



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique



Université Abbès Laghrour Khenchela

Institut des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

N° d'ordre :.....

N° de Série :.....

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Biologie

Option: Microbiologie des écosystèmes aquatiques

Par

BENAMMAR Leyla

Thème

**Elimination des phosphates par procédé biologique
des eaux usées de la région de Khenchela**

Soutenu le: 20/02/2012

Devant le jury:

Président :	HOUHAMDI Moussa	Professeur Université de Guelma
Encadreur :	BENOUNIS Messaoud	M.C.A. Université de Khenchela
Examineur :	SAHEB Menouar	M.C.A. Université d'Oum El Bouaghi
Examineur :	DARBOUCHE Abdelhak	Professeur Université de Khenchela
Invité :	AYACHI Ammar	M.C.B. Université de Batna

2011-2012

Remerciements

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à toutes les personnes qui par leurs conseils, leurs suggestions, et leur aide, m'ont permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont

A mon promoteur Dr. BENOUNIS Messaoud de l'Université de Khenchela pour son aide précieuse à la réalisation de ce mémoire.

A mes professeurs de l'Université de Khenchela, Pr. DARBOUCHE Abdelhak, Dr. KELLIL-BENDJEMANA Katia, et Dr. HOUHA Belgacem, pour leur attention, leur dévouement et leur disponibilité.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de bactériologie du département Vétérinaire de l'Université de BATNA. Je tiens à remercier particulièrement Dr. AYACHI Ammar responsable du laboratoire pour m'avoir accueilli et pour l'intérêt qu'il a manifesté envers ce travail.

Je remercie vivement le professeur MEHENAOUI Ismail responsable du laboratoire d'Environnement, Santé et Productions Animales (LESPA) pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire de recherche et pour toutes les connaissances que j'ai acquises à ses côtés.

Je remercie également Monsieur HOUHAMDI Moussa, professeur en biologie à l'Université Badji Mokhtar, Annaba, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon mémoire, ainsi qu'aux Dr. SAHEB Menouar, Pr. DARBOUCHE Abdelhak, et Dr. AYACHI Ammar, d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce mémoire.

Je remercie profondément mon Père Dr. BENAMMAR Abdelmadjid qui m'a accompagné patiemment tous au long de la réalisation de ce modeste travail.

Mes remerciements aussi à M^{me} HIJAZI Farida, M^{me} KHEDRI Sana, M^{me} MEGALATI Amel, M. BENDAIKHA Abdelouahab, M. TITAOUINE Nadhir, M. SIMOUHAMED Salah. Ainsi qu'à M^{me} CHORFI Rafika et tout le personnel des laboratoires pédagogiques de l'Université de Khenchela d'avoir mis à ma disposition les produits nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je voudrais encore remercier M^{lle} Nouar Yasmina ingénieur du laboratoire, ainsi que toute l'équipe de la station d'épuration de la Wilaya de Khenchela pour leur disponibilité et leur accueil chaleureux.

Je remercie mes amis et collègues Hammames Mokhtar, Abdesemed zineb, Yakhlef Wahiba, Bacha mohamed-nadjib, Chorfi Keltoum pour leur précieuse aide, et encouragements.

A tous je réitère mes sincères remerciements

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes parents en témoignage de ma reconnaissance pour tout ce que je leur dois. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon amour.

A ma sœur Dr. AMINA

A mes frères FEHD et ALAEDDINE

Ainsi qu'à tous mes amis et collègues en particulier ceux qui m'ont procuré aide durant la réalisation de ce travail.

Avec toute mon affection.

BENAMMAR Leyla

Table des matières

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I Généralités sur le phosphore

1. Le phosphore dans l'environnement	3
2. Cycle du phosphore.....	3
2.1. Minéralisation.....	3
2.2. Assimilation	4
2.3. Solubilisation.....	4
2.4. Adsorption.....	5
3. Les phosphates	6
3.1. Formes de phosphates	6
3.1.1. Phosphore total dissous.....	6
3.1.1.1. Phosphore inorganique dissous.....	6
3.1.1.2. Phosphore organique dissous.....	6
3.1.2. Phosphore total particulaire.....	7
3.1.2.1. Phosphore inorganique particulaire	7
3.1.2.2. Phosphore organique particulaire	7
3.2. Sources de phosphore dans les eaux usées.....	8
3.2.1. Métabolisme humain.....	8
3.2.2. Détergents	8
3.2.3. Rejets domestiques.....	8
3.2.4. Rejets industriels	8
3.3. Effets des phosphates	8
3.3.1. Effets connus sur la santé humaine	9
3.3.1.1. Effets des algues sur la santé	9
3.3.1.2. Effets des cyanobactéries sur la santé.....	9
3.3.2. Effets connus sur l'environnement.....	9
3.3.2.1. Eutrophisation.....	9
3.3.2.2. Bloom de cyanobactéries (Fleurs d'eau de cyanobactéries).....	10

Chapitre II Procédés d'élimination des phosphates

1. Méthodes de déphosphatation	11
1.1. Déphosphatation physico-chimique	11
1.1.1. Etapes du traitement physico-chimique	11
1.1.1.1. Précipitation	11
1.1.1.2. Adsorption	11
1.1.1.3. Flocculation	11
1.1.2. Mécanismes réactionnels de la déphosphatation chimique.....	11
1.1.2.1. Précipitation du phosphate par le fer	11
1.1.2.2. Précipitation du phosphate par l'aluminium	12
1.1.2.3. Précipitation du phosphate par le calcium.....	12
1.1.3. Techniques de déphosphatation physico-chimique.....	13
1.1.3.1. Précipitation directe	13
1.1.3.2. Pré-précipitation.....	13

1.1.3.3. Précipitation simultanée.....	13
1.1.3.4. Post-précipitation	13
1.2. Déphosphatation biologique.....	14
1.2.1. Procédés d'élimination du phosphate par voie biologique.....	15
1.2.1.1. Procédé A/O.....	15
1.2.1.2. Procédé Bardenpho	15
1.2.1.3. Procédé Phoredox	16
1.2.1.4. Procédé Phoredox modifié.....	16
1.2.1.5. Procédé Phostrip	17
1.2.1.6. Réacteur biologique séquentiel (SBR).....	18

Chapitre III Elimination biologique des phosphates

1. Mécanisme biologique d'élimination des phosphates	19
1.1. Assimilation	19
1.2. Enlèvement biologique amélioré du phosphate (EBAP)	19
2. Modèles biochimiques de la déphosphatation biologique.....	20
2.1. Modèles biochimiques en condition anaérobie	20
2.1.1. Modèle de Comeau / Wentzel (1986)	20
2.1.2. Modèle de Mino et <i>al.</i> (1987)	21
2.1.3. Modèle de Mino adapté par Wentzel et <i>al.</i> (1991).....	22
2.2. Modèles biochimiques en condition aérobie.....	23
3. Facteurs influençant l'élimination biologique du phosphate dans les eaux usées	24
3.1. Configuration du procédé.....	24
3.2. Nature du substrat.....	24
3.3. Cations.....	25
3.4. Température	25
3.5. pH.....	26
3.6. Age de boue.....	26
3.7. Nitrates	26
3.8. Métaux lourds.....	27
3.9. Oxygène	27
3.10. Rapport DCO/P	28
4. Micro-organismes accumulant les polyphosphates.....	28

Chapitre VI Matériel et méthodes

1. Echantillonnage.....	29
1.1. Présentation de la station d'épuration	29
2. Milieu de culture	29
2.1. Composition du milieu de culture	29
2.2. Composition de la solution de trace	30
3. Préparation de l'inoculum	30
4. Cinétique de l'élimination du phosphate par culture mixte	31
4.1. Conditions de culture	31
4.2. Méthode d'analyse	31

4.2.1. Mesure du pH.....	31
4.2.2. Mesure de la biomasse	31
4.2.3. Dosage du phosphate.....	32
5. Analyse microbiologique	32
5.1. Isolement et purification des microorganismes.....	32
5.2. Conservation des souches isolées.....	32
5.3. Coloration de Neisser	32
5.4. Identification	33
5.4.1. Identification morphologique.....	33
5.4.1.1. Aspect macroscopique	33
5.4.1.2. Aspect microscopique.....	34
5.4.2. Identification biochimique classique.....	34
5.4.2.1. Etude du type respiratoire	34
5.4.2.2. Recherche des enzymes respiratoires.....	35
5.4.2.3. Etude de la voie d'attaque du glucose	36
5.4.2.4. Utilisation du citrate comme source de carbone	36
5.4.2.5. Test du mannitol mobilité	36
5.4.2.6. Recherche de la β -galactosidase	37
5.4.2.7. Etude de la dégradation du glucose, saccharose et lactose en milieu TSI	37
5.4.2.8. Etude des voies fermentatives intermédiaires.....	37
5.4.2.9. Recherche de l'uréase	38
5.4.2.10. Recherche de l'indole	38
5.4.2.11. Recherche de tryptophane désaminase (TDA).....	39
5.4.2.12. Recherche des décarboxylases.....	39
5.4.2.13. Croissance sur milieu King (King A et King B).....	39
5.4.3. Identification par galerie API 20NE	40
6. Cinétique de l'élimination du phosphate par les souches isolées (culture pure).....	42
6.1. Préparation des inoculum	42
6.2. Conditions de culture	42

Chapitre V Résultats et discussion

1. Réaction de déphosphatation par l'utilisation d'une culture mixte	43
1.1. Suivi de la biomasse.....	43
1.2. Suivi de la concentration en phosphate	44
1.3. Suivi du pH	45
2. Optimisation des paramètres liés au milieu de culture	47
2.1. Influence de la concentration initiale de la source de carbone.....	47
2.1.1. Suivi de la biomasse.....	47
2.1.2. Suivi de la concentration en phosphate.....	48
2.1.3. Suivi du pH	50
2.2. Influence de la concentration initiale du phosphate	51
2.2.1. Suivi de la biomasse.....	51
2.2.2. Suivi de la concentration en phosphate.....	52
2.2.3. Suivi du pH	54
2.3. Influence de différentes sources de carbone sur la déphosphatation biologique.....	55
2.3.1. Effet du glucose	55
2.3.2. Effet du lactose.....	57
2.3.3. Effet du lactate	58
5. Analyse microbiologique	61
5.1. Isolement des microorganismes responsable de la déphosphatation.....	61
5.1.1. Résultats de l'étude macroscopique	61

5.1.2. Résultats de l'étude microscopique.....	61
5.1.3. Résultats des tests biochimiques classiques.....	62
5.1.4. Résultats des galeries API 20 NE.....	64
6. Réaction de déphosphatation par l'utilisation d'une culture pure	68
6.1. Elimination du phosphate par une culture pure d' <i>Acinetobacter junii</i>	68
6.2. Elimination du phosphate par une culture pure de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
6.3. Elimination du phosphate par une culture pure de <i>Moraxella lacunata</i>	71
6.4. Elimination du phosphate par une culture pure d' <i>Alcaligenes denitrificans</i>	73
Conclusion générale et perspectives	76

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

Résumé Arabe

NE PAS DUPLIQUER

Liste des figures

Figure 1. Le cycle du phosphate dans les milieux aquatiques (Gaultier, 1994).....	5
Figure 2. Les différentes formes de phosphores (Rodier et <i>al.</i> , 2009).....	7
Figure 3. Les différents types de traitement physico-chimique du phosphate (Daumer, 2007).....	14
Figure 4. Le procédé A/O (Tae, 1993).....	15
Figure 5. Le procédé Bardenpho (Bitton, 2005).....	15
Figure 6. Le procédé Phoredox (Tae, 1993).....	16
Figure 7. Le procédé Phoredox modifié (Oehmen, 2007).....	16
Figure 8. Le procédé Phostrip (Bitton, 2005).....	17
Figure 9. Le cycle de fonctionnement d'un réacteur biologique séquentiel (Ong et <i>al.</i> , 2010).....	18
Figure 10. Modèle biochimique de Comeau /Wentzel pour le métabolisme anaérobique (Meinhold, 2001 ; Wentzel et <i>al.</i> , 1986).....	21
Figure 11. Modèle biochimique de Mino pour le métabolisme anaérobique (Meinhold, 2001).....	22
Figure 12. Source de NADH ₂ sous condition anaérobique (Meinhold, 2001).....	22
Figure 13. Modèle biochimique aérobie de l'enlèvement biologique du phosphate (Meinhold, 2001).....	23
Figure 14. Fiche de résultats API 20NE.....	41
Figure 15. Cinétique de la croissance d'une culture mixte.....	43
Figure 16. Cinétique de l'élimination des phosphates par une culture mixte.....	44
Figure 17. Variation du pH au cours de la réaction de déphosphatation par culture mixte.....	45
Figure 18. Modèle du métabolisme anaérobique des bactéries déphosphatantes (Comeau et <i>al.</i> , 1986).....	46

Figure 19. Influence de la concentration initiale d'acétate sur la croissance.....	47
Figure 20. Influence de la concentration initiale d'acétate sur la réduction des phosphates ...	48
Figure 21. Influence de la concentration initiale d'acétate sur le pH.....	50
Figure 22. Influence de la concentration initiale du phosphate sur la croissance	51
Figure 23. Influence de la concentration initiale du phosphate sur la cinétique de la déphosphatation.....	53
Figure 24. Influence de la concentration initiale du phosphate sur le pH.....	54
Figure 25. Influence du glucose sur l'élimination du phosphate et sur la croissance	55
Figure 26. Cheminement biochimique du stockage des PHB avec le glucose comme source de carbone (Asmlal, 1996)	56
Figure 27. Influence du lactose sur l'élimination du phosphate et sur la croissance	57
Figure 28. Influence du lactate sur l'élimination du phosphate et sur la croissance.....	58
Figure 29. Voie métabolique de la conversion du lactate en PHA (Jeon et Park, 2000)	59
Figure 30. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure d' <i>Acinetobacter junii</i>	68
Figure 31. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
Figure 32. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure de <i>Moraxella lacunata</i>	71
Figure 33. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure d' <i>Alcaligenes denitrificans</i>	73

Liste des Tableaux

Tableau I. Composition du milieu de culture (Saito et <i>al.</i> , 2004).....	29
Tableau II. Composition da la solution de trace (Saito et <i>al.</i> , 2004).....	30
Tableau III. Taux de déphosphatation obtenus avec différentes concentration d'acétate de sodium.....	49
Tableau IV. Résultat de l'étude macroscopique des colonies isolées.....	61
Tableau V. Résultat de l'étude microscopique des souches isolées.....	62
Tableau VI. Résultats des tests biochimiques des différentes souches isolées.....	63
Tableau VII. Résultats d'identification des espèces bactériennes par galerie API 20NE.....	67
Tableau VIII. Taux de déphosphatation pendant la phase exponentielle et stationnaire de la culture de quatre souches pures.....	75

NE PAS DUPLIQUER

Liste des abréviations

AGV: Acides Gras Volatils
API 20 NE: Appareillage et Procédés d'Identification des Non Entérobactéries
Bio-P: Bactéries qui sont capables d'enlever le Phosphate
DBO: Demande Biologique en Oxygène
DCO: Demande Chimique en Oxygène
D.O: Densité Optique
EBP: Enlèvement Biologique du Phosphate
E.D: Voie d'Entner-Doudorof
EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
E.M: Voie Embden-Meyerhof
KH₂PO₄: Dihydrogénophosphate de potassium
K₂HPO₄: Monohydrogénophosphate potassium
MEVAG: Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides
mpm: Mouvement Par Minute
MVS: Matières Volatiles en Suspension
ONPG: Orthonitrophenyl β-D-galactoside
P: Phosphore
PHA: Polyhydroxyalkanoate
PHB: Polyhydroxybutyrate
PIA: Phosphore Inorganique Apatitique
PINA: Phosphore Inorganique Non Apatitique
PIP: Phosphore Inorganique Particulaire
POP: Phosphore Organique Particulaire
PP: Phosphore Particulaire
ppm: Partie Par Million
PRS: Phosphore Réactif Soluble
PT: Phosphore Total
PTD: Phosphore Total Dissous
RM: Rouge de Méthyle
rpm: Tour Par Minute
SBR: Réacteur Biologique Séquentiel
TDA: Tryptophane Désaminase
VP: Voges Proskauer

Introduction générale

NE PAS DUPLIQUER

Introduction générale

L'eau recouvre 70 % de la superficie du globe, cependant 97 % de cette eau est salée, non potable et inconvenable à l'irrigation. L'eau douce, ne représente que 3 % de la totalité. Les rivières et les lacs représentent 0,3 %, alors que tout le reste est stocké dans les calottes polaires glacières (Hernández, 2006).

Au vingt-et-unième siècle, le besoin en eau est devenu plus important que par le passé en raison de l'urbanisation, de l'accroissement démographique, de la consommation accrue de l'eau par l'agriculture, de la pollution industrielle, ainsi que des effets des changements climatiques (Paquerot, 2007).

Avec l'augmentation de la demande en eau, sa réutilisation est devenue une nécessité. Ainsi l'épuration des eaux usées s'inscrit dans une démarche de protection de notre environnement et de la préservation de cette ressource.

Le contrôle de la quantité des phosphates dans les rejets est devenu une clé importante pour améliorer la qualité des écosystèmes, car sa présence à des concentrations élevées, affecte les ressources en eau douce, ainsi que la réutilisation des eaux usées.

Le phosphate est l'un des éléments constitutifs majeurs de toutes les cellules vivantes. Il se trouve dans l'environnement sous diverses formes ; il est naturellement présent dans certaines roches (ignées ou sédimentaires), et il est introduit dans les écosystèmes aquatiques par le lessivage de ces derniers par les processus naturels d'érosion qui conduit à sa solubilisation (Boukemara, 2009 ; Stednick, 1991).

Cependant, la présence des phosphates à des concentrations élevées provoque l'eutrophisation, menant à un déséquilibre biologique du milieu par la prolifération excessive des algues et des plantes aquatiques. Cette détérioration de la qualité environnementale aquatique est néfaste pour la faune, et peut entraîner des pertes d'usage de ces eaux, pour l'être humain (Poulin, 2005).

La méthode d'élimination des phosphates des eaux usées la plus couramment utilisée est la déphosphatation physico-chimique ; qui consiste à utiliser des sels métalliques pour faire précipiter le phosphate. Cependant les coûts importants associés à l'ajout des réactifs chimiques, ainsi que les investissements inhérents; ont limité son usage à grande échelle (Laridi, 2006).

Actuellement, les procédés biologiques semblent être les plus compétitifs et les mieux adaptés au traitement du phosphate présent dans les eaux usées.

Ce présent travail entre essentiellement dans le cadre d'un projet PNR qui porte sur l'élaboration de nouveaux capteurs appliqués au contrôle et à l'analyse des polluants chimiques de l'eau.

Cette recherche a pour objectif global de réduire le phosphate des eaux usées par des procédés biologiques. Elle s'intéresse plus spécifiquement à l'étude des cinétiques biologiques de l'élimination du phosphate par une culture mixte de boue activée prélevée dans la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Khenchela, ainsi qu'à l'isolement et l'identification des souches dominantes impliquées dans l'accumulation du phosphate.

On s'est intéressé aussi à l'étude et à la comparaison de la capacité des différentes souches isolées à éliminer le phosphate.

Le but ultime de ce travail est d'optimiser un modèle simple des cinétiques biologiques de biodéphosphatation à l'aide de réacteurs en batch, afin de prévoir de nouveaux capteurs à base de bactéries sélectives, pour la détection des phosphates dans les eaux qui dépassent les normes.

Le présent manuscrit s'articule en cinq chapitres:

- Un premier chapitre est réservé à la description des phosphates dans l'environnement. leurs formes, leurs sources, et leurs effets sur la santé humaine et sur l'environnement.
- Un second chapitre regroupe tous les procédés d'élimination des phosphates.
- Un troisième chapitre illustre l'élimination des phosphates par procédé biologique.
- Un quatrième chapitre décrit le matériel et les protocoles expérimentaux utilisés pour la réalisation de cette étude.
- Un cinquième chapitre rassemble les résultats et discussion.
- Enfin, une conclusion et les perspectives esquissées à partir des résultats.

Chapitre I

Généralités sur le phosphore

NE PAS DUPLIQUER

1. Le phosphore dans l'environnement

Le phosphore est un élément rare dans l'environnement naturel (< 0.1% en masse de la composition élémentaire de la lithosphère, mais de grande importance écologique (Pourriot and Meybeck, 1995). Il constitue en effet un des composants essentiels de la matière vivante dans laquelle il se rencontre à un taux relativement élevé. Il intervient indispensablement à l'édification des nucléotides, des acides nucléiques, des phospholipides des membranes cellulaires, et des enzymes (Lévêque, 1996). Il joue un rôle clé dans le transfert d'énergie (ATP, ADP, et AMP). Sa rareté dans l'écosystème sans influence humaine en fait un élément très convoité entraînant une forte compétition (Ramade, 1998).

L'intérêt écologique du phosphore, vient d'une part de son rôle majeur dans les métabolismes biologiques et d'autre part de ses quantités relativement faibles disponibles dans les systèmes aquatiques. En comparaison aux quantités importantes des autres constituants nutritionnels et structurels (carbone, hydrogène, azote, oxygène, soufre), le phosphore est le moins abondant et celui qui généralement limite la productivité algale et par conséquent l'eutrophisation du milieu aquatique (Wetzel, 2001).

2. Cycle du phosphore

Le cycle du phosphore est unique parmi les cycles biogéochimiques majeurs en ce sens qu'il ne possède pas de phase gazeuse, du moins en quantité significative (Lemercier et al., 2003), de sorte qu'il est exclusivement sédimentaire (Némery, 2003), car il s'effectue principalement entre les océans et les continents (Lemercier et al., 2003).

Le cycle du phosphore (Figure1) fait intervenir des réactions de minéralisation, d'assimilation de solubilisation, et d'adsorption.

2.1. Minéralisation

La matière organique morte est alors prise en charge par une large gamme de micro-organismes décomposeurs. Cela inclut des bactéries (*Bacillus subtilis*, *Arthrobacter*), des actinomycètes (*Streptomyces*) et même des champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*) (Bitton, 2005), qui par le jeu enzymatique minéralisent le phosphore organique particulaire et dissous en ions orthophosphates (Némery, 2003). Ces réactions sont rendues possible par l'action principale des phosphatases ; enzymes extracellulaires associées aux algues et bactéries et présentes librement dans le milieu. Les phosphatases catalysent le clivage hydrolytique des esters phosphoriques. En fonction du pH et de leur activité optimale, elles sont classées en phosphatase alcaline (pH>7), phosphoamidase (5<pH<6), et phosphatase acide (pH<6) (Madigou, 2005).

2.2. Assimilation

Les processus d'assimilation englobent l'absorption et l'utilisation des formes inorganiques dissoutes (orthophosphates) par les producteurs primaires (phytoplanctons, algues benthiques, macrophytes) qui représentent la principale source de matière organique autochtone (Némery, 2003) et aussi par les bactéries qui stockent les orthophosphates sous forme de polyphosphate dans des granules métachromatiques spécifiques appelées 'volutines' (Serafim et al., 2002). L'assimilation se fait essentiellement par diffusion des ions orthophosphates (seule forme disponible) au travers des membranes cytoplasmiques pour les algues et les bactéries (Labroue et al., 1995) et par tous les organes (racines et pousses) pour les macrophytes (Robach et al., 1995). Selon la logique de la chaîne alimentaire, la fraction organique du phosphore évolue ensuite vers les organismes d'ordre trophique supérieur (Némery, 2003).

Trois facteurs contrôlent cette activité : la température, la concentration en orthophosphates et l'intensité lumineuse utilisable pour la photosynthèse (Madigou, 2005).

2.3. Solubilisation

La régénération du phosphore à partir des sédiments se fait par mobilisation biologique ou physicochimique (Ouazzani, 1997).

Le taux de relargage du phosphore du sédiment est inversement lié à l'oxygénation de ce dernier, lequel résulte de l'intensité de l'activité photosynthétique algale à sa surface (Carlon et Wetzel, 1988). La baisse de la concentration d'oxygène peut influencer les conditions d'oxydo-réduction au niveau des sédiments et favorise le relargage du phosphore inorganique particulaire (PIP) lié aux cations (Némery, 2003).

La solubilisation du phosphore par certains microorganismes, incluant des bactéries, des champignons et des algues, à partir des formes particulières inorganiques, peut s'effectuer de différentes façons (Oehl et al., 2001).

Elle peut être réalisée par de nombreux acides organiques (acide citrique, succinique, malique, oxalique...), produits par des bactéries du genre *Pseudomonas*, *Acinetobacter*..., capables d'extraire le phosphore dit 'assimilable' en séquestrant les cations métalliques intervenant dans l'adsorption du phosphore (Vasquez et al., 2000) ou par acides inorganiques produits par certains microorganismes comme *Nitrosomonas* ou *Thiobacillus*, les acides ainsi produits vont faire baisser le pH du milieu et ainsi dissoudre les phosphates naturels, réalisant en quelque sorte une fabrication biologique du phosphate (Narsian et Patel, 2000).

2.4. Adsorption

L'adsorption du phosphore en solution est la conséquence de réactions physiques et chimiques. Les paramètres contrôlant la proportion de phosphore échangeable et les équilibres entre les phases dissoutes et particulaires sont nombreuses et variées : magnésium, calcium, fer, matière organique, température, potentiel redox, et pH (Madigou, 2005).

Une augmentation de température amplifie l'activité biologique de minéralisation consommatrice d'oxygène. Cette baisse d'oxygène abaisse le potentiel redox et peut occasionner une libération d'orthophosphates liés au fer. Par ailleurs l'augmentation de la température accroît également les vitesses d'adsorption des orthophosphates sur les argiles, les hydro-complexes ferriques et la calcite (Moutin *et al.*, 1993).

Par ailleurs la baisse du CO_2 induite par la photosynthèse peut également conduire à une augmentation du pH favorisant le relargage des ions orthophosphates liés au Fer. Alors qu'à bas pH, ces ions sont adsorbés tandis que les sels de calcium sont dissous conduisant à leur relargage (Némery, 2003). Un relargage des ions orthophosphates liés au Fer s'opère à bas potentiel redox (< 200 mV) provoqué par la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (Mesnage et Picot, 1995).

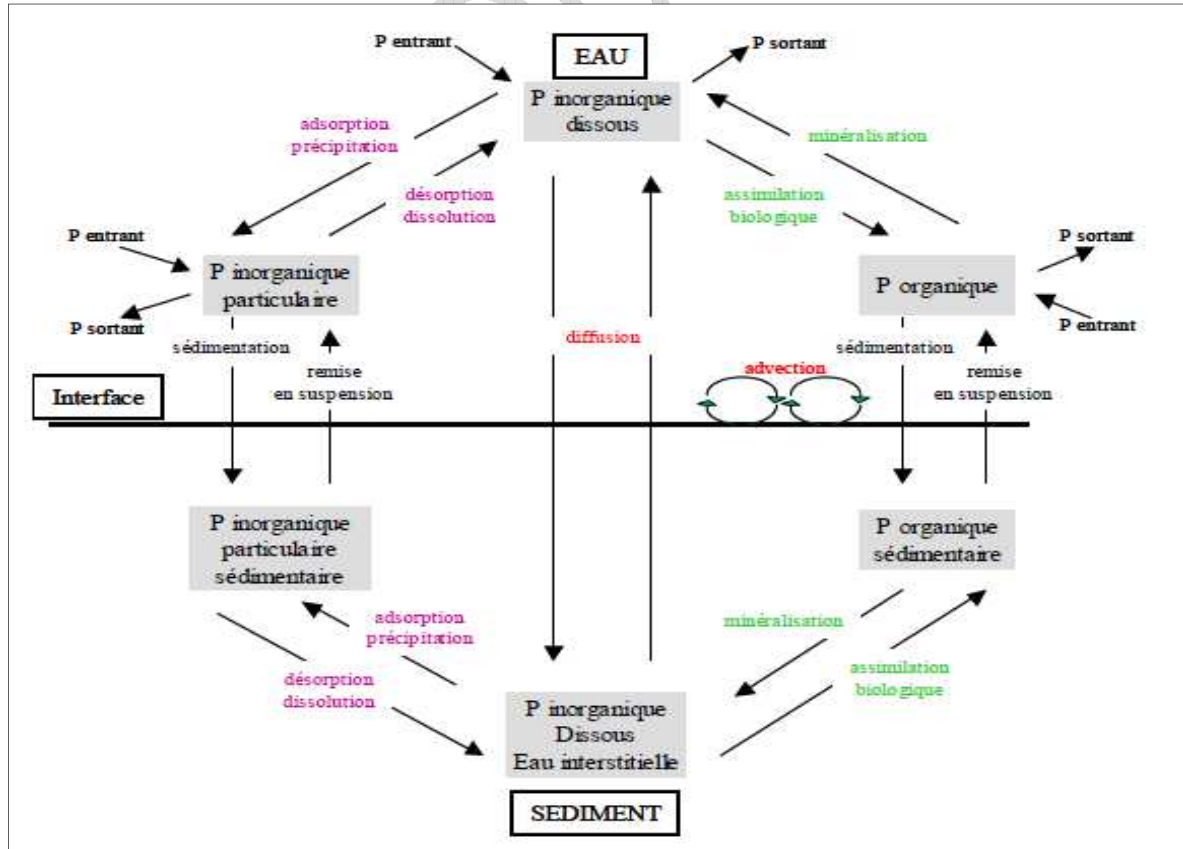


Figure 1. Le cycle du phosphate dans les milieux aquatiques (Gaultier, 1994).

3. Les phosphates

Dans la nature, le phosphore (P) est généralement présent sous forme de phosphates en raison de sa forte réactivité (Shafie, 2009). Les phosphates sont les formes minérales de phosphore, formés à partir des ions PO_4^{3-} . Ils sont généralement peu solubles dans l'eau, alors que les formes hydrogénées H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} sont beaucoup plus solubles (Chocat et Eurydice 92, 1997).

3.1. Formes de phosphates

Dans l'environnement le phosphore est présent sous différentes formes (figure 2). On les classifie en deux principales catégories : Le phosphore total dissous (PTD) et le phosphore particulaire (PP) (Lemercier et al., 2003).

3.1.1. Phosphore total dissous

Le PTD regroupe le phosphore inorganique dissous (ou phosphore réactif soluble; PRS) et le phosphore organique dissous (ou phosphore non réactif soluble) (Mcmeekin, 2009).

3.1.1.1. Phosphore inorganique dissous

Il comprend les formes minérales d'ions orthophosphates (ions mono-orthophosphates HPO_4^{2-} et di-orthophosphates $\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$); qui sont des sels minéraux de l'acide phosphorique (H_3PO_4) (Banas et Lata, 2006 ; Némery, 2003) ainsi que les polyphosphates, qui correspondent à des molécules plus complexes de phosphates minéraux, qu'on peut trouver sous forme linéaire (pyrophosphates) ou cyclique (métaphosphates) (Rejesk, 2002). Ils proviennent pour une grande majorité des détergents synthétiques utilisés dans les lessives (Asmlal, 1996). Les polyphosphates sont en réalité des composés très instables qui sont très rapidement hydrolysés en orthophosphates dans les milieux aquatiques (Carbiener, 1990).

3.1.1.2. Phosphore organique dissous

Les phosphates organiques, qui correspondent à des molécules de phosphates associées à des molécules à bases carbonées, sont un court état intermédiaire dans le processus de minéralisation du phosphore organique particulaire (Banas et Lata, 2006).

3.1.2. Phosphore total particulaire

Le phosphore total particulaire, regroupe toutes les formes de phosphore combinées à des composés minéraux ou à de la matière organique, soit adsorbées à la surface des particules (Némery, 2003).

3.1.2.1. Phosphore inorganique particulaire

La fraction inorganique particulaire (PIP) est un peu plus complexe. La vision classique consiste à les diviser en deux compartiments; le phosphore inorganique apatitique (PIA) et le phosphore inorganique non apatitique (PINA) (Lemerrier *et al.*, 2003).

Le phosphore inorganique apatitique est le phosphore lié au calcium sous forme de sels cristallisés, plus particulièrement aux fluoroapatites et les hydroxyapatites, qui comptent parmi les formes les moins solubles (Némery, 2003). Tant dis que le phosphore inorganique non apatitique désigne le phosphore complexé au fer (Strengite) ou à l'aluminium (Variscite) et le phosphore adsorbé à la surface des particules (carbonate de calcium, hydroxydes de fer et d'aluminium, argile, matière organique) (Robert, 1996).

3.1.2.2. Phosphore organique particulaire

La fraction organique particulaire (POP) est représentée par l'ensemble des phosphates de la matière organique animale et végétale, vivante ou en voie de dégradation (nucléotides, ADN, phospholipides membranaires, ATP, enzymes) (Madigou, 2005).

Cette fraction peut représenter une part importante du PP (50 % observés dans des sédiments de rivières en zone agricole) (Dorioz *et al.*, 1998).

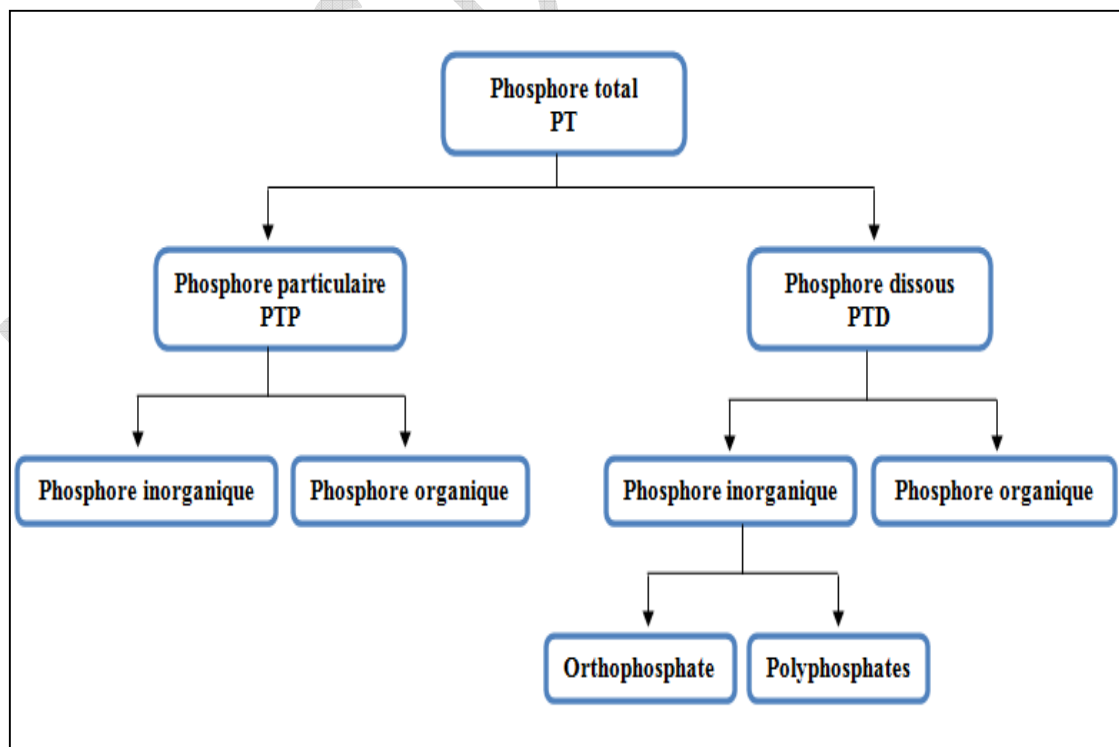


Figure 2. Les différentes formes de phosphores (Rodier *et al.*, 2009).

3.2. Sources de phosphore dans les eaux usées

Le phosphore, dans les eaux usées, provient des déchets humains, des eaux domestiques, des déchets organiques et des détergents (Asmlal, 1996).

3.2.1. Métabolisme humain

L'urine et les fèces excrétées par les animaux et les hommes constituent également une source de phosphore. Un homme excrète entre 1 et 2 g de phosphore par jour (Dernat et al., 1995). La part de ces rejets humains ne représente que 30 à 50 % du phosphore total, (entre 5 et 20 mg.L⁻¹) (Rodier et al., 2009).

3.2.2. Détergents

L'usage des polyphosphates comme additifs dans les lessives textiles et les produits pour lave-vaisselle constitue une grande source de contamination des eaux par les phosphates. Elles sont à l'origine de 50 à 70 % du phosphore total (PT) des eaux usées (Rejesk, 2002).

