewater Treatment and Reclamation.
Water Science and Technology. Vol. 24, N° 7
- Larpent J.,1997 ;** Microbiologie alimentaire. Technique de Laboratoire
Tec et DOC :Edt Lavoisier
- Leveau J.Y et Bouix M.,1999 ;** Netoyage desinfection et hygiène dans les bioindustries .
Tec et Doc .paris p 548
- LEVI Y. ,1995 ;** Les paramètres influençant le développement des germes dans les réseauxd'eau potable.
Technique Science et Méthode, Vol .3, P 240-245.
- Lewandowski Z., Stoodley P., Altobelli S., Fukushima E.,1993;** Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems: recent advances and new problems.
Proceedings of the 2nd IAWQ specialized conference on "Biofilm reactors".Paris, France.PP: 313-319.
- Lewandowski Z., Stoodley.,1995;** Flow induced vibrations, drag force and pressure drop in conduits covered with biofilm.

- Proceedings of the Conference workshop "Biofilm structure, growth and dynamics.
Noordwijkerhout, The Netherlands, PP:223-229.
- Lazarova V. Z., Manem J., 1995;** Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment.
WaterResearch, Vol. 29, P. 2227-2245.
- Marbach A. and Shilo M.,1978 ;** Dependence of marine Bdellovibrios on potassium calcium and magnesium ions . Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air) Guy martin 1985.
Vol, 2.2 : PP 54-64
- Marshall K. C., 1994;** Microbial adhesion in biotechnological process.
Current Opinion in Biotechnology, Vol.5 ,P296-301
- Marin L. Benitoy., Fernandez M.F., Garcia M.L., Selgas D., 1997;** Lactic acid bacteria : hydrophobicity and strength of attachment to meat surface.
Letters appl. Microbiol,Vol. 24, P.14-18
- MaC Rae Z.C., Evans S.K.,1983;**Factors influencing the adsorption of bacteria to magnetite in water and wastewater. Cité In : Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air), Guy M. 1985.
Vol 2.2 , PP.5-11
- Menoret C., 2001 ;** Traitement d'effluents concentres par cultures fixes sur gravier ou pouzzolane.
Thèse de Doctorat ,Académie de Montpellier
- Merck E.,1986 ;** Guide d'analyse microbiologique
- Mottier V., 2000;** wastewater treatment by infiltration percolation : a case study, in
Water Science and Technology, Vol. 41, PP. 77-84.
- Mouton C., Benito Y., Bilack rvMichaileSCO.,ValcaralJ.,1999;** Biofilm bactérien de la cavité buccale.
Bull.Soc .Fr.Microbiol ,Vol.14. N°. 2, P.112-120.
- Nguyen K. M., 1989 ;** Description et modélisation de films biologiques aérobies.
Ph. D. thesis Nr. 96, INSA Toulouse, France.
- O'Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R.,2000a;** Biofilm formation as microbial development.
Annu.Rev. Microbiol, Vol.54, P.49-79.
- Palmer R.J .,White J.R and White D.C.,1997;** Developmental biology of biofilm implication for treatment and control.
Trends Microbiol,Vol.5,N°.11, P.435-440
- Pelmont J.,1994 ;** Bactéries environnement. Adaptation physiologique
T1.Edt.O.P.U. Alger

