



HAL
open science

Applications de l'analyse d'image à la caractérisation de la microfaune de stations d'épuration des eaux usées

Mauricio Alves Da Motta Sobrinho

► To cite this version:

Mauricio Alves Da Motta Sobrinho. Applications de l'analyse d'image à la caractérisation de la microfaune de stations d'épuration des eaux usées. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2001. Français. NNT : 2001INPL565N . tel-01750331

HAL Id: tel-01750331

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750331>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Institut National
Polytechnique de Lorraine

École Nationale Supérieure des Industries Chimiques

École Doctorale RP2E

U36026 8967 01 INPL 803 W
(M) 2001 DA MOTTA, M.

Applications de l'analyse d'image à la caractérisation de la microfaune de stations d'épuration des eaux usées

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 22 octobre 2001

pour l'obtention du

Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
(spécialité Génie des Procédés)

par

Mauricio DA MOTTA

M.Sc. de l'Université Fédérale de la Paraíba (Brésil)

Composition du Jury

- Président: M. C. PROST - Professeur à l'Université Henri Poincaré
- Rapporteurs: M. A. GRASMICK - Professeur à l'Université de Montpellier II
M. J. VAN IMPE - Professeur à l'Université Catholique de Louvain (Belgique)
- Examineurs: M. J.C. BLOCK - Professeur à l'Université Henri Poincaré
M. E.C. FERREIRA - Professeur à l'Université du Minho (Portugal)
Mlle. M.N. PONS - Directeur de Recherches CNRS à l'ENSIC / INPL
M. N. ROCHE - Professeur à l'Université d'Aix-Marseille
- Invité: M. H. VIVIER - Professeur à l'Université de Saint-Etienne

A mes parents,
ma famille et
mes amis

La Certitude

De tout, restent trois choses:

La certitude qu'on est toujours en train de commencer ...

La certitude qu'on doit continuer ...

La certitude qu'on sera interrompu avant de finir ...

Alors, on doit:

Faire de l'interruption un chemin nouveau ...

De la chute, un pas de danse ...

De la peur, une échelle ...

Du rêve, un pont ...

De la recherche, une rencontre ...

Fernando PESSOA

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Hans-Günther LINTZ, directeur du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (*LSGC*), pour la proposition de ce sujet de thèse qui m'a beaucoup intéressé et pour m'avoir si bien accueilli. Je suis également reconnaissant au CNPq (Brésil) et au CNRS pour leur soutien financier.

Je remercie vivement Nicolas ROCHE, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille, pour son amitié (et les blagues sur le match France 3 - Brésil 0), ses conseils, son aide précieuse et la direction de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Ma gratitude s'adresse spécialement à Marie-Noëlle PONS, Directeur de Recherche au CNRS, qui m'a également dirigé au cours de ce travail. Ses qualités humaines et scientifiques, sa passion pour la recherche et ses connaissances m'ont donné grand plaisir de travailler à ses côtés et m'ont beaucoup stimulé pour poursuivre ce chemin dans la recherche scientifique.

Je tiens à souligner ma gratitude à Alain GRASMICK, Professeur à l'Université de Montpellier II, ainsi qu'à Jan VAN IMPE, Professeur à l'Université Catholique de Louvain (Belgique), pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs.

J'adresse mes remerciements au Professeur Christian PROST, responsable de l'équipe de Génie des Traitement des Eaux du Groupe de la Réaction Chimique (*GRC*) pour m'avoir reçu au sein de cette équipe, son amitié ainsi que pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Une partie des résultats de cette thèse a été obtenue en collaboration avec l'Université du Minho à Braga (Portugal). Je voudrais remercier le Professeur Eugénio FERREIRA, pour son amitié, ses conseils et pour avoir accepté d'être membre du jury. Je tiens aussi à remercier Madalena ALVES et Manuel MOTA ainsi que Luis, Cristina, Alcina et Nicole, professeurs et thésards à cette université pour leur amitié qui a rendu mes séjours au Portugal si agréables.

J'apporte ma gratitude à Hervé VIVIER, Professeur à Université de Saint Etienne, pour ses conseils, son amitié, sa passion pour l'aviation, ainsi qu'à Jean-Claude BLOCK, Professeur à l'Université Henri Poincaré, pour avoir examiné ce rapport et accepté d'être membre du jury.

Je voudrais remercier le Professeur Abderrazak LATIFI pour son amitié et pour m'avoir accueilli au sein du groupe Traitement et Acquisition de l'information chimique Simulation et Commande des procédés (*TASC*), ainsi que tous mes autres collègues "TASCquiens" qui ont rendu mon séjour lorrain accueillant, gourmand et sympathique; citons: François, Ben, Jean-Jean, Dominique, Zaza, Seb, Virginie, Farouk, Karima, Bruno, Henda, Miro, Mélika, Jean-Pierre et Michel et mes stagiaires Marjorie et David.

J'aimerais aussi remercier la communauté des brésiliens à Nancy, qui m'ont rappelé la joie de vivre brésilienne (les barbecues, la feijoada, les caipirinhas, etc., ...) et pour l'amitié et le support qu'ils m'ont apportés : Domingos, Clara, Julia, Ricardo et Isabel; Rafael (le cinéma du mercredi), Wanesa et Arthur, Silvio (pour les œufs au champignons) Ramon (pour les cours de ski) et sa famille, Waldir (pour la musique brésilienne), Vera et leur famille; M. Roger, Mme Louise et Mme Olry (les français les plus brésiliens que j'ai connus), Fernando, Lousiane, Romulo, Osmar et sa famille; Didier, Jacinta et leur famille; Marcio et Patricia entre autres ...

Je tiens aussi à remercier des copains qui sont au Brésil, qui compte tenu du nombre ne seront pas cités ici, et Pedro, Marcos et Rosinha qui sont à l'étranger en train de préparer faire leur doctorat.

Je tiens finalement à apporter toute ma gratitude et remerciements à mes parents, Mauricy et Sylvia, ainsi qu'à mes frères, Cristiana (in memorium), Sylvio et Mauricy, pour l'amour, l'amitié, le support et sans lesquels je n'aurais pas pu faire ce travail. Aussi je remercie mes grands parents, Newton et Carmelita, Lourenço et Virgilina, Helio et Cacilda, ainsi que toute ma famille pour l'amour, l'amitié et la confiance qu'ils ont mis en moi.

Table de matières

Résumé	xi
Nomenclature	xiii
Introduction Générale	1
1. Etude Bibliographique	5
1.1. L'Épuration des Eaux Usées	6
1.1.1. L'auto-épuration	6
1.1.2. La pollution	6
1.1.3. Le processus d'épuration	6
1.1.4. L'aérobiose et anaérobiose	7
1.1.5. Cultures libres et cultures fixées	8
1.1.6. L'épuration par boues activées	9
1.1.7. Les coûts, les investissements et le financement	12
1.1.8. Les directives européennes	14
1.2. La Décantation	16
1.2.1. La décantabilité	17
1.2.2. Le décanteur	18
1.2.3. La théorie de Kynch	19
1.2.4. Les modèles de décantation	20
1.2.5. Le calcul des décanteurs	23
1.2.6. Les corrélations entre la vitesse et la concentration des boues	25
1.2.7. Les outils de caractérisation des propriétés de décantation	26
1.3. Le Flocc Bactérien	30
1.3.1. Le modèle d'attraction et de répulsion électrostatique	30
1.3.2. Le modèle du squelette filamenteux	31
1.3.3. L'effet de la présence des bactéries filamenteuses sur les floccs	32
1.3.4. Influence des paramètres de procédé et des additifs sur les floccs bactériens	33
1.3.5. Influence de la géographie	35
1.3.6. L'effet de la température sur les bactéries filamenteuses	36
1.3.7. Les effets des substrats sur les bactéries	37
1.3.8. Le contrôle du bulking	38

1.4. Les Micro-Organismes plus Evolués	41
1.4.1. Les protozoaires	41
1.4.2. Les métazoaires	45
1.5. L'Analyse de la Microfaune	46
1.5.1. Distribution de la taille des particules (<i>DTP</i>)	46
1.5.2. La microscopie	48
1.5.3. Outils à micro-échelle applicables à la microfaune	50
1.5.4. L'analyse d'image	51
1.6. Conclusions	54
2. Matériels et Méthodes	55
2.1. Réacteurs	56
2.1.1. La station de traitement des eaux usées de Nancy-Maxéville	56
2.1.2. La station de traitement des eaux usées de Braga	56
2.1.3. Les autres stations	57
2.1.4. installations pilotes	57
2.1.5. L'alimentation en "substrat synthétique"	59
2.1.6. L'alimentation en "substrat naturel"	60
2.1.7. Suivi des expérimentations	61
2.2. Systèmes d'Acquisition	63
2.2.1. Le système d'acquisition d'images de Nancy	63
2.2.2. Le système d'acquisition d'images de Braga	64
2.2.3. L'acquisition des images	64
2.3. Méthodes Analytiques	67
2.3.1. L'analyse de la composition des boues	67
2.3.2. La décantabilité	67
2.3.3. La turbidité	69
2.3.4. Sonde à biomasse	69
2.3.5. Sonde à oxygène	70
2.3.6. Distribution de la taille des particule par granulométrie laser	70
2.3.7. Spectrophotométrie U.V. d'absorption	71
2.4. Analyse d'Image	72
2.4.1. Programme FlocMorph	72
2.4.2. Programme Fond Noir	79
2.4.3. Programme ProtoRec	81
2.4.4. Programme Gram	91

2.4.5. Analyse en composantes principales	92
2.4.6. Analyse factorielle discriminante	94
3. Etude des Floccs Bactériens	97
3.1. Suivi de la Station de Nancy-Maxéville	98
3.1.1. Préliminaires	98
3.1.2. Analyse des floccs bactériens de la station de Nancy-Maxéville	100
3.2. Suivi des Stations	109
3.3. Effet du Volume du Décanteur	116
3.4. Influence de la Température de l'Inoculum	123
3.5. Comparaison entre Réacteurs	130
3.5.1. Substrat synthétique	130
3.5.2 Substrat naturel	134
3.5.2. L'état de la station d'épuration pendant la même période	139
3.6. La Coloration de Gram	141
4. Etude des Protozoaires.	145
4.1. Reconnaissance des Protozoaires (ProtoRec v.1)	146
4.2. ProtoRec v.2	152
4.3. ProtoRec v.3	159
4.3.1. Le suivi de la station de Braga	159
4.3.1. Reconnaissance des espèces par ProtoRec v.3	161
Conclusions et Perspectives	167
Références Bibliographiques	171
Annexes	

Résumé

Dans une station d'épuration d'eaux usées par boues activées on trouve un écosystème formé en majeure partie par des bactéries, protozoaires et métazoaires. Les bactéries s'agglomèrent sous la forme de floccs qui sont formés par des bactéries filamenteuses et par les exopolymères produits par les bactéries zoogléales. Un déséquilibre de concentration entre ces deux groupes de bactéries cause des dysfonctionnements tel que le bulking filamenteux et le flocc dit "tête d'épingle". Les espèces de protozoaires présents sont sensibles aux variations du procédé, ce qui en fait de bons indicateurs de l'état de la station. Afin d'automatiser les tâches de quantification de ces espèces, deux procédures par analyse d'image ont été mises en place pour le comptage des filaments et des caractéristiques morphologiques des floccs (*FlocMorph v.2*) et pour l'identification et comptage des protozoaires (*ProtoRec v.3*). Le suivi d'une grande station urbaine (Nancy-Maxéville, 350 000 équivalent-habitants) ainsi que des analyses sur 11 autres stations en France et au Portugal nous ont permis de valider la procédure *FlocMorph v.2* et de détecter les situations de crise (bulking, défloculation). En complément des expériences sur réacteur pilote ont été réalisées. Sur le réacteur pilote parfaitement agité (*RPA*), l'effet du volume du décanteur ainsi que de la température sur le comportement des bactéries a été mis en évidence. Des longueurs plus importantes de bactéries filamenteuses ont été observées pendant la période la plus froide et pendant le bulking. La comparaison du *RPA* avec un réacteur canal (*RC*) a démontré la stabilité plus importante de ce dernier par rapport au développement du bulking et de la morphologie des floccs. Des analyses multiparamétriques ont montré que l'Indice de Mohlman est une fonction de la longueur totale et du nombre des filaments et du diamètre équivalent des floccs. Les résultats obtenus par *ProtoRec v.3* sont satisfaisants puisque l'on a obtenu des indices de reconnaissance moyens de 72% pour les espèces et au-dessus de 80% pour les groupes de protozoaires. Ces outils permettent de remplacer des opérations manuelles délicates et fastidieuses réalisées par des experts, et leur implantation sur site est rapidement envisageable.

Abstract

In wastewater treatment plants by activated sludge, a large part of ecosystem consists in bacteria, protozoa and metazoa. Bacteria are agglomerated in floccs, formed by filamentous bacteria and by exopolymers produced by zooglycal bacteria. A misbalance between these two bacterial groups induces malfunctions such as filamentous bulking or "pin-point" flocc formation. Protozoa are sensitive to process perturbations, which make them good indicators of the plant state. In order to automate the quantification of those species, two image-analysis procedures have been developed, to count filaments and characterise the morphology of floccs (*FlocMorph v.2*) and to identify and count protozoa (*ProtoRec v.3*). The procedure *FlocMorph v.2* has been validated through the monitoring of a large municipal wastewater treatment plant (Nancy-Maxéville, 350 000 equivalent people) and by samples collected in 11 plants in France and Portugal. Critical situations such as bulking and deflocculation can be detected. Moreover, pilot-scale experiments have been performed. On a well-stirred tank (*RPA*), the effect of the clarifier size as well as of the temperature on the behaviour of bacteria has been shown. Filamentous bacteria are longer during the cold period and during bulking. By comparing the *RPA* with a channel-type reactor (*RC*) it could be shown that the latter is more stable with respect to bulking and flocc morphology. Multi-parameter analysis has shown that the Sludge Volume Index is function of the number and total length of filaments and of the flocc equivalent diameter. The results obtained with *ProtoRec v.3* are satisfactory as average recognition rates of 72% for protozoa species and larger than 80% for protozoa groups have been obtained. These tools can replace delicate and tedious manual operations done by experts and their on-site implementation can be rapidly considered.

Introduction Générale

*"Les vieux croient tout,
Les gens d'âge moyen soupçonnent tout,
Les jeunes savent tout"*

OSCAR WILDE

Le traitement et le recyclage des résidus produits par l'humanité sont essentiels pour un développement durable de la planète. Au début du millénaire passé la population était fixée essentiellement dans les campagnes. Les hommes vivaient généralement dans de petites villes, sans problème "apparent" de pollution. Quelques grandes villes de l'antiquité connaissaient déjà des réseaux de distribution et de collecte d'eaux. On peut citer à cet effet les fameux aqueducs romains, les fontaines et bains publics, qui démontrent ainsi une préoccupation pour l'hygiène personnelle dès cette époque.

C'est avec la révolution industrielle que la population commença à se rassembler autour des villes, cherchant de meilleures conditions de vie et des emplois. La concentration et le volume des polluants commencèrent à augmenter et l'auto-épuration du milieu naturel ne fut plus suffisante. Les eaux usées étaient rejetées principalement dans les rues et de nombreuses épidémies frappèrent les populations. A Paris, les premiers égouts couverts sont apparus en 1371, mais la construction des égouts souterrains n'a eu lieu qu'à partir de 1850, suite à l'épidémie de choléra de 1832.

Le traitement des eaux usées peut être réalisé par des processus physico-chimiques, biologiques ou mixtes. Les processus biologiques fonctionnent, suivant la concentration en oxygène dissous, en aérobiose, anaérobiose et anoxie, la biomasse étant libre ou fixée. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au procédé par boues activées en aérobiose et à culture libre: ce procédé est l'un des plus répandus pour le traitement des eaux usées, domestiques ou industrielles dans les agglomérations moyennes et grandes.

D'une façon simple on peut dire que le traitement des eaux usées par boues activées consiste en un bassin d'aération, où les micro-organismes (essentiellement bactéries et protozoaires) sont mis en contact avec l'eau usée à épurer et d'un décanteur où l'on sépare l'eau épurée de la biomasse.

Motivation

La séparation entre la biomasse et l'eau épurée est le point le plus sensible d'une station d'épuration. Il s'y produit malheureusement nombre de dysfonctionnements qui peuvent compromettre le fonctionnement de toute la station d'épuration. Les dysfonctionnements les plus communs sont: le bulking filamenteux (gonflement des boues), le moussage et le floc "tête d'épingle" (cf. Chapitre 1).

Le bulking filamenteux se produit quand il y a un déséquilibre entre les espèces de bactéries (zoogléales et filamenteuses) présentes dans les bassins. Un développement excessif des bactéries filamenteuses provoque une réduction de la vitesse de décantation empêchant la séparation de la biomasse de l'eau épurée et pouvant provoquer l'arrêt complet de la station d'épuration. Ce phénomène est la principale cause des problèmes liés au fonctionnement des stations. Comme le bulking, le moussage se développe à cause d'une présence excessive des bactéries filamenteuses, mais dans ce cas la gêne occasionnée est le débordement du réacteur biologique et la perte de biomasse. Le phénomène du floc de "tête d'épingle", ou formation de floccs de dimensions très petites, cause une perte de biomasse par la surverse du clarificateur, ce qui compromet la qualité de l'effluent final, mettant en danger le milieu récepteur.

La quantification des organismes filamenteux se fait généralement manuellement. C'est une tâche pénible qui demande beaucoup de temps aux opérateurs. De plus les résultats sont souvent présentés en classes d'abondance dont l'attribution est très subjective.

Le développement initial de ce travail a été basé sur les publications du groupe de Vanrolleghem et Verstraete entre 1995 et 1996 sur la quantification des paramètres morphologiques des floccs par analyse d'image. Ils ont utilisé un grossissement moyen qui leur permettait d'avoir une bonne visualisation des floccs bactériens, mais ils ne pouvaient pas analyser les bactéries filamenteuses.

Compte tenu de ces difficultés, il a été décidé de développer une procédure d'analyse d'image qui puisse permettre une quantification des bactéries filamenteuses de façon plus exacte et rapide et en même temps qui fournisse des informations sur la structure des floccs de bactéries. Du fait de la large utilisation de l'analyse d'images en biotechnologie pour la caractérisation des bactéries et champignons filamenteux, ce défi semblait réaliste même si, comme on peut le voir sur la Figure 1, l'allure générale des cultures pures de micro-organismes filamenteux est assez différente de celle des boues activées. Le résultat en est le programme FlocMorph, qui permet de mettre en évidence l'imminence des phénomènes de bulking et de moussage, mais aussi les problèmes de défloculation qui peuvent provoquer la formation des floccs "tête d'épingle".

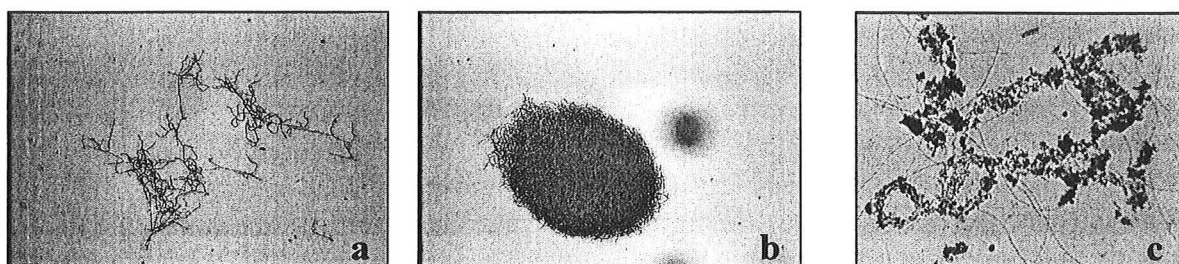


Figure I - Filaments (a) et "pelote" (b) de *Streptomyces ambofaciens* (culture pure); Boues activées (c)

Les bactéries font partie d'un édifice biologique complexe dans le bassin d'aération avec des relations de prédation, compétition et cannibalisme. Les bactéries sont les principales responsables de l'épuration biologique des eaux usées et sont présentes en plus forte concentration, mais les protozoaires, qui sont des micro-organismes plus évolués que les bactéries, ne doivent pas être négligés. Ils sont classés en flagellés, sessiles et amibes. Les sessiles sont généralement le groupe prédominant. Grâce à leur sensibilité aux conditions du milieu dans lequel ils se trouvent, les protozoaires sont des indicateurs de l'état biologique du bassin d'aération. Pour évaluer cet état plusieurs indices ont été développés à partir de l'analyse de l'espèce dominante. Mais la quantification et l'identification des espèces sont des tâches effectuées manuellement par des spécialistes et qui requièrent beaucoup de temps.

Il a alors été décidé de développer un outil par analyse d'image pour l'identification et quantification automatique (ou semi-automatique) afin de faciliter cette tâche fastidieuse, permettant ainsi sa diffusion dans les stations d'épuration. Il s'agit d'un projet ambitieux, réalisé en partenariat avec l'équipe du Département de Génie Biologique de l'Université du Minho, à Braga (Portugal).

Plan de l'étude

Le premier chapitre de ce mémoire présente une brève introduction de l'épuration biologique des eaux usées, suivie d'un exposé sur le principe de la décantation et des outils habituellement utilisés pour la caractériser. Les troisième et quatrième parties de ce chapitre introduisent le lecteur à l'univers des bactéries et protozoaires. Enfin la dernière partie présente les outils de la caractérisation de la microfaune.

Dans le deuxième chapitre les matériels et méthodes employés pour la réalisation de cette étude sont présentés. Dans un premier temps on présente les réacteurs étudiés, puis on décrit les systèmes d'acquisition d'images utilisés ainsi que la procédure pour la réaliser et les méthodes analytiques nécessaires aux suivis des expériences. Les programmes d'analyse d'image développés ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour traiter les résultats de ces programmes sont finalement présentés.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la microfaune bactérienne par analyse d'image, à l'aide des trois programmes développés (ProtoRec, FondNoir et Gram). La caractérisation des floccs et des bactéries filamenteuses par FlocMorph et FondNoir a tout d'abord été validée sur un site réel, la station de traitement des eaux usées de Nancy-Maxéville (cf. Chapitre 3.1). Puis, pour vérifier la robustesse de la démarche, celle-ci a été appliquée à un ensemble de 12 stations d'épuration différentes, présentant une grande variabilité de conditions de fonctionnement (cf. Chapitre 3.2).

Si l'application à une situation réelle est un passage obligé, le bon fonctionnement des installations ne permet pas toujours d'obtenir les dysfonctionnements souhaités pour la validation complète des procédures. Pour cette raison, des expériences ont été réalisées sur les installations pilote, dans des conditions opératoires favorables au développement excessif des bactéries filamenteuses (cf. Chapitres 3.3 à 3.5)

Si dans un premier temps, on s'est efforcé de rendre la préparation des échantillons la plus simple possible (état frais entre lame et lamelle, sans coloration), il est légitime de se demander si on ne peut pas aller plus loin qu'une simple caractérisation morphologique. Une

identification plus précise des bactéries requiert des techniques de coloration, dont l'une des plus simples est la coloration de Gram. Afin d'estimer sa difficulté de mise en œuvre en routine, un applicatif (Gram) a été développé et testé (cf. Chapitre 2.4.4)

Enfin, le quatrième chapitre est dédié à l'étude des protozoaires et métazoaires présents dans les bassins biologiques. L'évolution du programme de reconnaissance automatique développé en collaboration avec l'Université du Minho est présenté avec les problèmes rencontrés et les solutions mises en œuvre pour améliorer ses performances. Des suivis des populations de protozoaires des stations d'épuration de Nancy-Maxéville et de Braga sont présentés avec une interprétation des résultats obtenus.

Chapitre 1

Revue Bibliographique

*"Ceux qui sont férus de pratique sans posséder la science
sont comme un pilote qui s'embarque sans timon ni boussole,
et ne saurait jamais avec certitude où il va"*

LEONARDO DA VINCI

La revue bibliographique, à laquelle est consacré ce chapitre, est divisée en cinq parties. La première est une introduction aux systèmes d'épuration, conduisant le lecteur jusqu'au procédé de traitement des eaux usées par boues activées. Ensuite quelques informations sur les coûts de fonctionnement ainsi que sur les nouvelles directives européennes sur l'eau usée sont données.

La deuxième partie (1.2) traite de la décantation, des décanteurs et de leur conception. On présente pour cela les modèles de décantation et les corrélations entre la vitesse de décantation et la concentration des boues. Enfin les outils qui permettent d'évaluer les propriétés de décantation sont décrits.

Les bactéries isolées ou sous forme de floccs sont présentées dans la troisième partie (1.3). On commence avec les modèles de formation des floccs bactériens et l'effet de la présence des bactéries filamenteuses sur les floccs et sur le procédé d'épuration. Ensuite on présente l'influence des paramètres de procédé sur les floccs. Pour conclure, on résume les connaissances sur la variabilité géographique ainsi que sur les effets de la température et des substrats sur les bactéries et les actions pour contrôler le développement du bulking filamentueux

Le sous-chapitre 1.4 est dédié aux protozoaires et métazoaires. Des informations qu'ils apportent en temps que groupe ou espèce sur l'état biologique de la station sont ici présentées.

La dernière partie (1.5) présente des outils qui permettent la caractérisation et l'analyse de la microfaune d'une échelle macroscopique à une échelle moléculaire.

1.1. L'Épuration des Eaux Usées

Le processus d'épuration consiste essentiellement en une oxydation de la matière organique en gaz carbonique. Pour cela on peut utiliser le métabolisme des micro-organismes ou encore des moyens physico-chimiques. Dans ce chapitre, on se limitera à l'étude de l'épuration biologique.

1.1.1. L'auto-épuration

La nature est-elle capable d'éliminer la pollution ? Oui, le pouvoir auto-épurateur du milieu naturel est connu et applicable lorsque l'on a une faible concentration en polluant. La croissance des activités humaines a provoqué une forte augmentation de cette concentration et de son débit d'une façon telle que le milieu naturel récepteur n'est plus capable de l'absorber à lui seul.

Aujourd'hui on utilise encore des rivières et lagunes, lorsque la concentration et le débit en pollution ne dépassent pas leur capacité auto-épuration. Car lorsque cela arrive, on peut observer des dégagements de gaz nauséabonds dus au développement de processus anaérobies et la mort de la faune aérobie par manque d'oxygène.

Pour obtenir une épuration naturelle, par lagunage par exemple, on doit avoir une surface suffisante, variable selon la nature du sol ou plan d'eau, la latitude (influence des rayonnements solaires sur la production d'oxygène nécessaire à l'oxydation), la température, etc. L'ordre de grandeur de cette surface est d'une dizaine de mètres carrés par habitant; on ne peut utiliser ces techniques épuratrices naturelles que lorsque la densité de la population et l'activité industrielle sont faibles (Brouzes, 1973).

1.1.2. La pollution

La pollution dissoute peut être évaluée par la quantité d'oxygène nécessaire à son oxydation. Avant la révolution industrielle, cette pollution était constituée en grand partie de résidus alimentaires. Pour l'exprimer, on utilise la Demande Biochimique en Oxygène (*DBO*), qui représente la quantité nécessaire d'oxygène pour oxyder toute la matière organique biodégradable. Pour cela, on considère généralement que cinq jours sont suffisants à cette oxydation de la pollution carbonée et qu'ils permettent de ne pas prendre en compte les phénomènes beaucoup plus lents tels que la nitrification: on obtient alors la *DBO₅*.

A partir de la fin du XIX^e siècle, d'autres polluants ont été peu à peu rejetés. Ces polluants contiennent des éléments organiques qui ne sont pas oxydables par les micro-organismes. Pour mesurer cette pollution on utilise la Demande Chimique en Oxygène (*DCO*) qui représente la pollution organique totale. La différence entre la *DCO* et la *DBO₅* est constituée essentiellement par la pollution peu ou pas biodégradable.

1.1.3. Le processus d'épuration

L'épuration des eaux usées peut être réalisée par voie physico-chimique ou biologique. Le choix doit prendre en compte le type d'effluent à traiter, sa biodégradabilité, les toxiques

présentes, la production des boues, etc. Du fait de son coût de fonctionnement bas et de sa simplicité opérationnelle, l'épuration biologique est en général choisie pour le traitement des effluents urbains et pour quelques effluents industriels.

Dans la majorité des cas, on met un pré-traitement physique des effluents pour enlever les grosses particules (dégrillage), les sables (dessableurs) et les huiles et particules flottantes (déshuileur). Après ces pré-traitements, il est parfois nécessaire d'effectuer d'autres traitements chimiques, pour, par exemple, neutraliser des effluents acides ou alcalins ou éliminer des substances toxiques. Cette étape de pré-traitement est généralement suivie d'un traitement, dit primaire, permettant d'éliminer une grande partie de la pollution non dissoute (Matières En Suspension, *MES*) par simple décantation gravitaire. Ce traitement est précédé dans certains cas par une étape de coagulation-floculation.

Après ces premières opérations, l'eau contient en grande partie des matières carbonées, azotées, phosphatées et d'autres éléments minéraux (potassium, calcium, etc.). La plus grosse partie de ces matières sera consommée par la microfaune existante dans le bassin biologique, lorsque la station d'épuration (*STEP*) est en bon état de fonctionnement. Une partie des molécules va diffuser directement à travers la paroi cellulaire des bactéries et les autres sont préalablement hydrolysées par une action enzymatique bactérienne. Les éléments nutritifs sont métabolisés à l'intérieur de la cellule, produisant ainsi de l'énergie (sous forme d'adénosine triphosphate – *ATP*) et de nouvelles cellules bactériennes (protoplasme).

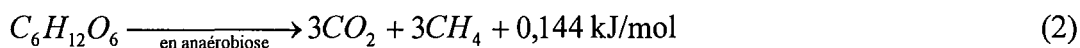
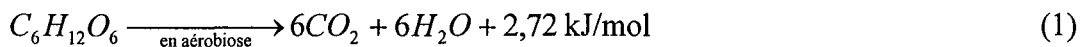
1.1.4. L'aérobiose et anaérobiose

Selon l'utilisation de l'oxygène le traitement des eaux usées peut être réalisé de deux façons : en aérobie ou en anaérobie. L'aérobiose utilise l'oxygène comme capteur d'électrons nécessaire pour les réactions d'oxydoréduction, l'associant au carbone et à l'hydrogène pour produire du gaz carbonique et de l'eau. Cette voie sera étudiée plus en détail dans ce chapitre pour le cas des boues activées.

Les procédés anaérobies éliminent la pollution carbonée organique sous la forme de gaz carbonique (CO_2) et de méthane (CH_4), la pollution azotée sous celle d'ammoniac (NH_3) et le soufre principalement sous celle d'hydrogène sulfureux (H_2S). Le lecteur trouvera dans Moletta (1996) le descriptif des différentes technologies utilisées en digestion anaérobie.

La première activité qui se met en place, dans le processus anaérobie, est l'hydrolyse (dans le cas de matière particulaire) et l'acidogénèse réalisée par des bactéries hydrolytiques et fermentatives, ce qui conduit à la formation de molécules intermédiaires comme des acides gras volatils, des alcools et des gaz, tel que le gaz carbonique et l'hydrogène. Les molécules solubles servent de substrat aux bactéries acétogènes dites *OHPA* (Obligate Hydrogen Producing Acetogen) pour générer de l'acétate, du gaz carbonique et de l'hydrogène: ces composés sont consommés par des bactéries méthanogènes, dites acétoclastes pour celles qui transforment l'acétate en méthane et gaz carbonique, et hydrogénophiles pour celles qui utilisent l'hydrogène et le gaz carbonique pour produire du méthane et de l'eau (Moletta, 1996). Le Mémento Technique de l'Eau (Degrémont, 1989) détaille chaque étape de la dégradation en anaérobiose et présente les particularités des bactéries méthanogènes comme leur fluorescence due au facteur co-enzyme F420.

Les équations ci-dessous représentent les réactions de dégradation du glucose, et ses apports énergétiques en aérobose d'une part et en anaérobose d'autre part :



L'écriture de ces deux réactions nous montre bien que la réaction par aérobose apporte plus d'énergie. Il y a une corrélation directe entre l'apport d'énergie et la production de biomasse. Il apparaît donc évident que les procédés anaérobies produisent moins de biomasse en excès que les procédés aérobies. On trouve dans le Tableau 1.1.1 une comparaison entre ces deux voies.

Tableau 1.1.1 - Comparaison entre l'aérobose et l'anaérobose (d'après Brouzes, 1973)

	Type de Traitement	
	Aérobie	Anaérobie
Âge moyen de la biomasse (ordre de grandeur)	1 à 5 jours	10 à 30 jours
Aération à fournir	0,5 à 2 kg d'oxygène par kg de DBO.	Néant
Gaz Produit	CO ₂ (peu gênant en milieu aéré)	CO ₂ et CH ₄ (inflammable et combustible)
Contrôles importants	Aérobose (oxygène dissous)	Acides gras volatils (pH)
Chauffage	Pas nécessaire au-dessus de 5°C	Optimum à 35 °C pour les mésophiles et 55°C pour les thermophiles
Mode de construction usuel	Cuve ouverte à l'atmosphère	Cuve fermée

Les cultures aérobies sont particulièrement appropriées pour des concentrations en matière organique comprises entre 50 et 4000 mg/L de DCO. Pour des concentrations plus faibles, l'adsorption sur charbon actif est plus économique. Pour des concentrations supérieures à 4000 mg/L en DCO, on utilise fréquemment un pré-traitement anaérobie suivie d'une opération aérobie (Beccari, 1998).

1.1.5. Cultures libres et cultures fixées

Les cultures bactériennes peuvent être mises en œuvre de différentes façons. En général elles sont classifiées en cultures fixées et cultures libres.

Dans les cultures libres, les bactéries sont dispersées au sein du liquide sous la forme de floccs bactériens. Pour les maintenir en suspension le bassin est agité. Pour les cultures aérobies libres (boue activée, lagunage) on utilise les outils d'oxygénation du bassin (insufflation d'air, turbines de surface, etc.) pour assurer la brassage et le maintien en suspension des floccs bactériens. Dans le cas des lagunes aérées naturellement, la vitesse de l'air et la convection naturelle sont souvent suffisantes. Pour les procédés anaérobies (lit de boue et lagunage

anaérobie), on utilise le brassage mécanique ou l'insufflation de gaz de digestion. Les procédés à cultures libres ont l'avantage de la simplicité, mais ils sont limités en concentration de biomasse (de 2 à 5 g/L en général) et exigent ainsi des ouvrages de grand volume.

Dans les procédés à cultures fixées, la masse bactérienne se fixe sur un support rigide grâce notamment aux exopolymères produits par les bactéries. Le contact entre le biofilm formé sur le support et l'eau à épurer peut être réalisée par arrosage (lits bactériens) ou en faisant tourner les supports dans l'eau (biodisques bactériens ou tambours tournants). Ainsi comme pour les cultures libres, ces procédés peuvent être aérobies ou anaérobies et la biomasse en excès doit être enlevée et traitée. Contrairement aux cultures libres, les procédés à biomasse fixée permettent des concentrations en biomasse plus importantes (de l'ordre de 40 g/L), réduisant ainsi la taille des installations.

1.1.6. L'épuration par boues activées

Le lagunage est apparemment la plus ancienne méthode d'épuration biologique aérobie. Ces procédés ont été déjà utilisés dans la Chine Antique. Les lits bactériens ont été utilisés pour régler (ou tenter régler) les problèmes de santé qui sont apparus dans les zones urbaines au moment de la révolution industrielle en conséquence de l'augmentation de la démographie dans ces sites. C'est seulement au début du XX^e siècle (en 1916 à Manchester) qu'est apparu le traitement par boues activées.

Ce procédé consiste en mettre l'eau à épurer en contact avec une forte concentration en micro-organismes qui vont digérer la matière carbonique, produisant de l'eau et du gaz carbonique, et éliminer d'autres composés tels que les composés azotés et phosphatés. Dans le bassin d'aération, les bactéries se trouvent en suspension sous forme de floccs bactériens formant un écosystème complexe avec des protozoaires et des métazoaires. C'est dans ce bassin que se produit la biodégradation de la matière organique par les micro-organismes. Ensuite, on sépare la biomasse épuratrice de l'eau épurée par simple décantation gravitaire. Pour cela on utilise un clarificateur (décanteur secondaire), où l'on récupère les boues concentrées au fond de l'ouvrage et l'eau traitée en surverse. L'eau épurée peut être ainsi envoyée vers le milieu naturel sans perturber son écosystème. Une grande partie des boues (~97%) retournera en tête du bassin d'aération de façon à maintenir une concentration en biomasse stable et suffisante. Le reste (~3%) sera extrait (boues en excès) et traité spécifiquement par la suite avec les boues produites dans l'étape du traitement primaire (traitement des boues).

Sur la Figure 1.1.1, on présente un schéma simplifié d'un système d'épuration par boues activées, composé essentiellement par :

- un bassin d'aération, où l'oxygène (utilisé comme capteur d'électrons), et l'eau à épurer (qui contient des matières susceptibles d'être oxydées) vont être en contact avec les micro-organismes épurateurs.
- un système de brassage et d'oxygénation pour le bassin, fournissant l'oxygène pour les réactions métaboliques, maintenant les boues en suspension et assurant un bon contact entre l'eau et les micro-organismes. En général le système d'oxygénation assure les deux fonctions d'aération et de brassage.
- un clarificateur, où l'on sépare l'eau de la biomasse.
- un système de recirculation et d'extraction de boues.

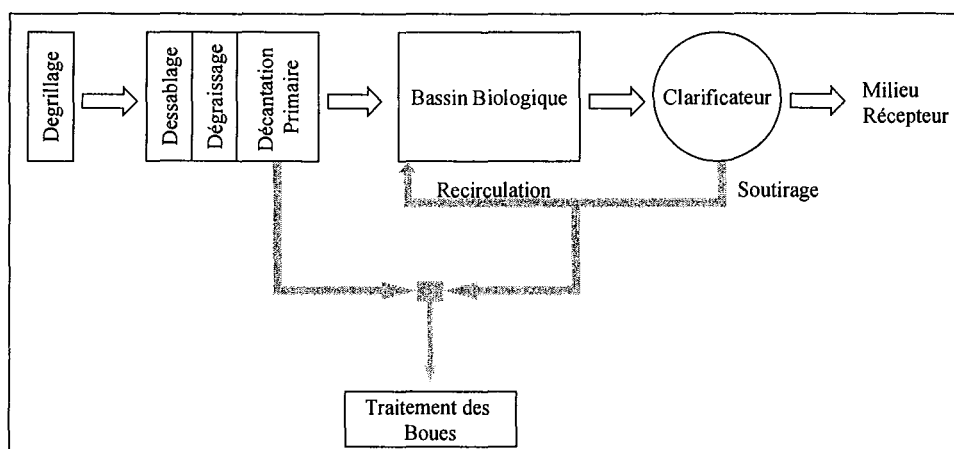


Figure 1.1.1 - Schéma "classique" d'une station de traitement des eaux usées par boues activées.

De nombreuses variantes de ce procédé ont été réalisées dans le but d'améliorer le temps de contact, de diminuer le temps de séjour ou de réduire la production de boues en excès. A titre d'exemple, on trouve sur la Figure 1.1.2 des schémas de procédé par boues activées avec alimentation étagée et avec contact-stabilisation (Elmaleh, 1996).

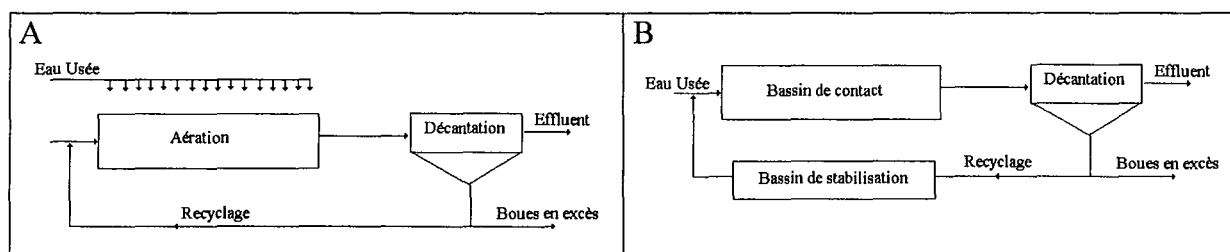


Figure 1.1.2 - Procédés par boues activées avec aération étagée (A) et avec contact-stabilisation (B)

Sur la totalité de la matière biodégradable présente dans le bassin d'aération, une partie sera consommée par les bactéries produisant ainsi de l'énergie pour la respiration (oxydation de cette matière) et la division cellulaire et une autre partie pour la synthèse de cellules, de substances de réserve et d'autres produits microbiens. Il est difficile de mesurer précisément la quantité de boues activées présentes: en général on mesure les concentrations en matières en suspension (*MES*) et en matières volatiles (*MV*). Dans les calculs, on prend généralement la valeur de la concentration en matière en suspension pour la concentration en boues activées. Sans grande erreur on peut associer la fraction organique composant les flocs bactériens aux matières volatiles et la fraction minérale des flocs à la différence entre les matières en suspension et les matières volatiles.

La synthèse du protoplasme est appelée anabolisme et sa consommation, quand il n'y a plus de substrat rapidement biodégradable, est appelée catabolisme (respiration endogène). Pendant l'assimilation du protoplasme des sels minéraux sont libérés. Ces sels doivent être éliminés pour éviter l'eutrophisation (prolifération exagérée des plantes, causée par la grande concentration de nutriments, qui déséquilibre l'écosystème) du milieu récepteur de l'eau épurée. L'anabolisme et le catabolisme utilisent l'oxygène pour l'oxydation des matières et la production d'énergie. L'ensemble de ces réactions est appelée respiration.

Les micro-organismes ne consomment pas seulement la pollution biodégradable, mais ils peuvent aussi concentrer les polluants. Les ions de 10^{-7} à 10^{-5} mm sont fixés par les bactéries de taille d'environ 10^{-3} mm. Les protozoaires (taille comprise entre 10^{-2} et 10^{-1} mm) présents

dans et à la surface des floes vont s'alimenter d'une partie de ces bactéries. Les floes bactériens ont généralement des dimensions comprises entre 0,1 et 1 cm (Brouzes, 1973).

Afin de caractériser le fonctionnement des stations d'épuration il est usuel de calculer les charges massique et volumique. La charge massique est le rapport entre le flux massique de matière biodégradable entrant par jour dans la station d'épuration et la masse totale de boues activées présentes dans le bassin d'aération. La charge volumique est le flux quotidien de pollution ramené à l'unité de volume du réacteur biologique. Une classification du fonctionnement des STEP selon les charges appliquées est proposée dans le Tableau 1.1.2 .

Tableau 1.1.2 - Classification et caractéristiques des procédés à boues activées pour eaux urbaines (Forster, 1977).

		Faible Charge	Moyenne Charge	Forte Charge
Charge volumique	kg DBO ₅ / m ³ .j	0.125 – 0.5	0.6 – 1.6	2 – 6
Charge massique	kgDBO ₅ /kgMES.j	0.02 – 0.1	0.2 – 0.5	1.5 – 5
Temps de passage	h	12 h – plus. jours	2 – 4	2 – 3
Consommation d'O ₂	kg O ₂ / kg DBO ₅	1.5 – 2	0.5 - 1	0.3 – 0.5
Production de boues	kgMES / kg DBO ₅	0.15	0.55	0.75
Taux de recyclage		>0.95	0.85 – 0.95	0.6 – 0.75

La basse production de boues en excès à faible charge est due à une limitation de nutriments, qui stimule la respiration endogène et favorise ainsi la minéralisation des boues. Le rendement d'épuration est lié au temps de séjour hydraulique et à la charge massique, une faible charge massique autorisant une consommation plus importante de la pollution.

L'évolution d'une culture bactérienne est divisée en cinq phases (Degrémont, 1989):

- latence : adaptation au milieu sans reproduction cellulaire. Des enzymes utilisés pour la métabolisation des substrats sont produites.
- croissance exponentielle : dans cette phase, s'il n'y a pas de limitation en substrat, la reproduction cellulaire atteint son niveau maximal. La vitesse de croissance augmente proportionnellement à la concentration des bactéries.
- croissance ralentie : l'indisponibilité d'un ou plusieurs substrats ou la présence d'inhibiteurs réduisent la vitesse de croissance.
- stationnaire : suite à l'épuisement des substrats, la croissance s'arrête et on atteint la concentration maximale en bactéries.
- décroissance (ou état endogène) : du fait de l'autolyse des cellules, la concentration en bactéries diminue et le taux de mortalité augmente avec le temps.

Pendant la phase de croissance exponentielle, les bactéries restent dispersées et dans la phase de croissance ralentie elles s'agglomèrent en floes. Même quand il y a assimilation du protoplasme, les floes subsistent encore.

Un des paramètres principaux dans le traitement des eaux usées est l'âge des boues. Certains auteurs définissent l'âge des boues comme le rapport entre la quantité de boue présente dans le bassin sur la quantité produite journalièrement, d'autres comme le rapport entre la quantité totale et la quantité extraite chaque jour. Ces deux définitions se rejoignent néanmoins puisque l'extraction des boues a pour but de maintenir la concentration constante, donc d'extraire la quantité de boues produites.

Si on suit l'évolution du pourcentage des protozoaires en fonction de l'âge des boues, le minimum se trouve entre quatre et neuf jours. Au dessus de neuf jours d'âge des boues, la décantabilité des boues dans le clarificateur reste bonne dans l'ensemble, mais on peut commencer à observer des phénomènes de défloculation. Au-dessous de quatre jours les floes très hydrophiles ne décantent pas bien et on note une rapide augmentation de la population des micro-organismes libres dans le bassin d'aération (Degrémont, 1989)

1.1.7. Les coûts, les investissements et le financement.

Le problème de la pollution est plus critique dans les grands centres urbains où la densité de population ne cesse d'augmenter. Dans les grandes villes françaises, cette densité a augmenté de 53% entre 1936 (475) et 1990 (729) pendant que la moyenne nationale française n'a, elle, augmenté que de 35% (104 habitants par kilomètre carré en 1990).

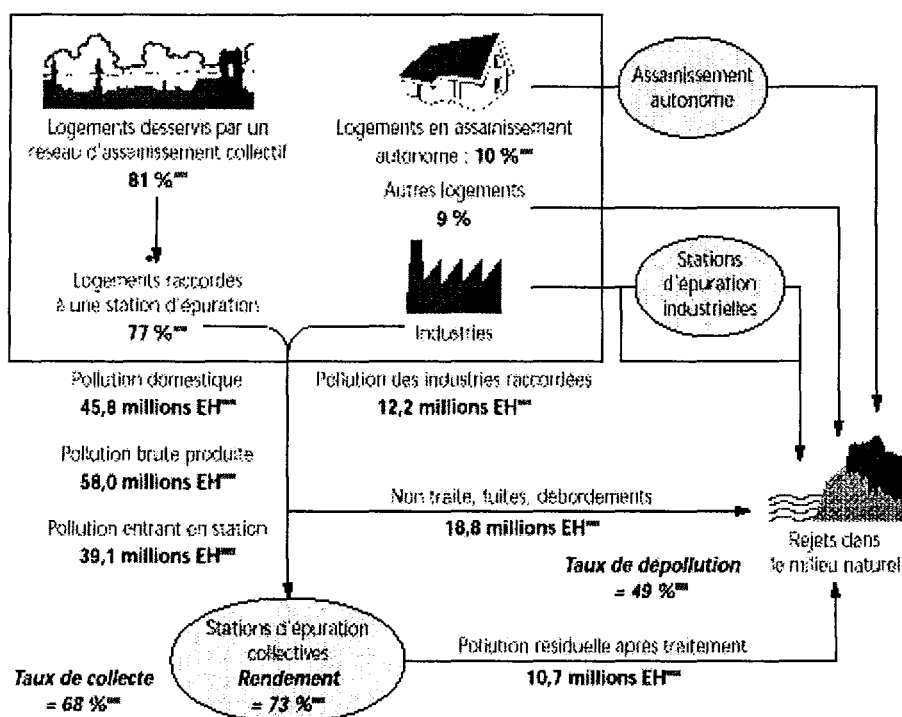


Figure 1.1.3 - L'assainissement et le traitement des matières dégradables en France (Source Institut Français de l'Environnement (IFEN))

Selon un rapport de l'Institut Français de l'Environnement (IFEN) en 1996, les stations d'épuration en France ont éliminé 49% de la pollution brute en matière organique produite dans les 640 principales agglomérations (agglomérations de plus de 10.000 EH représentant 62% de la population française) en 1996 (Figure 1.1.3).

Les dépenses nationales concernant la gestion des eaux usées correspondait à 42% du budget total français pour la protection de l'environnement en 1997 (Figure 1.1.4), ce qui équivaut à une dépense de plus de 150 € par an et par habitant. Le prix de cette facture est payé par l'eau consommée, sur le principe "l'eau paie l'eau". A titre d'exemple, pour le bassin Rhin-Meuse, presque un tiers du prix du m³ d'eau potable (15.86 FHT, soit 2.42 € HT) est destiné au service d'assainissement pour l'entretien du réseau de collecte et l'épuration.

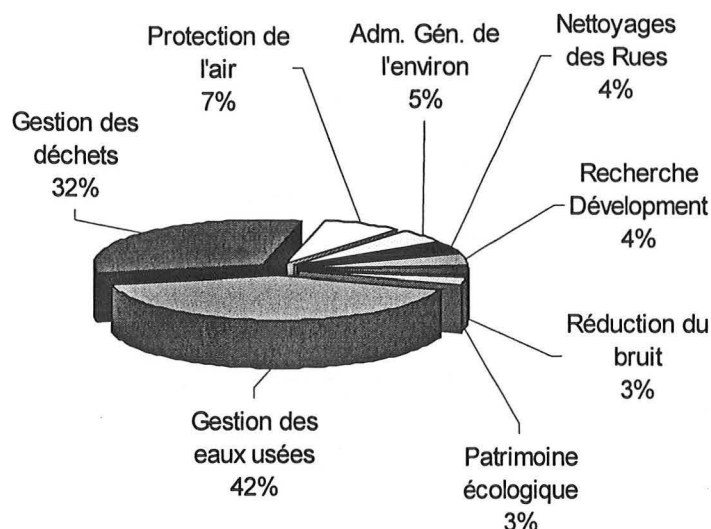


Figure 1.1.4 - Répartition de la dépense nationale de la protection de l'environnement en 1997 (source Institut Français de l'Environnement (IFEN))

Les coûts de fonctionnement de ces stations varient selon le procédé utilisé et les contraintes de sol et de site (odeurs, esthétique, bruit, qualité de l'effluent final), du type de réseau (séparatif ou unitaire), des effluents à traiter ainsi que de la charge et ses variations quotidiennes et saisonnières. Dans une analyse de l'agence de l'eau Adour-Garonne (1995) sur 59 stations, une moyenne de 95.43 €/équivalent habitant (EH) a été obtenue pour les coûts généraux de construction, avec un coefficient de variation de 47%.

Les coûts de fonctionnement d'une station d'épuration des eaux usées par voie biologique, peuvent être répartis en quatre postes (Figure 1.1.5):

- traitement de l'eau (arrivée, relevage, pré-traitement et traitement biologique),
- traitement des boues,
- traitement de l'air,
- services généraux (électricité, chauffage, liaisons hydrauliques, etc.).

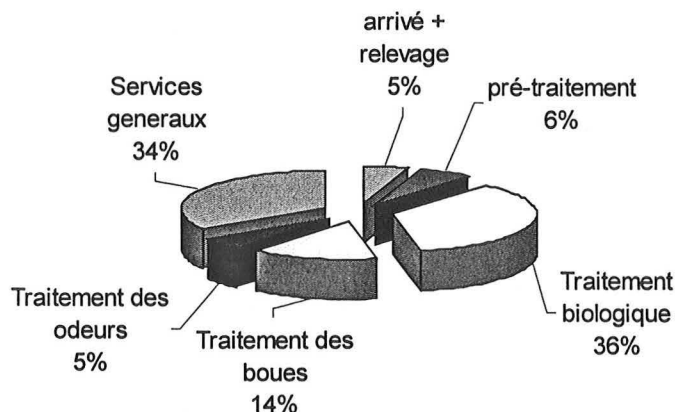


Figure 1.1.5 - Répartition des coûts dans une station d'épuration par boues activées.

La consommation d'eau et la composition des effluents sont influencées par de très nombreux facteurs économiques et géographiques. Une approximation de la consommation d'eau selon la taille de l'agglomération est donnée par Dauphin (1998) :

- moins de 10 000 usagers → 180 L/habitant jour
- entre 10 000 et 50 000 usagers → 200 L/habitant jour
- plus de 50 000 usagers → 250 L/habitant jour

Le Tableau 1.1.3 présente la composition moyenne des effluents en France.

Tableau 1.1.3 - Composition moyenne des effluents en France (d'après Dauphin, 1998)

Paramètres		Variations
pH		7.5 à 8.5
Extrait Sec	(mg/L)	1000 à 1300
MES totales	(mg/L)	100 à 400
DBO ₅	(mg/L)	150 à 500
DCO	(mg/L)	300 à 1000
COT	(mg/L)	100 à 300
NTK	(mg/L)	30 à 100
N-NH ₄ ⁺	(mg/L)	20 à 80
N-NO ₂ ⁻	(mg/L)	< 1
N-NO ₃ ⁻	(mg/L)	< 1
Détergents	(mg/L)	6 à 13
P _T	(mg/L)	10 à 25

1.1.8. Les directives européennes

Une directive européenne relative aux eaux urbaines résiduaires a été adoptée par le Conseil des Ministres de la Commission Economique Européenne le 21 mai 1991. Cette directive régleme les niveaux des rejets des stations d'épuration des eaux usées urbaines (Tableau 4) et a fixé des dates limites de mise aux normes. Pour les stations de plus de 15 000 équivalent-habitant (EH) cette limite est fixée au 31/12/2000 et pour les stations de taille inférieure au 31/12/2005.

Tableau 1.1.4 - Limites de rejets pour toutes les zones

Paramètre	Concentration Maximale	Rendement Minimum
DBO ₅	25 mg/L O ₂	70 - 90 %
DCO	125 mg/L O ₂	75 %
MES (facultatif)	35 mg/L	90 %

Cette directive a aussi défini des zones sensibles, pour lesquelles il est nécessaire de maîtriser les rejets en pollution azotée et en phosphore (Tableau 1.1.5) .

Tableau 1.1.5 - Limites de phosphore et d'azote pour les zones sensibles

Paramètre	Concentration	Rendement Minimum
Phosphore Total (P_T)	En moyenne annuelle 1 mg/L pour les stations au-dessus de 100 000 équivalent - habitant et 2 mg/L pour celles au-dessous	80 %
Azote Total (NGL)*	En moyenne annuelle 10 mg/L pour les stations au-dessus de 100 000 équivalent - habitant et 15 mg/L pour celles au-dessous ou 20 mg/L en moyenne journalière.	70 -80 %

* NGL correspond à l'azote total ou global, c'est-à-dire à l'azote Kjeldahl (NKT), qui correspond à l'ammonium et l'azote organique, plus les nitrates.

Pour la France, l'arrêté du 22 décembre 1994 (traduction en droit français de la directive CEE du 21 mai 1991) définit les normes françaises de rejet pour les eaux usées et fixe les exigences épuratoires minimales (Tableau 1.1.6), le nombre de dépassements autorisés selon le nombre d'échantillons prélevés dans l'année et la fréquence des mesures à la station selon sa taille.

Tableau 1.1.6 - Exigences épuratoires minimales (arrêté du 22 décembre 1994)

	Paramètres	Concentration maximale	Rendement minimal	Charge en pollution reçue
		mg/L	%	Nombre d'équivalent - habitant
Zones normales	DBO_5	25	70	2 000 - 10 000
	DBO_5	25	80	> 10 000
Pollution carbonée	DCO	125	75	Toutes Charges
	MES	35	90	Toutes Charges
Zones sensibles	NGL	15	70	10 000 - 100 000
	NGL	10	70	> 100 000
Azote et/ou Phosphore	P_T	2	80	10 000 - 100 000
	P_T	1	80	> 100 000

1.2. La Décantation

Dans une station classique, la décantation est un concept mis en œuvre dans deux unités:

- le décanteur primaire
- le clarificateur

Sa maîtrise est de la plus grande importance, car elle va en particulier permettre d'assurer des concentrations correctes en matières en suspension (*MES*) dans l'effluent.

La phase de décantation peut être définie comme une méthode de séparation, où l'on veut obtenir une phase clarifiée, qui va sortir par la surverse, et une phase concentrée en particules qui sera soutirée. Si la purification de la surverse est l'objectif recherché, on appelle cette opération *clarification*. Par contre si le but est de concentrer les particules, on a une opération d'*épaississement*.