3.2.3. Rejets domestiques

Les rejets d'eaux domestiques constituent généralement la principale source de pollution des eaux par les phosphates (Banas et Lata, 2006). Elles ont des teneurs en phosphore total généralement comprises entre 10 et 25 mg.L⁻¹ (Guivarch, 2001).

3.2.4. Rejets industriels

Les effluents d'industries agro-alimentaires, d'abattoirs, de laveries industrielles, d'industries de traitement de surface et d'industries chimiques spécialisées peuvent générer du phosphore (Deronzier et Choubert, 2004). La teneur en phosphore des eaux résiduaires industrielles est de l'ordre de 10 à 100 mg.L⁻¹ du phosphore total (Kellil et Bensafia, 2003 ; Menanteau, 1990).

3.3. Effets des phosphates

Le phosphore est l'élément le plus important à considérer pour évaluer la qualité de l'eau d'un écosystème aquatique. Un accroissement de la concentration de phosphore est accompagné par une augmentation de la biomasse végétale et de la turbidité de l'eau, laquelle peut réduire la transparence (Søndergaard et al., 2003), ainsi que d'autres changements biologiques souvent indésirables tels que des changements dans les espèces présentes (Dodds, 2006).

3.3.1. Effets connus sur la santé humaine

Autre qu'à l'état pur, le phosphore n'est pas considéré directement toxique pour les êtres humains et les animaux; il l'est par contre indirectement lorsque sa surabondance accélère la croissance d'algues et des cyanobactéries (Carpenter *et al.*, 1998 ; Wiegand et Pflugmacher, 2005).

3.3.1.1. Effets des algues sur la santé

Les algues produisent des métabolites organiques qui peuvent entraîner sérieusement des problèmes de saveur et d'odeur; ou parfois une toxicité des eaux (Asmlal, 1996). En plus, ces métabolite réagissent avec le chlore pour produire les trihalométhanes (THM) qui sont connus être cancérigènes (Boorman, 1999; Mills *et al.*, 1998).

3.3.1.2. Effets des cyanobactéries sur la santé

Les cyanobactéries peuvent produire des toxines potentiellement nuisibles à la santé des usagers des milieux aquatiques (Mcmeekin, 2009). Les trois principales catégories de toxines sont les hépatotoxines, les neurotoxines, et les endotoxines du type lipopolysaccharide qui provoquent des problèmes irritants et allergènes. Les lipopolysaccharides seraient présents chez toutes les espèces de cyanobactéries. Toutefois, seulement certaines d'entre elles sont associées à un potentiel toxique par des hépatotoxines ou des neurotoxines (Chorus et Bartram, 1999).

Un cas des plus majeurs a eu lieu au Brésil, où 101 patients sont atteints d'une insuffisance hépatique sévère et 50 sont morts suite à une hémodialyse effectuée avec de l'eau contenant des toxines de cyanobactéries (Jochimsen *et al.*, 1998).

Des effets d'exposition à long terme sont également à redouter. Comme c'est le cas, lors de l'épidémie de cancer du foie en Chine (dans la ville de Haimen et dans la région de Naihui) qui a été attribuée à l'exposition chronique de la population à des toxines de la cyanobactéries *Microcystis aeruginosa* (Ueno *et al.*, 1996).

3.3.2. Effets connus sur l'environnement

Bien qu'essentiel à la survie de nombreux organismes. Le phosphore peut également devenir une menace pour les milieux aquatiques (Asmlal, 1996). Des teneurs dans l'eau supérieures à 0,5 mg.L⁻¹ doivent constituer un indice de pollution (Rodier *et al.*, 2009).

3.3.2.1. Eutrophisation

En effet, on considère le phosphore comme le principal responsable du processus d'eutrophisation qui conduit à une augmentation de la biomasse algale (Lacaze, 1996). Cette

dernière provoque une turbidité et une écume à la surface de l'eau. D'autre part, les algues favorisent la formation de zones où se forment des macrophytes enracinés, impliquant ainsi une diminution du volume occupé par l'eau dans un écosystème aquatique (Asmlal, 1996).

Une fois mortes, les algues tapissent le fond des étendues d'eau conduisant à une désoxygénation provoqué par la décomposition de cette matière organique algale par des bactéries aérobies et à une respiration de la faune et la flore aquatique qui diminue éventuellement l'oxygène dissous menaçant ainsi la vie aquatique (Dodds, 2006 ; Dorit *et al.*, 1991).

3.3.2.2. Bloom de cyanobactéries (Fleurs d'eau de cyanobactéries)

Les cyanobactéries font partie de la communauté phytoplanctonique de plusieurs milieux aquatiques (Vasconcelos, 2006). Elles deviennent problématiques si leurs populations s'accroissent de façon démesurée provoquant ce qu'on appelle fleurs d'eau (bloom) (Blais, 2002a).

La prolifération de cyanobactéries est favorisée par une interaction complexe entre plusieurs facteurs, dont la concentration élevée de phosphore et d'azote, l'ensoleillement, la température élevée, le pH, la disponibilité de carbone, le faible courant ou les eaux stagnantes (Duy *et al.*, 2000). Cependant, le phosphore demeure un élément très important à leur croissance. Elles sont d'ailleurs capables de le stocker dans leur cellule; cela leur permet de se multiplier efficacement et d'augmenter leur biomasse d'au moins 10 fois (Chorus et Bartram, 1999).

Par ailleurs, une étude effectuée sur 13 lacs en Alberta au Canada a révélé que le phosphore était le facteur du milieu qui présentait la corrélation la plus forte avec la biomasse de *Microcystis aeruginosa*, une espèce de cyanobactéries (Kotak *et al.*, 2000).

Les blooms de cyanobactéries forment alors une écume colorée et parfois nauséabonde conduisant à l'altération du milieu aquatique. Seulement certaines espèces de cyanobactéries produisent des toxines. Toutefois, lorsqu'elles sont dominantes dans un plan d'eau, les espèces ne produisant pas de toxines sont tout de même considérées comme nuisibles car elles affectent la qualité de l'eau (Blais, 2002b). Au pic de leur production, elles causent une réduction de l'oxygène disponible menaçant la survie des espèces présentes (Ploug, 2008; Wiegand et Pflugmacher, 2005).

De plus, la santé des animaux sauvages vivant sur le bassin-versant peut également être compromise. Lorsque ceux-ci s'abreuvent, l'accumulation des toxines dans leurs organismes entraîne leurs l'empoisonnement (Hitzfeld *et al.*, 2000).

Chapitre II

Procédés d'élimination des phosphates

1. Méthodes de déphosphatation

L'élimination du phosphate peut être réalisée par un traitement physico-chimique soit par traitement biologique, ou encore par combinaison des deux procédés.

1.1. Déphosphatation physico-chimique

Le traitement du phosphore par voie physico-chimique consiste à précipiter le phosphate dissous sous forme de composé insoluble (Laridi, 2006), par adjonction de sel de fer, aluminium, ou calcium, ainsi les composés formés peuvent être facilement éliminés par décantation ou flottation (Bossche, 1999; Strom, 2006).

1.1.1. Etapes du traitement physico-chimique

1.1.1.1. Précipitation

Lors de la précipitation, le phosphore dissous, principalement sous forme d'orthophosphates, est converti en complexes hydroxométalliques de faible solubilité par l'addition d'un sel métallique, généralement de fer, d'aluminium ou de calcium. Le précipité ainsi formé se retrouve sous forme de particules de diamètre inférieur à 1 μm , c'est-à-dire sous forme de colloïde (Poulin, 2005).

1.1.1.2. Adsorption

Les espèces phosphorées dissoutes s'adsorbent sur les surfaces de complexes hydroxo métalliques, qui viennent de précipiter (Filali-Meknassi, 2003).

1.1.1.3. Flocculation

Il y'aura formation des particules plus grosses (flocs) à partir de la matière colloïdale finement dispersée afin d'en faciliter la séparation par décantation, flottation ou filtration (Henze et al., 1997).

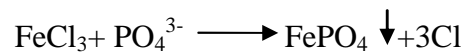
Ces trois mécanismes ont lieu simultanément, ce qui explique les rendements élevés de déphosphatation atteints par les procédés de traitement physico-chimiques (Deronzier et Choubert, 2004).

1.1.2. Mécanismes réactionnels de la déphosphatation chimique

1.1.2.1. Précipitation du phosphate par le fer

Les sels de fer sont communément utilisés dans la précipitation du phosphate présent dans les eaux usées municipales (De Bashan et Bashan, 2004). Les formes sous lesquelles le fer peut être ajouté sont variées: sulfates ferreux et ferrique, chlorures ferreux et ferrique

(Laurent *et al.*, 1994). La réaction entre le chlorure ferrique et le phosphate donne naissance au phosphate ferrique selon la formule suivante:

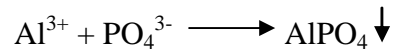


L'inconvénient de la précipitation par les sels de fer, est une production importante de boues, et l'utilisation d'une quantité élevée en fer pour atteindre un rapport molaire $\text{Fe}^{3+} : \text{PO}_4^{3-}$ de 1:1. Ce ratio molaire entraîne un ratio de Fe (III): P de 1.8:1 tandis que le ratio massique $\text{FeCl}_3 : \text{P}$ est de 5.2: 1. Cette méthode engendre alors des coûts importants pour une utilisation à grande échelle (Filali-Meknassi, 2003).

1.1.2.2. Précipitation du phosphate par l'aluminium

Les sels d'aluminium les plus utilisés pour la précipitation du phosphate sont le sulfate d'aluminium $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, l'hydroxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$, et l'aluminate de sodium ($\text{Na}_2\text{Al}_2\text{O}_4$) (Morales *et al.*, 1991).

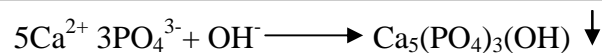
Les ions d'aluminium sont combinés avec des ions de phosphate pour former du phosphate d'aluminium selon la réaction suivante:



1.1.2.3. Précipitation du phosphate par le calcium

Le calcium est habituellement ajouté sous forme de chaux $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Poulin, 2005) qui réagit d'abord avec le bicarbonate présent dans l'eau, pour précipiter en carbonate de calcium (CaCO_3). Alors que le pH de l'eau à traiter augmente, les ions de calcium excédentaires réagissent avec les phosphates pour précipiter en hydroxyapatite, $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ (Prepas, 2001).

La réaction de précipitation du phosphate par la chaux est présentée par l'équation suivante :



En raison de la réaction avec le bicarbonate de l'eau, la quantité de chaux nécessaire est généralement indépendante de la quantité de phosphate présent et dépend principalement de l'alcalinité (Sincero *et Sincero*, 2002). De ce fait la quantité de chaux requise pour la précipitation du phosphate dans les eaux usées est de 1,4 à 1,5 fois l'alcalinité totale exprimée en CaCO_3 (Filali-Meknassi, 2003).

1.1.3. Techniques de déphosphatation physico-chimique

De multiples configurations d'addition de produit chimique ont été testées et utilisées (figure 3) (De Haas *et al.*, 2000a; Metcalf et Eddy, 1991; Rybicki, 1997)

1.1.3.1. Précipitation directe

La précipitation directe du phosphate ne nécessite pas de traitement biologique en aval; ce traitement est essentiellement appliqué quand de très fortes concentrations en phosphate sont visées. La précipitation est appliquée après le premier bassin de décantation (Filali-Meknassi, 2003).

1.1.3.2. Pré-précipitation

La pré-précipitation appelée aussi précipitation primaire précède le traitement biologique. L'ajout des sels est suivi d'un mélange vigoureux, d'une floculation et d'une décantation (Narasiah *et al.*, 1991).

La précipitation primaire permet d'atteindre une concentration de 1 mg.L^{-1} de Phosphore dans l'effluent, mais conduit à la formation d'un volume de boue important (Bowker et Stensel, 1990).

1.1.3.3. Précipitation simultanée

La précipitation simultanée consiste à ajouter des sels dans un même bassin de boue activée d'une station d'épuration biologique (De Haase *et al.*, 2000b; Maurer et Boller, 1999).

Cependant, l'ajout des réactifs chimiques inhibe certains microorganismes responsables de l'élimination des polluants (Rybicki, 1997) et peut même inhiber le procédé de déphosphatation biologique en limitant l'hydrolyse des polyphosphates (Morse *et al.*, 1998).

1.1.3.4. Post-précipitation

Dans le cas de la post-précipitation (précipitation tertiaire) les produits chimiques sont ajoutés en aval du traitement biologique et plus précisément après le deuxième clarificateur (Rybicki, 1997). Les performances épuratoires sont améliorées et les niveaux de phosphore peuvent être inférieurs à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Daumer, 2007).

Cependant, les coûts d'investissement et de fonctionnement sont élevés et requiert des installations supplémentaires pour l'ajout et le mélange de produits chimiques (De Haase *et al.*, 2000a).

1.2. Déphosphatation biologique

L'enlèvement biologique du phosphore semble offrir un potentiel considérable pour contrer les inconvénients que présentent les procédés chimiques. Ainsi, un système de boues activées avec une séquence d'une zone anaérobie suivie d'une zone aérobie peut induire le développement de boues contenant 2 à 3 fois plus que le contenu en phosphore des boues d'un système conventionnel (Tetreault *et al.*, 1986).

Cependant, les stations d'épuration pratiquant une élimination biologique du phosphore peuvent atteindre des efficacités d'enlèvement du phosphate de 80 à 90 % et pouvant produire parfois un effluent contenant moins de 1 mg P.L^{-1} (Asmlal, 1996).

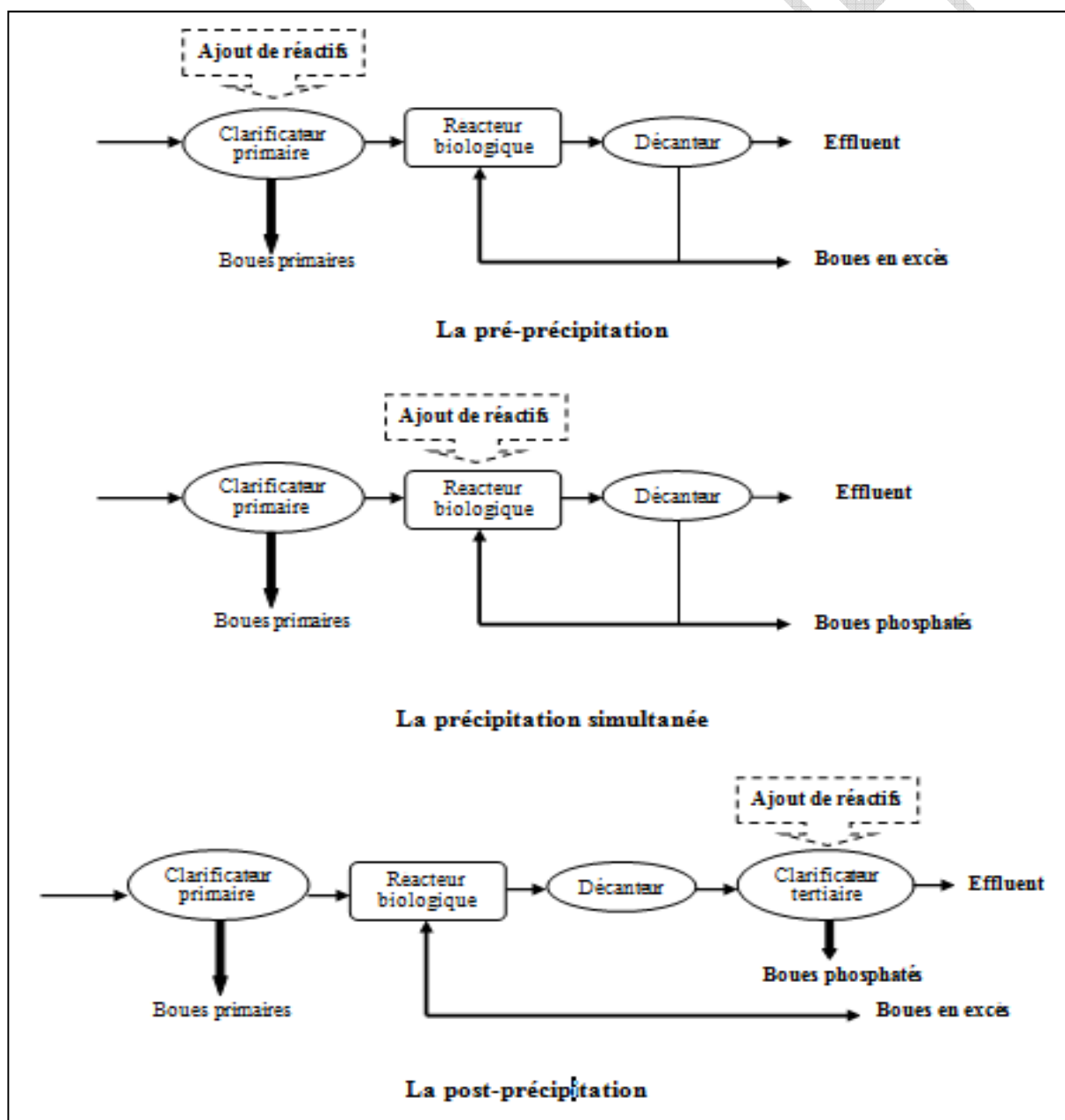


Figure 3. Les différents types de traitement physico-chimique du phosphate (Daumer, 2007).

1.2.1. Procédés d'élimination du phosphate par voie biologique

1.2.1.1. Procédé A/O

Le procédé A/O (Anaerobic/Oxic sequence) a été initialement développé pour l'élimination du phosphate (Rybicki, 1997). La configuration la plus simple du processus consiste en un réacteur anaérobie divisé en trois compartiments suivi d'un bassin aérobie divisé aussi en trois compartiments ou plus (figure 4), la boue sera par la suite recyclée vers le bassin d'anaérobiose (Morales et al., 1991).

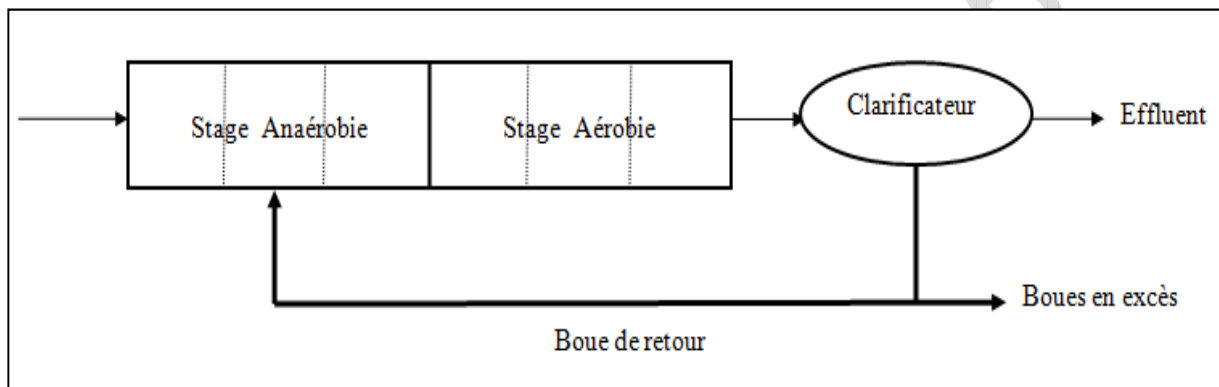


Figure 4. Le procédé A/O (Tae, 1993).

1.2.1.2. Procédé Bardenpho

Le procédé Bardenpho "Barnard denitrification phosphorus removal" (figure 5) a été conçu par James Barnard en Afrique du Sud (Filali-Meknassi, 2003). Ce processus permet aussi d'accomplir l'élimination biologique des nitrates, à côté de l'élimination du phosphate (Bitton, 2005). Il comporte deux zones d'anoxies, et deux zones aérobies, suivit d'un clarificateur, et enfin une zone aérobie de réactivation (Tae, 1993).

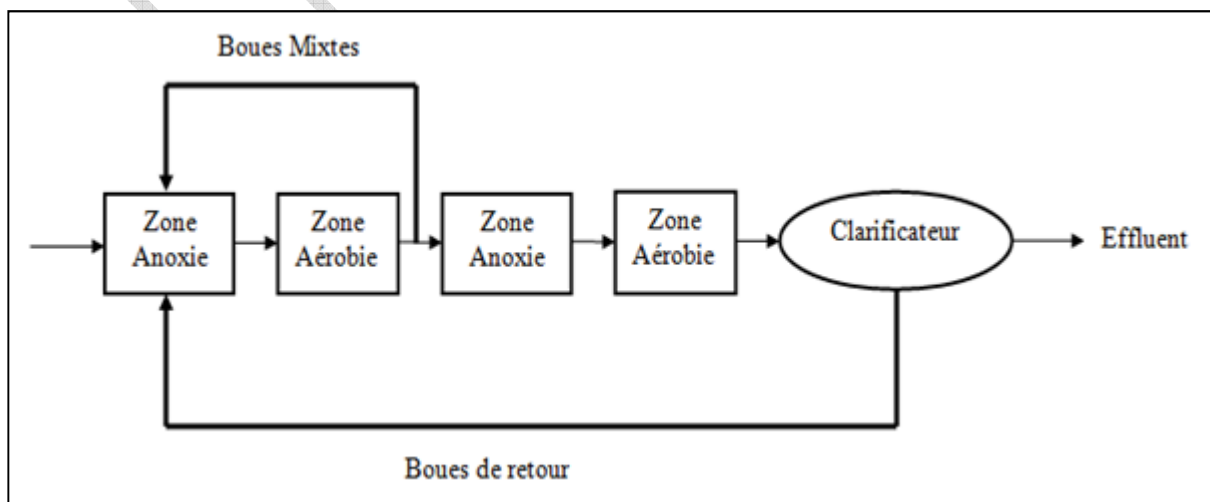


Figure 5. Le procédé Bardenpho (Bitton, 2005).

1.2.1.3. Procédé Phoredox

Ce procédé reprend le schéma Bardenpho, c'est-à-dire une succession de quatre bassins (anoxie, aérobie, anoxie, et aérobie) en lui ajoutant une zone anaérobie en tête (figure 6). Dans le bassin anaérobie sont introduits l'eau brute et les boues issues du clarificateur. La liqueur mixte venant du bassin d'aération est recyclée dans la zone d'anoxie. (Laurent *et al.*, 1994).

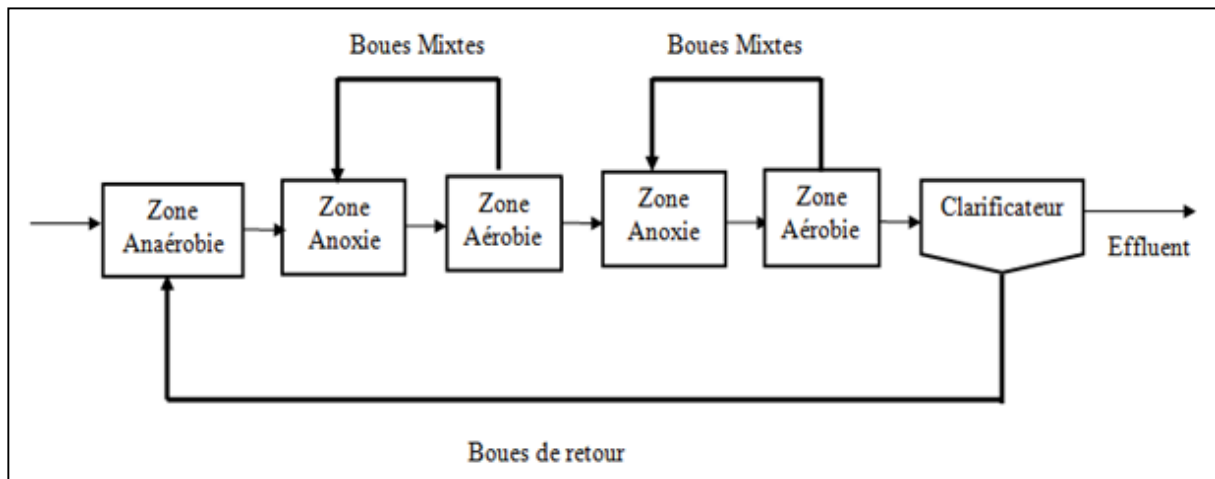


Figure 6. Le procédé Phoredox (Tae, 1993).

1.2.1.4. Procédé Phoredox modifié

Ce processus appelé aussi procédé UCT (University of Cape Town), comprend trois bassins (anaérobie, anoxie, et aérobie), suivi d'un bassin de clarification final (Bitton, 2005). La boue sera recyclée dans la zone d'anoxie et non pas en zone anaérobie (figure 7), pour minimiser le recyclage du nitrate afin d'avoir des conditions anaérobies dans le réservoir d'anaérobiose (Tae, 1993).

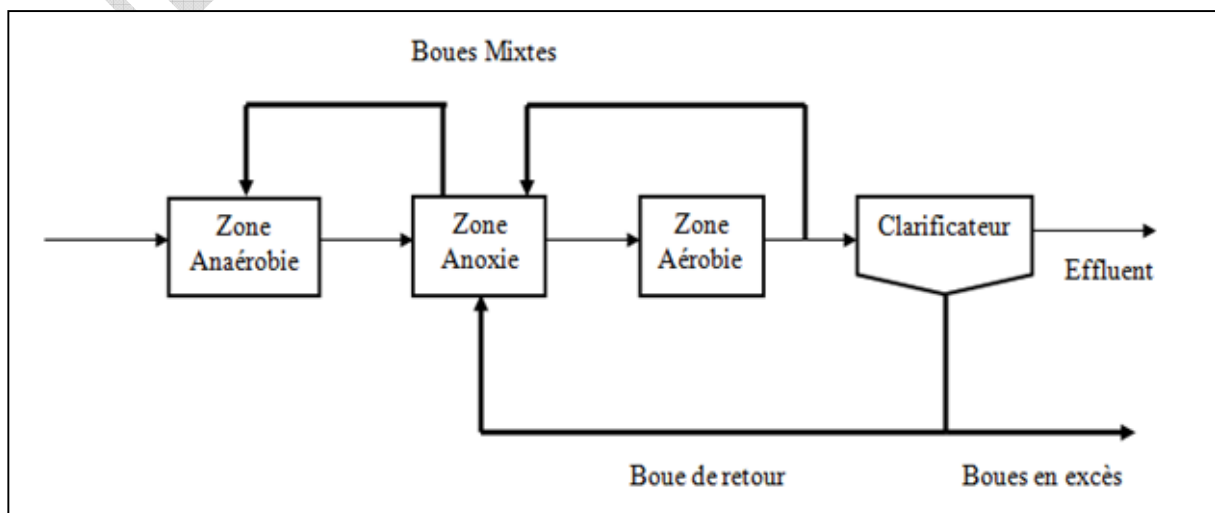


Figure 7. Le procédé Phoredox modifié (Oehmen, 2007).

1.2.1.5. Procédé Phostrip

Le processus de Phostrip est le premier processus d'élimination biologique du phosphate développé par Levin en 1975 (figure 8). C'est un processus qui a été conçu pour l'enlèvement du phosphate par voie biologique aussi bien que par moyen chimique (Levin et al., 1975; Tetreault et al., 1986).

Après accumulation du phosphate dans les boues au niveau du bassin d'aération, une partie de la boue décantée dans un clarificateur généralement 10 à 30%, sera introduite dans un réacteur anaérobie fonctionnant comme un épaisseur gravitaire pendant 5 à 20 h (Rybicki, 1997). Lors de l'épaississement, la boue consomme tout l'oxygène dissous et le relargage du phosphate s'opère (Laurent et al., 1994). La boue épaissie est renvoyée en aération où elle recommencera à stocker du phosphate, tandis que le surnageant de l'épaississement contenant une forte concentration de phosphate subira une déphosphatation chimique (Meinhold, 2001).

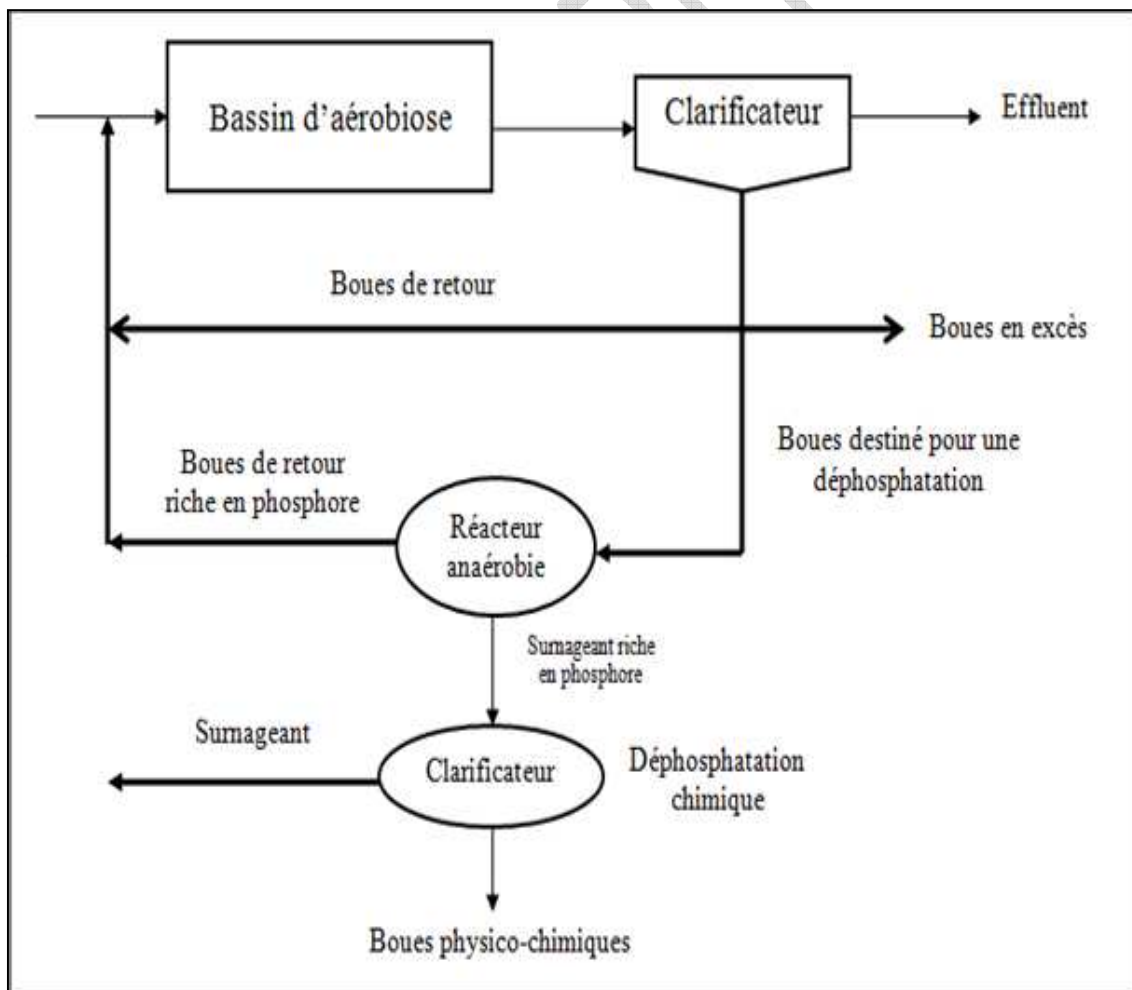


Figure 8. Le procédé Phostrip (Bitton, 2005).

1.2.1.6. Réacteur biologique séquentiel (SBR)

Le SBR est un système de boue activée pour le traitement des eaux usées. Sa particularité réside dans le fait que la décantation, l'aération et la clarification se déroulent dans une cuve unique (Péringier *et al.*, 2004).

Le cycle d'un SBR se compose de cinq étapes:

Le remplissage, les réactions, la décantation, le soutirage et le repos (figure 9) (Filali-Meknassi, 2003; Surampalli *et al.*, 1997).

-Le remplissage correspond à l'apport de l'eau usée.

-Les réactions consistent en des phases de traitement par anoxies, anaérobies et/ou aérobies, dont les successions et les durées varient en fonction du traitement requis.

-La décantation permet à la boue d'être séparée de l'effluent traité.

-Le soutirage est la décharge de l'effluent traité et de la boue.

-Le repos est une phase de latence entre deux cycles (temps après le soutirage et le nouveau remplissage du réacteur) elle permet de maintenir la biomasse active en attente du nouveau remplissage (Lu, 2008; Surampalli *et al.*, 2004).

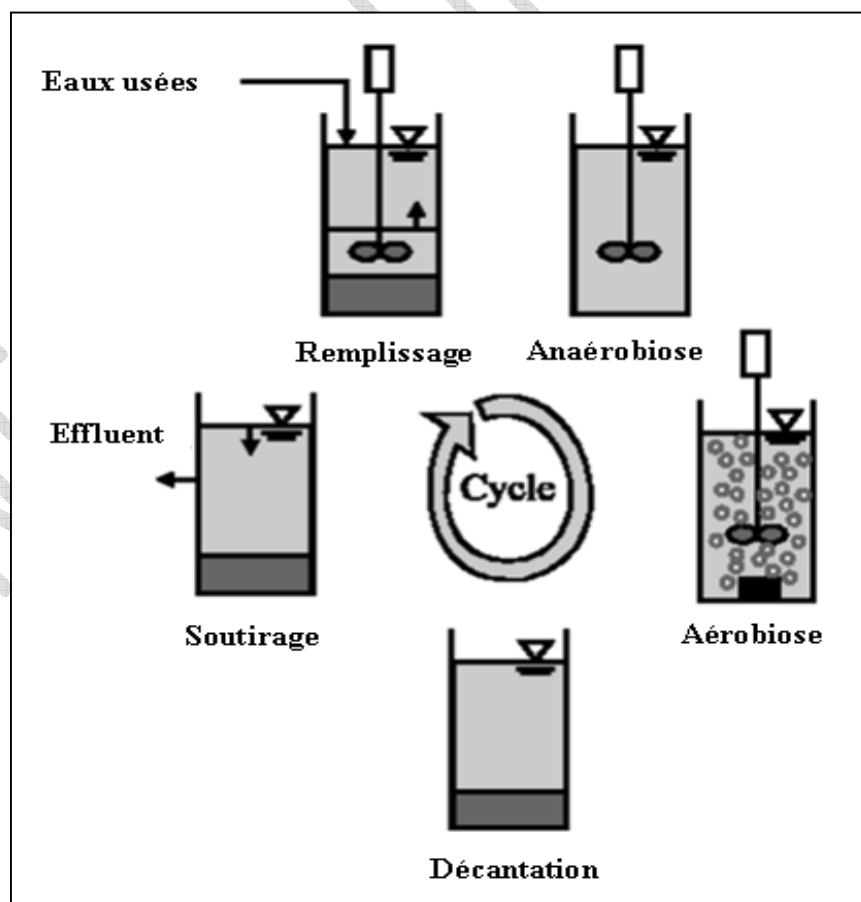


Figure 9. Le cycle de fonctionnement d'un réacteur biologique séquentiel (Ong *et al.*, 2010).

Chapitre III

Elimination biologique des phosphates

1. Mécanisme biologique d'élimination des phosphates

L'élimination biologique du phosphate des eaux usées est basée sur deux mécanismes microbiens, le couplage stoechiométrique à la croissance microbienne et le processus d'élimination biologique amélioré du phosphate (Mino *et al.*, 1998).

1.1. Assimilation

Une partie des phosphates des eaux usées est assimilée par une biomasse algale et bactérienne afin de subvenir à ses besoins métaboliques minimaux (Meinhold, 2001). Traditionnellement, cela a été réalisé grâce à des bassins de traitement contenant des planctons, des algues attachées, des plantes enracinées, ou même des plantes flottantes par exemple *Eichhornia*, *Lemnaceae* (Awuah *et al.*, 2004).

En raison de l'efficacité relativement basse de l'élimination du phosphate par l'assimilation naturelle, une autre approche a été développée (De Bashan *et Bashan*, 2004).