- Philip S.,2003;** Structure and microbial population activity in an anaerobic fluidized bed reactor treating synthetic wastewater.
Journal of Bacteriology, March 2003, Vol. 185, N° 5 p. 1485-1491,
- Pierzo, V. 1996;** Etude de la composition et de l'activité de biofilms développés sur supports granulaires : élimination conjointe de l'azote et du carbone au cours du traitement des eaux résiduaires urbaines.
Thèse en Biologie des Populations et Ecosystèmes.
Université de Savoie,Chambery, p. 261.
- Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C and Lejeune P.,1999;** Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*.
J Bacteriol, Vol .81, P. 5993-6002.
- Rediske M., Roede B., NelsonJ., Robison R.L., 1999 ;** Ultrasonic enhancement of antibiotic action on E.coli biofilm.Antimicrob.
Agent chemother, Vol. 43, N° 5, P. 1211-1214.
- Rodier J., 1984 ;** Analyse des eaux .Dunoud 7^{ème} Ed.
- Ro K. S. and J. B. Neethling 1991 ;** Biofilm density for biological fluidized beds. *Journal of Water Pollution Control Federation*, Vol .63, N°5, P. 815-818.
- Roques, H. 1979.,** Fondements théoriques du traitement biologique des eaux.
Volume 2.Ed. Technique et documentation, Lavoisier.
- Séguret, F. 1998 ;** Etude de l'hydrodynamique des procédés de traitement des eaux usées à biomasse fixée, application aux lits bactériens et aux biofiltres. Cité In
Traitement d'effluents concentres par cultures fixes sur gravier ou pouzzolane. Menoret C.
Thèse de Doctorat ,Académie de Montpellier2001
- Show K. et Tay J., 1999;** Influence of support media on biomass growth and retention in anaerobic filters.
Wat. Res., Vol. 33, N°6, P. 1471-1481.
- Schneider R. P. and Marshall K. C.,1994;** Retention of the Gram-negative marine bacterium SW8 on surfaces - effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films.
Colloids and surfaces B:Biointerfaces, Vol 2, P. 387-396.
- Sutherland I.W. ,1972 ;** Bacterial exopolysaccharides dans A.H. Rose. cité par Dirk Bergmaier production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *lb. rhamnosus* rw-9595m d'un milieu à base de perméat de lactosérum .
Thèse de doctorat , Université de Laval Québec , 2002.
- Trulear M.G et Characklis W.G., 1982;** Dynamics of biofilm processes.

- Cité in Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air)
Guy Martin, Vol 2.2 , P.5-11 (1985)
- Turkhia M.H., Characklis W.G and Cooksey., 1983.,** Influence of a calcium Specific chelant on biofilm removal.Cité in Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air) Guy Martin, Vol 2.2 , P.5-11 (1985)
- Van Loosdrecht M. C. M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnde A. J.B.,1987b;** Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict initial steps of bacterial adhesion.
Applied and Environmental Microbiology, Vol .53 ,N°.8, P. 1898-1901.
- Van Loosdrecht M. C. M. and Heijnen S. J. ,1993;** Biofilm bioreactors forwastewater treatment.
Trends in Biotechnology, Vol.11, P. 117-121.
- Van Loosdrecht M. C. M., M., Eikelboom D., Gjaltema A., Mulder A., Tijhuis L.and Heijnen J. J.,1995;** Biofilm structures.
Wat. Sci. Tech. Vol.32, N°.8, P. 35-43
- Wanner O. ,1995;** New experimental findings and biofilm modelling concepts. Proceedings of theConference workshop "Biofilm structure, growth and dynamics."
Noordwijkerhout, The Netherlands, P. 144-151.
- Williamson K. and McCarty P. L.,1976;** A model of substrate utilization by bacterial films.
Journal of Water Pollution ControlFederation, Vol.48 N°.1, P. 9-24.
- Wimpenny J., Manz W. and Szewzyk U., 2000;** Heterogeneity in biofilms. In:
Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities R.A.N.
Chmielewski and J.F. frank comprehensive reviews in food science and food safety, Vol. 2, 2003
- Wolfaardt G. M; and Cloete T. E. ,1992;** The effect on some environmental parameters on surface colonization by microorganisms.
Water Research, Vol.26 , N°.4, P. 527-537.
- Xu X., Nieber J.L., et Gupta, S.C.,1992 ;** Compaction effect on the gas diffusion coefficient in soils.
Soil Sci. Soc. Am. J., Vol.56, P.1743-1750.
- Zhang T. and Bishop P. L., 1994;** Evaluation of tortuosity factors and effective diffusivities in biofilms.
Water Research, Vol.28 ,N°. 11, P.2279-2287.
- Zhu X., Suidan M. T., Alonso C., Yu T. , Kim B. J., et Kim B. R., 2001;** Biofilm structure and mass transfer in a gas phase trickle-bed biofilter.
Wat. Sci. Tech., Vol. 43, N°.1, P. 285-293.

Annexe

1. Détermination de la demande biochimique en oxygène DBO

1.1. Méthode volumétrique

1.1.1. Méthode à chaud

- **Principe**

L'eau est portée à ébullition en présence d'une solution diluée de permanganate de potassium dont l'excès est dosé après 10 minutes exactement d'ébullition.