On peut définir trois principaux types de décantation. Suivant essentiellement la concentration en particules, on distinguera les cas de :

La particule isolée, qui décante à une vitesse constante. Dans ce cas il y a un équilibre entre la gravité agissant sur la particule et les forces de frottement liées à la vitesse de chute. On obtient ainsi l'équation de Stokes, quand le régime est laminaire.

$$v_0 = \frac{gd^2(\rho_s - \rho_l)}{18\mu} \quad (1.2.1)$$

où : d = diamètre de la particule, g = gravité, μ = viscosité dynamique et
 $(\rho_s - \rho_l)$ = différence de poids spécifique entre le solide et le liquide.

Pour augmenter la vitesse de décantation on peut augmenter la floculation, donc le diamètre de la particule, par l'addition de polymères, ou la densité par l'utilisation de talc, par exemple.

Des essais sur des agrégats bactériens ont été réalisés par Yuan et Li (2000). Ils ont notamment vérifié que les floes obéissaient bien à l'équation de Stokes dans le cas de la chute d'une particule poreuse avec une perméabilité faible. Cette faible perméabilité est due aux exopolymères qui remplissent les « pores » des floes. Une deuxième conclusion obtenue dans leur travail est que le transfert de matière du liquide vers les micro-organismes, au sein des agrégats, est régi par des phénomènes de convection moléculaire.

Plusieurs particules à une concentration faible ou moyenne, qui décantent chacune à une vitesse proportionnelle à leur taille. Les particules vont se heurter les unes contre les autres et échanger ainsi de l'énergie entre elles. Cette décantation est appelée décantation diffuse.

L'efficacité de la décantation diffuse est liée non seulement à la charge hydraulique superficielle, mais aussi au temps de séjour. Il n'existe pas de formule mathématique permettant le calcul de la vitesse de décantation diffuse. Des essais de laboratoire et des méthodes graphiques permettent alors de la connaître (Degrémont, 1989). Ces méthodes sont adaptées au dimensionnement des décanteurs primaires des stations d'épuration.

Plusieurs particules avec une concentration élevée (décantation en écoulement piston). La forte concentration de particules crée une couche qui se déplace vers la partie inférieure, avec une interface nette entre le solide et le liquide.

La théorie du décanteur idéal de Hazen introduit plusieurs hypothèses pour en simplifier l'étude. Ces hypothèses, décrites par Edeline (1992), nous mettent dans le cas de la décantation des particules isolées qui suivent une trajectoire rectiligne.

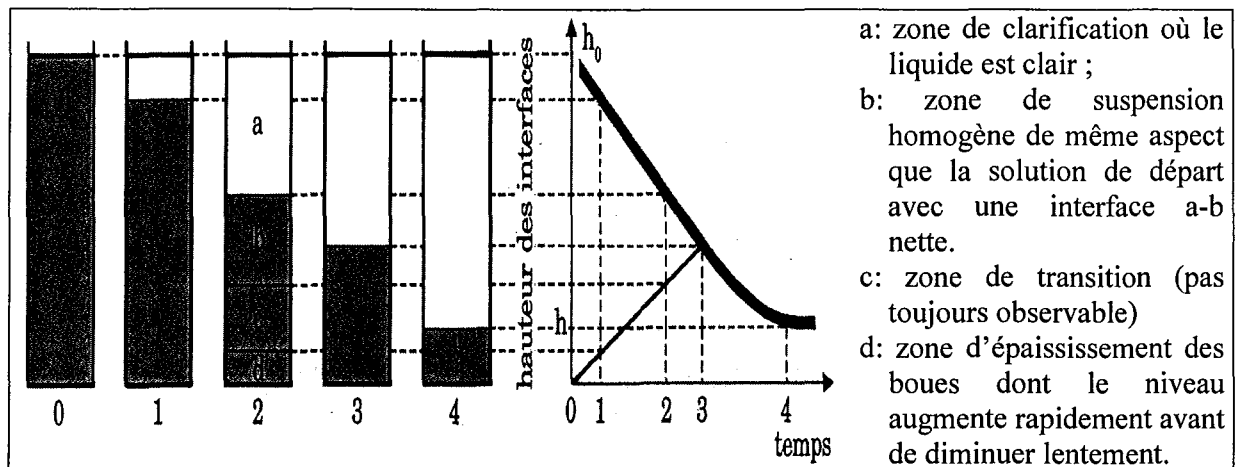


Figure 1.2.1 – Schéma de la décantation en piston d'après le Mémento Technique de l'Eau.

Pour qu'une particule soit complètement éliminée, elle doit parcourir toute la hauteur du décanteur dans un temps égal ou inférieur au temps de séjour (t_s), qui est défini par la relation :

$$\frac{l}{t_s} = \frac{\text{Débit}}{\text{Volume du Décanteur}} \quad (1.2.2)$$

et on obtient par rapport à H (hauteur du décanteur) la vitesse ascensionnelle, définie par :

$$\text{vitesse ascensionnelle} = \frac{H}{t_s} = \frac{Q}{S} = \frac{\text{Débit}}{\text{Surface Projectée}} \quad (1.2.3)$$

qui est le point clé d'une station d'épuration par boues activées. Quand on utilise des décanteurs circulaires les trajectoires des particules sont paraboliques.

1.2.1. La décantabilité

Brouzes (1973) définit la décantabilité comme un ensemble de caractéristiques physiques qui déterminent la vitesse de chute et le tassement des matières en suspension. L'Indice de Mohlman (IM), ou indice de volume des boues, traduit l'un des aspects de la "décantabilité".

L'Indice de Mohlman est défini comme la relation entre le volume occupé par les boues après 30 minutes de décantation divisé par la concentration de matières en suspension et par le volume initial. Il s'agit donc du volume occupé par 1 g de boues après une demi-heure de décantation. Il est aussi connu sous le terme anglo-saxon de SVI (Sludge Volume Index).

$$\text{Indice de Mohlman (IM)} = \frac{V_{30}}{V_0 C_0} = \frac{H_{30}}{H_0 C_0} \quad (1.2.4)$$

Le volume (ou hauteur) final(e) dépend des dimensions de l'éprouvette. Quand on diminue le diamètre, les frottements entre les particules et la paroi augmentent et la vitesse de décantation diminue.

Selon le *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, l'Indice de Mohlman n'a pas de base dans la théorie de séparation solide-liquide, mais il a un fond empirique (Bye et Dold, 1999).

Il y a d'autres indices pour mesurer la décantabilité qui sont dérivés de l'Indice de Mohlman, comme par exemple l'Indice de Mohlman dilué (*IMd*) ou Diluted Sludge Volume Index (*DSVI*) et l'Indice de Mohlman Agité (*IMa*) ou Stirred Sludge Volume Index (*SSVI*). Bye et Dold (1999) et Ekama et al. (1997) expliquent ces indices et montrent les corrélations entre eux et différents paramètres de décantation (hauteur initiale, concentration initiale, etc.).

La vitesse de décantation est fonction principalement de la hauteur initiale dans la colonne (H_0), de son diamètre et de la concentration volumique initiale. Cependant, généralement, la hauteur initiale n'interfère pas dans les résultats. Mais il y a une limite de 30 cm à partir de laquelle un effet de profondeur perturbe la décantabilité des boues (Vesélind et Dick, 1969). Cho (1989) a vérifié cet effet en réalisant des essais avec des hauteurs de 30 et 60 cm. Il a observé que, plus la concentration de la boue était importante, plus les différences entre les vitesses mesurées sur un même échantillon augmentaient. Par contre, pour des hauteurs de 60 et 90 cm, la différence n'est pas significative. En théorie, on doit obtenir pour des hauteurs différentes des tangentes parallèles, donnant ainsi des vitesses égales, mais si on réalise des décantations successives ou des dilutions, la structure du floc peut changer et on obtient alors des valeurs différentes. Cho (1989) a réalisé des essais de sédimentation successifs sur des boues d'argile et des boues activées après remise en suspension par aération, afin de vérifier la reproductibilité des valeurs des paramètres de décantabilité. Il a observé des variations importantes (supérieures à 50%) sur les paramètres déterminés. Pour éviter des effets de paroi, le rapport entre le diamètre de la colonne et le diamètre de la particule doit être supérieur à 100.

Au cours de ce travail nous étudierons particulièrement l'importance d'autres facteurs sur la décantabilité des boues activées, tels que l'abondance des bactéries filamenteuses et le diamètre des floes.

1.2.2. Le décanteur

Le bon fonctionnement du décanteur secondaire, ou clarificateur, est essentiel pour le processus d'épuration des eaux usées par voie biologique. Il combine les fonctions d'*épaisseur*, produisant un flux de boue concentrée pour alimenter le bassin d'aération, de *clarificateur*, produisant un surnageant clair, avec une faible concentration de matières en suspension et aussi de *réservoir de boues*, pendant les débits de pointe.

Les facteurs qui affectent le fonctionnement du décanteur peuvent être groupés, selon Ekama et al. (1997) en:

- 1- Facteurs hydrauliques et physiques, tel que le débit d'eau usée et l'âge des boues.
- 2- Facteurs internes au décanteur: présence d'une zone de floculation, type de déversoir, géométrie (forme, surface, profondeur), configuration de flux hydraulique (longitudinal ou transversal) et turbulence, etc.
- 3- Conditions du site: action du vent et variation des températures de l'eau et de l'air
- 4- Caractéristiques des boues: concentration dans le bassin d'aération, décantabilité des boues (floculation, décantation et compression) et procédé biologique employé (ex. dénitrification).

Konicek et Burdych (1988) ont réalisé des essais avec quatre types de décanteurs (deux circulaires et deux rectangulaires) et ils ont notamment observé que les décanteurs à flux verticaux et circulaires avec flux radial sont les plus efficaces. Pour les décanteurs rectangulaires, ceux qui fonctionnent avec un flux horizontal transversal ont de meilleurs profils d'écoulement que ceux qui fonctionnent avec un flux horizontal longitudinal.

Le procédé d'aération du bassin biologique peut influencer les caractéristiques et l'évolution des boues. Par exemple, le procédé par insufflation d'air désagrège moins les floccs bactériens que les procédés mécaniques, tels que la turbine de surface.

1.2.3. La théorie de Kynch

Selon la concentration des particules, on peut passer du cas de la chute d'une particule isolée à celui de la décantation en piston (cf. Chapitre 1.2.1). Dans la décantation en piston (ou à forte concentration) les particules décantent en couches, chacune caractérisée par une concentration en matières en suspension. Kynch a supposé que la vitesse de sédimentation des particules dans une couche est uniquement fonction de la concentration de la couche dans laquelle elle se trouve. Les hypothèses de cette théorie sont :

- Il n'y a pas d'effet de parois
- La concentration initiale est uniforme
- La vitesse est identique pour toutes les particules de cette couche
- La concentration en particules de la couche est constante

Quand on suit l'évolution de la hauteur du front de décantation en fonction du temps $H(t)$ (Figure 1.2.2) on peut observer une petite période de refloculation, suivie par une zone où la concentration et la vitesse sont constantes (pente rectiligne). En règle générale, on présente la courbe $H(t)$ sans la période de refloculation (zone 1).

Au fond de l'éprouvette va se former une zone de haute concentration, qui va monter jusqu'à l'interface liquide/solide. Kynch a montré que ces couches de concentration croissante montent selon des lignes droites à partir de l'origine. Plus leur pente est faible, plus elles correspondent à des concentrations élevées (Edeline, 1992).

La rencontre de la zone de haute concentration avec l'interface solide/liquide (front de décantation) se réalise au bout de la droite (point B). A ce moment la compressibilité des boues commence à interférer et la concentration augmente avec la baisse du front de décantation.

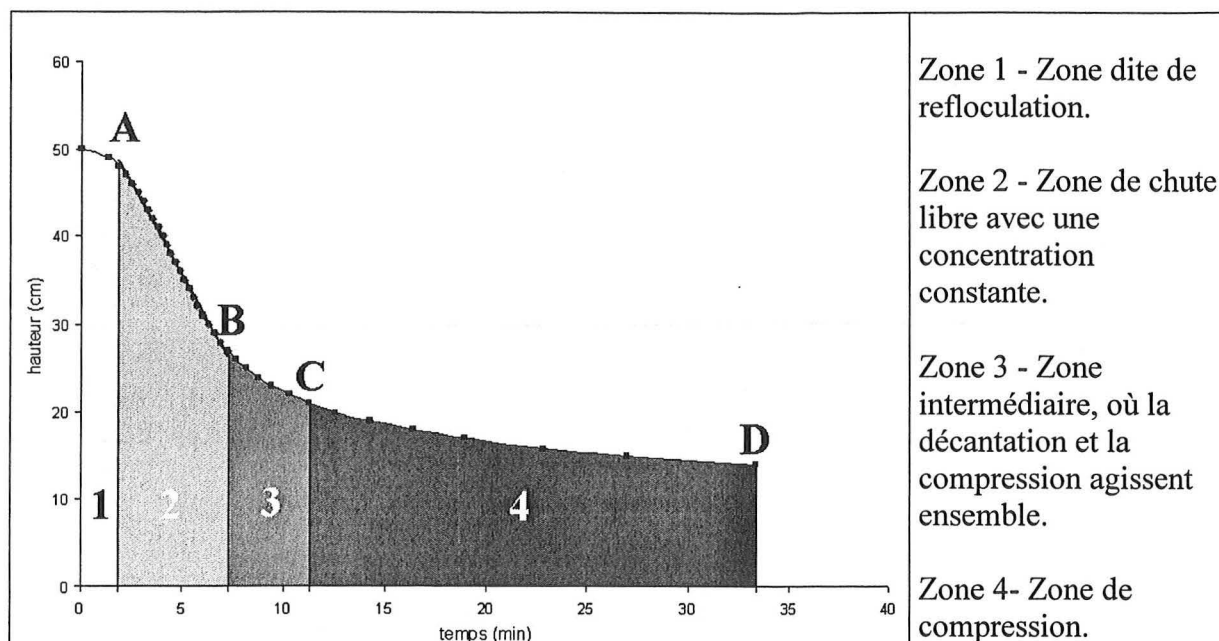


Figure 1.2.2 – Courbe de décantation $h(t)$.

La théorie de Kynch nous permet d'obtenir ce couple vitesse/concentration à partir d'une seule courbe $H(t)$. Tout d'abord on trace une tangente au point où l'on veut calculer le couple v_i/C_i . Par la pente de la tangente on obtient la vitesse v_i et la concentration est calculée à partir de la hauteur initiale instantanée donnée par l'intersection de la tangente et l'axe vertical H .

Pour la vitesse de décantation dans la zone de chute libre (vitesse de chute libre) on fait une régression linéaire entre les points dans le segment AB. Le coefficient angulaire est la vitesse moyenne de chute et la concentration dans cet intervalle est considérée comme constante et égale à la concentration initiale.

Dans la zone de concentration variable, on mesure la vitesse en calculant la tangente à la courbe en chaque point et la concentration est obtenue par l'Equation 1.2.5.

$$C_i = C_0 \frac{H_0}{H_i} \quad (1.2.5)$$

où : C_0 = concentration initiale

H_0 = hauteur initiale

H_i = hauteur équivalente obtenue par l'intersection de la tangente.

1.2.4. Les modèles de décantation

La littérature présente de nombreux modèles permettent de décrire l'évolution de la vitesse de décantation en fonction de la concentration en particules (Tableau 1.2.1). Les plus utilisés sont les modèles "puissance" et "exponentiel".

Dans le développement de ce travail, nous avons utilisé ces deux modèles classiques de décantation. Ils utilisent deux paramètres n et k pour ajuster les courbes aux valeurs de la vitesse de décantation en fonction de la concentration.

Tableau 1.2.1 – Modèles de vitesse de sédimentation (d'après Cho, 1989)
 v = vitesse de décantation et C = concentration de la boue

Formule	Source
$v = k \exp(-nC)$	Thomas (1963); Veselind (1968)
$v = k C^n$	Yoshioka (1955)
$v = k(1 - nC)^{4,65}$	Dick et Young (1972)
$v = k \frac{(1 - nC)^3}{C}$	Richardson et Zaki (1954)
$v = k \frac{(1 - nC)^4}{C}$	Scott (1966); Steinour (1944)
$v = k \frac{\exp(-nC)}{C}$	Cho (1989)
$v = kC(1 - C)$	Cho (1989)
$v = kC(1 - C)$	Scott (1968)
$v = k \frac{(1 - n_1C)^4}{C} \exp(-n_2C)$	Cho (1989)
$v = k(1 - nC)^2 \exp(-4,19C)$	Steinour (1944)
$v = k(1 - n_1C)^2 \exp\left(\frac{-n_2C}{1 - n_3C}\right)$	Vand (1948)
$v = k(1 + n_1C + n_2C^2 + n_3C^3 + n_4C^4)$	Shannon (1963)
$v = k(1 + n_1C)^{n_2}$	Vaerenberghg (1980)
$v = k(1 + n_1C)^{n_2} + k_2$	Vaerenberghg (1980)

a. Modèle exponentiel

$$v = k e^{-nC} \quad (1.2.6)$$

Cette équation est connue aussi comme "équation semi-logarithmique de Veselind". Elle est obtenue à partir de la courbe $\ln(v) = f(C)$.

Avant l'utilisation de la théorie de Kynch on réalisait plusieurs essais avec des concentrations des boues (C) différentes pour mesurer la vitesse de sédimentation. On utilisait ainsi deux vitesses initiales, à partir de deux concentrations différentes, pour obtenir les paramètres n et k selon l'Equation 1.2.7.

$$n = \ln(v_1 / v_2) / (C_2 - C_1) \quad (1.2.7)$$

Si on prend en compte la théorie de Kynch, on établit un graphique avec les valeurs de la concentration en fonction du logarithme népérien de la vitesse, on réalise une régression linéaire et on obtient comme coefficient angulaire de l'équation de la régression la valeur de n .

$$\ln v = \ln k - n \cdot C \quad (1.2.8)$$

La valeur de k est obtenue à partir de l'ordonnée à l'origine.

La Figure 1.2.3 présente une courbe $\ln(v) = f(C)$ et la droite de l'équation obtenue par régression sur un essai de décantation réalisée sur des boues activées.

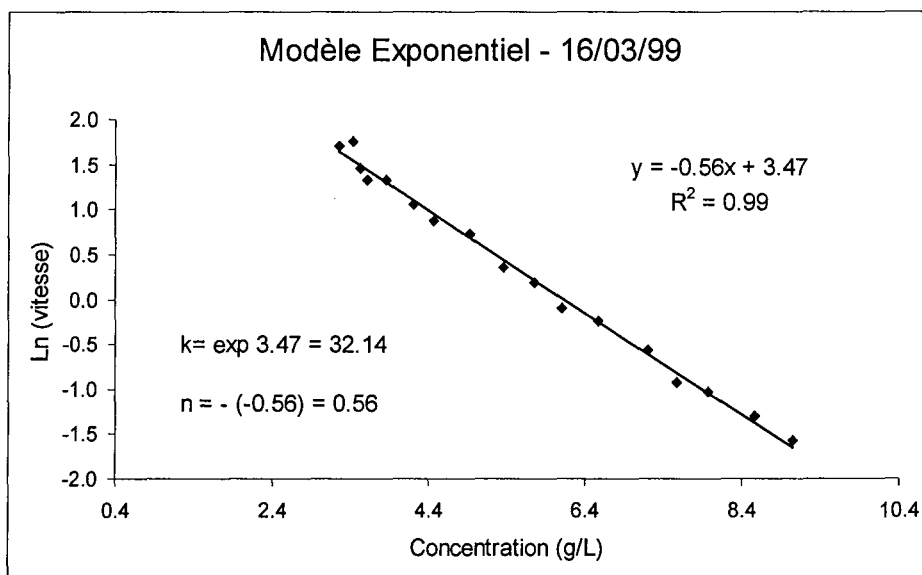


Figure 1.2.3 – Courbe \ln (vitesse) en fonction de la concentration.

b. Modèle puissance

$$v = k C^{-n} \quad (1.2.9)$$

Dans ce cas on doit tracer le logarithme de la concentration en fonction du logarithme de la vitesse. Les paramètres k et n sont obtenus à partir de l'Equation 1.2.10.

$$\log v = \log k - n \log C \quad (1.2.10)$$

On peut voir la courbe \log de la concentration versus \log de la vitesse et la droite obtenue par la régression avec son équation en regardant la Figure 1.2.4, pour le même essai que celui présenté avec le modèle exponentiel.

Si on utilise la procédure de deux vitesses en réalisant deux essais de sédimentation, on calcule le paramètre n par l'Equation 1.2.11:

$$n = \log(v_1 / v_2) / \log(C_2 / C_1) \quad (1.2.11)$$

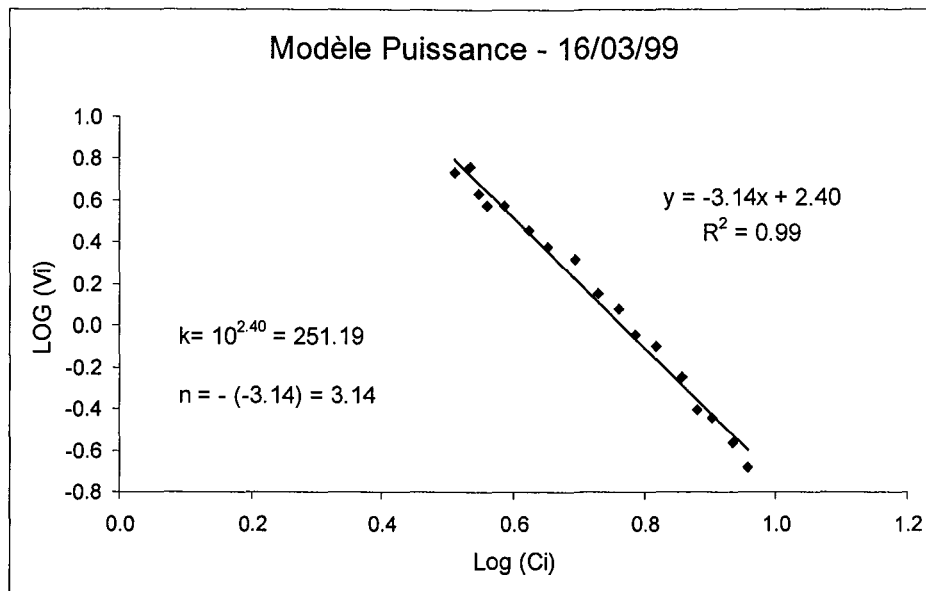


Figure 1.2.4 – Courbe log (vitesse) en fonction du log (concentration).

1.2.5. Le calcul des décanteurs

Pour calculer la surface d'un décanteur, paramètre principal dans son dimensionnement, il faut connaître la charge hydraulique superficielle et le flux massique.

La charge hydraulique est définie par le volume de l'effluent à traiter par la surface du décanteur et le temps ($m^3/m^2.h$). Elle est associée à la vitesse de décantation des particules.

Le flux massique est le rapport de la biomasse (exprimée en *MES*) par la surface et par le temps, c'est-à-dire la quantité de matière en suspension (*MES*) que va traverser la surface *S* dans un temps *t*. Pour le calculer on doit réaliser un bilan de matière dans le décanteur.

La Figure 1.2.5 présente un schéma d'un décanteur avec un débit d'entrée Q_E à une concentration en *MES* de C_E . Le débit d'eau traitée est Q_T et si on considère une élimination de 100%, la concentration en *MES* de l'eau traité C_T peut être considérée comme négligeable. Le soutirage a une concentration C_S en *MES* et un débit Q_S .

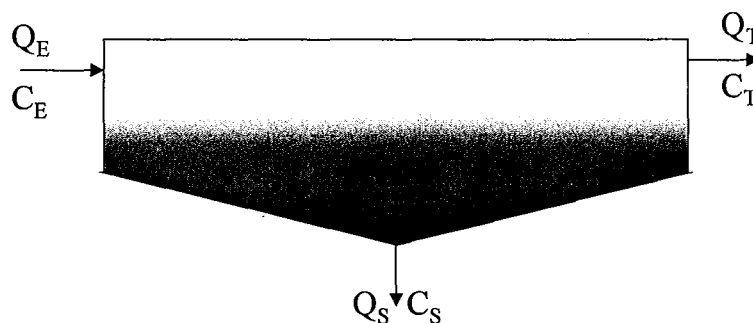


Figure 1.2.5 - Schéma d'une décanteur

Le bilan des débits nous fournit l'équation 1.2.12.

$$Q_T = Q_E - Q_S \quad (1.2.12)$$

Et celui de matière l'Equation 1.2.13.

$$Q_E C_E = Q_S C_S \quad (1.2.13)$$

Si on divise l'Equation 1.2.13 par la surface transversale (S_T) au débit on a le flux massique, représenté par l'Equation 1.2.14.

$$\frac{Q_E C_E}{S_T} = \frac{Q_S C_S}{S_T} \quad (1.2.14)$$

Le flux massique décantable (φ_D) est donné par le produit du couple vitesse (v_i) et concentration (C_i) obtenus de la courbe de Kynch. A ce flux de décantation il faut ajouter le flux dû au soutirage (φ_S) On a ainsi le flux total (φ_T) donné par l'Equation 1.2.15.

$$\varphi_T = \varphi_D + \varphi_S = v_i C_i + v_s C_i \quad (1.2.15)$$

où v_s est la vitesse de soutirage obtenue à partir de l'Equation 1.2.16.

$$v_s = \frac{Q_S}{S_T} \quad (1.2.16)$$

La Figure 1.2.6 présente la composition des flux de décantation et de soutirage dans le clarificateur. La concentration C_L est la concentration limite à laquelle est associé un flux minimal. Ce flux minimal ou flux limite ne pourra pas être dépassé sans avoir un engorgement dans le décanteur, avec des pertes de solides par la surverse. C'est cette concentration qui va servir de base pour le dimensionnement du clarificateur.

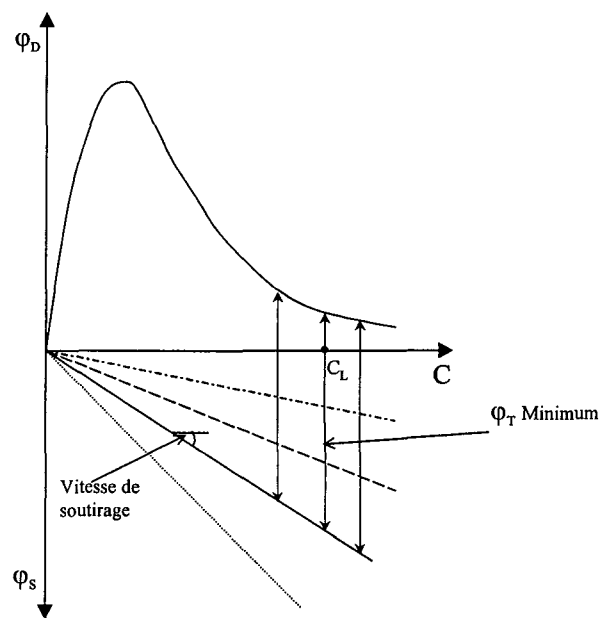


Figure 1.2.6 - Schéma des flux de décantation et soutirage dans le décanteur secondaire

1.2.6. Les corrélations entre la vitesse et la concentration des boues

Les corrélations entre la vitesse de chute libre et la concentration des boues sont utilisées dans la théorie du flux pour le dimensionnement des décanteurs. La plus utilisée est celle de Vesilind (modèle exponentiel) dont le calcul a été explicité précédemment.

$$v = k e^{-nC} \quad (1.2.6)$$

En 1999, Vanderhasselt et Verstraete ont réalisé des tests de décantation pour quatre types de boues en comparant les relations de Vesilind et de Cho. Ils ont observé que l'équation de Vesilind décrit mieux le rapport entre la vitesse de chute libre et la décantation et, par contre, que l'équation de Cho permet une meilleure description de toute la courbe de décantation.

Il est aussi possible d'utiliser des corrélations entre la vitesse de chute libre et les indices de décantabilité, tels que l'Indice de Mohlman (*IM*), l'Indice de Mohlman agité (*IMa*) et l'Indice de Mohlman dilué (*IMd*). Bye et Dold (1999) présentent la plupart de ces corrélations (Tableau 1.2.2). D'autres corrélations, ainsi que leur utilisation dans un modèle dynamique de décanteur secondaire, sont présentées par Härtel et Pöpel (1992).

Tableau 1.2.2 – Corrélations entre les paramètres *k* et *n* et les Indices de Mohlman pour plusieurs types de mesures de décantabilité (d'après Bye et Dold, 1999).

Référence	Corrélation pour <i>k</i> (m/h)	Corrélation pour <i>n</i> (m ³ /h)
Koopman et Cadee	$\ln(k) = 2.605 - 0.00365IMd$	$K = 0.249 + 0.002191IMd$
Pitman	$\frac{k}{n} = 67.9 \exp(-0.016IMa_{3,5})$	$\frac{k}{n} = 67.9 \exp(-0.016IMa_{3,5})$
Ekama et Marais		$n = 0.88 - 0.393 \log\left(\frac{k}{n}\right)$
Daigger et Roper	$k = 7.80$	$n = 0.148 + 0.00210IM$
Wahlberg et Keinath	$V_0 = 15.3 - 0.0615IMa$	$n = 0.426 - 0.00384IMa + 0.000543IMa^2$
Härtel et Pöpel	$k = 17.4 \exp(-0.0113IM) + 3.931$	$n = 1.043 - 0.9834 \exp(-0.0581IM)$
Catunda et van Haandel	$k = 12.0 - 3\left(\frac{IMa_{3,5} - 43}{25}\right)$	$n = 0.30 - 0.08\left(\frac{IMa_{3,5} - 43}{25}\right)$
	$k = 12.0 - 3\left(\frac{IMd - 43}{50}\right)$	$n = 0.30 - 0.08\left(\frac{IMd - 43}{50}\right)$
Daigger	$k = 6.495$	$n = 0.1646 + 0.001586IM$
	$k = 7.973$	$n = 0.0583 + 0.00405IMa_{3,5}$
	$k = 7.599$	$n = 0.1030 + 0.002555IMd$
	$k = 8.53094 \exp(-0.00165IM)$	$n = 0.20036 + 0.00091IM$
Ozinsky et Ekama	$k = 11.59936 \exp(-0.00636IMa_{3,5})$	$n = 0.15128 + 0.00287IMa_{3,5}$
	$k = 6.35543 \exp(-0.00084IMd)$	$n = 0.19818 + 0.00123IMd$

Bye et Dold (1999) présentent une corrélation entre le rapport hauteur initiale/ hauteur finale de décantation et la concentration initiale des solides. Cette corrélation ne peut être utilisée que dans une station qui fonctionne sans problèmes de décantabilité des floes et qui n'utilise pas d'agents floclants.

1.2.7. Les outils de caractérisation des propriétés de décantation

Les outils utilisés pour étudier la décantation peuvent être divisés en deux types selon le but que l'on se fixe :

- Etude de la décantation des floes – Dans ce cas on étudie la décantation des floes isolés à une faible concentration.
- Etude du front de décantation – Le but est d'obtenir les paramètres de décantabilité par des essais de décantation en « batch » ou en continu.

La décantation des floes

Dans ce domaine, on étudie généralement l'effet de l'addition de floclants ou d'autres produits sur la vitesse de décantation des floes, ce qui permet de situer le régime d'écoulement selon le nombre de Reynolds et de modéliser la vitesse de décantation en réalisant des mesures sur le diamètre des particules, leur densité, perméabilité et vitesse de sédimentation.

Lee et al. (1996) utilisent une camera vidéo équipée d'un zoom pour mesurer le diamètre et la vitesse de décantation de floes avant et après congélation. Ils ont obtenu des corrélations entre la densité des floes et leur diamètre et selon le nombre de Reynolds et ils ont vérifié que la perméabilité augmente avec le diamètre des floes et après congélation.

Desroches et al. (2001) étudient la décantation de floes minéraux obtenus à partir de différentes eaux naturelles en utilisant un système d'acquisition d'images digitales en temps réel. Les images obtenues sont ensuite analysées pour calculer la vitesse de sédimentation et caractériser la taille et la morphologie des floes (méthode dynamique). Des acquisitions d'images de floes étalés sur une lame avec un microscope optique et un stéréomicroscope sont réalisées en parallèle, pour étudier l'effet de la déformation induite par ce mode d'observation (méthode statique). L'utilisation de la méthode statique se montre plus rapide. Ces auteurs ont observé que dans les essais dynamiques les floes souffraient également de déformations et que les résultats de la caractérisation morphologique dépendaient de la méthode de visualisation. Compte tenu de cela, on ne doit comparer que les résultats obtenus par une même méthode et réalisés dans des conditions semblables.

Le front de décantation à fond fermé

Cette procédure est réalisée en utilisant une éprouvette et en mesurant le déplacement du front de décantation en fonction du temps. Néanmoins, la méthode de base manuelle demande du temps et parfois, quand le front de décantation n'est pas très net, induit des erreurs. Des méthodes automatiques ont été proposés, basées sur deux principes :

- Suivi du front de décantation par rapport au temps
- Mesure de la variation de la concentration en un point fixé

Vanrolleghem et al (1996) ont développé un équipement pour mesurer la décantabilité ("settrometer") en utilisant un scanner pour suivre le front de décantation. Un schéma de l'équipement est présenté sur la Figure 1.2.18. Ils utilisent une colonne en verre Pyrex de 10 litres, dans laquelle il y a un agitateur. Un fond lumineux est obtenu par deux lampes placées sur la face opposée au scanner. Le scanner descend à partir du point d'origine (placé en haut) et mesure la luminosité jusqu'au front de décantation. Ce front est détecté par le changement d'intensité de la lumière. La distance parcourue par le scanner et le temps après le début de l'expérimentation sont enregistrés comme un point de la courbe $H(t)$. Le scanner remonte alors à sa position d'origine. Cette procédure est répétée jusqu'à la fin de l'expérimentation, permettant ainsi tracer toute la courbe $H(t)$.

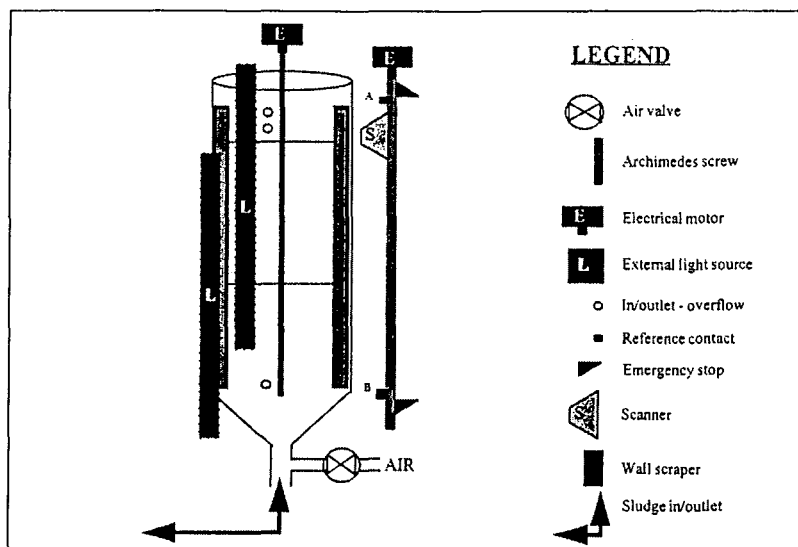


Figure 1.2.18 - Dispositif pour tracer la courbe de décantation (Vanrolleghem et al ,1996)

Cho (1989) a utilisé un dispositif doté d'un capteur photoélectrique mobile pour déterminer la décantabilité des boues, utilisant la méthode à deux vitesses initiales. A la colonne en Plexiglas utilisée était liés un agitateur (vitesse de rotation de 1 tour par minute), une pompe (permettant l'alimentation en boue de la colonne), des vannes et des capteurs de niveau. Tout l'ensemble était contrôlé par un ordinateur qui réalisait l'acquisition du temps de passage entre deux hauteurs, le calcul de la vitesse de sédimentation ainsi que des paramètres (k et n) des différents modèles de décantation.

a. La vitesse de décantation en régime continu

Rasmussen et Larsen (1996, 1997) ont proposé une méthode de mesure de la vitesse de sédimentation en régime continu, dans laquelle il n'y a pas de front de décantation à suivre. La solution proposée consiste à réaliser un bilan de matière. Deux systèmes ont été développés, l'un pour le régime laminaire et l'autre pour régime turbulent.

Le premier (Figure 1.2.19) est composé d'un réservoir, d'une colonne en verre et d'une pompe pour faire circuler la boue. La concentration est mesurée avec un système à transmission de lumière (ODLIM) à l'aide de capteurs optiques situés à l'entrée et au milieu de la colonne. Lorsque la boue entre dans la colonne le cisaillement va casser les floccs. Ils vont refloculer rapidement dans une zone située en haut du cylindre. Après la zone de floculation, il y a une zone d'équilibre, suivi d'une zone de compression, comme dans le cas de la décantation à fond fermé.

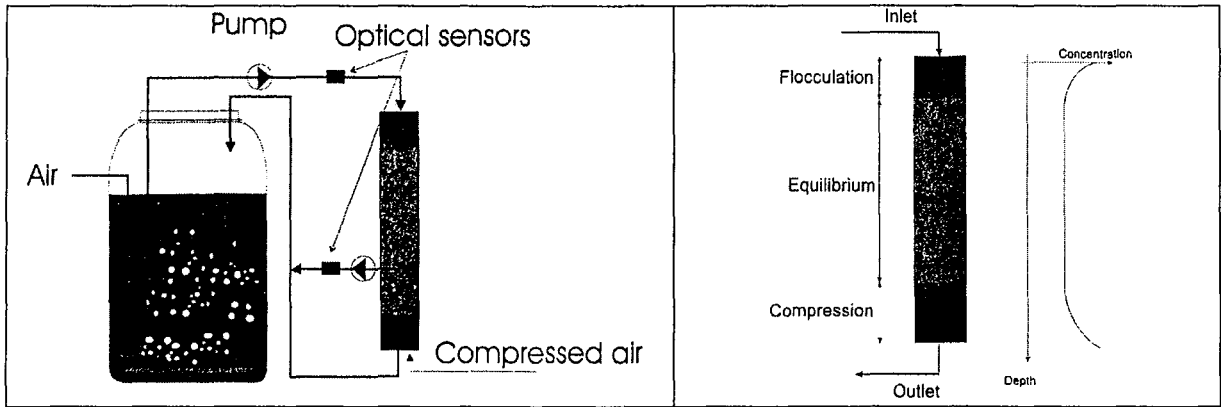


Figure 1.2.19 - Système pour mesurer la vitesse de décantation en régime continu (Rasmussen et Larsen, 1997)

Un bilan de matière entre l'entrée et la sortie fournit l'équation suivante :

$$v_{cl} = v_p \frac{C_E - C_{eq}}{C_{eq}} \quad (1.2.17)$$

où v_{cl} est la vitesse décantation, C_E la concentration à l'entrée, v_p la vitesse due à la pompe et C_{eq} la concentration d'équilibre

En connaissant v_p et calculant C_E et C_{eq} à partir des valeurs de lumière transmise on peut ainsi obtenir la vitesse de décantation.

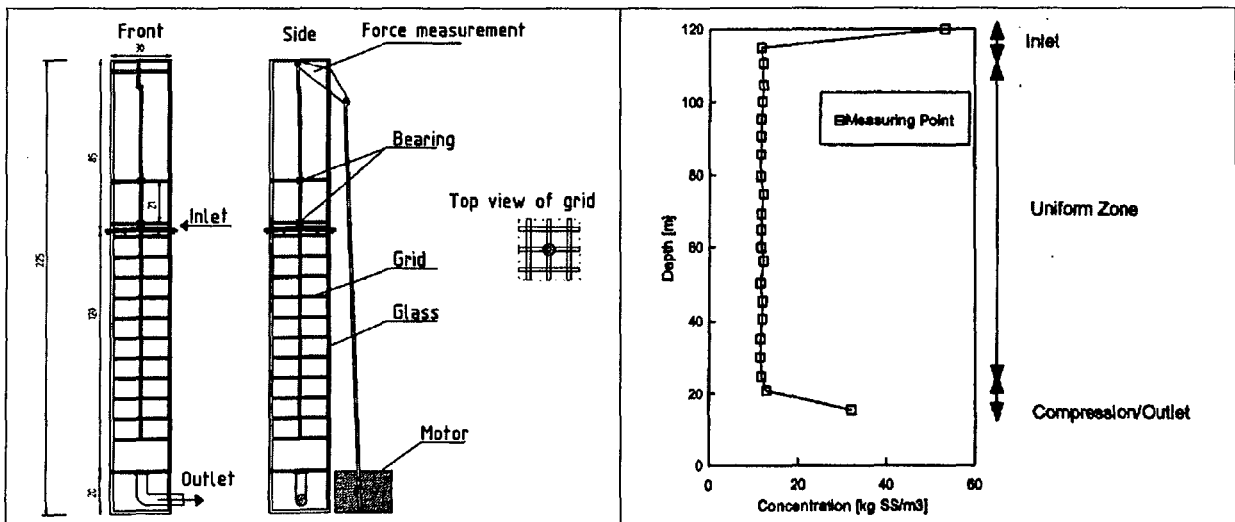


Figure 1.2.20 - Equipement pour mesurer la vitesse de décantation en régime turbulent (Rasmussen et Larsen, 1997)

Pour le régime turbulent (Figure 1.2.20) le même principe est utilisé. La turbulence est assurée par l'inclusion de grilles qui se déplacent verticalement. Un système avec des jauges de contrainte permet de calculer la force mise en jeu pour déplacer la grille afin d'obtenir le gradient de vitesse turbulent. On obtient ainsi un paramètre qui décrit la corrélation entre la vitesse de décantation et le gradient moyen de vitesse.

b. L'étude du surnageant pendant la décantation

Peu de recherches sont présentées sur ce point. Cependant on sait qu'en règle générale, si l'Indice de Mohlman est élevé on aura un surnageant plus clair. Un Indice de Mohlman élevé indique un problème de bulking (terme anglo-saxon n'ayant pas d'équivalent en Français, indiquant un accident de décantabilité des floccs bactériens). Dans ces cas, on a une masse plus ou moins compacte qui décante et qui d'une certaine façon filtre le surnageant qui passe à travers. Par contre des problèmes de défloculation peuvent faire augmenter la turbidité : les floccs de plus petite taille pourront traverser le front, augmentant ainsi la turbidité du surnageant et en conséquence, sa teneur en matière organique. On peut ainsi obtenir des corrélations entre la turbidité et la matière en suspension du surnageant.

Fuchs et Staudinger (1999) ont développé un équipement (SCHLUMOSSED) présenté dans la Figure 1.2.21, qui permet d'étudier la turbidité du surnageant pendant une décantation à fond fermé. Ils utilisent un tube circulaire (30 x 320 mm) en verre et trois capteurs de lumière situés à 6,0, 19,5 et à 156 mm du niveau de la boue. Une fente lumineuse, des miroirs et des plaques à orifice sont utilisés afin d'obtenir un faisceau lumineux horizontal. Les analyses sont basées sur trois paramètres :

- le saut de transparence- c'est le temps nécessaire pour que la transparence devienne non nulle. Cela donne une information sur la vitesse de décantation
- le maximum de transparence – quand il y a un front net de séparation entre la boue et le surnageant, on peut observer une zone de transparence plus élevée près du front
- la transparence finale – c'est la valeur de la transparence à la fin de l'expérience

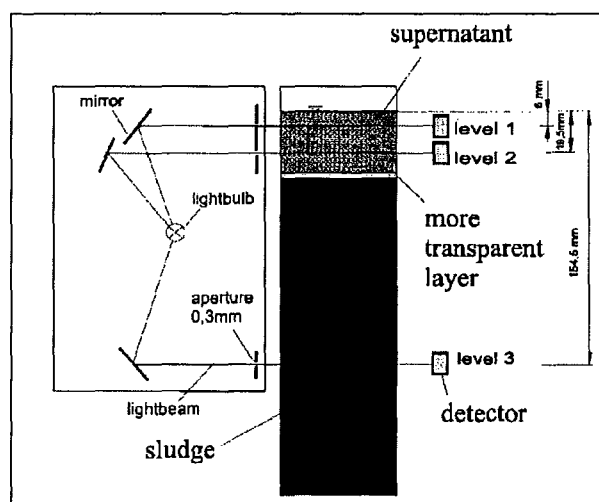


Figure 1.2.21 - Dispositif de Fuchs et Staudinger (1999) pour mesurer la turbidité du surnageant et la vitesse de décantation.

Il a été observé que des boues avec des courbes de décantation similaires peuvent produire des surnageants de qualité très différente et que la réduction de la biomasse du surnageant était liée à la formation d'un réseau de floccs reliés. Ce réseau est formé par l'excès des bactéries filamenteuses qui provoquent le bulking filamenteux.

1.3. Le Flocc Bactérien

Les bactéries présentes dans le bassin d'aération s'agglomèrent sous la forme de floccs bactériens. Ces floccs sont formés grâce aux exopolymères produits par certaines espèces de bactéries. Il y a essentiellement deux modèles pour expliquer leur formation, son contrôle et ses dysfonctionnements:

1.3.1. Le modèle d'attraction et de répulsion électrostatique (d'après Erikson et Hardin, 1984)

Dans ce modèle, les floccs bactériens sont formés par des bactéries se présentant sous la forme de bâtonnets et chargées négativement à pH neutre. En général, les ions contenus dans les eaux usées urbaines sont au-dessous du seuil critique de coagulation. Cependant, dans certaines conditions, les particules peuvent être faiblement liées. Théoriquement, les charges électrostatiques de répulsion sont plus faibles aux extrémités d'une bactérie allongée ou d'un flocc que sur leur longueur. Aux faibles concentrations en sels, la floculation se développe entre les extrémités des bactéries et des floccs allongés sont progressivement formés. Les exopolymères excrétés vont créer des ponts entre les floccs, et de préférence sur les distances les plus courtes. De cette façon, les floccs continueront à s'allonger. Du fait de leur forme allongée et des liaisons polymériques faibles (au moins au début du processus), ces floccs sont facilement cassés et les exopolymères du pont libérés dans le milieu. Cela se produit quand il y a des changements de la microfaune dus à des instabilités ou à des perturbations du procédé. Les floccs "jeunes" auront ainsi une forme plutôt allongée et les floccs "âgés" une forme plutôt ronde.

Lorsque le procédé est stable, une production plus importante d'exopolymères est observée, ce qui favorise la formation de liaisons plus fortes entre les floccs: ils deviennent ainsi plus résistants. Cependant, un excès peut provoquer à l'inverse une dispersion des floccs, spécialement s'ils sont chargés et hydrophiles. La production des exopolymères peut être stimulée par des fortes charges, par un âge de boue élevé ou même par un milieu déséquilibré en nutriments.

La présence des bactéries filamenteuses, quant à elles, favorise la formation des floccs bactériens quand il y a un manque d'azote, de phosphore ou d'oxygène et quand le pH baisse. L'excès de bactéries filamenteuses à l'intérieur des floccs, dont la quantité doit être proportionnelle à la quantité de celles aperçues en dehors, augmente la résistance du flocc et réduit la compressibilité des boues.

Pour contrôler la clarification, il faut avoir un équilibre entre les bactéries formatrices des floccs et les bactéries filamenteuses et entre la quantité et les types d'exopolymères présents dans les floccs bactériens.

Jorand et al. (1995) ont décrit un modèle (Figure 1.3.1) semblable à celui de Erikson et Hardin (1984). Ils proposent trois niveaux d'organisation, qui ont été mis en évidence par sonification et analyse par granulométrie laser des fragments. Au premier niveau on trouve des particules primaires de 2.5 μm qui sont liées pour constituer les microagrégats du deuxième niveau d'une taille de 13 μm . Ces particules sont liées par des exopolymères pour former le troisième niveau avec un diamètre de 125 μm (microfloccs). Le fait que le polymère qui relie les structures du deuxième niveau puisse être extrait après 30 s de sonification leur a fait supposer que les structures de 2.5 μm étaient liées par un autre type de polymère.

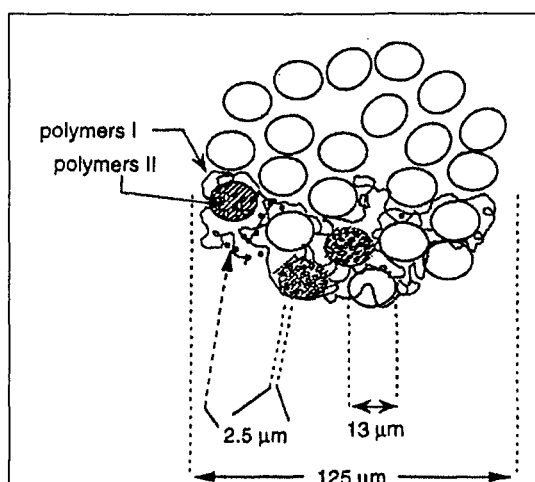


Figure 1.3.1 - Modèle d'un floc de boue activée selon Jorand et al. (1995)

Snidaro et al. (1997), poursuivant les travaux de Jorand et al (1995), ont réalisé des études sur les structures de 13 µm et 125µm. Ils ont calculé la dimension fractale des particules de 13µm à partir d'observations tridimensionnelles faites par microscopie confocale (CSLM) et ont obtenu une valeur de 3, indicatrice d'une structure très compacte. Comme pour les agrégats de 125 µm ils ont obtenu une valeur de 2.5, cela leur a permis de conclure que les mécanismes d'agrégation de ces niveaux n'étaient pas les mêmes: pour les microcolonies à 13 µm il s'agit de la division cellulaire et pour les microflocs à 125 µm d'un phénomène de diffusion.

1.3.2. Le modèle du squelette filamenteux (d'après Jenkins et al., 1993)

Les flocs bactériens sont formés par deux espèces de composants: biologiques (bactéries, protozoaires, métazoaires et champignons) et non biologiques (particules organiques et inorganiques). Les observations visuelles et quelques mesures ont suggéré à Jenkins et à ses collaborateurs que les flocs possèdent deux niveaux de structure: une microstructure et une macrostructure.

La microstructure est responsable des processus d'adhérence microbienne, d'agrégation et de floculation. Elle est composée essentiellement par les bactéries formatrices de flocs, telles que les bactéries zoogléales, qui produisent les exopolymères. Ces exopolymères vont fonctionner comme des polyélectrolytes afin de promouvoir la floculation. Ils sont composés en majorité par des hydrates de carbone et représentent 15 à 20 % du poids de la matière en suspension.

La macrostructure est formée grâce aux bactéries filamenteuses, qui forment un réseau entre les flocs de la microstructure. Quand les boues activées contiennent des bactéries filamenteuses, on peut envisager la formation des gros flocs. Même s'ils sont plus résistants, ils sont toujours susceptibles d'être fragmentés dans l'environnement tourbillonnant du bassin d'aération. Les gros flocs contenant des filaments ont une forme irrégulière, qui s'approche d'une sphère à mesure que la quantité de filaments baisse. Jenkins et al. (1993) expliquent que, selon Sezgin (1977), quand il y a beaucoup de filaments, les flocs prennent une forme allongée, voire quasi cylindrique.

1.3.3. L'effet de la présence des bactéries filamenteuses sur les floccs.

Selon la quantité de filaments et d'exopolymères dans le flocc bactérien on peut observer les phénomènes suivants (Gerardi et al., 1990):

- Flocc tête d'épingle : ce phénomène se produit lorsque il n'y a pas assez de bactéries filamenteuses. Les floccs formés sont petits et ont une structure peu solide. La vitesse de décantation des floccs est élevée et la compression est bonne. Leur forme est en général arrondie et sous l'effet de la turbulence des réacteurs biologiques des petits agrégats peuvent s'en détacher: ceux-ci, qui décantent très lentement, augmentent la turbidité du surnageant.
- Le flocc idéal : il résulte d'un bon équilibre entre les bactéries filamenteuses et les bactéries formatrices de floccs. Les floccs sont assez gros et assez robustes. Ils décantent et se compactent bien et le surnageant obtenu est clair, avec une turbidité et une teneur en matière en suspension faibles.
- Bulking dû aux bactéries filamenteuses : les bactéries filamenteuses se développent en excès. On aura beaucoup de filaments au sein du liquide et ils dépasseront largement les limites des floccs. Les floccs auront des tailles importantes et seront résistants à la rupture. Le surnageant produit présente une faible turbidité et les vitesses de décantation seront faibles. Les bactéries responsables de ce phénomène ont, en général, des longueurs plus importantes que celles responsables du phénomène de moussage.

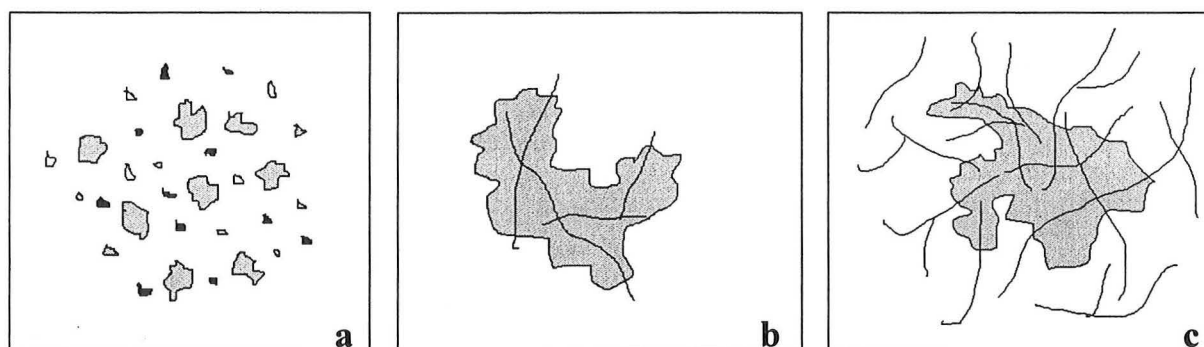


Figure 1.3.2 - Représentation des types de flocc en fonction de la présence des bactéries filamenteuses: (a) flocc tête d'épingle, (b) flocc idéal et (c) bulking filamenteux.

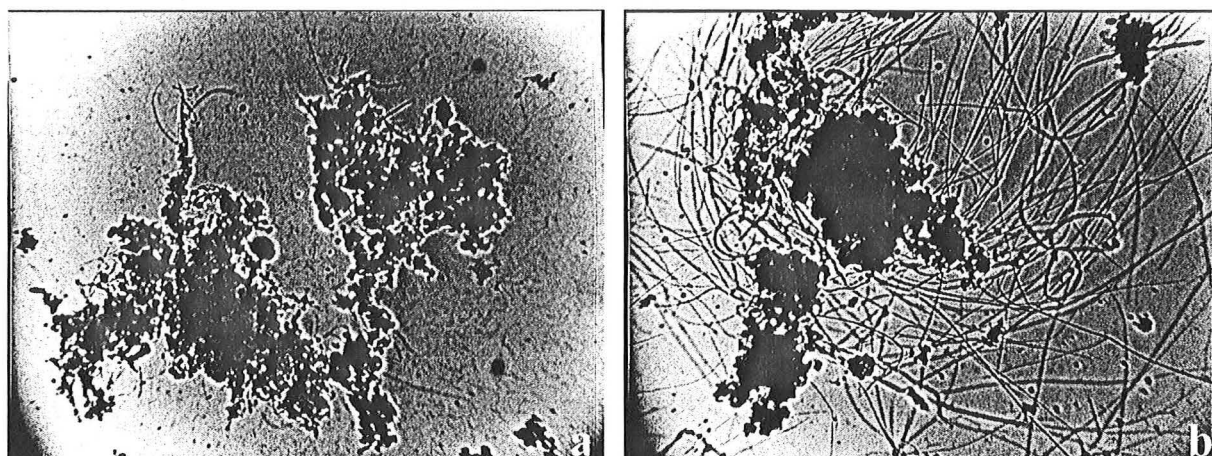


Figure 1.3.4 - Images d'un flocc normal (a) et avec un excès de bactéries filamenteuses (b), prises avec un grossissement 100x.

- Croissance dispersée : ce phénomène est causé par l'absence de floculation au niveau de la microstructure du floc. Ce phénomène peut se produire du fait de la sélection de bactéries non floculantes ou à cause de la faible biodégradabilité d'agents tensioactifs (Jenkins, 1993).
- Bulking zoogléal : aussi appelé bulking visqueux, il est dû à une sur-production d'exopolymères. Dans ces conditions, on aura une faible décantabilité, caractérisée par une faible vitesse de décantation et par un Indice de Mohlman élevé. Il n'y a pas beaucoup d'informations sur ce type de bulking. Novak et al. (1994) ont vérifié que, en général, il est associé au phénomène de moussage. Pour son développement l'eau usée à traiter doit avoir une biodégradabilité élevée avec un manque de phosphore et comporter des composants organiques fortement biodégradables tels que le glycol et l'acide acétique.
- Moussage filamenteux: comme le bulking filamenteux, le moussage est causé par un développement excessif de bactéries filamenteuses. Mais ces bactéries ont une faible surface hydrophile. Elles se développent en excès et forment des floccs hydrophobes. Ceux-ci emprisonnent des bulles d'air, qui vont abaisser la densité des floccs, en les faisant flotter. Cette mousse peut provoquer un débordement du bassin d'aération provoquant des pertes en biomasse. Le même phénomène peut se produire dans le clarificateur par libération d'azote gazeux. Dans ce cas, la mousse peut s'échapper avec l'eau épurée dans le milieu récepteur (Jenkins, 1993). Richard (1989) considère que *Nocardias sp.* est responsable seulement du moussage. Du fait de sa petite taille elle ne peut pas provoquer de bulking. Duchène et Cotteux (1998) explique l'origine du moussage biologique par des bactéries que sont nettement hydrophobes tandis que pour le bulking elles sont hydrophiles. Le passage de la forme hydrophobe à hydrophile peut être soudain et n'est pas encore expliqué. Soddell et Seviour (1996) indiquent la préférence des bactéries hydrophobes, surtout des *Nocardias sp.*, pour des substrats hydrophobes. Une faible concentration en oxygène dissous dans le bassin d'aération peut contribuer à la formation du bulking filamenteux (Al-Yousfi et al., 2000), ainsi que des limitations en substrats.