1.2. Enlèvement biologique amélioré du phosphate (EBAP)

La déphosphatation biologique est basée sur la capacité de certains micro-organismes à accumuler le phosphore au-delà de leur besoin métabolique. Ce métabolisme est connu sous le nom d'EBPR de l'anglais « Enhanced Biological Phosphate Removal ». La quantité de phosphate immobilisée dans les cellules est jusqu'à vingt fois supérieure à celle d'une biomasse de boues activées classiques et peut atteindre $0,38 \text{ mg P.gMVS}^{-1}$ (Wentzel *et Ekama*, 1997).

Le mécanisme de suraccumulation nécessite de mettre la biomasse alternativement en phases anaérobies puis aérobies (Comeau, 1990 ; Laridi, 2006).

En condition anaérobie, les bactéries déphosphatantes sont capables de stocker les composés organiques simples des eaux usées tels que les acides gras volatils (AGV) sous formes de polyhydroxyalcanoates (PHA). L'énergie nécessaire à cette transformation est fournie par l'hydrolyse des polyphosphates intracellulaires et du glycogène, entraînant un relargage des phosphates dans le milieu (Asmlal, 1996).

Pendant la phase aérobie, Les bactéries déphosphatantes n'entrent pas en compétition avec les autres souches bactériennes aérobies pour utiliser les substrats organiques extracellulaires, car elles utilisent les substrats intracellulaires sous formes de PHA stockés auparavant pour produire l'énergie nécessaire à leur croissance et à l'accumulation des phosphates. La concentration du phosphate réabsorbée est plus importante que celle relarguée en anaérobiose (Daumer, 2007).

2. Modèles biochimiques de la déphosphatation biologique

Le procédé d'élimination biologique du phosphate obéit à un modèle biochimique du comportement des bactéries déphosphatantes dans des conditions favorables à leur stimulation. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme du fonctionnement biochimique de cette biomasse bio-déphosphatante (Asmlal, 1996).

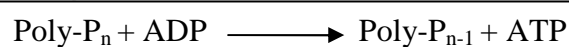
2.1. Modèles biochimiques en condition anaérobie

En phase anaérobie, l'acétate principale source de carbone est stocké à l'intérieur des bactéries capables d'éliminer le phosphate (bactéries bio-P). Il sera tout d'abord transformé en acétyl-CoA et ensuite converti en polyhydroxybutyrates (Meinhold, 2001). Le transport de l'acétate à l'intérieur de la cellule requiert de l'énergie, et la transformation d'acétyl-CoA en PHB (polyhydroxybutyrates) requiert des molécules réductrices, telles que les NADH, plusieurs modèles biochimiques ont été proposés pour identifier la source de cette énergie de transport et de ces molécules réductrices (Ky, 1999).

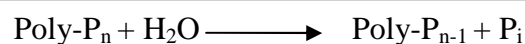
2.1.1. Modèle de Comeau / Wentzel (1986)

Le Modèle de Comeau et Wentzel (figure 10) propose qu'en condition anaérobie, l'acétate sera transféré dans la cellule par diffusion passive (Oehmen, 2007).

Une fraction de l'acétate assimilé sera convertie en PHB, en passant par la formation d'acétyl CoA, l'énergie nécessaire pour cette transformation sera fournie par l'hydrolyse des polyphosphates (Bitton, 2005; Wentzel, 1986); en effet comme résultat d'un faible rapport intracellulaire ATP/ADP, l'enzyme polyphosphate kinase sera activée pour catalyser la dégradation des polyphosphates et la production d'énergie (Tae, 1993).



Le phosphore en excès sera alors relâché à l'extérieur de la cellule ce qui explique le phénomène de relargage en condition anaérobie (Asmlal, 1996).



L'autre fraction d'acétate, sera oxydée via le cycle des acides tricarboxyliques pour fournir les molécules de NADH qui sont les donneurs d'électrons et des protons requis pour le stockage de polyhydroxybutyrate (Comeau, 1986). Pour chaque mole d'acétyl-CoA quatre NADH₂ seront produits. De tout l'acétate accumulé, 11% entre dans le cycle de Krebs tandis que l'acétate restant est converti en PHB (Meinhold, 2001).

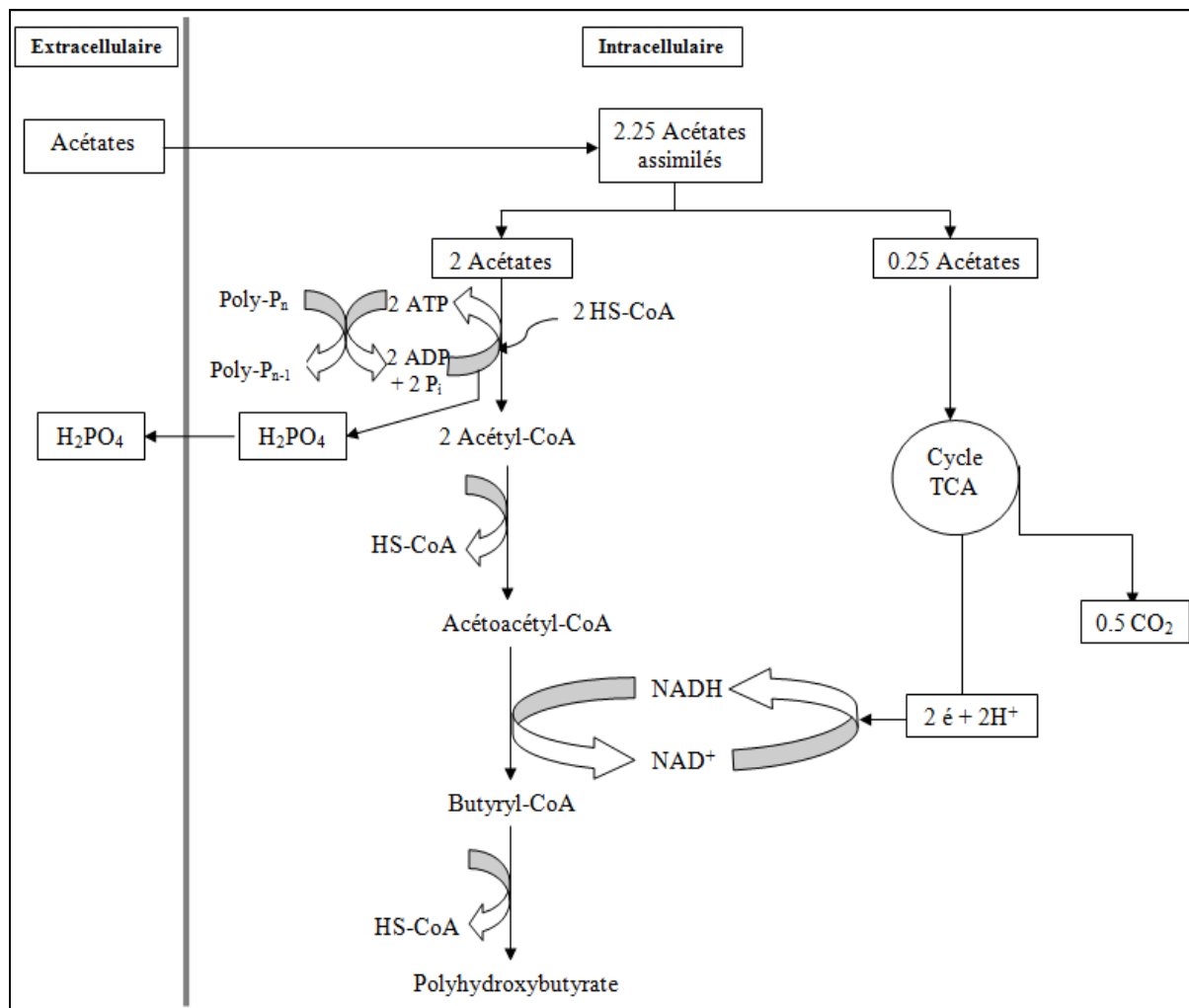


Figure 10. Modèle biochimique de Comeau / Wentzel pour le métabolisme anaérobie (Meinhold, 2001; Wentzel *et al.*, 1986).

2.1.2. Modèle de Mino *et al.*, (1987)

Ce modèle (figure 11) propose un mécanisme de transport actif de l'acétate, le besoin en énergie pour ce transport est supposé être obtenu par l'ATP fournie à partir de l'hydrolyse des polyphosphates (Oehmen, 2007). Alors que les NADH requis pour la transformation de l'acétyl-CoA en PHB seront obtenus par la dégradation du glycogène, préalablement accumulé dans les cellules des bactéries déphosphatantes (Ky, 1999).

Selon Mino *et al.*, (1987), les bactéries déphosphatantes suivent la voie d'Embden-Meyerhof (EM) pour pouvoir convertir le glycogène en acétyl-CoA avec une réduction concomitante de NAD (Asmlal, 1996). La dégradation de 1 mole de glycogène produit 4 moles de NADH₂ (Meinhold, 2001).

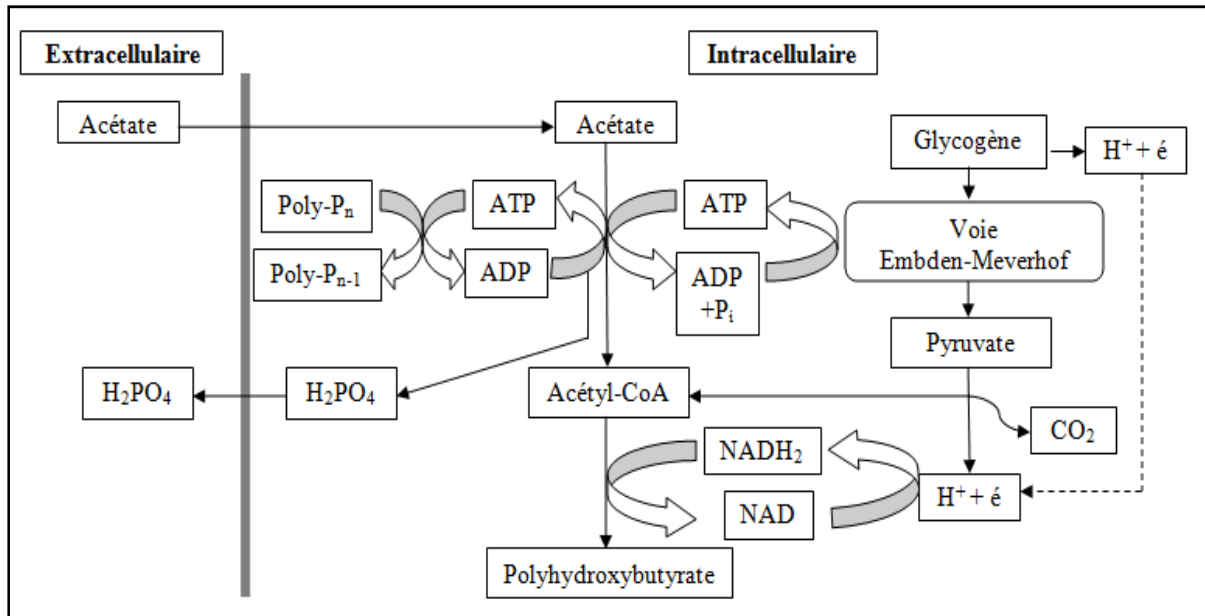


Figure 11. Modèle biochimique de Mino pour le métabolisme anaérobie (Meinhold, 2001).

2.1.3. Modèle de Mino adapté par Wentzel et al., (1991)

Wentzel et al., (1991), en se basant sur le modèle de Mino et al., (1987) ont établi un modèle décrivant les processus qui n'étaient pas bien expliqués par Mino et al., (1987), ainsi le mécanisme de régénération des carbohydrates à partir des PHB a été décrit (figure 12). Ils proposent que le NADH₂ requis pour la synthèse des PHB soit fourni via la voie d'Entner-Doudorof (ED), au lieu du cheminement des acides tricarboxyliques (TCA) soutenu par Comead/Wentzel, (1986) ou au lieu de la voie Embden-Meyerhof (EM) proposé par Mino et al. (1987) (Asmlal, 1996).

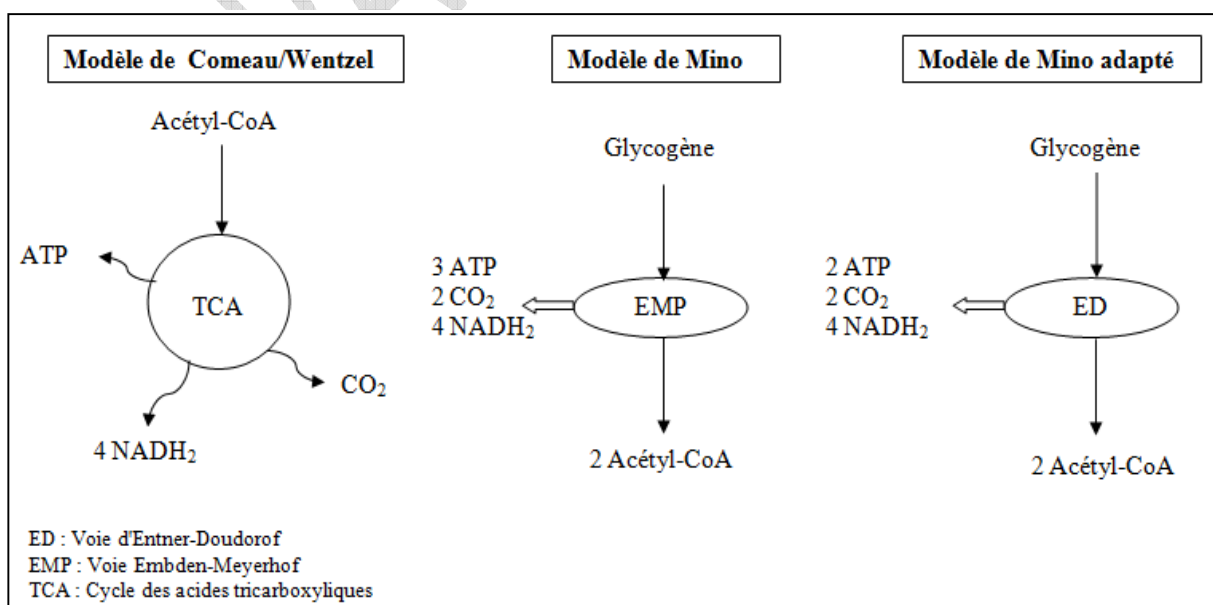


Figure 12. Source de NADH₂ sous condition anaérobie (Meinhold, 2001).

2.2. Modèles biochimiques en condition aérobie

En phase aérobie, les bactéries déphosphatantes utilisent leurs réserves de polyhydroxybutyrate comme source d'énergie et de croissance (Ky, 1999). La voie de synthèse et de dégradation des polyhydroxybutyrates est représentée en (Annexe 3).

La diminution du rapport NADH/NAD stimule la dégradation des PHB en acétyl-CoA se qui active cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ainsi que le cycle du glyoxylate, les NADH₂ générés à partir de ces cycles seront plus tard oxydés via la chaîne de transfert d'électrons (Meinhold, 2001). En présence d'oxygène, le rapport ATP/ADP dans les cellules augmente via la phosphorylation oxydative, conduisant à la formation des polyphosphates à partir des phosphates solubles captés de l'extérieur (Tae, 1993). Pour les modèles prenant en considération le glycogène, la réaction de formation de glycogène à partir du PHA en conditions aérobie doit être aussi considérée (Ky, 1999).

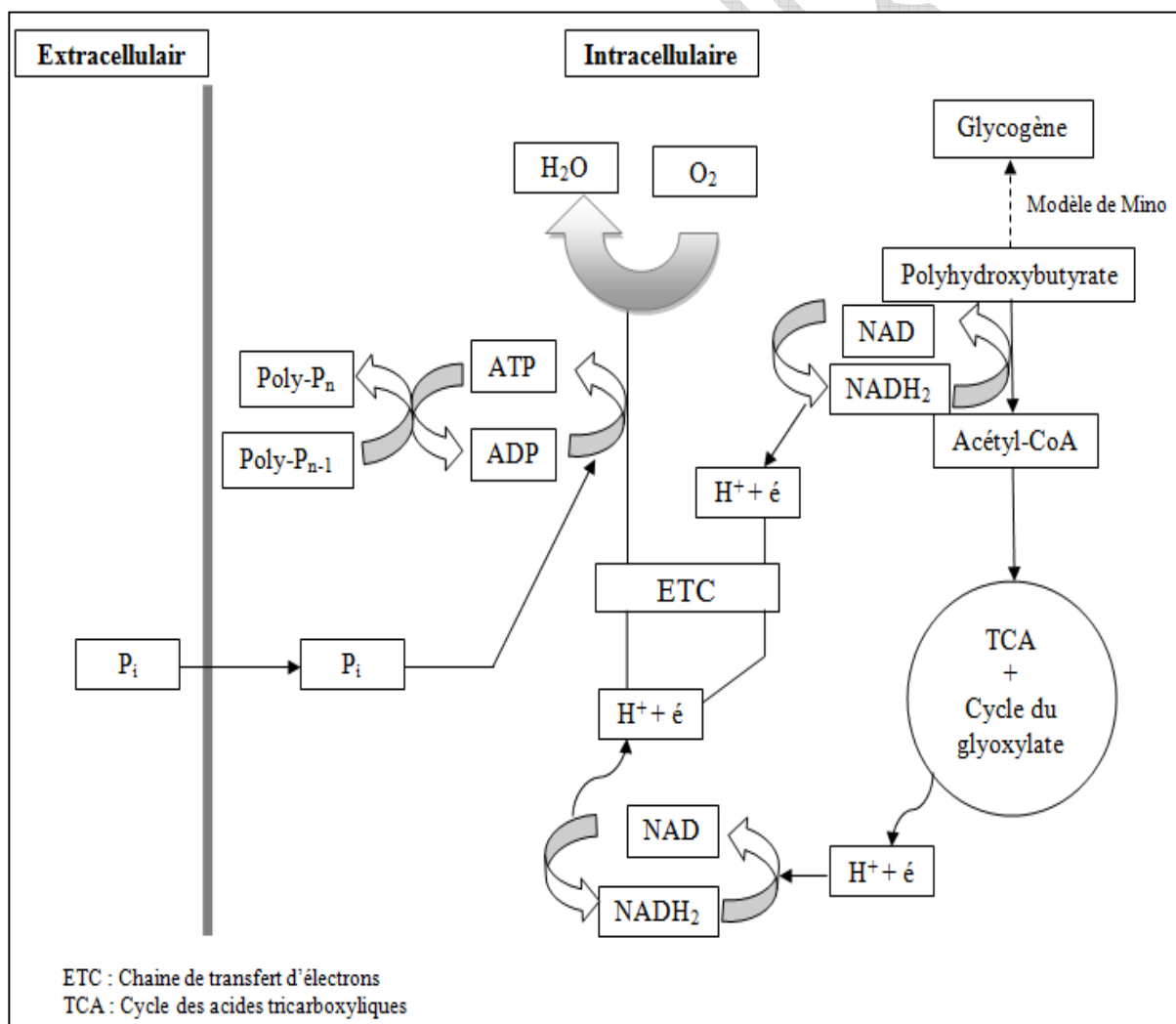


Figure 13. Modèle biochimique aérobie de l'enlèvement biologique du phosphate (Meinhold, 2001).

3. Facteurs influençant l'élimination biologique du phosphate dans les eaux usées

Les bactéries déphosphatantes s'avèrent l'élément clé du procédé de déphosphatation biologique des eaux usées (Asmlal, 1996). De ce fait il faut s'intéresser aux facteurs qui peuvent influencer le comportement de ces micro-organismes ce qui se traduira par une perturbation de la performance du procédé (Nielsen *et al.*, 2010).

3.1. Configuration du procédé

L'importance d'une séquence anaérobie-aérobie pour la croissance d'une biomasse déphosphatante fut reconnue en premier par Fuhs et Chen, (1975), qui constatèrent que les conditions anaérobies dans la première étape d'un processus d'élimination biologique du phosphate étaient essentielles pour le fonctionnement du processus.

En conditions anaérobies, les bactéries déphosphatantes, nommées "bio-P" (Comeau *et al.*, 1986), accumulent des réserves de carbone en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de polyphosphates préalablement accumulés ce qui explique la phase de relargage des phosphates dans le milieu.

En conditions aérobies, ces réserves de carbone pourraient alors être utilisées pour la croissance et les besoins énergétiques de ces bactéries bio-déphosphatantes (Ky, 1999).

3.2. Nature du substrat

Le procédé d'élimination du phosphate dépend de la disponibilité des sources de carbone facilement biodégradables, qui sont indispensables pour les bactéries déphosphatantes (Rybicki, 1997). La concentration en carbone assimilable va donc directement définir la quantité maximale potentiellement éliminable de phosphates par voie biologique (Sadowski *et al.*, 2002).

Elles consistent en simples composés organiques principalement, les acides gras volatils à courtes chaînes (AGV) et les carbohydrates qui peuvent passer directement à travers les membranes cellulaires sans aucune hydrolyse extracellulaire (Asmlal, 1996).

Ces substrats organiques proviennent, soit des eaux usées brutes ou bien de la fermentation des matières organiques de poids moléculaires plus élevés dans des conditions anaérobies (Lötter et Pitmann, 1992 ; Randall *et al.*, 1994 ; Skalsky et Daigger, 1995).

Une large gamme de composés organiques est utilisée comme substrat par les bactéries déphosphatantes y compris l'acétate, propionate, butyrate, lactate, malate, glucose, ribose, glycérol et acide aminé (Sato *et al.*, 1996 ; Carucci *et al.*, 1999).

Cependant, il a été prouvé que l'acétate et le butyrate sont les substrats les plus favorables à la déphosphatation biologique, tandis que le propionate est l'acide gras volatil le moins efficace (Rustrian *et al.*, 1997).

3.3. Cations

La concentration des cations joue un rôle important dans le maintien de la stabilité du processus d'élimination biologique du phosphate et dans le mécanisme de la rétention du phosphate par les boues (Schönborn *et al.*, 2001), et aussi l'activation des micro-organismes impliquées dans ce processus (Machnicka *et al.*, 2005).

L'assimilation du phosphate est affectée par la disponibilité du potassium, magnésium et du calcium (Brdjanovic *et al.*, 1996). En effet, le relargage du phosphore pendant la phase anaérobie est accompagnée d'un relargage du magnésium et du potassium. De la même façon, en phase aérobie un co-transport du magnésium et du potassium relargué est réalisé par les micro-organismes en même temps que l'assimilation du phosphate (Asmlal, 1996). Pour chaque mole de phosphore libérée en phase anaérobie, 0,27 à 0.36 mole de potassium et 0.29 à 0.32 mole de magnésium sont simultanément reléguées (Jonsson *et al.*, 1996).

L'augmentation de la concentration du magnésium de 15 à 31 mg.L⁻¹, aboutit à une augmentation du taux d'élimination du phosphore de 85% à 97% (De Bashan et Bashan, 2004).

Le magnésium et le potassium peuvent servir également comme contre-ions pour la stabilisation de la chaîne des polyphosphates ou bien comme cofacteurs dans les réactions biochimiques qui catalysent soit la biosynthèse soit la dégradation des polyphosphates (Machnicka *et al.*, 2005).

3.4. Température

La température est un facteur important dans l'évaluation de l'efficacité du processus biologique du traitement des eaux usées (Mulkerrins *et al.*, 2003). Cependant la littérature révèle des observations contradictoires concernant l'effet de la température sur la performance de l'élimination biologique du phosphate (Brdjanovic *et al.*, 1997 ; Filali- Meknassi, 2003).

Il est rapporté que l'efficacité du système d'EBP s'améliore aux températures comprises entre 20 et 37 °C (McClintock *et al.*, 1993 ; Converti *et al.*, 1995 ; Jones et Stephenson, 1996). Tandis que le même résultat est observé à des températures plus basses entre 5 et 15 °C (Helmer et Kunst, 1997 ; Mulkerrins *et al.*, 2003).

Le taux de relargage et d'assimilation du phosphate par les bactéries déphosphatantes croît proportionnellement avec la température dans une gamme de 10 à 32 °C (Mamais et Jenkins, 1992). Une inhibition significative du stockage du phosphate est observée à 42,5 °C alors qu'à 45 °C aucune concentration de phosphore relargué ou assimilé est signalée (Beatens et Vanrolleghem, 1999).

Les variations de température ont aussi un effet sur les phosphates en eaux usées. En effet, le taux d'hydrolyse des polyphosphates en orthophosphates est plus accéléré en été qu'en hiver (Narasiah et al., 1990).

3.5. pH

La gamme de pH propice au fonctionnement du traitement biologique du phosphate s'étend de 6.5 à 9 (Henze et al., 1997).

En phase anaérobie, La quantité de phosphate relarguée par rapport à la quantité d'acide acétique consommée augmente avec le pH (Smolders et al., 1994). Ceci a été confirmé et modélisé par Filipe et al., (2001) pour des valeurs de pH comprises entre 6 à 8.

La quantité d'énergie nécessaire à l'absorption de l'acétate par les bactéries déphosphatantes est plus importante lorsque le pH est élevé. Cependant, pour des valeurs de pH supérieures à 8 le phosphate relargué précipite et la quantité d'orthophosphates soluble a tendance à diminuer (Daumer, 2007). Il a été rapporté qu'un pH élevé permet aussi de réduire le taux des bactéries déphosphatantes (Beatens et Vanrolleghem, 1999).

3.6. Age de boue

L'âge de boue (ou le temps de résidence cellulaire) peut avoir un effet significatif sur l'efficacité d'élimination du phosphate par les bactéries bio-P, car il joue un rôle sur l'intensité de l'activité déphosphatante (Gürtekin et Şekerdağ, 2011).

En effet, le taux de rétention du phosphate par les boues est meilleur lorsque l'âge de boue augmente (Merzouki et al., 2001).

Cependant, au-delà de vingt jours l'augmentation de l'âge de boue reste favorable à la nitrification mais défavorable à la déphosphatation biologique, l'efficacité du traitement passant de 93 à 84% d'élimination du phosphate dans l'effluent liquide lorsque l'âge des boues passe de vingt à trente jours (Lee et al., 2007).

3.7. Nitrates

Les nitrates interviennent selon diverses manières mais toutes auront pour conséquence une perturbation ou un arrêt de la déphosphatation biologique.

Les bactéries acétogènes vont utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons, inhibant par conséquent les voies fermentatives produisant l'acétate; principale source de carbone pour les bactéries déphosphatantes. D'autre part, le carbone facilement assimilable va être consommé prioritairement par les réactions de dénitrification et ne sera plus disponible pour les mécanismes de relargage du phosphore ce qui favorise la dénitrification aux dépens de la déphosphatation (Laurent *et al.*, 1994).

Quand le niveau des nitrates dans les effluents est réduit de 10,9 à 5,6 mg.L⁻¹, l'efficacité d'élimination du phosphate augmente de 80 à 98% (Chang et Hao, 1996). Généralement quand le niveau du nitrate pendant le traitement biologique du phosphore varie de 2 à 5 mg.L⁻¹, il ne devrait pas affecter le processus (Keller *et al.*, 1997 ; Lemaire, 2007).

Afin d'éliminer l'effet néfaste des nitrates, une dénitrification s'avère nécessaire, notamment par intégration d'un bassin d'anoxie en amont du bassin d'anaérobie de cette façon les deux traitements peuvent être couplés (Legros et Villain, 2004).

3.8. Métaux lourds

Il est admis que la présence de métaux lourds dans les rejets d'eau usée peut atténuer gravement les capacités épuratoires des stations d'épuration (Asmlal, 1996).

L'augmentation de la concentration des métaux lourds permet l'inhibition de la croissance microbienne des boues activées (Ong *et al.*, 2007 ; Gikas, 2008 ; Ong *et al.*, 2010). Pour le cadmium, le chrome et le nickel l'inhibition de la biomasse devient importante pour des concentrations supérieures à 10 mg.L⁻¹ (Zarnovsky *et al.*, 1994).

Hascoet et Florentz (1985) ont étudié l'effet du cuivre sur le relargage et l'utilisation du phosphore en utilisant des boues provenant d'un système d'EBP. Ils ont trouvé que la dose maximale tolérable au dessus de laquelle l'efficacité du système commence à diminuer est de 1 mg.L⁻¹. Ils ont aussi rapporté que les doses maximales admissibles pour ne pas affecter l'efficacité de l'EBP sont de 10 mg.L⁻¹ pour le cadmium, de 5 mg.L⁻¹ pour le nickel, de 10 mg.L⁻¹ pour le zinc, et de 100 mg.L⁻¹ pour le plomb.

3.9. Oxygène

Lors du traitement biologique du phosphate, la zone anaérobie doit être maintenue exempte d'oxygène (0.0-0.2 mg.L⁻¹) car la présence des substances oxydantes telles que l'oxygène interférera avec le processus (Mulkerrins *et al.*, 2003).

Toutefois, dans la zone aérobie, le maintien d'un taux d'oxygène dissous entre 3 à 4 mg.L⁻¹ est requis pour stimuler l'assimilation du phosphate (Shehab *et al.*, 1996).

3.10. Rapport DCO/P

Le rendement d'élimination du phosphate est significativement lié au rapport DCO/P (Rybicki, 1997). L'efficacité d'un système d'EBP avec un effluent de concentration en phosphore $< 1.0 \text{ mg.L}^{-1}$ exige que les eaux à traiter dans la zone anaérobie devraient avoir un ratio DCO: P $> 40: 1$, ou bien DBO₅: PT $> 20: 1$ (Randall et al., 1992).

Chaque fois que le rapport DCO/P descend en dessous de 50, L'BPR sera insuffisant pour atteindre le niveau souhaité de phosphate dans l'effluent traité (Mulkerriens et al., 2003).

4. Micro-organismes accumulant les polyphosphates

Traditionnellement, il était supposé que la classe des *Gammaproteobacteria* et plus précisément le genre *Acinetobacter* soient les seuls micro-organismes dominant dans les boues activées issus de l'enlèvement biologique du phosphate avec une haute capacité d'accumulation de se dernier (Fuhs et Chen, 1975 ; Lötter et Murphy, 1985 ; Oehmen, 2007). Cependant, l'utilisation de techniques modernes de biologie moléculaire ont démontré une grande diversité phylogénétique des microorganismes présents dans les boues activées (Seviour et al., 2003), et que les *Acinetobacter* ne sont pas les principaux acteurs de la déphosphatation biologique et représentent souvent une fraction inférieure à 10% de la population bactérienne (Mino et al., 1998).

Plusieurs autres bactéries isolées à partir des réacteurs d'EBPR ont été proposées comme candidates de l'accumulation de phosphate (Wagner, 2002) dont les bactéries Gram positif riches en GC%, comme *Microlunatus phosphovorius* qui constituent environ 2.7% des bactéries totales (Mino, 2000 ; Nakamura et al., 1995) et les Actinomycètes qui ont été détectées en grand nombre (plus de 35% des bactéries totales) dans les dix stations d'épuration des eaux usées étudiées au Danemark (Kong et al., 2005).

Lampropedia spp., une bactérie cocci à Gram négatif a été prouvée qu'elle possède un rôle significatif lors de l'accumulation du phosphate (Stante, 1997).

Plusieurs cultures pures ont été effectuées afin de mener à bien la déphosphatation, les principaux genres étudiés sont: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* et *Moraxella* (Cai, 2007 ; Sarioglu, 2005 ; Sidate et al., 1999 ; Srivastava et Srivastava, 2006).

Cependant *Acinetobacter* demeure le genre le plus étudié à cause de sa haute capacité d'accumulation du phosphate et aussi la facilité de son isolement et son identification par méthodes classiques par rapport aux autres genres accumulant le phosphate (Boswell et al., 2001 ; Ghigliazza et al., 1998 ; Kim et Pagilla, 2002 ; Momba et Cloete, 1995).

Chapitre IV

Matériel et méthodes

1. Echantillonnage

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé des échantillons de boues activées prélevés à partir du bassin aérobie de la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Khenchela.

La boue a été mise dans des flacons en verre stériles et conservée à 4 °C dans une glacière et transportée en 2 h, au laboratoire de bactériologie du département Vétérinaire de l'Université de Batna où les différentes expériences ont été effectuées.

1.1. Présentation de la station d'épuration

La station d'épuration des eaux usées de Khenchela est située à la périphérie de la ville sur la route de Baghai. Elle a été mise en service en 2007, et traite aujourd'hui les rejets domestiques déversés par la Ville de Khenchela.

Celle-ci a une capacité de 192 000 équivalents habitants, dimensionnée pour un débit moyen de 6422 m³/jour (O.N.A, 2009).

2. Milieu de culture

Pour favoriser la croissance des micro-organismes déphosphatants, nous avons utilisé un milieu de croissance minimum synthétique qui apporte aux micro-organismes tous les éléments nécessaires à leurs développements cellulaires (Saito *et al.*, 2004).

2.1. Composition du milieu de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum dont l'acétate de sodium est la seule source de carbone et d'énergie avec le K₂HPO₄ et le KH₂PO₄ comme source unique de phosphore, sa composition pour 1 litre d'eau distillée est représentée dans le tableau I. Le pH du milieu est ajusté de telle façon à avoir un pH final de 7 après stérilisation.

Tableau I. Composition du milieu de culture (Saito *et al.*, 2004).

Composés	Concentrations (g.L ⁻¹)
CH ₃ COONa. 3H ₂ O	0.4
K ₂ HPO ₄	0.049
KH ₂ PO ₄	0.028
NH ₄ Cl	0.107
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.180
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0003
Solution de trace	0.3 mL.L ⁻¹

2. Composition de la solution de trace

La solution de trace est une solution d'oligo-éléments qui confère des sels minéraux indispensables à la croissance des bactéries. La composition de la solution de trace utilisée dans le milieu de culture est donnée dans le tableau II.

Tableau II. Composition de la solution de trace (Saito *et al.*, 2004).

Composés	Concentrations (g.L ⁻¹)
EDTA	10
FeSO ₄ .7H ₂ O	1.54
H ₃ BO ₃	0.15
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.03
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.120
KI	0.18
Na ₂ .MoO ₄ .2H ₂ O	0.06
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.12
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.15

3. Préparation de l'inoculum

Le consortium utilisé pour l'inoculation de nos réacteurs provient des boues activées prélevées dans la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Khenchela.

Les boues doivent subir un traitement avant d'inoculer les différents fermenteurs. Tout d'abord elles sont dissoutes dans une solution d'eau physiologique stérile à 0.9 %, Ce mélange est ensuite homogénéisé par agitation avec un vortex pendant deux minutes; pour disperser les floculations et pour détacher les micro-organismes attachés aux particules (Pauli *et Kaitala*, 1997 ; Vergeynst, 2010).

La boue diluée dans de l'eau physiologique sera par la suite centrifugée à 300 rpm pendant deux minutes; cette opération permet la sédimentation des particules volumineuses.

Le surnageant sert d'inoculum à la première pré-culture effectué dans 100 ml du milieu de culture minimum (Tableau I), et incubé sous agitation à 30 °C. Après 24h d'incubation, les microorganismes sont récupérés par centrifugation à 10.000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est éliminé, alors que le culot bactérien subit un lavage avec de l'eau physiologique stérile. A ce stade les microorganismes récupérés seront prêts pour être utilisés comme inoculum des différents réacteurs (Bouziane, 2009 ; Terrouche, 2009).

4. Cinétique de l'élimination du phosphate par culture mixte

4.1. Conditions de culture

Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs miniaturisés de 500 ml, contenant 300 ml de notre milieu chargé avec différentes concentrations d'acétate de sodium comme source de carbone et d'énergie et le K_2HPO_4 ainsi que le KH_2PO_4 comme source unique de phosphore.

Les fermenteurs sont ensuite menés en mode batch et incubés dans un bain marie agitateur (GFL 1083) en alternance d'une phase anaérobie (2h) durant laquelle les fermenteurs sont mis dans une jarre à bougie, puis une phase aérobie (4h) à une température de 30 °C sous une agitation horizontale de 150 mpm.

Toutes les expériences sont effectuées en triplicata.

Des prélèvements, à différents intervalles de temps réguliers, d'échantillons liquides sont effectués aseptiquement à partir des fermenteurs, à l'aide d'une seringue stérile sans les ouvrir, afin de réaliser le suivi de la croissance bactérienne, les concentrations en phosphate et le pH.

Ces prélèvements, d'un volume de 8 ml, sont répartis dans deux tubes comme suit:

- 2,5 mL du volume total permet la lecture de la densité optique par spectrophotométrie pour la mesure de la biomasse, suivie de la mesure du pH.
- Le volume restant (5,5 mL) est injecté dans un tube fermé, il subit alors une centrifugation à 7000 rpm par une centrifugeuse pendant 15 min afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes qui servira pour le dosage de phosphate.