- **Réactifs**

*Solution de permanganate de potassium N /80

1 ml de cette solution correspond à 0.1 mg d'oxygène

*Solution de sulfate de fer et d'ammonium à 25 g/l

*Solution d'acide sulfurique au ½ en volume

1.1.2. Mode Opérateur

Porter à l'ébullition 100 ml d'eau additionnée de 10 ml de solution d'acide sulfurique . Ajouter 50 ml de permanganate de potassium N/80 et maintenir l'ébullition pendant 10 minutes exactement , refroidir rapidement et décolorer franchement par la solution de sulfate de fer et d'ammonium , titrer en suite l'excès de réactif par le permanganate de potassium N/80 soit N ml et retrancher de ce chiffre celui trouvé en faisant le même dosage sur le l'eau distillée soit n ml.

- **Expression des Résultats**

La quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation des matières réductrices contenues dans un litre d'eau est donnée par l'expression :

$$(N - n) \text{ mg/l}$$

- **Remarques**

1. Si l'oxydabilité dépasse 3.5 mg/l refaire le dosage en diluant l'échantillon.
2. Avec ce test , la solubilisation des matières organiques en suspension peut conduire à une consommation d'oxygène plus importante que pour la DBO₅

1.2. Méthode automatique

La (DBO)₅ est la valeur de la demande biologique D'oxygène en 5 jours .et qui représente le nombre de milligrammes d'oxygène nécessaire aux micro-organismes mit en incubation avec le résidus pour en métaboliser les matières assimilables organiques et minérales contenues dans 1 litre de milieu de dispersion homogènes avec 20°C dans l'obscurité.

1.2.1. Mode opératoire

- Utilisation d'un DBO-mètre de modèle AQUALYTIC
- Les mesures sont effectuées à une température constante de 20°C
- Dans des bouteilles colorées et étanches, car l'activité bactériennes est influencé par la température et la lumière, on met dans chaque bouteille un barreau d'agitation magnétique et on ajoute deux goutte de la solution hydroxyde de potassium à 45 % dans chaque coupelle .On met la coupelle dans la bouteille de l'échantillon.

L'unité de DBO est placée à un incubateur réglé à 20°C, ou l'échantillon est agité en continu.

1.2.3. Interprétation des résultats

Après 5 jours toutes les valeurs individuelles sont affichées. Les valeurs mesurées doivent être multipliées par le facteur de conversion en DBO.

Tableau1:facteur de conversion en fonction du volume de la DBO.

Volume d'échantillon en (ml)	Valeur mesurée de la DBO en (mg/l)	Facteur de conversion
428	0-40	1
360	0-80	2
244	0-200	5
157	0-400	10
94	0-800	20
56	0-2000	40
21.7	0-4000	100

2. Dénombrement des levures et moisissures

Ce sont des micro-organismes qui à 25 °C forment des colonies dans un milieu sélectif selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

- **Principe**

Le principe de la présente méthode consiste à ensemencer en surface dans un milieu de culture sélectif, coulé dans deux boîtes Pétri .Avec une quantité définie de l'échantillon pour essai.

- **Milieu de culture**

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue. Le milieu de culture utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures est le milieu Agar à l'oxytétracycline au glucose et à levure (OGA).

Tableau 3 : Composition du milieu O.G.A

Composants	Quantité
Extrait de levure déshydrater	5.0 g/l
Glucose	20 g/l
Agar-Agar	20 g/l
Eau	1000 ml

- **Préparation**

Dissoudre les composants dans l'eau distillée, en portant à l'ébullition. Repartir le milieu dans des flacons de 250ml. stériliser par autoclave à 121°C pendant 15 minute. Après stérilisation le pH est ajusté de telle sorte qu'il soit de 6,6.

2.1. Mode opératoire

2.1.1. Préparation des boîtes de milieu pour dénombrement

Couler dans des boîtes Pétri stériles 15 à 20ml de gélose à 47 °C environ. Laisser solidifier. Transférer à l'aide d'une pipette stérile à la surface de gélose coulée 0.1 ml de l'échantillon pour essai. Étaler l'inoculum sur toute la surface du milieu jusqu'à adsorption complète en utilisant une pipette pasteur.

- **Incubation**

Retourner les boîtes ainsi ensemercer et les faire incuber dans une étuve réglée à 22°C durant 4 à 5 jours.

2.2. Interprétation

Après 5 jours, retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies. Le nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre est égal à

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

$\sum C$ est la somme des colonies sur toute les boites comptées

n_1 est le nombre de boites comptées à la première dilution

n_2 est le nombre de boites comptées à la seconde dilution

d est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrement sont obtenus.