1.3.4. L'influence des paramètres de procédé et des additifs sur les floccs bactériens

Liao et al. (2001) ont montré que les propriétés de surface des floccs, ainsi que la composition des exopolymères peuvent varier avec l'âge des boues. Cependant la quantité totale en exopolymères ne varie pas. La concentration des hydrates de carbone dans les exopolymères baisse avec l'augmentation de l'âge des boues. Cela peut être dû à leur consommation par les bactéries. Pour un âge de boue élevé l'hydrophobicité augmente et la charge de la surface des floccs ainsi que la teneur en matières en suspension de l'effluent diminuent. Ces auteurs ont obtenu de bonnes corrélations entre la charge, l'hydrophobicité et la teneur en matières en suspension de l'effluent. Cela montre l'importance des propriétés de surface des floccs sur la floculation biologique.

Chao et Keinath (1979) relie la qualité de l'effluent final à la quantité d'exopolymères, dont la production est fortement affectée par la charge organique. Pour les fortes charges, elle diminue, augmentant ainsi la quantité de matières en suspension du surnageant. A propos de la compacité des floccs ils suggèrent de travailler dans deux régions d'intensité de charge optimale : aération prolongée (faible charge) et mode conventionnel à moyenne charge (voir Chapitre 1.1.6). En dehors de ces zones ils prévoient que les phénomènes de bulking peuvent se manifester et dégradent la qualité de la compression.

La croissance de la taille des floccs avec l'augmentation de la charge organique a été vérifiée par Barbusinski et Koscielniak (1995). Cette observation est bien en accord avec les résultats de Chao et Keinath (1979), plus d'exopolymères permettant une formation de floccs plus gros. Cependant, de fortes charges utilisées sur de longues durées peuvent provoquer des dysfonctionnements sur les floccs ("flocc tête d'épingle", par exemple). L'augmentation de la taille abaisse la densité des floccs. Ce fait dû à la nature fractale du flocc est lié à la structure ouverte des gros floccs. Les floccs auront de faibles vitesses de décantation dues à la diminution de la densité et à une augmentation des forces de frottement (Gregori, 1998). Pour cette même raison la compression sera affectée et sera faible.

La limitation en oxygène dissous, dans le bassin d'aération, réduit la quantité des sites hydrophobes des floccs, ce qui conduit à une dégradation de la qualité de l'effluent final. Certains types de bactéries, comme *Enterococcus hirae*, ne sont pas affectés. Cette réduction est significative surtout pendant la phase stationnaire de la croissance (Palmgren et al., 1998). La faible concentration en oxygène dissous peut aussi stimuler la croissance excessive des bactéries filamenteuses, ce qui va provoquer le phénomène de bulking filamenteux. Par contre une concentration élevée produit des gros floccs très compacts (Wilen et Balmer, 1999).

L'addition de particules minérales fines ou de polymères peut améliorer la décantabilité des floccs de boues, par augmentation de la densité et/ou de la taille des floccs par floculation. Clauss et al. (1998) ont étudié l'effet de l'addition du talc sur des floccs de boues activées avec un excès de filaments. L'addition du talc produit des effets importants sur le diamètre des floccs à partir d'une addition de 40 % du poids de biomasse. Une addition de 43% (en poids) a permis une augmentation de la vitesse de décantation de plus de 100%. Les filaments qui sont à l'extérieur des floccs sont emprisonnés et recouverts par les nouveaux floccs. Une expérience sur une station de traitement d'eaux usées d'une industrie de jus de fruit présentant des problèmes de bulking filamenteux pendant l'été a été aussi réalisée par ces auteurs. Après l'addition du talc, les valeurs d'Indice de Mohlman qui dépassait 2000 mL/g sont restées au dessous de 200 mL/g. Lors de la première année l'addition du talc a été arrêtée en décembre mais en mai de l'année suivant le problème est réapparu. L'addition du talc a ensuite été réalisée en continu.

Vanderhasselt et Verstraete (1999), qui ont étudié l'addition de talc et d'adjuvant de floculation (polymère), ont observé que l'addition du premier a un effet à long terme, tandis que l'effet de l'addition de l'adjuvant n'a duré que quelques heures. Au travers des mesures d'Indice de Mohlman conventionnel et agité ils ont pu observer que l'indice agité était plus sensible pour mesurer les paramètres de décantabilité. Vanderhasselt et al. (1999) ont vérifié que l'effet des additifs dépendait du type de boues.

Le talc a été utilisé dans une deuxième expérience réalisée sur une station d'épuration mixte (50 % des effluents étant d'origine industrielle) au Pays-Bas par Eikelboom et Grovenstein (1998). L'Indice de Mohlman a chuté de 850 à 250 mL/g puis à 110 mL/g. Ils n'ont pas observé de précipitation du talc dans le bassin biologique ni dans le clarificateur. Le talc n'a pas affecté l'activité biologique mais a provoqué un phénomène de moussage, qui n'avait jamais été observé précédemment.

Les additifs tels que le talc ou les polymères peuvent aider dans le combat des dysfonctionnements comme le bulking filamenteux (augmentation de la vitesse de décantation par la formation de floccs plus denses qui vont agglomérer les bactéries filamenteuses libres) et

le flocs "tête d'épingle" (en augmentant la floculation, permettant ainsi la formation de flocs de taille plus importante et en agrégeant les petits flocs dispersés).

Une mauvaise décantation des boues activées peut être un phénomène de courte durée, dû à des phénomènes transitoires tels qu'une augmentation ponctuelle de la charge, ou à des changements de saison (effet de la température) mais elle peut aussi être un problème continu lié à une mauvaise conception de l'installation.

1.3.5. L'influence de la géographie

Plusieurs suivis de stations d'épuration ont été réalisés dans le but d'identifier les espèces de bactéries filamenteuses prédominantes selon les pays (Rossetti et al. 1994; Madoni et al. 2000; Wanner et al, 1998; Williams et Unz, 1985; Westlund et al., 1996; Eikelboom et al., 1998; Kistensen et al., 1994; Pujol et al., 1994).

En Italie, Rossetti et al. (1994) ont réalisé un suivi de 39 stations d'épuration de différentes capacités. Selon la classification manuelle de Sezgin et al. (1978), 46 % des stations avait une abondance en filaments moyenne (niveau 4) et 30% forte (niveau 5). Les micro-organismes filamenteux prédominants étaient *Microthrix parvicella* (32 %) et *Nocardia sp.* (15%), suivis du *Type 0092* et du *Type 0041*. Ces organismes appartiennent aux groupes des bactéries filamenteuses dites de faible charge, ce qui semble normal car plus de 60% des stations étudiées travaillent avec une charge inférieure à 0.5 g DCO/g MV h. Ils ont observé que les petites stations qui fonctionnent en régime alterné d'aération présentent de fortes concentrations en bactéries filamenteuses.

Les suivis de trois stations d'épuration de Stockholm (Suède) ont permis à Westlund et al. (1996) de confirmer le rapport entre la faible charge et les espèces *Microthrix parvicella*, *Type 0041/0675* et *Nostocoida limicola*. *Microthrix parvicella* était l'espèce dominante, suivie des autres espèces.

Williams et Unz (1985) présentent le *Type 0041* et le *Type 1701* comme les bactéries filamenteuses dominantes sur 17 installations examinées aux Etats Unis. Richard (1989), par un suivi de 270 installations réparties sur 35 états, juge que *Nocardia sp* est responsable en général du moussage mais pas du bulking; le *Type 1701*, suivi du *Type 021N* et du *Type 0041* sont largement présents.

Après un suivi de 18 mois de 167 stations d'épuration en Italie, Madoni et al. (2000) ont observé que 84 d'entre elles avaient présenté des problèmes de moussage, 81 de bulking, alors que 55 avaient présenté les deux types de problème pendant cette même période. Les analyses ont démontrées que *Microthrix parvicella* était le micro-organisme filamenteux le plus commun. Il était présent dans 60 % des stations, étant dominant pour les problèmes de moussage dans 75% des cas et pour ceux de bulking dans 53%. Ils ont aussi trouvé des bactéries *Nostocoida limicola* dans 58% et le *Type 0041* dans 44% des stations.

Madoni et al. (2000) ainsi que Jenkins et al. (1993) présentent des tableaux récapitulatifs où *Microthrix parvicella* et le *Type 0092* dominant en Europe par rapport aux problèmes de bulking et moussage. Par contre aux Etats-Unis c'est GALO (*Gordona amarae-like organisms*) selon Madoni et al. et *Nocardia sp.* selon Jenkins et al. qui dominant.

1.3.6. L'effet de la température sur les bactéries filamenteuses

Comme cela a été mentionné, les dysfonctionnements observés peuvent être saisonniers, occasionnels ou continus (Tableau 1.3.1).

Tableau 1.3.1 - Occurrence et pourcentage (entre parenthèses) des stations touchées par le bulking et/ou le moussage pendant plusieurs saisons (total de 167 stations). (d'après Madoni, 2000)

	Total	Printemps	Eté	Automne	Hiver
Bulking ^a	81(48.5)				
continu	26(15.6)				
occasionnel	20(12)	9(5.4)	0	7(4.2)	4(2.4)
saisonnier ^b	36(21.6)	16(9.6)	3(1.8)	10(6.0)	20(12.0)
Moussage ^a	84 (50.3)				
continu	29(17.4)				
occasionnel	24(14.4)	10(6.0)	1(0.6)	5(3.0)	8(4.8)
saisonnier ^b	31(18.6)	8(4.8)	4(2.4)	6(3.6)	17(10.2)

^a Dans 55 cas les stations étaient affectées par le bulking et le moussage

^b Dans quelques stations le bulking et/ou le moussage apparaissent pendant deux saisons.

On peut observer que les dysfonctionnements sont beaucoup plus importants pendant la période d'hiver et de printemps où la température est plus basse.

Wanner et al. (1998) ont réalisé des suivis sur des stations d'épuration en République Tchèque pendant quatre différentes périodes (janvier à février 1996 / mars à mai 1996 / octobre à novembre 1996 et décembre 1996 à février 1997). Pour chaque station les espèces de bactéries dominantes ont été déterminées. Le Tableau 1.3.2 présente les trois principales espèces dominantes par période:

Tableau 1.3.2 - Bactérie filamenteuse dominante dans les liqueurs mixtes des stations d'épuration par boues activées en République Tchèque (d'après Wanner et al., 1998)

Janvier - Février 1996			Mars - Mai 1996			Octobre - Novembre 1996			Décembre 96 - Février 97		
Micro-organisme Filamenteux	Nbre de stations	%	Micro-organisme Filamenteux	Nbre de stations	%	Micro-organisme Filamenteux.	Nbre de stations	%	Micro-organisme Filamenteux	N° de stations	%
<i>N. limicola</i>	8	32	<i>N. limicola</i>	14	45	<i>M. parvicella</i>	15	63	<i>M. parvicella</i>	11	100
<i>M. parvicella</i>	6	24	<i>M. parvicella</i>	12	39	<i>N. limicola</i>	11	46	Type 0092	8	73
Type 0092	6	24	Type 0803	4	13	Type 0092	7	29	Type 0041	3	27

Si on prend en compte seulement les micro-organismes filamenteux, *M. parvicella* a dominé pendant toute la période du suivi. Les auteurs mettent en évidence que la plus forte abondance des filaments (niveau 6) a été observé dans 28 % des stations pendant la période 4 et 3 % des stations pendant la période 3. Pour la période supposée plus chaude (période 2), le niveau maximal d'abondance était le niveau 5 pour 10 % des stations.

Selon Knoop et Kunst (1998), *M. parvicella* a une croissance optimale à une température au-dessous de 15 °C avec une charge organique inférieure à 0.1 kg DBO₅/kg jour. Dans ces conditions les filaments peuvent atteindre des longueurs entre 200 et 500 µm. Une augmentation de la température de 12 à 20 °C cause la réduction de la longueur des filaments jusqu'à un facteur dix.

Une étude sur l'influence de la température combinée à la charge polluante sur le processus d'épuration biologique et la croissance des micro-organismes a été réalisée par Pöpel et Fischer (1998). Pour cela ils ont créé un paramètre appelé "coefficient apparent de température", qui est fonction de la déviation entre la charge actuelle et la charge nominale, le type de réacteur (parfaitement agité, canal, etc.) et l'effet de la température sur la cinétique de conversion. Ce paramètre permet des réductions d'investissement une fois inclus dans les projets de conception des réacteurs biologiques, du fait de la prise en compte de l'effet de la température.

1.3.7. Les effets des substrats sur les bactéries

Pour évaluer l'influence de l'oxygène dissous, Sezgin et al (1978) ont proposé un modèle basé sur la compétition entre les espèces de bactéries : les bactéries filamenteuses et les bactéries zoogléales. Pour que l'oxygène soit disponible pour les bactéries qui sont à l'intérieur du floc, il doit franchir plusieurs barrières: la couche limite, le réseau des exopolymères, les débris accrochés aux floes, etc. La Figure 1.3.5(a) présente le profil de concentration en oxygène dissous d'un floc bactérien.

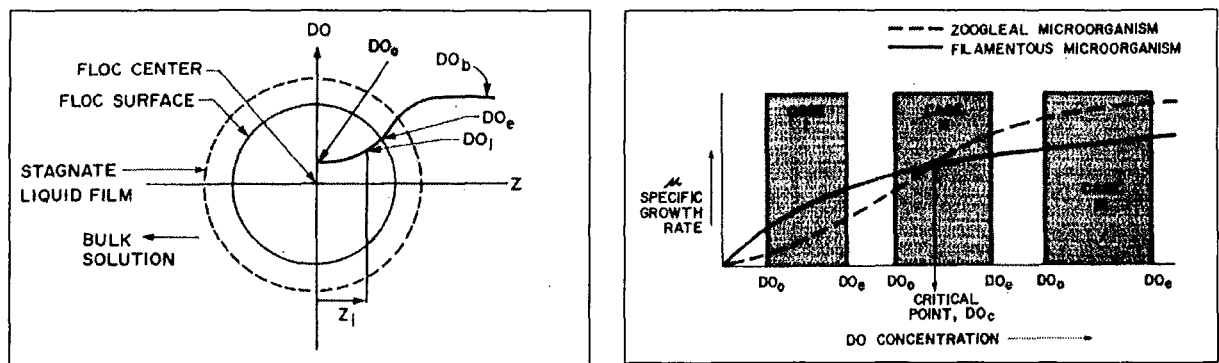


Figure 1.3.5 - Profil de concentration d'oxygène pour un floc bactérien et effet de l'oxygène sur la compétition entre les espèces de bactéries (d'après Sezgin et al., 1978)

On peut alors postuler trois cas, selon la concentration d'oxygène dissous (Figure 1.3.5b).

Cas 1 : A faible concentration, les bactéries filamenteuses sont favorisées. Le développement excessif va provoquer le bulking filamenteux.

Cas 2 : Dans ce cas la partie interne du floc est au-dessous de la concentration critique en oxygène, favorisant le développement des bactéries filamenteuses, mais à l'extérieur se trouve une concentration plus importante, ce qui favorise les bactéries zoogléales. Dans ces conditions on aura des floes bien structurés et avec de bonnes propriétés de décantation et de compression.

Cas 3 : Du fait de la forte concentration en oxygène dissous, le floc entier est à une concentration qui favorise le développement des bactéries formatrices des floes. Les filamenteuses peuvent être éliminées, produisant le phénomène "floc tête d'épingle".

Ceci a été notamment été confirmé dans des travaux sur l'effet de la distribution spatiale (hydrodynamique) (Roche, 1989) ou temporelle (alimentation cyclique) (Charmot et al., 1997) des conditions de milieu sur la mise en place d'un bulking filamenteux. En effet une présence non limitante de substrat entraîne une accumulation de sous-produits du

métabolisme microbien, dont les exopolymères, à l'intérieur des floccs, provoquant ainsi une limitation accrue du transfert d'oxygène et de substrat vers les colonies de bactéries zoogléales au profit des bactéries filamenteuses. Aussi une absence de substrat dans le réacteur provoque un relargage des exopolymères des floccs vers la phase liquide. L'alternance de conditions nutritionnelles permet donc de réguler la concentration en exopolymères à l'intérieur des floccs et de favoriser la croissance des bactéries zoogléales. Une modélisation de ces phénomènes est proposée par Charmot et al. (1999).

D'autres facteurs peuvent favoriser le développement des bactéries filamenteuses, comme la carence d'un substrat spécifique ou la présence de matières flottantes. Le Tableau 1.3.3 résume la situation en France.

Tableau 1.3.3 - Principales causes du développement des micro-organismes filamenteux (d'après Duchène et Cotteux, 1998)

Micro-organisme	Causes	Charge massique
<i>Microthrix parvicella</i>	Périodes d'anoxie trop longues; Septicité; Flottants permanents.	Faible charge Faible charge Faible charge
Type 0041	Effluents dilués – carence en carbone	Faible charge
<i>Thiothrix sp</i>	Soufre réduit, Carence en nutriments et oxygène, Forme oxique.	-- Faible charge Charge moyenne
Type 021N	Carence en nutriments et oxygène, Forme oxique.	Faible à moyenne charge Charge moyenne et croissante
Type 0961	Carence en nutriments (plus souvent en phosphore)	Faible à moyenne charge
Type 0914	Soufre réduit	--
<i>Beggiatoa sp.</i>	Soufre réduit ; anaérobiose (dépôts)	--
<i>Sphaerotilus natans</i>	Carence en nutriments et oxygène (Carbone facilement assimilable)	Faible charge
Type 1701	Carence en nutriments et oxygène	Faible à moyenne charge
Type 1851	Carence en nutriments et oxygène	Faible à moyenne charge
<i>Nostocoida milicola</i>	Carence en nutriments et oxygène	Faible à moyenne charge
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Carence en nutriments et oxygène	Charge conventionnelle
Type 0675	Carence en nutriments et oxygène Effluents dilués (?)	Faible charge --
Type 0803	Forte septicité	--
Type 0092	Carence en nutriments et oxygène Flottants non repris (septicité)	Faible à moyenne charge Faible charge
Type 0581		--
<i>Nocardioformes</i>	Flottants non repris (âge de boues élevé et persistance de flottants) Carence en nutriments (laiterie)	-- Charge conventionnelle Faible charge
<i>Champignons</i>	pH variable – effluents chimiques	--
<i>Algues pigmentées</i>	Sous charge – long arrêt de l'aération	Faible charge

1.3.8. Le contrôle du bulking

En général, sauf en cas de carence en oxygène et de forte charge, il faut corriger les problèmes qui ont causé le dysfonctionnement, pour que le bulking soit éliminé (Duchène et Cotteux, 1998).

Le contrôle de la croissance entre les deux espèces de bactéries (filamenteuses et zooglées) semble être la meilleure procédure à adopter pour obtenir des floccs bien formés. Le facteur essentiel pour le contrôle par sélection cinétique est le rapport entre le taux maximal de croissance et la concentration à demi-saturation (μ_m/K_S). Pour des faibles concentrations en substrat, la faible valeur de la concentration de demi-saturation (K_S) pour les bactéries filamenteuses provoque un fort taux de croissance. Pour cette raison elles sont appelées stratégiques- K_S , car une faible valeur de K_S indique une forte affinité pour le substrat. Par contre, pour des fortes concentrations, le taux de croissance effectif des bactéries formatrices de floccs est plus élevé, ce qui donne des valeurs importantes de μ_m et favorise leur développement (stratégiques- μ_m) (Beccari, 1998).

Les procédures pour contrôler le développement des bactéries filamenteuses peuvent être de deux natures: méthodes biologiques sélectives qui ont pour but de contrôler la croissance des micro-organismes filamenteux et méthodes non spécifiques, qui vont agir sur tous les micro-organismes du bassin et qui sont utilisées en général de façon corrective (Eckenfelder et Grau, 1992).

Dans le cas des méthodes biologiques sélectives (solutions préventives) on utilise des zones de contact qui ont pour objectif de minimiser la formation des bactéries filamenteuses. La zone de contact permet d'obtenir une zone à forte concentration en substrat soluble, que les bactéries doivent être capables d'assimiler rapidement. Comme les bactéries formatrices de floccs assimilent plus rapidement le substrat, elles vont gagner la compétition avec les bactéries filamenteuses. Le temps de contact est de l'ordre de 10 minutes et la charge est de 100 mg de DCO assimilable (soluble) par gramme de matière volatile (Pujol et Canler, 1994). Ces sélecteurs peuvent fonctionner en aérobiose, anaérobiose ou anoxie (Albertson, 1991; Wanner, 1994; Fainsod et al., 1999; Prendl et Kroiß, 1998). Aussi l'utilisation de bassin d'aération de type piston ou étagé (Roche, 1989) permet d'empêcher un développement excessif des bactéries filamenteuses.

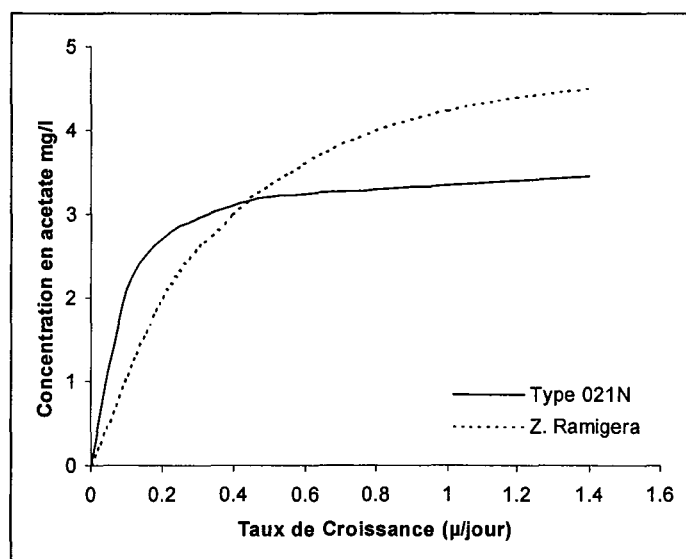


Figure 1.3.6 - Taux de croissance pour les bactéries formatrices de flocc (*Zooglea ramigera*) et bactéries filamenteuses (*Type 021N*) en fonction de la concentration en acétate (d'après Beccari, 1998).

Parmi les produits utilisés pour résoudre le problème du bulking (solutions curatives) on peut citer le chlore et le peroxyde d'oxygène. Ces produits n'éliminent pas seulement les bactéries

filamenteuses mais aussi toute la microfaune: leur addition doit être réalisée avec beaucoup de précautions. Le chlore (généralement sous la forme d'eau de Javel ou hypochlorite de sodium) est le plus utilisé à cause de son faible coût et parce qu'on le retrouve souvent sur site (il est utilisé pour aseptiser les bassins ou d'autres unités de la station ou encore comme post-traitement après la décantation secondaire). L'addition peut se faire directement dans le bassin d'aération, dans le canal de recirculation ou en le mélangeant dans une recirculation externe de la boue du bassin (Jenkins et al., 1993)

Hwang et Tanaka (1998) ont réalisé des comparaisons entre le chlore, un polymère d'acrilamine cationique et un polymère anti-filamenteux (amine quaternaire) (AFP), pour contrôler le moussage provoqué par *Microthrix parvicella*. En ce qui concerne le chlore, ils ont observé qu'à partir de 10g/kg de matière volatile les floes sont détruits et que les protozoaires sont inactifs mais qu'il n'y a pas eu de changements importants par rapport aux bactéries filamenteuses. C'est seulement avec une dose de 500g/kg de matière volatile que ces dernières ont complètement disparu. Cette forte dose nécessaire est liée au fait que *Microthrix parvicella* possède une forte résistance au chlore qui peut être due à des changements hydrophobes/hydrophiles quand elle est soumise à des conditions stressantes. Les résultats obtenus avec l'AFP ont été beaucoup plus satisfaisants.

L'addition de chlorure ferrique pour contrôler le bulking et précipiter les phosphates a été employée par Yamamoto et al. (1998). L'effet de l'oxydation/réduction du fer influence celle du sulfure. L'énergie libérée par la réduction du sulfate en sulfite peut être utilisée pour les bactéries filamenteuses pour leur développement. De cette façon l'addition de $FeCl_3$ va former des floes plus gros (effet coagulant) et inhiber la formation de sulfite.

La taille des protozoaires varie en général de 5 à 300 µm et ils se reproduisent, essentiellement, par division cellulaire (avec fission du noyau). Le premier protozoaire a été observé par Antonie van Leeuwenhoek en 1674. Aujourd'hui on compte plus de 65 000 espèces de protozoaires, dont environ 40 000 qui vivent dans le milieu naturel. On a pu dénombrer une centaine de protozoaires dans les stations d'épuration, mais si on considère une unité en particulier on peut trouver entre une dizaine et une vingtaine d'espèces dans les boues activées.

En conditions normales de fonctionnement la concentration des protozoaires est supérieure à 10^6 individus/L. A une concentration de 10^7 individus/L on obtient généralement de bons rendements d'épuration. Par contre, des concentrations inférieures à 10^5 individus/L indiquent des rendements faibles (Drakides, 1978). En terme de biomasse, les protozoaires représentent entre 0.17 et 0.44 % de la biomasse des boues activées dans la phase initiale de colonisation et on arrive à 9% à l'état stationnaire (Madoni, 1994a).

a. La classification

Dans la littérature on trouve des classifications variables pour les protozoaires (Gerardi et al., 1990; Curds, 1992; Jahn et al., 1979; Ridet et al., 1992; Madoni et al., 1996). Nous nous intéresserons à celle de Madoni, compte tenu des informations qu'elle donne sur l'état des stations. Le classement, ainsi qu'un petit guide de reconnaissance des espèces de protozoaires sont présentés dans l'annexe B. D'une façon plus simpliste on peut les classer en flagellés, ciliés et amibes (Figure 1.4.2). Les ciliés, présents en concentration importante en conditions normales de fonctionnement, peuvent être classés, selon leur régime alimentaire, en bactériophages et carnivores. Les bactériophages, selon leur mobilité, sont groupés en nageurs, mobiles de fond et sessiles.

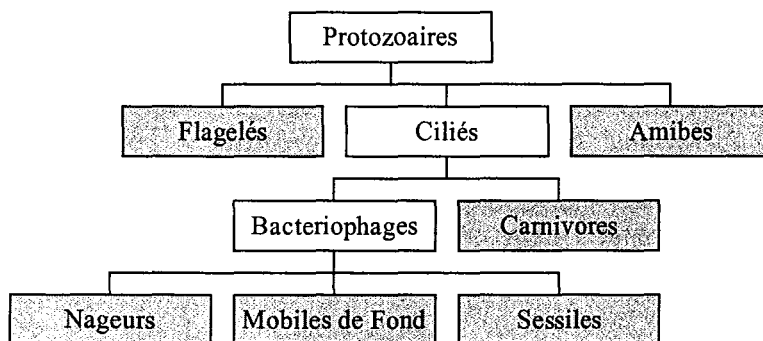


Figure 1.4.2 - Classification des protozoaires

Il y a de nombreuses espèces de protozoaires qui sont attachés ou qui circulent sur ou entre les floes (protozoaires sessiles, mobiles de fond et nageurs respectivement). Ce sont en majeure partie des ciliés (environ 10^6 individus/L dans une installation en fonctionnement normal d'après Madoni (1994b)) et essentiellement des bactériophages qui abaissent la turbidité et améliorent ainsi la qualité des effluents (Curds et al., 1968).

Plusieurs auteurs se sont attachés à recenser les différentes espèces de ciliés présentes (Curds et Cockburn, 1970a); (Sasahara et Ogawa, 1983) et d'établir des relations entre les performances des installations et la présence et l'abondance de tel ou tel type de protozoaire (Curds et Cockburn, 1970b ; Madoni, 1994c ; Nicolau et al., 1997). Martin-Cereceda et al.

(1996) ont utilisé l'analyse de corrélations partielles (*PLS*) pour les protozoaires de 10 stations d'épuration de Madrid et ont obtenu des relations entre les groupes de protozoaires et l'efficacité du traitement (qualité des effluents et décantabilité). Au travers d'une analyse en composantes principales (ACP), Genoveva et al (1991) ont exprimé 73% de la variabilité du procédé à l'aide de six composantes, parmi lesquelles la première prenait en compte le groupe de ciliés qui représentait à lui seul 25% de la variabilité.

Le Tableau 1.4.1. présente les groupes dominants de protozoaires en fonction de la charge organique et le Tableau 1.4.2. donne les informations sur l'état de la station en fonction du groupe de protozoaires dominant.

Tableau 1.4.1. – Groupe dominant en fonction de la charge organique (d'après Richard, 1989)

Conditions	Groupe Prédominant
Faible charge organique	Ciliés sessiles, rotifères et invertébrés, spécialement nématodes.
Charge organique optimale	Bonne diversité d'organismes, dominée par les nageurs libres et ciliés sessiles.
Forte charge organique	Flagellés, amibes et ciliés nageurs

Tableau 1.4.2. - Quelques situations particulières dans le fonctionnement d'une station d'épuration par boues activées (Madoni, 1994c)

Groupe Dominant	Efficacité	Cause possible
Petits flagellés	Mauvaise	Boues peu oxygénées ; charge trop forte ; entrée de substances fermentescibles
Petits ciliés nageurs (< 50 µm)	Médiocre	Temps de contact trop faible ; boues peu oxygénées
Grands ciliés nageurs (> 50 µm)	Médiocre	Charge trop forte
Ciliés mobiles de fond	Bonne	
Ciliés sessiles + mobiles de fond	Bonne	
Ciliés sessiles	En baisse	Phénomènes transitoires (charge discontinue ; extraction récente de boues)
Petites amibes nus et flagellés	Mauvaise	Charge trop élevée non facilement biodégradable
Amibe avec coquille	Bonne	Charge basse ; liqueur diluée ; bonne nitrification

Les principaux facteurs qui affectent le développement des protozoaires sont: la concentration d'oxygène dissous, la température, le pH, la concentration de CO₂, la lumière, la salinité, le débit, la présence de toxiques, la composition et quantité des nutriments organiques et inorganiques, les rapports de compétition et prédation, l'origine des organismes et les conditions opératoires (Gerardi et al., 1990). Un autre facteur important pour les protozoaires est l'âge des boues.

La Figure 1.4.3 présente l'évolution des groupes de micro-organismes en fonction de l'âge des boues. Dans le cas d'un âge de boue élevé on a une prédominance des ciliés fixés (sessiles) et

"Wastewater Biology: The Microlife" de Gerardi et al. (1990). Après avoir identifié et comptabilisé les individus de chaque espèce présente on peut utiliser les ouvrages de: Seviour et Blackall, 1999; Drakides, 1978; Canler et al., 1999; Madoni et al., 1996 ou Gerardi et al., 1990 pour obtenir les informations fournies par l'espèce ou groupe prédominant sur les conditions de fonctionnement de la station.

De nombreux indices biotiques, tels que le "Extended Biotic Index" (*EBI*) de Woodiwiss (1980) et le "Indici Sapobrico" de Sladeczek (1973), existent pour exprimer les conditions d'un écosystème aquatique. L'analyse de la microfaune comme indicateur de performance biologique du système est une pratique assez utilisée en routine (Madoni, 1994c).

Madoni (1994d) a proposé le Sludge Biotic Index (*SBI*) comme indice biotique, qui a sa sensibilité basée sur les conditions physiques, chimiques et opératoires de la station. Cette méthode est basée en même temps sur les sensibilités démontrées de chaque groupe envers les paramètres physico-chimiques et opérationnels et sur l'abondance et la diversité de la microfaune. Cette méthode exige aussi une identification, un comptage et une classification.

Cependant il faut reconnaître que le comptage des protozoaires et leur identification réalisés de façon manuelle, en utilisant un microscope, est une tâche fastidieuse réservée à des opérateurs expérimentés et bien formés.

1.4.2. Les métazoaires

Les métazoaires sont des micro-organismes pluricellulaires d'une telle complexité que leur cycle reproductif est très lent. Pour cette raison on en trouve seulement dans le cas d'une aération prolongée où l'âge des boues est élevé. Cependant, leur présence n'est pas un indicateur de qualité de l'effluent ni de performance d'épuration. Parmi les principaux métazoaires présents dans les stations d'épuration on peut citer les sous-embranchements suivants: *Rotifères*, *Nématodes*, *Gastrotriches*, *Oligochètes* et *Tardigrades*.

La présence des rotifères dans les stations d'épuration est importante, car ils stimulent l'activité et la décomposition de la microflore, augmentant ainsi la pénétration de l'oxygène et recyclant les nutriments minéraux. Il y a deux classes de rotifères: *Monogononta* (tête avec une couronne de cils) et *Digononta* (tête divisée en deux couronnes de cils) (Gerardi et al., 1990).

Les *Nématodes* sont présents dans presque toutes les installations de traitement d'eau en faible quantité. Même s'ils sont souvent sur ou entre les floccs, les déstructurant, leur présence n'est pas forcément défavorable. Elle peut indiquer la formation de dépôts (Canler et al., 1999).

L'*Oligochète* est un vermiforme allongé, doté de soies dorsales, qui peut mesurer de 0.5 à 4 mm. Ils sont très rares dans les boues activées et apparaissent seulement à très faible charge et indique la présence de nitrates.

Les *Gastrotriches* sont des métazoaires de forme cylindrique, de dimension comprise entre 100 et 300 µm avec la partie terminale dichotome. On les trouve seulement dans des boues à très faible charge mais ils restent rares dans les boues activées (Madoni et al, 1996).

1.5. Nouvelles Méthodes d'Analyse de la Microfaune

Plusieurs types de techniques nous permettent d'étudier la microfaune. A part les méthodes manuelles de caractérisation des protozoaires et des bactéries basées sur la morphologie et quelques colorations simples, d'autres types de mesure sont possibles pour réaliser des études sur le comportement de la biomasse. La distribution de taille des particules nous donne une information sur la taille des objets sans les différencier, la microscopie associée à l'analyse d'image peut nous fournir des informations plus précises sur le contenu de l'échantillon. Si on veut aller vers l'échelle moléculaire et en particulier identifier les bactéries (ou les groupes fonctionnels) avec précision, on utilise les techniques FISH et de microautoradiographie.

1.5.1. La distribution de la taille des particules (DTP)

La détermination de la distribution de la taille des particules peut être réalisée par plusieurs méthodes :

a. La filtration

L'utilisation de la filtration séquentielle avec une gamme de diamètres d'ouverture permet d'obtenir des informations sur la distribution de taille des particules. Cette distribution de taille par classe (fenêtre de taille) peut être aussi obtenue par rapport au pourcentage en masse de chaque classe.

Une des applications est la vérification du fonctionnement des décanteurs primaires et secondaires. Neis et Tiehm (1997) ont employé cette méthode pour vérifier l'état des décanteurs de trois stations d'épuration. Ils ont utilisé des filtres de diamètre de pore de 0.1 μm à 125 μm et ont réalisé des analyses de taille à l'aide d'un appareil (Galai). Ils concluent que les particules qui sortent du décanteur primaire doivent avoir une taille inférieure à 32 μm pour ne pas surcharger le bassin d'aération. Par contre la plus grosse partie des particules rejetées dans le milieu récepteur à la sortie du clarificateur doivent avoir une taille inférieure à 8.0 μm .

Ils ont observé pendant la période d'analyse une augmentation de la taille des particules en fonction du temps, probablement due à des phénomènes d'agrégation. Les distributions obtenues par filtration et par analyse par diffraction laser ne sont pas en très bon accord. Les forces de frottement et/ou phénomènes d'agrégation sont considérées comme étant responsables de cet état de fait.

b. Granulométrie par laser

Il y a sur le marché plusieurs équipements pour mesurer la granulométrie en utilisant des faisceaux laser. Ces équipements diffèrent entre eux par le principe de mesure.

b.1. Théorie de la diffraction

Le fonctionnement des granulomètres par diffraction laser est basée sur les théories de Fraunhofer et de Mie. La théorie de Fraunhofer prévoit la figure de diffraction créée lorsqu'un

faisceau laser traverse un disque plein et opaque de dimensions connues. Comme il y a beaucoup de particules qui ne sont pas opaques ni qui ont la forme d'un disque (comme les boues et protozoaires qui sont transparents et amorphes), cette théorie est peu adaptée dans le cas présent.

Mie a développé une théorie pour prévoir la façon selon laquelle la lumière est soit diffusée, soit absorbée par la particule. Cette théorie suppose que la particule est sphérique, ce qui est le cas en première approche quand on analyse les boues activées s'il n'y a pas trop de filaments en dehors des floes. Elle demande la connaissance d'informations sur les particules, comme par exemple, leur indice de réfraction et d'adsorption.

Au travers de ses détecteurs, l'équipement mesure l'image de diffusion créée par les particules et, en utilisant les théories ci-dessus, calcule la taille des particules. Plusieurs études ont été réalisées en utilisant ce type d'équipement pour analyser soit la distribution des particules, soit le diamètre moyen. Snidaro et al. (1997) l'ont employé pour la caractérisation de la structure des floes et Wilén et Balmér (1999) pour évaluer l'influence de la concentration d'oxygène sur la structure des floes.

La concentration de l'échantillon ne doit pas être trop élevée, pour éviter des résultats erronés. De ce fait, on a besoin de diluer la boue. Avant de réaliser la mesure de la Distribution de la Taille des Particules (*DTP*), l'appareil vérifie la concentration, calculée selon la loi de Beer-Lambert, et exprimée en terme d'obscurité de l'échantillon. L'obscurité est une mesure de la quantité de lumière perdue lors de l'ajout de l'échantillon dans le faisceau laser. Une obscurité entre 10 et 30 % est idéale. On peut travailler avec des valeurs entre 5 et 50 %, mais on risque d'avoir des diffusions multiples. Entre 30 et 50 et entre 5 et 10% le rapport signal/bruit de fond n'est pas très bon.

b.2. Théorie du temps de transition

L'appareil commercialisé par Galai (Migdal Haemek, Israël) est basé sur la théorie du temps de transition (Time Of Transition – TOT): les particules stationnaires ou non sont balayées par un rayon laser focalisé tournant à vitesse constante grâce à un prisme triangulaire. L'intersection du faisceau laser avec une particule dans la zone focalisée génère un signal détecté par la photodiode. La taille de chaque particule est calculée par la durée (c'est-à-dire TOT) et la forme du signal. Hillgardt et Hoffmann (1997) l'ont utilisé pour étudier l'effet de l'addition de polymères, du chlorure ferrique et d'autres agents sur la décantabilité des boues activées.

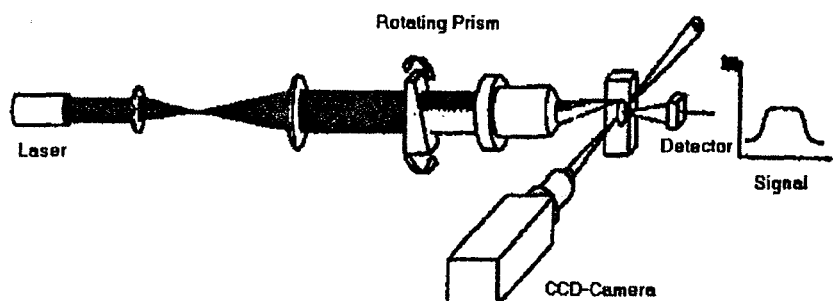


Figure 1.5.1 - Schéma simplifié d'un équipement de mesure de distribution de taille de particule par la théorie du temps de transition.

b.3. Principe de la diffusion aux petits angles

Le Spectrex utilise le principe de la diffusion aux petits angles (near angle light scatter). Un rayon laser en rotation traverse les parois de la cellule de mesure. Quand on le dirige à travers le centre de la zone de mesure, l'appareil ne compte pas seulement les particules en suspension, mais mesure aussi leur taille. Cet équipement a été utilisé par Sanin et Veselind (1999) pour étudier le comportement de floccs synthétiques, qui ont été développés pour aider à mieux comprendre les mécanismes de floculation des boues activées.

1.5.2. La microscopie

Plusieurs types de microscopie peuvent être utilisés pour étudier les floccs bactériens (Eriksson et Hardin, 1984 ; Jorand et al, 1995 ; Snidaro et al, 1997). Cependant, pour certaines de ces techniques il faut réaliser des pré-traitements sur l'échantillon à analyser (microscopie laser confocale, microscopie électronique). La procédure permet de stabiliser les floccs, préservant le plus possible leurs caractéristiques originales. Droppo et al. (1996) suggèrent une technique à base d'agarose. Ce gel présente des caractéristiques de clarté, de porosité et de fixation qui permettent la coloration, le sous-échantillonnage, le lavage ou même l'analyse microscopique directe.

a. Méthodes classiques d'estimation de la quantité des bactéries filamenteuses

Plusieurs méthodes pour estimer la quantité des bactéries filamenteuses sont proposées dans la littérature. Finstein et Heukelekian (1967) ont été parmi les premiers à quantifier la relation entre le niveau de présence des organismes filamenteux par abondance et les propriétés de décantation des boues activées. Ils ont montré que la longueur totale des filaments par flocc était corrélée avec l'Indice de Mohlman. Pipes (1979) a utilisé une chambre de Neubauer¹ pour compter le nombre des filaments des floccs de boue activée. Il a observé que pour des valeurs au-dessous de 10^2 filaments/mg de matière volatile (*MV*), l'Indice de Mohlman était au-dessous de 100 mL/g. Par contre, pour des valeurs entre 10^2 et 10^3 filaments / mg de *MV*, l'Indice de Mohlman augmentait rapidement.

Sezgin et al. (1978) ont développé une procédure pour mesurer la longueur totale des filaments. Cette procédure, présentée ci-dessous, a été utilisée postérieurement par Palm et al. (1980) et par Lee et al. (1982). Cette procédure utilise huit classes, selon l'abondance des bactéries filamenteuses.

a.1. Technique de mesure de longueur totale des filaments (Sezgin et al., 1978)

1. Diluer 2 mL de l'échantillon de boue activée bien mélangée, d'une concentration en matière sèche (*MS*) connue, avec 1 litre d'eau distillée dans un bécher de 1.5 litres ;
2. Agiter à 95 tours par minutes dans un équipement de "jar test" ;
3. Transférer 1 mL de cette dilution dans une chambre de comptage microscopique calibrée pour contenir 1 mL et couvrir avec une lamelle ;
4. Avec un oculaire doté d'une échelle micrométrique, compter le nombre des filaments par chambre ou la fraction connue de ce volume, utilisant un grossissement 100x ;

¹ La chambre de Neubauer est une lame quadrillée utilisée pour le comptage des hématies.

5. Classer les résultats selon les groupes ci-dessous:

- | | |
|--------------------------|---|
| ① 0 - 10 μm | ⑤ 100 - 200 μm |
| ② 10 - 25 μm | ⑥ 200 - 400 μm |
| ③ 25 - 50 μm | ⑦ 400 - 800 μm |
| ④ 50 - 100 μm | ⑧ > 800 μm (sont mesurés séparément) |

6. Les résultats pourront alors être présentés en terme de longueur totale des filaments (*LTF*) par mL ou par g de matière volatile (*MV*) selon les formules:

$LTF \mu\text{m/ml } MV = \text{Longueur Totale des filaments } (\mu\text{m}) \times \text{facteur de dilution}$

$LTF \mu\text{m/g } MV = \frac{\text{Longueur Totale des filaments } (\mu\text{m})}{MV(\text{g} / L)} \times \text{facteur de dilution}$

Une manière plus simple d'estimer la présence des bactéries filamenteuses est utilisée par les stations de contrôle de pollution de San Jose et Santa Clara, aux Etats Unis. Cette procédure vise seulement à compter le nombre des filaments à partir des interceptions avec une ligne de l'oculaire.

a.2. Technique simplifiée de comptage des bactéries filamenteuses (d'après Jenkins et al., 1993)

1. Transférer 50 μL du liqueur mixte sur une lame de verre ;
2. Couvrir complètement l'échantillon avec une lamelle de 22x30 mm ;
3. En utilisant un grossissement total de 100x, commencer l'observation au bord de la lamelle et parcourir toute la longueur ;
4. Avec un oculaire doté d'une ligne simple, compter combien de fois un organisme filamenteux quelconque coupe cette ligne ;
5. Il faut ensuite additionner le nombre des intersections de tous les champs analysés. Celui-ci est le nombre des filaments. Si une unité de comptage est désirée, le nombre des filaments doit être multiplié par le nombre de champs dans la largeur de 22 mm de la lamelle. Si on a 12 champs dans la largeur, on aura:

$$\text{Nombre des filaments} / \mu\text{L} = \frac{\text{nombre total des intersections}}{50 \mu\text{L}} \times 12$$

Jenkins et al. (1993) présentent une autre technique de mesure pour quantifier *Nocardia sp.*, principale responsable des phénomènes de moussage filamenteux.

L'identification manuelle des espèces de bactéries est réalisée, en général, à l'aide d'une clé qui utilise les colorations de Gram et Nessler et prend en compte la forme des bactéries. Le schéma de ces clés ainsi que la méthodologie pour l'identification sont décrits dans la littérature (Gerardi et al., 1990 ; Jenkins et al., 1993). D'autres techniques, telles que FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), sont aussi utilisées pour l'identification des espèces ainsi que pour l'étude de leur développement (Blackall et al., 1996 ; Pernelle et al., 2001).

des bactéries dégradant le pétrole en analysant la surface de pierres couverte par de l'huile. La taille, la forme et la localisation sont les informations les plus couramment recherchées

Parmi les applications récentes dans le domaine médical, Valet et al. (2001) ont utilisé l'analyse d'image pour localiser des lésions cardio-vasculaires. Gautier et al. (2001) l'ont appliquée à la localisation intracellulaire des molécules qui sont mise en œuvre dans le combat contre le cancer par thérapie photodynamique.

L'analyse d'image connaît et connaîtra encore d'importants développements dans son application aux solides divisés, par leur importance dans le monde industriel (produits de construction comme le ciment et le béton, produits agro-alimentaires (sucres, céréales, etc.), pharmaceutiques, cosmétiques, etc.): il s'agit essentiellement de quantifier la taille et la forme des particules en relation avec leurs propriétés d'usage (Vivier et al., 2000)

Nombre d'applications sont certes encore limitées au laboratoire de recherche ou de contrôle de qualité. Mais les progrès de l'informatique industrielle permettent de plus en plus des applications en temps réel: détection de défauts sur les contenants dans les lignes d'embouteillage, sur les gélules dans l'industrie pharmaceutique, tests de non-conformité de pièces mécaniques (vis, boulons) dans les industries mécaniques, etc.

Duthoo et al. (2001) ont développé un système de contrôle par analyse d'image pour le soudage des crayons combustibles dans l'industrie nucléaire. Moll et al. (1995) proposent un contrôle de qualité de la fabrication des biscuits par analyse d'image en utilisant une caméra couleur. L'analyse de la taille et de la couleur du biscuit permet de s'assurer de son degré de cuisson. D'une façon plus générale Geraci et al. (1996) et Cruz et al. (1996) ont proposé des systèmes de contrôle de production industrielle et de classification d'objets par analyse d'image.

En microbiologie et en biotechnologie, on travaille sur des êtres vivants fragiles, que l'on doit compter ou sur lesquels on désire acquérir des informations morphologiques sans les altérer. L'utilisation la plus simple de l'analyse d'image dans ce domaine est le comptage des individus, comme les colonies dans les boîtes de Petri ou des cellules animales sur des microporteurs (Pichon et al., 1991).

Du fait de la petite taille des micro-organismes, l'emploi d'un microscope optique est de rigueur pour des travaux de routine. Le développement des systèmes en ligne est assez complexe. Il faut faire recirculer l'échantillon sans provoquer de changements importants dans sa composition. Pour résoudre ces problèmes, Lichtfield et al. (1992) ont utilisé un capillaire et Maruhashi et al. (1994) une cellule de flux. Pour éviter les déformations imposées aux cellules vivantes par des conditions hydrodynamiques drastiques, Suhr et al. (1995) puis Bittner et al. (1998) ont proposé un dispositif de microscopie in-situ pour observer les cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* dans un bioréacteur. La qualité de l'image obtenue n'est cependant pas très bonne, ce qui rend le traitement complexe et long. Ces systèmes sont peu applicables aux micro-organismes filamenteux, pour lesquels cependant l'analyse d'image a permis de faire progresser fortement la caractérisation hors ligne lors de leur mise en œuvre.

c) Le cas des micro-organismes filamenteux

Ces micro-organismes ont une grande importance industrielle, mais ils présentent plusieurs morphologies lors de leur culture en milieu liquide: filaments simples, enchevêtrements ou

pelotes plus ou moins chevelues. Cela rend la quantification de la biomasse difficile. La production de métabolites secondaires peut être, parfois, associée à l'état morphologique de ces micro-organismes filamenteux (Matsumura et al., 1980).

L'étude de la croissance des micro-organismes filamenteux par l'analyse d'image a été l'objet de nombreuses applications, comme le montre plusieurs articles de synthèse (Packer and Thomas, 1990; Pichon et al., 1991; Reichl et al. 1992).

Parmi les travaux les plus récents, on peut citer ceux de Higashiyama et al. (1999) qui ont étudié la morphologie de *Mortierella alpina* 1S-4 pendant la production de l'acide arachidonique, en séparant la fraction des granules de celle des filaments. Ils ont montré que la production de l'acide était plus importante pour la fraction de granules. Ils ont observé que les granules deviennent plus lisses par la perte de filaments à leur surface et par réduction de taille due à la fragmentation. Ils ont pu constater une contribution de la morphologie des filaments à la viscosité de la culture.

Si on veut extraire plus d'informations d'un organisme filamenteux on doit utiliser des colorations afin de rehausser les organes ou les fonctions que l'on désire étudier. Des exemples typiques sont les colorations de Gram et Neisser pour identifier les types de bactérie. Packer et al. (1992) ont estimé le volume occupé par le cytoplasme et les régions dégénérées qui contiennent des vacuoles chez *Penicillium chrysogenum*. Une double coloration au bleu de méthylène et à la fuchsine de Ziehl a permis à Vanhoutte et al. (1995) de distinguer six états physiologiques le long des hyphes de ce même champignon.

Les applications les plus récentes utilisent nombre de colorants fluorescents (DAPI, acridine orange) (Pons et Vivier, 1998) ou des techniques sophistiquées (FISH, etc.).

d) Le domaine du traitement des eaux usées

Ce domaine a paradoxalement été peu abordé à l'heure actuelle. Grijspeerdt et Verstraete (1996, 1997) ont développé un capteur en ligne basé sur analyse d'image, pour le décanteur secondaire d'une station d'épuration. Les images sont acquises à partir d'une cellule de mesure qui est placée sur le plateau du microscope, sur lequel est connectée une caméra qui est reliée à un ordinateur. Ils ont pu établir des corrélations entre la surface projetée des floccs avec la concentration des boues activées, sur une unité pilote. Cette corrélation est restreinte à de faibles concentrations et à un même type de boue. En utilisant la dimension fractale, comme un indice de la quantité de bactéries filamenteuses, ils ont constaté que l'Indice de Mohlman (*IM*) et l'Indice de Mohlman dilué (*IMd*) étaient fonction de la dimension fractale (quantité des filaments) et du diamètre équivalent des floccs.

Heine et al. (2001) proposent une procédure pour l'identification rapide de la dégénération des propriétés de décantation des boues activées par analyse d'image, par l'analyse morphologique des floccs bactériens et la quantification des bactéries filamenteuses. Ils ont prévu le phénomène de bulking 2 à 3 jours avant son installation et ont démontré que, dans la phase initiale du développement du bulking filamenteux, la réduction des filaments par agitation ou ultrasons peut être utilisée avec succès. Un outil d'analyse de la microfaune, qui prend en compte les floccs bactériens, les bactéries filamenteuses et les protozoaires par analyse d'image est proposée par Golz et Lange (2001).

1.6. Conclusions

Une culture épuratrice est un véritable édifice biologique, où on trouve plusieurs espèces de bactéries, protozoaires et autres organismes plus évolués. Son efficacité est essentielle pour un développement durable de la planète. Les nouvelles normes européennes mettent en évidence le contrôle des émissions des stations surtout pour les zones sensibles comme c'est le cas dans le bassin Rhin-Meuse.

Des dysfonctionnements tel que le bulking filamenteux qui gêne la séparation de la biomasse de l'eau épurée ou les floccs "tête d'épingle" qui augmentent la turbidité et la *DBO* de l'effluent final, provoquent une chute de l'efficacité et parfois une mise hors service de la station. Plusieurs espèces de bactéries sont responsables de ces dysfonctionnements. Les actions entreprises se font en général de façon curative, quand le phénomène est déjà installé.

Pour le cas du bulking filamenteux, principal dysfonctionnement observé dans les stations, des quantifications sont réalisées habituellement de façon manuelle, pour évaluer la concentration des bactéries filamenteuses à l'intérieur du système biologique. Ces analyses sont longues et fastidieuses, ce que rend pénible leur réalisation journalière. Des analyses automatiques des floccs bactériens ont été déjà proposées à un grossissement faible, auquel les bactéries filamenteuses ne sont pas visualisées.

Au niveau de la microfaune bactérienne nous proposons donc de développer un outil qui permette non seulement d'étudier les floccs bactériens mais aussi les bactéries filamenteuses, de façon à mieux comprendre les phénomènes de dysfonctionnement. Avec cet outil on pourra ainsi suivre l'évolution de la microfaune et engager rapidement des actions préventives, réduisant ainsi les coûts et le temps de remise de la station en condition normale d'opération.

Nous avons ici plusieurs espèces de protozoaires sont sensibles aux conditions du bassin d'aération, ce qui permet de les utiliser comme indicateurs de l'état biologique de la microfaune. Des travaux ont démontré des corrélations entre le groupe de protozoaire dominant et la charge organique ainsi qu'avec l'efficacité de la station, mettant en évidence les possibles causes d'une faible performance. D'autres études ont été menées pour vérifier l'information donnée pour la prédominance de chaque espèce de protozoaire. Plusieurs indices ont été élaborés pour mesurer la qualité de la microfaune, mais ils sont basés sur des analyses manuelles, qui sont souvent réalisées par un spécialiste, qui sont fastidieuses et qui prennent beaucoup de temps.

Une procédure semi-automatique pour l'identification des espèces de protozoaires ainsi que des métazoaires sera donc proposée et étudiée dans le présent travail de façon à optimiser le temps d'analyse ainsi que d'en permettre la réalisation par un opérateur qui n'a pas nécessairement de fortes bases en microbiologie. Les résultats devront permettre d'obtenir des indices sur des éventuels problèmes dans l'étage biologique d'une station d'épuration des eaux usées.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

*" La vérité doit s'inspirer de la pratique.
C'est par la pratique que l'on conçoit la vérité.
Il faut corriger la vérité d'après la pratique."*

MAO TSE-TUNG

Ce chapitre est divisé en quatre parties. Dans la première partie on présente des informations sur les deux principales stations d'épuration étudiées (Nancy-Maxéville et Braga), les installations pilotes conçues pour l'expérimentation en laboratoire avec substrat synthétique puis naturel.

La deuxième partie (Chapitre 2.2) présente les systèmes d'acquisition d'images de Nancy et de Braga et la procédure qui doit être utilisée pour celle-ci. Les méthodes analytiques ainsi que les appareils utilisés pour réaliser les mesures sont présentés dans la troisième partie (Chapitre 2.3).

Le Chapitre 2.4 est consacré aux programmes d'analyse d'image développés et aux méthodes statistiques utilisées. L'évolution et les principales étapes de chaque programme sont expliquées ainsi que les paramètres calculés. Les programmes FlocMorph, Fond Noir et Gram ont été développés pour l'étude de la microfaune bactérienne et le programme ProtoRec pour l'identification des protozoaires et métazoaires. Ce dernier a été mis au point dans le cadre d'une coopération scientifique entre le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique du INPL et le Département du Génie Biologique de l'Université du Minho (Portugal).