4.2. Méthode d'analyse

4.2.1. Mesure du pH

Les mesures du pH ont été réalisées à l'aide d'un pH-mètre (Phywe) muni d'une électrode en verre. Le pH-mètre est préalablement étalonné avec des solutions tampons (pH = 4,7, 7, et 10).

4.2.2. Mesure de la biomasse

La détermination de la biomasse des échantillons est opérée par la mesure de la turbidité de la suspension avec un spectrophotomètre UV-Visible 12-05 (Shimadzu), à une longueur d'onde de 600 nm. Pour la mesure de la densité optique on se base sur la loi de Beer-Lamber (Annexe 2).

4.2.3. Dosage du phosphate

La seule forme de phosphate pouvant être détectée en solution est l'orthophosphate. Toutes les autres formes doivent subir un pré-traitement afin d'être transformées en orthophosphate avant de les analyser (Akmouci-Toumi, 2009).

Les orthophosphates sont dosés par colorimétrie avec la méthode d'acide ascorbique (Rodier et al., 2009). Le protocole expérimental est présenté en (Annexe 1).

Le dosage de phosphate a été effectué au niveau du laboratoire d'Environnement, Santé et Productions Animales du département Vétérinaire de l'Université de Batna.

5. Analyse microbiologique

5.1. Isolement et purification des microorganismes

L'isolement des microorganismes dominants est effectué au fur et à mesure de l'élimination biologique des phosphates. L'ensemencement est fait à partir des fermenteurs inoculés par les boues activées sur milieu minimum gélosé. L'incubation se fait à 30 °C pour une durée de 24 h jusqu'à 72 h. Sur la base de l'aspect macroscopique, un échantillon de chaque type de colonie est prélevé ensuite purifié par repiquages successifs selon la méthode des stries sur le même milieu, jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

5.2. Conservation des souches isolées

Les souches isolées ont été conservées dans des tubes à essai contenant un bouillon nutritif additionné de 10 % de glycérol puis congelées à -20°C. Elles sont également conservées dans un milieu de conservation prêt à l'emploi dans des petits tubes ensemencés par pique centrale (Guiraud, 2003).

5.3. Coloration de Neisser

Cette coloration permet de mettre en évidence les polyphosphates stockés sous forme de granulation chez les bactéries. Elle est réalisée en milieu acide acétique en présence du bleu de méthylène et contre coloré par le brun de Bismarck (la vésuvine). Les bactéries contenant des granules de polyphosphates sont colorées en bleu foncé (violé) et considérées comme Neisser positif. Alors que les bactéries colorées en jaune brun sont Neisser négatif (Pandolfi, 2006).

-Préparation des colorants

1. Solution de brun de Bismarck

Brun Bismarck2g
Eau déminéralisée1000 ml

2. Solution de Bleu acétique

Bleu de Méthylène	1g
Alcool absolu.....	20 ml
Acide acétique glacial.....	50 ml
Eau déminéralisée.....	950ml

-Technique de préparation

- Une goutte d'échantillon est prélevée à la pipette et déposée au centre d'une lame propre.
- Un étalement est préparé.
- la lame est ensuite fixée à chaleur douce.
- Appliquer la solution du bleu acétique pendant 10 minutes environ.
- Rincer à l'eau déminéralisée
- Recouvrir avec la solution du brun Bismarck pendant une minute.

L'observation est réalisée au microscope optique à contraste de phase en présence de l'huile à émersion, grossissement 250X (Annexe 6) (Pandolfi, 2006).

5.4. Identification

Les souches microbiennes isolées sont identifiées en se basant sur leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

5.4.1. Identification morphologique

5.4.1.1. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après Delarras (2007), les éléments importants de l'identification macroscopique sont:

- La forme des colonies: rondes, irrégulières, ondulées,...etc.
- La taille des colonies: par la mesure du diamètre.
- La chromogènes: la couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, légèrement convexe, plate....etc.
- L'opacité: opaque, translucide, transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.
- La consistance: Les colonies grasses, crémeuse donnant facilement des suspensions homogènes, correspondent au type S. Tandis que les colonies sèches correspondent au type R et les colonies muqueuses (filantes) correspondant au type M; elles donnent difficilement des suspensions homogènes.

5.4.1.2. Aspect microscopique

a-Examen à l'état frais

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur regroupement. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique stérile et placée entre lame et lamelle. Pour éviter les débordements, quatre gouttes de paraffine stérile sont déposées aux quatre coins de la lamelle, ensuite à l'aide d'une pince stérile bien chauffée chaque goutte est étalée sur la limite entre lame et lamelle (technique du lutage). L'observation se fait au microscope optique (x40) (Joffin et Leyral, 2005).

b-Coloration de Gram

Les souches isolées sont fixées et colorées selon la méthode de Gram (Annexe 5), puis elles sont observées au microscope optique (grossissement x100). Cette coloration permet de différencier les bactéries en deux groupes, en fonction de la couleur obtenue: les Gram positifs et les Gram négatifs (Prescott *et al.*, 2010).

5.4.2. Identification biochimique classique

Cette identification nous oriente sur le métabolisme suivi par les microorganismes et les enzymes qu'ils possèdent. C'est tests on été réalisés en utilisant les mini galeries classiques (Delarras, 2007).

5.4.2.1. Etude du type respiratoire

Le type respiratoire est identifié sur une gélose profonde de type Viande Foie (VF) répartie en tubes en culot de 10 à 15 cm. Après régénération du milieu à une température comprise entre 70 et 80 °C, on laisse refroidir jusqu'à 45 °C, puisensemencé à l'aide d'une pipette pasteur que l'on plonge au fond du tube et que l'on remonte en décrivant des tours de spires très serrées de façon àensemencer uniformément le milieu sur tout la hauteur. Faire sortir la pipette à 0.5 cm de la surface. Les tubesensemencés sont ensuite incubés à 30 °C.

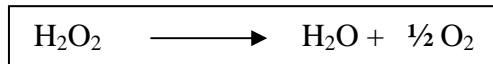
Le type respiratoire est exprimé par la localisation du niveau de la croissance bactérienne dans le tube:

- Croissance dans tout le tube: bactéries aérobies-anaérobies facultatives.
- Colonies en surface du tube: bactéries aérobies strictes.
- Colonies en haut du tube légèrement sous la surface: bactéries micro-aérophiles
- Croissance en profondeur du tube: bactéries anaérobies strictes.

5.4.2.2. Recherche des enzymes respiratoires

-Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme ayant la capacité de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement de l'oxygène selon la réaction suivante :



Sur une lame en verre et à l'aide d'une pipette pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute une à deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles de gaz (Guiraud, 2003).

-Recherche de l'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence l'existence du cytochrome oxydase, enzyme caractéristique d'un métabolisme respiratoire aérobie spécifique de la réduction de l'oxygène moléculaire.

L'oxydase est recherchée par la méthode des disques. A partir d'un milieu solide, et à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, une colonie est déposée sur un disque oxydase préalablement imprégné avec une goutte d'eau distillée stérile. Une réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette (Delarras, 2007).

-Recherche de la nitrate réductase

Ce test permet de mettre en évidence la nitrate réductase, une enzyme capable de réduire les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-). Des tubes contenant un bouillon nitraté sont ensemencés par les souches isolées, puis incubés à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une culture abondante. Après incubation, quelques gouttes du réactif I (acide parasulfanilique) et du réactif II (alpha-naphtylamine) sont ajoutées aux cultures.

- Apparition d'une coloration rose ou rouge: réaction positive (réduction des nitrates en nitrites).

Cependant, un certain nombre de bactéries sont capables de réduire les nitrates au delà du stade «nitrite» jusqu'au N_2 . En conséquence, toute réaction ne révélant pas la présence de nitrates (absence de coloration) dans le milieu doit être complétée par l'épreuve de Zo-Bell, qui consiste à ajouter dans le milieu de la poudre de zinc qui réduit les nitrates présents dans le milieu en nitrites.

- Apparition en cinq minutes d'une coloration rose ou rouge : réaction négative.

- Absence de coloration : réaction positive (bactérie réduisant les nitrites jusqu'au stade azote gazeux) (Akmouci-Toumi, 2009).

5.4.2.3. Etude de la voie d'attaque du glucose

Le milieu utilisé est le milieu MEVAG de couleur rouge, contenant comme source de carbone le glucose. Ce milieu permet de distinguer les bactéries à métabolisme oxydatif des bactéries à métabolisme fermentatif ou les deux à la fois.

L'ensemencement se fait par piqure centrale de deux tubes du milieu MEVAG, l'un d'entre eux sera recouvert d'une couche d'environ 1-1.5 cm de vaseline stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 30 °C pendant 24 à 48h. La lecture se fait comme suit:

- Bactéries fermentatives: virage au jaune du tube avec vaseline.
- Bactéries oxydatives: virage au jaune du tube sans vaseline
- Bactéries à métabolismes oxydatifs et fermentatifs: virage au jaune des tubes avec et sans vaseline.

5.4.2.4. Utilisation du citrate comme source de carbone

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons, dont l'unique source de carbone est le citrate de sodium, seules les bactéries contenant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu.

Le milieu est ensemencé d'une suspension bactérienne, par stries longitudinales. Les tubes sont ensuite légèrement fermés et incubés à 30 °C pendant 3 à 5 jours. L'observation a eu lieu chaque jour. L'utilisation du citrate provoque l'alcalinisation du milieu qui se traduit par une couleur bleue (Akmouci-Toumi, 2009).

5.4.2.5. Test du mannitol mobilité

Le Mannitol-Mobilité est un milieu de culture qui permet de mettre en évidence l'utilisation du mannitol et permet simultanément d'établir la mobilité bactérienne.

Le milieu est ensemencé par piqure centrale, à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée chargée de la culture à étudier, puis incubé à 30 °C pendant 24 heures à 48h.

- La fermentation du mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.
- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu, tandis que les souches immobiles croissent uniquement le long de la strie d'ensemencement (Delarras, 2007).

5.4.2.6. Recherche de la β -galactosidase

Cette enzyme permet de scinder la molécule du lactose, après leur pénétration dans la cellule bactérienne en glucose et galactose.

La présence de la β -galactosidase est mise en évidence à l'aide d'un analogue structural du lactose, l'ONPG (orthonitrophenyl β -D-galactoside) qui diffuse librement à l'intérieur des bactéries où il est alors dégradé par β -galactosidase en galactose et en orthonitrophénol. Ce dernier donne une couleur jaune citron lors de sa libération dans le milieu (réaction positive).

Un disque ONPG est ajouté dans une suspension bactérienne dense. L'incubation est faite à 30 °C pendant 24 heures. La lecture se fait à des intervalles de temps différents: 15min, 30 min, 1h ,6h et 24h.

- Apparition d'une coloration jaune citron : bactérie ONPG positive.
- Absence de coloration : bactérie ONPG négative.

5.4.2.7. Etude de la dégradation du glucose, saccharose et lactose en milieu TSI

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron agar) permet de mettre en évidence la dégradation du glucose, lactose, et du saccharose, la production éventuelle du sulfure d'hydrogène (H_2S) et la production de gaz (CO_2). Ce milieu est composé d'un culot et d'une pente, et contient le rouge de méthyle comme un indicateur de pH.

Le milieu est ensemencé à l'aide d'une anse stérile par des stries longitudinales au niveau de la pente et par une piqûre centrale dans le culot. Les tubes ensemencés sont incubés à 30 °C pendant 24 heures.

Les résultats se manifestent comme suit:

- Glucose positif : culot jaune.
- Saccharose et lactose positif : la pente vire au jaune.
- H_2S positif : noircissement du milieu au niveau de la zone joignant le culot et la pente.
- Production de gaz : présence de bulles de gaz dans le culot (Halassi, 2009).

5.4.2.8. Etude des voies fermentatives intermédiaires

Cette étude permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction au Rouge de Méthyle) et celle butylène glycolique (réaction de Voges Proskauer).

-Réaction au Rouge de Méthyle: elle consiste à mettre en évidence l'acidification finale du milieu par la fermentation du glucose.

-Réaction de l'acétoïne (réaction de Voges Proskauer): Ce test détecte la capacité de synthèse de l'acétoïne (acétyl-méthyle carbinol) par les microorganismes, qui est un métabolite spécifique intermédiaire de la fermentation butandiolique (VP +).

Dans un milieu bien aéré et fortement alcalinisé, il se produit une auto-oxydation de butanediol en acétoïne et en diacétyl. L'acétoïne réagit avec le réactif VP I (soude ou potasse) pour former le diacétyl ; ce dernier après addition du VP II va réagir avec le groupe guanidine de l'arginine pour former un complexe coloré en rose.

Afin de réaliser ces deux tests, la souche à étudier est ensemencée sur un milieu Clark et Lubs puis incubée à 30 °C pendant 24h à 48h. Après l'incubation on divise le milieu dans deux tubes à hémolyse stériles, dans le premier tube on ajoute quelques gouttes de VP I et quelques gouttes de VP II, et on laisse le tube incliné (réaction facilité par l'air), alors que dans le deuxième tube on ajoute quelques gouttes de RM.

Test VP

- Coloration rouge: VP positif.
- Coloration jaunâtre : VP négatif.

Test RM

- Coloration rouge : RM positif.
- Coloration jaunâtre : RM négatif (Akmouci-Toumi, 2009).

4.4.2.9. Recherche de l'uréase

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée (NH₂)₂CO en dioxyde de carbone et ammoniac qui se lient entre eux pour donner le complexe du carbonate d'ammonium.



Le milieu urée-indole permet de mettre en évidence ce caractère, dont le virage de l'indicateur de pH au rouge violacé en raison de l'alcalinisation du milieu, indique l'utilisation de l'urée par les bactéries.

5.4.2.10. Recherche de l'indole

L'indole est le métabolite terminal de la dégradation du tryptophane présent initialement dans le milieu. Seules les bactéries indologènes permettent cette dégradation jusqu'à la formation de l'indole. Ce test s'effectue en utilisant un milieu riche en tryptophane exempt d'indole, ou un milieu urée-indole (Halassi, 2009).

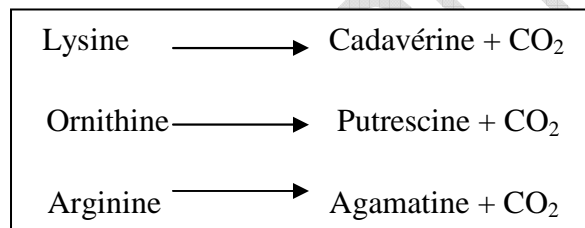
Après 24 h d'incubation, on ajoute quelques gouttes du réactif Kovac (acide nitrique nitreux) au milieu urée indole inoculé par la souche à étudier. Après agitation l'indole formé va réagir avec le réactif de Kovacs pour former un anneau rouge surnageant (indole positif), alors que la formation d'un anneau brunâtre (couleur du réactif) signifie que la souche est indole négatif (Akmouci-Toumi, 2009).

5.4.2.11. Recherche de tryptophane désaminase (TDA)

La tryptophane désaminase agit sur l'acide aminé L-tryptophane en formant l'acide indole pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brun rouge.

5.4.2.12. Recherche des décarboxylases

Ce test permet de détecter la production des décarboxylases suivant : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine déshydrolyase (ADH) qui décarboxylent respectivement la lysine, l'ornithine et l'arginine en cadavérine, putrescine et agmatine par ordre successif selon les réactions suivantes:



Le test est réalisé avec le milieu Moeller réparti en 4 tubes à hémolyse différents

- Le premier tube constitue le témoin, il contient essentiellement du glucose et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH.
- Les trois autres tubes contiennent en plus du milieu témoin, un des trois acides aminés suivants: Lysine, Ornithine, ou Arginine.

Après ensemencement, 1 ml de vaseline stérile est ajouté dans chaque tube, le tout sera incubé à 30°C pendant 24h à 48h.

- Apparition d'une coloration jaune : réaction négative.
- Apparition d'une coloration pourpre : réaction positive

5.4.2.13. Croissance sur milieu King (King A et King B)

Les milieux King A et King B permettent de différencier les espèces du genre *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigmentations spécifiques.

Les souches élaborant des pigments diffusibles sur la gélose nutritive sont ensemencées sur milieu King A et King B en réalisant des stries médianes à la surface de la

pende, les capsules des tubes sont ensuite replacées et revissées. L'incubation se fait à 30 °C pendant 24 heures et jusqu'à 5 jours.

- Le milieu King A est utilisé pour mettre en évidence la pyocyanine, pigment caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert.
- Le milieu King B est utilisé pour mettre en évidence la pyoverdine pigment vert fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* du groupe fluorescent (Akmouci-Toumi, 2009).

5.4.3. Identification par galerie API 20NE

-Principe

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant chacune un substrat spécifique déshydraté, correspondant à l'identification d'un caractère métabolique. Les différentes cupules sont inoculées à l'aide d'une suspension bactérienne de la souche à identifier. Les réactions produites pendant la durée de l'incubation se traduisent soit par un virage spontané du milieu ou bien par virage révélé par l'addition d'un réactif approprié. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum, et les bactéries se cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

-Préparation de la galerie

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, puis environ 5 ml d'eau distillée stérile sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte.

-Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune (18-24 heures), une à quatre colonies d'aspect morphologique identique sont prélevées par touches successives puis mises en suspension dans une ampoule API contenant du NaCl 0,85 %. Une densité suffisante (0,5 de McFarland) est exigée.

-Inoculation de la galerie

Les tubes des tests NO₃ à PNG sont remplis en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation des bulles au fond des tubes, qui empêcheraient le contact entre les bactéries à identifier et le réactif ou substrat à tester, la pointe de la pipette est posée sur le côté de la cupule tout en inclinant légèrement la boîte d'inoculation vers l'avant. Les tubes et cupules des tests | GLU | à | PAC | sont remplis en veillant à créer un

niveau horizontal ou légèrement convexe. Enfin, les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) sont remplies d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe. A la fin la boîte d'incubation est fermée et incubée à 30 °C pendant 24 heures jusqu'à 48 heures.

-Lecture

Après incubation, la lecture des résultats de la galerie est faite en se référant au tableau de lecture (Annexe 4).

- **Test NO₃**

La révélation des deux tests NO₃ et TRP est faite en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air. Une goutte de chaque réactif (NIT 1 et NIT 2) est ajoutée dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats (Figure 14). Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles). Pour cela, 2 à 3 mg du réactif de zinc sont ajoutés dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive, tant dis que si la cupule devient rose-rouge, la réaction est dite négative.

- **Test TRP**

Une goutte de réactif JAMES est ajoutée dans la cupule TRP. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

- **Test d'assimilation**

La pousse bactérienne étant observée ; la cupule trouble indique une réaction positive.

-Interprétation

L'identification est réalisée à partir du profil numérique. Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois, et une valeur (1, 2, 4) est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondantes à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive (Bio-Mérieux, 2006). Le chiffre obtenu sera attribué à un logiciel d'identification (APiX1) afin de déterminer l'espèce.

Figure 14. Fiche de résultats API 20NE.

6. Cinétique de l'élimination du phosphate par les souches isolées (culture pure)

Dans cette partie, nous avons suivi la réaction de déphosphatation par les différentes souches pures isolées, nous avons mesuré en concomitance la concentration des phosphates et la croissance bactérienne en fonction du temps.

6.1. Préparation des inoculums

A partir d'un stock de bactéries conservé à -20 °C dans un bouillon nutritif additionné de 10 % de glycérol, 20 μl sont prélevés puis régénérés sur gélose nutritive. Après 18 h d'incubation à 30 °C , quelques colonies de chaque souche isolée sont prélevées puis transférées séparément dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de notre milieu de culture milieu minimum utilisé pour les différentes cultures en batch. Les erlenmeyers sont mis en incubation en aérobiose dans un bain marie agitateur (GFL 1083), durant 24 heures à 30 °C sous agitation horizontale de 150 mpm (Zafiri, 1999).

Lorsque la croissance bactérienne est suffisamment avancée (24 h d'incubation), les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 10.000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est éliminé, alors que le culot bactérien est remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

Les concentrations bactériennes des inoculums ont été évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique à 600 nm par un spectrophotomètre. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée à une densité optique de 0,1 et utilisée comme inoculum (Krishnaswamy, 2009).

6.2. Conditions de culture

Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs miniaturisés de 500 ml contenant 300 ml du milieu minimum chargé avec 5 g.L^{-1} d'acétate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie avec le KH_2PO_4 comme unique source de phosphore ($\text{P-PO}_4^{-3} = 18\text{ mg.L}^{-1}$). Par la suite chaque fermenteur est inoculé à partir des différentes pré-cultures préalablement préparées à raison de 2.5%.

Les fermenteurs sont ensuite menés en mode batch et incubés à une température de 30 °C sous une agitation horizontale de 150 mpm.

Des prélèvements à différents intervalles de temps réguliers sont effectués pour suivre la croissance bactérienne, ainsi que les concentrations en phosphate, en suivant les mêmes étapes effectuées lors du suivi de la cinétique de l'élimination du phosphore par culture mixte.

Chapitre V

Résultats et discussion

1. Réaction de déphosphatation par l'utilisation d'une culture mixte

Dans cette partie, nous avons suivi l'évolution de la concentration du phosphate, la croissance bactérienne, et le pH en fonction du temps en choisissant 500 mg.L⁻¹ d'acétate de sodium comme source unique de carbone et d'énergie avec le KH₂PO₄ et le K₂HPO₄ comme source unique de phosphore (P-PO₄⁻³ = 15 mg.L⁻¹). Les bioréacteurs ont été maintenus à 30 °C sous agitation.

1.1. Suivi de la biomasse

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 15, qui montre la production de la biomasse en fonction du temps d'incubation.

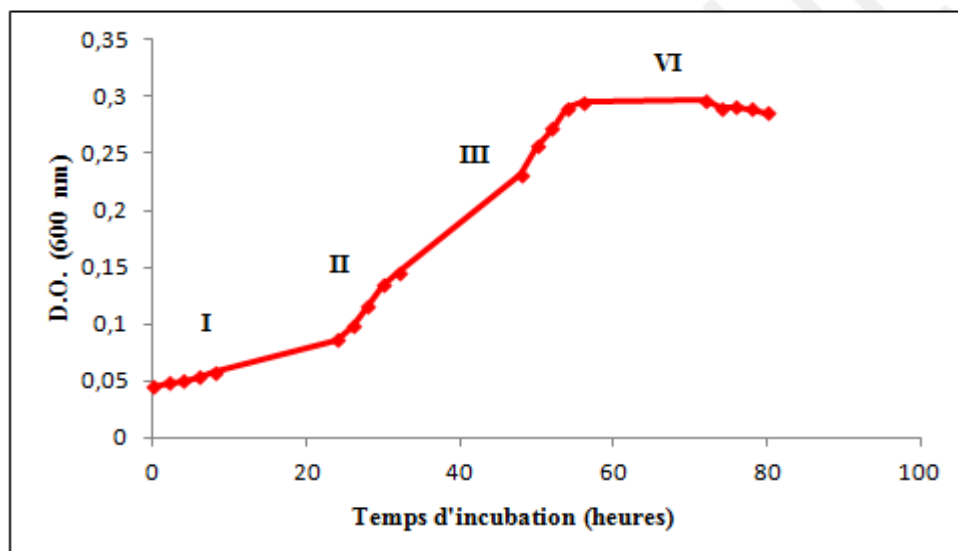


Figure 15. Cinétique de la croissance d'une culture mixte

La figure 15 montre que la cinétique de croissance suit quatre phases principales :

I- La phase de latence : durant laquelle le nombre de microorganismes reste constant, elle correspond à une phase d'adaptation des cellules à leur nouvel environnement en synthétisant les enzymes nécessaires à la métabolisation des substrats disponibles. Cette phase de latence est une phase d'ajustement pendant laquelle les bactéries procèdent à des modifications dans le but de pouvoir initier la phase de croissance (Buchanan et Klawitter, 1991).

II- La phase de croissance exponentielle : dite aussi phase de croissance maximale; où les microorganismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible. Ils se divisent en doublant leur nombre à intervalle de temps régulier (Prescott et al., 2010).

Au cours de cette phase, le taux de croissance est constant. Il se traduit par une augmentation exponentielle du nombre de cellules en fonction du temps (Dens et al., 2005).

III- La phase de décélération ou phase de freinage : l'insuffisance des nutriments ainsi que l'accumulation des déchets entraînent un ralentissement de la croissance bactérienne. Le taux de croissance par organisme décroît, c'est-à-dire que le temps de génération moyen augmente. On observe alors un début de plafonnement de la masse cellulaire (Mammeri, 2007).

IV- La phase stationnaire : correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le nombre total de microorganismes viables reste constant. Ceci peut résulter d'un équilibre entre division et mort cellulaire.

Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des micro-organismes (Augustin, 1999).

1.2. Suivi de la concentration en phosphate

La croissance bactérienne est accompagnée d'une élimination proportionnelle du phosphate comme le montre la figure 16, qui représente la variation de la concentration des phosphates en fonction du temps.

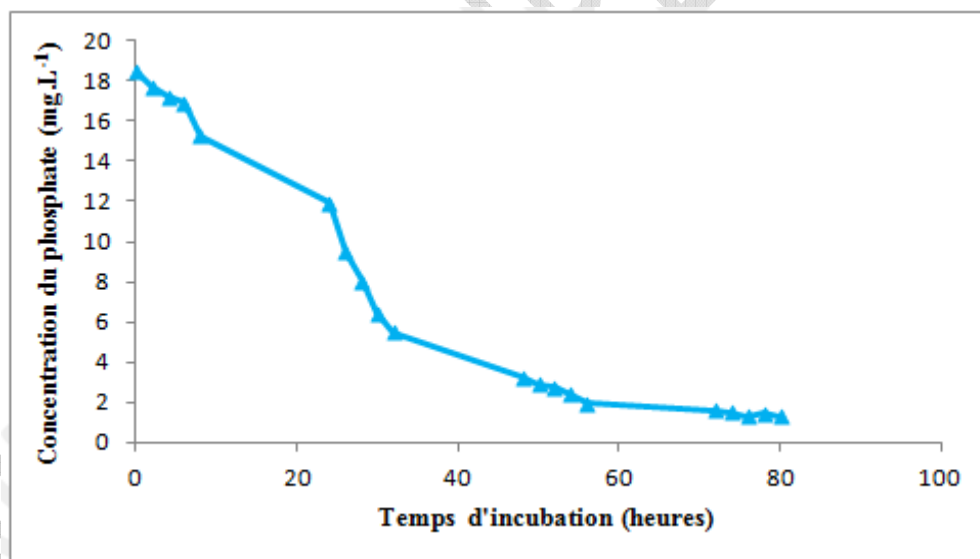


Figure 16. Cinétique de l'élimination des phosphates par une culture mixte

La figure 16 montre que les microorganismes impliqués dans le processus d'accumulation des phosphates expriment une phase de latence de 8 heures. Cette phase correspond à une période d'adaptation du microbiote au milieu de culture. Cette adaptation rapide est une conséquence logique à une biosynthèse enzymatique accélérée par la culture mixte. Cette situation pourrait bien résulter d'inter-relations synergiques entre les espèces microbiennes co-cultivées (Cohen, 2011).

Durant cette phase, le taux du phosphate assimilé est de l'ordre de 17,44 %, cette quantité sera utilisée par les micro-organismes afin de subvenir à leurs besoins métaboliques minimaux (Meinhold, 2001).

Après la phase de latence, l'accumulation des phosphates débute d'une façon relativement rapide durant les 50 premières heures, avec une vitesse moyenne d'accumulation de $0.31 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cette période d'accumulation semble correspondre à la phase exponentielle de la croissance microbienne où les microorganismes se multiplient intensément. Ceci est confirmé par la présence de troubles microbiens dans tous les fermenteurs qui n'apparaissent qu'après 24 heures d'incubation.

Après 50 heures d'incubation, la concentration des phosphates continue à diminuer. Sa vitesse d'accumulation devient alors nettement plus faible, estimée à $0.052 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. L'accumulation des phosphates s'arrête après que le consortium microbien soit entré en phase de latence. La vitesse moyenne d'accumulation des phosphates durant la phase de croissance exponentielle est : $V_{\text{moy}} = 0.215 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

La déphosphatation s'arrête après 78 heures de traitement. La concentration des phosphates est alors de 1.32 mg.L^{-1} , ce qui donne un taux de déphosphatation de 92.87%.

1.2. Suivi du pH

Tout au long de la réaction d'élimination du phosphate par culture mixte nous avons suivi la variation du pH (figure 17).

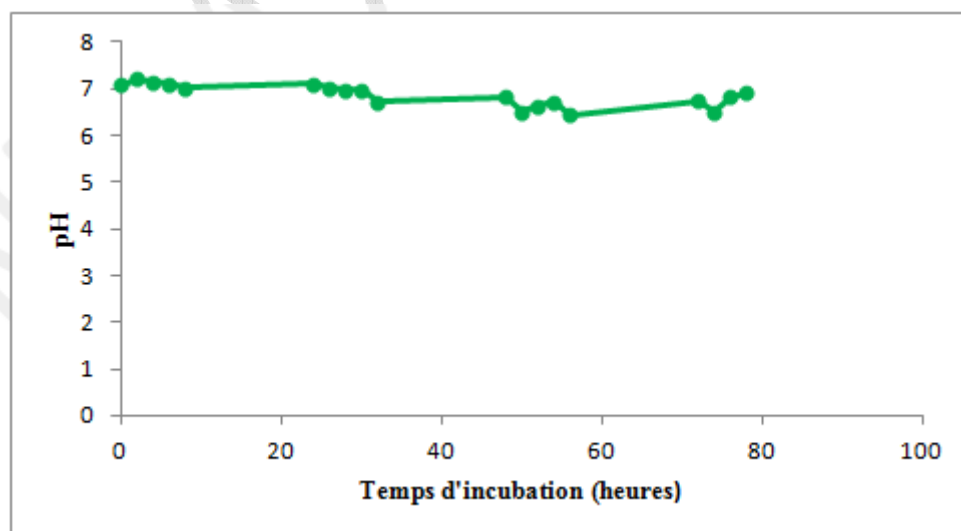


Figure 17. Variation du pH au cours de la réaction de déphosphatation par culture mixte

Au cours de la réaction d'élimination du phosphate nous avons observé une très légère diminution du pH dans tous les réacteurs qui est de 7.09 à 6.64. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation d'un milieu nutritif suffisamment tamponné.

La baisse du pH cytoplasmique au cours de la phase anaérobie est due à la dissociation de l'acétate de sodium assimilé par le microbiote. En effet avec la diffusion d'acétate dans la cellule puis sa dissociation, il en résulte une diminution du gradient pH d'environ un H^+ pour chaque molécule d'acétate transportée (Tae, 1993). Cette diminution du gradient de pH va réduire la force proton motrice dont les cellules ont tendance à la maintenir à un niveau relativement constant.

Pour rétablir le gradient de pH cytoplasmique, Les bactéries déphosphatantes expulsent les protons de la cellule via une enzyme de type ATP-ase en utilisant l'énergie de la dégradation des polyphosphates (Comeau et al., 1986), et en relargant du phosphore dans la liqueur mixte, ce qui se traduit par une augmentation du pH du milieu extérieur (figure 18).

Au cours de la phase aérobie, la diminution du pH est due à la libération du dioxyde de carbone et à l'accumulation du phosphate, en effet deux moles de protons sont pris avec chaque mole de phosphore accumulée (Serralta et al., 2006). La réaction de stockage de polyphosphate peut être décrite comme suit :

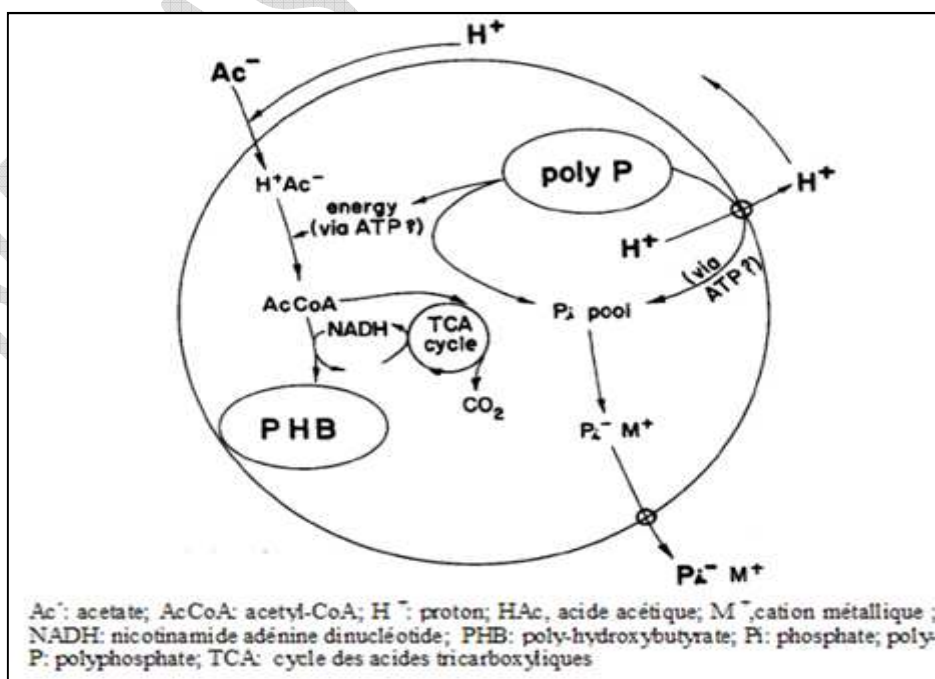
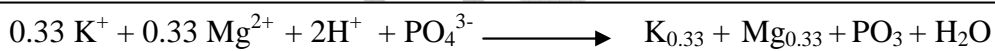


Figure 18. Modèle du métabolisme anaérobie des bactéries déphosphatantes (Comeau et al., 1986).

2. Optimisation des paramètres liés au milieu de culture

2.1. Influence de la concentration initiale de la source de carbone

Afin de déterminer l'effet de la concentration initiale de la source de carbone sur la l'élimination du phosphate, ainsi que sur la croissance microbienne, des expériences ont été réalisées avec des concentrations initiales en acétate de sodium de 1000, 2000, 3000 4000, et 5000 ppm, les autres paramètres étant fixes. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous.

2.1.1. Suivi de la biomasse

La cinétique de croissance microbienne des cultures mixtes sur un milieu de culture minimum avec différentes concentrations d'acétate de sodium comme source unique de carbone et d'énergie a été suivie, en mesurant la densité optique (D.O.) des différents échantillons prélevés à partir des fermenteurs au fur et à mesure de l'élimination biologique du phosphate en fonction du temps. Ce qui a permis de tracer les courbes représentées par la figure 19.

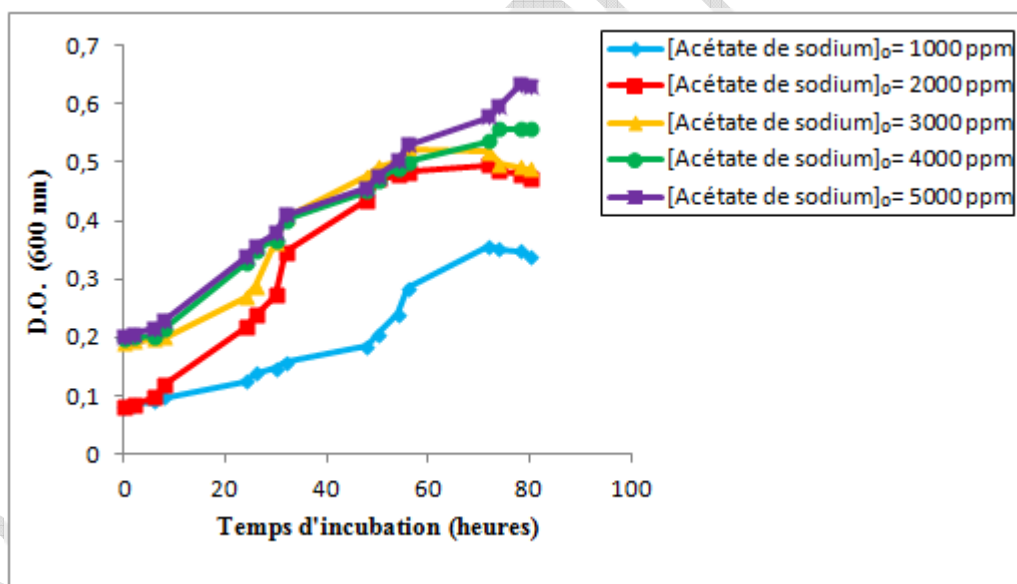


Figure 19. Influence de la concentration initiale d'acétate sur la croissance

D'après les graphiques de la figure 19, la différence entre la concentration initiale en biomasse et la concentration finale est proportionnelle à la concentration initiale d'acétate.