3. Détermination des coliformes

- **Principe**

Le principe de la présente méthode consiste à ensemencer dans des tubes à essai de type Durham qui contient des clochettes de Durham avec une quantité déterminée de l'échantillon.

Les tubes sont incubés à une température de 37°C durant 24 heures puis 48 heures. A la fin on retient seulement les tubes positifs pour le dénombrement et la détermination du nombre le plus probable (NPP).

- **Milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé pour la détermination des coliformes est conforme aux « standards methods for the examination of water and wastewater (1975) et de l'ISO (1975) et aux normes DIN 10172 et à la norme algérienne 1998 (N.A).

Le milieu sélectif utilisé est le Bouillon lactose au vert brillant et à la bile 2 % (BLBVB)

Tableau 3 : Composition du milieu (BLBVB)

Composants	Milieu simple concentration (quantité)	Milieu double concentration(quantité)
Peptone	10 g	20 g
Lactose	10 g	20 g
Bile de bœuf déshydraté	20 g	40 g
Vert brillant spécifique	0.0133 g	0.026 g
Eau distillée	1000 ml	1000 ml

• Préparation de milieu

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté, en portant à l'ébullition. après l'ébullition on ajuste le pH au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7.2 ± 0.1 à 25°C

Le milieu est reparté dans chaque tube à essai à raison de 10 ml (simple ou double concentré). Le milieu est stérilisé durant 15 min à une température $121 \pm 1^\circ\text{C}$

3.1. Mode opératoire

On prend un volume de 1ml de l'échantillon (prise d'essai) à l'aide d'une pipette et on la dilue dans 9ml d'eau distillé stérile ; la nouvelle solution en la diluée de la même façon. On répète l'opération jusqu'à l'ordre de dilution désiré (dans notre cas la dilution est d'ordre 3).

• Ensemencement

On transfère à l'aide d'une pipette stérile trois fractions 1ml et 0.1ml de la dilution la plus petite jusqu'à la plus élevée dans des tubes contenant 10 ml de milieu sélectif (simple concentré). de la même façon on transfère 10ml des séries de dilution dans des tubes contenant 10 ml de milieu sélectif.

• Incubation

Les tubes sont incubés dans un incubateur (étuve) réglé à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durant $48 \pm 2\text{h}$.

3.2. Interprétation

Après incubation, on examine les tubes, en tenant compte seulement des tubes positifs dans lesquels on trouve production de gaz d'au moins 1/10 du volume de la cloche de Durham, changement de couleur vert au jaune et présence de trouble. Le NPP est calculé en retenant trois dilutions consécutives d'après la table de MAC GRADIE

4. Dénombrement des streptocoques

Le principe de la présente méthode consiste à ensemercer dans des tubes à essai de type Durham avec une quantité déterminée de l'échantillon. Les tubes sont incubés à une température de 37°C durant 24 à 48 heures. A la fin on retient seulement les tubes positifs pour le dénombrement et la détermination de du nombre le plus probable (NPP).

• Milieu de culture

Le milieu Rothe est utilisé pour l'enrichissement des streptocoques fécaux dans les eaux usées. Ce milieu sélectif contient l'azide de sodium qui permet d'éliminer la flore secondaire.

Tableau 4 : Composition du milieu ROTHE

Composants	Quantité
Peptone de caséine	20 g/l
Glucose	5.0 g/l
Chlorure de sodium	5.0 g/l
Phosphate bipotassique	2.7 g/l
Phosphate monopotassique	2.7 g/l
Azide de sodium	0.2 g/l

•Préparation

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté, en portant à l'ébullition. Le milieu est reparti dans chaque tube à essai a raison de 10 ml (simple ou double concentré). Le milieu est stérilisé durant 20 minutes à une température 115°C.

4.1. Mode opératoire

La procédure de préparation de l'échantillon et l'ensemencement sont les mêmes que pour la recherche des coliformes sauf que, dans ce cas les tubes présentant un trouble bactérien seront considérés positifs. Le dénombrement sera effectué sur le milieu de LITSKY

•Milieu de LITSKY

Ce milieu est destiné à la mise en évidence des streptocoques fécaux dans les eaux usées après utilisation du milieu Rothe dont la composition est donnée ci-dessous.