2.1. Réacteurs

2.1.1. La station de traitement des eaux usées de Nancy-Maxéville

La filière urbaine de la station d'épuration de la Communauté Urbaine du Grand Nancy, située à Maxéville, a été mise en service en 1971. Elle assure le traitement des eaux usées des 20 communes faisant partie de l'agglomération Nancéenne, avec une capacité de 340.000 équivalent-habitant, soit 100.000 m³/j. En 1985, une filière industrielle d'une capacité de 310.000 équivalent-habitant a été mise en place pour traiter les effluents de la brasserie Kronenbourg, située à Champigneulle. En 1986 a été installée une troisième filière destinée au traitement des boues de la station. Des travaux pour l'implantation du traitement de l'azote et du phosphore sont en cours, afin de respecter la loi sur l'eau de 1992 et la directive européenne de 1991.

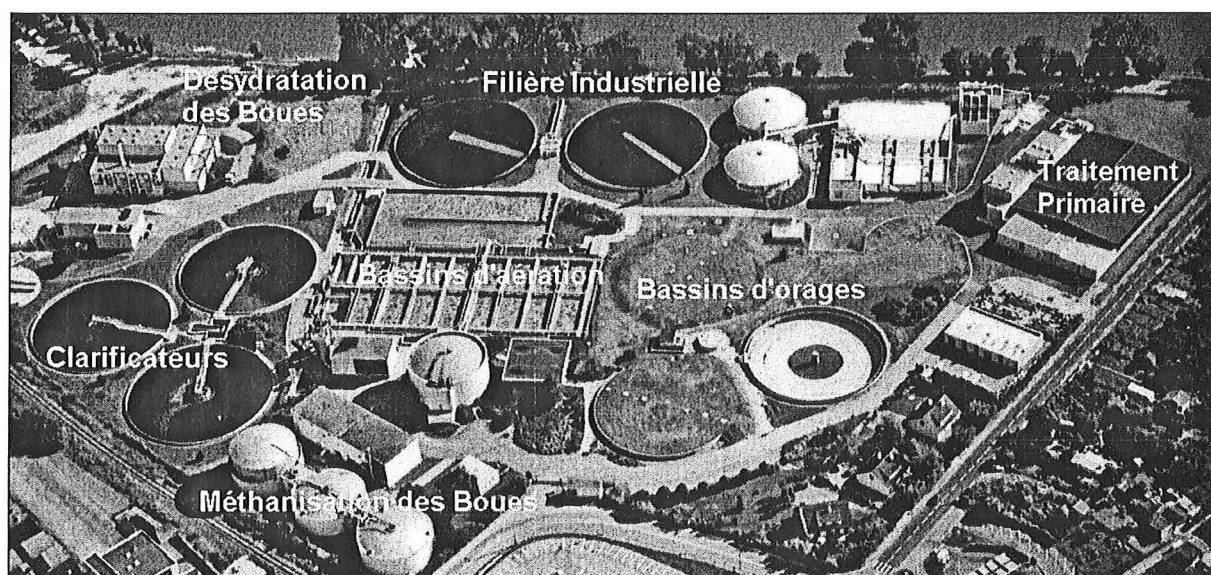


Figure 2.1 - Vue de la station d'épuration du Grand Nancy à côté de la Meurthe.

Pour la filière urbaine, le pré-traitement physique est composé de deux dégrillages (grossier et fin), d'un dessablage, d'un déshuilage suivi d'une décantation. L'eau ensuite est conduite vers les bassins biologiques. La station compte cinq bassins de type canal à insufflation d'air, pour un volume total de 9000 m³. Les trois clarificateurs qui les suivent ont chacun un volume de 5000 m³ pour un diamètre de 42 mètres. La production de l'air se fait à l'aide de trois surpresseurs pour les deux filières (12 à 15 000 m³/h d'air pour la filière urbaine). Une partie des effluents urbains est envoyée vers la filière industrielle après le pré-traitement physique.

En moyenne, la filière urbaine reçoit un débit de 100 000 m³/j pour une capacité maximale de 170 000 m³/j environ) avec une *DCO* moyenne de 260 mg/L et *DBO*₅ moyenne de 120 mg/L. Le débit de sortie de l'eau épurée urbaine est de 70 000 m³/j avec une *DCO* de 43 mg/L (réduction de 83%) et une *DBO*₅ de 14 mg/L (réduction de 88%).

2.1.2. La station de traitement des eaux usées de Braga

La station de traitement des eaux usées de Braga (Portugal), située à Frossos, reçoit un débit moyen de 23 000 m³/jour d'eau usée. Son pré-traitement est composé d'un dégrillage, d'un dessablage et d'un déshuilage suivi d'une décantation primaire. Ensuite, l'eau usée est envoyée

vers les deux bassins biologiques. Chacun a un volume de $2\,138\text{ m}^3$ et est équipé de deux turbines d'aération de surface.

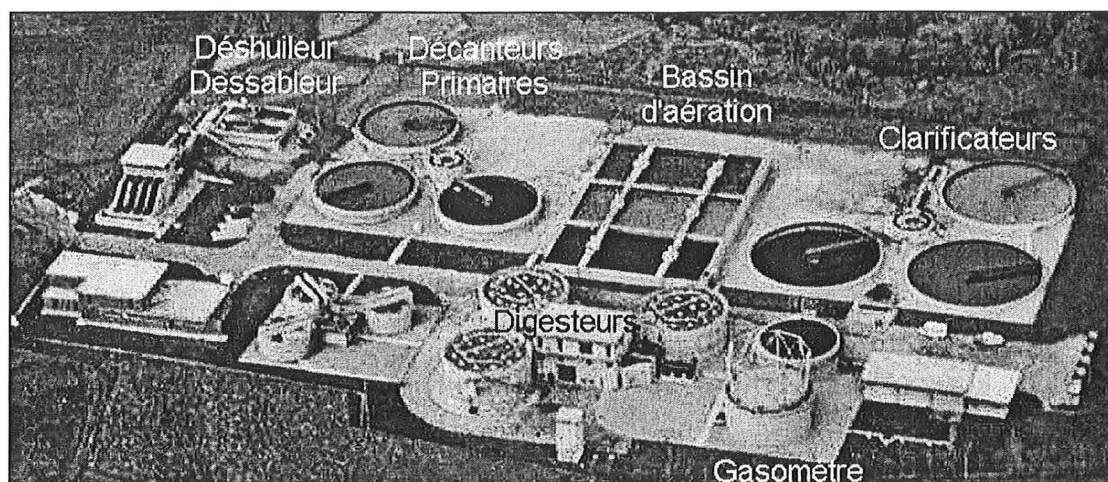


Figure 2.2 – Station de traitement des eaux usées de Frossos - Braga (Portugal)

La séparation des boues activées de l'eau épurée est réalisée par trois clarificateurs de $1\,357\text{ m}^3$ chacun. La boue est recyclée avec un débit de $15\,000\text{ m}^3/\text{jour}$ et l'eau est envoyée à la rivière. La production de boues est de $800\text{ m}^3/\text{jour}$.

Cette station ne possède pas de filière industrielle. L'eau qui arrive à la station est composée, en théorie, de 90% d'effluents urbains. Les valeurs de la charge en *DCO* et *DBO* sont d'environ 450 mg/L et 245 mg/L respectivement.

2.1.3. Les autres stations

Une dizaine d'autres stations ont été analysées, mais un seul prélèvement a été effectué sur chacune d'entre elles. Cette campagne a eu pour but de valider le programme de caractérisation des bactéries filamenteuses et des floccs sur d'autres espèces et sur des floccs de morphologies différentes.

Les stations françaises visitées sont situées en Meurthe-et-Moselle (Damelevières, Dombasle, Liverdun, Pont-à-Mousson et Toul), en Moselle (Metz) et en Haute-Vienne (Aixe-sur-Vienne et Isle-sur-Vienne). Les stations portugaises se situent dans la région du Minho (Caminha et Gelfa/Vila Praia de Ancora). Des informations sur certaines de ces stations se trouvent en annexe C.

2.1.4. Les installations pilotes

a. Le réacteur parfaitement agité

Le réacteur parfaitement agité (Figure 2.3b) est formé d'une base pyramidale (31.5 cm de largeur et 17 cm de hauteur) en PVC, et d'un corps cubique (31.5 cm de côté et 35.5 cm de hauteur) en Plexiglas. La base contient cinq diffuseurs d'air, disposés de chaque côté de la pyramide et au centre, et une sortie pour l'échantillonnage ou pour la vidange. Trois vannes de sortie sont situées à différentes hauteurs afin d'obtenir plusieurs volumes utiles de réacteur.

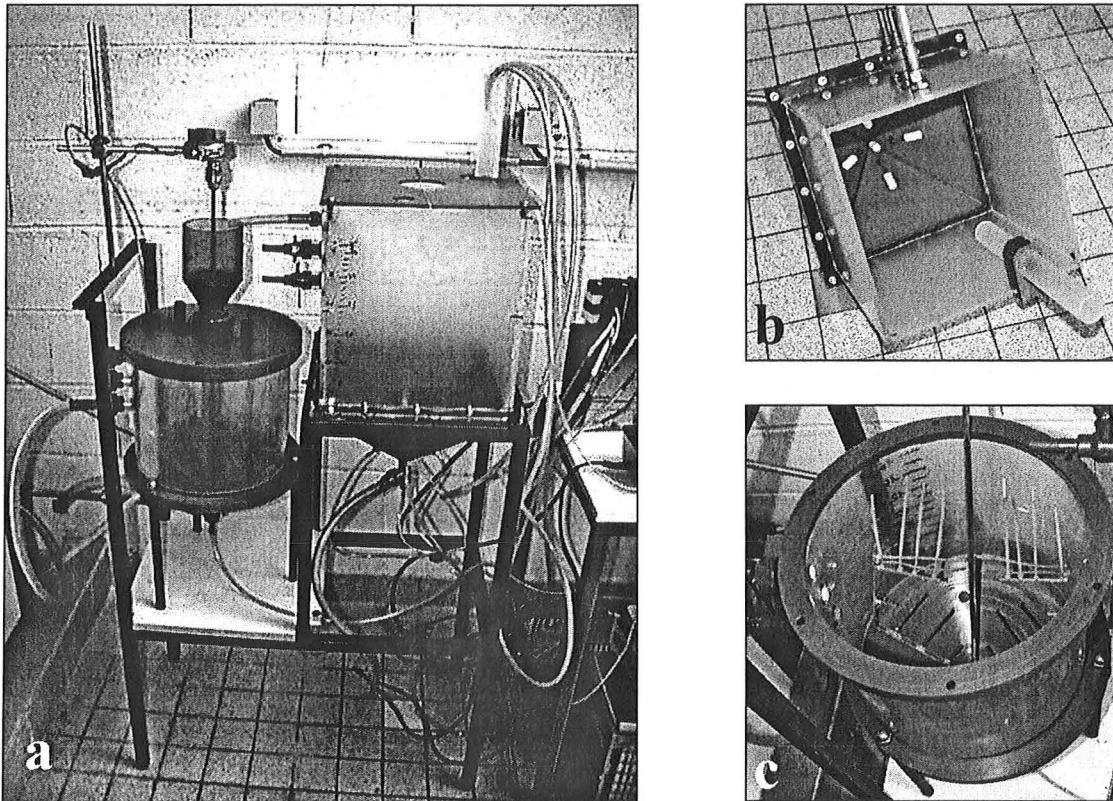


Figure 2.3 - Photo du réacteur parfaitement agité et du décanteur (a), vue interne du réacteur (b) et du décanteur (c)

Pendant toutes les expériences, la sortie la plus haute a été utilisée, ce qui donnait un volume total de 35 L pour le bassin d'aération. Le réacteur est recouvert de deux plaques en Plexiglas pour fermer la partie supérieure. Un tube permet l'alimentation en substrat et le recyclage.

b. Le clarificateur

La sortie du réacteur est dirigée vers le clarificateur. Ce clarificateur (Figure 2.3c) est composé d'une base conique en PVC (18.75 cm de diamètre pour 8.5 cm de hauteur) et d'un corps cylindrique en Plexiglas (18.75 cm de diamètre et 14.25 cm de hauteur). Un cylindre en PVC placé sur la base permet la vidange à travers une vanne et la recirculation de la boue. Les trois sorties placées sur le corps permettent de travailler à des volumes allant de 9 à 15 litres. Une plaque de PVC, sur laquelle est fixé un entonnoir, ferme la partie supérieure. Un moteur de 3 watts entraîne le racleur à 0.5 RPM. Des colliers en plastique ont été fixés sur le racleur afin de casser les flocs qui pourraient remonter dans le décanteur.

c. Le réacteur canal

Le réacteur canal (Figure 2.4) possède un volume total de 35 litres (75 cm de longueur, 54 cm de largeur et 15 cm de hauteur). Ses parois sont en Plexiglas et sur sa base en PVC sont fixés 16 diffuseurs (14 de 25.5cm x 2.0cm et 2 de 12.5cm x 2.0cm) à l'aide de vis. Ils sont alimentés individuellement pour réduire les problèmes de perte de charge.

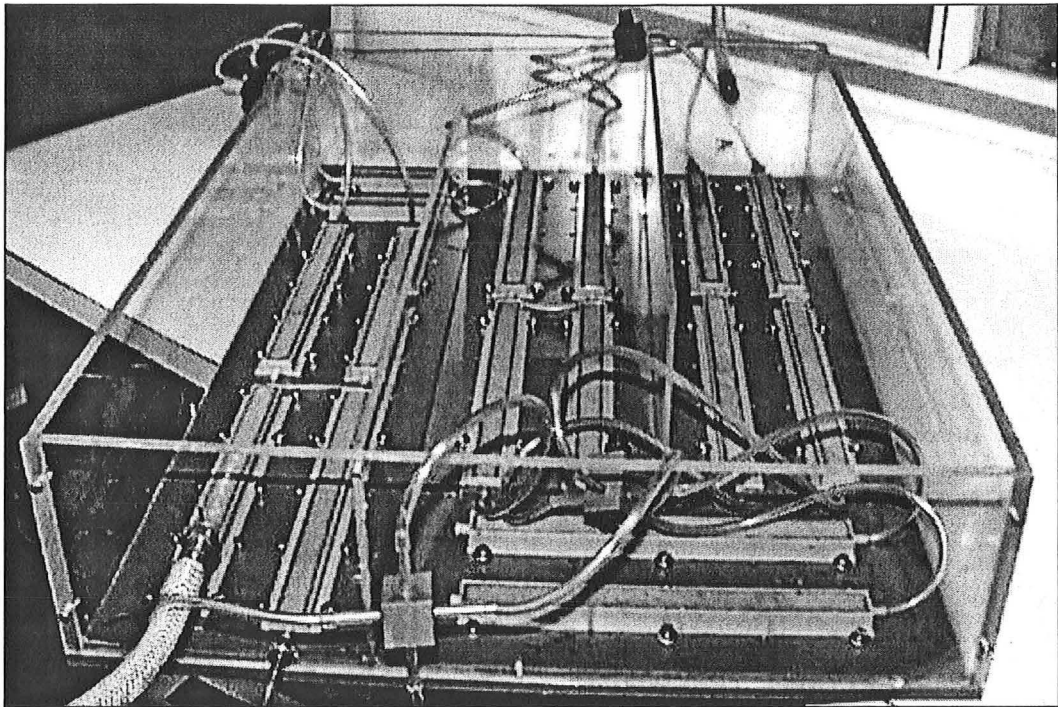


Figure 2.4 - Réacteur pilote type canal

Les canaux formés par deux parois de 58 cm de longueur ont 17.25 cm de largeur. L'entrée et la sortie (1.1 cm de diamètre) sont placées au centre du canal à une hauteur de 9.0 cm.

La sortie du canal est dirigée vers le décanteur. Ce décanteur est le même que celui qui a été utilisé avec le réacteur parfaitement agité.

2.1.5. L'alimentation en "substrat synthétique"

Quatre expériences ont été réalisées : trois avec le réacteur parfaitement agité et une avec le réacteur canal.

Le substrat synthétique (Vaxelaire, 1994) utilisé correspondait à une demande chimique en oxygène (*DCO*) qui variait de 100 mg/L jusqu'à 400 mg/L pendant la phase d'adaptation (une semaine) et restait ensuite à une valeur constante de 400 mg/L. Pour préparer 1 litre de solution mère on utilise 628 g d'extrait de viande (Viandox®), 33.82 g de saccharose, 27.06 g de chlorure d'ammonium et 3.68 ml d'acide phosphorique. On stocke cette solution concentrée par dose de 50 mL au congélateur. Pour obtenir 50 litres de substrat à 400 mg/L en *DCO*, il suffit de dissoudre deux flacons de 50 ml (dilution 1:500) dans 50 litres d'eau de ville.

Les débits d'alimentation et de recyclage ont été assurés par une pompe péristaltique à deux voies (Gilson Miniplus2) à une valeur constante de 1,5 L/heure. Les boues activées utilisées pour l'ensemencement ont été prélevées dans un canal de recyclage de la station d'épuration de Nancy. Ensuite, elles ont été diluées avec de l'eau de ville jusqu'à obtenir une concentration en *MES* proche de 3,0 g/L. La Figure 2.5 présente les montages du réacteur parfaitement agité et du réacteur canal.

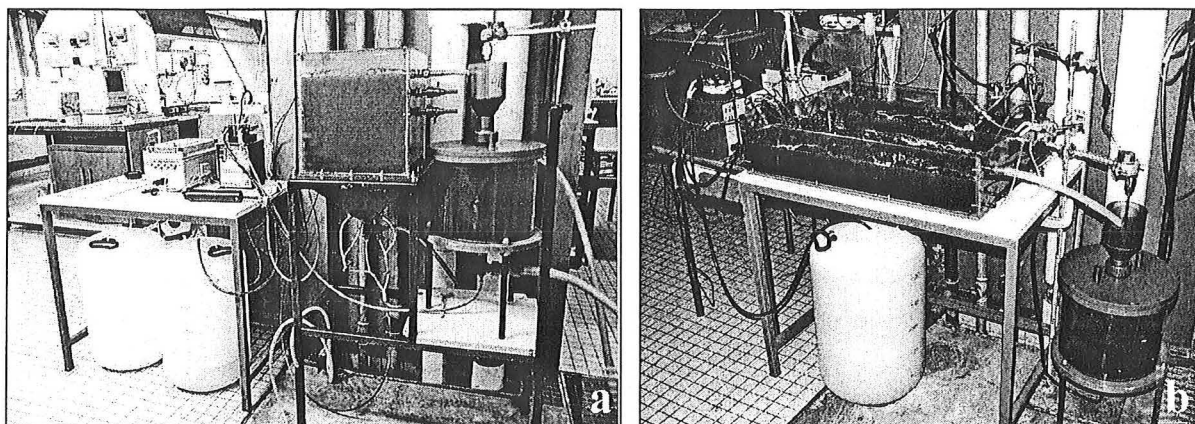


Figure 2.5 - Montage expérimental des réacteurs parfaitement agité (a) et canal (b) pour le substrat synthétique.

La mise en route des expérimentations avec le substrat synthétique a été faite selon la procédure suivante:

- Ouvrir l'air et remplir le décanteur d'eau ;
- Diluer les boues afin d'obtenir une concentration proche de 3g/L et charger le réacteur ;
- Laisse fonctionner le système pendant une journée avec aération et recyclage mais sans aucune alimentation ;
- Ensuite, commencer avec une alimentation de 100 mg/L en *DCO* pendant 1 jour, de 200 mg/L pendant 3 ou 4 jours, 1 jour à 300 mg/L et ensuite stabiliser la *DCO* à 400 mg/L (concentration qui doit être utilisée jusqu'à la fin de l'expérience).

2.1.6. L'alimentation en "substrat naturel"

Pour ces expériences on a utilisé de l'eau de sortie des décanteurs primaires de la station d'épuration de Nancy. Les réacteurs ont été installés dans une halle d'essais sur la station, dans laquelle il y a une boucle de circulation de cette eau qui retourne ensuite en tête de station.

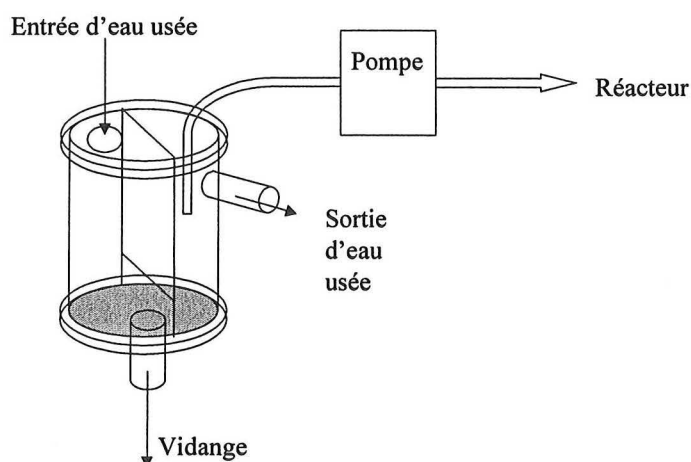


Figure 2.6 - Schéma de l'installation du bac d'alimentation

Un bac (8,5 cm de diamètre et 26 cm de hauteur) a été conçu pour qu'on puisse prélever une fraction de cette eau usée. La Figure 2.6 présente le schéma du bac d'alimentation. L'eau entre par la partie supérieure, passe par une chicane et sort vers l'égout. Dans le bas se trouve

une vanne de vidange. Tous les jours on doit nettoyer le bac pour éviter l'accumulation des particules solides présentes dans l'eau usée.

Les stations de traitement d'eaux usées domestiques sont soumises, au cours de la journée, à des variations importantes en terme de concentration de la pollution (ce sera illustré dans le chapitre 3) et de débit. Afin de faire fonctionner les réacteurs pilote dans des conditions réalistes, on a tenté de reproduire les variations de débit en combinant les actions de trois pompes (débit maximal en milieu de journée et minimal la nuit).

Trois pompes péristaltiques (deux Gilson Miniplus2 et une Vial Medical 1000 mini Becton Dickinson) ont ainsi été reliées à des programmateurs pour simuler les variations de débit de la station d'épuration. La programmation des pompes est la suivante: une pompe assure le débit de base (1.0 L/h) et le recyclage (2.0 L/h). Une deuxième pompe se met en marche entre 6h et 22h, augmentant le débit d'alimentation à 2.5 L/h. Entre 11h et 15h la troisième pompe apporte 1.0 L/h et le débit d'alimentation total arrive à 3.5 L/h. La Figure 2.7 présente la variation du débit d'alimentation pendant la journée. On peut de cette façon reproduire la tendance des variations de débit de la station de Nancy-Maxéville.

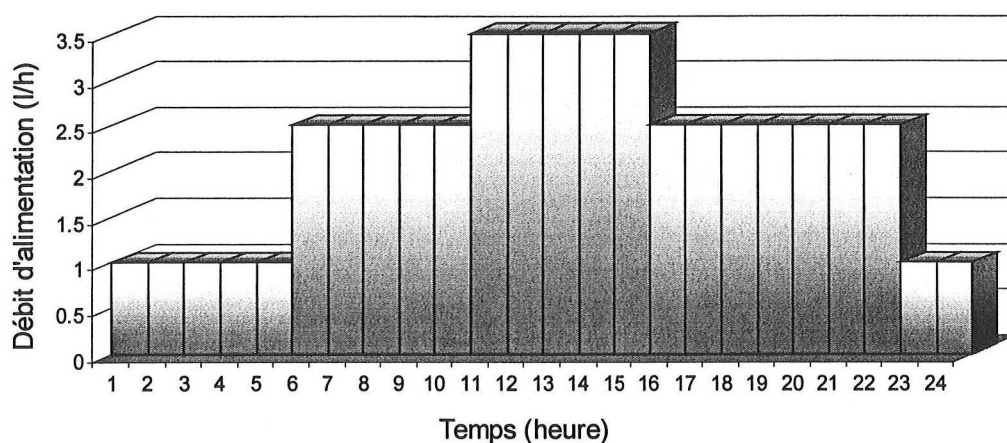


Figure 2.7 - Variation du débit d'alimentation des expérimentations pilotes.

2.1.7. Suivi des expérimentations

Le suivi des expérimentations sur pilote se fait par les analyses quotidiennes suivantes :

- analyse d'images des floccs bactériens, des filaments et de la microfaune ;
- courbe de décantation et ses paramètres (vitesse de chute libre et paramètres n et k des modèles puissance et exponentiel) ;
- matières en suspension (*MES*) et matières volatiles (*MV*) ;
- turbidité du surnageant après 30 minutes de décantation ;
- mesure de la concentration en *MES* avec la sonde de biomasse (Ponselle Mesure); oxygène dissous dans le réacteur (Consort Z621).

Lors des expérimentations sur pilote avec de l'eau usée réelle, on suit aussi l'évolution de la station d'épuration de Nancy. Les analyses effectuées sont :

- analyse d'images des floccs bactériens, des filaments et, deux fois par semaine, de la microfaune ;

- courbe de décantation et ses paramètres (vitesse de chute libre et paramètres des modèles puissance et exponentiel) ;
- matières en suspension (*MES*) et matières volatiles (*MV*).

Lors des campagnes sur les stations de traitement d'eaux usées, les analyses suivantes ont été faites pour chaque prélèvement:

- analyse d'images des floccs bactériens, des filaments et de la microfaune ;
- courbe de décantation et ses paramètres (vitesse de chute libre et paramètres des modèles puissance et exponentiel) ;
- matières en suspension (*MES*) et matières volatiles (*MV*).

Le Tableau 2.1 présente un résumé des expériences réalisées

Tableau 2.1 - Résumé des expériences réalisées sur les réacteurs pilotes

	Type de Réacteur	Volume du décanteur	Type du substrat	Début de l'expérience	Fin de l'expérience
Expérience 1	<i>RPA</i>	12 L	Synthétique	08/10/99	30/11/99
Expérience 2	<i>RPA</i>	9 L	Synthétique	07/02/00	13/03/00
Expérience 3	<i>RPA</i>	9 L	Synthétique	24/07/00	21/08/00
Expérience 4	<i>RC</i>	9 L	Synthétique	28/08/00	13/10/00
Expérience 5	<i>RPA</i>	9 L	Naturel	16/11/00	17/12/00
Expérience 6	<i>RC</i>	9 L	Naturel	23/01/01	23/02/01

2.2. Systèmes d'Acquisition

2.2.1. Le système d'acquisition d'images de Nancy

Le système d'acquisition utilisé pour capturer les images des floccs, des filaments et des protozoaires est composé d'une caméra vidéo monochrome Hitachi CCTV modèle HV-720E(F) (Tokyo, Japon) fixée à un microscope Leitz Dialux 20 (Wetzlar, Allemagne) et d'une carte d'acquisition Matrox (Québec, Canada) implantée dans un ordinateur. L'ordinateur est un Pentium 266 MHz avec 64 MO de mémoire (RAM). Ce système est présenté dans la Figure 2.8a. Pour réaliser l'acquisition des images de la coloration de Gram, la caméra Hitachi a été remplacée par un caméra vidéo couleur Sony 3 CCD ExwaveHAD (Tokyo, Japon).

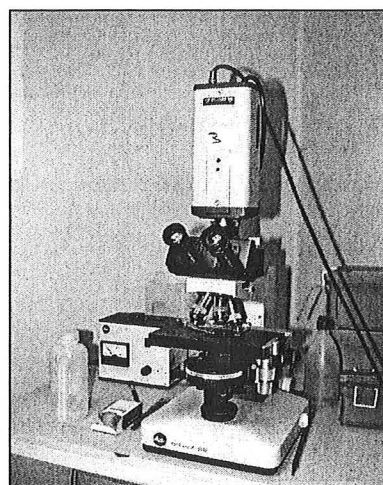
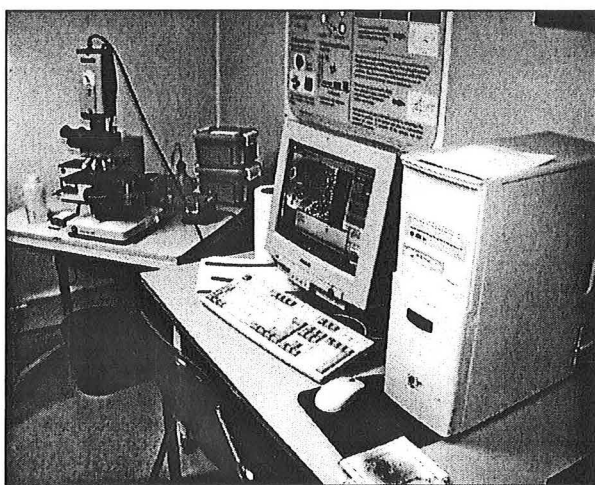


Figure 2.8 - Système d'acquisition de Nancy (a) et microscope (b)

Pour l'acquisition des images (786 x 576 pixels sur 256 niveaux de gris) des floccs bactériens (grandissement 100x et 25x) ainsi que pour celles des protozoaires (grandissement 250x ou 400x), une goutte de liqueur mixte est placée sur une lame de verre et recouvert par une lamelle (observation sur état frais). On acquiert une série de 50 images par balayage systématique de la lame pour les protozoaires. Pour les floccs observés au grandissement 100x, on a réalisé 72 images (nombre minimal) et pour ceux observés au grandissement 25x, 48 images.

Le nombre de 48 images correspond au nombre maximal d'images que l'on peut acquérir par un balayage de toute la lamelle (24 x 24 mm) à un grossissement 25x. A un grossissement 100x, le nombre d'images nécessaires pour la parcourir est très élevé (plus de 700 images). On a alors décidé de parcourir la largeur de la lamelle à 1/4, 1/2 et 3/4 de sa hauteur (cf. Chapitre 2.2.3). Les essais réalisés pendant la mise en place de la méthodologie d'acquisition nous ont donné 24 images en moyenne pour chaque passage. Pour les trois passages, on aura alors 72 images.

Le microscope (Figure 2.8b) possède cinq objectifs (2.5x ; 10x ; 25x ; 40x et 100x) et un oculaire 10x. Le régulateur de puissance de lumière travaille dans un domaine de 0 à 15 volts. L'acquisition des floccs a été réalisée avec une puissance d'éclairage de 3 volts pour 100x et 3.5 volts pour 25x. Avant de capturer l'image d'un protozoaire à un grandissement 400x, on le localise d'abord au grandissement 100x. Le changement d'objectif demande aussi un changement de la puissance d'éclairage (qui doit être plus forte pour des grossissements plus

importants). De ce fait elle n'est pas fixée: on l'ajuste simplement pour que le protozoaire soit bien visible et que le halo qui l'entoure soit minimisé.

Un ensemble de filtres (Leitz, Wetzlar, Germany, 513 467) permet l'utilisation du contraste de phase avec les objectifs 40x et 100x (filtres 2 et 3 respectivement). Les acquisitions de 100x à 400x ont été réalisées sans aucun filtre (position H). Pour le grossissement 25x (fond noir) on a utilisé l'objectif 2.5 et le filtre 3. Ce réglage nous a permis d'obtenir les contours de floccs plus nets.

2.2.2. Le système d'acquisition d'images de Braga

Le système d'acquisition d'images de Braga (Figure 2.9) est constitué d'un microscope à épifluorescence Axioskop (Zeiss, Oberkochen), sur lequel a été connectée une caméra CCD AVC D5CE (Sony, Tokyo). Le signal a été traité par un adaptateur CMA-D5CE (Sony, Tokyo) pour être stocké dans l'ordinateur grâce à une carte d'acquisition DT 3155 (Data Translation, Marlboro USA).



Figure 2.9 - Système d'acquisition de Braga

Les images ont été acquises sans l'utilisation d'aucun filtre et sans épifluorescence. Pour les floccs bactériens une série de 70 images (nombre minimal) au grossissement 100x a été réalisée pour chaque échantillon. Les protozoaires ont été visualisés à 400x et une série de 50 images (nombre minimal) par échantillon a été prise.

Pour l'acquisition et le stockage des images un ordinateur (compatible PC) Pentium Intel MMX 166 MHz avec 64 MO de mémoire (RAM) a été utilisé. Le logiciel d'acquisition était Image ProPlus, version 3.0.01.00 (Media Cybernetics, Silver Spring). Ensuite, les images ont été enregistrées sur un CD Rom pour un traitement ultérieur à Nancy.

2.2.3. L'acquisition des images

Avant de réaliser l'acquisition des images, il faut préparer la lame de façon précise. On verra dans le chapitre 3.1 qu'une mauvaise préparation peut provoquer des erreurs de l'ordre de 50%. Par contre un bon réglage du système d'acquisition et un strict suivi de la méthodologie donnent des écarts-type inférieurs à 3%.

Un premier facteur à prendre en compte est le délai entre la prise de l'échantillon et l'acquisition des images de protozoaires. Un délai inférieur à trois heures pour le transport, la préparation et l'acquisition est jugé satisfaisant. Au delà de ce temps des modifications de la microfaune (due à l'absence d'oxygénation entre autres) et des déformations des protozoaires sont possibles. Les bactéries sont plus résistantes, mais dans une certaine limite de temps.

Les lames doivent être propres pour éviter que des saletés puissent gêner la visualisation d'un protozoaire et pour ne pas causer de fausses informations pendant l'acquisition des floes (les grains de poussière pourraient être interprétés comme des floes). La taille de la lame utilisée était de 76 x 26 mm et celle de la lamelle de 24 x 24 mm.

Quel que soit le volume déposé sur la lame, il doit être bien distribué après la mise en place de la lamelle. La Figure 2.10a présente une lame avec un gradient. Du côté droit de la lame, les floes sont plus groupés et le liquide a migré vers le côté gauche. Cette distribution non uniforme peut produire des résultats avec des diamètres de floes plus grands et un nombre inférieur de filaments.

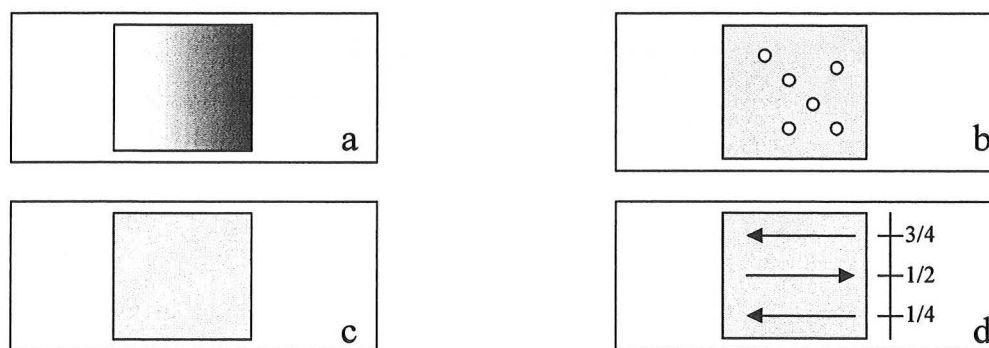


Figure 2.10 - Préparation de la lame : gradient (a), bulles d'air (b), forme correcte (c) et sens du balayage pour l'acquisition des images (d).

La lamelle doit être posée délicatement sur la lame et avant de la lâcher, on doit faire le contact avec le liquide (échantillon). De cette façon, on peut minimiser le problème des bulles d'air (Figure 2.10b).

Après avoir préparé la lame et réglé le microscope et le système d'acquisition, on peut commencer l'acquisition. La Figure 2.10d montre comment doit être réalisé le balayage de la lame. On commence à $\frac{1}{4}$ de la hauteur et on la parcourt jusqu'à l'extrémité, pour ensuite revenir jusqu'au milieu et enfin faire un dernier passage à $\frac{3}{4}$ de la hauteur.

Pour les floes, chaque passage doit permettre de générer 24 images. La focalisation doit être réalisée par rapport aux filaments (Figure 2.11). S'il y a des filaments sur plusieurs niveaux, on doit choisir un réglage qui permette de bien voir la plus grande partie d'entre eux. Sur l'écran ils doivent apparaître comme des lignes noires.

Pendant l'acquisition des protozoaires, on doit toujours ajuster le plan de focalisation pour que le contour du protozoaire soit entier et visible. Dans le cas des sessiles, on doit ajuster ce plan pour visualiser le pédoncule et qu'il soit attaché au protozoaire. Pour les flagellés on doit agir de la même façon par rapport au flagelle. Après une demi-heure d'acquisition, si on n'a pas acquis les 50 images, on doit changer de lame car les protozoaires (surtout les sessiles) commencent à se déformer.

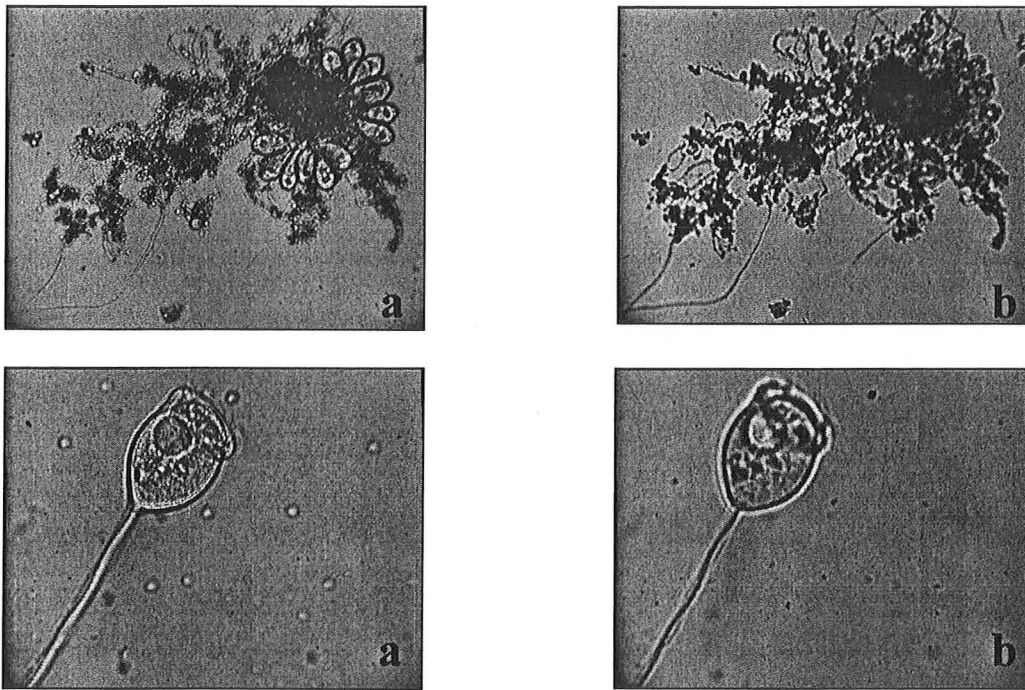


Figure 2.11 - Exemple d'acquisitions avec une mauvaise focalisation (a) et avec une mise au point correcte (b).

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

*" La vérité doit s'inspirer de la pratique.
C'est par la pratique que l'on conçoit la vérité.
Il faut corriger la vérité d'après la pratique."*

MAO TSE-TUNG

Ce chapitre est divisé en quatre parties. Dans la première partie on présente des informations sur les deux principales stations d'épuration étudiées (Nancy-Maxéville et Braga), les installations pilotes conçues pour l'expérimentation en laboratoire avec substrat synthétique puis naturel.

La deuxième partie (Chapitre 2.2) présente les systèmes d'acquisition d'images de Nancy et de Braga et la procédure qui doit être utilisée pour celle-ci. Les méthodes analytiques ainsi que les appareils utilisés pour réaliser les mesures sont présentés dans la troisième partie (Chapitre 2.3).

Le Chapitre 2.4 est consacré aux programmes d'analyse d'image développés et aux méthodes statistiques utilisées. L'évolution et les principales étapes de chaque programme sont expliquées ainsi que les paramètres calculés. Les programmes FlocMorph, Fond Noir et Gram ont été développés pour l'étude de la microfaune bactérienne et le programme ProtoRec pour l'identification des protozoaires et métazoaires. Ce dernier a été mis au point dans le cadre d'une coopération scientifique entre le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique du INPL et le Département du Génie Biologique de l'Université du Minho (Portugal).

2.3. Méthodes Analytiques

2.3.1. L'analyse de la composition des boues (*MES* et *MV*)

On distingue trois types d'analyses pour caractériser les boues: les Matières Sèches (*MS*), les Matières En Suspension (*MES*) et les Matières Volatiles (*MV*). La différence entre les matières sèches et les matières en suspension réside dans les sels dissous, qui sont enlevés de l'échantillon, dans les *MES*, par centrifugation ou filtration.

a. Matière sèche (*MS*)

Pour obtenir la concentration en matières sèches, on a placé 25 mL de l'échantillon dans une capsule pré-tarée et on a laissé sécher pendant au moins 12 heures dans un four à 105°C. Pour chaque échantillon on a réalisé deux analyses et pris la moyenne entre elles.

b. Matière en suspension (*MES*)

On commence par centrifuger l'échantillon. On remplit deux tubes avec, chacun, 50 ml de boues et on les pèse. La vitesse de rotation est fixée à 3000 tours par minute, et la centrifugation dure quinze minutes. Ensuite, on élimine l'eau et on transfère le culot dans une capsule pré-tarée. On laisse sécher dans un four à 105 °C pendant 12 heures au moins. On calcule la moyenne entre les deux poids obtenus et on exprime le résultat en g/L.

Pendant les analyses sur la station de Braga il y avait une concentration très forte en bactéries filamenteuses qui empêchait la formation du culot pendant la centrifugation. On a dû augmenter la vitesse de rotation de 3000 à 5000 tours par minutes et le temps de 15 à 25 minutes pour obtenir un culot.

c. Matière volatile (*MV*)

La détermination des Matières Volatiles selon la norme NF T 90 029 se fait à partir de la *MS*. Dans cette étude, on l'a calculé à partir de la *MES* afin d'étudier la composition des boues. L'échantillon issu du dosage des *MES* est placé dans un four à 550 °C pendant deux heures. Puis, on pèse et par différence on obtient les matières volatiles, exprimées en g/L.

On peut considérer, sans grande erreur, que les matières volatiles représentent les matières organiques et que la différence entre *MES* et *MV* représente les matières minérales.

2.3.2 La décantabilité

Pour mesurer la décantabilité des boues des stations et du réacteur parfaitement agité on a utilisé une éprouvette de 10 litres, conçue en Plexiglas et graduée en cm, avec un facteur de conversion pour le volume de 177.5 mL/cm. Les boues sont placées dans l'éprouvette jusqu'à 50 cm de hauteur. Pour le réacteur canal, une éprouvette de 2 litres en verre a été utilisée, car en prenant une quantité trop importante de boues pour cette mesure, on aurait pu détruire le gradient formé dans le réacteur. Cette même éprouvette a été utilisée pour le réacteur parfaitement agité avec du substrat naturel afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus. Le temps de descente du front est enregistré pour chaque graduation des éprouvettes (à chaque 50 mL pour l'éprouvette de 2 litres et à chaque centimètre pour l'éprouvette de 10 litres) pendant au moins 30 minutes.

d. La vitesse de décantation

La courbe hauteur (H) en fonction du temps (t) est tracée en utilisant la théorie de Kynch. La vitesse de décantation moyenne est calculée par une régression des points dans la zone de chute libre (ZCL). La valeur absolue de la pente est la vitesse moyenne en cm/min (ou mL/min). Dans cette zone, on considère H_0 et C_0 comme constants. La Figure 2.12 montre la courbe expérimentale et la régression pour le 16 mars 1999.

On calcule ensuite la vitesse instantanée (v), définie comme :

$$v_i = \frac{H_{i-1} - H_i}{t_i - t_{i-1}} \quad (2.3.1)$$

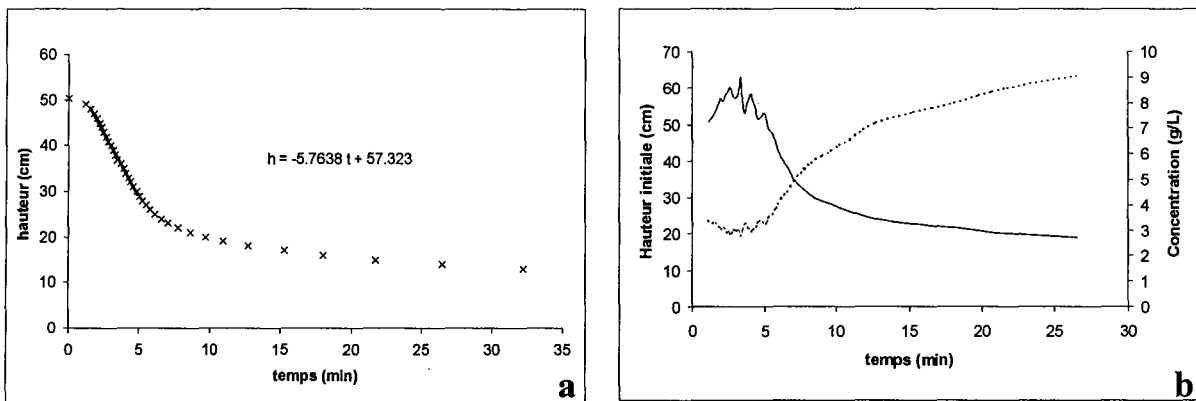


Figure 2.12 - Courbe hauteur en fonction du temps et droite obtenue par régression des points de la zone de chute libre avec son équation (a) et la variation de la hauteur initiale (H_{0i}) (—) et de la concentration (C_i) (---) en fonction du temps (b).

e. Calcul de H_i , C_i

La hauteur initiale instantanée (H_{0i}) est obtenue à partir de la tangente à la courbe au point i . L'intersection de cette tangente avec l'axe H fournit directement H_{0i} . Pour ce calcul on utilise l'équation suivante :

$$H_{0i} = H_i + t_i \left(\frac{H_{i-1} - H_{i+1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} \right) \quad (2.3.2)$$

La valeur de C_i est calculée selon l'équation 2.3.3

$$C_i = \frac{H_0 C_0}{H_{0i}} \quad (2.3.3)$$

où H_0 est la hauteur initiale et C_0 la concentration initiale.

d. L'Indice de Mohlman

Mathématiquement, l'Indice de Mohlman est défini comme étant le volume occupé par 1 gramme de boues après 30 minutes de décantation. Il est aussi connu sous l'appellation *SVI* (de l'anglais Sludge Volume Index).

$$\text{Indice de Mohlman} = IM = \frac{V_{30}}{V_0 C_0} = \frac{H_{30}}{H_0 C_0} \quad (2.3.8)$$

Le volume (ou hauteur) final(e) dépend des dimensions de l'éprouvette. Quand on diminue le diamètre les frottements entre les particules et la paroi augmentent et la vitesse de décantation diminue. Dans notre étude on a utilisé principalement une éprouvette de 10 litres en acrylique avec un diamètre interne de 15 cm et une hauteur de 69 cm, de façon à minimiser les effets de la paroi et de la hauteur.

Pour calculer l'Indice de Mohlman (*IM*) on mesure la hauteur après 30 minutes de décantation (H_{30}), on la divise par la concentration initiale (C_0) et par la hauteur initiale (H_0). Le résultat est présenté en L/g.

$$IM = \frac{H_{30}}{H_0 C_0} \quad (2.3.9)$$

2.3.3. La turbidité

La turbidité du surnageant peut indiquer des problèmes de dysfonctionnement tels que les flocs "tête d'épingle" et des phénomènes de défloculation qui causent la perte de biomasse. Elle peut aussi indiquer la présence des protozoaires (on a vu que leur présence fait baisser la turbidité). Pour la mesurer on a utilisé un spectrophotomètre HACH DR/2000 avec une longueur d'onde de 450 nm. Avant la mesure de l'échantillon, on doit faire un blanc avec de l'eau distillée. Le résultat est obtenu en Turbidité FTU (Formazine Turbidity Unit). L'échantillon de surnageant est prélevé dans l'éprouvette, après 30 minutes de décantation.

2.3.4. La sonde à biomasse

La mesure de la biomasse a été réalisée par une sonde Ponselle Mesure. Le principe en est assez simple: on mesure l'atténuation du rayon lumineux (infrarouge) provoquée par le passage des boues entre les capteurs qui sont à l'extrémité de la sonde. L'appareil doit être étalonné en utilisant de l'eau distillée (pour le zéro) et une boue de concentration connue. Ces mesures ont été effectuées soit directement dans le réacteur parfaitement agité, soit dans l'échantillon pris pour le test de décantabilité dans le réacteur canal.



Figure 2.15 - Sonde à biomasse

2.3.5. La sonde à oxygène

La détermination de la concentration en oxygène dissous dans les réacteurs a été réalisée à l'aide d'une sonde CONSORT Z621. Les mesures ont été effectuées une fois par jour, dans le but d'observer une éventuelle limitation dans la concentration d'oxygène dissous (facteur important pour le développement des bactéries filamenteuses).

2.3.6. La distribution de la taille des particules (DTP) par granulométrie laser

La détermination de la distribution de la taille des particules peut être réalisée par plusieurs méthodes. Dans cette étude, à part l'analyse d'image, on a utilisé l'analyse par diffraction laser. L'équipement employé était un Malvern Mastersizer avec un banc long, relié à un micro-ordinateur. Celui-ci interprète et traite les données qui peuvent ensuite être exportées vers un tableur de calcul.

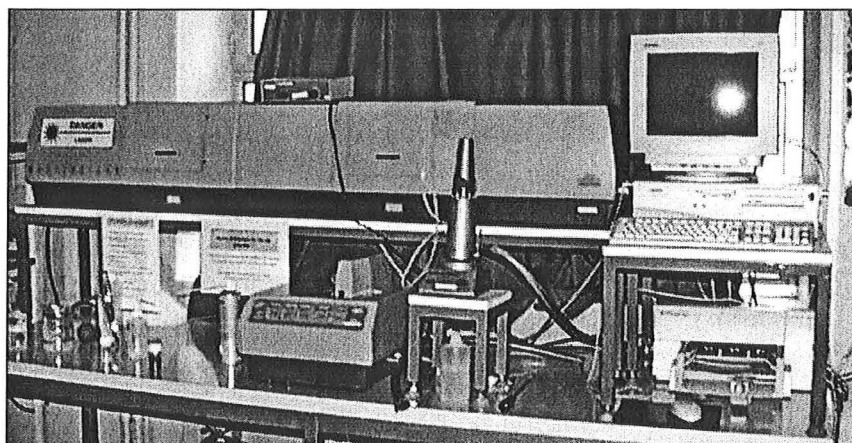


Figure 2.16 - Système de mesure par diffraction laser Malvern Mastersizer.

La lentille avait une distance focale de 1000 mm, ce qui couvre l'intervalle granulométrique de 4,0 à 3500 μm . Cela a été choisi précédemment par Wilén et Balmér (1999). La configuration d'analyse (*configuration analyse*) a été choisie pour une solution polydisperse et la présentation (*setup presentation*) pour des particules en milieu liquide. Après la configuration de l'appareil, il faut l'aligner et ensuite mesurer le bruit de fond avec de l'eau distillée. Les échantillons sont dilués avec de l'eau distillée dans la petite cellule d'échantillonnage, à l'aide d'une pipette, jusqu'à une obscurité autour de 17% (plage d'obscurité idéale entre 10 et 30 %).

a. Paramètres calculés

L'équipement nous fournit comme résultats les paramètres suivants:

- Le résiduel : il indique dans quelle mesure les paramètres de configuration ont été bien adaptés à la mesure. Une bonne adaptation se manifeste par un résiduel inférieur à 1% ;
- Les diamètres dérivés $D(V,0.5)$, $D(V,0.1)$ et $D(V,0.9)$.
 - $D(V,0.5)$ est la taille de particule pour laquelle 50% de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension. Il est aussi connu comme le diamètre massique moyen (Mass Median Diameter - *MMD*)

- $D(V,0.1)$ est la taille de particule pour laquelle 10% de l'échantillon se trouve en-dessous de cette dimension.
- $D(V,0.9)$ est la taille de particule pour laquelle 90% de l'échantillon se trouve en-dessous de cette dimension.
- Le diamètre moyen $D[4,3]$ est définie par l'Equation ci-dessous:

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad (2.3.10)$$

- Le paramètre L_D : mesure de la largeur de la distribution. Plus cette valeur est faible, plus la distribution est étroite. Il est calculé par la formule ci-dessous:

$$L_D = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)} \quad (2.3.11)$$

2.3.7. La spectrophotométrie U.V. d'absorption

Des mesures dans le spectre ultraviolet ont permis d'estimer la DCO soluble et la concentration en nitrate. Ces mesures ont été effectuées avec un spectrophotomètre SECOMAM S1000, dans une plage de 200 à 1000 nm, avec un pas d'un nanomètre. Chaque échantillon a été filtré et toute de suite analysé.

La concentration en azote sous forme de nitrate est déterminée à partir des valeurs de la surface du spectre s'étalant entre 200-250 nm en échelle logarithmique (Pereira, 1996). La méthode de calcul employée pour le calcul de la surface est la méthode des trapèzes.

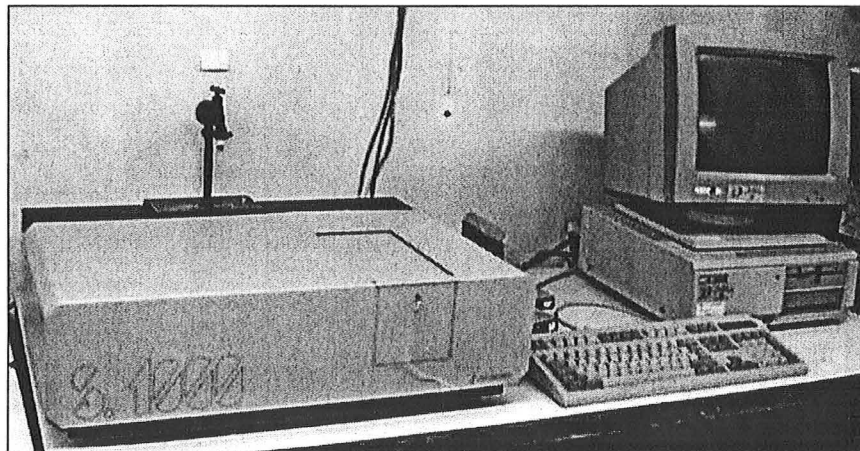


Figure 2.17 - Spectrophotomètre U.V.

Potier (1993) montré qu'il y a un rapport entre l'absorbance de la lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 254 nm et la concentration en DCO soluble sur la station d'épuration de Nancy-Maxéville.

Pour l'expérimentation pilote sur le réacteur canal en utilisant du substrat synthétique, deux échantillons de 50 mL ont été prélevés chaque jour: un à l'entrée du réacteur et l'autre à la sortie.

2.4. Analyse d'Image

2.4.1. Programme FlocMorph

Le programme FlocMorph a été développé pour étudier les flocs bactériens. Ce programme identifie et quantifie les bactéries filamenteuses et calcule des paramètres morphologiques des flocs. Cet outil nous permet de mieux comprendre les phénomènes de dysfonctionnement et d'estimer la décantabilité des boues activées.

a. FlocMorph v.0

FlocMorph a été développé sous forme d'une procédure à base de langage C dans l'environnement de Visilog5, un logiciel d'acquisition, de traitement et d'analyse d'image, produit par Noésis (Les Ulis, France). Ses principales étapes sont présentées dans la Figure 2.18. L'organigramme détaillé est donné dans l'annexe 1.

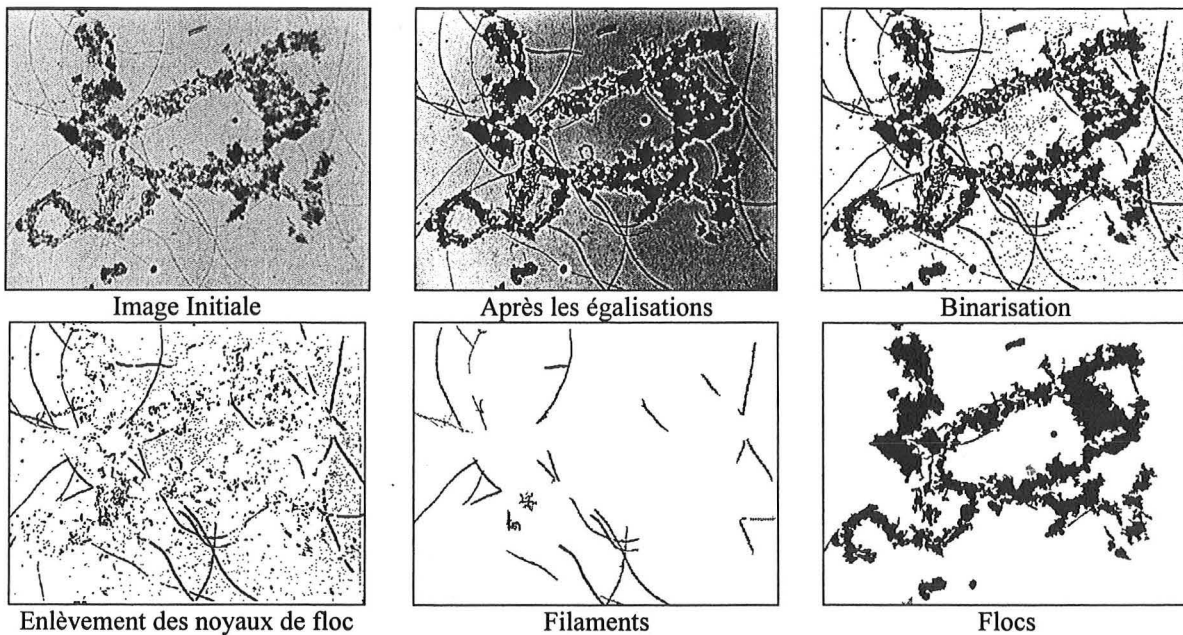


Figure 2.18 - Principales étapes du programme FlocMorph

A partir de l'image initiale on réalise un pré-traitement pour améliorer le contour des flocs et des filaments. Ce pré-traitement, schématisé dans la Figure 2.18, est divisé en deux parties: dans une première partie on réalise une égalisation globale de l'image initiale suivi d'une égalisation locale. Ces opérations vont égaliser l'histogramme des niveaux des gris de l'image, c'est-à-dire qu'elles vont répartir l'intensité sur les niveaux de gris de 0 à 255 (Figure 2.19). La différence entre ces deux égalisations est que la première agit sur toute l'image et que la seconde agit sur des micro-fenêtres de 16x16 pixels, ce qui permet de prendre en compte les variations locales d'éclairage.