Pour les cinq concentrations d'acétate de sodium testées, les phases de latence étaient très courtes, elles varient de 6 à 8 h. Ce résultat démontre une adaptation plus au moins rapide du microbiote à la source de carbone utilisée (Mino *et al.*, 1998 ; Randall *et al.*, 1997).

On observe aussi que la concentration microbienne augmente à partir de la huitième heure pour entamer la phase exponentielle, mais avec des taux de croissance différents.

Pour des concentrations en acétate de 1000 ppm, 2000 ppm, et 3000 ppm la croissance microbienne atteint son maximum après 60 heures d'incubation avec des densités optiques de 0.34, 0.49, et 0.51 respectivement. Alors que pour des concentrations 4000 ppm et 5000 ppm, la concentration microbienne atteint sa valeur maximale après 80 heures d'incubation, avec une densité optique de 0.55 pour la première concentration, et de 0.59 pour la deuxième.

De se fait, l'augmentation de la concentration d'acétate pourrait entrainer celle de la biomasse (Zafiri *et al.*, 1999).

la durée des phases exponentielles des différentes cultures s'est avérée proportionnelle à la concentration initiale en acétate, et dure environs 48 h, 62 h, 64 h, 66 h, et 74 h pour des concentrations respectives en acétate de sodium de 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, et 5000 ppm.

2.1.2. Suivi de la concentration en phosphate

Les résultats obtenus suite à l'étude de l'influence des différentes concentrations d'acétate sur l'élimination biologique du phosphate sont représentés sur la figure 20.

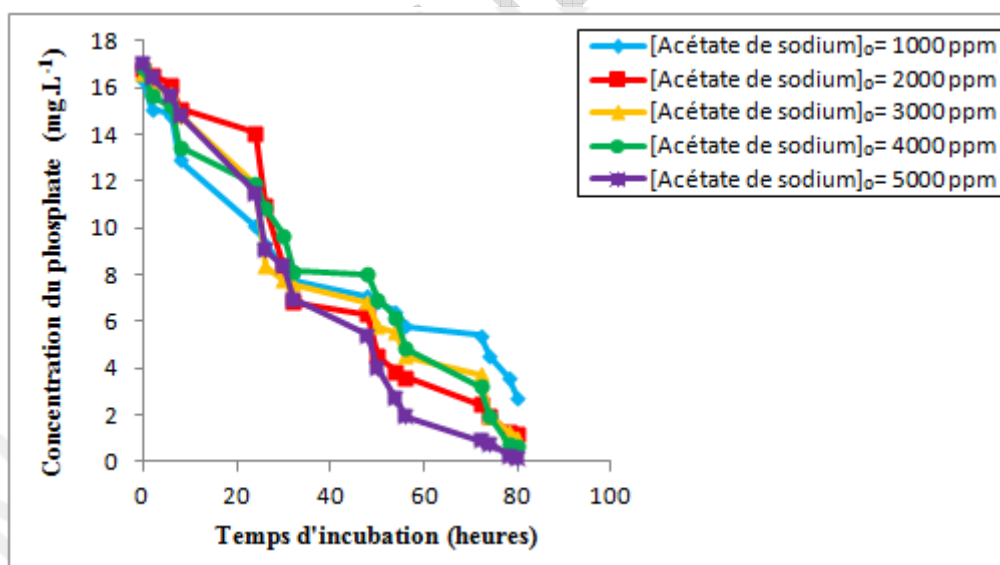


Figure 20. Influence de la concentration initiale d'acétate sur la réduction des phosphates.

Les cultures testées dans cette étude montrent un potentiel d'élimination de phosphate qui varie selon les concentrations d'acétate utilisées.

Au début de l'expérience, le microbiote impliqué dans le processus d'accumulation du phosphate exprime une phase de latence plus au moins courte, durant laquelle le taux d'élimination du phosphate est relativement faible pour toutes les concentrations d'acétate. Cela s'explique par une période d'adaptation du consortium microbien au milieu de culture.

Durant cette phase, le taux du phosphate assimilé est de 20.90 %, 9.95 %, 11.16 %, 20.13 %, 13.03 % respectivement pour des concentrations de 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, et 5000 ppm d'acétate de sodium.

A partir de 20 heures, la concentration microbienne commence à augmenter d'une façon significative, et s'accompagne d'une accumulation de phosphate débutant d'une façon relativement rapide. Cette période d'accumulation semble correspondre à la phase exponentielle de la croissance microbienne. Les taux de déphosphatation ainsi que les concentrations du phosphate après traitement sont regroupés dans le tableau III.

Tableau III. Taux de déphosphatation obtenus avec différentes concentration d'acétate de sodium

Concentration en Acétate de sodium	Concentration du phosphate après traitement (mg.L ⁻¹)	Taux de déphosphatation (%)
1000 ppm	2.71	83.38
2000 ppm	1.16	93.08
3000 ppm	1.03	93.80
4000 ppm	0.64	96.19
5000 ppm	0.13	99.23

D'après ces résultats on constate que le taux d'élimination du phosphate est proportionnel à la concentration initiale en source de carbone. Ces résultats confirment les travaux obtenus par [Rustrian et al., \(1997\)](#).

Une concentration de 5000 ppm d'acétate de sodium a donné le meilleur rendement de déphosphatation qui atteint 99.23 %, avec une vitesse moyenne d'accumulation de 0.19 mg.L⁻¹.h⁻¹, ce qui a permis une élimination presque totale du phosphate.

Pour des concentrations de 4000 et 5000 ppm, nous avons obtenus des concentrations finales en phosphate de 0.64 mg.L⁻¹ et 0.13 mg.L⁻¹ respectivement. Ces concentrations sont nettement inférieures à la concentration considérée comme polluante qui est de l'ordre de 1 mg.L⁻¹ ([Rodier et al., 2009](#)).

D'après ces résultats, nous pouvons dire que la concentration initiale en source de carbone influence significativement la concentration du phosphate après traitement et par conséquent la concentration du phosphate éliminé ([Rustrian et al., 1997](#)).

En effet pour des concentrations en acétate de sodium de 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, et 5000 ppm, la concentration de phosphate éliminé était respectivement de 13.60 mg.L^{-1} , 15.59 mg.L^{-1} , 16.20 mg.L^{-1} , 16.61 mg.L^{-1} , et 16.90 mg.L^{-1} .

Des résultats similaires en été rapportés par Cloete et Bosch (1994), qui ont prouvé qu'une concentration de 200 ppm d'acétate aboutit à une concentration de phosphate éliminé de 9 mg.L^{-1} , alors qu'une concentration de 5000 ppm donne le meilleur rendement avec une concentration beaucoup plus d'importante de l'ordre de 20 mg.L^{-1} .

2.1.3. Suivi du pH

Tout au long de la réaction d'élimination du phosphate par une culture mixte et en utilisant différentes concentrations de source de carbone, nous avons suivi la variation du pH. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 21.

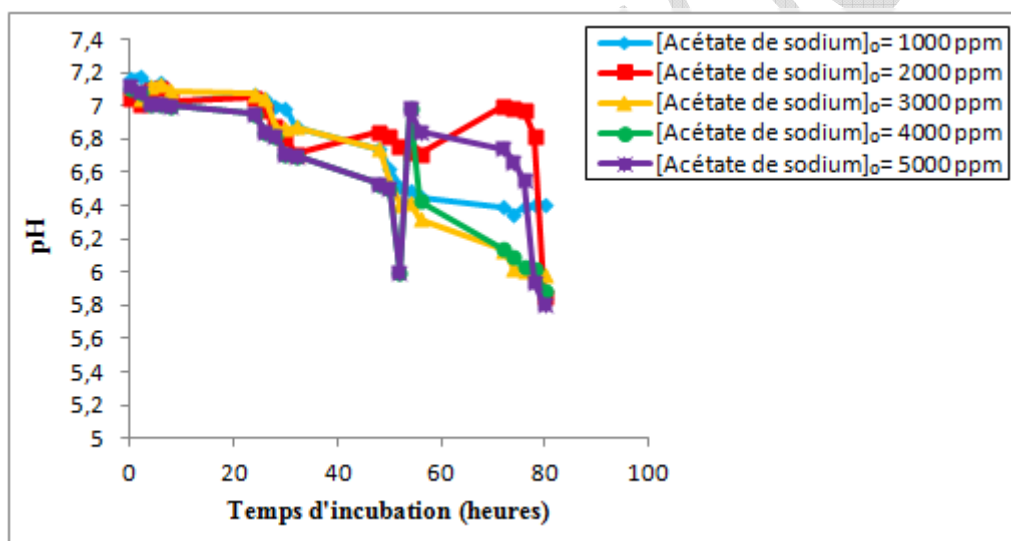


Figure 21. Influence de la concentration initiale d'acétate sur le pH.

Lors du suivi des cinétiques d'élimination du phosphate, nous avons constaté une baisse du pH dans nos réacteurs pour toutes les concentrations en acétate testées. Cette diminution varie entre 7.12 et 5.89 durant les 80 heures d'incubation.

D'après les graphiques représentés sur la figure 21, le pH diminue en fonction de la concentration initiale en acétate de sodium.

En effet, le plus bas pH obtenu est de 5.89, correspondant à la plus grande concentration d'acétate étudié qui est de 5000 ppm. Alors qu'avec une concentration de 1000 ppm, le pH est de l'ordre de 6.41.

2.2. Influence de la concentration initiale du phosphate

Plusieurs expériences ont été menées afin d'évaluer dans nos conditions opératoires l'influence de la concentration initiale du phosphate sur le phénomène de la déphosphatation biologique en utilisant 5 g.L^{-1} d'acétate de sodium comme source de carbone.

Nous avons ainsi mesuré, en concomitance la concentration du phosphate, le pH et la croissance en fonction du temps. Les expériences sont réalisées avec des concentrations initiales en P-PO_4^{-3} de 0 mg.L^{-1} , 5 mg.L^{-1} , 10 mg.L^{-1} , 30 mg.L^{-1} et 50 mg.L^{-1} . Les autres paramètres étant fixes. Les différents fermenteurs sont ensuite incubés dans un bain marie agitateur à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en alternance d'une phase anaérobie (2h) puis aérobie (4h). Les résultats obtenus sont représentés sur les figures ci-dessous.

2.2.1. Suivi de la biomasse

Afin de mieux comprendre le phénomène d'élimination biologique du phosphate, nous avons suivis l'évolution de la cinétique de croissance des cultures mixtes sur un milieu de culture minimum avec différentes concentrations de KH_2PO_4 comme source unique de phosphate en mesurant la densité optique (D.O.) des différents échantillons prélevés à partir des fermenteurs au fur et à mesure de l'élimination biologique du phosphate en fonction du temps. Ce qui a permis de tracer les courbes représentées par la figure 22.

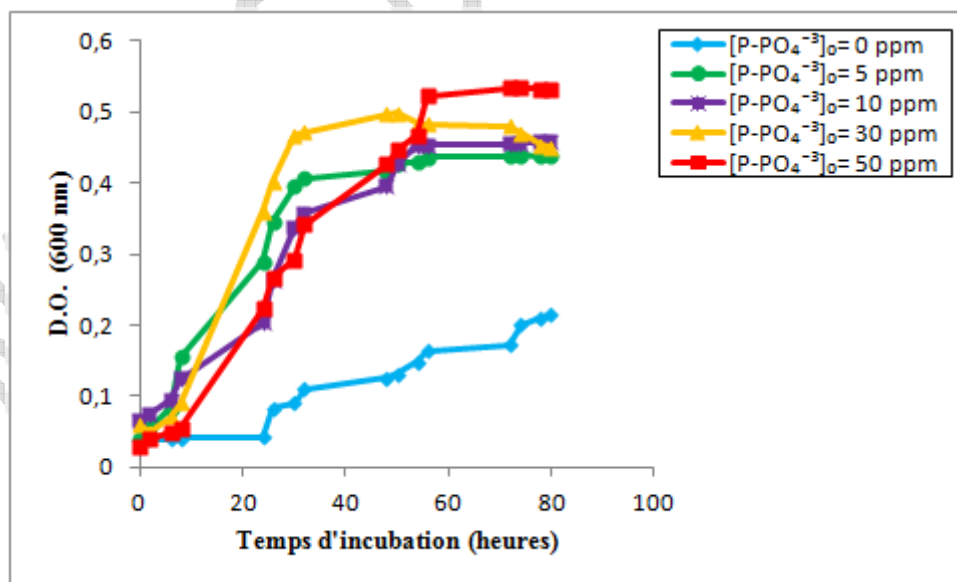


Figure 22. Influence de la concentration initiale du phosphate sur la croissance.

Pour la concentration de 0 ppm de P-PO_4^{-3} , la courbe de croissance n'a pas évolué. Sachant que le phosphore est indispensable au développement et à la croissance des microorganismes, donc son absence dans le milieu de culture s'est traduite par une croissance microbienne

faible, d'une densité optique maximale de l'ordre de 0.21. De ces résultats on peut suggérer que l'absence de phosphate inhibe la croissance bactérienne, même en présence de quantité suffisante de carbone organique et des autres éléments nutritionnels apportés par le milieu de culture (Sathasivan *et al.*, 1997).

D'après les quatre autres courbes, la phase de latence est presque inexistante (entre 2 et 4 heures), mais la concentration microbienne commence à augmenter d'une façon significative, à partir de la dixième heure avec des taux de croissance différents.

La durée des phases exponentielles des différentes cultures s'est avérée être proportionnelle à la concentration initiale en phosphate, elles durent environs 48 h, 54 h, 57 h, et 60 h pour des concentrations respectives en phosphate de 5 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm.

Pour des concentrations en phosphate de 50 ppm, et 30 ppm, la croissance microbienne atteint son maximum après 60 h d'incubation avec des densités optiques de 0.53, et 0.49 respectivement. Alors que pour des concentrations de 5 ppm et 10 ppm, la concentration microbienne atteint sa valeur maximale après 56 h d'incubation, avec une densité optique de 0.43 pour la première concentration et de 0.45 pour la seconde.

De ces résultats, on constate que la concentration initiale en phosphate est proportionnelle à la croissance microbienne (Miettinen *et al.*, 1997).

Durant la phase exponentielle des quatre courbes de 5 ppm, 10 ppm, 30 ppm, et 50 ppm la concentration en phosphate suffit aux besoins métaboliques de la communauté microbienne ainsi que son stockage. Au delà de 60 h, le niveau de la croissance microbienne stagne, ceci s'explique par un épuisement de la source en carbone. Cette croissance linéaire entre 60 h et 80 h correspond à la phase stationnaire

2.2.2. Suivi de la concentration en phosphate

Les résultats de la variation des cinétiques de la concentration en phosphate en fonction du temps en utilisant différentes concentrations de $P-PO_4^{-3}$ sont représentés sur la figure 23.

A partir des courbes ci-dessus on constate que la concentration en phosphate diminue mais avec des taux différents.

Pour la courbe représentant 0 ppm de $P-PO_4^{-3}$, on observe une légère présence de phosphate avec une concentration de 1.72 mg.L^{-1} qui disparaît au cours du temps. Cela peut s'expliquer par le relargage des polyphosphates préalablement accumulés par le consortium microbien. Cette concentration sera par la suite rapidement utilisée par le microbiote pour

subvenir à ses besoins métaboliques ce qui induit une diminution presque totale du phosphate dans le milieu avec une concentration finale de 0.05 mg.L^{-1} au bout de 80 h de traitement.

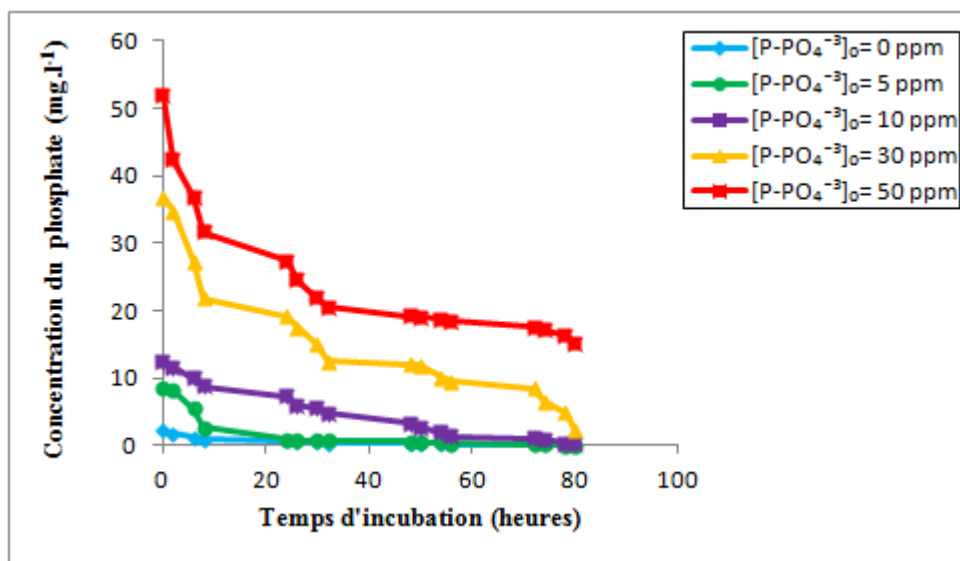


Figure 23. Influence de la concentration initiale du phosphate sur la cinétique de déphosphatation.

D'après les résultats obtenus on constate que le taux de déphosphatation est inversement proportionnel à la concentration initiale en phosphate.

En effet, une concentration initiale de 5 ppm de P-PO_4^{-3} donne un meilleur rendement de déphosphatation qui atteint un taux de 99.68 %, avec une vitesse moyenne d'accumulation de $0.10 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, permettant ainsi une élimination presque totale du phosphate avec une concentration final de 0.027 mg.L^{-1} .

Pour des concentrations initiales de 10 et 30 ppm de P-PO_4^{-3} , on obtient un taux de déphosphatation de 98.87 % et 93.91 % respectivement, avec des vitesses moyennes d'élimination du phosphate de $0.15 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, pour une concentration de 10 ppm et $0.43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour 30 ppm. Après traitement les concentrations en phosphate finales étaient de 0.14 mg.L^{-1} pour la première concentration, et 2.24 mg.L^{-1} pour la seconde.

Une concentration de 50 ppm P-PO_4^{-3} donne le plus faible taux de déphosphatation par rapport aux autres concentrations testées qui est de l'ordre de 71.09 % avec une vitesse d'accumulation de $0.46 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Ce qui s'explique par le fait qu'avec cette concentration le consortium arrive à la phase stationnaire avant d'avoir éliminé la totalité du phosphate par manque de temps et de nutriments (sources de carbone). C'est la raison pour laquelle, la concentration de phosphate restante est de l'ordre de 14.98 mg.L^{-1} .

A partir de ces résultats et dans ces conditions expérimentales on peut conclure que la concentration initiale en phosphate influence significativement le taux de déphosphatation.

2.2.3. Suivi du pH

Le suivi du pH au cours de cette expérience nous a permis de tracer les courbes représentées par la figure 24.

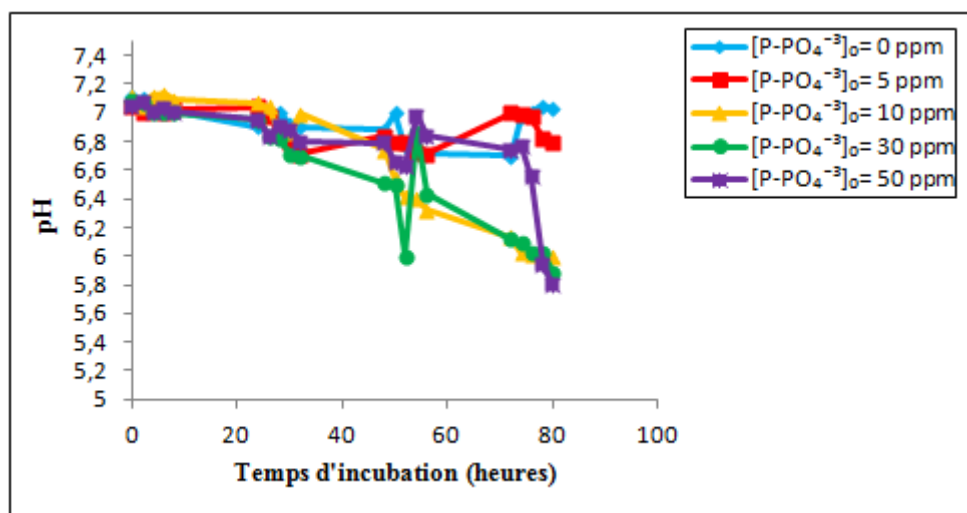


Figure 24. Influence de la concentration initiale du phosphate sur le pH.

Lors du suivi des cinétiques d'élimination du phosphate, une diminution du pH est constatée dans nos réacteurs pour toutes les concentrations en acétate testées, qui varient entre 7.11 et 5.80 durant les 80 heures d'incubation.

D'après les graphiques représentés sur la figure 24, le pH diminue en fonction de la concentration en phosphate.

En effet, le plus bas pH obtenu est de 5.80, correspondant à la plus grande concentration de phosphate étudiée qui est de 50 ppm, alors qu'avec une concentration de 5 ppm, le pH est de l'ordre de 7.09.

Les valeurs finales de pH obtenues pour des concentrations en P-PO₄⁻³ de 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 30 ppm et 50 ppm sont respectivement de 7.09, 6.98, 5.99, 5.91, 5.89.

D'après ces résultats, on constate qu'en utilisant une concentration de 0 ppm la valeur de pH n'a presque pas évolué (pH= 7.09), puisqu'au début de l'expérience le pH du milieu de culture était ajusté à 7.00. Cela peut être dû au fait qu'en absence totale de phosphate, la croissance microbienne n'a pas évolué et par conséquent, il y'a eu absence des réactions métaboliques influençant la valeur du pH dans les réacteurs.

2.3. Influence de différentes sources de carbone sur la déphosphatation biologique

Nous avons entrepris de vérifier le niveau de la déphosphatation biologique, ainsi que la croissance microbienne par une culture mixte de boue activée dans des fermenteurs en batch contenant un milieu de culture minimum (Tableau I), en présence de différentes sources de carbone. Dans ce cadre, différentes cultures ont été menées en présence du glucose, lactose, et du lactate à une concentration de 5 g.L^{-1} .

Les fermenteurs sont ensuite incubés dans un bain marie agitateur à $30 \text{ }^\circ\text{C}$, en alternance d'une phase anaérobie (2h), suivie d'une phase aérobie (4h). Des prélèvements à différents intervalles de temps ont permis de suivre à la fois la croissance microbienne, ainsi que la concentration en phosphate.

2.3.1. Effet du glucose

Le suivi au cours du temps des fermenteurs contenant 5 g.L^{-1} de glucose comme source unique de carbone a permis d'obtenir des résultats représentés par la figure 25.

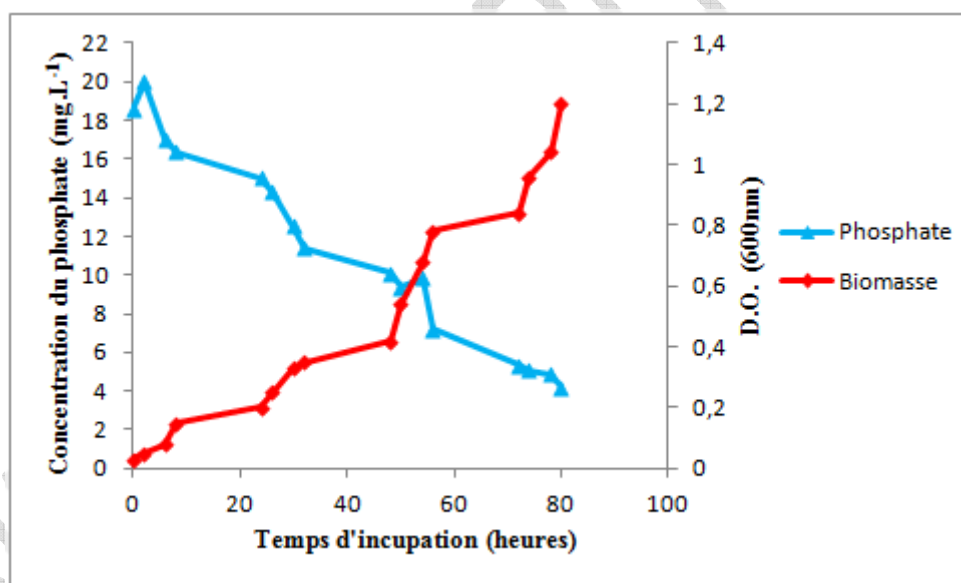


Figure 25. Influence du glucose sur l'élimination du phosphate et sur la croissance.

D'après ces résultats, les microorganismes présentent une phase de latence très courte, ceci démontre une adaptation plus au moins rapide de ces souches au glucose qui est considéré comme une source de carbone facilement assimilable (Voet et Voet, 2005). Durant cette phase, l'élimination du phosphate est moins importante ; le phosphate a atteint un taux d'accumulation de 11.15 %.

Après la phase de latence, l'élimination du phosphate démarre rapidement durant les 70 premières heures, avec une vitesse d'accumulation de $0,17 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ où on a noté une

perte moyenne de 20,62 % de la concentration initiale du substrat. Cette période d'accumulation semble correspondre à la phase exponentielle de la croissance microbienne, où les microorganismes se multiplient intensément. Ceci est confirmé par la présence de troubles microbiens dans tous les fermenteurs qui apparaissent après 7 heures d'incubation.

En effet le glucose est bien assimilé par le microbiote du fait qu'il a favorisé la croissance cellulaire avec une densité optique de 1.2. Ces résultats concordent avec le fait que ce monosaccharide facilement métabolisable est phosphorylé lors de son transport dans le cytoplasme, il devient le principal métabolite de la glycolyse ou de la voie Entner-Douderoff (ED) pour produire du pyruvate qui sera par la suite converti en acétyl-CoA via le cycle des acides tricarboxyliques (Wang *et al.*, 2002).

Dans la cellule bactérienne l'acétyl-CoA sert à remplir deux fonctions. La première est la fourniture d'une réserve de proton et d'électron par la réduction de l'acétyl-CoA en polyhydroxybutyrate (Asmlal, 1996). La deuxième est la production d'énergie par transformation d'acétyl CoA en acétate ou lactate (Asmlal, 1996 ; Jeon et Park, 2000 ; Pijuana-Vilalta, 2004 ; Wang *et al.*, 2002a ; Wang *et al.*, 2002b) (Figure 26). Ce modèle propose que les polyphosphates constituent une source de phosphore pour la formation d'ATP à partir de l'ADP (Asmlal, 1996).

Après 80h d'incubation, le taux d'accumulation atteint 71.22% avec une concentration de phosphate restant de 3.82 mg.L⁻¹. Des résultats proches aux nôtres sont rapportés par Yu *et al.*, (2004) avec un taux d'élimination de phosphate de l'ordre de 93 %.

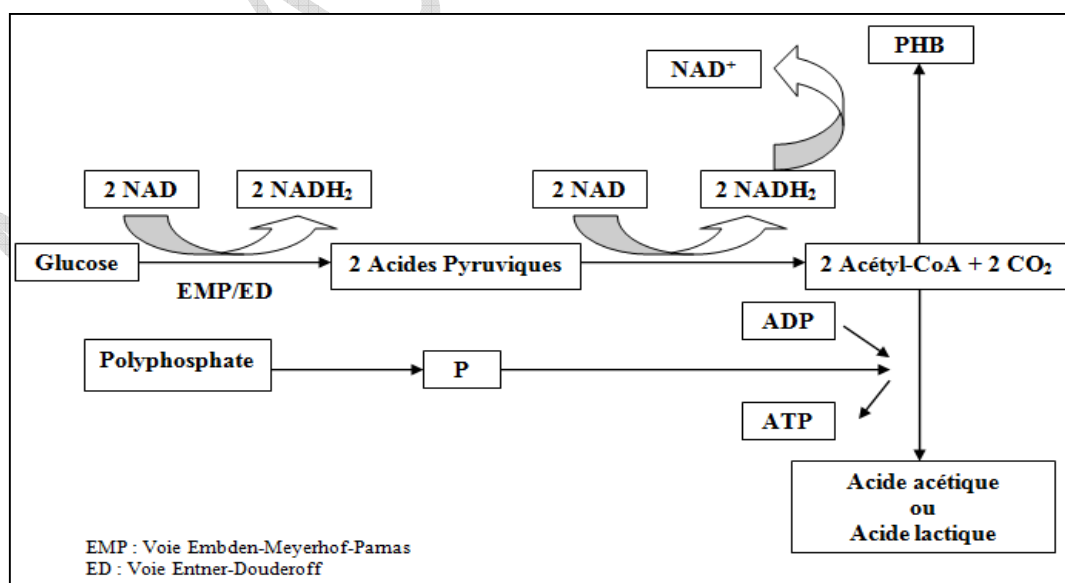


Figure 26. Cheminement biochimique du stockage des PHB avec le glucose comme source de carbone (Asmlal, 1996).

2.3.2. Effet du lactose

Le suivi de l'élimination du phosphate, ainsi que la croissance bactérienne en présence de 5 g.L^{-1} de lactose sont représentés par la figure 27.

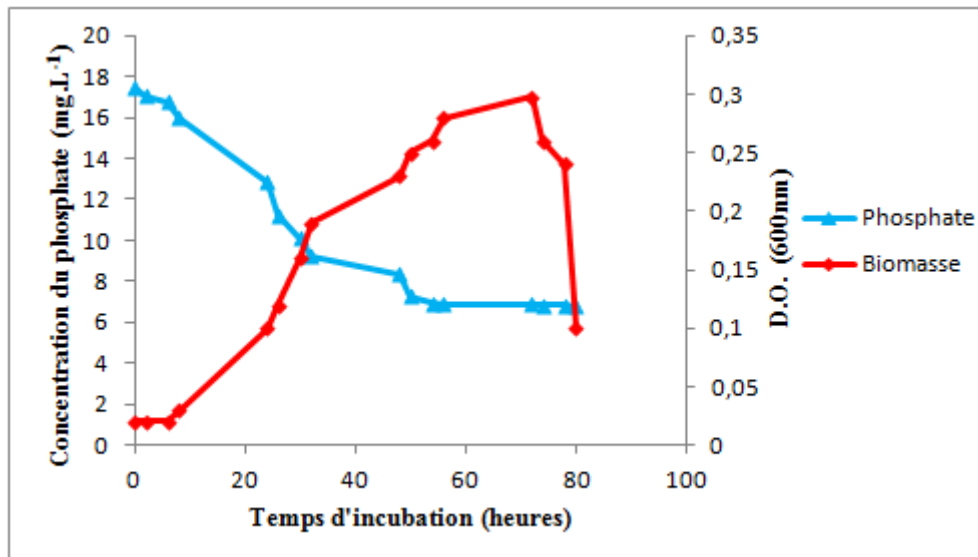


Figure 27. Influence du lactose sur l'élimination du phosphate et sur la croissance.

Pendant la phase de latence qui a duré presque 10 h, une légère diminution de la concentration du phosphate est constatée avec un taux d'accumulation de 8.36 % ; ceci correspond à une phase d'adaptation du microbiote et indique que le système enzymatique impliqué dans l'utilisation du lactose n'est pas produit d'une façon constitutive (Dale et Park, 2004).

En effet les microorganismes présents doivent assurer la pénétration du lactose à l'intérieur de leurs cellules, ainsi que son clivage en deux monosaccharides (glucose et galactose) assimilables en produisant les deux enzymes β -galactoside perméase et la β -galactosidase. Toutefois, la production de ces enzymes est inutile quand le lactose n'est pas disponible, donc cette activité enzymatique est induite par la présence du lactose dans le milieu. Ce qui explique cette phase d'acclimatation du microbiote au substrat (Cooper, 1997 ; Griffiths et al., 2002).

Après 24 h d'incubation, la croissance microbienne augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale de densité optique de 0.29. Cette augmentation correspond à la phase exponentielle, durant laquelle au delà de 60.65 % de la concentration initiale du phosphate est éliminée par le microbiote de boue avec une vitesse d'accumulation de $0.15 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A partir de 60 h, le microbiote entre en phase de latence ce qui se traduit par une diminution significative du taux de microorganismes ($\text{D.O.}=0.10$), aussi bien qu'au niveau

d'élimination du phosphate qui atteint un niveau presque constant. Le taux d'élimination du phosphate durant cette étape est de 1.44 % ce qui reflète la mort cellulaire du microbiote.

2.3.3. Effet du lactate

La cinétique de croissance microbienne, ainsi que la concentration en phosphate des fermenteurs contenant 5 g.L⁻¹ de lactate de sodium comme source unique de carbone ont été suivies et représentées sur la figure 28.

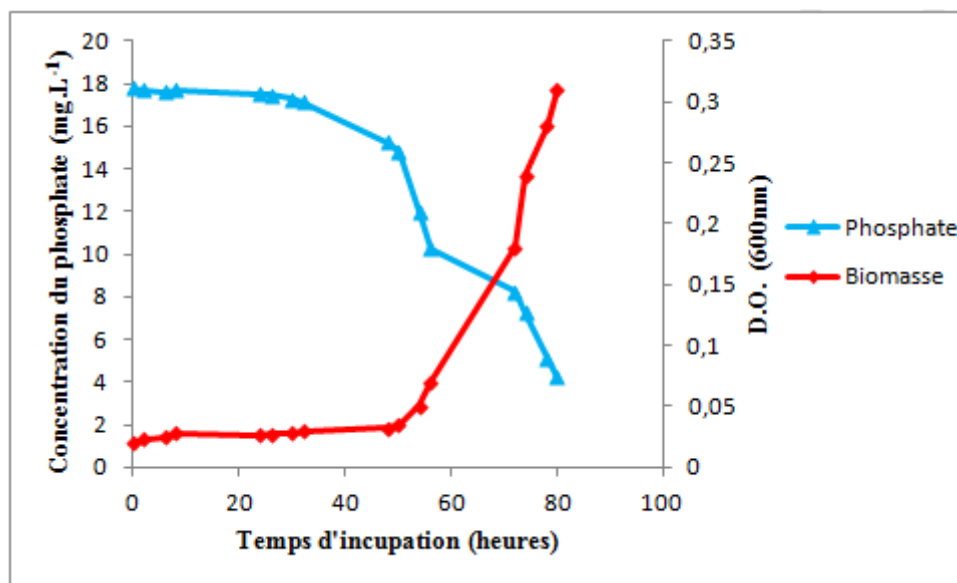


Figure 28. Influence du lactate sur l'élimination du phosphate et sur la croissance.

D'après ces courbes, nous pouvons observer que le consortium microbien en présence du lactate comme source de carbone présente une phase de latence plus au moins longue, qui dure environ 48 h. Durant laquelle le taux d'élimination du phosphate est faible 3.71 % avec une vitesse moyenne d'accumulation de 0.053 mg.L⁻¹.h⁻¹.

Cette phase correspond à une période d'adaptation du microbiote au lactate. En effet lorsque le cycle de Krebs fonctionne en sens inverse en présence de la fumarate réductase, la cellule peut prendre le lactate à partir du milieu extérieur. Après son assimilation, il sera converti en polyhydroxyalkanoate (PHA) avec une consommation de polyphosphates (Mino et Satoh, 2006).

Selon ce modèle le lactate sera transformé en pyruvate, la moitié de ce dernier sera converti en acétyl-CoA et le reste en propionyl-CoA (Figure29), ce qui maintient l'équilibre d'oxydo-réduction (Satoh et al., 1992). L'opération inverse du cycle TCA est nécessaire pour consommer le surplus d'énergie produit lors de la conversion du lactate en acétyl-CoA (Mino

Les différentes sources de carbone utilisées pour enrichir le milieu synthétique ont considérablement influencé la croissance, ainsi que l'efficacité de l'élimination du phosphate par culture mixte.