Tableau 5: Composition du milieu LITSKY

Composition	Quantité
Peptone de caséine tryptique	20 g/l
Glucose	5.0 g/l
Chlorure de sodium	5.0 g/l
Phosphate bipotassique	2.7 g/l
Phosphate monopotassique	2.7 g/l
Azide de sodium	0.3 g/l
Ethyl violet	0.0005 g/l

- **Préparation**

La préparation du milieu LITSKY est similaire a celle de milieu ROTHE

- **Incubation**

Ensemencer à l'aide d'une anse bouclée à partir d'un tube de ROTHE positif agité auparavant. Incuber dans un incubateur à 44 °C pendant 24 à 48 heures.

4.2. Emploi et interprétation

Un trouble bactérien dans tout le milieu et (ou) l'apparition d'une pastille violette au fond de tube après l'ajout de quelque gouttes du milieu KOVACS.

5. Dénombrement Anaérobie sulfito-réducteur (SR) totaux

- **Principe**

Pour le dénombrement des spores en détruit d'aborde la forme végétatives au bain d'eau à la température requise (80 °C) pendant 10 minute ,par la suite en ensemence un volume d'eau à analysé en profondeur dans un milieu glosé sélectif en tube.

- **Milieu de culture**

La présente méthode et conforme aux disposition de norme ISO 6649 Viande foie sulfité (milieu de base)

Tableau 6 : Composition du milieu (VF)

Composants	Quantité
Viande de bœuf paré, dégraissée et hache	200 g
Foie de bœuf paré et haché	55.55 g
Acide chlorhydrique concentré (d = 1.19)	08.33 g
Pepsine titre 500	0.55 g
Eau distillée	1000 ml

- **Préparation de milieu**

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté, en portant à l'ébullition. Après l'ébullition, le milieu est ensuite filtré sur papier filtre .Le filtrat et recueillie dans des flacons de 250 ml. Ces derniers sont stérilisés durant 15 min à une température de 121 ± 1°C.

Le pH est ajuste au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7.2 ± 0.1 à 25 °C.

Avant emploi du milieu gélose en ajoute a chaque flacons de 2.5ml du solution de sulfite de sodium et de fer ammoniacal pour avoir Le Milieu complet V.F sulfité à 1.25 % .

5.1 . Mode opératoire

A l'aide d'une pipette stérile on transfert 20ml et 1 ml de l'échantillon analysé dans deux tubes à essai de dimension (18 x1.8cm) .le milieu est coulé dans chaque tube ainsi préparé de gélose (V.F). Les tubes sont mélangés sont aération par mouvement. Après solidification de la gélose et dans le bute de crier l'anaérobiose les tubes sont bouche par du coton cardé et incubé dans l'étuve à une température de $46 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 72 heure.

5.2 . Interprétation

Après incubation, les clostridium sulfite-réducteur apparaissent sous formes de grosses colonies noires. Le nombre de colonies positif est multiplié par l'ordre de dilution afin de trouver le nombre exact.

Table de Mac Gradie

Nombres de tubes positifs au niveau des trois dilutions retenues			Coefficient NPP	Catégories	Limite de confiance			
1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}			95%		99%	
0	0	0	< 0.3					
0	0	1		0				
0	1	0	0.3	2	<	1.7	<0.1	2.3
0	2	0		0	0.1			
1	0	0	0.4	1		<0.4		
1	0	1	0.7	2	0.1	2.8		
1	1	0	0.7	1	2.1	0.4		
1	1	1		0	0.2	3.5		
1	2	0	1.1	2	2.7	.31		
1	2	1		0	0.2	3.6		
1	3	0		0	2.8			
2	0	0	0.9	1		3.5	0.2	
2	0	1	1.4	2	0.4	4.4		
2	1	0	1.5	1				
2	1	1	2	2				
2	2	0	2.1	1	0.2	<0.1		
2	2	1		0	3.8	5.0		
2	3	0		0	0.5	0.2		6.2
3	0	0	2	1	4.8	0.2		6.4
3	0	1	4	1	0.5	0.4		7.6
3	0	2		0	5.0	0.5		
3	1	0	4	1	0.7	7.9		
3	1	1	7	1	6.0			
3	1	2		0	0.8			
3	2	0	9	1	6.2	<1		
3	2	1	15	1		18		
3	2	2	21	2		<1		
3	2	3		0	<1	23		
3	3	0	20	1	13			
3	3	1	50	1	1	<1		
3	3	2	110	1	18	28		
3	3	3	110			2		
					1	36		
					21			