On peut voir sur la Figure 2.18 que ces opérations vont rehausser aussi le gradient du fond de l'image. Ce gradient est dû un éclairage non uniforme de la lame sur le microscope. Afin d'obtenir une image de ce gradient qui ne contienne pas les objets d'intérêt (flocs, filaments), on réalise dans la seconde partie du traitement une ouverture d'ordre 2 suivie d'une fermeture

d'ordre 55, à partir de l'image initiale. Ensuite, on soustrait le gradient (obtenu à la fin de la seconde partie du traitement) de l'image égalisée (obtenue à la fin de la première partie).

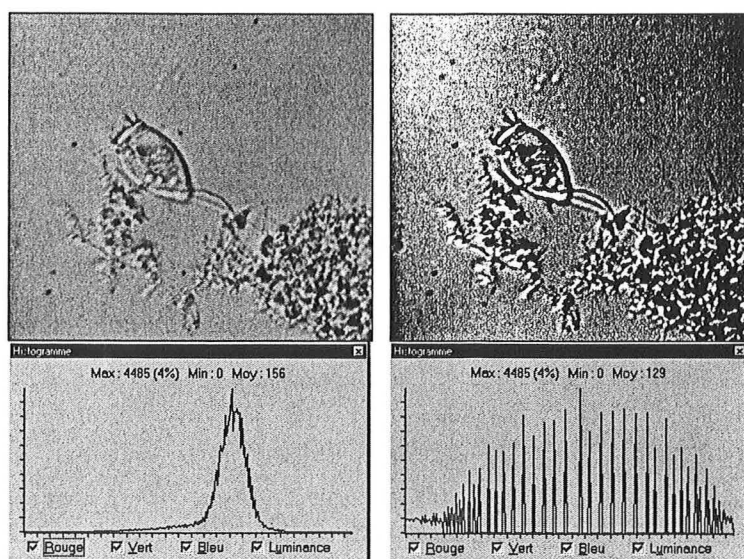


Figure 2.19 - Image d'un sessile avant égalisation (a) et après (b) avec ses histogrammes correspondants (c de l'image a) et (d de l'image b).

On peut binariser l'image en niveaux de gris obtenue (c'est-à-dire passer de 256 niveaux de gris à 2 niveaux, 1 (blanc) pour les objets intéressants (flocs, filaments) et 0 (noir) pour le fond). Le seuillage se fait automatiquement par examen de la variance de l'histogramme de l'image.

La binarisation par variance divise l'image en deux régions. La variance mesure l'épaisseur de la distribution des niveaux de gris de l'image (histogramme). L'algorithme a pour but de minimiser la somme des variances de ces deux régions (Noesis, 1996a).

P_i est la probabilité pour chaque pixel d'avoir une intensité égale à i

$$p_i = \frac{N_i}{N} \quad (2.4.1)$$

où N_i est le nombre de pixels à un niveau de gris i et N le nombre total de pixels.

w_0 est la probabilité pour un pixel d'avoir une intensité inférieure à j :

$$w_0 = \sum_0^j p_i \quad (2.4.2)$$

w_1 est la probabilité pour un pixel d'avoir une intensité supérieure à j

$$w_1 = \sum_j^{255} p_i \quad (2.4.3)$$

La variance de la première région est définie par :

$$\psi_0 = \frac{1}{w_0} \times \sum_0^j i^2 p_i - \frac{1}{w_0^2} \times \left(\sum_0^j i p_i \right)^2 \quad (2.4.4)$$

et celle de la deuxième région par

$$\psi_1 = \frac{1}{w_1} \times \sum_j i^2 p_i - \frac{1}{w_1^2} \times \left(\sum_j^{255} ip_i \right) \quad (2.4.5)$$

Alors le niveau de binarisation j est la valeur qui minimise la somme des deux variances.

L'algorithme actuel de Visilog5 maximise la variance entre classes:

$$\psi_b = w_0 \times w_1 \times (M_0 - M_1)^2 \quad (2.4.6)$$

$$\text{où } M_0 = \frac{1}{w_0} \times \sum_0^i ip_i \text{ et } M_1 = \frac{1}{w_1} \times \sum_j^{255} ip_i \quad (2.4.7)$$

A partir de l'image binaire obtenue on calcule la surface totale de l'image et ensuite on l'érode pour obtenir les "noyaux" des floes. Par une soustraction, on enlève ces noyaux pour ensuite identifier les filaments des restes des floes. Cette identification est basée sur le rayon de giration de chaque élément, obtenu par la formule suivante :

$$r_g = \frac{\sqrt{M_{2X} + M_{2Y}}}{D_{eq}/2} \quad (2.4.8)$$

où: D_{eq} est le diamètre équivalent des floes et S leur surface projetée.

$$D_{eq} = 2\sqrt{\frac{S}{\pi}} \quad (2.4.9)$$

M_{2X} et M_{2Y} les moments d'ordre 2

$$M_{2X} = \frac{1}{S} \sum (x_i - M_{1X})^2 \quad (2.4.10)$$

$$M_{2Y} = \frac{1}{S} \sum (y_i - M_{1Y})^2 \quad (2.4.11)$$

et M_{1X} et M_{1Y} les moments d'ordre 1.

$$M_{1X} = \frac{1}{S} \sum x_i \quad (2.4.12)$$

$$M_{1Y} = \frac{1}{S} \sum y_i \quad (2.4.13)$$

où (x_i, y_i) représentent les coordonnées d'un point de l'objet dans l'image.

Si le rayon de giration est supérieur à 1.1, alors l'objet est bien un filament. Pendant la phase de test du programme, on a initialement utilisé 1.0 mais après plusieurs essais on a vérifié que la valeur de 1.1 pour ce rayon permettait une meilleur séparation entre filaments et les débris.

Après avoir obtenu tous les filaments de l'image, on calcule le nombre et la surface totale des filaments. Les filaments sont ensuite squelettisés, c'est-à-dire que leur épaisseur est réduite à 1 pixel par une série d'érosions. La longueur totale des filaments est en effet la surface totale

occupée par leur squelette. On ne tien pas compte d'un éventuel contact entre les filaments, ce qui peut introduire un biais sur leur nombre s'ils sont très abondantes.

Pour étudier les flocs on doit soustraire les filaments des images sans les noyaux, et additionner ce reste à l'image des noyaux. Ensuite, par une érosion d'ordre 4 suivie d'une reconstruction, on élimine les petits débris qui ne sont pas considérés comme étant des flocs significatifs. Chaque floc est étiqueté et les paramètres sont calculés (cf. Chapitre 2.4.1.d).

b. La Deuxième Version (FlocMorph v.1)

La variation de couleur des flocs, qui parfois devenaient plus foncés dans certaines installations, peut induire des problèmes pendant l'obtention du gradient (fond). Ceci provoque parfois des trous au milieu des flocs. Pour corriger ce défaut on a décidé de réaliser un deuxième seuillage par entropie à partir de l'image obtenue par une soustraction entre l'image après égalisation et l'image du fond ainsi que de changer le seuillage principal par variance par un seuillage par entropie. Après les deux seuillages par entropie les images sont ensuite additionnées. Dans la binarisation par entropie le seuil de séparation est choisi de façon à minimiser l'entropie entre deux maxima de l'histogramme (Noésis, 1996a).

Afin d'expliquer l'algorithme de la binarisation par entropie, on doit d'abord faire quelques rappels des paramètres déjà définis:

P_i est la probabilité pour chaque pixel d'avoir une intensité égale à i

$$p_i = \frac{N_i}{N} \quad (2.4.1)$$

w_0 est la probabilité pour un pixel d'avoir une intensité inférieure à j

$$w_0 = \sum_0^j p_i \quad (2.4.2)$$

w_1 est la probabilité pour un pixel d'avoir une intensité supérieure à j

$$w_1 = \sum_j^{255} p_i \quad (2.4.3)$$

L'entropie de chaque région est définie comme:

$$\phi_1(j) = \left(- \sum_0^j \left(\frac{p_i}{w_0} \right) \cdot \text{Log} \left(\frac{p_i}{w_0} \right) \right) \quad (2.4.14)$$

$$\phi_2(j) = \left(- \sum_j^{255} \left(\frac{p_i}{w_1} \right) \cdot \text{Log} \left(\frac{p_i}{w_1} \right) \right) \quad (2.4.15)$$

La valeur du seuil j est le niveau de gris qui maximise la somme des entropies des deux régions

$$\phi(j) = \phi_1(j) + \phi_2(j) \quad (2.4.16)$$

La Figure 2.24 présente un organigramme avec des modifications sur ce programme. La partie correspondante aux images (c) et (e) est présentée sur la Figure 2.24. Un listing complet du programme, ainsi qu'un organigramme se trouve dans l'annexe A.

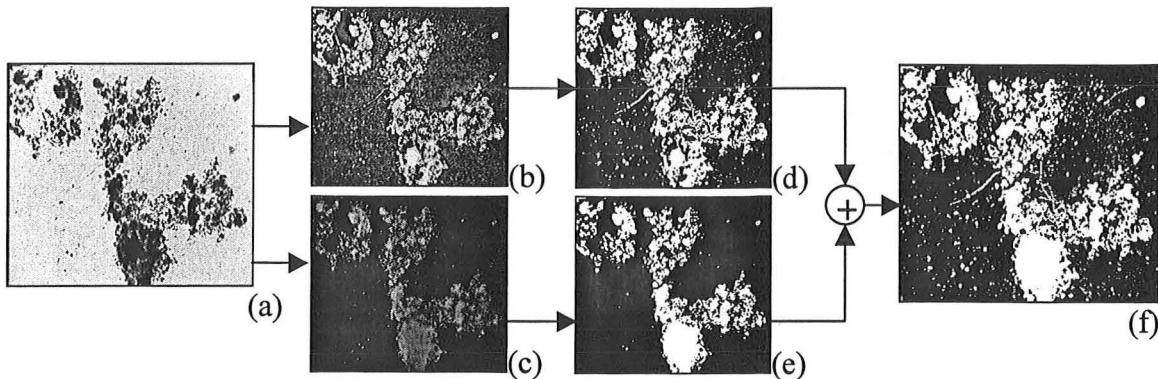


Figure 2.24 - Schéma des modifications sur FlocMorph: (a) image initiale, (b) soustraction entre l'image après égalisation et égalisation linéaire et l'image du fond, (c) soustraction entre l'image après égalisation et le fond, (d) et (e) images binarisées par entropie et (f) l'image résultante de l'addition entre les images (d) et (e).

c. Mise en route du programme

Le programme travaille sur la série d'images correspondant à un échantillon. Avant de lancer le programme l'opérateur doit faire une liste des images à traiter. Pour cela il utilise un programme (mlist.exe) avec la commande *mlist.tif* (commande DOS) qui va créer une liste des images .tif présentes dans le répertoire.

Après avoir démarré Visilog, l'avoir mis en fonction *Process* et appelé le programme FlocMorph en utilisant le *Recorder*, il faut ajuster quelques paramètres qui apparaissent dans la fenêtre de dialogue (Figure 2.20): répertoire contenant les images à traiter, fichier contenant les noms des images à traiter, fichier contenant les résultats. De plus dans le cas d'un nouveau type de boue on peut ajuster l'ordre de fermeture (nombre de fermeture pour obtenir le gradient) et le nombre d'érosions (pour nettoyage après binarisation).

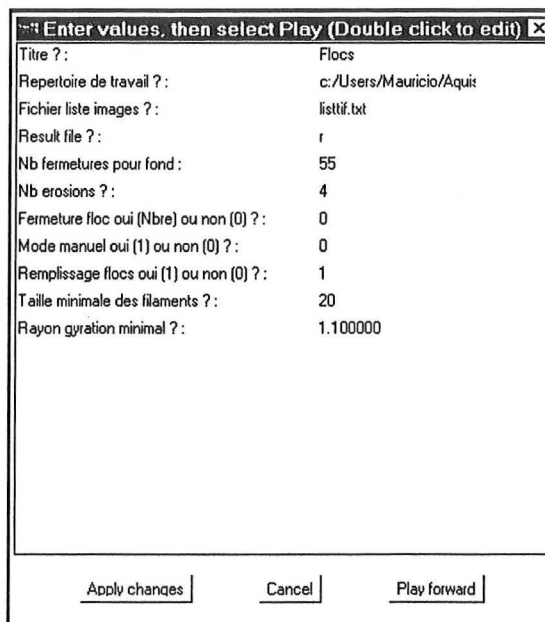


Figure 2.20 - Fenêtre de dialogue du programme FlocMorph

Lors du traitement des floccs, on observe parfois l'apparition de micro-zones vides de quelques pixels au milieu de ceux-ci. Elles sont dues à des variations d'épaisseur des floccs. Pour corriger cela, on réalise un remplissage qui permet de fermer ces trous. On a observé dans une des 12 stations étudiées que les floccs étaient réellement fractionnés et que ces vides étaient alors vraiment significatifs. Le programme prend en compte cette possibilité et offre l'option de ne pas remplir les trous des floccs.

Pour les filaments, on dispose de deux options : changement de la taille minimale, qui permet de différencier les filaments des petits débris, et changement du rayon de giration minimal qui permet d'identifier les filaments. La taille minimale suggérée est de 100 et le rayon de 1.1.

Pour les suivis réalisés sur les stations ainsi que sur les unités pilotes, les paramètres d'acquisition, affichés sur la Figure 2.2, n'ont pas été modifiés.

d. Les paramètres calculés

Outre la longueur totale des filaments par image (L_f) (somme de la longueur des squelettes des filaments) et le nombre de filaments par image (N_f), les paramètres suivantes sont calculés pour caractériser les floccs:

Surface totale occupée par les objets (S_t)

La surface totale est la surface projetée de tous les objets qui se trouvent dans l'image binaire. Elle prend en compte les floccs, filaments, débris et protozoaires (s'il y en a).

Surface unitaire (S_f) et totale des floccs (S_{tf}) de l'image

La surface S_f est calculée pour chaque flocc. La somme des surfaces de tous les floccs donne la surface totale des floccs.

Diamètre équivalent (D_{eq}) mésoscopique

Le diamètre équivalent (Figure 2.21b) de chaque flocc est le diamètre d'un disque de surface égale à la surface du flocc.

$$D_{eq} = 2\sqrt{\frac{S}{\pi}} \quad (2.4.2)$$

où S est la surface projetée de l'objet.

L'indication mésoscopique se réfère au grandissement utilisé (100x) pour différencier cette mesure de celle réalisée au grandissement 25x (macroscopique).

Longueur et largeur

La longueur de l'objet est donnée par le diamètre de Féret maximal (F_{Max}) et sa largeur par le diamètre de Féret minimal (F_{Min}). Le diamètre de Féret est égal à la distance entre deux tangentes parallèles à une direction donnée et encadrant la silhouette de l'objet. La Figure 2.21 présente un exemple.

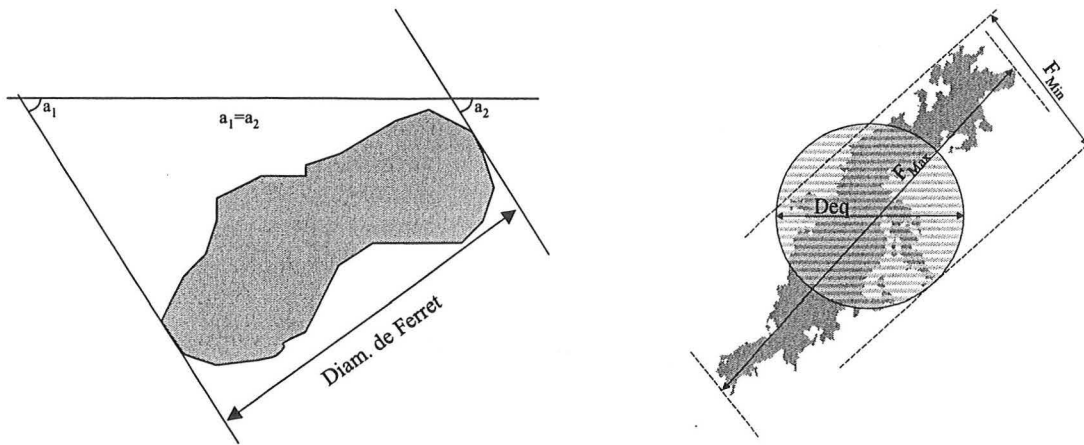


Figure 2.21 - Calcul du diamètre de Féret dans la direction a_1 (a) et représentation de la longueur (F_{Max}), largeur (F_{Min}) et diamètre équivalent (D_{eq}) d'un floccule.

Dimension fractale (D_f) mésoscopique

Il existe plusieurs façons de calculer la dimension fractale d'un objet (Li et Ganczarczyk, 1989; Kaye, 1992; Kaye et al, 1992) mais la méthode proposée par Russ (1995) a été préférée pour sa robustesse (par rapport à la précision du contour).

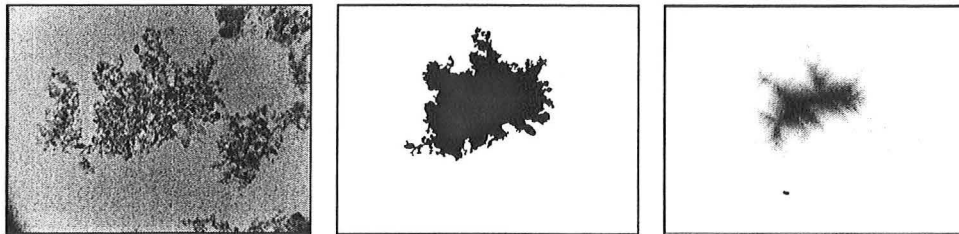


Figure 2.22 - Image initiale en niveaux de gris (a); Image binaire d'un floccule (b); image de la Distance Euclidienne du floccule (c).

Elle utilise les propriétés de la Distance Euclidienne. Dans l'image de la Distance Euclidienne le niveau de gris b associé à chaque pixel est relié à sa distance (λ) au bord le plus proche de l'objet (Figure 2.22c). La distribution des niveaux de gris $b(\lambda)$ donne le nombre de pixels à chaque distance λ . Le périmètre $P(\lambda)$ est calculé en divisant le nombre de pixels possédant un niveau de gris supérieur ou égal à λ par λ :

$$P(\lambda) = \frac{\sum_{\zeta=\lambda}^{\lambda} b(\zeta)}{\lambda} \quad (2.4.17)$$

Si p est la pente de la droite reliant $\log P$ et $\log \lambda$ (Figure 2.23), la dimension fractale est définie par:

$$D_f = 1 - p \quad (2.4.17b)$$

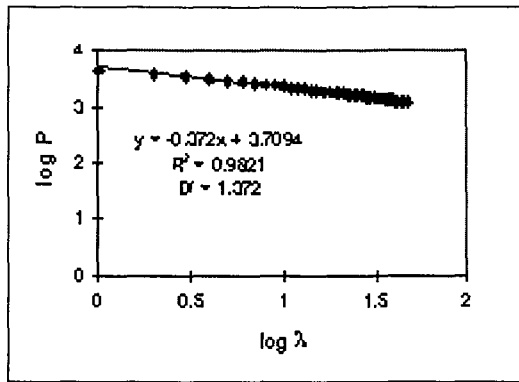


Figure 2.23 - Calcul de la dimension fractale : $\log P$ en fonction de $\log \lambda$.

e. Éléments statistiques

Les échantillons sont caractérisés par la valeur moyenne des grandeurs calculées ainsi que pour les coefficients de variation.

Coefficient de variation intra-échantillon (CV_{m1})

Ce coefficient mesure la dispersion des valeurs d'une grandeur obtenus par l'analyse des images d'un même échantillon. Il est défini par :

$$CV_{m1} = \frac{Ecartype(a_1 \dots a_n)}{Moyenne(a_1 \dots a_n)} \times 100 \quad (2.4.18)$$

où $a_1 \dots a_n$ sont les valeurs des descripteurs calculés pour chaque image.

Coefficient de variation inter-échantillons (CV_{m2})

Pour mesurer la dispersion des valeurs moyennes des échantillons, on utilise le coefficient de variation inter-échantillons. Il est défini par:

$$CV_{m2} = \frac{Ecartype(b_1 \dots b_n)}{Moyenne(b_1 \dots b_n)} \times 100 \quad (2.4.18b)$$

où $b_1 \dots b_n$ sont les valeurs moyennes des descripteurs de chaque échantillon.

2.4.2. Programme *FondNoir*

Selon Jorand et al. (1995) et Snidaro et al (1997) la structure des floes peut être visualisé à trois niveaux. Par rapport à la décantabilité seuls les niveaux meso et macro nous intéressent. Le programme *FlocMorph* permet d'étudier la méso-structure des floes. Afin d'étudier leur macro-structure, le programme *FondNoir* a été développé, sur la base de *FlocMorph*.

Les images acquises avec un microscope optique en fond clair à un grossissement de 25x ne sont pas très nettes, surtout en ce qui concerne les contours des floes. Lorsque l'on travaille en fond noir, les floes deviennent blancs et légèrement brillants. L'acquisition de ces images a été réalisée avec le même système d'acquisition précédemment décrit, mais on a utilisé l'objectif

2,5 et le filtre 3. Pour chaque échantillon une série de 48 images, avec un balayage couvrant toute la surface de la lamelle est prise.

Les principales étapes de ce programme sont présentées sur la Figure 2.25. A partir de l'image initiale (Figure 2.25a) on calcule le gradient (Figure 2.25b) par une ouverture (avec 10 itérations par défaut) suivie d'une normalisation. Ensuite, on soustrait ce fond de l'image initiale. Un bon réglage de la luminosité permet en fait d'obtenir des images sans gradient.

Une fois que l'image est binarisée par variance (Figure 2.25c), les petits débris sont éliminés par une érosion d'une seule itération suivie d'une reconstruction. La surface totale des flocs est ainsi calculée et on effectue une analyse individuelle de chaque floccule ainsi qu'une analyse globale de la taille des zones objets. A ce grossissement (25x) les filaments ne sont pas détectés et on analyse seulement la structure des floccules et leur distribution de taille.

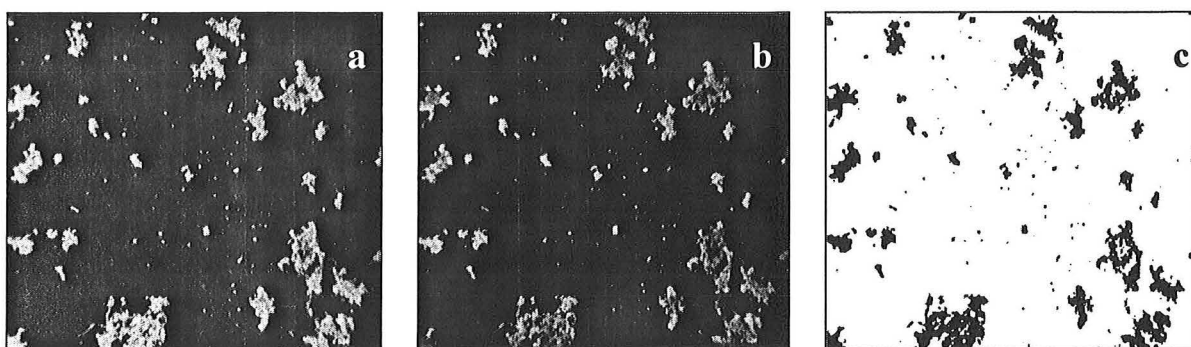


Figure 2.25 - Etapes principales du programme *FondNoir*.

Paramètres calculés

Les paramètres calculés sont : la taille moyenne des floccules, le diamètre équivalent macroscopique et la dimension fractale macroscopique.

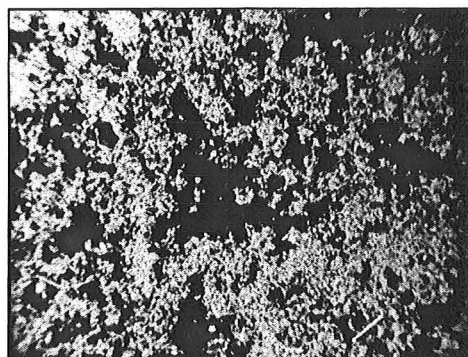


Figure 2.25d - Image de floccules bactériens acquise à un grossissement 25x.

On verra sur certaines images de boues activées obtenues à ce grossissement (Figure 2.25d) que les floccules n'apparaissent plus toujours comme des objets individualisés mais comme une zone plus ou moins continue. L'analyse classique de taille n'est plus adaptée dans ce cas. On effectue une analyse générale par une série d'ouvertures avec un élément structurant hexagonal (Coster et Chermant, 1992; Noesis, 1996b).

Pour chaque image on obtient alors un histogramme de la taille des hexagones inscriptibles dans la zone (ou les zones) objet. De cet histogramme on calcule la *Taille Moyenne* (moment d'ordre 1 de l'histogramme).

Diamètre équivalent (D_{eq}) macroscopique

Le diamètre équivalent macroscopique des flocs est calculée par la même équation que le diamètre mésoscopique (Equation 2.4.2), mais il prend en compte les flocs issus de l'analyse macroscopique des flocs.

Dimension fractale (D_f) macroscopique

Comme la dimension fractale mésoscopique des flocs, elle utilise la Distance Euclidienne et est calculée par la même procédure (cf. Chapitre 2.4.1b).

2.4.3. Programme ProtoRec

Cette procédure a pour but la reconnaissance automatique des protozoaires présents dans le bassin d'aération d'une station d'épuration des eaux usées par voie biologique. L'image acquise en niveaux de gris est soumise à un pré-traitement afin de rehausser les contours des protozoaires. Elle est ensuite binarisée. Le traitement pour isoler le protozoaire du reste de l'image peut alors commencer. La procédure serait simple s'il n'y avait ni flocs, ni filaments sur lesquels les protozoaires peuvent s'attacher.

Une première version (*ProtoRec v.0*) avait été élaborée par Amaral et al. (1999) sous Visilog5 (Noésis, Les Ulis) pour permettre l'étude d'une douzaine de types de protozoaires. Cependant des essais de validation du logiciel réalisés pendant une période de l'année différente de celle utilisée pour le développement de *ProtoRec v.0* ont mis en évidence la présence régulière d'autres espèces de protozoaires. La quantité de bactéries filamenteuses était en outre assez importante, ce qui a causé des problèmes avec la procédure initiale. Pour ces raisons une seconde version a été développée (*ProtoRec v.1*).

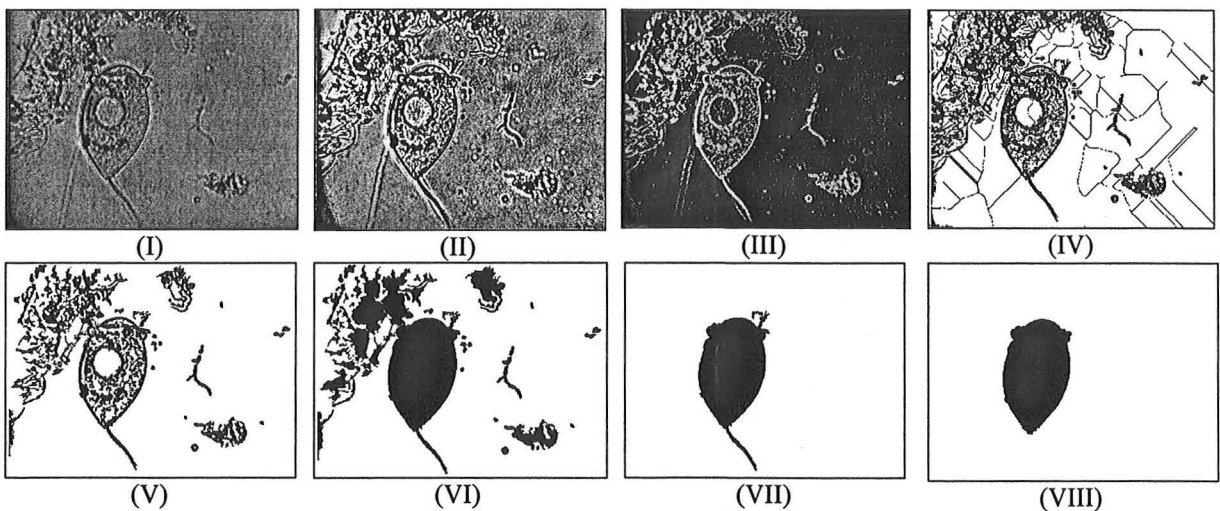


Figure 2.26 – Etapes de *ProtoRec v.1*

Les principales étapes de cette seconde version sont présentées dans la Figure 2.26. Une image étant une représentation bidimensionnelle d'une réalité tridimensionnelle, la

caractérisation des protozoaires est faite à partir des caractéristiques de leur silhouette projetée sur le plan image.

- (I) Image initiale acquise avec un grossissement de 400x et une puissance d'éclairage de 1V;
- (II) Rehaussement des contours utilisant une égalisation suivie d'une égalisation linéaire par zone de 16x16 pixels;
- (III) Suppression du fond, obtenue par une ouverture d'ordre 2 et une fermeture d'ordre 55, pour éliminer le halo;
- (IV) Séparation automatique d'ordre 2 pour séparer les protozoaires des flocs et des filaments,
- (V) Suppression des flocs en contact avec le bord de l'image et fermeture des ouvertures du contour du protozoaire causées par l'opération de segmentation par une dilatation suivie d'une érosion d'ordre un ;
- (VI) Remplissage des protozoaires et séparation des flocs avec segmentation automatique d'ordre 4;
- (VII) Suppression des flocs par érosion et récupération du protozoaire par la fonction reconstruction;
- (VIII) Suppression des flagelles ou petits filaments attachés. Cette étape a été incluse seulement pour la création de la base de données. Elle doit être éliminée du programme final parce que les flagelles des protozoaires facilitent leur identification.

On peut observer que le pré-traitement utilisé est le même que celui du programme FlocMorph, mais qu'à partir de la binarisation la procédure se montre beaucoup plus complexe. Le seuillage est réalisé de façon manuelle pour qu'on puisse garantir la fermeture du contour des protozoaires et, si possible, faciliter la séparation des flocs en choisissant bien les seuils de binarisation. Les opérations de segmentation automatique et d'érosion/reconstruction ont pour objectif d'éliminer les flocs résiduels et les filaments de l'image pour ensuite calculer les paramètres morphologiques propres aux protozoaires.

a. Problèmes rencontrés

A part les difficultés liées à l'attachement aux flocs et filaments, quelques caractéristiques des protozoaires posent plusieurs défis pour réussir à les isoler et à les identifier. Certaines espèces se déplacent avec une vitesse très élevée (centaines de $\mu\text{m}/\text{sec}$), ce qui rend difficile la prise d'images nettes. On voit sur la Figure 2.27a et 2.27b des représentants de l'espèce *Aspidisca cicada* qui se déplacent à une vitesse élevée (a) et à une vitesse plus faible (b). On pourra isoler le protozoaire dans l'image (a) mais son identification ne sera pas possible.

D'autres protozoaires se déplacent en suivant la surface des flocs (mobiles de fond) ou en restant très proches des flocs. Sur la Figure 2.27c on observe à nouveau un protozoaire *Aspidisca cicada* cette fois-ci en train de se nourrir. Du fait de sa petite taille et de sa proximité du floc, il sera "perdu" pendant les opérations de nettoyage (érosion et reconstruction) ou restera attaché à un morceau de floc.

Du fait de l'anisotropie de certaines espèces de protozoaires, on doit prendre des images dans plusieurs positions pour bien les identifier. Les Figures 2.27d et 2.27e présentent des vues de *Chilodonella* de côté et de dessous.

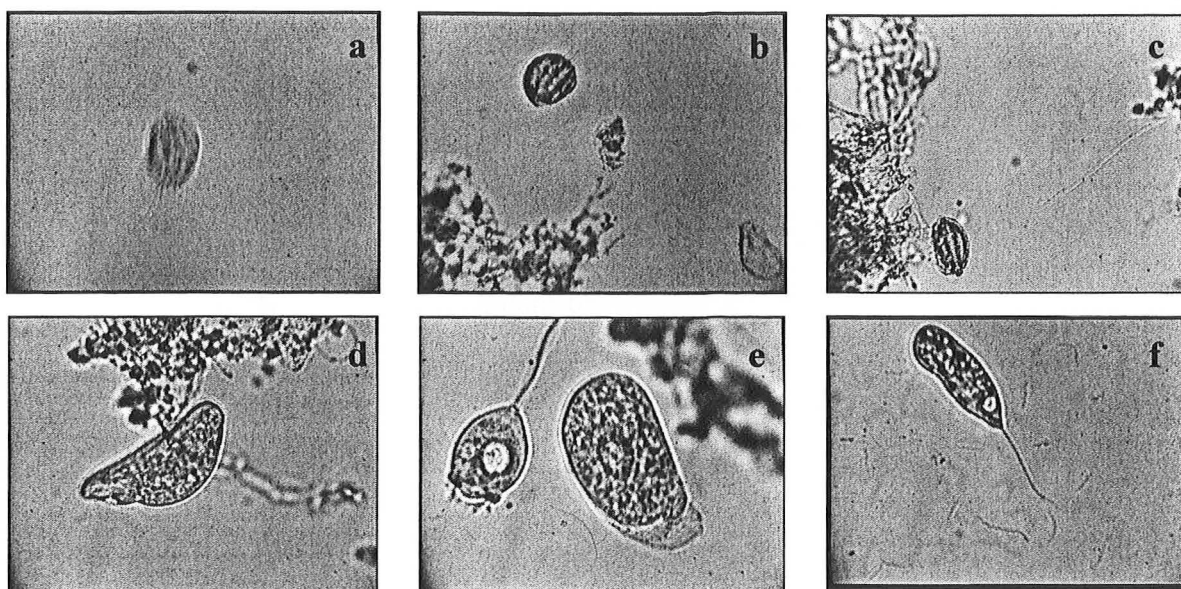


Figure 2.27 – *Aspidisca cicada* (a), (b) et sur un floc (c), *Chilodonella* (d), *Chilodonella* avec *Vorticelle* (e) et *Peranema* (f). Images acquises avec un grossissement de 400x.

La taille des flagelles et des pédoncules des sessiles peuvent varier, et pendant la binarisation des images, il est presque impossible de les prendre sur toute leur longueur car ils sont positionnés suivant différents plans de focalisation. Cela augmente la variabilité des espèces. On voit sur la Figure 2.27f un protozoaire de l'espèce *Peranema* avec son flagelle qui lui permet de se déplacer.

b. Programme ProtoRec v.2

La version v.1 présente une amélioration au niveau de la séparation des protozoaires des flocs. Une banque de données plus complète avec des espèces récoltées pendant un an à la station de Nancy-Maxéville a été bâtie. On a obtenu de bons indices de séparation et de reconnaissance pour certaines espèces comme les sessiles. Néanmoins pour les petits mobiles de fond et flagellés on a obtenu des performances jugées peu satisfaisantes.

Dans cette nouvelle version (v.2) toute la procédure de séparation a été modifiée. Il a été décidé de travailler par zone d'intérêt définie manuellement par l'opérateur (découpage de la zone où se trouve le protozoaire), de façon à supprimer quelques étapes et rendre le programme plus robuste et efficace au niveau de la séparation des protozoaires.

Aux paramètres morphologiques surface, longueur, excentricité, circularité et élongation ont été ajoutés la robustesse et l'indice de concavité. Ces nouveaux paramètres associés à une meilleure séparation ont permis l'obtention d'indices de reconnaissance plus significatifs. Les étapes les plus importantes de ce programme sont présentées dans la Figure 2.28.

Ce programme peut être séparé en trois étapes : pré-traitement, découpage de la zone d'intérêt et traitement de l'image. Le pré-traitement a pour but d'améliorer l'image initiale en rehaussant le contour des protozoaires : pour cela on utilise une égalisation, suivie d'un filtre moyen qui va affaiblir les irrégularités de l'image. On réalise ensuite une égalisation linéaire (16x16), qui est une égalisation locale dans une micro fenêtré de 16x16 pixels, et une maximisation. Cette maximisation prend les maxima de ces deux dernières images, produisant une troisième image.

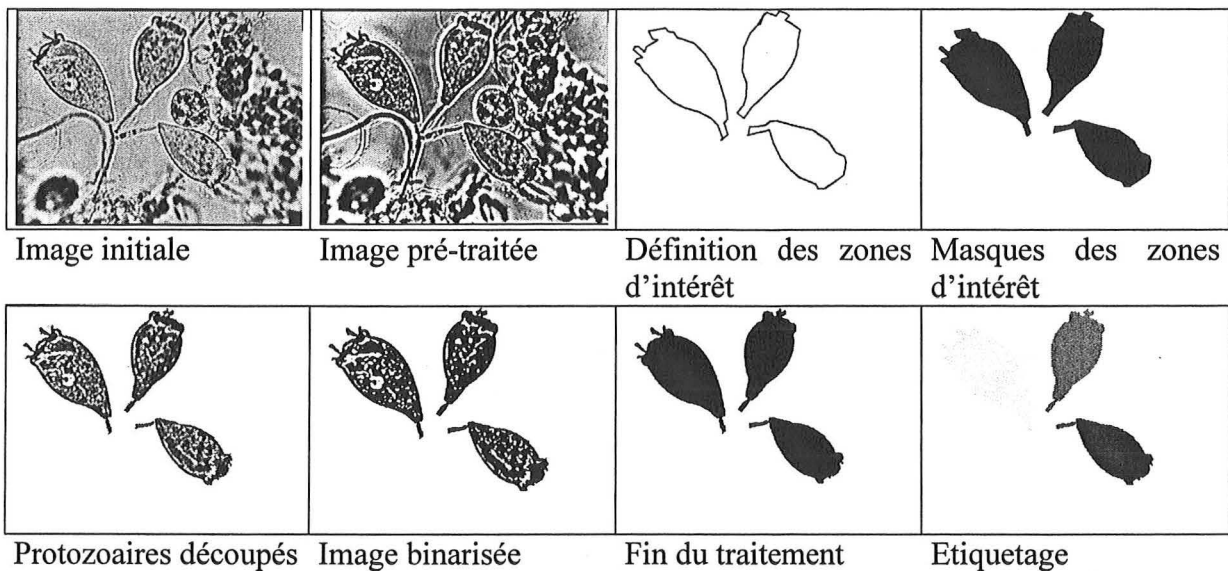


Figure 2.28 – Etapes principales du programme ProtoRec v2.0.

Ensuite, on trace une ligne autour de la zone d'intérêt (du protozoaire) avec le curseur. Cette ligne va créer un masque pour découper le(s) protozoaire(s) de l'image. Les protozoaires découpés pourront être ainsi binarisés. Cette nouvelle version présente trois options de seuillage : deux seuillages automatiques (une pour une segmentation automatique basée sur l'analyse de la variance de l'histogramme (cf. Chapitre 2.4.1) et une autre avec un seuil fixé à 127) et un seuillage manuel où on peut choisir l'intervalle de binarisation (les valeurs de seuil minimal (λ_1) et maximal (λ_2)).

Si deux protozoaires sont en contact, on peut lancer l'option "séparation" dans la boîte de dialogue. Dans le cas des sessiles, pendant la séparation, on coupe parfois le pédoncule et on le perd. Une petite boîte de dialogue demande s'il a été perdu et, si c'est le cas, le programme part à sa recherche et le récupère.

A partir de l'image binarisée le programme réalise une érosion suivie d'une reconstruction pour éliminer les petits débris qui peuvent subsister. Ensuite on ferme les possibles ouvertures dans le contour du protozoaire avec une dilatation et on remplit le protozoaire. Par une érosion d'ordre 15 couplée à une reconstruction on supprime le reste des objets qui sont autour du protozoaire. L'ordre de cette érosion peut être modifié via une boîte de dialogue (Figure 2.29) s'il s'agit d'un petit protozoaire (pour qu'il ne soit pas enlevé pendant l'opération de nettoyage)

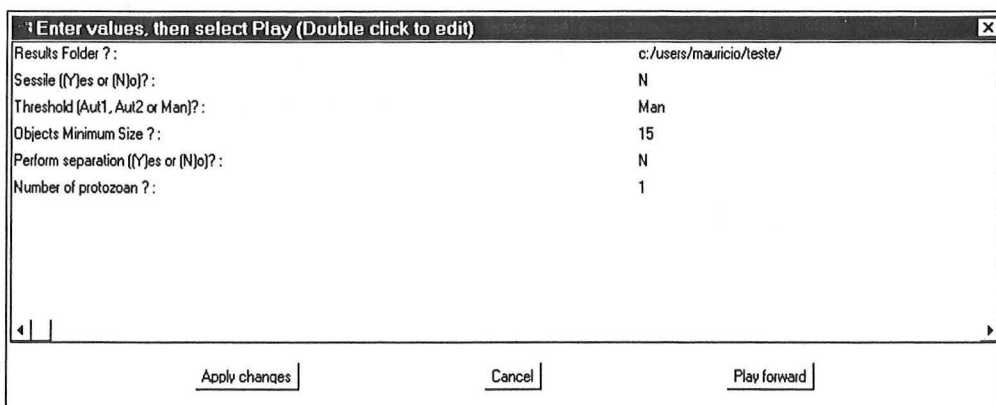


Figure 2.29 – Fenêtre de configuration du programme ProtoRec v2.0.

c. Paramètres calculés

Surface (S)

La surface (S) du protozoaire est celle de sa surface projetée, comme pour la surface des floes. Sur la Figure 2.30 on voit en gris la surface projetée de deux protozoaires: *Chilodonella* (a) et *Vorticelle* (b).

Diamètre équivalent (D_{eq})

Le diamètre équivalent (Figure 2.30) de chaque protozoaire est le diamètre d'un disque de surface égale à la surface projetée du protozoaire.

$$D_{eq} = 2\sqrt{\frac{S}{\pi}} \quad (2.4.2)$$

où S = surface de l'objet

Longueur (F_{Max}) et Largeur (F_{min})

Comme pour les floes la longueur de l'objet est donnée par le diamètre de Féret Maximal (F_{Max}) et la largeur par le diamètre de Féret minimal (F_{min}). La Figure 2.30 présente un exemple.

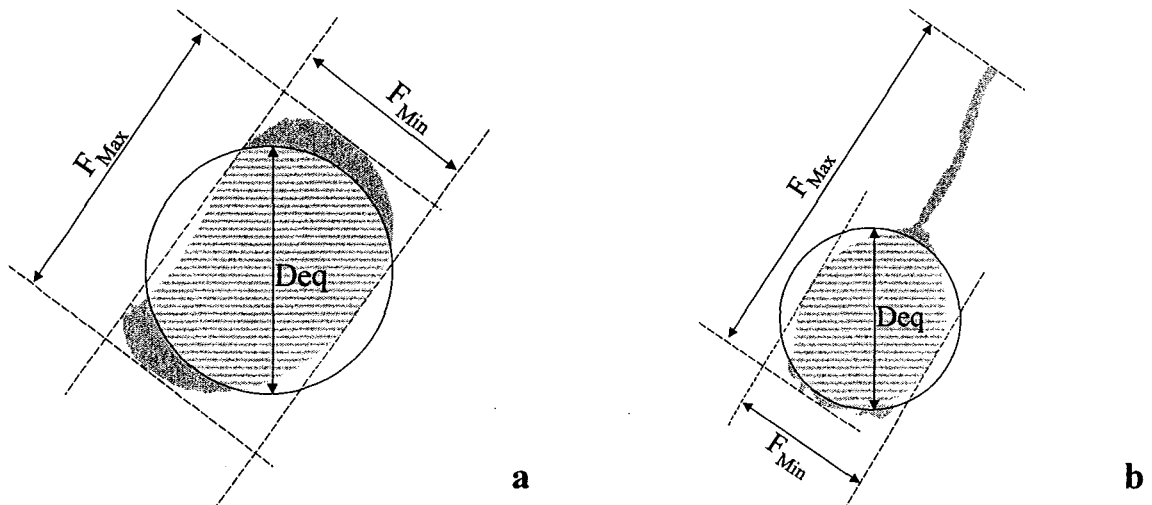


Figure 2.30 - Représentation de la surface projetée du protozoaire et les paramètres morphologiques: diamètre équivalent (D_{eq}), longueur (F_{Max}) et largeur (F_{min}).

Les indices d'allongement

Plusieurs indices d'allongement sont utilisés. L'indice de Féret, ou Facteur de Forme FF , est défini par le rapport entre le diamètre de Féret maximal et celui à 90 degrés du diamètre de Féret maximal. Il donne une information sur l'allongement des objets. Pour un cercle ou un carré, sa valeur est 1.

$$FF = \frac{F_{Max}}{F_{Max90}} \quad (2.4.5)$$

Le rapport des diamètres de Féret maximal et minimal constitue un second indice d'allongement (F_{Mm}). Pour un cercle il vaut 1 et pour un carré 1.42.

$$F_{Mm} = F_{MAX} / F_{min} \quad (2.4.6)$$

Cet allongement est en fait celui de l'enveloppe convexe de l'objet. L'allongement au sens propre de l'objet est représenté par la robustesse. Cela constitue une notion importante pour la reconnaissance des espèces de protozoaires car ceux-ci peuvent se déformer.

Périmètre (P)

Le périmètre est la longueur du contour d'un objet. En géométrie discrète, il est calculé par la somme des pixels de valeurs 1 (qui appartiennent à l'objet) qui ont comme voisin un pixel de valeur 0. Ce calcul, qui est en effet une somme de pixels, n'est pas très précis. Pour remédier à cela on utilise le périmètre de Crofton.

Périmètre de Crofton (P_C)

Le périmètre de Crofton est calculé en utilisant le nombre d'intersections.

$$P_C(x) = \int_0^\pi D_2(x, \alpha) d\alpha \quad \text{Formule de Cauchy} \quad (2.4.7)$$

Le *Nombre d'Intersection* est défini comme le nombre d'entrées dans un objet transversé par une droite dans une direction α . On doit tracer plusieurs lignes parallèles à une direction pour obtenir ce nombre pour cette direction. La Figure 2.31 présente un exemple du calcul de ce nombre et sa propriété de symétrie.

$$D_2(X, \alpha) = \int N_\alpha(X) dx \quad (2.4.8)$$

où $N_\alpha(X)$ est le nombre de points de la bordure de l'objet que intercepte l'ensemble de lignes $d(X, \alpha)$.

Si on discrétise la formule de Cauchy, on remplace l'intégrale par une somme d'angles. Pour notre cas (grille carrée), on utilise les directions 0° , 45° , 90° et 135° . Le périmètre est ainsi calculé par la formule ci-dessous.

$$P_C(X) = \frac{\pi}{4} \left[a.(N_0 + N_{90}) + \frac{a}{\sqrt{2}}.(N_{45} + N_{135}) \right] \quad (2.4.9)$$

où a est la distance entre les pixels.

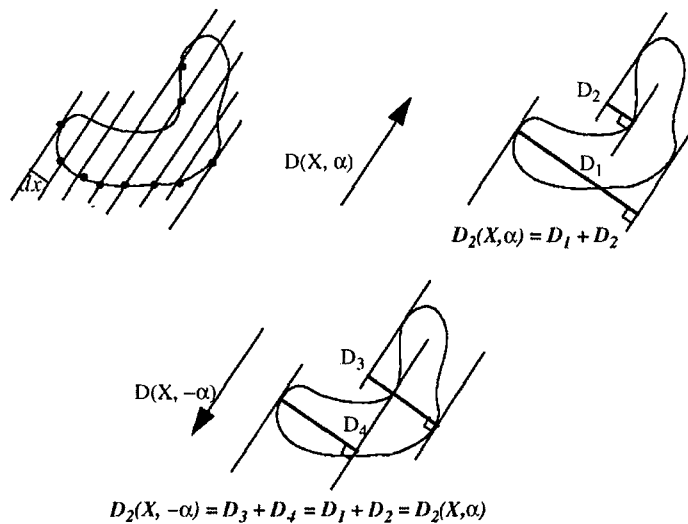


Figure 2.31 - Calcul du nombre d'interceptions (Noésis, 1996a)

Excentricité (E)

L'excentricité est calculée à partir des moments d'ordre 2 de la silhouette:

$$E = \frac{(4\pi)^2 (M_{2X} - M_{2Y})^2 + 4M_{2XY}^2}{S^2} \quad (2.4.10)$$

avec

$$M_{2X} = \frac{1}{S} \sum (x_i - M_{1X})^2 \quad (2.4.11)$$

$$M_{2Y} = \frac{1}{S} \sum (y_i - M_{1Y})^2 \quad (2.4.12)$$

$$M_{2XY} = \frac{1}{S} \sum (x_i - M_{1X})(y_i - M_{1Y}) \quad (2.4.13)$$

où (x_i, y_i) représentent les coordonnées d'un point de l'objet dans l'image. La position du centre de gravité de la silhouette est définie à partir des moments d'ordre 1:

$$M_{1X} = \frac{1}{S} \sum x_i \quad (2.4.14)$$

$$M_{1Y} = \frac{1}{S} \sum y_i \quad (2.4.15)$$

Circularité

La circularité (c) est définie à partir du périmètre de Crofton (P_C) et de la surface de la silhouette (S):

$$c = \frac{P_C^2}{4\pi S} \quad (2.4.16)$$

Ce paramètre mesure simultanément l'allongement et la rugosité de l'objet. Son interprétation doit être faite par comparaison avec un paramètre d'allongement.

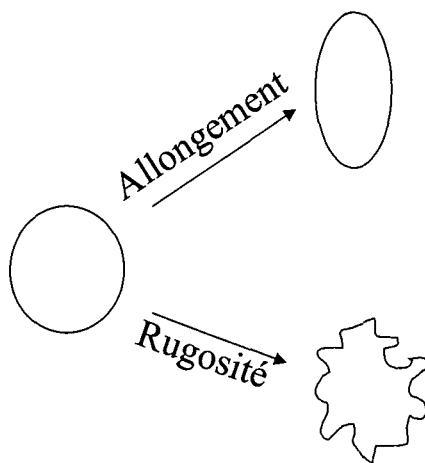


Figure 2.32 - Paramètre de circularité.

L'enveloppe convexe

Avant de définir la concavité, la robustesse et l'indice de concavité on doit d'abord définir l'enveloppe convexe : il s'agit du plus petit polygone convexe dans lequel on peut inscrire l'objet. Il existe plusieurs façons de l'obtenir. En traitement d'images on utilise en général des séries de fermetures qui conduisent à une enveloppe faiblement convexe, c'est-à-dire pas complètement convexe et dépendante de la position de l'objet dans l'image. Une autre enveloppe a donc été choisie qui est basée sur des concepts de géométrie continue. Cette enveloppe est créée à partir de la vectorisation du contour de l'objet, qui permet de représenter ce contour à l'aide d'une série de segments. Chaque segment est limité par des points pivots. Ensuite on relie deux à deux tous les points pivots. Pour remplir l'enveloppe on effectue une dilatation, suivi d'un remplissage et d'une érosion.

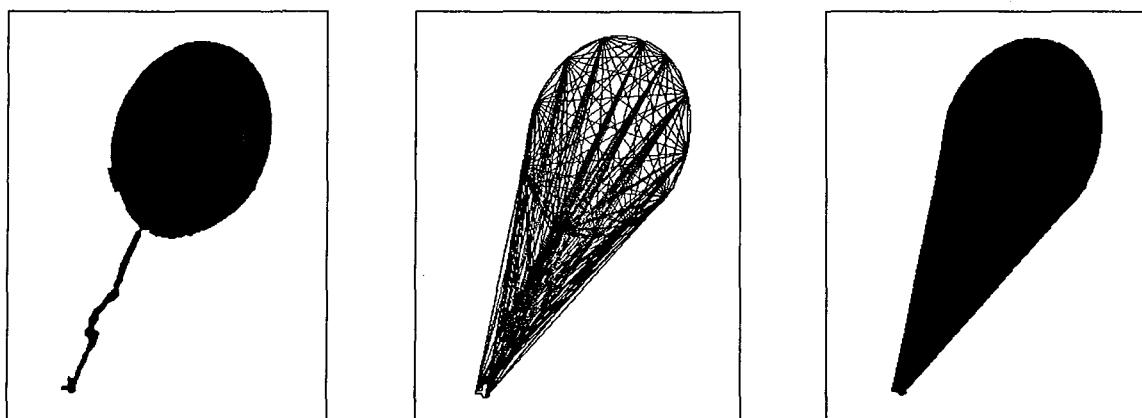


Figure 2.33 - Etapes de la création de l'enveloppe convexe : image initiale (a), contour vectorisé et points reliés (b) et enveloppe convexe rempli (c).

Robustesse (Ω_1) et indice de plus grande concavité (Ω_2)

Soit ω_1 le nombre d'érosions nécessaires pour faire disparaître la silhouette de l'objet et ω_2 le nombre d'érosions nécessaires pour faire disparaître le complément de la silhouette par rapport à son enveloppe convexe. En normant par rapport à la surface, on obtient (Pons et al., 1998):

la robustesse $\Omega_1 = \frac{2\omega_1}{\sqrt{S}}$ (2.4.17)

et la taille réduite de la plus grande concavité ou indice de la plus grande concavité

$$\Omega_2 = \frac{2\omega_2}{\sqrt{S}} \quad (2.4.18)$$

Indice de concavité IC

L'indice de concavité est défini par le rapport entre la surface de l'objet et la surface de l'enveloppe convexe.

On a au total plus de dix paramètres pour définir la morphologie des protozoaires: pour synthétiser toutes ces informations on a utilisé la technique d'analyse en composantes principales.

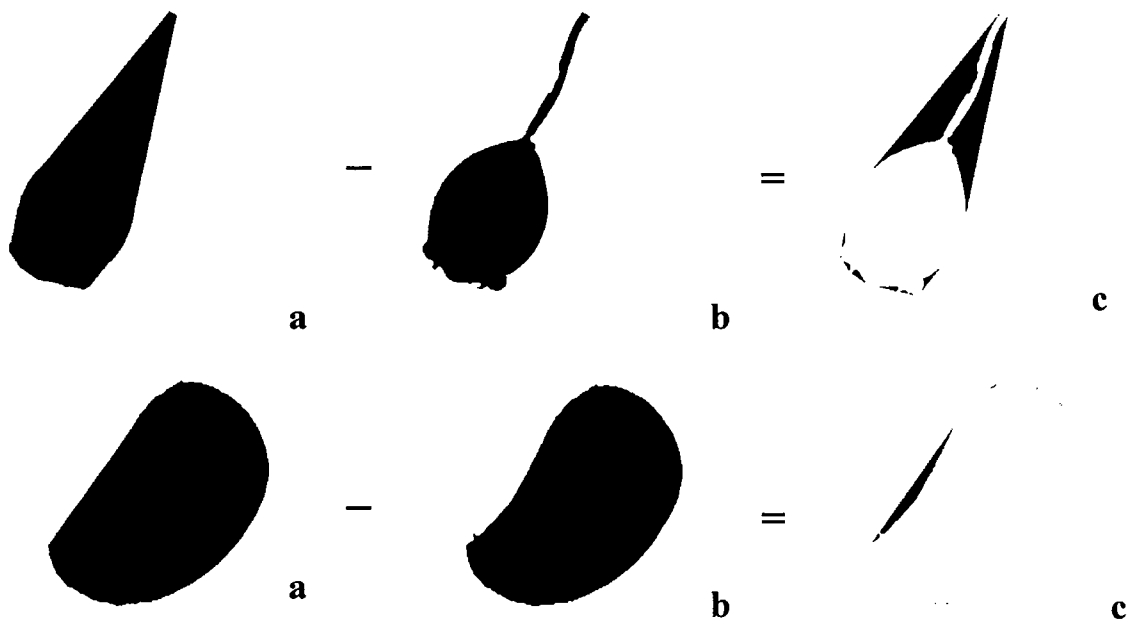


Figure 2.34 - Enveloppe convexe (a), silhouette de l'objet (b) et complément de la silhouette par rapport à l'enveloppe convexe.