En présence d'acétate, qui a été choisi comme source de carbone principale durant la réalisation des différentes expériences, il est constaté qu'il a donné un rendement maximal d'élimination du phosphate avec un taux qui atteint 99.23 %, et une vitesse d'accumulation de $0.19 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. La croissance microbienne optimale est d'une densité optique de 0.63. À la fin de la déphosphatation, la concentration du phosphate restant est de 0.13 mg.L^{-1} .

Les quatre sources de carbone utilisées (acétate, glucose, lactose et lactate) ont permis une croissance optimale de toutes les cultures mixtes testées. La plus importante croissance est obtenue par le glucose, avec une densité optique de 1.2, suivi de l'acétate avec une densité de 0.63, alors que celle du lactose est de 0.31. Cependant le lactate a présenté une densité optique de 0.29.

Concernant le taux d'élimination du phosphate, parmi toutes les sources de carbone utilisées l'acétate a donné le meilleur rendement avec un taux de 99.23 %, suivi du lactate avec un taux de 78.51 % puis du glucose 71.22%, et enfin le lactose 61.05 %. Les résultats obtenus sont conformes aux travaux de plusieurs chercheurs (Hollender *et al.*, 2002 ; Kargi *et al.*, 2005 ; Krishnaswamy *et al.*, 2009; Krishnaswamy *et al.*, 2011).

D'après nos résultats, l'acétate et le lactate ont permis une bonne élimination du phosphate par rapport aux autres sources de carbone utilisées (glucose et lactose). Ce qui est également en conformité avec la littérature qui a démontré que les acides gras volatils à courtes chaînes comme l'acétate, le lactate, le propionate, et le butyrate sont les substrats les plus favorables à la déphosphatation biologique (Asmlal, 2006 ; Rustrian *et al.*, 1997).

Parmi toutes les sources de carbone utilisées seulement l'acétate a permis d'avoir une concentration en phosphate après traitement de 0.13 mg.L^{-1} une concentration relativement au dessous de 1 mg.L^{-1} . Ceci reflète un traitement satisfaisant vu que la concentration en phosphate est dite polluante au delà de 1 mg.L^{-1} (Rodieret *et al.*, 2009).

Pour les autres sources de carbone utilisées (lactate, glucose et lactose) les concentrations finales en phosphate obtenues sont respectivement de 3.82 mg.L^{-1} , 4.22 mg.L^{-1} et 6.8 mg.L^{-1} .

5. Analyse microbiologique

5.1. Isolement des microorganismes responsables de la déphosphatation

5.1.1. Résultats de l'étude macroscopique

L'isolement des microorganismes impliqués dans le phénomène de la déphosphatation biologique a donné huit souches bactériennes d'aspects macroscopiques différents, dont quatre d'entre elles sont pigmentées. Tous ces isolats sont capables de se développer sur un milieu minimum solide contenant l'acétate de sodium comme seule source de carbone. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV.

Tableau IV. Résultat de l'étude macroscopique des colonies isolées.

Souches	Critères							
	Diamètre	Chromogénèse	Forme	Elévation	Contour	Opacité	Surface	Consistance
SA	2mm	verte	Circulaire	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Muqueuse
SB	>1mm	Marron clair	Circulaire	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse	Muqueuse
SC	1mm	Crème	Circulaire	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse	Muqueuse
SD	1mm	Crème	Circulaire	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Muqueuse
SE	1-2mm	jaune	Circulaire	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Visqueuse
SF	1-5mm	Blanc - grisâtre	Circulaire	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse	Crémeuse
SH	1-2mm	Crème	Circulaire	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Muqueuse
SJ	1mm	jaune	Circulaire	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Muqueuse

5.1.2. Résultats de l'étude microscopique

L'observation microscopique est réalisée suivant deux étapes : observation à l'état frais et coloration de Gram qui nous ont conduits aux résultats rassemblés dans le tableau V.

L'observation microscopique à l'état frais des souches bactériennes isolées montre que 5 souches sont des bacilles, alors que 3 souches sont des coccobacilles. Parmi les 8 souches isolées, 5 d'entre elles sont mobiles, tandis que les 3 restantes sont immobiles.

L'observation microscopique après coloration de Gram révèle que toutes les souches, aussi bien les bacilles que les coccobacilles, sont de Gram négatif.

Tableau V. Résultat de l'étude microscopique des souches isolées

Souches	Etat frais	Coloration de Gram		
	Mobilité	Regroupement	Forme	Gram
SA	+	Isolées en paire	Bacille	-
SB	-	Isolées en paire, et en chaînes courtes	Bacille	-
SC	-	Isolées en paire, et en courtes chaînettes	Coccobacille	-
SD	+	Isolées	Bacille	-
SE	+	Isolées, et en paire	Bacille	-
SF	+	Isolées, et en paire	Coccobacille	-
SH	-	Isolées en paire, et en chaînes courtes	Coccobacille	-
SJ	+	En chaînes courtes	Bacille	-

5.1.3. Résultats des tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont regroupés dans le tableau VI.

La souche (SA) est un bacille Gram négatif, oxydase (+), présente une mobilité polaire, aérobic stricte à métabolisme oxydatif. Elle produit un pigment diffusible sur gélose nutritive (coloration verte). Cette souche présente une réaction positive avec le King B et avec le King A, elle produit donc la pyoverdine ainsi que la pyocyanine. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de seringa s'exhale de ces cultures.

La sécrétion de ces deux pigments est caractéristique des bactéries du genre : *Pseudomonas*. Ces observations ont fortement orienté le diagnostic et l'identification de la souche vers l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ; seule capable de produire ces deux pigments, les autres *Pseudomonas* synthétisent seulement la pyoverdine (Dworkinet et al., 2006 ; Joffin et Leyral, 2005)

Pour les sept souches restantes les résultats de l'étude macroscopique, microscopique ainsi que les tests biochimiques préliminaires nous ont orientés vers l'utilisation des galeries API 20 NE destinées aux bacilles Gram négatif non entérobactéries.

Tableau VI. Résultats des tests biochimiques des différentes souches isolées.

Tests		Souches								
		SA	SB	SC	SD	SE	SF	SH	SJ	
Métabolisme énergétique	Type respiratoire	AS	AS	AS	AS	AS	AAF	AS	AS	
	Catalase	+	+	+	-	-	+	+	+	
	Oxydase	+	+	-	+	+	+	-	+	
	Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	
Métabolisme glucidique	Milieu MEVAG	OX	OX	OX	OX	OX	OX/F	OX	OX	
	Milieu TSI	Glu.	-	-	-	-	-	+	-	-
		Lac. /Sac.	-	-	-	-	-	+	-	-
		H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
		Gaz	-	-	-	-	-	+	-	-
	ONPG	-	-	-	-	-	+	-	+	
	Citrate perméase	+	-	+	+	-	+	+	-	
	Milieu Mannitol Mobilité	Mannitol	+	-	-	-	-	+	-	-
		Mobilité	+	-	-	+	+	+	-	+
		Gaz	-	-	-	-	-	+	-	-
	Milieu Clark et Lubs	VP	-	-	-	-	-	+	-	-
RM		-	-	-	-	-	+	-	-	
Métabolisme protéique	Milieu Moeller	ADH	+	-	-	-	-	-	-	
		LCD	-	-	-	-	-	+	-	
		ODC	-	-	-	-	-	-	-	
Milieu Urée Indole	Uréase	-	-	-	-	-	-	+	-	
	TDA	-	-	-	-	-	-	+	+	
	indole	-	-	-	-	-	+	-	-	
King A		+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
King B		+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

(+) : Résultat positif.
 (-) : Résultat négatif.
 ND : Non déterminé.
 AAF : Aéro-anaérobie facultatif.

Lac : Lactose.
 Sac : Saccharose.
 Glu : Glucose.

AS : Aérobie stricte.
 OX : Oxydatif.
 F : Fermentatif.

5.1.4. Résultats des Galeries API 20 NE

-La souche SA

Après l'addition des réactifs nitrite 1 et nitrite 2, on a noté l'absence d'une coloration rouge ; signe de l'absence des nitrites dans le milieu. Néanmoins, ce résultat ne signifie pas que la souche ne possède pas une nitrate réductase. En effet, l'ajout de la poudre de zinc, capable de réduire les nitrates du milieu, n'a montré aucune coloration. Cette observation signifie que la souche possède une nitrate réductase très active, capable de réduire les nitrates du milieu au-delà des nitrites, jusqu'au stade diazote, ce dernier est bien signalé par la formation des microbulles. La souche ne produit pas d'indole. Elle oxyde le glucose, le mannitol, le N-acétyl-glucosamine, le gluconate, le caprate, l'adipate, le malate et le citrate.

Les tests d'assimilation montrent qu'elle n'assimile pas l'arabinose, le mannose, le maltose, l'adipate et le phénylacétate. Une réponse positive est obtenue pour les tests de l'arginine dihydrolase, l'uréase, et l'hydrolyse de la gélatine. Par contre, une réaction négative est obtenue pour le test de l'esculinase et la β - galactosidase. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche SA comme étant : *Pseudomonas aeruginosa* (Tableau VII).

La souche (SA) est selon le résultat du King A et King B une *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanine (+) pyoverdine (+), cela a confirmé notre suggestion.

-La souche SB

La souche SB possède une nitrate réductase capable de réduire le nitrate, jusqu'au stade diazote, cela est prouvé par l'absence de coloration même après l'ajout de poudre de zinc. Elle ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Cette souche permet l'hydrolyse de la gélatine, mais elle ne possède pas une argénine dihydrolase, une uréase, une esculinase, ni une para-notrophény-galactopyranosidase. Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile seulement le malate. Le profil numérique obtenu permet d'identifier la souche SB comme étant : *Moraxella lacunata* (Tableau VII).

-La souche SC

La souche SC est oxydase négative. Le test NO_3 montre qu'elle réduit le nitrate jusqu'au stade N_2 . Elle ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Elle n'hydrolyse pas la gélatine et ne possède pas une esculinase, une PNPG-hydrolase, une uréase ni une arginine dihydrolase. Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile l'arabinose, le caprate, le malate, et le citrate seulement. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche SC comme étant : *Acinetobacter junii/johnsonii* (Tableau VII).

La croissance de cette souche sur gélose nutritive à 41 °C, a pu déterminer qu'il s'agit d'*Acinetobacter junii* ; car *Acinetobacter johnsonii* ne se développe que dans une gamme de température qui varie entre 15 °C et 30 °C (Dworkin et al., 2006).

-La souche SD

La souche SD montre qu'elle est capable de réduire le nitrate en nitrite, cela se traduit par l'apparition d'une couleur rouge après l'ajout des réactifs nitrite 1 et nitrite 2. Cette souche ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Elle n'hydrolyse pas la gélatine et ne possède pas une esculinase, une PNPG-hydrolase, une uréase ni une arginine dihydrolase. Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile le gluconate, l'adipate, le malate, le citrate et le phényl-acétate. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche SD comme étant : *Alcaligenes denitrificans* (Tableau VII).

-La souche SE

La souche SE possède une nitrate réductase très active, capable de réduire les nitrates du milieu au-delà des nitrites, jusqu'au stade diazote, elle ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Elle possède une esculinase, mais pas une uréase, ni une arginine dihydrolase, ni une PNPG-hydrolase. Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile le glucose, le mannose, le N-acétylglucosamine et le maltose. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche SE comme étant : *Sphingobacterium spiritivorum* (Tableau VII).

- La souche SF

La souche SF possède une nitrate réductase capable de réduire le nitrate en nitrite. Elle produit l'indole et fermente le glucose. Cette souche permet la dégradation de l'esculine, mais elle ne possède pas une argénine dihydrolase, ni une uréase, elle hydrolyse la gélatine, et possède une para-notrophény-galactopyranosidase. Les tests d'assimilation montrent qu'elle n'assimile pas uniquement le caprate et l'adipate. Le profil numérique obtenu permet d'identifier la souche SF comme étant *Aeromonas hydrophila/ caviae* (Tableau VII).

La capacité de cette souche a fermenté le glucose sur milieu TSI, ainsi que sur la galerie API 20NE, nous permet de suggérer qu'il s'agit de *Aeromonas hydrophila* ; Car *A. caviae* ne fermente pas le glucose (Garrity et al., 2005).

-La souche SH

La souche SH est oxydase négative. Le test NO₃ montre qu'elle réduit le nitrate en nitrite. Elle ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Elle n'hydrolyse pas la

gélatine et ne possède pas une esculinase, ni une PNPG-hydrolase, ni une arginine dihydrolase. Mais elle a une uréase. Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile le glucose, le mannose, le caprate, le malate, le citrate, et le phényl-acétate. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche SH comme étant : *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (Tableau VII).

La culture de cette souche sur gélose nutritive à 41 °C, n'a pas permis son développement, ce qui nous permet de suggérer qu'il s'agit d'*Acinetobacter calcoaceticus*; vu qu'elle croit entre 15 et 37 °C. En revanche *Acinetobacter baumannii* se développe à une température qui varie entre 15 °C et 44 °C (Dworkin et al., 2006).

-La souche SJ

La souche SJ montre qu'elle est capable de réduire le nitrate jusqu'au stade diazote, elle ne produit pas l'indole et ne fermente pas le glucose. Elle n'hydrolyse pas la gélatine et ne possède pas une uréase ni une arginine dihydrolase, mais elle est dotée d'une esculinase, et d'une PNPG-hydrolase. Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile le glucose, le N-acétylglucosamine, le maltose, le gluconate. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche SJ comme étant : *Sphingomonas paucimobilis* (Tableau VII).

Au total, il ya eu huit souches isolées à partir des différents réacteurs inoculés afin de suivre les cinétiques d'élimination du phosphate par un mélange de boues activées provenant de la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Khenchela. Ils ont été identifiés comme étant *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter junii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, et *Sphingomonas paucimobilis* en utilisant divers tests biochimiques ainsi qu'aux galeries API 20NE. Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs recherches (Cai, 2007 ; Sarioglu, 2005 ; Sidate et al., 1999 ; Srivastava et Srivastava, 2006).

La comparaison des espèces isolées avec ceux des classes bactériennes publiées dans le "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" a permis d'affecter les espèces à différentes classes comme suit :

Cinq souches de ces isolats qui sont *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, et *Aeromonas hydrophila* appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria*, tandis que *Alcaligenes denitrificans* semble appartenir à la classe des *Betaproteobacteria*, alors que *Sphingomonas paucimobilis* appartient à celle des *Alphaproteobacteria*, et finalement *Sphingobacterium spiritivorum* appartient à la classe des *Bacteroidia* (Dworkin et al., 2006 ; Garrity, 2005).

Ces résultats prouvent la richesse de la biodiversité des boues activées de la Ville de Khenchela. Ils montrent également que les *Proteobacteria* sont les plus abondants avec environ 87.5% de toutes les souches isolées. Des résultats similaires ont été rapportés par Christensson *et al.*, (1998) qui montre que les *Proteobacteria* sont les plus abondants et représentent plus de 50 % de tous les microorganismes présents, lors des analyses effectuées dans cinq différentes stations d'épuration d'eau usée.

D'après nos résultats la classe la plus importante est celle des *Gammaproteobacteria* avec cinq espèces isolées, tandis que plusieurs recherches ont montré que les *Betaproteobacteria* sont en revanche les plus fréquemment isolées (Bond *et al.*, 1999; Kawaharasaki *et al.*, 1999 ; Levantesi *et al.*, 2002 ; Mudaly *et al.*, 2000 ; Wagner *et al.*, 1994).

Tableau VII. Résultats d'identification des espèces bactériennes par galerie API 20 NE.

Test	Souches							
	SA	SB	SC	SD	SE	SF	SH	SJ
NO₃	+	+	+	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-	+	-	-
GLU	-	-	-	-	-	+	-	-
ADH	+	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	-	-	-	-	-	+	-
ESC	-	-	-	-	+	+	-	+
GEL	+	+	-	-	-	-	-	-
PNPG	-	-	-	-	-	+	-	+
GLU	+	-	-	-	+	+	+	+
ARA	-	-	+	-	-	+	-	-
MNE	-	-	-	-	+	+	+	-
MAN	+	-	-	-	-	+	-	-
NAG	+	-	-	-	+	+	-	+
MAL	-	+	-	-	+	+	-	+
GNT	+	-	-	+	-	+	-	+
CAP	+	-	+	-	-	-	+	-
ADI	-	-	-	+	-	-	-	-
MLT	+	-	+	+	-	+	+	-
CIT	+	-	+	+	-	+	+	-
PAC	-	-	-	+	-	+	+	-
OX	+	+	-	+	+	+	-	+
Profil numérique	1354575	1010204	1001051	1000467	1442304	7467747	1242053	1460704
Similitude	100%	55.3%	78.8%	82.6%	49.8%	94.1%	42%	98.3%
Identification	T.B.	T.B.	B.	T.B.	Pas B.	B.	Pas B.	B.

T.B : Très bonne,

B : Bonne,

Pas B : Pas bonne.

6. Réaction de déphosphatation par l'utilisation d'une culture pure

La présente étude est réalisée pour déterminer les capacités d'accumulation individuelles des différentes souches bactériennes isolées au fur et à mesure du suivi du processus d'élimination du phosphate.

L'objectif de cette partie d'étude est d'essayer d'établir des paramètres représentatifs de la capacité d'accumulation du phosphate par différentes cultures pures afin d'établir si oui ou non l'accumulation du phosphate est une propriété spécifique d'un groupe bactérien.

6.1. Elimination du phosphate par une culture pure d'*Acinetobacter junii*

Le suivi des fermenteurs inoculés par une culture pure d'*Acinetobacter junii* en présence de 5 g.L^{-1} d'acétate de sodium comme source unique de carbone nous a permis d'obtenir les résultats représentés sur la figure 30.

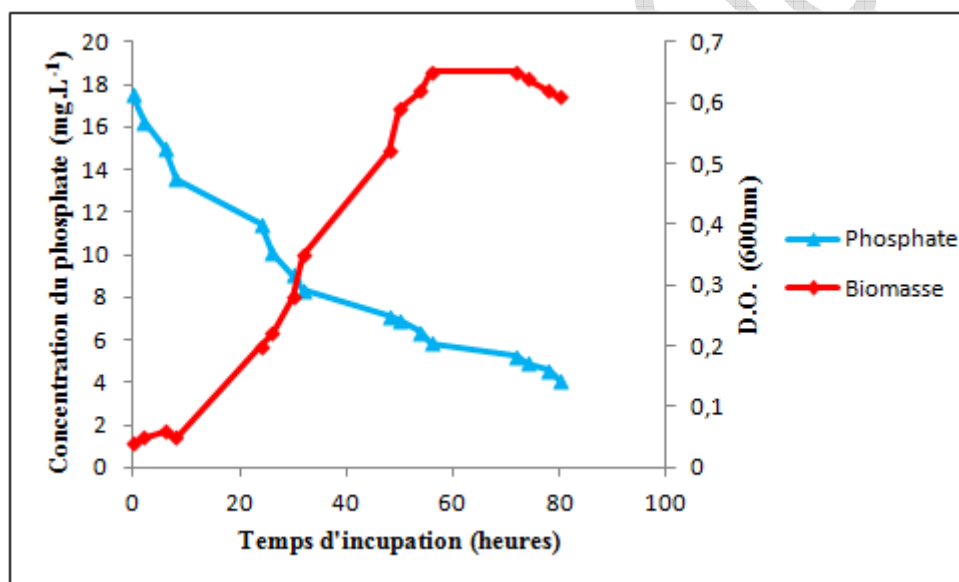


Figure 30. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure d'*Acinetobacter junii*.

L'absence de la phase de latence dans le graphique est due au fait que des pré-cultures d'*Acinetobacter junii* sont lancées préalablement afin d'adapter la souche pure à l'acétate ; donc les cellules prélevées pour l'ensemencement des réacteurs étaient au point de «microcroissance».

Les graphiques montrent que la croissance et l'accumulation du phosphate sont liées, et évoluent simultanément mais d'une façon inversement proportionnelle.

A partir des premières heures, l'élimination du phosphate démarre d'une manière rapide, avec une vitesse d'accumulation de $0,21 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, où on note une perte moyenne de 72.53 % de la concentration initiale du phosphate. Cette période d'accumulation correspond à

la phase exponentielle de la croissance microbienne. Ceci est confirmé par la présence de troubles microbiens dans tous les fermenteurs qui apparaissent après 3 heures d'incubation. Durant cette phase, la densité optique atteint sa valeur maximale de 0.65, après 50 h d'incubation.

Au-delà de 60 h, les bactéries entament la phase stationnaire durant laquelle la vitesse d'accumulation de phosphate diminue, et atteint une valeur de $0.13 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ avec un taux de déphosphatation de 58.38 %.

Le suivi de cette cinétique a permis de montrer la capacité d'*Acinetobacter junii* a accumulé le phosphate avec un taux de 76.72 %. Ceci est en conformité avec d'autres recherches qui rapportent que différentes espèces appartenant au genre *Acinetobacter* ont la capacité d'élimination du phosphate (Boswell et al., 2001 ; Ghigliazza et al., 1998 ; Kim et Pagilla, 2002 ; Rustrian et al., 1997 ; Srivastava et Srivastava, 2008).

La concentration de phosphate éliminée après traitement est de l'ordre de 13.45 mg.L^{-1} , des résultats proches aux nôtres avec des concentrations de 14 mg.L^{-1} et de 18.50 mg.L^{-1} sont rapportés par Cloete et Bosch (1994) et Momba et Cloete (1994) respectivement.

Cloete et Bosch (1994), ont travaillé aussi dans les mêmes conditions, mais avec d'autres souches appartenant au même genre ; *Acinetobacter Iwoffii*, et *Acinetobacter johnsonii*. Ils rapportent une concentration en phosphate éliminée de l'ordre de 16 mg.L^{-1} et 20 mg.L^{-1} respectivement. Des résultats proches au notre en utilisant la souche *Acinetobater junii*.

6.2. Elimination du phosphate par une culture pure de *Pseudomonas aeruginosa*

La cinétique de croissance bactérienne, ainsi que la concentration en phosphate des fermenteurs inoculés par une culture pure de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de 5 g.L^{-1} d'acétate de sodium comme seule source de carbone ont été suivies et représentées sur la figure 31.

Selon les graphiques, *Pseudomonas aeruginosa* n'a pas présenté une phase de latence, ceci peut être expliqué par le fait que l'inoculum bactérien utilisé pour inoculer les différents réacteurs a été pré-enrichit préalablement dans le même milieu de culture utilisé pour les fermenteurs en batch, ce qui a éliminé la phase de latence (Gobsi, 2007).

Durant la phase exponentielle, le niveau d'élimination du phosphate est relativement important, il atteint un taux de 60.02 % avec une vitesse moyenne d'accumulation de $0.23 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cette forte élimination de phosphate s'accompagne d'une croissance microbienne

qui atteint une densité optique maximale de 0.14. Ces résultats montrent que la souche *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'accumuler le phosphate (Lacoste et al., 1981).

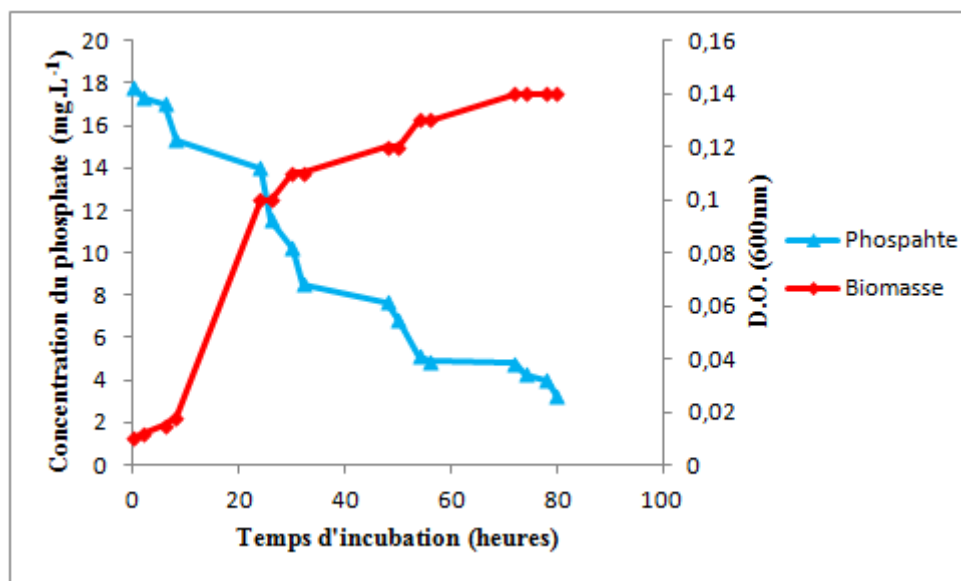


Figure 31. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure de *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir de 72 h, le consortium bactérien entre en phase stationnaire, durant laquelle le taux d'accumulation de phosphate a significativement diminué pour atteindre une valeur de 31.34 %, avec une vitesse de $0.18 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Selon ces résultats on remarque que l'élimination du phosphate a cessé d'évoluer du fait que durant cette phase le nombre total de bactéries viables reste constant ; résultant d'un équilibre entre division et mort cellulaire. Cela est confirmé par une densité optique constante de 0.14 tout au long de cette phase qui a duré environs 8 heures.

Durant les quatre-vingt heures d'incubation, le taux d'élimination du phosphate est de 61.78 %, un taux moins important de l'ordre de 25 % est rapporté par une autre recherche qui a étudié la même souche en utilisant 1 g.L^{-1} d'acétate de sodium (Sarioglu, 2005). Alors qu'en étudiant une autre souche qui est *Pseudomonas putida* Mubyana-John et Letsamao, (2007) ont trouvé un taux de déphosphatation de 34 %.

Le suivi de la cinétique de déphosphatation par *Pseudomonas aeruginosa* montre que la concentration en phosphate éliminée après traitement est de 12.59 mg.L^{-1} . Un résultat proche est obtenu par Sidat et al., (1999), après l'étude d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* avec une concentration de 20.60 mg.L^{-1} , en revanche avec la même souche Momba et Cloete (1996) ont eu une concentration de phosphate éliminée de l'ordre de 28.50 mg.L^{-1} .

6.3. Elimination du phosphate par une culture pure de *Moraxella lacunata*

Le suivi des fermenteurs inoculés par une culture pure de *Moraxella lacunata* en présence de 5 g.L⁻¹ d'acétate de sodium comme source unique de carbone, nous a permis de tracer la courbe de la cinétique de croissance bactérienne, ainsi que la concentration en phosphate. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 32.

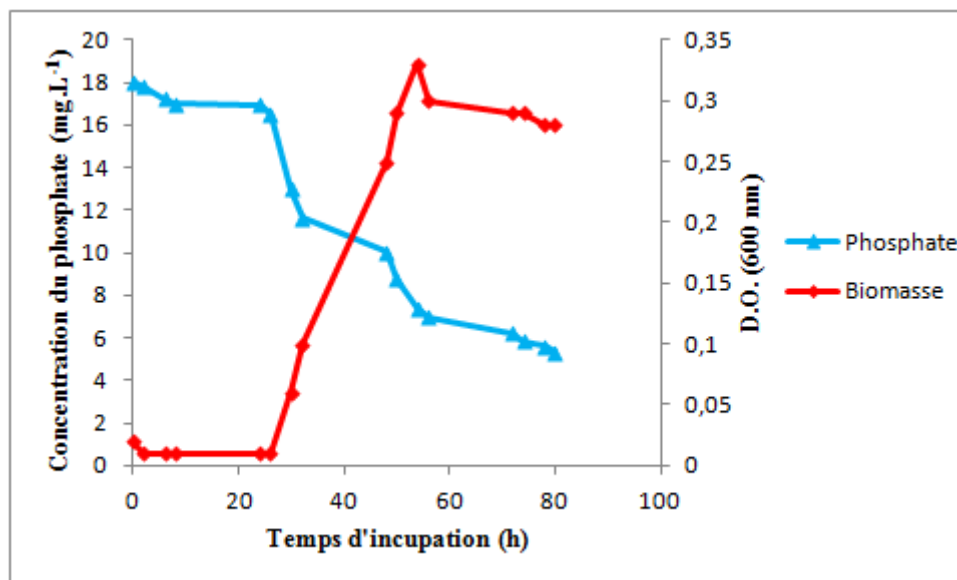


Figure 32. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure de *Moraxella lacunata*.

D'après le graphique on constate que la souche *Moraxella lacunata* présente une phase de latence plus au moins importante d'environ 26 heures durant laquelle la densité optique varie de 0.02 jusqu'à 0.04, alors qu'elle a subi un pré-enrichissement pendant 24h. Cela peut être dû au fait que plusieurs espèces appartenant au genre *Moraxella* ont des exigences complexes aux facteurs de croissance (Dworkin et al., 2006).

Généralement elles sont isolées sur des milieux spécifiques enrichis en sang (gélose au sang, gélose chocolat, gélose au sang cuit, gélose chocolat poly-vitaminée) pour favoriser leurs croissances (Greenwood, 2007). Cependant certaines espèces poussent facilement sur un milieu simple contenant une seule source de carbone organique et d'énergie (Dworkin et al., 2006).

Selon Garrity et al., (2005) deux sous-espèces de *Moraxella lacunata* ont été reconnues :

- *Moraxella lacunata* subsp. *Lacunata*,
- *Moraxella lacunata* subsp. *Liquefaciens*.

Les différentes exigences nutritionnelles et différents profils d'acides gras cellulaires, ainsi que la variation des loci enzymatiques de la sous-espèce, suggèrent que ces deux bactéries normalement occupent des niches écologiques différentes.

M. lacunata subsp. lacunata peut normalement croître sur un milieu bien enrichi avec des éléments nutritifs qu'elle avait la capacité de synthétiser, mais au cours des éons, elle a évolué et a perdu considérablement sa capacité de biosynthèse. En revanche, *M. lacunata subsp. liquefaciens* peut croître sur un milieu déficient en certains nutriments, et elle a évolué en synthétisant des facteurs de croissance non fournis par le milieu, Cela explique sa capacité de biosynthèse relativement importante (Garrity et al., 2005).

Ceci nous laisse penser que notre souche isolée est probablement *M. lacunata subsp. Liquefaciens*, vu que cette souche a eu la capacité de croître sur notre milieu de culture minimum, après une phase de latence de 26 h, au cours de laquelle elle a pu synthétiser tous l'arsenal enzymatique indispensable pour la synthèse des facteurs de croissances dont elle avait besoin pour son développement. Cependant la confirmation de notre hypothèse sera obtenue par l'identification phylogénique de notre souche par l'emploi des outils de génie génétique.

Durant la phase de latence, l'espèce présente un taux de déphosphatation de 8.32 % avec une vitesse d'accumulation de phosphate de $0.06 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Au delà de 30 h d'incubation, la croissance bactérienne débute d'une manière significativement rapide, et atteint une densité optique maximale de 0.33 après 54 h. elle s'accompagne d'un taux d'élimination de phosphate de 46.4% avec une vitesse moyenne de l'ordre de $0.23 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cette phase a duré environs 26 h.

A partir de 72 h, la culture bactérienne entame la phase stationnaire, où la croissance devient linéaire ; la densité optique varie de 0.29 à 0.28. Durant cette phase le taux de déphosphatation diminue, il est d'une valeur de 14.30 % avec une vitesse de $0.11 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Après traitement la concentration en phosphate restant est de l'ordre de 5.33 mg.L^{-1} .

Le suivi de cette cinétique montre que *Moraxella lacunata* est capable d'accumuler le phosphate avec un taux de 50.6 %. Ceci est en conformité avec d'autres recherches qui rapportent que différentes espèces appartenant au genre *Moraxella* ont la possibilité d'élimination de phosphate (Bao et al., 2007 ; Bitton, 2005 ; Merzouki et al., 1999).

A la fin tu traitement, la concentration en phosphate éliminée est de 12.69 mg.L^{-1} , un résultat proche à celui-ci est observé avec l'étude de Sidat et al., (1999) qui montre des

concentrations de phosphate éliminée de l'ordre de 15.8 mg.L^{-1} et de 7.1 mg.L^{-1} par deux espèces qui sont *Moraxella phenylpyruvica* et *Moraxella* spp. respectivement.

6.4. Elimination du phosphate par une culture pure d'*Alcaligenes denitrificans*

Le suivi des fermenteurs inoculés par une culture pure d'*Alcaligenes denitrificans* en présence de 5 g.L^{-1} d'acétate de sodium comme source unique de carbone nous a permis d'obtenir des résultats représentés dans la figure 33.

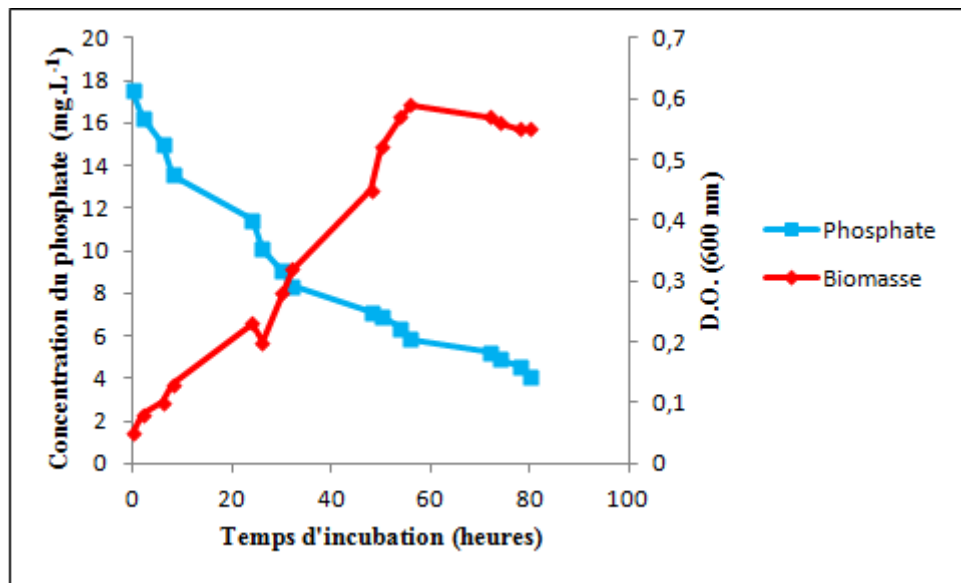


Figure 33. Suivi de la concentration en phosphate et de la croissance bactérienne avec une culture pure d'*Alcaligenes denitrificans*.

A partir des résultats des graphes de la figure 33, on constate que la souche *Alcaligenes denitrificans* n'a pas présenté une phase de latence, vue le pré-enrichissement qu'elle a subi 24 h auparavant, ce qui lui a permis une adaptation adéquate au milieu de culture.

Au cours des vingt premières heures, la concentration de phosphate éliminé est de l'ordre de 6.08 mg.L^{-1} . Ce résultat est en accord avec la recherche réalisée par [Bao et al., \(2007\)](#) qui rapporte une concentration de 6.43 mg.L^{-1}

La croissance bactérienne débute avec une densité optique de 0.05 pour atteindre sa valeur maximale de 0.59 au bout de 60 heures d'incubation. Cette période correspond à la phase exponentielle de la croissance microbienne où les bactéries se multiplient intensément. Elle s'accompagne également d'une élimination relativement rapide et importante du phosphate qui atteint un taux de déphosphatation de 66.68 % avec une vitesse moyenne d'accumulation de $0.20 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Après 72 heures d'incubation, la culture bactérienne se stabilise à des densités optiques qui varient entre 0.57 et 0.55, ce qui indique le début de la phase stationnaire, durant laquelle le taux d'élimination diminue pour atteindre une valeur de 30.13 %.

Le suivi de cette cinétique indique que le taux d'élimination de phosphate est de 70.42 %. Alors que la concentration en phosphate éliminée après traitement est de l'ordre de 13.45 mg.L⁻¹. Ce qui confirme les résultats de [Sidat et al., \(1999\)](#) qui était de 13.80 mg.L⁻¹.

Le suivi des cultures des souches pures telles que *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, et *Alcaligenes denitrificans* montre que ces bactéries étaient capables de l'accumulation du phosphate sous forme de polyphosphates stockés dans des granules métachromatiques situées dans leurs cytoplasmes (Annexe 6). Ces inclusions ont été mises en évidence par la coloration de Neisser (expliqué précédemment). Ces résultats confirment ceux des recherches précédentes ([Bao et al., 2007](#) ; [Mubyana-John et Letsamao, 2007](#) ; [Pauli et Kaitala, 1997](#) ; [Sarioglu, 2005](#) ; [Seviour et al., 2003](#)).

Les quatre espèces bactériennes testées pour leurs capacités d'accumulation du phosphate (*Acinetobacter junii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, et *Alcaligenes denitrificans*) ont permis une bonne croissance dans le milieu de culture minimum utilisé, mais avec des taux de croissances différents. La plus importante croissance est obtenue avec *Acinetobacter junii* représentée par une densité optique de 0.65, suivi d'*Alcaligenes denitrificans* avec une densité de 0.59, puis *Moraxella lacunata* avec une densité de 0.33, cependant celle de *Pseudomonas aeruginosa* était de 0.14.

Acinetobacter junii, *Pseudomonas aeruginosa* et *Alcaligenes denitrificans* n'ont pas présenté une phase de latence du fait du pré-enrichissement qu'elles ont subi avant d'être inoculées dans les réacteurs en batch. Ceci confirme leurs adaptations rapides au milieu de culture, indiquant que ce sont des bactéries non exigeantes. Alors que pour *Moraxella lacunata* on remarque qu'elle a présenté une phase de latence importante de 26 h, une durée nécessaire pour son accoutumance à son nouvel environnement et pour la synthèse enzymatique, vu que c'est une bactérie exigeante ([Dworkin et al., 2006](#) ; [Garrity et al., 2005](#)).

Durant la croissance des trois bactéries pendant la phase exponentielle, Les concentrations en phosphate dans le milieu de culture évolue en parallèle avec la croissance bactérienne (Figures 30, 31, et 32).

Il apparaît clairement, comme reporté par [Florentz et Hartemann \(1984\)](#) et [Morohoshi et al., \(2003\)](#) que la plus grande consommation de phosphate a eu lieu pendant la phase

exponentielle de la croissance des différentes espèces étudiées. Alors que pour la phase stationnaire les trois espèces ont continué d'accumuler le phosphate mais avec un taux moins important. Les différents taux d'élimination de phosphate pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire par les souches pures testées sont représentés sur le tableau VIII.

Tableau VIII. Taux de déphosphatation pendant la phase exponentielle et stationnaire de la culture de quatre souches pures.

Espèces étudiées	Taux de déphosphatation en phase exponentielle	Taux de déphosphatation en phase stationnaire
	%	%
<i>Acinetobater junii</i>	72.53	48.38
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	66.68	30.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60.02	31.34
<i>Moraxella lacunata</i>	46.4	14.03

D'après les résultats du tableau VIII, ces valeurs peuvent être expliquées par le fait que pendant la phase exponentielle la croissance bactérienne est maximale ce qui permet de stocker une bonne quantité de phosphate. Alors que lors de la phase stationnaire, la croissance s'arrête et le nombre de bactéries viables reste constant. Ceci résulte d'un équilibre entre division et mort cellulaire et par conséquent une diminution des taux d'élimination de phosphate (Barton, 2004 ; Cohen, 2011).

Pour toutes les espèces bactériennes testées, *Acinetobater junii* a donné le meilleur rendement avec un taux de 76.72 %, suivi d'*Alcaligenes denitrificans* avec 70.42 % puis de *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de 61.78 %, alors que *Moraxella lacunata* a présenté un taux de 50.6 %. Des résultats similaires aux nôtres, démontrant une décroissance du taux de déphosphatation successivement chez *Acinetobater junii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Moraxella lacunata*, ont été rapportés par plusieurs travaux (Sidate et al., 1999 ; Zafiri et al., 1999).

*Conclusion générale et
perspectives*

Conclusion générale et perspectives

La présente étude entre dans le cadre d'un projet PNR qui porte sur l'élaboration de nouveaux capteurs appliqués au contrôle et à l'analyse des polluants chimiques de l'eau.

L'objectif essentiel de notre travail est axé sur l'étude de la déphosphatation biologique par le microbiote total des boues activées, ainsi que l'isolement et l'identification des microorganismes dominants, responsables de cette biodéphosphatation. Nous nous sommes également intéressés à l'étude et à la comparaison de la capacité des différentes souches isolées à éliminer le phosphate, afin de prévoir de nouveaux biocapteurs à base de bactéries sélectives pour la détection des phosphates dans les eaux qui dépassent les normes. Pour cela, des échantillons de boues activées sont prélevés à partir du bassin aérobie de la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Khenchela pour inoculer un milieu de culture minimum où l'acétate de sodium est la seule source de carbone et d'énergie.

Les cultures discontinues, sont menées dans des fermenteurs miniaturisés en alternance d'une phase anaérobie (2h) durant laquelle les fermenteurs ont été mis dans une jarre à bougie, suivie d'une phase aérobie (4h), puis incubés dans un bain marie agitateur à une température de 30 °C sous une agitation de 150 rpm. La concentration de phosphate est mesurée par colorimétrie avec la méthode d'acide ascorbique. L'isolement des microorganismes dominants est effectué à partir du milieu liquide, au fur et à mesure de l'accumulation des phosphates. L'isolement est suivi d'une purification sur le même milieu minimum gélosé. L'identification des genres bactériens responsables de la déphosphatation biologique est réalisée par l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches isolées, ainsi que par les galeries API 20NE bio-Mérieux.

Les résultats obtenus montrent la capacité du microbiote isolé à éliminer le phosphate à partir des boues activées. Près de 92.87% de la concentration initiale du phosphate est éliminée au bout de 80 heures, avec une vitesse moyenne d'accumulation de $0.215 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Nous constatons également que le taux d'élimination de phosphate par culture mixte est proportionnel à la concentration initiale en source de carbone. En effet une concentration de 5000 ppm d'acétate de sodium a donné le meilleur rendement de déphosphatation qui atteint 99.23 % au bout de 80 h d'incubation, avec une concentration en phosphate après traitement de 0.13 mg.L^{-1} , ce qui reflète un traitement satisfaisant vu que la concentration en phosphate est dite polluante au-delà de 1 mg.L^{-1} .

L'étude de l'influence de différentes sources de carbone sur la déphosphatation biologique par culture mixte montre que l'acétate a donné le meilleur rendement avec un taux de 99.23 %, suivi du lactate avec un taux de 78.51 % puis du glucose 71.22%, et enfin le lactose 61.05 %. D'après ces résultats on constate que les acides gras volatils à courtes chaînes comme l'acétate et le lactate sont les substrats les plus favorables à la déphosphatation biologique.

L'identification des groupements microbiens impliqués dans le processus de la déphosphatation biologique révèle la présence d'un nombre de huit souches identifiées comme étant : *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter junii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, et *Sphingomonas paucimobilis*. Ces souches se sont montrées capables de croître sur un milieu minimum en utilisant l'acétate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie.

Le suivi et la comparaison de la capacité des différentes souches isolées à éliminer le phosphate a montré que ces bactéries étaient capables d'accumuler le phosphate sous forme de polyphosphates stockés dans des granules métachromatiques appelées volutines situées dans leurs cytoplasmes (Serafim et al., 2002).

Il en sort que le meilleur taux de déphosphatation par culture pure est observé avec *Acinetobacter junii* avec un taux de 76.72 %, suivi d'*Alcaligenes denitrificans* avec 70.42 %, puis de *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de l'ordre de 61.78 %, alors que *Moraxella lacunata* à présenter un taux de 50.6 %.

Ces résultats préliminaires indiquent donc la possibilité d'utiliser ces souches microbiennes isolées dans la protection de l'environnement. Ils permettent également d'envisager avec plus d'optimisme, l'atteinte de l'objectif d'une accumulation complète et rapide des phosphates des eaux usées. D'autant plus qu'il ne faut pas écarter la possibilité que certains de ces souches puissent éliminer d'autres polluants organiques persistants dans l'environnement.

Cette étude montre aussi qu'il est possible d'envisager des biocapteurs sélectifs capables de détecter et de contrôler certains polluants chimiques dans l'eau. Plusieurs résultats ont été générés, mais la complexité du sujet laisse le champ libre à une poursuite ultérieure des travaux dans le domaine des biocapteurs.

Certaines autres perspectives peuvent être envisagées afin de compléter cette étude :

- Identification avancée des souches isolées par l'emploi des outils de génie génétique, aidera à déterminer de façon précise l'affiliation des espèces microbiennes isolées à partir de nos différents échantillons.
- Optimisation du milieu de culture minimum pour une accumulation rapide et totale des phosphates.
- Etude approfondies des différents facteurs influençant l'efficacité d'élimination biologique du phosphate.
- Il serait également intéressant d'étudier et de comparer l'accumulation des phosphates par chacune des bactéries isolées, et de déterminer les voies d'accumulation, et d'affiner l'étude jusqu'au niveau moléculaire.
- Elaboration de nouveaux biocapteurs sélectifs pour la détection des phosphates dans l'eau.
- Analyse et détection d'autres polluants.

Bibliographie

NE PAS DUPLIQUER

Références bibliographiques

- Akmouci-Toumi, S. (2009). Contribution à l'étude des boues de forages : Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Thèse de Magistère. Univ. M'Hamed Bougara, Boumerdes. 158p.
- Asmlal, L. (1996). Contribution à l'étude du métabolisme bactérien dans l'enlèvement biologique du phosphore des eaux usées. Thèse de Doctorat. Univ. Sherbrooke. 208p.
- Augustin, L.C. (1999). Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de Doctorat. Univ. Claude Bernard - Lyon I. 156p.
- Awuah, E., Oppong-Peprah, M., Lubberding, H.J., et Gijzen, H.J. (2004). Comparative performance studies of water lettuce, duckweed, and algal-based stabilization ponds using low-strength sewage. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 67(20-22): 1727-1739.
- Banas, D., et Lata., J.C. (2006). Les phosphates. Laboratoire d'Ecologie Systématique et Evolution. Univ. Paris-Sud. 6p.
- Bao, L.L., Li, D., Li, X.K., Huang, R.X., Zhang, J., Lv, Y., et Xia, G.G. (2007). Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. *Journal of Environmental Sciences*. 19 : 391-395.
- Barton, L.L. (2004). Structural and functional relationships in prokaryotes. Springer. 844p.
- Beatens, D., et Vanrolleghem, P.A. (1999). Temperature effects in bio-P removal. *Water Science and Technology*. 39(1): 215-225.
- Bio-Mérieux. (2006). Catalogue Analytique API 20 NE. Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (Réf. 20050). biomérieux.p45.
- Bitton, G., (2005). Wastewater microbiology. 3rd Edition. WILEY. 750p.
- Blais, S. (2002a). La problématique des Cyanobactéries (algues bleu-vert) à la baie Missisquoi en 2001. *Agrosol*. 13(2): 103-110.
- Blais, S. (2002b). La problématique québécoise des cyanobactéries : une préoccupation récente à l'étude. Résumé de la conférence Concrétiser le développement durable : Recherches et réalisations, Programme final, 6^{ème} colloque annuel, Chapitre Saint-Laurent, SRA-SETAC, 6 et 7 juin 2002. Québec. 67p.
- Bond, P.L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J., et Blackall, L.L. (1999). Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4077-4084.
- Bond, P.L., Hugenholtz, P., Keller, J., et Blackall, L.L. (1995). Bacterial community structures of phosphate-removing and nonphosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1910-1916.

- Boorman, G. A. (1999). Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation, *Environmental Health Perspectives*. 107(1): 207-217.
- Bossche, H.V. (1999). Devenir du phosphore apporté sur les sols et risques de contamination des eaux de surface: Cas des boues de stations d'épuration. Thèse de Doctorat. Univ. Rennes 1. 321p.
- Boswell, C.D., Dick, R.E., Eccles, H., et Macaskie, L.E. (2001). Phosphate uptake and release by *Acinetobacter johnsonii* in continuous culture and coupling of phosphate release to heavy metal accumulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26: 333 -340.
- Boukemara, L. (2009). Etude de l'Adsorption des ions Phosphate sur des Oxy-hydroxydes cas de l'hydroxyde de fer. Mémoire de Magistère. Univ. Mentouri, Constantine.94p.
- Bouziane, M. (2009). Biodégradation du méthanol en réacteur batch et étude de l'influence des paramètres physico-chimique sur la cinétique. Mémoire de Magistère. Univ. Mentouri, Constantine. 113p.
- Bowker, R.P.G., et Stensel, H.D. (1990). Phosphorus removal from wastewater. Noyes Data Corporation. Park Ridge, New Jersey, U.S.A. 115p.
- Brdjanovic, D., Hoojmans, C. M., Loosdrech, M. C. M., Alaerts, G. J. et Heijnen, J. J. (1996). The Dynamic effects of potassium limitation on biological phosphorus removal. *Water Research*. 30 (10): 2323-2328.
- Brdjanovic, D., Van Loosdrech, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. et Heijnen, J.J. (1997). Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal. *Journal of Environmental Engineering*. 123 (2): 144-154.
- Buchanan, R.L. et Klawitter, L.A. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 12: 235-46.
- Cai, T. M., Guan, L. B., Chen, L. W., Cai, S., Li, X. D., Cui, Z. L., et Li, S. P. (2007). Enhanced biological phosphorus removal with *Pseudomonas putida* GM6 from activated sludge. *Pedosphere*. 17(5): 624-629.
- Carbiener, R. (1990). Compositions lessiviels avec ou sans phosphates et protection des milieux aquatiques. Rapport au secrétaire d'état auprès du Premier Ministre chargé de l'Environnement: 182p
- Carlson, R.G., et Wetzel, R.G. (1988). Phosphorus flux from lake sediments: Effect of epipellic algal oxygen production. *Limnology and Oceanography*. 33:562-570.
- Carpenter, S. R., Caraco, N., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., et Smith, V.H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*. 8: (3): 559-568.
- Carucci, A., Lindrea, K., Majone, M., et Ramadori, R. (1999). Different mechanisms for the anaerobic storage of organic substrates and their effect on enhanced biological phosphate removal (EBPR). *Water Science and Technology*. 39(6): 21- 8.

- Chang, C.H., and Hao, O.J. (1996). Sequencing batch reactor system for nutrient removal: ORP and pH profiles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 67(1): 27-38.
- Chocat, B., et Eurydice 92. (1997). Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement. Tec et Doc Lavoisier, Paris, 1124p.
- Chorus, I., et Bartram, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN SPON. London. 416p.
- Christensson, M., Blackall, L.L., et Welander, T. (1998). Metabolic transformations and characterisation of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49: 226–234.
- Cloete, T.E., et Bosch, M. (1994). *Acinetobacter* cell biomass, growth stage and phosphorus uptake from activated sludge mixed liquor. *Water Science and Technology*. 30(11):219-230.
- Cohen, G.N. (2011). Microbial Biochemistry. 2nd Edition. Springer.500p.
- Comeau, Y. (1990). La déphosphatation biologique, métabolisme microbien. *Sciences et Techniques de l'eau*. 23(1): 47-60. In. Laridi, R. (2006) Réduction de nutriments (P&N) du lisier du porc par précipitation contrôlée et récupération de la struvite. Thèse de Doctorat. Univ. Québec.176p.
- Comeau, Y., Hall, K., Hancock, R., et Oldham, W. (1986). Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*. 20: 1511-1521.
- Converti, A., Rovatti, M., Del Borghi, M. (1995). Biological removal of phosphorus from wastewaters by alternating aerobic and anaerobic conditions. *Water Research*. 29(1):263–9.
- Cooper, G.M. (1999). La cellule: approche moléculaire. 1^{ère} Edition. De Boeck.674p.
- Dale, J.W., et Park, S.F. (2004). Molecular genetics of bacteria. 4th Edition. John Wiley & Sons Inc. 358p.
- Daumer, M.L. (2007). Analyse des transformations du phosphore lors du stockage et du traitement biologique et physico-chimique des lisiers de porc en vue d'un recyclage. Thèse de Doctorat. Univ. Toulouse.200p.
- De Bashan, L.E. et Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). *Water Research*. 38:4222–4246.
- De Hass, D.W., Wentzel, M.C., et Ekama, G.A. (2000a). The use of simultaneous chemical precipitation in modified activated sludge systems exhibiting biological excess phosphate removal Part 1: Literature review. *Water SA*. 26 (4): 439-452.
- De Hass, D.W., Wentzel, M.C., et Ekama, G.A. (2000b). The use of simultaneous chemical precipitation in modified activated sludge systems exhibiting biological excess phosphate removal Part 6: Modeling of simultaneous chemical-biological P removal review of existing models. *Water SA*. 27 (2): 135-150
- Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Toc, Lavoisier. 476p.

- Dens, E.J., Bernaerts, K., Standaert, A.R., et Van Impe, J.F. (2005). Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag: part I. The theory of cell division. *International Journal of Food Microbiology*. 101: 303-18
- Dernat, M., Elmerich, P., et Pouillot, M. (1995). Vers une optimisation de la déphosphatation physico-chimique. *L'eau, L'industrie, Les nuisances*.182: 34-38.
- Deronzier, G., et Choubert, J.M. (2004). Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées. Document technique. FNDAE n° 29. Cemagref. 24p. <http://www.eau.fndae.fr>. consulter le 20/05/2011.
- Dodds, W. K. (2006). Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnology and Oceanography*. 51 (1): 671-680
- Dorioz, J.M., Pelletier, J.P., et Benoit, P. (1998). Physico-chemical properties and bioavailability of particulate phosphorus of various origins in a watershed of Lake Geneva (France). *Water Research*. 32(2): 275-286.
- Dorit, R.L., Walker, W.F., et Bames, R.D. (1991). *Zoology*. Saunders College Publishing. Philadelphia. 1009p
- Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G. R., et Connell, D. W. (2000). Toxicology and Risk Assessment of Freshwater Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 163: 113-186.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Third Edition. Springer.
- Filali-Meknassi, Y. (2003). Traitement biologique des eaux usées hautement riches en matières nutritives provenant d'abattoir de porcs dans un réacteur biologique séquentiel. Thèse de Doctorat. Univ. Québec.255p.
- Filipe, C.D., Daigger, G.T., et Grady, C.P. (2001). Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms. *Water Environment Research*. Research Publication of the Water Environment Federation, 73 (2), 213-222.
- Florentz, M., et Hartemann, P. (1984). Screening for phosphate accumulating bacteria isolated from activated sludge. *Environmental Technology Letters*. 5: 457-463.
- Fuhs, G.W., et Chen, M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology*. 2 :119-138.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., et Staley, J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume Two. The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria*. Second Edition.Springer. p1108.
- Gaultier, V. (1994). Contribution à l'étude des échanges de phosphate à l'interface eau sédiment en milieu fluvial. Rapport de Thèse, INSA de Lyon. 305p

- Ghigliazza, R., Lodi, A., et Rovatti, M. (1998). Study on biological phosphorus removal process by *Acinetobacter lwoffii*: possibility to by-pass the anaerobic phase. *Bioprocess Engineering*. 18 : 207-211.
- Gikas, P. (2008). Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 159 : 187–203
- Gobsi, A.O. (2007). Parameter modeling for a mechanistic understanding of microbial plugging. Mémoire de Master en science de l'ingénierie. Univ. Texas, Austin.84p.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., et Gelbart, W.M. (2002). Introduction à l'analyse génétique. 3^{ème} Edition. De Boeck. 860p.
- Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F., et Barer, M.R. (2007). Medical Microbiology, 17th Edition. Churchill Livingstone.752p.
- Guiraud, J. P. (2003). Microbiologie Alimentaire. DUNOD, Paris. 652p.
- Guivarch. A. (2001). Valeur fertilisante à court terme du phosphore des boues de stations d'épuration urbaines. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.306p.
- Gürtekin, E., et Şekerdağ, N. (2011). The effect of sludge retention time and hydraulic retention time on biological phosphorus removal performance in anaerobic/anoxic sequencing batch reactor. *International journal of academic research*. 3(3): 493-496.
- Halassi, I. (2009). Degré de contamination du Lac des Oiseaux et contribution à l'étude du pouvoir auto-épurateur de l'eau : Isolement et étude de *Bdellovibrio bacteriovorus*. Mémoire de Magistère. Univ. 08 Mai 1945 de Guelma.148p.
- Hascoet, M.C., et Florentz, M. (1985). Influence of nitrate on biological phosphorus removal from wastewater. *Water SA*. 11 (1): 1-8.
- Helmer, C., et Kunst, S. (1998). Low temperature effects on phosphorus release and uptake by microorganisms in EBPR plants. *Water Science and Technology*.37 (4– 5):531– 9.
- Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., et Arvin, E. (1997). Wastewater treatment: biological and chemical processes. 2nd Edition. Springer Verlag, Berlin, Allemagne, 383 p.
- Hernández, L. (2006). Supervision et diagnostic des procédés de production d'eau potable. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. p151.
- Hitzfeld, R.C., Hoger, S.J., et Dietrich, D.R. (2000). Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment». *Environmental Health Perspective*. 108 (1): 113-122.
- Hollender, J., Van der Krol, D., Kornberger, L., Gierden, E., et Dott, W. (2002). Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 355–360.

- Jeon, C.O., et Park, J.M. (2000). Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor supplied with glucose as a sole carbon source. *Water Research*.34 (7): 2160-2170.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W. W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B., De Melo-Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S., Azevedo, S.M.F.O., et Jarvis, W.R.(1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*. 338 (13): 873-878.
- Joffin, J.N., et Leyral, G. (2005). Microbiologie Technique. Tome 1. Dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et CRDP d'Aquitaine. p368.
- Jones, M., et Stephenson, T. (1996). The effects of temperature on enhanced biological phosphate removal. *Environmental Technology* .17(9) : 965-976.
- Jonsson, K., Johansson, P., Christensson, M., Lee, N., Lie E., et Welander, T. (1996). Operational factors affecting enhanced biological phosphorus removal at the wastewater treatment plant in Helsingborg, Sweden. *Water Science and Technology*. 34(1-2):67-74.
- Kawaharasaki, M., Tanaka, H., Kanagawa, T., et Nakamura, K. (1999). In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4P,6-diamidino-2phenylindole (DAPI) at a polyphosphate- probing concentration. *Water Research*. 33:257-265. In: Seviour, R.J., Mino, T., Onuki, M. (2003). The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology*. 27 (1) : 99-127.
- Keller, J., Subramaniam, K., Gosswein, J., et Greenfield, P.F. (1997). Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors. *Water Science and Technology*. 35(6): 137-144.
- Kellil, A., et Bensafia, D. (2003). Élimination des phosphates par filtration directe sur lit de sable. *Revue des sciences de l'eau*. 16(3) : 317-332.
- Kim, H.J., et Pagilla, K.R. (2002). Verification of Enhanced Phosphate Removal Capability in Pure Cultures of *Acinetobacter calcoaceticus* under Anaerobic/Aerobic Conditions in an SBR. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 7: 335-339.
- Kong, Y.H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H. (2005). Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (7): 4076-4085.
- Kotak, B. G., Lam, A. K.Y., Prepas, E. E., et Hrudey, S. E. (2000). Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 57 : 1584-1593.
- Kargi, F., Uygur, A., et Başkay, H.S. (2005). Phosphate uptake and release rates with different carbon sources in biological nutrient removal using a SBR. *Journal of Environmental Management*. 76 : 71-75
- Krishnaswamy, U., Muthusamy, M., et Perumalsamy, L. (2009). Studies on the efficiency of the removal of phosphate using bacterial consortium for the biotreatment of phosphate wastewater. *European Journal of Applied Sciences*. 1 (1): 06-15.

- Krishnaswamy, U., Muthusamy, M., et Perumalsamy, L. (2011). Biological removal of phosphate from synthetic wastewater using bacterial consortium. *Iranian journal of biotechnology*. 9 (1):37-49.
- Ky, R.C. (1999). Modélisation de l'enlèvement du phosphore d'un effluent agro-alimentaire traité par réacteur biologique séquentiel. Thèse de Métrise en Sciences appliquées. Univ. Montréal.162p.
- Labroue, L., Capblancq, J., et Dauta, A. (1995). Cycle des nutriments : l'azote et le phosphore. Chapitre 26 in : Limnologie générale, Pourriot, R., Meybeck, M. Masson, Paris, 727-764 pp.
- Lacaze, J.C. (1996). L'eutrophisation des eaux marines et continentales. Ellipses.191p.
- Lacoste, A.M., Cassaigne, A. et Neuzil, E. (1981). Transport of Inorganic Phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology*. 6:115-120.
- Laurent, J.L., Guettier, P., Iwema, A., Magnan, J.P., Raby, D., Vachou, A., et Vidou, P. (1994). L'assainissement des agglomérations: technique d'épuration actuelle et évolution. Rapport N° 27 de l'Agence de l'eau Artois Picardie et le Ministère de l'Environnement France. 170p.
- Laridi, R. (2006) Réduction de nutriments (P&N) du lisier du porc par précipitation contrôlée et récupération de la struvite. Thèse de Doctorat. Univ. Québec.176p.
- Lee, D., Kim, M., et Chung, J. (2007). Relationship between solid retention time and phosphorus removal in anaerobic-intermittent aeration process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.103 (4) :338-344.
- Legros, A., et Villain, N. (2004). L'élimination du phosphore présent dans les eaux résiduaires urbaine : Epuration des eaux usées. *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances*. 274 : 52-54
- Lemaire, R. (2007). Etudes fondamentales et développement de procédés innovants pour l'élimination biologique de l'azote et du phosphore dans des effluents d'abattoir. Thèse de Doctorat. Univ. Montpellier II et Queensland.173p.
- Lemercier, B., Morisson, C., Guiho M., Ropert, A.M., et De barmon, V., (2003). La pollution par les matières phosphorées en Bretagne : Sources, transfert et moyens de lutte. Direction régional de l'environnement Bretagne. 81p.
- Levantesi, C., Serafim, L.S., Crocetti, G.R., Lemos, P.C., Rossetti, S., Blackall, L.L., Reis, M.A.M., et Tandoi, V. (2002). Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor. *Environmental Microbiology*. 4: 559-569.
- Lévêque, C. (1996). Ecosystème Aquatique. Hachette.160p.
- Levin, G.V., Toror, G.I., et Tsrmar, A.G. (1975). Operation of full-scale biological phosphorus removal plant. *journal of the Water Pollution Control Federation*. 47(3): 577.
- Lötter, L.H., et Murphy, M. (1985). The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge plant with particular reference to polyphosphate accumulation. *Water SA*. 11: 179-184.

- Lötter, L.H. et Pitman, A. R. (1992). Improved biological phosphorus removal resulting from the enrichment of reactor feed with fermentation products. *Water Science and Technology*. 26(5-6), 943-953.
- Lu, Y. (2008). Optimisation d'un réacteur biologique séquentiel à lit fluidisé pour le traitement des eaux. Thèse de Doctorat. Univ. Limoges.185p.
- Machnicka, A., Suschka, J., et Grübel, K. (2005).The importance of potassium and magnesium ions in biological phosphorus removal from wastewater. Institute of Environmental Protection and Engineering, Univ. Bielsko-Biala, Poland. www2.lwr.kth.se/forskningsprojekt/Polishproject/rep12/MSG.pdf. Consulter le 16 September 2011 .
- Madigou, E. (2005). Influence du statut trophique de cours d'eau sur les fonctionnalités microbiennes des biofilms : *épipsammon* et *épilithon*. Thèse de doctorat. Univ. Claude-Bernard - Lyon 1.236p
- Mamais, D., et Jenkins, D. (1992). The effects of MCRT and temperature on enhanced biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*. 26 (5-6): 955–965.
- Mammeri, L. (2007). Etude de la réaction de dénitrification par l'utilisation du succinate de sodium comme source de carbone. Mémoire de Magistère. Univ. Mentouri, Constantine.79p.
- Maurer, M. et Boller, M. (1999). Modelling of phosphorus precipitation in wastewater treatment plant with enhanced biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*. 39(1): 147-163.
- McClintock, S.A., Randall, C.W., et Pattarkine, V.M. (1993). Effects of temperature and mean cell residence time on biological nutrient removal processes. *Water Environment Research*. 65(5):110–8.
- Mcmeekin, K. (2009). Le bilan de phosphore du lac Bromont: vers l'identification des activités humaines causant les blooms de Cyanobactéries. Maitrise en Sciences de l'environnement. Univ. Québec, Montréal.83p.
- Meinhold, J. (2001). Biological Phosphorus Removal from Municipal Waste water: interactions in the anoxic zone and consequences on process operations. Thèse de Doctorat. Univ. Danemark.191p.
- Menanteau, T. (1990). Élimination du phosphore dans les eaux résiduaires par précipitation simultanée alcaline. *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances*, 135, 37-40.
- Merzouki, M., Bernet, N., Delgenes, J.P., Moletta, R., et Benlemlih, M. (2001). Effect of operating parameters on anoxic biological phosphorus removal in anaerobic anoxic sequencing batch reactor. *Environmental Technology*. 22 (4): 397-408.
- Merzouki, M., Delgenes, J.P., M., Bernet, Moletta, R., et Benlemlih, M. (1999).Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Current Microbiology*. 38: 9–17.
- Mesnage, V., et Picot, B. (1995). The distribution of phosphate in sediments and its relation with eutrophication of a Mediterranean coastal lagoon. *Hydrobiologia*. 297(1): 29-41.

- Metcalf et Eddy. (1991) Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse. 3rd Edition. McGraw-Hill Book Comp., NY. 1334p.
- Miettinen, I.T., Vartiainen, T., et Martikainen, P.J. (1997). Phosphorus and Bacterial Growth in Drinking Water. *Applied And Environmental Microbiology*.63(8) : 3242–3245.
- Mills, C. J., Bull, R. J., Cantor, K. P., Reif, J., Hrudey, S. E. et Huston, P. (1998). Workshop report. Health risks of drinking water chlorination by-products: report of an expert working group. *Chronic Diseases and Injuries in Canada*. 19(3): 91-102.
- Mino, T. (2000). Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry*. 65(3): 341-348.
- Mino, T., et Satoh, H. (2006). Wastewater genomics: A metagenomic sequencing effort sheds light on the biology of wastewater treatment. *Nature Biotechnology*. 24 (10):1229-1230.
- Mino, T., Satoh, H., et Matsuo, T. (1994). Metabolisms of different bacterial populations in enhanced biological phosphate removal process. *Water Science and Technology*. 29(7) : 67-70. In. Jeon, C.O., et Park, J.M. (2000). Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor supplied with glucose as a sole carbon source. *Water Research*.34 (7) : 2160-2170.
- Mino, T., Tsuzuki, Y., et Matsuo, T. (1987). Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. p27–38. In Ramadori, R. (ed.), Biological phosphate removal from wastewaters: Proceedings. (1987). Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. In. Bond, P.L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J., et Blackall, L.L.(1996). Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non-efficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 4077–4084.
- Mino, T., Van Loosdrecht, M. C. M., et Heijnen, J. J. (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research*. 32 (11): 3193-3207.
- Momba, M.N.B., et Cloete, T.E. (1995). The relationship of biomass to phosphate uptake by *Acinetobacter junii* in activated sludge mixed liquor. *Water Research*. 30(2): 364-370.
- Momba, M.N.B., et Cloete, T.E. (1996). Biomass relationship to growth and phosphate uptake of *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* and *Acinetobacter radioresistens* in mixed liquor medium. *Journal of Industrial Microbiology*. 16: 364-369.
- Morales, L.M., Daigger, G., et Borberg, J.R. (1991). Capability assessment of biological nutrient removal facilities. *Journal Water Pollution Control Federation*.63 (6): 900-909.
- Morohoshi, T., Yamashita, T., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., et Kuroda, A. (2003). A method for screening polyphosphate accumulating Mutants which remove phosphate efficiently from synthetic water. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95(6): 637-640.
- Morse, G.K., Brett, S.W., Guy, J.A., et Lester, J.N. (1998). Review: Phosphorus removal and recovery technologies. *The Science of the Total Environment*. 212 : 69-81.

- Moutin, T., Picot, B., Ximénès, M.C. et Bontoux, J. (1993). Seasonal variations of compounds and their concentrations in two coastal lagoons Hérault (France). *Hydrobiologia*. 252(1): 45-59.
- Mudaly, D.D., Atkinson, B.W., et Bux, F. (2000). Microbial community profile of a biological excess phosphorus removal (BEPR) activated sludge system using a cultivation-independent approach. *Water SA*. 26(3): 343-352.
- Mubyana- John, T., et Letsamao, M.C. (2007). Polyphosphate bacteria associated with the glen valley wastewater treatment plant; Gaborone. 8th WaterNET/WARFSA/GWP-SA Symposium. www.bscw.ihe.nl/pub/bscw.../Mubyana-John.pdf. Consulter le 20/05/2010.
- Mulkerrins, D., Dobson, A.D.W., et Colleran, E. (2003). Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environment International* 30 : 249– 259.
- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., et Kamagata, Y. (1995). *Microtholunatus phosphovorius* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 45: 17–22.
- Narasiah, K.S., Morasse, C. et Lemay, J. (1991) .Nutrient removal from aerated lagoons using alum and ferric chloride : a case study. *Water Science and Technology*. 23: 1563-1572.
- Narasiah, K.S., Shoiry, J., et Morasse, C. (1990). Effets des variations de: températures saisonnières sur les modifications des phosphates dans les eaux usées. *Revue des Sciences de l'eau*. 1(4): 305-320.
- Narsian, V., et Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil biology and biochemistry*. 32: 559-565.
- Némery, J. (2003). Origine et devenir du phosphore dans le continuum aquatique de la seine des petits bassins amont à l'estuaire: Rôle du phosphore échangeable sur l'eutrophisation. Thèse de Doctorat. Univ. Paris VI – Pierre et Marie Curie. 259p.
- Nielsen, P.H., Mielczarek, A.T., Kragelund, C., Nielsen, J.L., A.M., Saunders, Kong, Y., et Hansen, A.A., Vollertsen, J. (2010). A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Research*. 44:5070-5088.
- Oehl, F., Oberson, A., Fliessbach, M. P. A., et Frossard, H. R. E. (2001). Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. *Biology and Fertility of Soils*. 34: 31-41.
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., et Reis, M.A.M. (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research*. 41: 2271-2300.
- O.N.A. (2009). Bilan d'exploitation du 3^{ème} Trimestre 2009. Office National d'assainissement. Ministère des Ressources Humaines. p59.
- Ong, S.A., Seng, C.E., et Lim, P.E. (2007). Influence of heavy metal on activate sludge activity: DO and SOUR monitoring. *Journal of engineering research and education*. 4: 20-24.

- Ong, S. A., Toorisaka, E., Hirata, M., Hano, T. (2010). Adsorption and toxicity of heavy metals on activated sludge. *ScienceAsia* 36: 204–209.
- Ouazzani, N., Bouarab, L., Picot, B., Lazrek, H.B., Oudra, B., et Bontoux, J. (1997). Variation saisonnières des formes de phosphore dans une station de traitement des eaux usées par lagunage, sous climat aride de Marrakech (Maroc). *Revue des sciences de l'eau*. 4: 527-544.
- Pandolfi, D. (2006). Caractérisation morphologique et physiologique de la biomasse des boues activées par analyse d'images. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. 142p.
- Pauli, A.S.L., et Kaitala, S. (1997). Phosphate uptake kinetics by *Acinetobacter* isolates. *Biotechnology and Bioengineering*. 53(3): 304–309.
- Péringer, P., Ruffin, F., Maillard, E., Philippe, P., Ferraris, G., Habermacher, F., Gallay, R., Gabus, S., Mason, M., et Silva, V. (2004). Sequencing batch reactor. Séminaire Génie et Modélisation des bioprocédés de l'environnement I. ENAC / Master SIE - 7ème sem. 12p.
- Pijuana-Vilalta, M. (2004). Effect of different carbon sources and continuous aerobic conditions of the EBPR process. Thèse de Doctorat. Université Autònoma de Barcelone. 135p.
- Ploug, H. (2008). Cyanobacterial surface blooms formed by *Aphanizomenon* sp. and *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea: Small-scale fluxes, pH, and oxygen microenvironments. *Limnology and Oceanography*. 53 (3): 914 -921.
- Poulin, E. (2005). Transformation et valorisation des boues rouges de l'industrie de l'aluminium en tant qu'agent de déphosphatation. Mémoire de Maîtrise en science. Univ. Québec. 127p.
- Pourriot, R., et Meybeck, M. (1995). Limnologie générale. Masson, Paris, 956 pp.
- Prepas, E.E., Alloul, B.P., Chambers, P.A., Murphy, T.P., Reedyk, S., Sandland, G., et Servediak, M. (2001). Lime treatment and its effects on the chemistry and biota of hardwater eutrophic lakes. *Freshwater Biology*. 46(8): 1049-1060.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Wiley, J.M., Sherwood, L.M., et Woolverton, C.J. (2010). Microbiologie. De Boeck. 3^{ème} Edition. 1088p.
- Ramade, F. (1998). Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Paris, Ediscience international: 785p.
- Randall, C.W., Barnard, J.L., et Stensel, H.D. (1992). Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal. Lancaster: Technomic Publishing. 420p.
- Randall, A. A., Benefield, L. D., et Hill, W. E. (1994). The effect of fermentation products on enhanced biological phosphorus removal, polyphosphate storage, and microbial-population dynamics. *Water Science and Technology*. 30(6): 213-219.