La base de données

Une base de données a été construite à partir des protozoaires observés sur les prélèvements pendant toute la période considérée et l'identification était basée au départ sur une analyse en composantes principales (ACP) (cf. Chapitre 2.4.5) (Einax et al., 1997) à l'aide d'une macro Excel (XLSTAT) développée et commercialisée par T. Fahmy (Paris, France). La Figure 2.35 présente les protozoaires inclus dans cette base, ainsi que le nombre d'individus pris en compte pour chaque espèce.

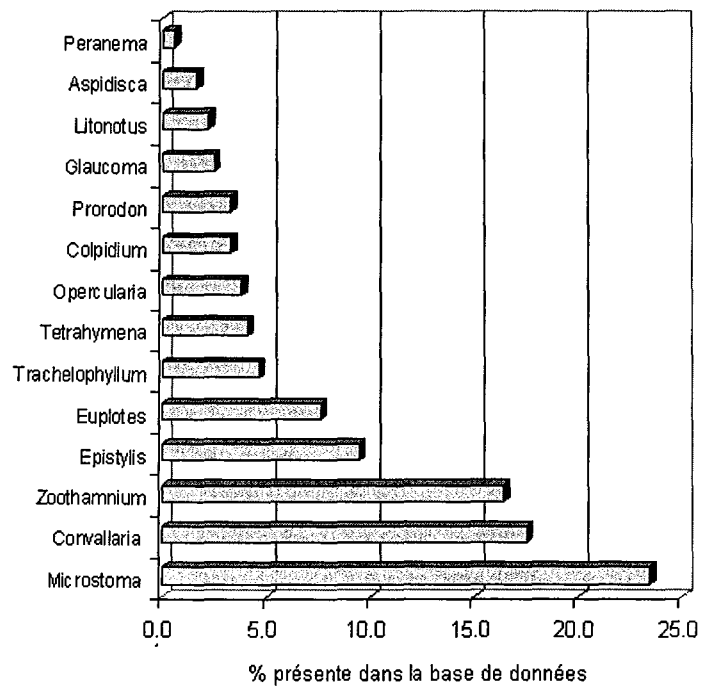


Figure 2.35 - Pourcentage des espèces de protozoaires présentes dans la base de données.

	Entraînement	Validation
<i>Arcella</i>	50	50
<i>Aspidisca cicada</i>	50	50
<i>Carchesium</i>	50	35
<i>Diginonta</i>	50	17
<i>Epistylis</i>	50	50
<i>Euplypha</i>	50	50
<i>Euplotes</i>	50	50
<i>Litonotus</i>	50	50
<i>Monogonota</i>	50	50
<i>Nematodes</i>	50	7
<i>Oligochètes</i>	50	16
<i>Opercularia</i>	50	50
<i>Peranema</i>	50	50
<i>Suctoriens</i>	50	*
<i>Trachellophyllum</i>	50	50
<i>Tritognostoma</i>	50	50
<i>Trochilia</i>	37	*
<i>V. acquadulcis</i>	50	50
<i>V. convalaria</i>	50	50
<i>V. microstoma</i>	50	50
<i>Zoothamnium</i>	50	50

* estimation à partir des protozoaires utilisés pour la validation

Figure 2.36 - Composition de la nouvelle base de données.

Si l'analyse en composantes principales (ACP) a donné des premiers résultats intéressants, elle n'était pas entièrement satisfaisante. Cela est dû au fait que cette méthode est plus adaptée pour indiquer des différences dans un même groupe que entre les groupes. On a alors pensé à

utiliser l'analyse factorielle discriminante (*AD*) (cf. Chapitre 2.4.6). Pour réaliser cette analyse ont été définis deux ensembles de 50 images des différentes espèces de micro-organismes. Le premier est utilisé pour l'entraînement et le deuxième pour la validation. On a introduit d'autres espèces de protozoaires ainsi que les amibes et les métazoaires. La Figure 2.36 présente les espèces de protozoaires et métazoaires existantes dans cette deuxième base de protozoaires ainsi que la quantité d'individus pour la validation et pour l'entraînement. Même si *Nématodes* (Classe), *Suctorina* (Sub-classe), *Monogononta* (Ordre) et *Digononta* (Ordre) ne sont pas des espèces, ils ont été mis ensemble dans la même figure.

2.4.4. Programme Gram

La coloration de Gram est une technique qui aide à l'identification des espèces de bactéries. Les bactéries dites Gram positives possèdent une paroi cellulaire formée par une couche épaisse de peptoglycane, tandis que pour les bactéries Gram négatives cette couche est moins épaisse et recouverte d'une membrane externe. Le cristal violet traverse les parois de toutes les bactéries et colore en violet leur cytoplasme. Après mordantage par du Lugol, les bactéries sont décolorées, plus rapidement pour les Gram négatives que pour les Gram positives. Après la deuxième coloration par la safranine les bactéries Gram négatives deviennent roses. *Microthrix parvicella* et *Norcadia* sont des exemples de bactéries Gram positives tandis que le *Type 021N* est Gram négative.

L'utilisation de la coloration de Gram requiert beaucoup de pratique. Les réactifs doivent être frais (3 - 6 mois) et, si possible, doivent être testés avec des cultures pures de bactéries dont on connaît les caractéristiques Gram. L'étape de décoloration doit être bien contrôlée pour éviter qu'elle ne soit excessive. Les gros flocs denses qui ne sont pas complètement décolorés sont ignorés dans le traitement des images (Jenkins et al., 1993).

La procédure de coloration de Gram que l'on a utilisée est la suivante:

- Fixer les bactéries sur les lames. On a laissé sécher pendant une demi-heure sur une source de chaleur douce pour qu'elles soient bien fixées ;
- Colorer avec la solution de Cristal violet ;
- Additionner le Lugol..
- Décolorer ;
- Rincer avec de l'eau ;
- Ajouter le deuxième colorant (la safranine) ;
- Rincer avec de l'eau ;
- Laisser sécher.

Pour chaque échantillon, six lames ont été préparées. 35 images sont acquises sur chaque lame avec un grossissement total de 1000x en utilisant de l'huile d'immersion. Si la préparation n'a pas été bien rincée après les colorations, lors de l'immersion, la teinte en excès peut colorer l'huile et rendre impossible les acquisitions.

La composante verte est extraite de l'image couleur et on la binarise pour récupérer l'ensemble des objets (filaments et flocs). La seuillage peut être réalisé par entropie ou par factorisation, selon le choix que l'on a fait dans la boîte de dialogue. Les petits débris sont éliminés par une érosion d'ordre 3 (cela peut être modifié dans la boîte de dialogue) suivie d'une reconstruction. La surface totale est alors calculée. Les morceaux des flocs sont obtenus par une ouverture (érosion suivie de fermeture) d'ordre 8 et supprimés de l'image par une soustraction logique. Ensuite les filaments et les gros débris sont étiquetés. La séparation entre filaments et débris

se fait à partir du rayon de giration, comme dans le programme FlocMorph. Les principales étapes de ce programme sont présentées sur la Figure 2.37.

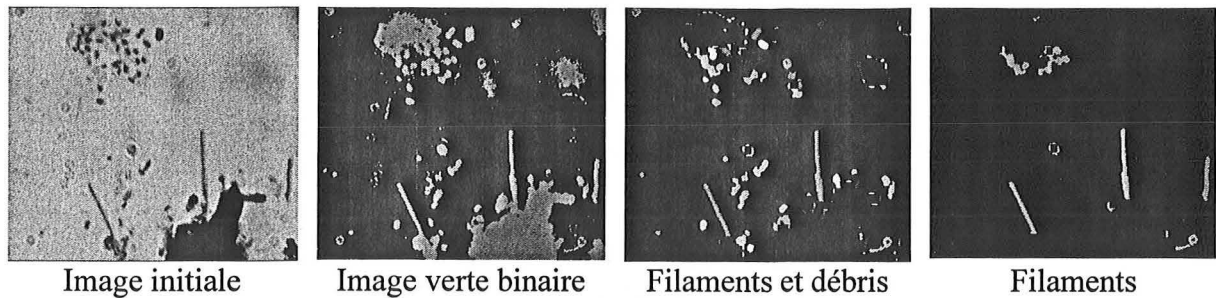


Figure 2.37 - Etapes principales du Programme Gram.

Les paramètres calculés :

La Fraction S_{fil}/S

C'est le rapport entre la surface projetée des filaments (S_{fil}) et de la surface projetée totale (S).

La fraction Rouge/Bleu ou Gram négatif/Gram positif

On s'est inspiré ici du travail de Saida et al. (1998). Pour obtenir ce paramètre on calcule la surface en bleu (caractéristiques des bactéries Gram positif) et la surface en rouge (caractéristiques des bactéries Gram négatif) des filaments de l'image initiale. La procédure de calcul est la suivante: l'image binaire des filaments va servir de masque pour que le programme puisse calculer la valeur de la composante bleue de l'image initiale découpée. Cela est réalisé pixel par pixel. Si un pixel a une composante bleue plus élevée que sa composante rouge, il est considéré comme bleu, et vice versa.

2.4.5. Analyse en composantes principales (d'après Einax et al., 1997)

L'analyse en composantes principales a pour but de trouver et d'interpréter des relations entre les individus d'un ensemble de données. Les individus corrélés sont convertis en facteurs, qui ne sont pas corrélés entre eux. L'objectif principal de cette analyse est de transformer la matrice des données originales (m,n) dans un produit de deux matrices: matrices des facteurs poids et matrice des facteurs valeurs.

$$\begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1n} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ X_{m1} & X_{m2} & \dots & X_{mn} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & \dots & a_{1s} \\ a_{21} & \dots & a_{2s} \\ \dots & \dots & \dots \\ a_{m1} & \dots & a_{ms} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} f_{11} & f_{12} & \dots & f_{1n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ f_{s1} & f_{s2} & \dots & f_{sn} \end{pmatrix}$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{A} \cdot \mathbf{F}$$

\mathbf{X} : matrice de données

\mathbf{A} : matrice de poids

\mathbf{F} : matrice de scores

s : nombre de facteurs ($s = m$)

Une combinaison linéaire des différents facteurs de la matrice A avec les coefficients de la matrice F permet de retrouver la matrice X . Ces facteurs sont de nouvelles variables qui représentent une certaine quantité des descripteurs de la matrice originale. Ils quantifient la variance totale de tous les descripteurs en ordre décroissant et sont non corrélés. Il est donc possible de réduire la dimension m du nombre de facteurs avec une perte minimale d'information. Cette perte est résumée par la matrice résiduelle E .

$$X = A \cdot F + E \text{ avec } (s < m) \quad (2.4.19)$$

$$\begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1n} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ X_{m1} & X_{m2} & \dots & X_{mn} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & \dots & a_{1s} \\ a_{21} & \dots & a_{2s} \\ \dots & \dots & \dots \\ a_{m1} & \dots & a_{ms} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} f_{11} & f_{12} & \dots & f_{1n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ f_{s1} & f_{s2} & \dots & f_{sn} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e_{11} & e_{12} & \dots & e_{1n} \\ e_{21} & e_{22} & \dots & e_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ e_{m1} & e_{m2} & \dots & e_{mn} \end{pmatrix}$$

E : matrice résiduelle obtenue en raison de la réduction de la dimension
 s : nombre de facteurs ($s < m$)

De cette façon, l'ACP permet une projection des objets d'un espace de grande dimension en un espace défini par quelques facteurs (ces facteurs sont des axes de l'espace des composantes principales). Cette analyse facilite ainsi la représentation graphique de données multidimensionnelles.

La décomposition est réalisée à partir de la transformation selon les axes principaux de la matrice de corrélation R . Cette matrice de corrélation des données brutes est donc le point de départ du calcul. L'algorithme mathématique est la solution d'un problème de valeurs propres :

$$R \cdot e_1 = \lambda_1 \cdot e_1 \quad (2.4.20)$$

$$R \cdot e_2 = \lambda_2 \cdot e_2 \quad (2.4.21)$$

...

où R : matrice de corrélation
 e_i : vecteurs propres
 λ_i : valeurs propres

La solution non triviale de ce problème se ramène à résoudre le déterminant : $|R - \lambda I| = 0$

La résolution de cette équation fournit les valeurs propres λ_i et les vecteurs propres e_i . Les propriétés de ces valeurs et vecteurs propres sont essentielles:

- Les valeurs propres sont une mesure de la variance extraite de la variance totale s_{total}^2 , exprimée par la matrice de corrélation R ;
- Les valeurs propres sont rangées par ordre décroissant $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \dots > \lambda_m$;
- Les valeurs propres et les vecteurs propres sont couplés par paires ;
- Les vecteurs propres sont orthogonaux entre eux ;
- La somme des valeurs propres est égale au nombre de descripteurs m ($\sum_{j=1}^m \lambda_j = m$) ;
- Les vecteurs propres contiennent les coefficients non normés de la matrice poids A . La normalisation des valeurs propres est réalisée en les divisant par la racine carré de λ_j .

La fraction de variance du facteur j est :
$$\frac{s_j^2}{s_{total}^2} = \frac{\lambda_j}{m} \quad (2.4.22)$$

Du fait de ces propriétés, il est possible de réduire le nombre de facteurs. Le nombre total de facteurs ($s = m$) décrit la variance de tout l'ensemble de données. Si on accepte une perte minimale de la variance exprimée par le modèle on peut réduire le nombre de facteurs.

2.4.6 Analyse factorielle discriminante (d'après Einax et al., 1997)

L'analyse discriminante est basée sur la matrice B ,

$$B = \sum_{k=1}^{k_{total}} n_k (\bar{x}_k - \bar{x})(\bar{x}_k - \bar{x})^T \quad (2.4.23)$$

qui exprime la variance des moyennes des classes et sur la matrice W ,

$$W = \sum_{k=1}^{k_{total}} \sum_{n=1}^{n_k} (x_{kn} - \bar{x}_k)(x_{kn} - \bar{x}_k)^T \quad (2.4.24)$$

qui exprime l'ensemble des variances dans les classes pour toutes les classes, où k_{total} est le nombre de classes, n_k le nombre d'objets, \bar{x} la moyenne totale et \bar{x}_k la moyenne de la classe k .

Les groupes ou classes de données testés sont "modélisés" avec l'objectif de re-classer les objets donnés avec une faible probabilité d'erreur et de classer ("discriminer") les autres objets en utilisant les fonctions du modèle.

La procédure mathématique pour trouver chaque fonction discriminante est la résolution du problème des valeurs propres du quotient $B.W^{-1}$, ce que veut dire qu'il faut trouver les racines caractéristiques et les vecteurs propres de:

$$(B.W^{-1}).e_1 = \lambda_1.e_1 \quad (2.4.25)$$

$$(B.W^{-1}).e_2 = \lambda_2.e_2 \quad (2.4.26)$$

...

La solution non triviale mène à l'étude de:

$$|B.W^{-1} - \lambda I| = 0 \quad (2.4.27)$$

La solution fournit des paires de valeurs propres et vecteurs propres comme dans l'analyse en composantes principales. Les vecteurs propres, e , sont non corrélés entre eux, c'est-à-dire qu'ils sont orthogonaux. Les valeurs propres, λ , fournies par cette équation, expriment la fraction de la variance obtenu de la matrice $B.W^{-1}$. La première valeur propre λ_1 est égale à la fraction de la variance contenue dans le premier vecteur propre, la deuxième valeur propre λ_2 exprime la variance obtenue par le deuxième vecteur propre, etc. La somme de toutes les valeurs propres représente la variance totale en $B.W^{-1}$.

Les coefficients de la fonction discriminante sont donc les coefficients des vecteurs propres e . Ces coefficients non normalisés sont les multiplicateurs des variables originales qui produisent les fonctions discriminantes.

Les coefficients normalisés, a , donnent des informations utiles pour l'évaluation de la nature des différences entre les classes.

$$a = \frac{e}{\sqrt{e^T e}} \quad (2.4.28)$$

Un autre possibilité d'interprétation des fonctions discriminantes est de calculer la corrélation entre ces fonctions et les caractéristiques originales.

a. Points discriminants des objets

Les coordonnées des objets dans un nouvel **espace fonction discriminante** peuvent être calculées à partir des valeurs des caractéristiques originales des objets. Avec n_{fd} fonctions discriminantes, les n_{fd} **points discriminants** de chaque objet peuvent être déterminés. Par exemple, pour le premier point discriminant d'un objet i , on obtient:

$$fd_{1i} = e_{11}x_{1i} + e_{12}x_{2i} + \dots + e_{1j}x_{ji} + e_{1m}x_{mi} \quad (2.4.29)$$

où: fd_{1i} = fonction discriminante 1 de l'objet i

e_{1j} = coefficients pour toutes les caractéristiques originales ($j=1, \dots, m$) de la fonction discriminante 1

x_{ji} = valeurs des caractéristiques originales ($j=1, \dots, m$) de l'objet i

b. Classification des objets "inconnus"

Dans le cas de deux groupes, on décrit les groupes par les points discriminants d'une fonction discriminante. Les coordonnées moyennes des deux classes avec leurs variances sont connues et le nouveau objet peut être discriminé facilement, c'est-à-dire, classé dans un des deux groupes. Ceci est réalisé en attribuant l'objet "inconnu" à la classe dans la région de confiance à laquelle elle appartient. Ceci peut être testé en utilisant l'Equation 2.4.30.

$$F_K = C_2 \sum_{t=1}^{n_{fd}} (fd_{ti} - fd_{tk})^2 \quad (2.4.30)$$

où: C_2 = coefficient qui combine plusieurs degrés de libertés

fd_{ti} = point discriminant caractéristique de l'objet i ; fonction discriminante t

fd_{tk} = point discriminant caractéristique de la moyenne de la classe k

(cette valeur est calculée par l'insertion des valeurs moyennes des caractéristiques originales dans l'Equation (2.4.29))

F_K = valeur expérimentale F de la classe k

n_{fd} = nombre de caractéristiques discriminantes

$$C_2 = \frac{n_0 - k_{total} - n_{fd} + 1}{n_{fd}(n_0 - k_{total})} \frac{n_k}{n_k + 1} \quad (2.4.31)$$

où: k_{total} = nombre total de classes
 n_0 = nombre total d'objets
 n_{fd} = nombre de caractéristiques discriminantes
 n_k = nombre d'objets dans la classe k

A partir de l'Equation 2.4.31, à chaque classe a été attribuée une région dispersée de dimension n_{fd} . Si F_k de l'objet en question est inférieur ou égal à $F(n_{fd}; n - k_{total} - n_{fd} + 1; q = 1 - \alpha)$ alors l'objet appartient à la classe k . Dans le cas d'une superposition de régions, la classe avec une valeur de F plus faible est généralement choisie.

Distance de Mahalanobis

La distance de Mahalanobis est une distance statistique, que l'on a employé pour classer les protozoaires dans une espèce ou on groupe. Elle est définie par l'Equation 2.4.32 :

$$D^2 = (n - k_{total})(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^T W^{-1} (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \quad (2.4.32)$$

où: D^2 est la distance Mahalanobis ;
 \bar{x} le vecteur qui contient les valeurs moyennes des classes 1 et 2 ;
 W la matrice de la variance totale intra-classe (Equation 2.4.24).

Chapitre 3

Etude des Floccs Bactériens

*"Tous les êtres vivants sont Boudha
et en eux sont sagesse et vertue"*

BOUDHA

Comme nous l'avons vu précédemment, la connaissance du niveau d'agrégation des floccs bactériens ainsi que de l'abondance de bactéries filamenteuses permet une meilleure gestion du procédé d'épuration des eaux usées par voie biologique, soit-elle aérobie ou anaérobie.

Dans le présent chapitre seront présentés les résultats de l'analyse de la microfaune bactérienne obtenus par trois programmes d'analyse d'image. Le premier, FloccMorph, permet l'étude des floccs à une échelle mésoscopique et donne des informations sur leur structure et la quantité de bactéries filamenteuses. Le deuxième s'appelle Fond Noir et réalise une analyse macroscopique de la structure des floccs. Le dernier, Gram, quantifie le rapport entre les bactéries Gram négatives et positives.

On présentera dans un premier temps les résultats obtenus lors d'un suivi de la station d'épuration de Nancy-Maxéville pendant une période de plus de deux ans, pendant laquelle on a pu constater plusieurs phénomènes (bulking et moussage). La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'étude réalisée sur 12 stations d'épuration en France et au Portugal. Afin de se placer dans des conditions favorables au développement des bactéries filamenteuses, on a également travaillé sur des systèmes pilotes. Un réacteur pilote parfaitement agité a été utilisé pour étudier l'effet du volume du décanteur (Chapitre 3.3) et de la température (Chapitre 3.4) sur le comportement des bactéries. Ensuite un deuxième réacteur à écoulement piston a été conçu: le fonctionnement des deux réacteurs a été comparé en utilisant du substrat synthétique puis naturel. Enfin, le dernier chapitre est consacré aux premiers résultats obtenus avec le programme Gram.

3.1 Suivi de la Station de Nancy - Maxéville

3.1.1. Préliminaires

A partir des mesures effectuées sur les floccs il est possible de définir, outre la dimension fractale qui caractérise la rugosité, plusieurs descripteurs morphologiques comme des facteurs d'allongement calculés à partir des diamètres de Féret et du diamètre équivalent (F_{max}/F_{min} , F_{max}/D_{eq}) ou la circularité ($P_c^2/(4\pi S)$) où P_c est le périmètre de Crofton (cf. Chapitre 2.4.3). Il a été décidé ici de se limiter à un seul descripteur morphologique, la dimension fractale. L'analyse des informations fournies pour les différents descripteurs sus mentionnés et surtout de leurs coefficients de variation intra-échantillon et inter-échantillons nous a conduit à la sélectionner comme "meilleur" descripteur morphologique dans le cas présent. La moyenne des valeurs moyennes par échantillon (Moy_m) obtenue sur une série d'échantillons est donnée pour les différents descripteurs dans le Tableau 3.1.1. Le coefficient de variation entre ces moyennes (CV_{m1}) a été calculé ainsi que le coefficient de variation moyen obtenu sur les différents échantillons (CV_{m2}) (coefficient de variation inter-échantillons). On observe pour la circularité que CV_{m2} est très élevé et que CV_{m1} est élevé. Pour les deux descripteurs d'allongement CV_{m1} est faible, indiquant que les valeurs moyennes ne varient pas beaucoup d'un échantillon à l'autre. Par contre CV_{m2} est plutôt élevé, traduisant une large distribution des ces grandeurs dans chaque échantillon. On a préféré utilisé la dimension fractale pour laquelle CV_{m1} est du même ordre de grandeur que pour les coefficients d'allongement mais qui possède un CV_{m2} plus faible.

Tableau 3.1.1 - Comparaison des moyennes et coefficients de variation des descripteurs morphologiques des floccs.

	$P^2/(4\pi S)$	F_{max}/F_{min}	F_{max}/D_{eq}	D_f
Moy_m	8.5	1.74	1.71	1.29
$CV_{m1}(\%)$	24	1.47	3	2.2
$CV_{m2}(\%)$	161	33	23	9

Afin de valider l'utilisation de nos méthodes de quantification par analyse d'image nous avons préalablement réalisé des essais de reproductibilité. Pour cela des essais ont été réalisés avec plusieurs opérateurs différents effectuant une analyse sur un même échantillon et avec un opérateur réalisant deux analyses successives d'un même échantillon.

Tableau 3.1.1 - Valeurs maximales (Max) et moyennes (Moy) de: coefficient de variation (CV_{m1}), surface totale par image (S_t), surface totale des floccs par image (S_f), nombre total de filaments par image (N_f), longueur totale des filaments par image (L_f), surface moyenne des floccs par image (S_f), diamètre équivalent mésoscopique des floccs ($D_{eq} \text{ méso}$) et dimension fractale mésoscopique des floccs ($D_f \text{ méso}$), entre deux analyses successives sur un même échantillon (1 op) et entre les résultats de l'analyse par plusieurs opérateurs d'un même échantillon (+ op).

	S_t (%)	S_f (%)	N_f (%)	L_f (%)	S_f (%)	$D_{eq} \text{ méso}$ (%)	$D_f \text{ méso}$ (%)
Max (1 op)	11.43	22.62	53.17	52.58	20.15	6.93	2.69
Moy (1op)	3.03	5.90	17.20	17.25	7.88	3.39	1.00
Max (+ op)	18.47	61.10	82.81	92.92	13.55	8.14	3.05
Moy (+ op)	14.07	38.68	46.25	49.35	7.26	5.45	2.90

On peut observer que, d'une façon générale, les erreurs commises quand il y a plusieurs opérateurs sont beaucoup plus importantes que celles commises avec un seul opérateur. Ces expériences, ainsi que les premières réalisées avec un seul opérateur, ont été réalisées avant que le protocole d'analyse ne soit complètement mis au point (Tableau 3.1.1 et Figure 3.1.1).

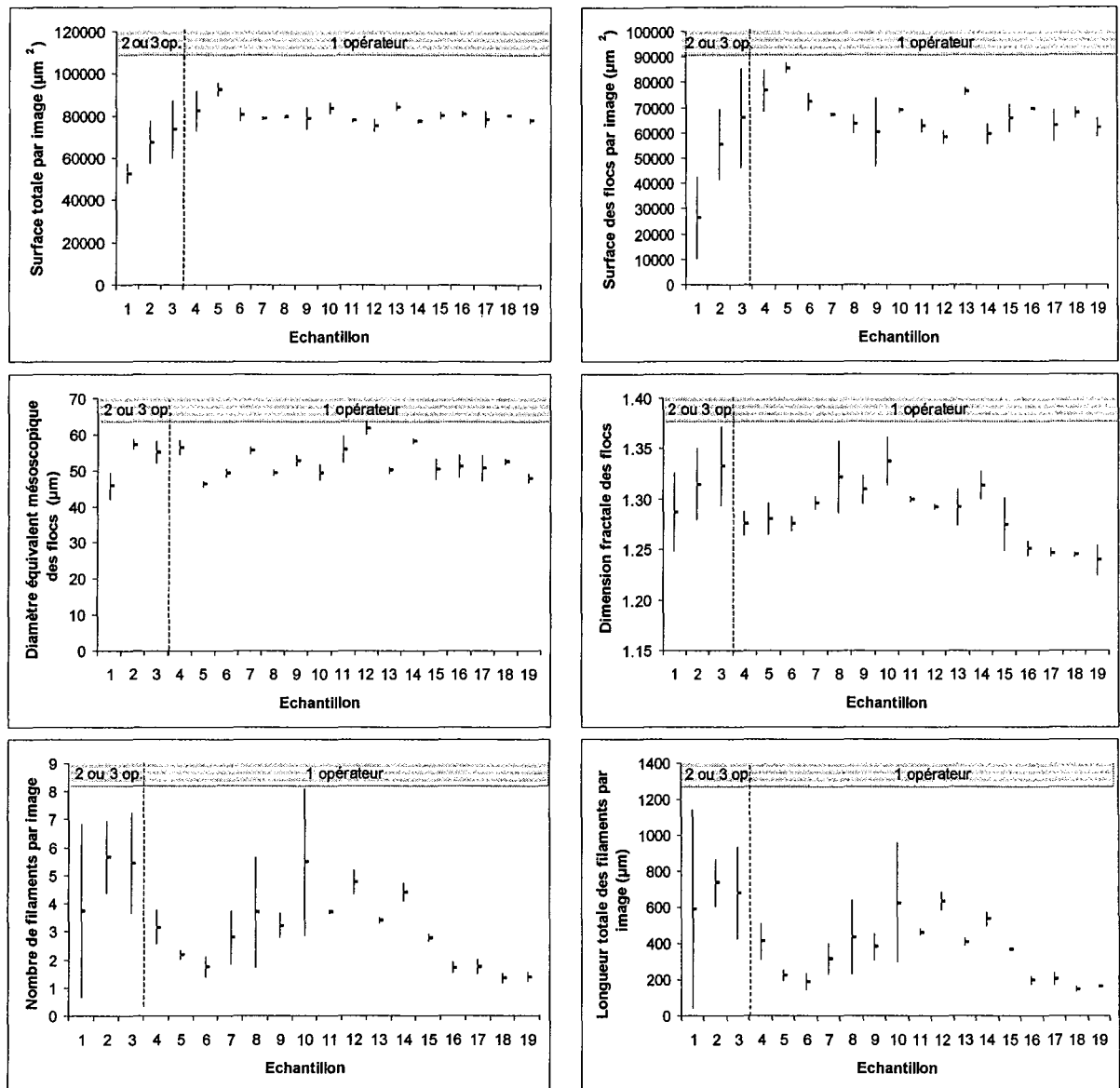


Figure 3.1.1 – Valeurs moyennes et écart type de la surface totale (S_f), surface totale des flocs (S_{f_f}), nombre total de filaments (N_f) et longueur totale des filaments (L_f) par image, diamètre équivalent mésoscopique des flocs ($D_{eq\ meso}$) et dimension fractale mésoscopique des flocs ($D_f\ meso$), pour une analyse par deux ou trois opérateurs (échantillon 1 - 3 opérateurs; échantillon 2 et 3 - 2 opérateurs) et pour deux analyses successives sur un même échantillon (échantillons 4 à 19)

Les paramètres les plus sensibles à la dextérité de l'opérateur sont la longueur et le nombre total des filaments par image. Le diamètre équivalent mésoscopique des flocs et leur surface totale par image sont les plus robustes.

La façon de préparer l'échantillon et les conditions d'acquisition (luminosité surtout) peuvent provoquer des erreurs de l'ordre de 50%. A partir de l'échantillon 11 une procédure détaillée a été mise en place (voir chapitre 2.2.3). Par un suivi rigoureux de cette procédure de

préparation et par le contrôle des paramètres d'acquisition des écarts types entre les deux mesures inférieurs à 5% sont obtenus.

Il n'a pas été tenté de comparer quantitativement les résultats obtenus par analyse d'image et ceux pouvant être obtenus par les méthodes classiques de comptage. La raison essentielle est que dans notre mode de préparation le volume exact de la goutte déposée n'est pas exactement connu. D'autre part la visualisation entre lame et lamelle implique que l'on ne connaît pas exactement l'épaisseur entre les surfaces de verre. Par contre ce type de visualisation facilite la focalisation des filaments. On a simplement vérifié la cohérence des résultats entre l'analyse d'image et l'aspect visuel des images.

3.1.2. Analyse des floccs bactériens de la station de Nancy - Maxéville

Le suivi de la station de traitement des eaux usées de Nancy (située à Maxéville) a été réalisé de février 1999 à mars 2001. Après un an de collecte de données (février/1999 à mars/2000), le suivi a été suspendu pendant presque six mois et a été repris juste avant le début de l'hiver 2000-2001, période pendant laquelle il y a eu des changements importants dans le comportement du réacteur biologique.

Les facteurs climatiques influent sur le comportement d'une station. La température modifie les vitesses des réactions biologiques. Les précipitations sous forme de neige préfigurent une arrivée de sel de déneigement, celles sous forme de pluie augmentent le débit d'entrée dans la station et diluent la pollution contenue dans l'eau usée à traiter. Pour tenir compte de ces faits on a obtenu de Météo France les relevés de la température de l'air (Figure 3.1.2) et des précipitations (Figure 3.1.3) correspondant à ces deux années de suivi.

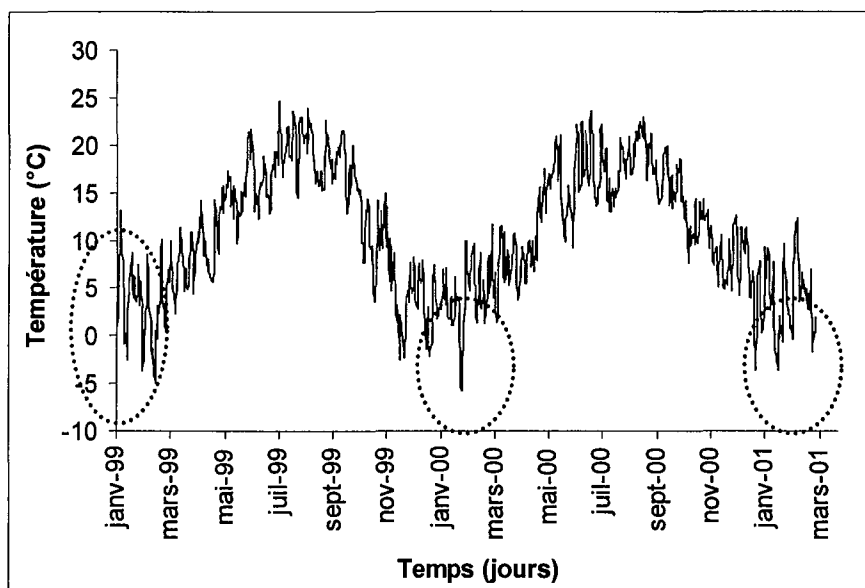


Figure 3.1.2 - Variation de la température moyenne de l'air du Grand Nancy entre Janvier/1999 et Mars/2001 (donnés fournies par Météo France).

On observe, sur la Figure 3.1.2, que la température de l'air est un peu près la même pour les trois hivers. Cependant, la différence entre l'hiver 1998/1999 et les suivants réside dans la nature des précipitations: il a neigé et une forte quantité de sel de déneigement a été répandu

sur les chaussées pendant le premier hiver. Ce sel est un mélange de chlorure de sodium et de calcium qui est amené à la station par le réseau d'assainissement (en partie unitaire) de la ville. Une grosse partie des insolubles est retenue lors du désablage mais le reste ainsi que les sels dissous atteignent le bassin d'aération, ce qui modifie le comportement des micro-organismes ainsi que les propriétés des floccs bactériens.

Les importantes pluies provoquent une dilution de la charge organique (et inorganique) à l'entrée dans la station. Une baisse de la charge peut provoquer un déséquilibre de la microfaune présente dans le bassin et des dysfonctionnements tel que le bulking filamenteux.

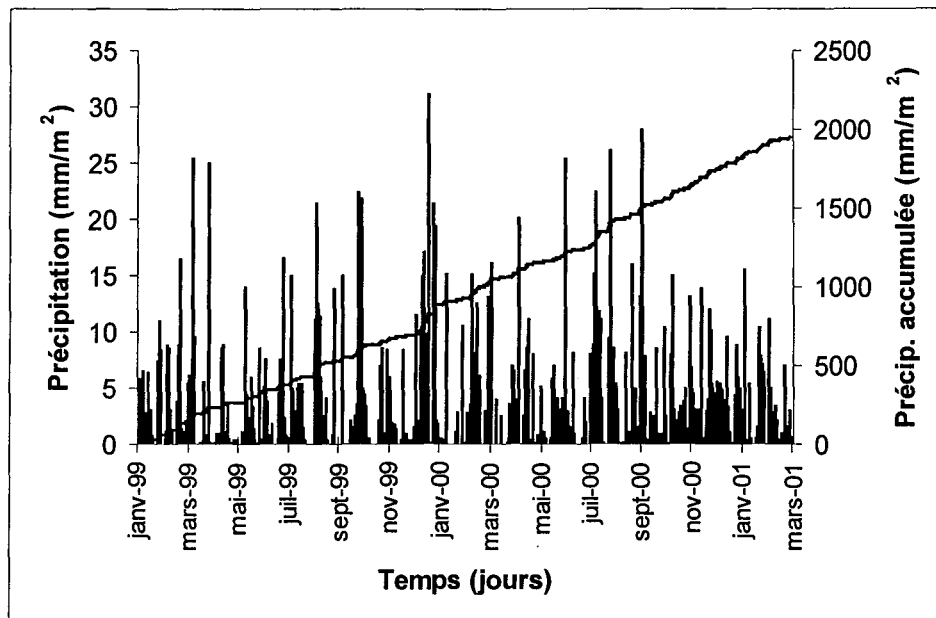


Figure 3.1.3 - Variation des précipitations (pluie et neige) journalières de la Communauté Urbaine du Grand Nancy entre Janvier/1999 et Mars/2001(donnés fournies par Météo France).

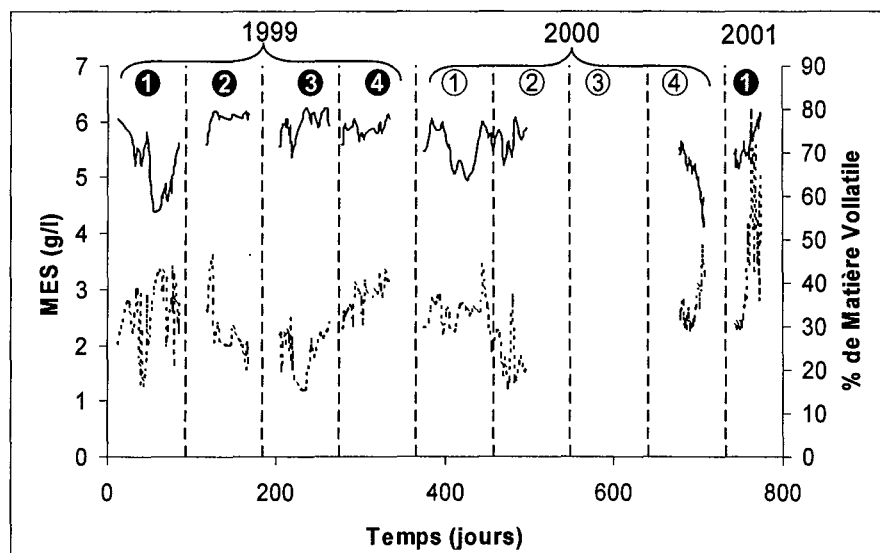


Figure 3.1.4 - Variation de la matière en suspension (--) et du pourcentage de matière volatile (—) pendant le suivi de la station d'épuration de Nancy-Maxéville.

Périodes: ①,① = hiver; ②,② = printemps; ③,③ = été et ④,④ = automne.

Si on analyse la période de l'hiver 1999 en ce qui concerne les matières en suspension (*MES*) et les matières volatiles (*MV*), on note une chute de ces dernières, causée probablement par la présence des sels (Figure 3.1.4). Le déséquilibre ionique provoqué par leur arrivée peut entraîner aussi des phénomènes de défloculation des floccs bactériens déjà formés et un lessivage de la biomasse par la surverse du clarificateur.

Une deuxième période très intéressante est la fin de l'année 2000 et le début de l'année 2001. Pendant l'automne 2000, on observe une chute suivie d'une augmentation des matières en suspension. Sur la Figure 3.1.5 on observe que l'Indice de Mohlman a le même comportement que les matières en suspension. Cette variation de l'Indice de Mohlman n'est pas seulement due aux matières en suspension mais aussi à la longueur totale des filaments (Figure 3.1.11).

L'hiver 2001 a vu une prolifération excessive des bactéries filamenteuses (*Nocardia sp.*). Cela a provoqué des débordements du bassin du fait d'un fort moussage, une réduction de la vitesse de décantation et une augmentation de l'Indice de Mohlman (caractéristiques d'un phénomène de bulking filamenteux et de moussage). Richard (1989) indique que les bactéries *Nocardia sp.* provoquent seulement un phénomène de moussage du fait de leur caractère hydrophobe. On peut supposer alors un changement de *Nocardia sp.* d'un caractère hydrophobe à un caractère hydrophile, comme cela se passe avec *Microthrix parvicella*. Une grande quantité de ces bactéries filamenteuses vont s'accrocher aux floccs et augmenter leur résistance à la décantation. On peut passer d'un régime de plusieurs floccs qui décantent ensemble à un milieu poreux formé par les floccs reliés par les bactéries filamenteuses. Ceci peut expliquer le phénomène qui s'est produit sur la station d'épuration pendant l'hiver 2001. La Figure 3.1.5 présente la variation de l'Indice de Mohlman pendant cette période. Afin de réduire l'excès des bactéries filamenteuses les opérateurs ont ajouté du chlore (sous la forme d'hypochlorite de sodium), dans le canal de recirculation. Ceci a permis de ramener l'Indice de Mohlman à des niveaux normaux de fonctionnement (entre 50 et 150 mL/g).

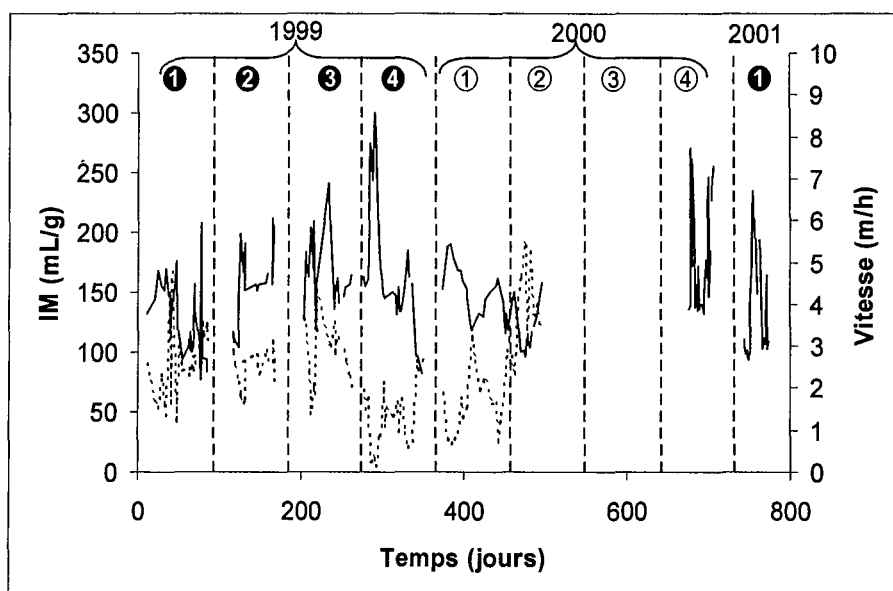


Figure 3.1.5 - Variation de l'Indice de Mohlman (*IM*) (—) et de la vitesse de décantation (--) pendant le suivi de la station de traitement de Nancy-Maxéville. Périodes: ①,① = hiver; ②,② = printemps; ③,③ = été et ④,④ = automne.

Entre l'automne 1999 et l'hiver 1999/2000 on peut observer une chute de la vitesse de décantation (Figure 3.1.5), qui correspond à une augmentation de la concentration des

matières en suspension (Figure 3.1.4). Cette période est suivie d'un phénomène de bulking au début de l'hiver, quand la vitesse de décantation passe au-dessous de 0.5 cm/min. La vitesse de décantation élevée pendant le printemps 2000 est liée à une chute de la concentration en matières en suspension et à une réduction du diamètre équivalent mésoscopique des floes (Figure 3.1.9).

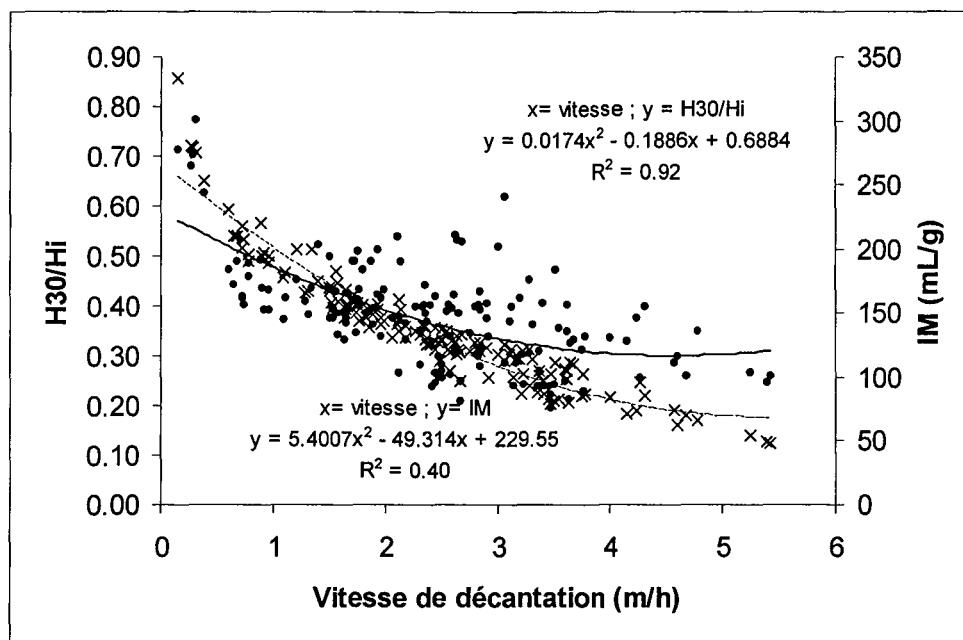


Figure 3.1.6 - Corrélation de la vitesse de décantation avec la fraction H_{30}/H_i (x) et avec l'Indice de Mohlman (IM) (●) (courbe pour la fraction H_{30}/H_i (- -) et pour l'Indice de Mohlman (-))

La corrélation entre la vitesse de décantation et l'Indice de Mohlman (Figure 3.1.6), est médiocre (coefficient de corrélation (R^2) égal à 0.40). Par contre, si on utilise la fraction décantée après 30 minutes (H_{30}/H_i) on obtient un meilleur coefficient de corrélation (0.92).

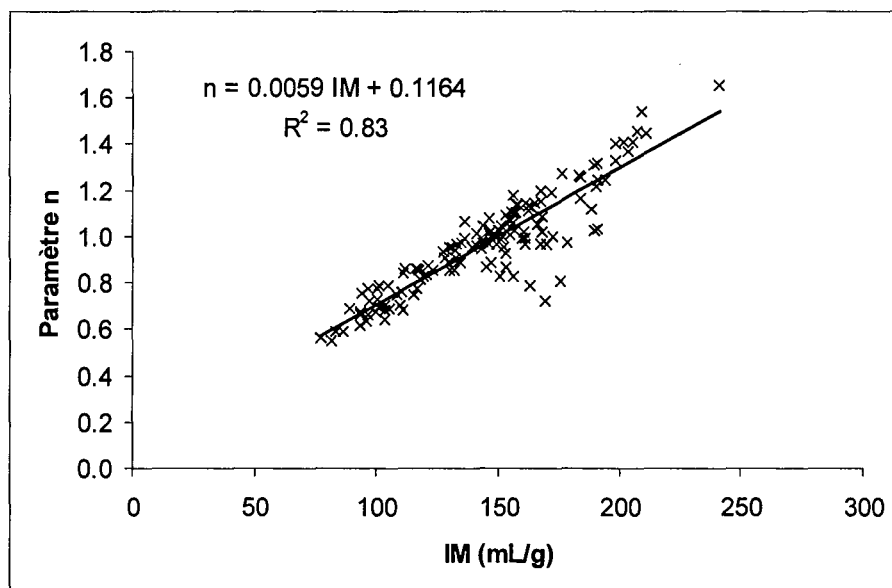


Figure 3.1.7 - Corrélation entre l'Indice de Mohlman (IM) et le paramètre n du modèle exponentiel.

La Figure 3.1.7 présente une corrélation obtenue entre l'Indice de Mohlman et le paramètre n du modèle exponentiel. Ce paramètre est fondamental pour le dimensionnement des clarificateurs. Il exprime, de façon indirecte, la vitesse de décantation pour toute la courbe de décantation.

Les variations de la surface totale (S_t) et de la surface totale des floes (S_{ff}) par image sont présentées dans la Figure 3.1.8. Elles peuvent être interprétées comme des mesures d'une concentration surfacique de la biomasse. Cette concentration surfacique est très faiblement corrélée avec la concentration en matière en suspension (Figure 3.1.9). Cela est essentiellement dû au fait que la surface totale est une surface projetée du floe qui est un objet tridimensionnel. Ajouté à cela, on a aussi les variations de densité des floes, dû à l'ajout du sel par exemple. Cette mesure peut seulement servir de contrôle pour une éventuelle dilution de l'échantillon si l'image est jugée trop chargée.

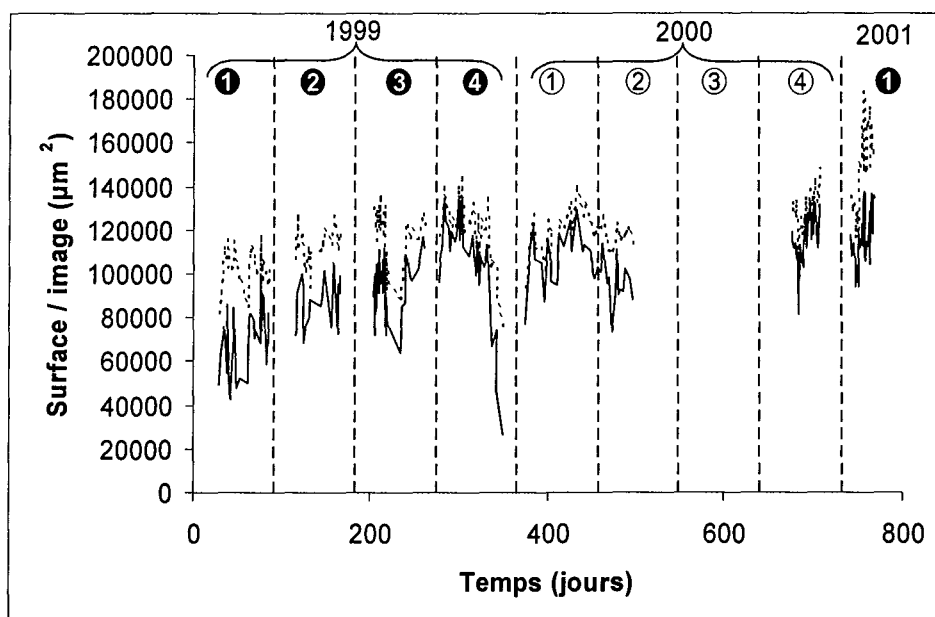


Figure 3.1.8 - Variation de la surface totale par image (---) et de la surface totale des floes par image (—) pendant le suivi de la station de Nancy - Maxéville. Périodes: ①,① = hiver; ②,② = printemps; ③,③ = été et ④,④ = automne.

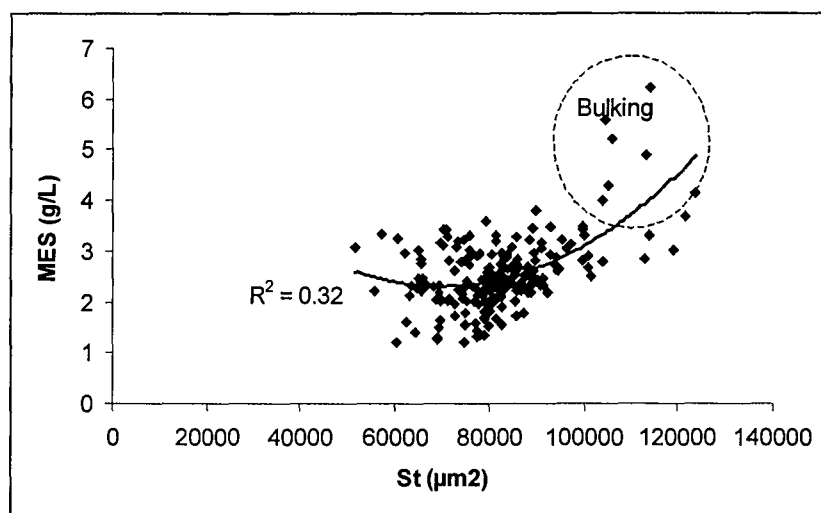


Figure 3.1.9 - Corrélation entre la surface totale par image (S_t) et la concentration en matières en suspension (MES).

On peut observer une chute des surfaces à partir du jour 333. Durant cette même période la vitesse de décantation augmente et l'Indice de Mohlman chute. Inversement on observe que les matières en suspension n'ont pas beaucoup évolué. Cela peut être expliqué par une présence de particules de taille inférieure à la limite de détection du programme FlocMorph. Ces petites particules, résultant probablement d'une défloculation, contribuent au calcul de la matière en suspension (concentration de biomasse) mais ne gênent pas la décantation. Par contre, à la fin de l'automne 1999, il y a une augmentation de la biomasse (Figure 3.1.4) et une augmentation des surfaces. L'augmentation de la surface totale pendant l'hiver 2001 correspond à la période de bulking.

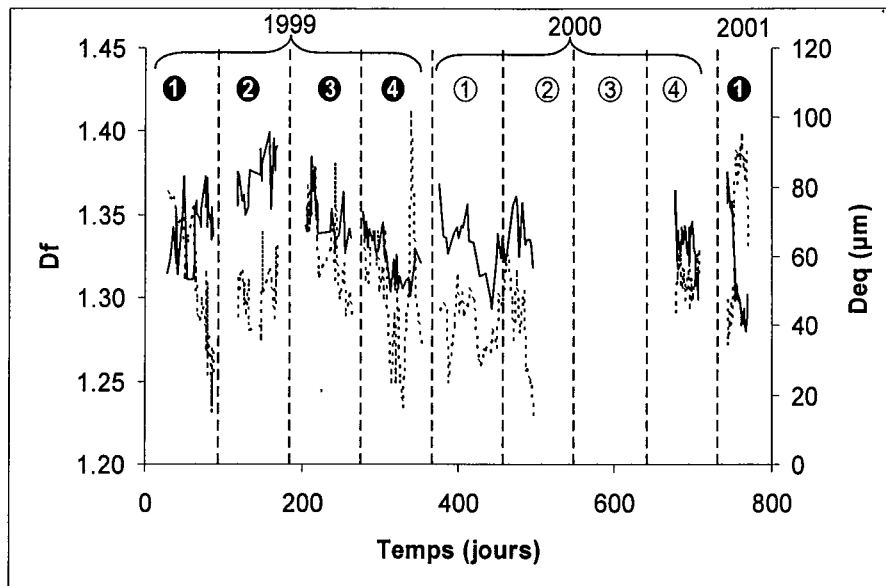


Figure 3.1.10 - Variation de la dimension fractale mésoscopique des floes (D_f) (--) et du diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq}) (—) pendant le suivi de la station traitement de Nancy - Maxéville.
Périodes: ①,① = hiver; ②,② = printemps; ③,③ = été et ④,④ = automne.

Les variations de la dimension fractale sont fortement liées à celles de la longueur totale des filaments et d'une façon plus limitée au diamètre équivalent. A la fin de l'hiver 1999/2000 la dimension fractale mésoscopique (D_f méso) chute fortement, de même que la longueur totale des filaments par image (L_f) (Figure 3.1.10). La défloculation qui a eu lieu au 333^{ème} jour a induit une augmentation de la rugosité des floes (forte augmentation de la dimension fractale). Parallèlement le diamètre équivalent a diminué pendant cette même période.

On a observé une réduction du diamètre équivalent lors d'une augmentation de la présence des bactéries filamenteuses, pendant les périodes hivernales de 1999 et 2001. Ceci peut indiquer une compétition entre les espèces, surtout quand la charge est plus faible. Les bactéries filamenteuses étant en dehors des floes, elles peuvent assimiler plus facilement les nutriments du milieu.

Il existe plusieurs espèces de bactéries filamenteuses et les conditions du milieu peuvent changer leur comportement. Si on calcule la longueur moyenne par image des bactéries en divisant la longueur totale par image par le nombre de bactéries par image, on peut avoir une idée du type de bactérie. Sur le Figure 3.1.11 on peut voir que pendant des 500 premiers jours on avait des longueurs moyennes pour les bactéries filamenteuses comprises entre 270 et 120 µm et que à la fin cette longueur a été réduite à 100 µm environ. La première période est

marquée par la présence de *Microthrix parvicella* (Figure 3.1.12a) et la seconde par la présence de *Nocardia sp.* (Figure 3.1.12b) qui sont très segmentés.

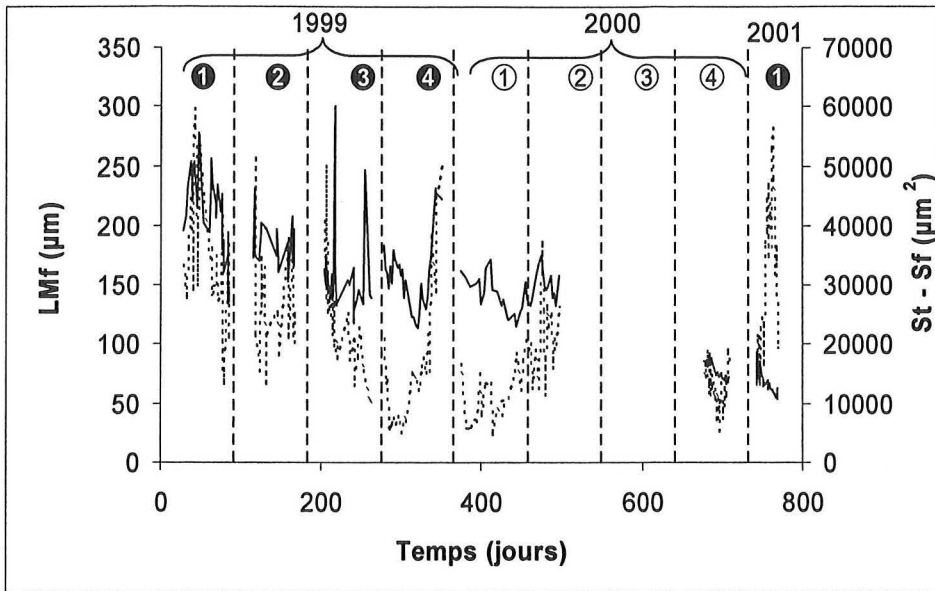


Figure 3.1.11 - Variation de la longueur moyenne des bactéries filamenteuses (LM_f) (—) et de la différence entre la surface totale des objets par image (St) et la surface totale des floes par image (S_f) (---). Station de traitement des eaux usées de Nancy - Maxéville.