- Randall, A. A., Benefield, L. D., Hill, W. E. Nicol, J.P., Boman, J.K. et Shuh-Ren, J. (1997). The effect of volatile fatty acids on enhanced biological phosphorus removal and population structure in anaerobic/aerobic sequencing batch reactors. *Water Science and Technology*. 35(1) : 153–160
- Rejesk, F. (2002). Analyse des eaux: Aspects réglementaires et techniques. CRDP, Aquitain.360p.
- Robach, F., Hajnsek, I., Eglin, I. et Tremolières, M. (1995). Phosphorus sources for aquatic macrophytes in running waters: water or sediment? *Acta Botanica Gallica*. 142(6):719-731.
- Robert, M. (1996). Le sol: interface dans l'environnement, ressource pour le développement. Masson, Paris, 241 pp.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., et Coll. (2009). L'analyse de l'eau. 9^e édition. DUNOD, Paris. 1526p.
- Rustrian, E., Delgenes, J.P., et Moletta, R. (1997). Effect of the volatile fatty acids on phosphate uptake parameters by pure cultures of *Acinetobacter sp.* *Letters in Applied Microbiology* 23(4):245–8.
- Rybicki, S. (1997). Phosphorus removal from wastewater. A literature review. Advanced Wastewater Treatment, Plaza, Levlin. Hultman. Stockholm.106p.
- Sadowski, A., Audic, J.M., virlaget, F., Lefevre, F., Cornice, R., Grulois, P., Attal, A., Manem, J., et Fayoux, C. (2002). Traitement des eaux usées urbaines. Lyonnaise des Eaux. C.I.R.S.E.E. ENGEES.
- Saito, T., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Research*. 38: 3760–3768
- Sarioglu, M. (2005). Biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor by using pure cultures. *Process Biochemistry*. 40 : 1599–1603.
- Sathasivan, A., Ohgaki, S., Yamamoto, k., et Kamiko, N. (1997). Role of inorganic phosphorus in controlling regrowth in water distribution system. *Water Science Technology*. 35(8):37-44.
- Satoh, H., Mino, T., et Matsuo, T. (1992). Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes water. *Science and Technology*. 26(5-6):933-942.
- Satoh, H., Ramey, W.D., Koch, F.A., Oldham, W.K., Mino, T., et Matsuo, T. (1996). Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage. *Water Science and Technology*. 34 (4): 8 – 15.
- Schönborn, C., Bauer, H.D., et Röske, I. (2001). Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules. *Water Research*. 35(13):3190– 6.

- Serafim, L.S., Lemos, C.P., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., Reis, M.A.M. (2002). Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate accumulating microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 51: 1–18.
- Serralta, J., Ferrer, F., Borra, L., et Seco, A. (2006). Effect of pH on biological phosphorus uptake. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(5): 875-882.
- Seviour, R.J., Mino, T., Onuki, M. (2003). The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology*. 27 (1) : 99–127.
- Shafie,S.A. (2009). Nutrient removal using biofilm reactor with support media. Mémoire d'Ingénieur. Univ. Malaysia Pahang.48p.
- Shehab, O., Deininger, R., Porta, F., et Wojewski, T. (1996). Optimising phosphorus removal at the Ann Arbor wastewater treatment plant. *Water Science and Technology* .34(1–2):493 –9.
- Sidate, M., Bux, F., et Kasan, H.C. (1999). Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. *Water SA*. 25(2): 175-180.
- Skalsky, D. S., et Daigger, G. T. (1995). Waste-water solids fermentation for volatile acid production and enhanced biological phosphorus removal. *Water Environment Research*. 67(2): 230-237.
- Sincero, A.P., et Sincero, G.A. (2002). Physical-chemical treatment of water and wastewater. IWA Publishing, Washington, DC. 832p.
- Smolders, G.J.F., Van Der Mei, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., et Heijnen, J.J. (1994). Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and Bioengineering*. 44 (7):837-848.
- Søndergaard, M., Jensen, P. J., et Jeppesen. E., (2003). Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia*. 506 (09): 135-145.
- Srivastava, S., et Srivastava, A.K. (2006). Biological phosphate removal by model based continuous cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Process Biochemistry*. 41: 624–630.
- Stante, L., Cellamare, C.M., Malaspina, F., Bortone, G., et Tilche, A. (1997). Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamproedia spp*. *Water Research*. 31 (6): 1317-1324.
- Stednick, J.D. (1991). Wildland water quality sampling and analysis. Academic Press Inc.217p.
- Strom, P.F., (2006). Technologies to Remove Phosphorus from Wastewater. Literature review. Rutgers University.USA.8p.
- Surampalli, R.Y., et Tyagi, R.D., Environmental and Water Resources Institute (U.S.), et Environmental and Multi-Media Council. (2004). Advances in water and wastewater treatment. American Society of Civil Engineers. Reston, Virginia. p585.
- Surampalli, R.Y., Tyagi, R.D., Scieible, O.K. et Heidman, J.A. (1997). Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. *Bioresource Technology*. 61(2): 151-157

- Tae, K. W. (1993). Biological phosphorus and nitrogen removal. Rapport d'analyse et technologies. Korea Environment Institute.56p.
- Terrouche, A. (2009). Biodégradation du MEK en réacteur batch : influence de la présence d'acétone et des conditions de culture initiales. Mémoire de Magistère. Univ. Mentouri, Constantine.93p.
- Tetreault, M.J., Benedict, A.H., Kaempfer, C., et Borth, E.F. (1986). Biological phosphorus removal: a technology evaluation. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 58: 823-837.
- Theberge, A. (1998). Utilisation d'une biomasse algale pour l'enlèvement du phosphore d'un effluent domestique de petite municipalité. Mémoire de Maîtrise en science. Univ. Laval.114p.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.D., Chen, G.C., Chen, G., et Yu, S.Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*. 17(6): 1317-1321.
- Vasconcelos, V. (2006). "Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25(1-2): 425-432.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A., et Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*. 30: 460-468.
- Vergeynst, L. (2010). Méthodes pour la mesure et la modélisation d'Escherichia coli dans les bassins d'orage. Mémoire de maîtrise en science. Univ. Gent.138p.
- Voet, D., et Voet, J.G. (2005). Biochimie. 2^{ème} Edition. De Boeck. 1583p.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. et Schleifer, K.H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 792-800.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., et Daims, H. (2002). Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 665–680,
- Wang, N., Hill, G., et Peng, J. (2002a). The role of glucose in developing enhanced biological phosphorus removal. *Environmental Engineering and Policy*. 3: 45–54.
- Wang, N., Peng, J., et Hill, G. (2002b). Biochemical model of glucose induced enhanced biological phosphorus removal under anaerobic condition. *Water Research*. 36 : 49–58.
- Wiegand, C., et Pflugmacher, S. (2005). Ecological effects of selected Cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203 (3): 201-218.

Wetzel, R.G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*, 3rd Edition. Academic Press, San Diego. 1006p

Wentzel, M.C., et Ekama, G.A. (1997). Principles in the design of single-sludge activated sludge systems for biological removal of carbon, nitrogen, and phosphorus. *Water Environment Research* .69 (7):1222-1231.

Wentzel, M.C., Lötter, L.H., Ekama, G.A., Lowenthal, R.E., et Marais, G.V.R. (1991). Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal. *Water Science and Technology*. 23(4-6): 567-576.

Wentzel, M. C., Lötter, L. H., Lowenthal, R. E. et Marais, G. V. R. (1986). Metabolic behavior of *Acinetobacter spp.* in enhanced biological phosphorus removal: a biological model. *Water SA*. 12: 209-224.

Yagci, N., Artan, N., Çokgör, E.U., Randall, C.W., et Orhon, D. (2003). Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate- and glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 84(3): 359–373.

Yu, S.L., Liu, Y.N., Jing, G.N., Zhao, B.J., et Guo, S.Y. (2004). Enhanced biological phosphorus removal in anaerobic/aerobic sequencing batch reactor supplied with glucose as carbon source. *Sciendepaper Online*.1-7. www.paper.edu.cn. Consulté le 06/05/2011.

Zafiri, C., Kornaros, M., et Lyberatos, G. (1999). Kinetic modelling of biological phosphorus removal with a pure culture of acinetobacter sp. under aerobic, anaerobic and transient. *Water Research*. 33(12): 2769-2788.

Zarnovsky, L., Derco, J., Kuffa, R., et Drtil, M. (1994). The influence of cadmium on activated sludge activity. *Water Science and Technology*. 30 (11): 235-242.

Annexes

NE PAS DUPLIQUER

Annexe 1. Protocole de dosage des orthophosphates par colorimétrie (Méthode d'acide ascorbique)

• Principe

En milieu acide et en présence de molybdate d'ammonium, les orthophosphates donnent un complexe phosphomolybdique qui, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue susceptible d'un dosage spectrométrique. Le développement de la coloration est accéléré par l'utilisation d'un catalyseur, le tartrate double d'antimoine et de potassium.

• Réactifs

– Solution d'acide sulfurique ($d = 1,84$) à 15 % environ en volume.

– Solution de molybdate d'ammonium à 40 g/L.

Molybdate d'ammonium tétrahydraté 20 g

Eau distillée *q.s.p.* 500 mL

Filtrer si nécessaire, à conserver en flacon de polyéthylène à 4 °C.

– Solution d'acide ascorbique à 20 g/L :

Acide ascorbique 2 g

Eau distillée *q.s.p.* 100 mL

À préparer chaque jour.

– Solution de tartrate double d'antimoine et de potassium à 2,8 g/L :

Tartrate double d'antimoine et de potassium 0,28 g

Eau distillée *q.s.p.* 100 mL

– **Réactif combiné**

Solution d'acide sulfurique 50 mL

Solution de tartrate double d'antimoine et de potassium 5 mL

Solution de molybdate d'ammonium 15 mL

Eau distillée *q.s.p.* 100 mL

Conserver le réactif au réfrigérateur à 4 °C

– Solution mère étalon à 50 mg/L de phosphore :

Dihydrogénophosphate de potassium desséché au préalable à l'étuve à 100 °C 219,7 mg

Eau distillée *q.s.p.* 100 mL

Acidifier la solution par 1 mL d'acide sulfurique à 15 % avant d'ajuster le volume.

– Solution fille étalon à 1 mg/L de phosphore.

Diluer au 1/50 la solution précédente avec de l'eau distillée au moment de l'emploi.

• Établissement de la courbe d'étalonnage

Introduire dans une série de fioles jaugées de 25 mL :

Numéro de fiole	T	1	2	3	4
Solution d'étalon de phosphore à 1 mg.L^{-1} (ml)	0	5	10	15	20
Eau distillée (ml)	20	15	10	5	0
Correspondance en mg/l de phosphore	0	0.25	0.5	0.75	1

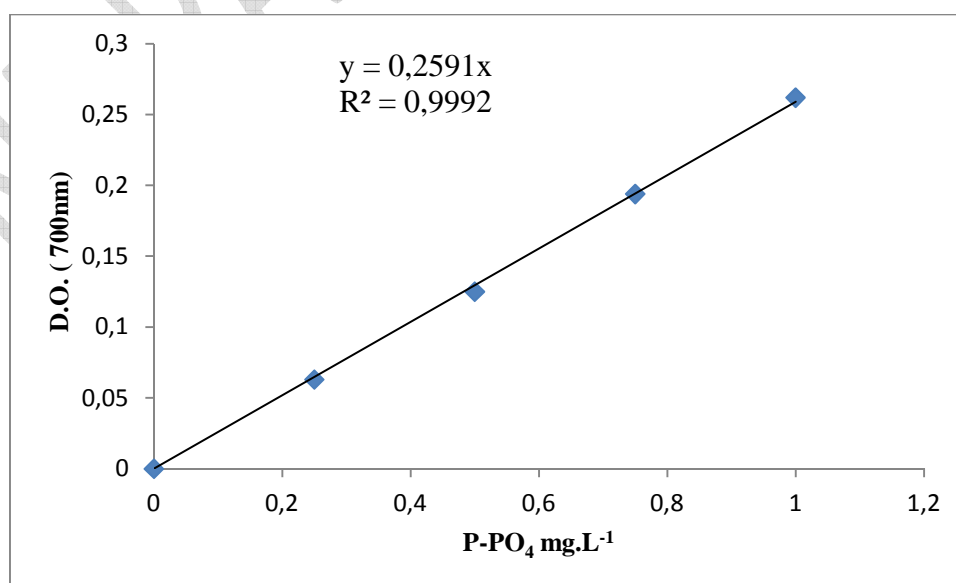
Introduire dans chaque fiole 1 mL de solution d'acide ascorbique, agiter, puis ajouter 4 mL de réactif, mélangé soigneusement. Attendre 30 minutes la stabilisation de la coloration bleu et effectuer les mesures au spectromètre à la longueur d'onde de 700 nm ou 800 nm en cuve de 1 cm. Construire la courbe d'étalonnage.

• Mode opératoire

Vérifier le pH de l'échantillon qui doit être compris entre 2 et 7, l'ajuster si nécessaire. Introduire 5 ml d'eau dans une fiole jaugée de 25 mL, puis ajouter 15 ml d'eau distillée, ajouter 1 mL de solution d'acide ascorbique puis poursuivre comme pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Tenir compte de la valeur lue pour le témoin. Se reporter à la courbe d'étalonnage.

• Expression des résultats

La courbe donne la teneur en phosphore, exprimée en milligrammes par litre pour le volume de 20 ml. Pour calculer la concentration du phosphore pour la prise d'essai (5ml), on utilise la relation $C_1.V_1=C_2.V_2$.



Courbe d'étalonnage du phosphate.

Annexe 2. Mesure de la densité optique

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très prisée pour mesurer la biomasse, c'est-à-dire la masse bactérienne sèche présente par unité de volume. L'absorbance ou la turbidité d'une culture est souvent déterminé par spectrophotométrie, où les micro-organismes jouent le rôle d'une barrière physique pour la lumière. Si on choisi une longueur d'onde bien déterminée le taux de la lumière transmise par l'échantillon sera proportionnel à la concentration des cellules présentes dans l'échantillon.

Pour déterminé la turbidité on utilise un spectrophotomètre qui exprime le plus couramment ces valeurs sous forme de densité optique (D.O.) définie comme suit :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A : Densité optique

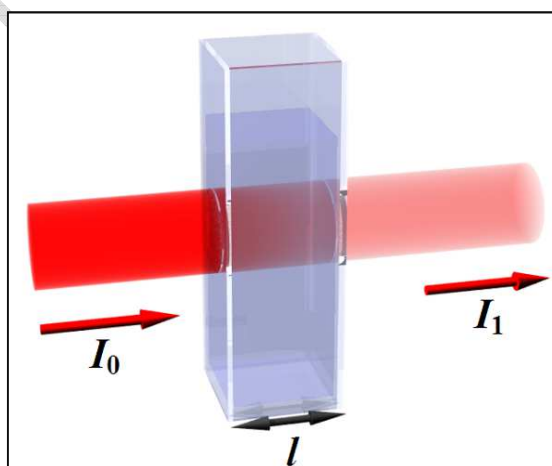
I : Intensité de la lumière incidente.

I₀ : Intensité de la lumière transmise.

ε : Absorbance molaire (absorbance d'une solution C= 1mole/l dans une cuvette de dimension de l=1cm).

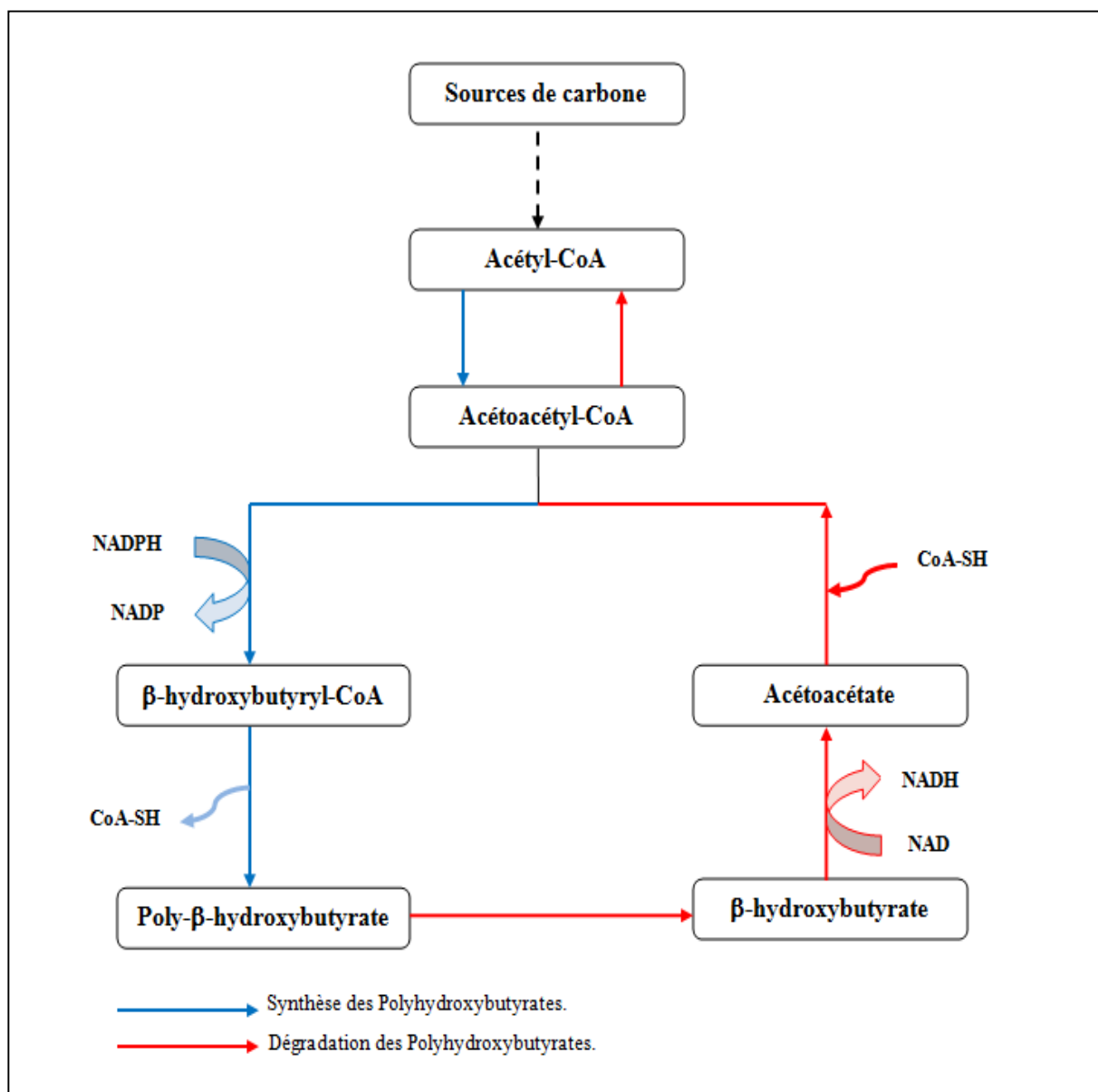
C : Concentration molaire (mole/l).

l : Epaisseur de la cuve (cm).



Principe de Beer Lambert

Annexe 3. Synthèse et dégradation des Polyhydroxybutyrates



Annexe 4. Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE

Tests	Substrats	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5 mn	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-βDgalactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétylglucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			

Annexe 5. Technique de la coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet la distinction des bactéries Gram (+) et Gram (-) sur la base de différence de composition chimique et d'ultra-structure des parois cellulaires.

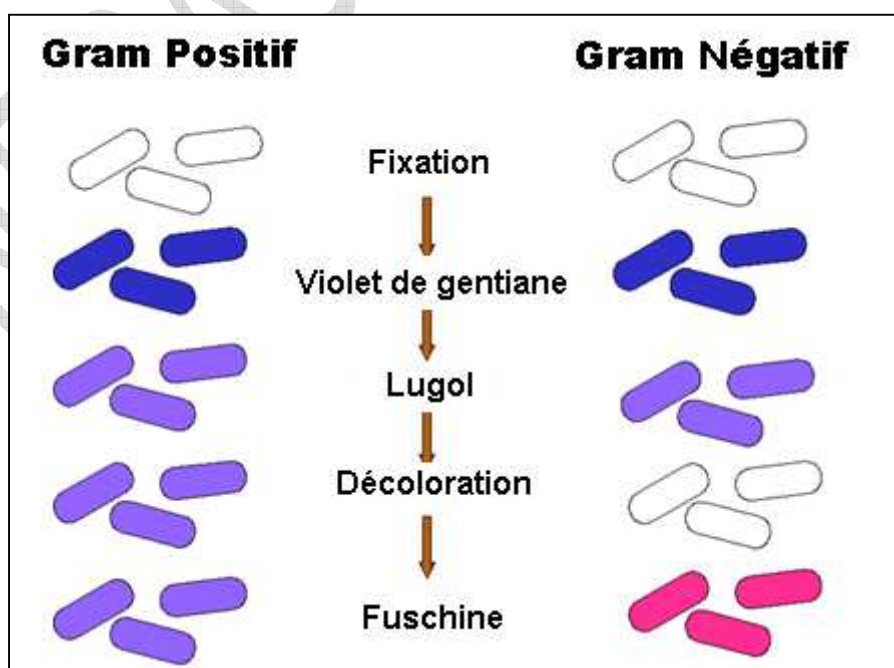
Technique

- Réaliser sur une lame propre un frottis puis le fixer.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane phénique pendant 1 minute.
- Recouvrir la lame d'une solution de lugol durant 30 secondes.
- Laver la lame à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente.
- Laver rapidement à l'eau et recouvrir la lame de fuschine phénique pendant 10 secondes
- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher la lame à l'aide d'un papier buvard.

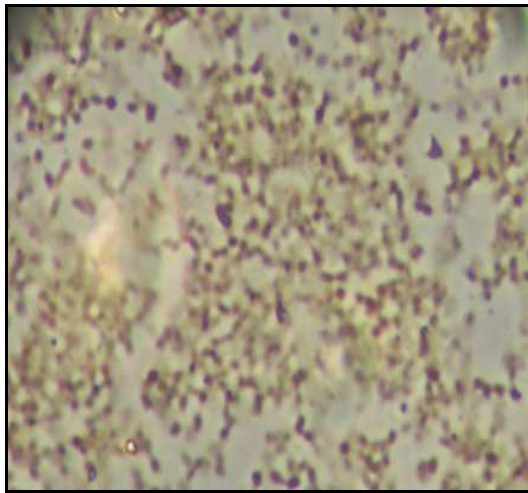
L'observation s'effectue à immersion (objectif $\times 100$) après avoir déposer une goutte d'huile de cèdre sur la lame (observation à immersion).

Lecture

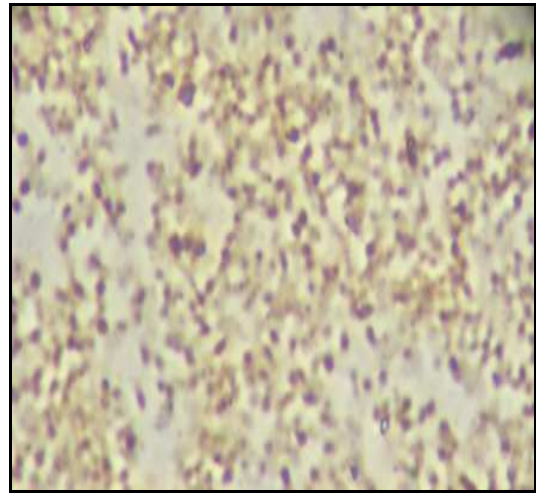
Les bactéries Gram négatif apparaissent colorées en rose tandis que les bactéries Gram positives sont colorées en violet.



Annexe 6. Aspect microscopique après coloration de Neisser



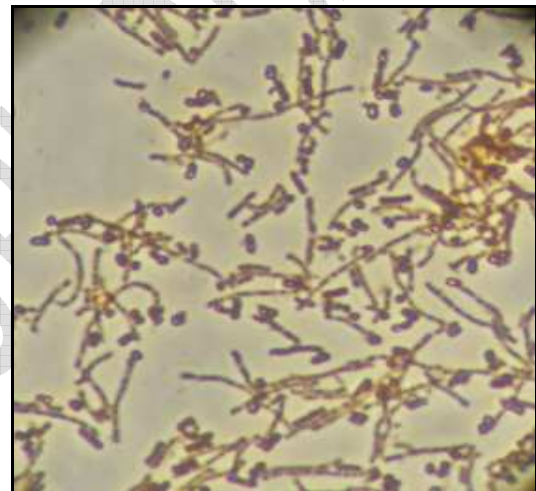
Neisser (+)



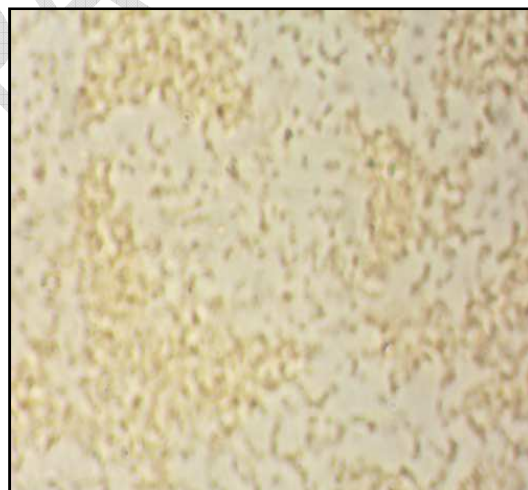
Neisser (+)



Neisser (+)



Neisser (+)



Neisser (-)

Aspect microscopique après coloration de Neisser en microscope optique à contraste de phase (type Zeiss) grossissement (250X).

Résumés

NE PAS DUPLIQUER

Résumé

Cette étude entre dans le cadre d'un projet PNR qui porte sur l'élaboration de nouveaux capteurs appliqués au contrôle et à l'analyse des polluants chimiques de l'eau. Elle a permis d'évaluer l'élimination biologique des phosphates des eaux usées par une culture mixte isolée à partir des boues activées de la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Khenchela. L'isolement et l'identification des souches dominantes responsables de la déphosphatation sont parallèlement réalisés. On s'est intéressé aussi à l'étude et à la comparaison de la capacité des différentes souches isolées à éliminer les phosphates.

L'évaluation de la déphosphatation est réalisée par le dosage des phosphates par colorimétrie avec la méthode d'acide ascorbique. L'isolement des souches dominantes est effectué sur un milieu minimum gélosé. L'identification des souches bactériennes est réalisée à l'aide du système API 20NE-bioMérieux.

Ce travail montre la capacité du microbiote des boues activées à éliminer les phosphates, avec des taux proportionnels à la concentration initiale en source de carbone. L'utilisation d'une concentration de 5000 mg.L⁻¹ d'acétate de sodium a donné le meilleur rendement de déphosphatation qui atteint 99.23%, avec une concentration de phosphate après traitement de 0.13 mg.L⁻¹, ce qui reflète un traitement satisfaisant vu que la concentration en phosphate est dite polluante au delà de 1 mg.L⁻¹.

L'étude de l'influence de différentes sources de carbone sur la déphosphatation biologique par culture mixte montre que les acides gras volatils à courtes chaînes comme l'acétate et le lactate sont les substrats les plus favorables au processus.

La recherche des microorganismes déphosphatants dominants impliqués dans ce processus a permis d'isoler huit espèces bactériennes identifiées comme étant *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter junii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, et *Sphingomonas paucimobilis*.

Il en sort que le meilleur taux de déphosphatation par culture pure est observé avec *Acinetobacter junii* avec un taux de 76.72 %, suivi d'*Alcaligenes denitrificans* avec 70.42% puis de *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de l'ordre 61.78 %, alors que *Moraxella lacunata* à présenter un taux de 50.6 %.

Mots clés : phosphates, eaux usées, épuration biologique, bactéries déphosphatantes, boues activées, culture en batch.

Abstract

This study comes within the framework of a PNR project for the development of new sensors applied to the control and analysis of chemical pollutants in water, allowed to evaluate the removal of phosphate from wastewater by a mixed culture isolated from activated sludge of sewage wastewater from the City of Khenchela. The isolation and identification of dominant strains responsible for phosphate removal are performed in parallel. We are also interested in studying and comparing the ability of different isolates strains to remove phosphate.

Evaluation of phosphate removal is achieved by the determination of phosphate by colorimetric method with ascorbic acid. The isolation of dominant strains is performed on a minimal medium agar. Identification of bacterial strains was performed using the system API-20 NE-bioMérieux.

This work shows the ability of the microbiota of activated sludge to remove phosphate, with rates proportional to the initial concentration of carbon source. It was found that a concentration of 5000 mg.L⁻¹ of sodium acetate gave a better yield of phosphate removal reaches 99.23%, with an average speed of accumulation of 0.19 mg.L⁻¹.h⁻¹. The concentration of phosphate obtained after treatment is 0.13 mg.L⁻¹, reflecting a satisfactory treatment sight that the phosphate concentration is known as polluting beyond 1 mg.L⁻¹.

The study of the influence of various sources of carbon on the biological phosphorus removal by mixed culture shows that the volatile fatty-acids with short chains such as acetate and lactate are the substrates most favorable to the process.

The research of the dominant micro-organisms implied in this process allowed the isolation of eight bacterial species identified as being *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter junii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, and *Sphingomonas paucimobilis*.

It emerges that the best rate of phosphate removal by pure culture is observed with *Acinetobacter junii* with a rate of 76.72%, followed by *Alcaligenes denitrificans* with 70.42% and *Pseudomonas aeruginosa* with a rate of about 61.78 %, followed finally by *Moraxella lacunata* with 50.6%.

Key-words: phosphate, wastewater, biological treatment, polyphosphate accumulation bacteria, activated sludge, batch culture.

ملخص

هذه الدراسة التي تدخل ضمن إطار مشروع وطني للبحث العلمي PNR حول انجاز حساسات جديدة لرصد و تحليل الملوثات الكيميائية الموجودة في المياه، سمحت بتقييم التخلص البيولوجي من الفوسفات في المياه المستعملة بواسطة الزرع المختلط المعزول من الرواسب الطينية الماخوذة من محطة تصفية المياه المستعملة لمدينة خنشلة، بالتوازي مع عملية عزل و تحديد السلالات السائدة المسؤولة عن عملية التخلص من الفوسفات. و قد تم الاهتمام أيضا بدراسة و مقارنة قدرة السلالات المعزولة من إزالة الفوسفات. تمت عملية الزرع في مخمرات صغيرة بطريقة غير مستمرة (الباتش) حيث احتضنت في درجة حرارة 30°م مع الرج المستمر.

تم تقييم عملية التخلص البيولوجي من الفوسفات بتحديد تركيزه بتقنية القياس اللوني بواسطة طريقة حمض الاسكوربيك. كما اجري عزل السلالات البكتيرية بتقنية الزرع في وسط مغذى، و تم تعريفها باستعمال نظام API 20NE. هذه الدراسة بينت قدرة المجموعات البكتيرية في التخلص من الفوسفات مع معدلات متناسبة مع التركيز الأولى لمصدر الكربون.

أظهرت النتائج بأن استخدام حوالي 5000 ملغ/ل من آسيتات الصوديوم أعطت المردود الأفضل للتخلص من الفوسفات بمعدل 99.23 % مع تركيز نهائي للفوسفات في نهاية العملية يقدر ب 0.13 ملغ/ل الشيء الذي يعكس نجاعة العلاج المتبع نظرا أن نسبة تركيز الفوسفات التي تعتبر ملوثة هي ابتداء من 1 ملغ/ل.

دراسة تأثير مختلف مصادر الكربون على التخلص البيولوجي من الفوسفات بواسطة الزرع المختلط أظهرت أن الأحماض الدهنية المتطايرة هي الأكثر ملائمة لهذه العملية.

اتضح أيضا من خلال هذه الدراسة أن المردود الأفضل للتخلص من الفوسفات لوحظ مع السلالة *Acinetobacter junii* بمعدل يقدر ب 76.72 % متبوعة ب *Alcaligenes dentritificans* مع معدل 70.42 % ثم ب *Pseudomonas aeruginosa* بمعدل 61.78 % و أخيرا *Moraxella lacunata* مع معدل 50.6 %

أظهر البحث عن المجموعات البكتيرية المهيمنة و التي تدخلت في هذه الظاهرة وجود ثمانية أنواع من البكتيريا و هي: *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter junii*, *Alcaligenes dentritificans*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, و *Sphingomonas paucimobilis*.

الكلمات المفتاحية: فوسفات، البيولوجية المعالجة، الصحي الصرف مياه بكتيريا مخزنة للفوسفات، الرواسب الطينية، زرع بطريقة غير مستمرة.

Nom : **BENAMMAR**

Date de soutenance : 20 /02/2012

Prénom : **Leyla**

Diplôme: **Magistère**

Thème: **Elimination des phosphates par procédé biologique des eaux de la région de Khenchela**

Résumé

Cette étude entre dans le cadre d'un projet PNR qui porte sur l'élaboration de nouveaux capteurs appliqués au contrôle et à l'analyse des polluants chimiques de l'eau. Elle a permis d'évaluer l'élimination biologique des phosphates des eaux usées par une culture mixte isolée à partir des boues activées de la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Khenchela. L'isolement et l'identification des souches dominantes responsables de la déphosphatation sont parallèlement réalisés. On s'est intéressé aussi à l'étude et à la comparaison de la capacité des différentes souches isolées à éliminer les phosphates.

L'évaluation de la déphosphatation est réalisée par le dosage des phosphates par colorimétrie avec la méthode d'acide ascorbique. L'isolement des souches dominantes est effectué sur un milieu minimum gélosé. L'identification des souches bactériennes est réalisée à l'aide du système API 20NE-bioMérieux.

Ce travail montre la capacité du microbiote des boues activées à éliminer les phosphates, avec des taux proportionnels à la concentration initiale en source de carbone. L'utilisation d'une concentration de 5000 mg.L⁻¹ d'acétate de sodium a donné le meilleur rendement de déphosphatation qui atteint 99.23%, avec une concentration du phosphate après traitement de 0.13 mg.L⁻¹, ce qui reflète un traitement satisfaisant vu que la concentration en phosphate est dite polluante au delà de 1 mg.L⁻¹.

L'étude de l'influence de différentes sources de carbone sur la déphosphatation biologique par culture mixte montre que les acides gras volatils à courtes chaînes comme l'acétate et le lactate sont les substrats les plus favorables au processus.

La recherche des microorganismes déphosphatants dominants impliqués dans ce processus a permis d'isoler huit espèces bactériennes identifiées comme étant *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter junii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, et *Sphingomonas paucimobilis*.

Il en sort que le meilleur taux de déphosphatation par culture pure est observé avec *Acinetobacter junii* avec un taux de 76.72 %, suivi d'*Alcaligenes denitrificans* avec 70.42 %, puis de *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de l'ordre de 61.78 %, alors que *Moraxella lacunata* à présenter un taux de 50.6 %.

Mots clés : phosphates, eaux usées, épuration biologique, bactéries déphosphatantes, boues activées, culture en batch.

Devant le jury:

Président:	HOUHAMDI Moussa	Prof. Université de Guelma.
Rapporteur :	BENOUNIS Messaoud	M.C.A. Université de Khenchela.
Examineurs:	SAHEB Menouar	M.C.A. Université Oum El Bouaghi.
	DARBOUCHE Abdelhak	Prof. Université de Khenchela.
Invité:	AYACHI Ammar	M.C.B. Université de Batna.