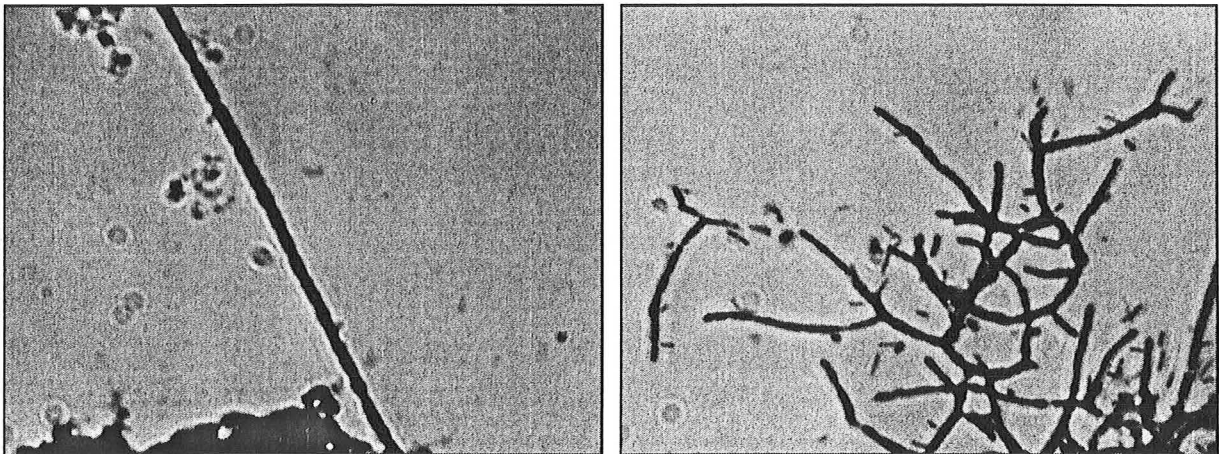


Figure 3.1.12 - *Microthrix parvicella* (a) et *Nocardia sp.* (b) après coloration de GRAM (grossissement 400x).

Pendant l'hiver 2001 on a observé que la différence entre la surface totale des objets et celle des floes par image a beaucoup augmentée: ceci est due surtout à une présence excessive des bactéries filamenteuses. Le phénomène de défloculation associé à une augmentation des bactéries filamenteuses a produit un deuxième pic de longueur totale des filaments par image à la fin de l'année 1999.

Sur la Figure 3.1.13 on peut observer que l'Indice de Mohlman et la longueur totale des filaments évoluent de façon similaire pour certaines périodes. Cependant la Figure 3.1.14 indique qu'il n'y a pas de corrélation évidente. En réalité l'Indice de Mohlman n'est pas seulement fonction de la longueur des filaments mais aussi du diamètre équivalent, de la

concentration, de la densité des floccs et d'autres facteurs (viscosité, température, etc.). La zone grisée de la Figure 3.1.14 correspond aux données que l'on trouve dans la littérature (Jenkins et al., 1993).

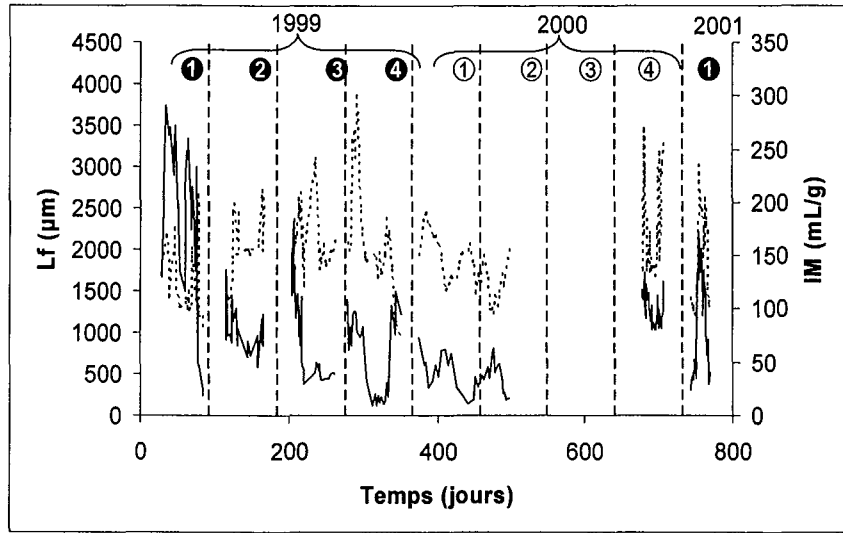


Figure 3.1.13 - Evolution de la longueur totale des filaments par image (L_f) (—) et de l'Indice de Mohlman (IM) (--) dans le bassin d'aération de la station de traitement des eaux usées de Nancy-Maxéville.

On a constaté que l'augmentation de l'Indice de Mohlman est souvent liée à des périodes de pluie intense après quelques jours de temps sec (Figure 3.1.15). Cela peut s'expliquer par une diminution de la charge organique (dilution) qui favorise le développement des bactéries filamenteuses. Une autre possibilité est liée à l'apport de bactéries présentes dans le réseau d'égouts. L'augmentation de la quantité de matières en suspension, due à l'augmentation du débit (curage du réseaux, érosion des sols) et/ou du lavage des chaussées par la pluie, peut contribuer aussi au déséquilibre de la composition de la biomasse.

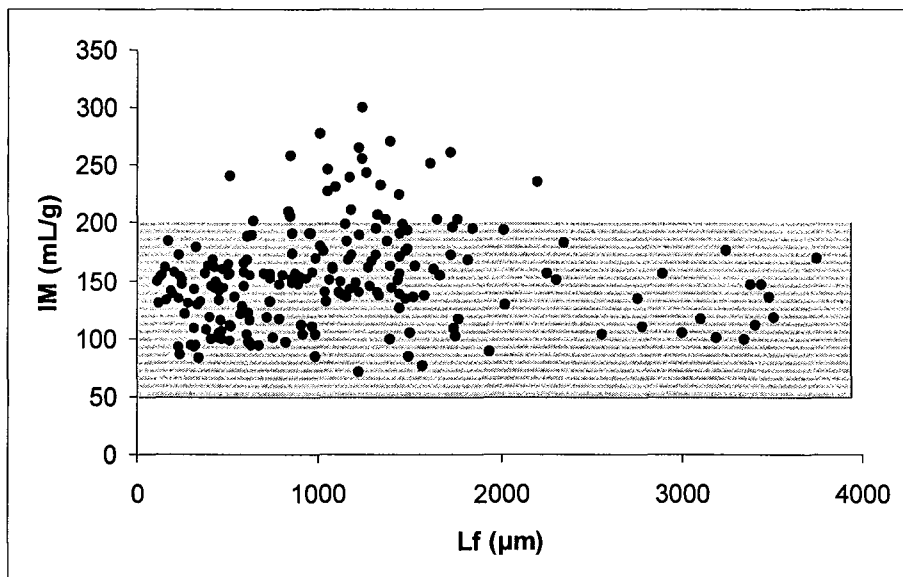


Figure 3.1.14 - Corrélation entre la longueur totale des filaments par image (L_f) et l'Indice de Mohlman (IM).

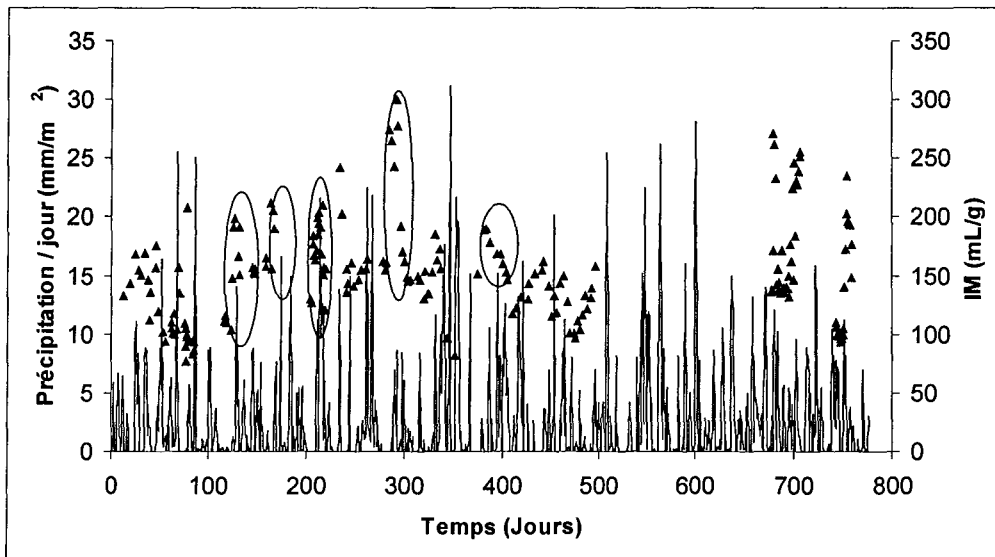


Figure 3.1.15 - Précipitations sur la communauté urbaine du Grand Nancy pendant la période de suivi et de l'Indice de Mohlman (*IM*) (\blacktriangle) du bassin d'aération de la station d'épuration.

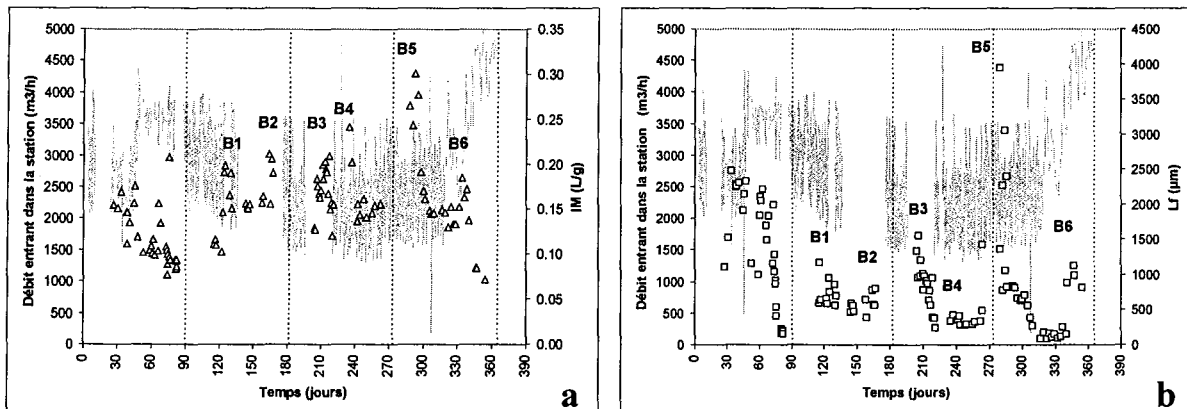


Figure 3.1.16 - Evolution du débit d'entrée de la station de Nancy-Maxéville et du Indice de Mohlman (*IM*) (a) et de la longueur totale des filaments par image (*L_f*) (b) pour l'année 1999.

Si on examine plus précisément les 360 premiers jours de la Figure 3.1.15, correspondant à l'année 1999, on détecte six épisodes de type bulking filamenteux avec une augmentation de l'Indice de Mohlman (Figure 3.1.16a). On voit sur la figure 3.1.16b, que, pour chacun des épisodes, la longueur totale des filaments par image (*L_f*) a augmenté.

En résumé la procédure de caractérisation par analyse d'image des bactéries filamenteuses et des floccs développée dans ce travail fournit des informations en accord avec les mesures classiques effectuées sur la station. Afin de valider la procédure sur d'autres installations, on a réalisé une campagne pendant laquelle on a pu analysé les boues activées de 12 stations différentes en France et au Portugal. Ces résultats sont présentés dans la section suivante.

3.2. Suivi des Stations

Cette campagne d'analyse sur plusieurs stations d'épuration a été réalisée pendant la période du 27 avril 2000 au 26 juin 2000. Les stations visitées sont celles de Nancy-Maxéville, Toul, Metz, Damelevières, Dombasle et Pont-à-Mousson en Lorraine, Isle-sur-Vienne et Aix-sur-Vienne dans le Limousin et les stations de Braga, Caminha et Gelfa dans la région du Minho au Portugal.

Les échantillons prélevés dans ces stations d'épuration sont acheminés au laboratoire en moins d'une heure afin d'éviter des modifications de la microfaune et des changements sur la structure des floccs bactériens. Les résultats obtenus par l'analyse d'image des floccs bactériens sont présentés dans le Tableau 3.2.1. Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes obtenues sur deux séries de 72 images.

Tableau 3.2.1 – Principaux résultats de l'analyse d'image des floccs bactériens : diamètre équivalent mésoscopique des floccs (D_{eq}); longueur totale des filaments par image (L_f); nombre total de filaments par image (N_f); surface totale par image (S_i); surface totale des floccs par image (S_{if}); surface moyenne des floccs par image (S_f) et dimension fractale mésoscopique des floccs (D_f).

Station	D_{eq} (μm)	L_f (μm)	N_f	S_i (μm^2)	S_{if} (μm^2)	S_f (μm^2)	D_f
Damelevières	56	1074	17	157801	147334	4359	1.34
Metz	44	1033	17	176758	156358	2473	1.34
Pont-à-Mousson	52	721	11	143429	134097	3704	1.32
Nancy-Maxéville	61	448	3	118653	97310	6313	1.28
Braga	35	5462	75	115593	60666	1247	1.44
Gelfa	39	3298	50	124116	88939	1783	1.39
Caminha	43	2188	34	92772	76912	2373	1.37
Aix-sur-Vienne	62	231	8	135494	96709	3954	1.44
Isle-sur-Vienne	37	626	38	38877	29728	1551	1.48
Liverdun	44	1495	24	157288	132285	2428	1.36
Toul	46	1601	26	127497	108589	2979	1.38
Dombasle	40	1356	22	170705	134181	1800	1.39

On observe que dans toutes les stations, excepté celle de Nancy-Maxéville, il y a beaucoup de filaments, indiquant un phénomène de " bulking " ou de moussage. Dans la station de Braga, par exemple, il s'agit d'une prolifération des bactéries filamenteuses, avec une prédominance de l'espèce *Type 1863*. Pour la station de Caminha on a eu un problème d'analyse lié à la structure des floccs. Il y avait des gros floccs très sombres et des petits floccs clairs. Le programme a considéré que ces petits floccs étaient des filaments. Dans cette station il y a en fait très peu de filaments et la décantation reste bonne. On a mis ici en évidence une des limitations du programme FloccMorph.

Dans la station de Nancy, ainsi que dans celle de Caminha, on a un bon équilibre entre les bactéries zoogléales et filamenteuses, produisant ainsi des floccs sains.

Pour les stations d'Isle-sur-Vienne et d'Aix-sur-Vienne il y a eu des problèmes liés au système d'acquisition, parce qu'il s'agissait d'un système portable de moins bonne résolution spatiale. Pour la station d'Isle-sur-Vienne, s'est ajouté un problème dû aux espèces de filaments présents. La bonne qualité de l'image initiale est en effet fondamentale pour le traitement d'image.

La Figure 3.2.1 représente la variation du diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq} méso) en fonction du nombre de filaments par image (N_f) pour l'ensemble des observations réalisées. On voit que le diamètre diminue quand le nombre de filaments augmente. Cela peut s'expliquer par la consommation des substrats par les bactéries qui sont dans le milieu liquide, réduisant ainsi la disponibilité du substrat pour celles qui se trouvent dans les floes, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (Chapitre 1.3.7).

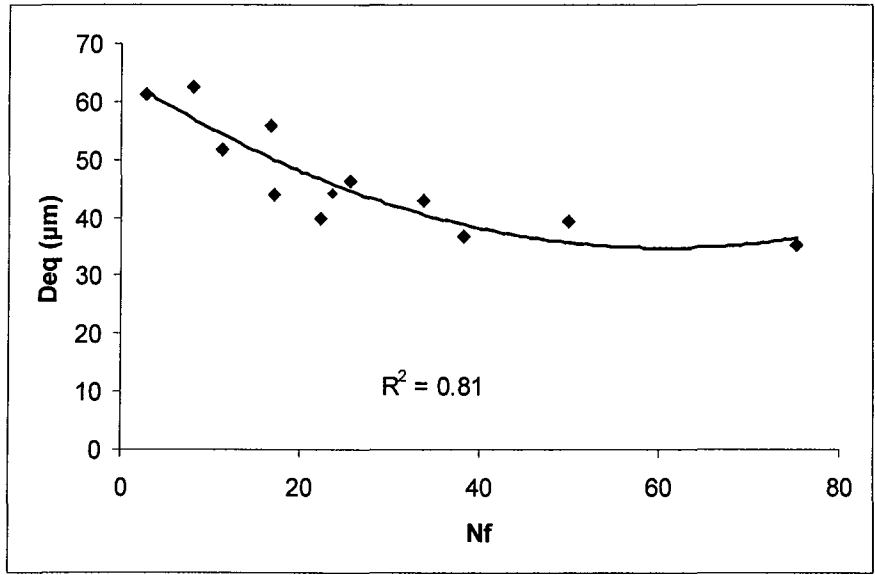


Figure 3.2.1 – Corrélation entre le nombre de filaments par image (N_f) et le diamètre équivalent mésoscopique des floes bactériens (D_{eq})

On observe aussi que la dimension fractale, qui donne une idée de la rugosité des floes, augmente avec le nombre des filaments (Figure 3.2.2a) et diminue lorsque le diamètre des floes augmente (Figure 3.2.2b). L'excès de filaments et/ou la réduction du diamètre équivalent induisent des floes plus irréguliers. Si on a moins des bactéries à l'extérieur des floes (paramètre mesuré par FlocMoph), il y aura plus de substrat disponible pour les bactéries qui se trouvent dans les floes. De cette façon les floes seront plus gros et résistants, mais seront lissés dans l'environnement tourbillonnant du bassin d'aération.

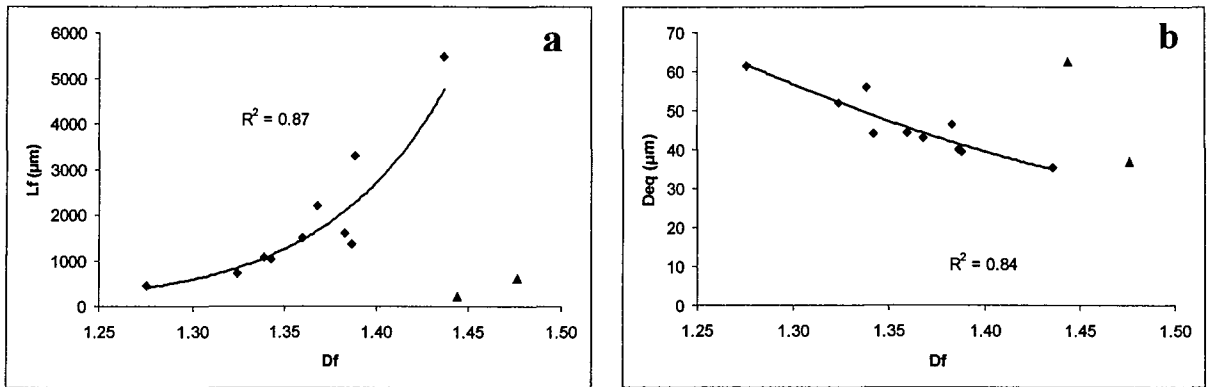


Figure 3.2.2 – Corrélation entre la dimension fractale mésoscopique (D_f) et la longueur totale des filaments par image (L_f) (a) et entre la dimension fractale mésoscopique (D_f) et le diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq}) (b).

Aussi lorsqu'il y a un excès de bactéries dans le milieu liquide les floccs sont plus fragiles et se fragmentent produisant des structures plus rugueuses. Les bactéries filamenteuses peuvent aussi se développer sur la surface exposée des floccs et contribuer ainsi à l'augmentation de la rugosité.

Les triangles dans les Figures 3.2.2a et 3.2.2b correspondent aux données des stations de Isle-sur-Vienne et Aix-sur-Vienne, pour lesquelles le système d'acquisition avait une résolution spatiale plus faible (elles ne sont pas prises en compte dans les corrélations). La dimension fractale est très sensible à la résolution spatiale car elle est calculée à partir du contour du flocc.

Les résultats des analyses de matières en suspension et volatiles et des paramètres de décantabilité sont reportés dans le Tableau 3.2.2. Pour obtenir la courbe de décantation il a fallu diluer la liqueur mixte de 9 des 12 stations analysées. Pour cela on a utilisé, quand on en avait la possibilité, l'eau de sortie du clarificateur (eau épurée). Cela évite que la structure des floccs ne soit trop déformée par la variation de la pression osmotique provoquée par l'addition d'eau de ville.

Tableau 3.2.2 – Résultats de l'analyse physico-chimique des floccs bactériens: Matières en suspension (*MES*); pourcentage de matière volatile (% *MV*) ; Indice de Mohlman concentré (*IM*); dilution ; Indice de Mohlman dilué (*IMd*) ; fraction décantée après 30 minutes (H_{30}/H_i) et vitesse de décantation (*v*).

Station	N°	<i>MES</i> (g/L)	% <i>MV</i>	<i>IM</i> (mL/g)	H_{30}/H_i (Conc)	dilution	<i>IMd</i> (mL/g)	H_{30}/H_i (Dilué)	<i>v</i> (cm/min)
Damelevières	1	3.8	64.5	238	0.91	1:2	161	0.31	4.29
Metz	2	4.8	63.6	201	0.97	2:5	153	0.47	1.89
Pont-à-Mousson	3	10.4	59.5	94	0.97	1:2	90	0.47	2.22
Nancy-Maxéville	4	1.7	74.6	133	0.22	n.d.	133	0.22	6.28
Braga	5	2.5	84.5	399	0.99	1:2	372	0.46	2.41
Gelfa	6	2.8	75.9	330	0.92	1:2	234	0.33	4.25
Caminha	7	3.2	72.7	88	0.28	n.d.	88	0.28	n.c.
Aix-sur-Vienne	8	4.6	n.c.	215	0.99	1:4	307	n.c.	n.c.
Isle-sur-Vienne	9	7.2	n.c.	136	0.98	1:2	271	n.c.	n.c.
Liverdun	10	5.0	69.3	196	0.97	1:2	175	0.42	1.91
Toul	11	3.1	64.1	157	0.49	n.d.	157	0.49	2.89
Dombasle	12	9.5	69.1	100	0.96	1:4	136	0.34	4.04

n.d. = non dilué n.c. = non connu

Si on observe les valeurs de l'Indice de Mohlman (*IM*), on trouve parfois des valeurs basses pour des boues que ne décantent pas bien (fraction H_{30}/H_i élevée). Cela est dû à des boues fortement concentrées. Dans ces cas il faut mieux utiliser l'Indice de Mohlman dilué (*IMd*). Les valeurs de l'Indice de Mohlman dilué présentées dans le Tableau 3.2.2 n'ont pas été obtenues en suivant la méthodologie préconisée dans la littérature ($H_{30}/H_i < 0,25$) car on ne disposait pas de suffisamment d'eau interstitielle ou épurée.

On peut considérer que la teneur en matières volatiles représente la teneur en matières organiques. La matière organique des floccs est composée dans sa plus grande partie par des exopolymères et des bactéries formatrices de floccs et filamenteuses (les autres micro-organismes sont en concentration plus faible). Aussi, un pourcentage de matières volatiles plus important peut être un indicateur de floccs plus gros et/ou avec plus des filaments, comme nous le montre la corrélation obtenue sur la Figure 3.2.3a.

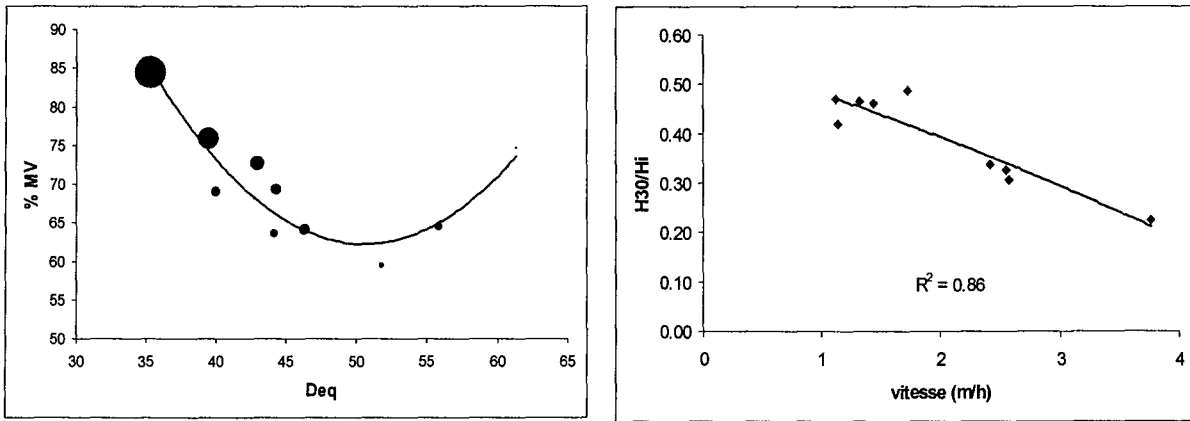


Figure 3.2.3 - Corrélations entre le diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq}), le pourcentage de matières volatiles (% MV) et le nombre de filaments par image (représenté par la taille du cercle) (a) et entre la vitesse de décantation et la fraction décantée après 30 minutes H_{30}/H_1 (b).

La corrélation obtenue entre la vitesse de décantation des floes dans la zone de chute libre pour le suivi de la station de Nancy a été confirmée. On a obtenu un coefficient de corrélation (R^2) de 0.86, en utilisant les données de 9 stations après dilution.

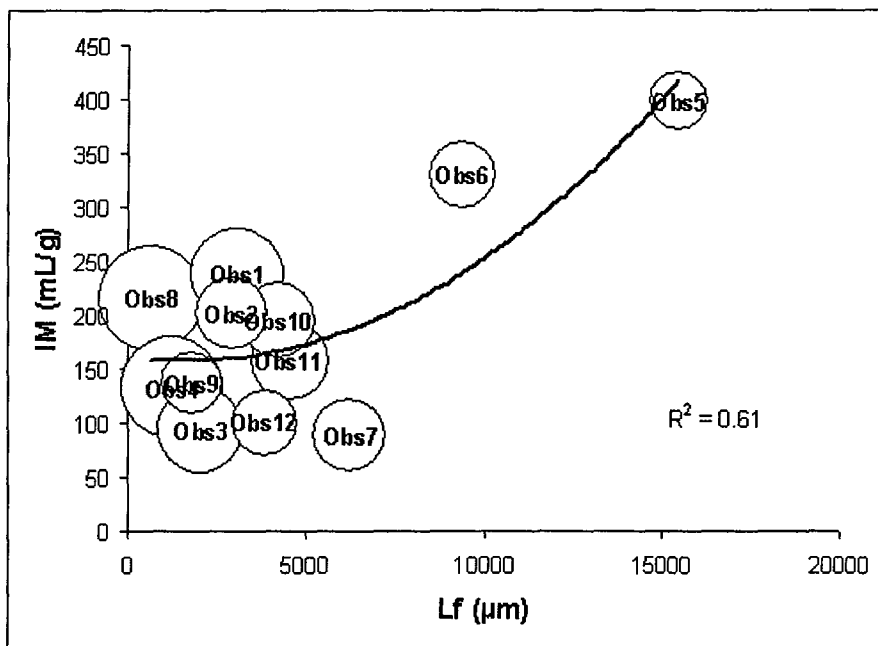


Figure 3.2.4 - Corrélation entre la longueur totale des filaments par image (L_f), l'Indice de Mohlman (IM) et le diamètre équivalent mésoscopique des floes. (La taille du cercle est proportionnelle au diamètre équivalent mésoscopique des floes et la légende Obs n° représente la station n°).

L'utilisation de l'Indice de Mohlman (IM) pour des boues très concentrées ou avec beaucoup de filaments a rendu la corrélation entre l'Indice de Mohlman et le nombre des filaments difficile. On a vu aussi que, dans ces cas, l'utilisation des valeurs de l'Indice de Mohlman n'exprime pas toujours des indices fiables de décantabilité. On observe sur la Figure 3.2.4 que la station n°3 (Pont-à-Mousson) a un Indice de Mohlman faible, indiquant une bonne décantation. Cependant, si on regarde la Figure 3.2.5, on se rend compte que dans cette station la décantation est très faible (rapport H_{30}/H_1 grand). Ces deux paramètres (H_{30}/H_1 et Indice de Mohlman) sont donc à considérer ensemble pour estimer la qualité des propriétés de décantation des floes.

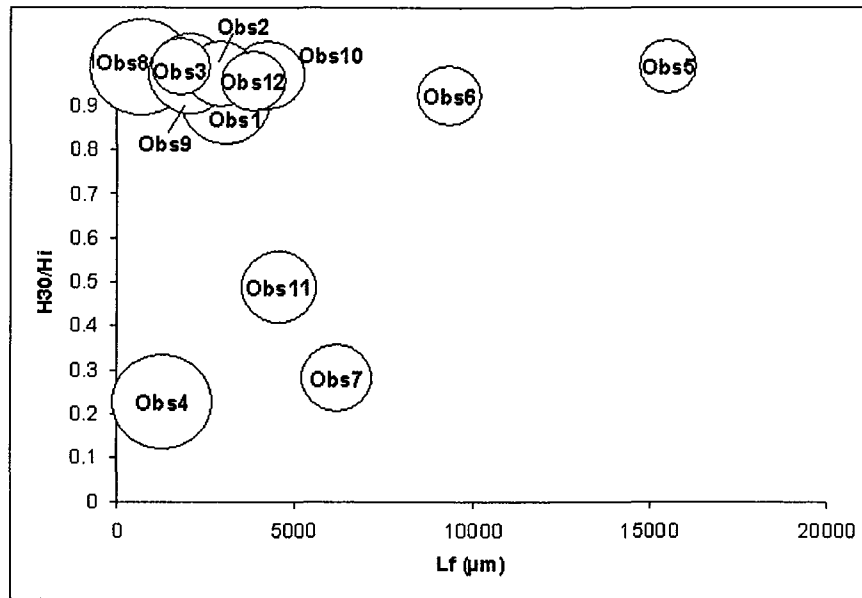


Figure 3.2.5 - Corrélation entre la longueur totale des filaments par image (L_f), la fraction décantée après 30 minutes (H_{30}/H_t) et le diamètre équivalent mésoscopique des floccs (La taille du cercle est proportionnelle à ce diamètre équivalent et la légende Obs n° veut dire station n°).

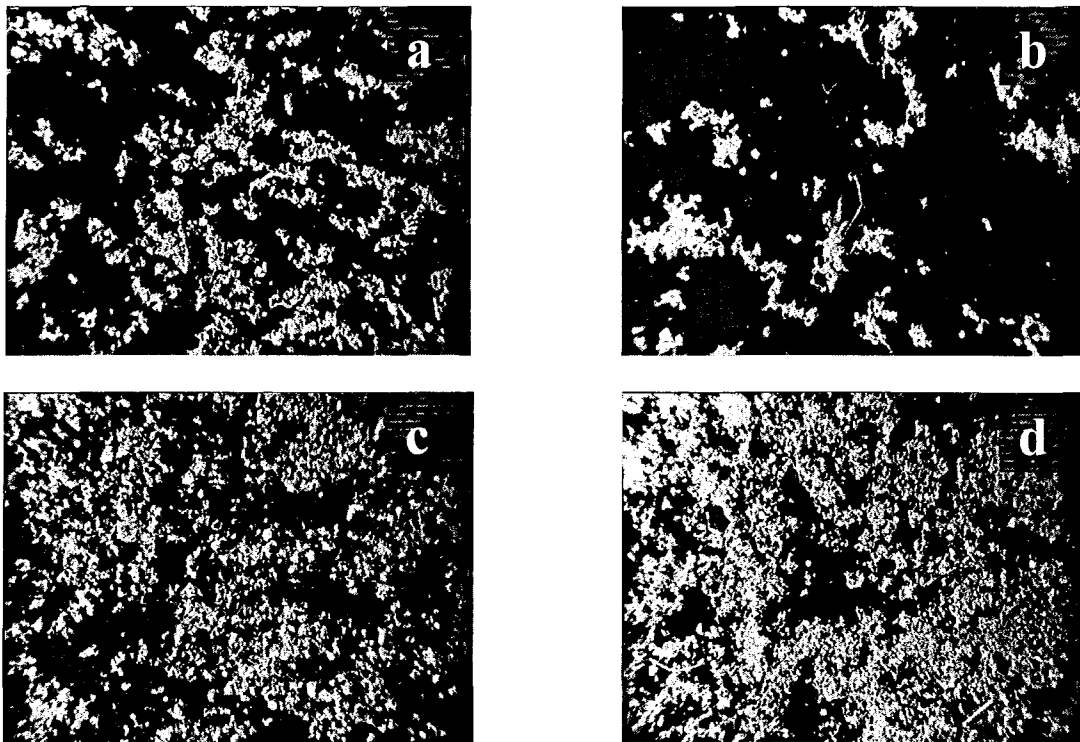


Figure 3.2.6 - Images initiales à 25x fond inversé pour les stations 3 (a), 4 (b), 10 (c) et 12 (d).

On peut voir, sur la Figure 3.2.6, que pour la station de Dombasle (n° 12) les floccs observés à l'échelle macroscopique sont beaucoup plus agglomérés. Dans cette station on a une forte concentration de la matière en suspension associée à un pourcentage élevé de matières volatiles et à une forte présence des filaments. Cette agglomération et ces liaisons entre les

flocs peuvent être caractérisées par une valeur élevée de la taille moyenne par rapport au diamètre équivalent (Tableau 3.2.3).

Tableau 3.2.3 - Résultats de l'analyse macroscopique et physico-chimique : diamètre équivalent macroscopique des flocs ($D_{eq\ macro}$) ; taille moyenne des flocs ($Taille\ Moy$) ; dimension fractale macroscopique ($D_f\ macro$) ; Indice de Mohlman (IM) ; matières en suspension (MES) et pourcentage de matière volatile ($\%MV$).

Station	n°	D_{eq} (μm)	$Taille\ Moy$ (μm)	$D_f\ macro$	IM (mL/g)	MES (g/L)	$\%MV$
Damelevieres	1	71	28	1.55	239	4	65
Metz	2	60	27	1.61	201	5	64
Pont-a-Mouson	3	68	26	1.55	94	10	60
Nancy	4	76	29	1.52	133	2	75
Liverdun	10	54	19	1.62	196	5	69
Toul	11	56	21	1.62	157	3	64
Dombasle	12	60	55	1.64	101	10	69

La station n° 4 a un pourcentage élevé de matières volatiles et des flocs très gros mais peu des filaments, tandis que la station n° 10 a un pourcentage de matières volatiles un peu moins important, un faible diamètre équivalent macroscopique des flocs mais beaucoup plus des filaments. Cela confirme encore les résultats obtenus par l'analyse à l'échelle mésoscopique des flocs, qui montre la compétition entre les bactéries filamenteuses du milieu liquide et les bactéries zoogléales et filamenteuses qui se trouvent à l'intérieur des flocs.

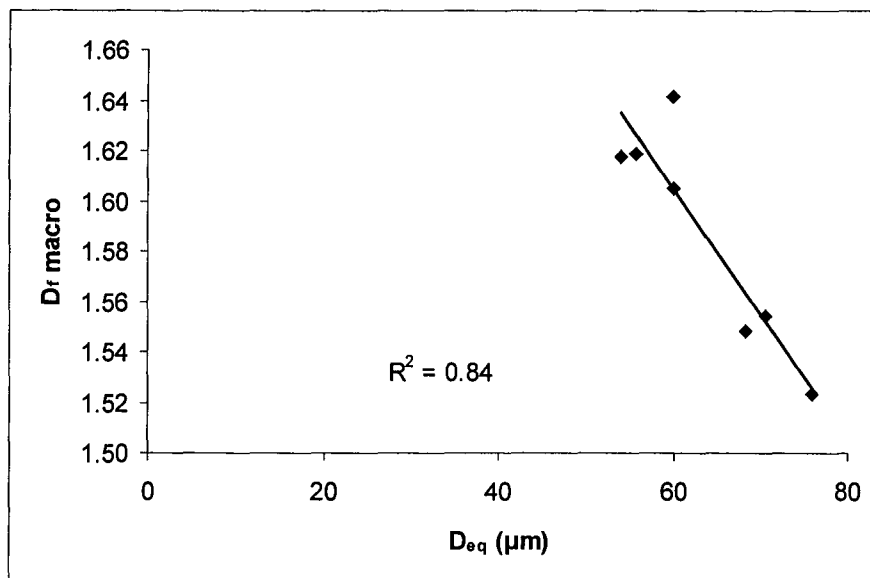


Figure 3.2.7 - Corrélation entre le diamètre équivalent (D_{eq}) et la dimension fractale (D_f) macroscopique des flocs.

Comme pour l'analyse en échelle mésoscopique on a observé une forte corrélation entre le diamètre équivalent des flocs et leur dimension fractale (Figure 3.2.7).

La structure macroscopique des flocs est plus irrégulière que la structure mésoscopique. En moyenne les valeurs de la dimension fractale macroscopique sont 20% supérieures à celles de la dimension fractale mésoscopique.

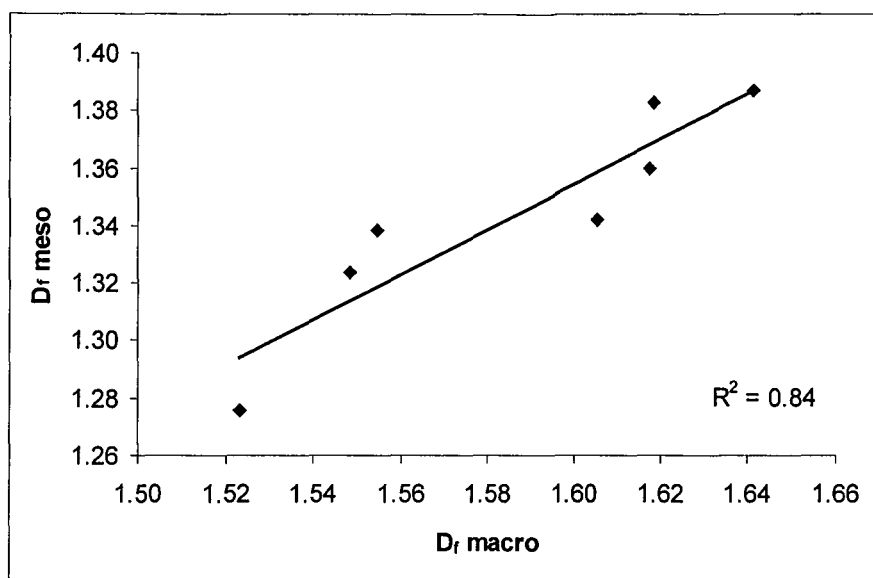


Figure 3.2.8 - Corrélation entre la dimension fractale (D_f) observée aux échelles macroscopique et mésoscopique.

En conclusion, on a constaté que dans les stations étudiées plus de 80% avaient des problèmes de dysfonctionnement liés à la décantabilité et dus à la présence excessive de bactéries filamenteuses. Ceci montre l'importance du développement et de la mise au point d'un outil qui puisse automatiquement quantifier la présence des bactéries filamenteuses. L'analyse des différentes stations nous a permis aussi de vérifier l'influence de la taille des floccs, à travers de son diamètre équivalent, sur l'Indice de Mohlman et la dimension fractale des floccs.

Les premiers résultats obtenus sur différentes stations nous montrent aussi que le suivi du pourcentage en matières volatiles, du diamètre équivalent des floccs et du nombre de filaments peut être un bon indicateur de la formation de "floccs sains", du point de vue de leur aptitude à décanter. Ces floccs sont caractérisées par un bon équilibre entre les bactéries zoogléesales et les bactéries filamenteuses.

3.3. Effet du Volume du Décanteur

Cette expérience a eu pour but de voir si le volume du décanteur avait une influence sur le développement des bactéries filamenteuses ainsi que de valider la procédure à des Indices de Mohlman plus élevés. Travailler sur un dispositif pilote avec un substrat synthétique permet de maîtriser la charge et la composition de la pollution entrante dans l'installation.

Pour ce montage expérimental on a utilisé le réacteur parfaitement agité de 35 litres et le décanteur avec un volume de 12 litres pour la première expérience et de 9 litres pour la deuxième. Le débit d'alimentation du substrat synthétique a été de 1,5 L/h pour une concentration en DCO variant de 100 mg/L O₂ à 400 mg/L O₂ pendant la phase d'adaptation. Ensuite cette concentration a été maintenue à 400 mg/L jusqu'au 15^{ème} jour pour l'expérience 2 (*Exp2*) et au 38^{ème} jour pour l'expérience 1 (*Exp1*). On a alors arrêté l'alimentation en substrat (pendant 2 jours pour l'expérience 1 et 1 jour pour l'expérience 2) pour ensuite la redémarrer à une concentration en DCO de 100 mg/L O₂ jusqu'à la fin des expériences.

L'expérience avec le décanteur de 12 litres (*Exp1*) a été réalisée du 09/10/99 au 30/11/99 et celle avec le décanteur de 9 litres (*Exp2*) du 08/02/00 au 13/03/00. Les températures ambiantes extérieures pendant les deux expériences ainsi que celles de l'air extérieur pendant la semaine où on a prélevé l'inoculum étaient très proches (différence moyenne inférieure à 2°C).

La Figure 3.3.1 présente l'évolution des matières en suspensions (*MES*) et le pourcentage des matières volatiles (*MV*) pendant les deux expériences. La matière en suspension décroît initialement fortement du fait de l'adaptation des bactéries à leur nouveau milieu. Durant cette période on observe une défloculation. La perte de biomasse a été moins importante pour l'expérience 1 que pour l'expérience 2.

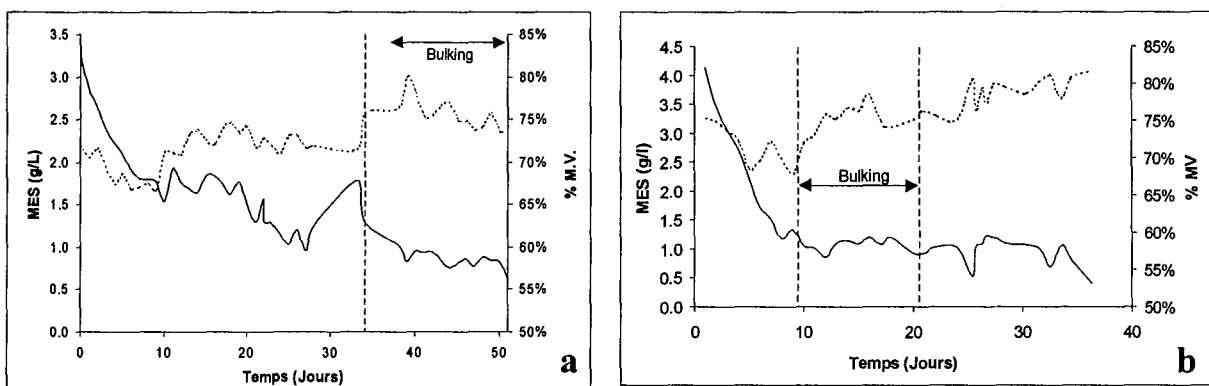


Figure 3.3.1 - Evolution de la matière en suspension (*MES*) (—) et du pourcentage de matières volatiles (*MV*) (--) pour l'expérience 1 (a) et l'expérience 2 (b)

Les pics de turbidité du surnageant (Figure 3.3.2) indiquent les phénomènes de défloculation. On peut observer que pendant les périodes de défloculation le diamètre équivalent des floes (D_{eq}) diminue. Le bulking filamenteux se développe à la suite des périodes de défloculation, quand les bactéries filamenteuses sont plus exposées au milieu nutritionnel. Cela s'est produit dès la première défloculation pour *Exp2* mais seulement après la seconde pour *Exp1*. Pour *Exp2* on observe une augmentation du pourcentage de matières volatiles au début du phénomène de bulking. Cela peut expliquer l'augmentation du diamètre équivalent mésoscopique des floes ($D_{eq\ meso}$) pendant ce phénomène, contrairement aux observations

réalisées sur les stations. La turbidité élevée pendant les périodes de défloculation est causée par les petits fragments de floccs qui ne décantent pas, comme dans le cas d'un flocc dit en "tête d'épingle".

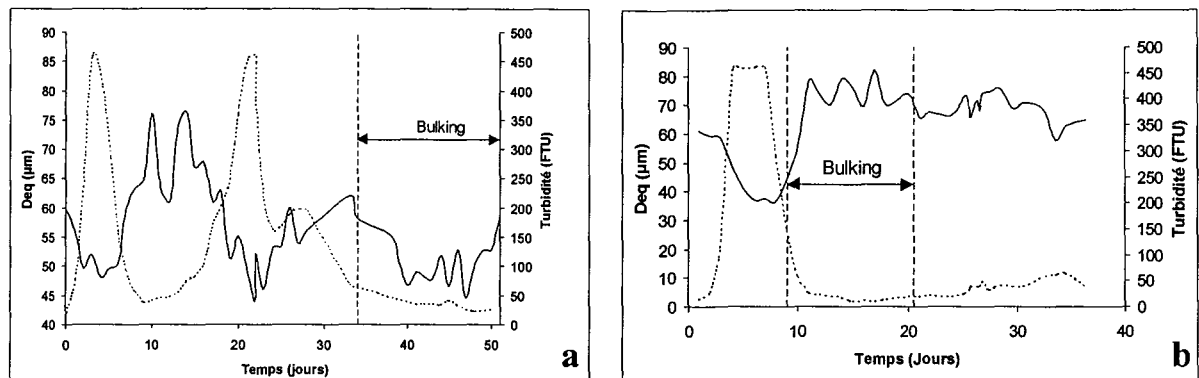


Figure 3.3.2 - Variation du diamètre équivalent mésoscopique des floccs (D_{eq}) (—) et de la turbidité FTU (--) pour l'expérience 1 (a) et l'expérience 2 (b) en fonction du temps.

A partir du 33^{ème} jour l'Indice de Mohlman a commencé à augmenter pour l'expérience 1 (Figure 3.3.3) ainsi que le pourcentage de matières volatiles (%MV), indiquant le développement du bulking filamenteux. A partir de ce moment la turbidité du surnageant a baissé car les réseaux de bactéries filamenteuses fonctionnent comme un filtre qui emprisonne les particules isolées. Ces mêmes réseaux filamenteux vont faire chuter la vitesse de décantation jusqu'à des valeurs proches de zéro.

Les pics de vitesse pour *Exp1* aux 3^{ème} et 21^{ème} jours et pour *Exp2* au 7^{ème} jour sont dus à la réduction de la taille des floccs pendant la période de défloculation tandis que ceux observés le 10^{ème} jour pour *Exp1* et au 26^{ème} pour *Exp2* sont dus à des réductions de la concentration en matières en suspension.

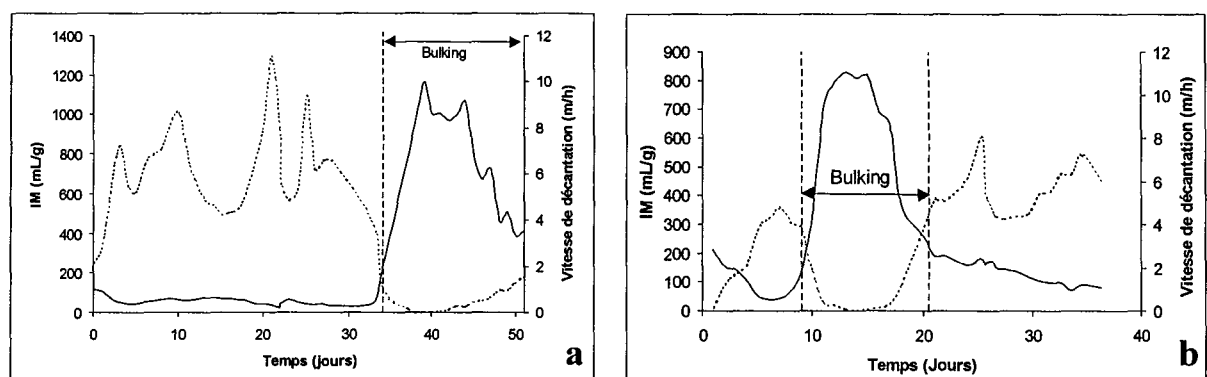


Figure 3.3.3 – Variation de l'Indice de Mohlman (IM) (—) et de la vitesse de décantation dans la zone de chute libre (--) pour l'expérience 1 (a) et l'expérience 2 (b) en fonction du temps

Comme pour le suivi de la station d'épuration de Nancy-Maxéville (Chapitre 3.1), les courbes de l'Indice de Mohlman (IM) et de la longueur totale des filaments (Figure 3.3.4) ont à peu près la même allure. Si on observe la période de bulking de *Exp1*, on voit, après le pic maximal, apparaître une légère différence entre les courbes. Cette différence pourrait être causée par le changement de propriétés du milieu liquide (dû à l'arrêt de l'alimentation) ou des variations du diamètre équivalent des floccs. L'analyse des courbes de l'Indice de Mohlman des

deux expériences démontre qu'avec un volume de décanteur moins important le bulking s'est installé beaucoup plus vite. Par contre il est moins intense (valeur de l'Indice de Mohlman maximal plus faible).

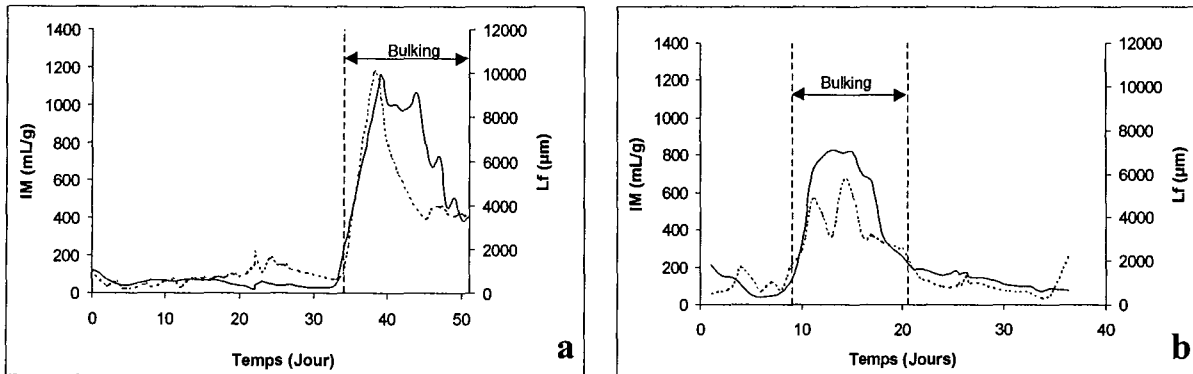


Figure 3.3.4 – Variation de l'Indice de Mohlman (IM) (—) et de la longueur totale des filaments par image (L_f) (---) pour l'expérience 1 (a) et l'expérience 2 (b) en fonction du temps

Les corrélations entre la longueur totale des filaments par image (L_f) et l'Indice de Mohlman (IM) sont présentées sur la Figure 3.3.5. On observe une grande dispersion des points, surtout pour *Exp1* : cela est dû à une variation plus importante du diamètre équivalent mésoscopique des floccs. Au-dessous d'un Indice de Mohlman de 200 mL/g, on a un nuage de points (zone marquée par un cercle) qui correspond à celle que l'on trouve dans la littérature (Jenkins et al., 1993). Au-dessus de cette zone se situe le bulking filamenteux. Même si la corrélation entre l'Indice de Mohlman (IM) et la longueur totale des filaments par image (L_f) n'est pas parfaite, celle-ci nous donne déjà une information sur le développement excessif des bactéries que l'on doit combattre. Ce qui est intéressant n'est pas de connaître la quantité exacte de bactéries filamenteuses mais à partir de quand elle commence à affecter la décantation et de suivre son évolution. On pourrait aussi se servir de cette procédure pour vérifier l'effet d'un agent oxydant utilisé pour contrôler le bulking.

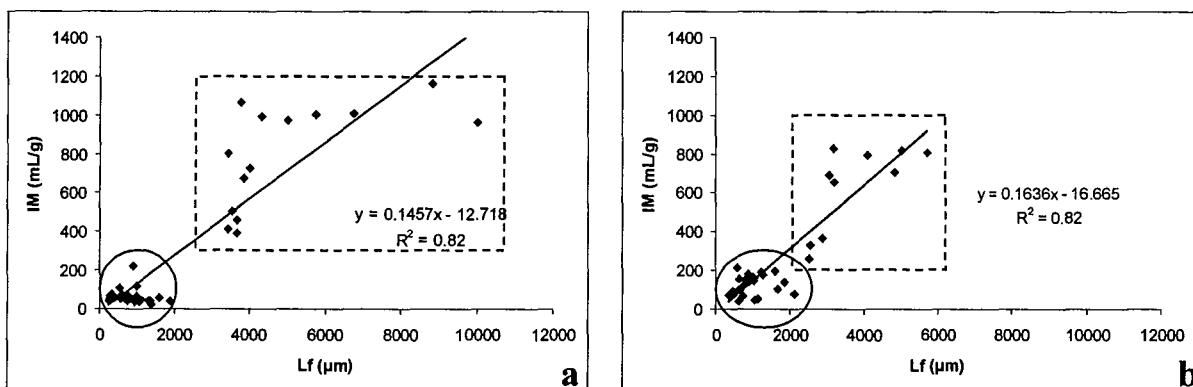


Figure 3.3.5 - Corrélations entre la longueur totale des filaments par image (L_f) et l'Indice de Mohlman (IM) pour l'expérience 1 (a) et l'expérience 2 (b).

La dimension fractale (D_f) révèle la rugosité des floccs de boues activées. La Figure 3.5.6 montre que la dimension fractale mésoscopique (D_f méso) a augmenté pendant la défloculation (sauf pour la première défloculation de l'expérience 1) et le bulking. On peut ainsi dire qu'elle est directement proportionnelle à la longueur totale des filaments par image (L_f) et inversement proportionnelle au diamètre équivalent mésoscopique (Deq meso).

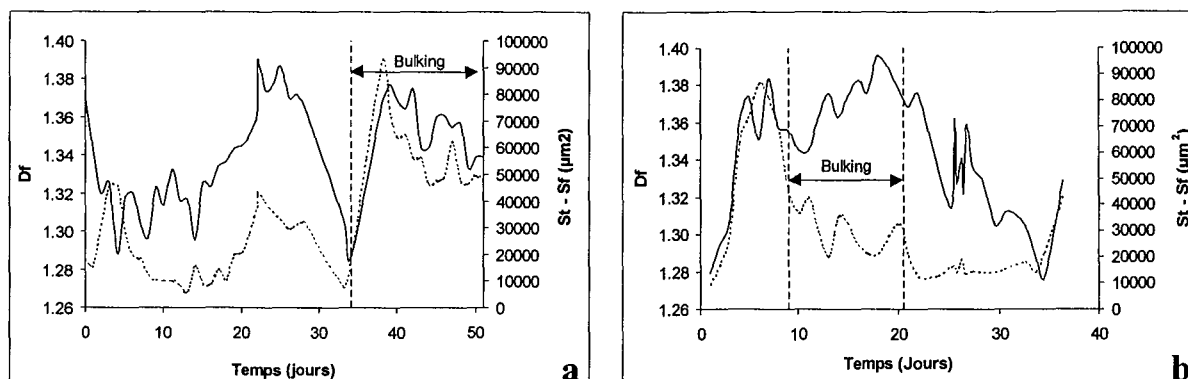


Figure 3.3.6 - Variation de la dimension fractale mésoscopique (D_f) (—) et de la différence entre la surface totale et la surface totale des floes ($S_t - S_f$) (- -) pour l'expérience 1 (a) et l'expérience 2 (b)

La différence entre la surface totale (S_t) et la surface des floes (S_f) nous fournit une surface (ΔS) qui correspond à la surface de petits débris éliminés pendant le traitement de l'image additionnée à la surface des filaments. Sur la Figure 3.3.6a on observe deux pics (3^{ème} et 22^{ème} jour) qui correspondent aux périodes de défloculation, quand des petites particules se détachent des floes et augmentent la turbidité. Sur cette même Figure au 38^{ème} jour on voit un pic plus important causé par la forte concentration de bactéries filamenteuses.

Sur la Figure 3.3.6b (*Exp2*) le pic dû à la défloculation (7^{ème} jour) est plus important que celui de *Exp1*. Cela est parfaitement d'accord avec les intensités des défloculations des expériences. Par contre pour le bulking on ne voit pas la formation d'un pic mais plutôt d'un ensemble qui forme une espèce de plateau qui décroît après le bulking. Les deux premiers pics de ce plateau correspondent aux pics des valeurs maximales de la longueur totale des filaments.

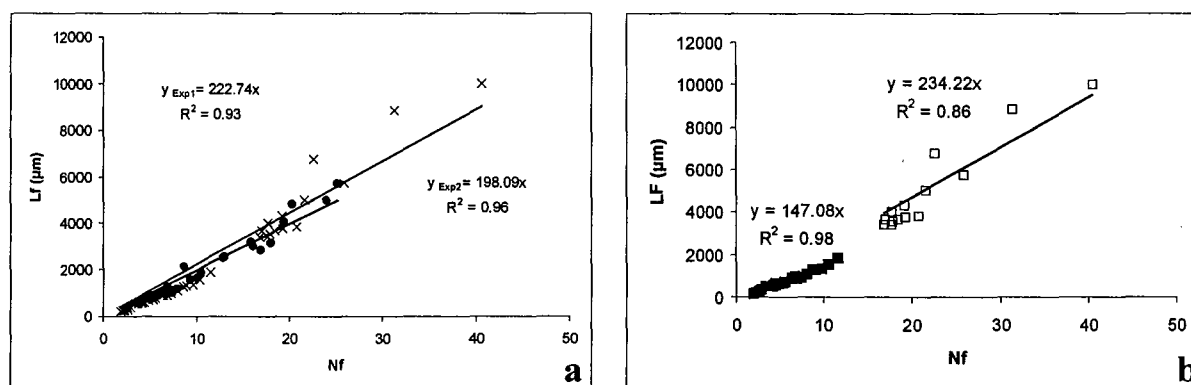


Figure 3.3.7 - Corrélation entre la longueur totale (L_f) et le nombre (N_f) des filaments par image pour l'expérience 1 (x) et l'expérience 2 (•) (a) et pour les deux parties (avant (■) et pendant le bulking (□)) de l'expérience 1 (b).

Si on calcule la longueur moyenne des bactéries filamenteuses en divisant la longueur totale des filaments par image (L_f) par le nombre total de filaments par image (N_f) on vérifie que les filaments ont presque la même taille. La Figure 3.3.7a présente la corrélation entre la longueur total (L_f) et le nombre (N_f) des filaments par image. A partir de la pente de la régression linéaire de cette corrélation on obtient la moyenne des longueurs moyennes des filaments par images. On peut vérifier que la différence est faible, de l'ordre de 10%. Si on regarde plus en détail cette corrélation pour l'expérience 1 (Figure 3.3.7b), on observe que la longueur moyenne pendant la période de bulking augmente. Les différences sont plus importantes (60%) indiquant une forte croissance des bactéries.

En plus des analyses de taille par microscopie et analyse d'image, on a réalisé des analyses de taille avec un granulomètre laser. Les échantillons prélevés chaque jour ont été mis dans la petite cellule d'échantillonnage à l'aide d'une pipette jusqu'à une obscurité d'environ 17% (plage d'obscurité idéale entre 10 et 30 %). Il s'agit d'une analyse globale qui ne distingue pas les floccs des bactéries filamenteuses ni des débris mais qui est souvent citée dans la littérature. La Figure 3.3.8a présente l'évolution du diamètre massique moyen ($D(v,0.5)$). Ce diamètre ainsi que le diamètre moyen ($D[4,3]$) sont calculés par rapport au volume des particules. On observe que les pics de turbidité correspondent à des valeurs minimales du diamètre massique moyen. Cela indique qu'on a beaucoup de petites particules qui augmentent la turbidité du surnageant. Si on compare les évolutions du diamètre équivalent (Deq), obtenu par analyse d'image et du diamètre massique moyen on constate que hors de la zone de bulking, ils sont similaires. Mais lors de l'installation du bulking le diamètre équivalent mésoscopique des floccs diminue tandis que le diamètre massique moyen augmente. Cela est dû à la présence des bactéries filamenteuses.

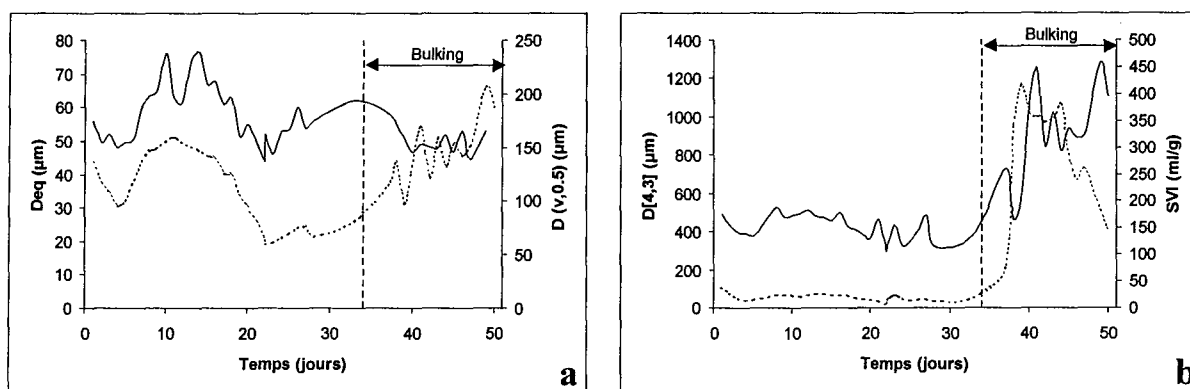


Figure 3.3.8 - Evolution du diamètre équivalent mésoscopique des floccs (Deq) (—) et le diamètre moyen massique ($D(v,0.5)$) (---) (a) et du diamètre moyen ($D[4,3]$) (—) et de l'Indice de Mohlman (IM) (---) (b) en fonction du temps

L'utilisation du diamètre moyen ($D[4,3]$) semble être la plus indiquée pour obtenir des informations par rapport à la décantabilité. Le comportement de l'Indice de Mohlman ressemble à celui du $D[4,3]$ (Figure 3.3.8b). La différence entre les deux courbes, au début du bulking, semble montrer que les filaments sont d'abord isolés dans le milieu liquide et seulement après commencent à former un volume unique, en se liant aux floccs.

Sur la Figure 3.3.9 on présente la variation du résiduel (cf chapitre 2.3.6), qui indique dans quelle mesure les paramètres de l'analyse ont été bien adaptés à la mesure (configuration de l'appareil). Un résiduel inférieur à 1% indique une bonne qualité de mesure. Sur la figure on observe que cette valeur dépasse cette limite à la fin du phénomène de bulking filamenteux.

La largeur de distribution (L_D) (Figure 3.3.9) mesure la largeur de la distribution des diamètres dans l'histogramme. On observe que quand le diamètre moyen augmente, on a une augmentation de la largeur de distribution. Cela indique la formation des gros floccs mais il reste encore des petits floccs isolés. Au début du bulking de gros agglomérats de floccs commencent à se former. Après le 40^{ème} jour les valeurs de la largeur de distribution commence à descendre, indiquant que les petits floccs commencent à s'agglomérer à cause de la présence du réseau filamenteux et des agglomérats de floccs.

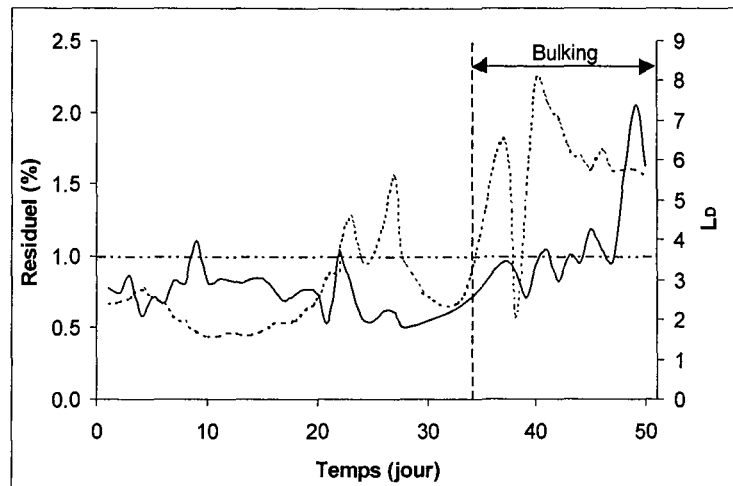


Figure 3.3.9 - Evolution du résiduel (—) et de la largeur de distribution (L_p) (--) en fonction du temps.

On a observé que les mesures par granulométrie laser sont peu adaptées à la caractérisation des floccs, notamment du point de vue de la présence des bactéries filamenteuses. Pour cela cette méthode d'analyse n'a plus été utilisée pendant les expériences subséquentes de cette étude.

Sur la Figure 3.3.10a on présente la corrélation obtenue entre le paramètre n du modèle exponentiel de décantation et l'Indice de Mohlman (IM) pour les deux expériences. Si on prend seulement en compte les points au-dessous de 200 mL/g on vérifie la très bonne corrélation avec des points très concentrés autour de la droite de régression. Cependant pour les valeurs plus élevées de l'Indice de Mohlman (longueur totale des filaments (L_f) au-dessus de 2000 μm) la corrélation est plus faible et on a une forte dispersion des points. Pour cette raison on estime que l'application de cette corrélation doit se faire hors du domaine du bulking filamenteux.

Les corrélations entre la fraction décantée (H_{30}/H_i) et la vitesse de décantation dans la zone de chute libre (Figure 3.3.10b) sont les mêmes pour les deux expériences. Ceci valide les résultats obtenus lors du suivi de la station de Nancy (chapitre 3.1) pour des fractions H_{30}/H_i supérieures à 0.6.

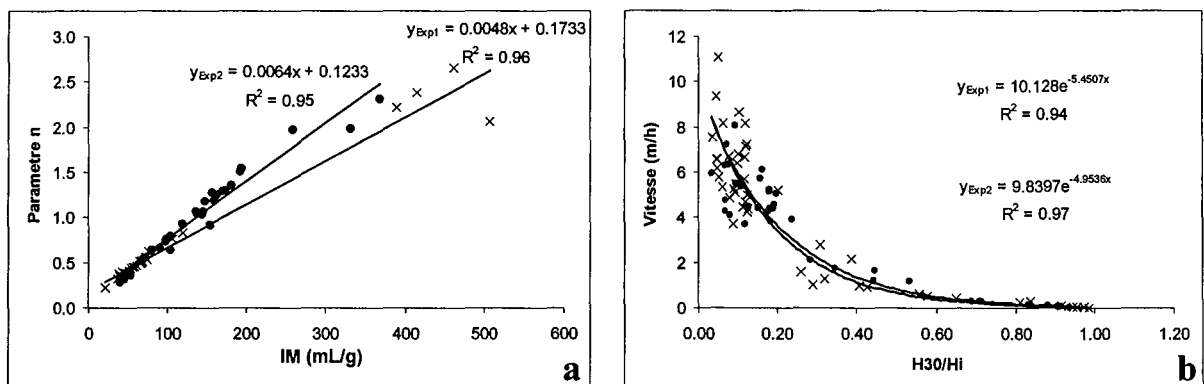


Figure 3.3.10 - Corrélation entre le paramètre n du modèle exponentiel et l'Indice de Mohlman (IM) (a) et entre la vitesse de décantation dans la zone de chute libre et la fraction décantée après 30 minutes (H_{30}/H_i) pour l'expérience 1 (x) et l'expérience 2 (•).

Avec des conditions de charge et de composition de substrat constantes, on a obtenu une corrélation entre l'Indice de Mohlman et la vitesse de décantation avec un coefficient de corrélation de 0.83 pour l'expérience 1 et de 0.65 pour l'expérience 2 (Figure 3.3.11a). Si on analyse séparément les points hors bulking et les points dans la zone de bulking, on observe que pour les premiers la corrélation n'est pas bonne (Figure 3.3.11b).

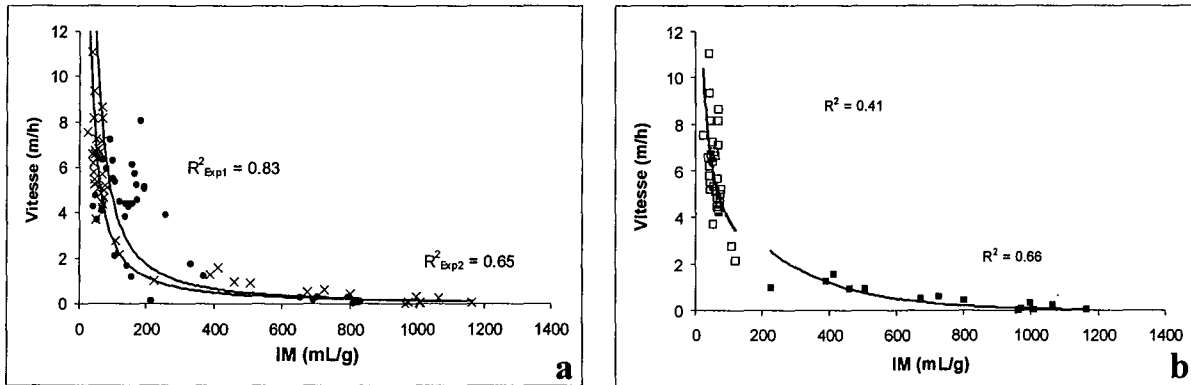


Figure 3.3.11 - Corrélation entre la vitesse de décantation et l'Indice de Mohlman (IM) pour l'expérience 1 (x) et l'expérience 2 (•) (a) et pour les deux parties (avant (□) et pendant le bulking (■)) de l'expérience 1 (b).

En résumé ces deux expériences nous ont montré que l'utilisation d'un volume plus important pour le décanteur défavorise l'implantation du bulking filamenteux, et qu'elle minimise l'intensité des problèmes de défloculation. Par contre le diamètre équivalent des floccs présente une variation plus importante. On a observé que cette variation de volume du décanteur n'a pas affecté la longueur moyenne des filaments par image ni la dimension fractale des floccs.

On a aussi pu constater que la longueur totale des filaments peut indiquer le développement du phénomène de bulking filamenteux. La différence entre la surface totale de l'image et la surface totale des floccs peut nous indiquer ce même phénomène ainsi que celui de défloculation.

Enfin, on a vu que l'utilisation de l'analyse par diffraction laser est peu, voire pas, adaptée à l'étude des floccs bactériens, principalement en cas de bulking filamenteux.

3.4. Influence de la Température de l'Inoculum

De nombreuses références bibliographiques font état de variations dans la prédominance des espèces de bactéries filamenteuses en fonction de la saison. Il y apparaît que le bulking se produit plus fréquemment pendant les périodes froides. Pour cette raison deux expériences ont été réalisées sur le réacteur pilote de type RPA (réacteur parfaitement agité) connecté à un décanteur de 9 litres, avec des inoculum prélevés à deux époques différentes de l'année. A part la température, toutes les conditions opératoires ont été les mêmes pour les deux expériences (protocole standard décrit dans Matériel et Méthodes). Chacune des expériences a duré environ un mois.

La Figure 3.4.1 rappelle les variations de la température (a) et des précipitations (b) pendant l'année 2000 pour la communauté urbaine du Grand Nancy. Le Tableau 3.4.1 présente les périodes et températures pour les deux expériences.

Tableau 3.4.1 - Périodes de réalisation et températures des expériences.

Expérience	Période	Température ambiante externe moyenne	Température au laboratoire (jour)
<i>Exp2</i>	08/02/00 à 13/03/00	6.7 °C	18 °C
<i>Exp3</i>	24/07/00 à 21/08/00	19.7 °C	27 °C

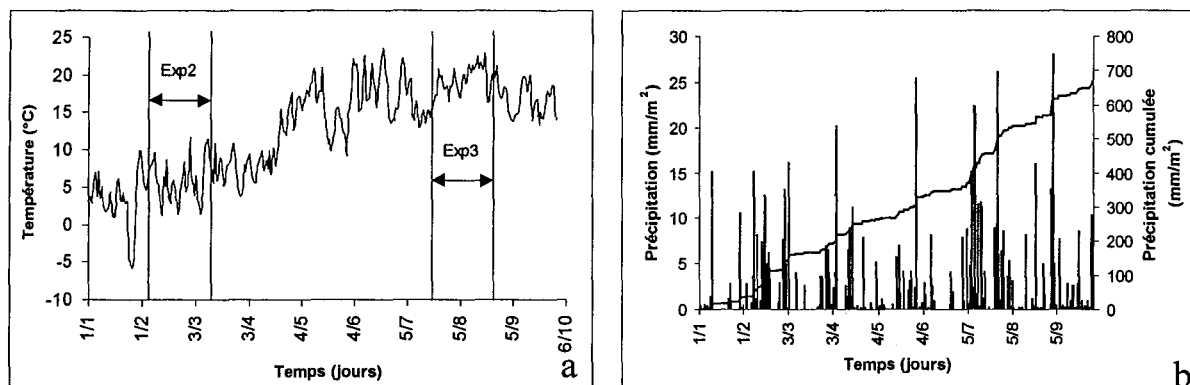


Figure 3.4.1 - Variation de la température de l'air (a) et de la pluviométrie (b) pendant l'année 2000 (Communauté Urbaine du Grand Nancy).

Peu après le début de l'expérience 2 (*Exp2*), la matière en suspension a fortement diminué suite à un lessivage occasionné par une forte défloculation pendant la période d'adaptation. On peut aussi observer sur la Figure 3.4.2 une chute de la matière volatile, qui correspond à une minéralisation de la boue. Pour l'expérience 3 (*Exp3*) la perte de matière en suspension a été moins importante. Ceci s'explique par une plus faible défloculation.

Les défloculations peuvent être visualisées par l'intermédiaire de l'augmentation de la turbidité du surnageant et une diminution des diamètres équivalents des floes (Figure 3.4.3). Après la défloculation, le bulking filamenteux a commencé à se développer pour l'expérience 2 (9^{ème} jour) et après la deuxième défloculation pour l'expérience 3 (21^{ème} jour). On peut observer pour les deux cas une augmentation de la proportion de matières volatiles, laquelle était plus élevée pour l'expérience 2 que pour l'expérience 3.

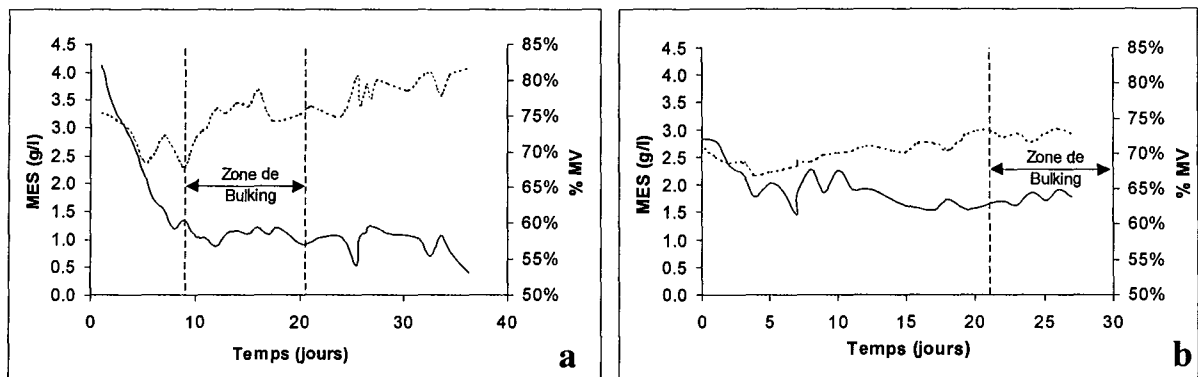


Figure 3.4.2 - Variation de la concentration du réacteur en matières en suspension (*MES*) (—) et en pourcentage de matières volatiles (*MV*) (---) pour l'expérience 2 (a) et l'expérience 3 (b) en fonction du temps.

Le diamètre équivalent mésoscopique des floccs pendant la période de bulking pour l'expérience 2 a été de 24 % supérieur à celui de l'expérience 3 (69.82 μm et 56.40 μm). Cela peut s'expliquer par la plus forte concentration en matière volatile. La deuxième défloculation de l'expérience 3 a été plus lente, provoquant ainsi une lente diminution de la valeur du diamètre équivalent.

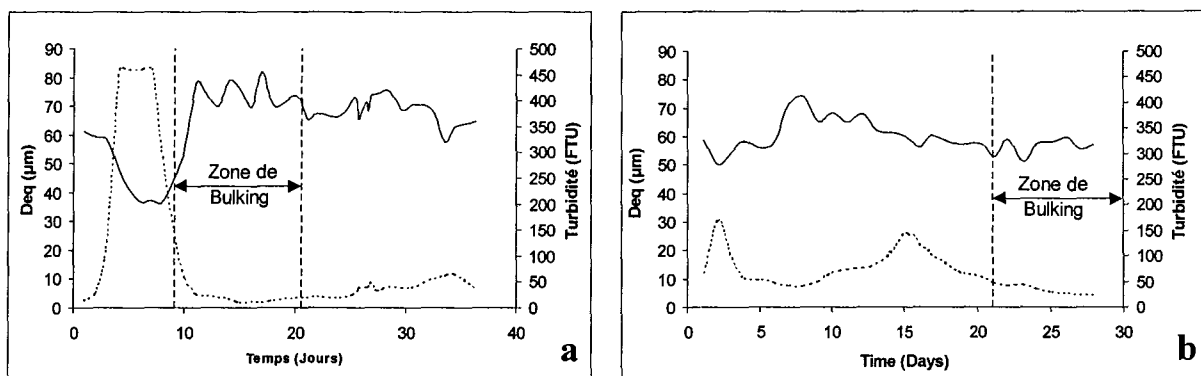


Figure 3.4.3 - Variation du diamètre équivalent mésoscopique des floccs (D_{eq}) (—) et de la turbidité en FTU (---) pour l'expérience 2 (a) et l'expérience 3 (b) en fonction du temps.

Pendant la défloculation, la vitesse de chute libre a augmenté (Figure 3.4.4). Cela peut être dû à la diminution de la taille des floccs qui permet un passage plus facile du liquide surnageant entre eux. Ensuite on a observé une diminution de la vitesse de décantation due au développement des bactéries filamenteuses, qui relient les floccs, empêchant le passage du flux d'eau ascendant et arrivant même à former une masse compacte.

Pour contrecarrer le bulking de l'expérience 2, on a arrêté l'alimentation pendant une journée (au 15^{ème} jour) pour ensuite réalimenter mais à 100 mg O_2/L en DCO. Cette opération a permis de baisser la quantité de bactéries filamenteuses et d'augmenter la vitesse de décantation.

La croissance excessive des bactéries filamenteuses sur l'expérience 3 s'est passée d'une façon moins dramatique. Sur l'expérience 2 en deux jours l'Indice de Mohlman a augmenté d'un facteur 5 et a atteint des valeurs proches de 1000 mL/g. Cependant, pour l'expérience 3, sur un intervalle de temps semblable, l'Indice de Mohlman a doublé et n'a pas dépassé la valeur de 500 mL/g.

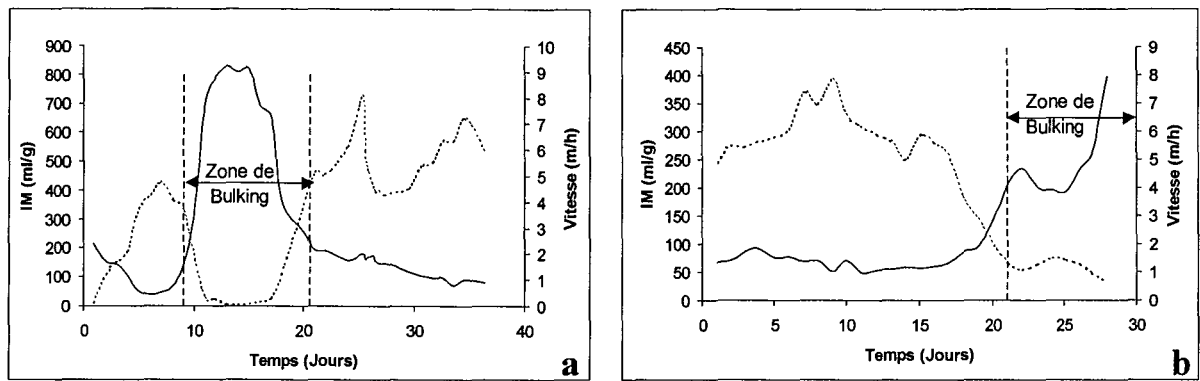


Figure 3.4.4 - Variation de l'Indice de Mohlman (IM) (—) et de la vitesse de décantation dans la zone de chute libre (--) pour l'expérience 2 (a) et l'expérience 3 (b) en fonction du temps.

La dimension fractale mésoscopique (D_f) a varié de façon beaucoup plus importante sur l'expérience 2. Cela démontre l'existence de forts changements sur la structure des floccs bactériens.

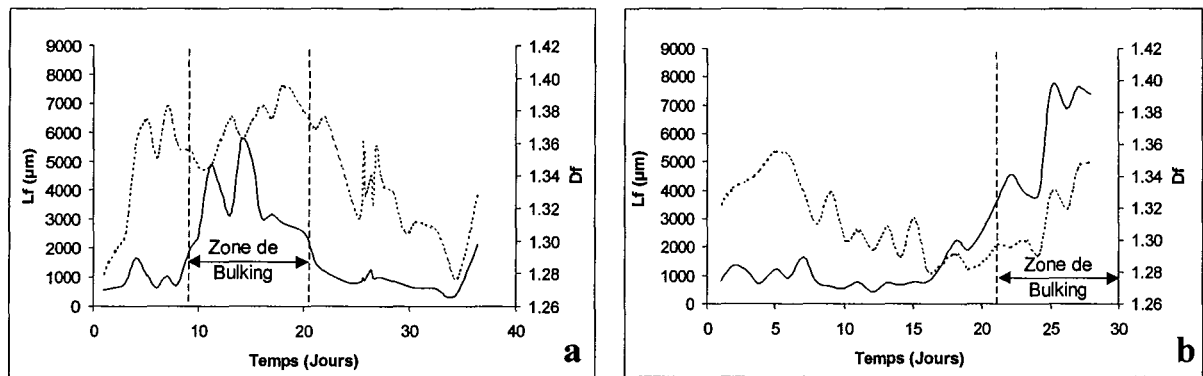


Figure 3.4.5 - Variation de la longueur totale de filaments par image (L_f) (—) et de la dimension fractale mésoscopique (D_f) (--) pour l'expérience 2 (a) et l'expérience 3 (b) en fonction du temps.

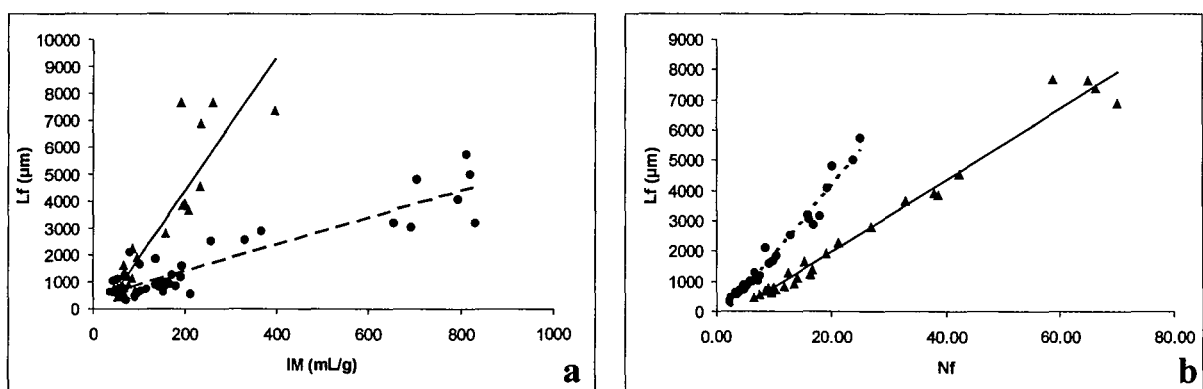


Figure 3.4.6 - Corrélation entre la longueur totale des filaments par image (L_f) et l'Indice de Mohlman (IM) (a) et entre la longueur totale (L_f) et le nombre des filaments par image (N_f) (b) pour l'expérience 2 (●) et l'expérience 3 (▲).

On a obtenu des corrélations linéaires entre la longueur totale des filaments par image (L_f) et l'Indice de Mohlman (IM) pour les deux expériences, avec des coefficients de corrélation (R^2)

supérieurs à 0.82. On voit sur la Figure 3.4.6 que les pentes de ces corrélations sont différentes. En effet, lors de l'expérimentation 2 on a observé la présence de filaments plus longs. On peut vérifier ceci sur la Figure 3.4.6b, qui montre les rapports entre la longueur des filaments et leur nombre. Cela explique aussi la croissance rapide de l'Indice de Mohlman dans l'expérience 2.

Des corrélations entre la longueur totale des filaments par image et la vitesse de chute libre sont présentées sur la Figure 3.4.7. Pour l'expérience 2, le coefficient de corrélation est faible; ceci est dû à une variation importante du diamètre équivalent. L'écart type du diamètre équivalent mésoscopique des floccs (D_{eq}) pour l'expérience 2 est de 12.9 μm , tandis que pour l'expérience 3 il est de seulement de 5.7 μm . Cela confirme la dépendance de la vitesse non seulement envers la quantité des filaments mais aussi envers le diamètre équivalent des floccs.

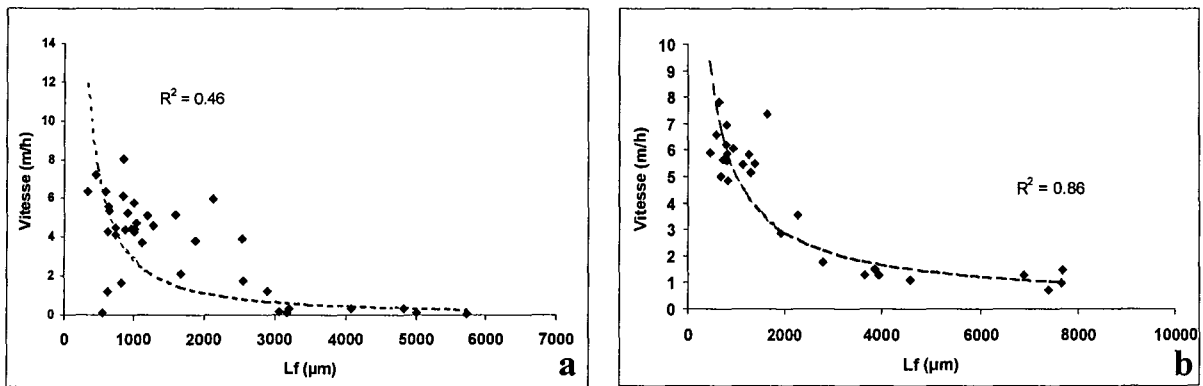


Figure 3.4.7 - Corrélation entre la vitesse de décantation dans la zone de chute libre et la longueur totale des filaments par image pour les deux expériences.

En prenant en compte les résultats de l'expérience 3, on a essayé de quantifier le rapport entre la vitesse de décantation et le diamètre équivalent des floccs (observation à l'échelle mésoscopique). Les relations obtenues présentent un faible coefficient de corrélation ($R^2 = 0.50$), même si on enlève les deux points (x) qui correspondent à la période de défloculation initiale ($R^2 = 0.57$) (Figure 3.4.8a).

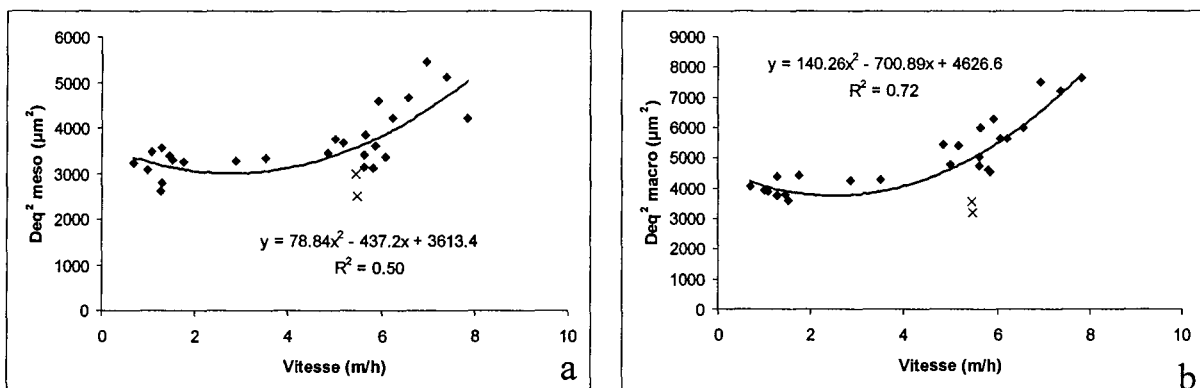


Figure 3.4.8 - Corrélations de la vitesse de chute libre avec le diamètre équivalent mésoscopique des floccs (D_{eq} méso) (a) et avec le diamètre équivalent macroscopique (D_{eq} macro) (b).

Si on utilise les résultats obtenus par observation à l'échelle macroscopique, pour la même expérience (expérience 3), on obtient des corrélations entre la vitesse et le diamètre équivalent qui sont beaucoup plus intéressantes ($R^2 = 0.72$). En supprimant les points correspondant à la

défloculation on obtient même une corrélation avec un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 84% (Figure 3.4.8b).

La taille moyenne, qui est le moment d'ordre zéro de l'histogramme de la distribution de taille par ouverture hexagonale, est liée à l'Indice de Mohlman, sauf dans le cas du bulking où elle est totalement décorrélée (Figure 3.4.9). On peut expliquer ceci par la présence de bactéries filamenteuses qui relient les floccs, augmentant ainsi la résistance au flux liquide. Il faut rappeler que les images acquises à ce grossissement ne prennent pas en compte les filaments.

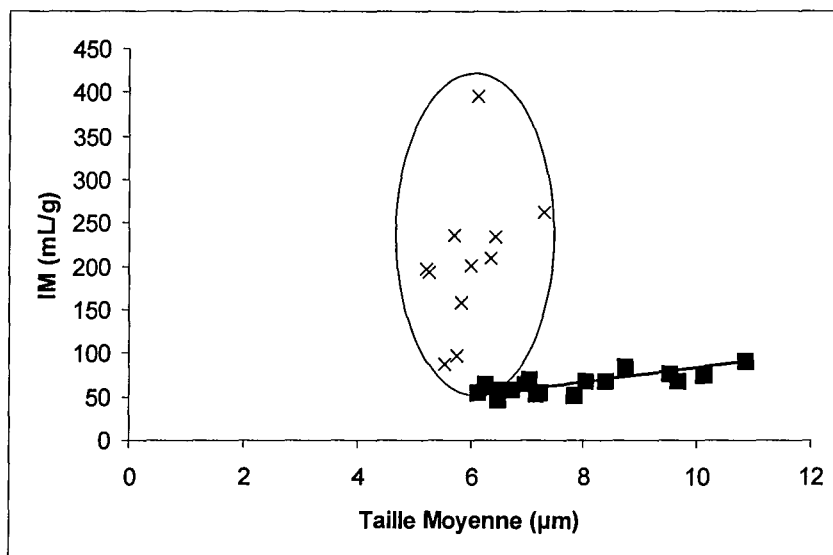


Figure 3.4.9 - Corrélation entre la taille moyenne et l'Indice de Mohlman (IM) pour l'expérience 2.

Des régressions linéaires multiparamétriques du type ($IM = \alpha L_f + \beta D_{eq}$) permettant de relier l'Indice de Mohlman à la longueur totale des filaments et au diamètre équivalent ont été testées (Tableau 3.4.1). On observe que dans l'expérience 2 l'utilisation du diamètre améliore de 2.5% le coefficient de corrélation (R^2) tandis que dans l'expérience 3 il le dégrade légèrement.

Tableau 3.4.1 - Résultats, pour chaque expérience, de l'analyse linéaire multiparamétrique du diamètre équivalent mésoscopique des floccs (D_{eq} méso) et de la longueur totale des filaments par image (L_f) par rapport à l'Indice de Mohlman (IM).

Expérience 2				Expérience 3			
Variables	D_{eq} méso	L_f	R^2 ajusté	variables	D_{eq} méso	L_f	R^2 ajusté
1		X	0.815	1		X	0.821
2	X	X	0.836	2	X	X	0.819

Nous avons alors regroupé les résultats des deux expériences et considéré des régressions multiparamétrique plus complexes, du type:

$$IM = \alpha L_f + \beta N_f + \delta D_{eq} + \gamma D_f$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3.4.2. On peut constater qu'il était nécessaire d'utiliser le nombre de filaments en plus de la longueur des filaments pour obtenir une valeur satisfaisante du coefficient de corrélation. L'apport sur la valeur du coefficient de

corrélation du diamètre équivalent est de l'ordre de 5% tandis que celui de la dimension fractale peut être ignoré dans nos expériences.

Tableau 3.4.2- Analyse linéaire multiparamétrique pour les deux expériences ensemble de la dimension fractale mésoscopique des floes (D_f méso), du diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq} méso), du nombre (N_f) et longueur totale (L_f) des filaments par image par rapport à l'Indice de Mohlman (IM).

variables	D_f méso	D_{eq} méso (μm)	N_f	L_f (μm)	R^2 ajusté
1				X	0.33
2			X	X	0.72
3		X	X	X	0.75
4	X	X	X	X	0.75

Un travail similaire a été réalisé avec la vitesse de chute libre

$$v = \alpha L_f + \beta N_f + \delta D_{eq} + \gamma D_f$$

Le facteur le plus important reste la longueur des filaments (L_f). La contribution sur le coefficient de corrélation du nombre de filaments est de 11% et celle du diamètre équivalent est de 4%. Le coefficient de corrélation reste faible.

Tableau 3.4.3- Analyse linéaire multiparamétrique pour les deux expériences ensemble de la dimension fractale mésoscopique des floes (D_f méso), du diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq} méso), du nombre (N_f) et longueur totale (L_f) des filaments par image par rapport à la vitesse de décantation

Variabes	D_f méso	D_{eq} méso (μm)	N_f	L_f (μm)	R^2 ajusté
1				X	0.50
2			X	X	0.55
3		X	X	X	0.57
4	X	X	X	X	0.58

Si on prend en compte seulement l'expérience 3, on observe que cette corrélation est beaucoup plus importante. Il faut se rappeler que le nombre des filaments et la longueur pour chaque expérience sont très corrélés (Figure 3.4.6). Ceci implique donc une corrélation entre la vitesse et la longueur des filaments. L'apport d'un deuxième paramètre permet une corrélation de 83% (Tableau 3.4.4). L'inclusion du diamètre équivalent apporte une augmentation de 10% sur la valeur de la corrélation, arrivant ainsi à plus de 91% de corrélation. La dimension fractale dépend fortement de la longueur des filaments (cf. Figure 3.2.2a). Son influence sur le coefficient de corrélation (R^2) est donc très importante si on ne prend pas en compte cette longueur dans le modèle.

Tableau 3.4.4- Analyse linéaire multiparamétrique pour la deuxième expérience de la dimension fractale mésoscopique des floes (D_f méso), du diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq} méso), du nombre (N_f) et longueur totale (L_f) des filaments par image par rapport à la vitesse de décantation.

variables	D_f méso	D_{eq} méso (μm)	N_f	L_f (μm)	R^2 ajusté
1			X		0.72
2	X		X		0.83
3	X	X	X		0.92
4	X	X	X	X	0.91

Des tests ont été réalisés avec le diamètre mésoscopique au carré, corrélation suggérée par la Figure 3.4.8, et les résultats ont été semblables à ceux présentés ci-dessus. Par contre les résultats obtenus avec le diamètre macroscopique au carré sont moins intéressants (apport de 8 %) quand il s'agit d'une régression linéaire. Cependant on n'a recherché ici que des relations linéaires, alors qu'elles ne le sont pas forcément.

En résumé, l'outil d'analyse d'image développé dans ce travail, nous a permis d'obtenir des corrélations entre les paramètres de décantabilité des floccs bactériens et ceux obtenus par analyse d'image. Il a aussi été possible d'observer les phénomènes qui ont lieu dans les bassins d'aération et qui peuvent compromettre le fonctionnement du clarificateur ou même de toute la station. On a pu constater l'importance du diamètre équivalent des floccs sur l'Indice de Mohlman et l'effet de la température sur le développement des bactéries filamenteuses.

L'analyse multiparamétrique a montré que, si on prend chaque expérience séparément, le nombre et la longueur totale des filaments par image contribue à plus de 80% aux corrélations avec l'Indice de Mohlman. Par contre, si on met ensemble les deux expériences il ne représente plus que 33%. Cela est dû surtout à la variation de taille des filaments. On met en évidence ainsi l'importance du couple nombre de filament et longueur des filaments, lié à la nature des bactéries.

Pour les essais en réacteur pilote, le temps nécessaire pour l'installation du bulking est d'environ un à deux jours. En réalisant deux analyses par jour on pourrait réagir rapidement avant que la situation s'aggrave. La procédure développée dans ce travail prend en moyenne 20 minutes pour l'acquisition des images et 45 minutes pour le calcul (selon la puissance de l'ordinateur), ce qui rend réaliste le fait de réaliser deux analyses par jour et ce qui permet d'obtenir un résultat presque immédiat sur l'état des floccs bactériens (comparé aux temps de réponse des procédés dans les stations d'épuration).

3.5. Comparaison entre Réacteurs

La littérature suggère l'importance de la conception du bassin biologique notamment du caractère plus ou moins piston de son écoulement dans le développement du bulking filamenteux.

C'est pour cette raison que nous avons comparé le fonctionnement d'un réacteur parfaitement agité (*RPA*) avec celui d'un réacteur canal (*RC*), dont la conception est inspirée par celle des réacteurs biologiques de la station de Nancy-Maxéville. Sans prétendre que ce réacteur canal possède un écoulement piston, il ne peut plus être considéré comme un réacteur parfaitement agité unique.

Deux expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions d'alimentation sur du substrat synthétique puis les pilotes ont été alimentés avec de l'eau usée réelle.

3.5.1. Substrat synthétique

Les deux expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions d'aération, d'alimentation et de charge organique. Celle avec le réacteur parfaitement agité (*RPA*) a eu lieu entre le 24/07/00 et le 21/08/00 et celle avec le réacteur canal (*RC*) entre le 29/08/00 et le 13/10/00.

Les deux réacteurs de 35 litres ont étéensemencés avec des boues prises dans le canal de recirculation de la station de Nancy-Maxéville et diluées avec de l'eau décantée afin d'obtenir une concentration proche de 3 g/L de matière en suspension. Le décanteur utilisé a un volume de 9 litres. L'alimentation du substrat synthétique et la recirculation étaient maintenues à un débit constant de 1,5 L/h. La charge a été augmentée de 100 jusqu'à 400 mg O₂/L en DCO pendant la période d'adaptation qui a duré une semaine. Ensuite la concentration est restée à 400 mg O₂/L en DCO jusqu'à la fin des expériences. L'échantillonnage pour le réacteur canal a été réalisé à la sortie du réacteur et pour le réacteur parfaitement agité dans la partie inférieure par la vanne d'échantillonnage.

On peut observer à partir des Figures 3.5.1a et b, que la quantité de matières en suspension a eu un comportement plus uniforme, après la période d'adaptation, pour le réacteur canal. La chute de la concentration en matières en suspension observée au début des expériences est due à la défloculation liée à l'adaptation des bactéries à leur nouveau milieu.

Dans la Figure 3.5.1c, on observe l'abattement de la pollution estimé par la différence entre la DCO soluble du substrat et celle mesurée dans le réacteur canal. Ces mesures ont été réalisées par spectrophotométrie U.V. d'absorption (cf. Chapitre 2.3.7). L'augmentation de la DCO soluble jusqu'au 5^{ème} jour correspond à la phase d'adaptation où la concentration du substrat est augmentée progressivement.

La variation de la concentration des nitrates dans le réacteur canal est présentée sur la Figure 3.5.1d. Comme la DCO soluble, elle a été estimée par spectrophotométrie U.V. d'absorption (cf. Chapitre 2.3.7). On observe une production des nitrates qui indique un "bon fonctionnement" de cette unité pilote. Ces deux courbes montrent une bonne stabilité du réacteur.

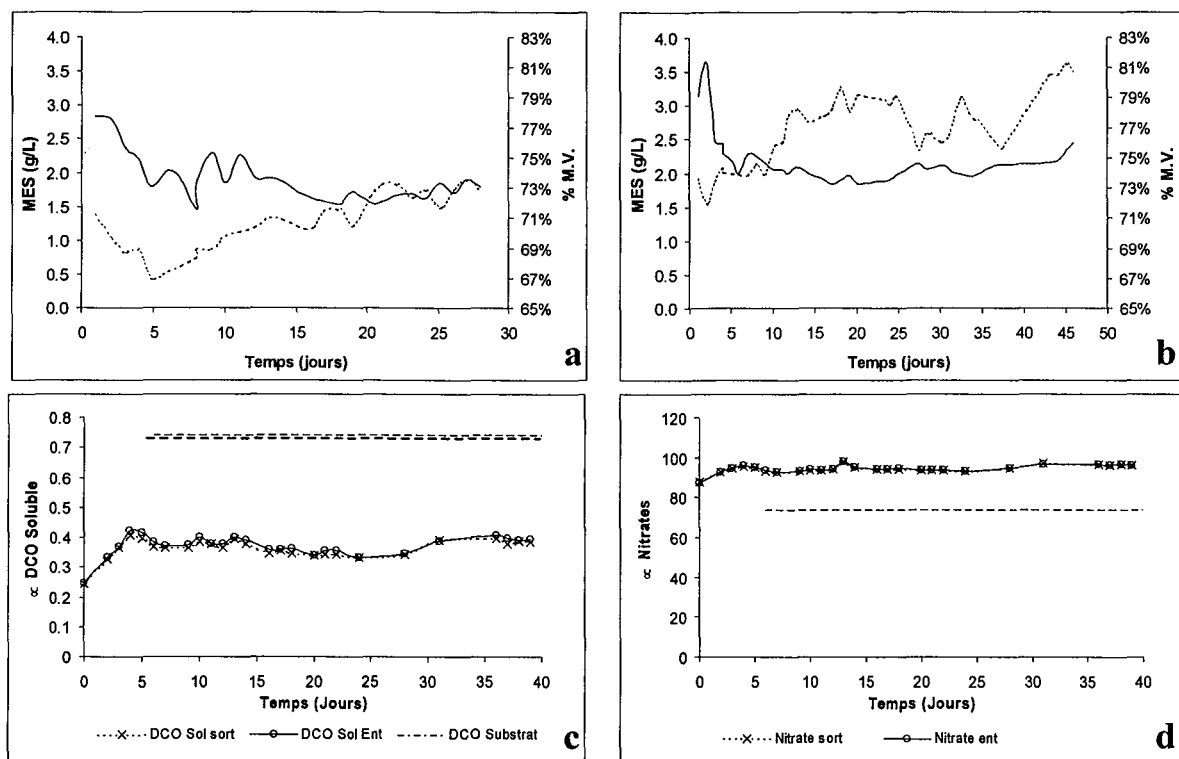


Figure 3.5.1 - Variation de la concentration en matières en suspensions (*MES*) (—) et du pourcentage des matières volatile (*MV*) (---) des réacteurs *RPA* (a) et *RC* (b) et la variation de la DCO soluble (c) et des nitrates (d) dans le réacteur canal fonction du temps.

La Figure 3.5.2 présente la variation de la turbidité et de la vitesse de chute libre pour les deux réacteurs. La turbidité nous permet d'observer le phénomène de défloculation ou relargage. Dans le *RPA* il y a eu une défloculation importante pendant la phase d'adaptation, suivi d'une deuxième défloculation 10 jours après (12^{ème} jour). Pour le réacteur canal les phénomènes de défloculation sont beaucoup moins marqués. Le second pic (vers 20 jours) est dû à un manque de substrat pendant 12 heures.

Après le 15^{ème} jour la vitesse de décantation et la turbidité du *RPA* commencent à diminuer. Ceci indique que les fragments de floc ont été éliminés avec l'eau traitée par la surverse du décanteur ou qu'ils se sont agrégés aux floes. Ensuite, à cause de la formation des réseaux entre les floes par les bactéries filamenteuses qui se développent en grande quantité, elle continue à baisser et atteint des valeurs inférieures à 50 FTU (Figure 3.5.2).

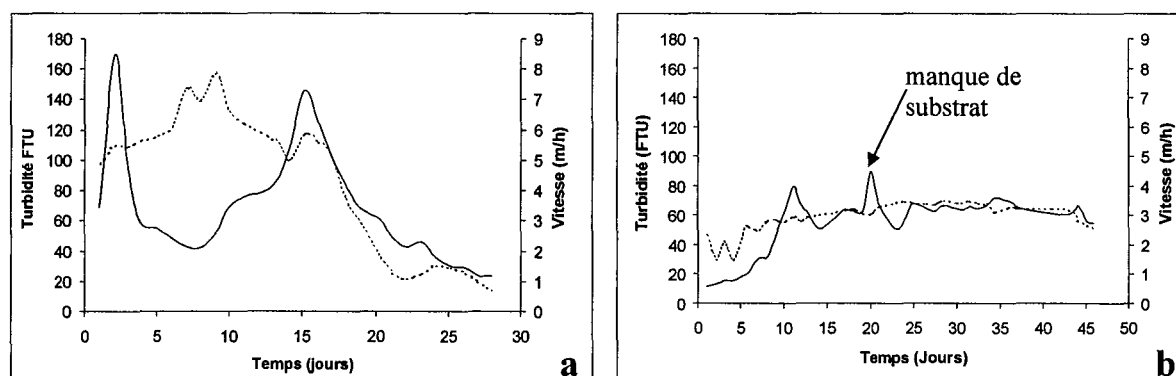


Figure 3.5.2 - Variation de la turbidité (—) et de la vitesse de chute libre (---) pour les réacteurs *RPA* (a) et *RC* (b) en fonction du temps.

La défloculation sur le réacteur canal a été plus faible, démontrant ainsi une meilleure adaptation des micro-organismes. Les pertes de biomasse ainsi que la formation des floccs dit en "tête d'épingle" ont été réduites. Les faibles variations de la vitesse de décantation du RC par rapport au RPA indiquent une structure plus stable des floccs bactériens et de leur environnement.

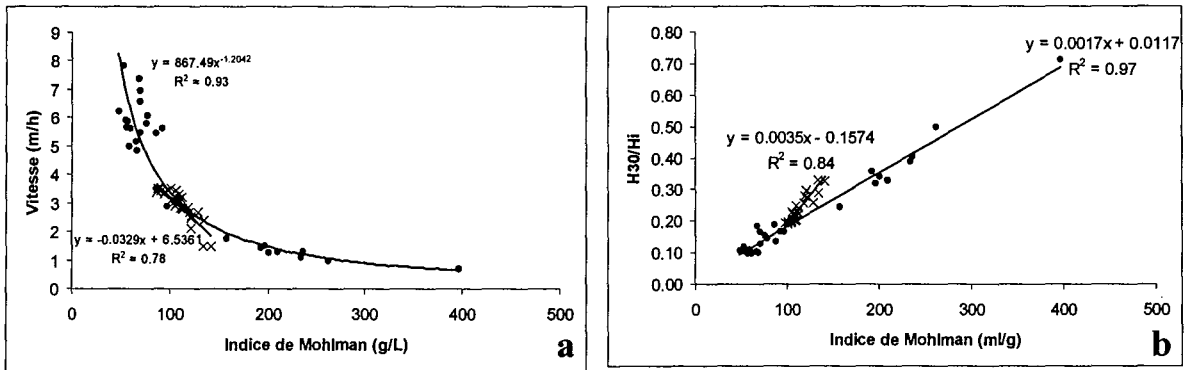


Figure 3.5.3 – Corrélations entre la vitesse de chute libre et l'Indice de Mohlman (IM) (a) et entre l'Indice de Mohlman (IM) et le rapport H_{30}/H_1 (b) pour les réacteurs RPA (●) et RC (X).

De bonnes corrélations de l'Indice de Mohlman (IM) avec la vitesse de décantation dans la zone de chute libre et avec la fraction décantée (H_{30}/H_1) ont été obtenues. Cela est plus évident pour le RPA, car du fait du bulking il y a eu une large variation de l'Indice de Mohlman (Figure 3.5.3). La différence de comportement entre les droites ($IM \times H_{30}/H_1$) est probablement due au diamètre de l'éprouvette utilisée (de 10 litres pour le RPA et de 2 litres pour le RC).

La Figure 3.5.4a montre qu'il y a eu des variations de la dimension fractale des floccs (D_f) plus importantes pour le RPA que pour le RC (Figure 3.5.4b). L'augmentation de la valeur de la dimension fractale après le 21^{ème} jour est liée à une déstructuration des floccs (défloculation) provoquée par le manque de substrat.

A partir du 16^{ème} jour d'expérience le phénomène de "bulking" filamenteux a commencé à s'installer dans le RPA. La Figure 3.5.4 montre qu'il y a une corrélation importante entre la longueur totale des filaments et l'Indice de Mohlman. Entre le 23^{ème} et le 25^{ème} jour on aurait pu penser que le "bulking" était en train de s'atténuer mais il s'est ensuite intensifié et l'Indice de Mohlman (IM) a augmenté. Pour le réacteur canal, jusqu'au 46^{ème} jour d'expérience la longueur totale des bactéries filamenteuses s'est maintenue dans des valeurs normales (Figure 3.5.5b).

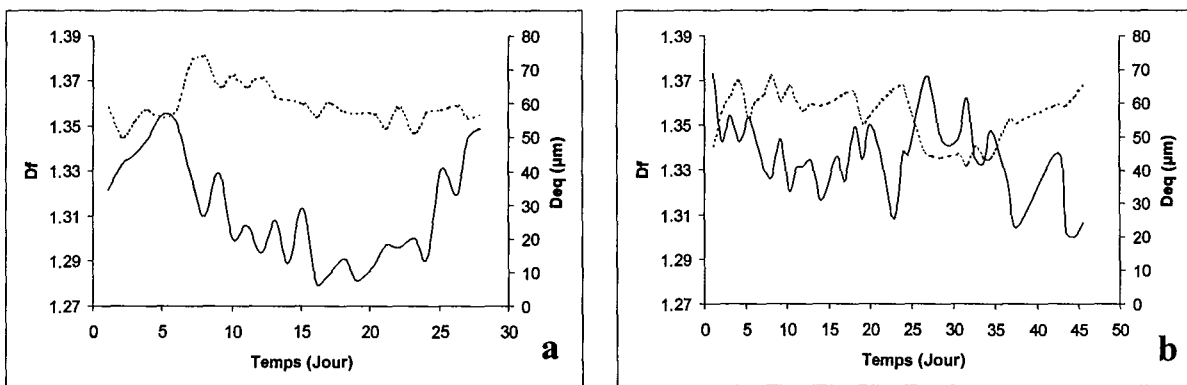


Figure 3.5.4 - Variation de la dimension fractale mésoscopique (D_f méso) (—) et du diamètre équivalent mésoscopique (D_{eq} méso) (--) pour les réacteurs RPA (a) et RC (b) en fonction du temps.

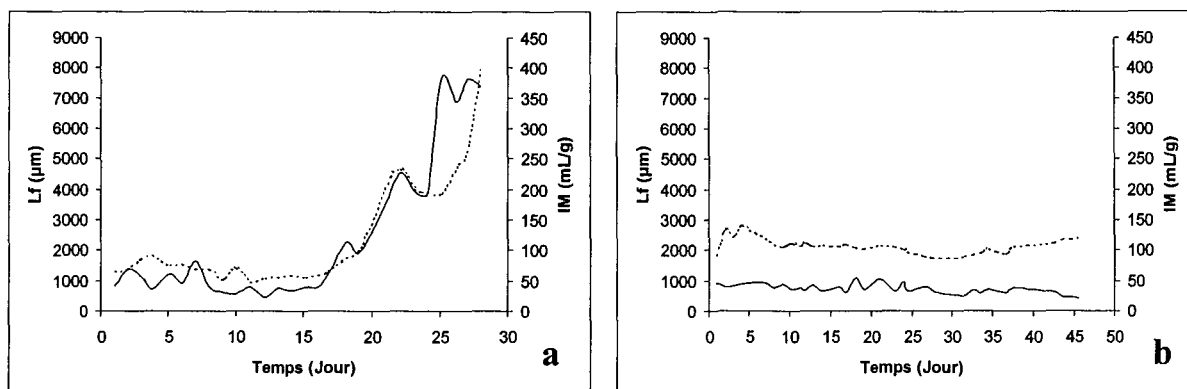


Figure 3.5.5 - Variation de la longueur totale des filaments par image (L_f) (—) et de l'Indice de Mohlman (IM) (---) pour les réacteurs *RPA* (a) et *RC* (b) en fonction du temps.

La longueur moyenne des filaments du *RPA* a été 50% plus importante que celles du *RC*.

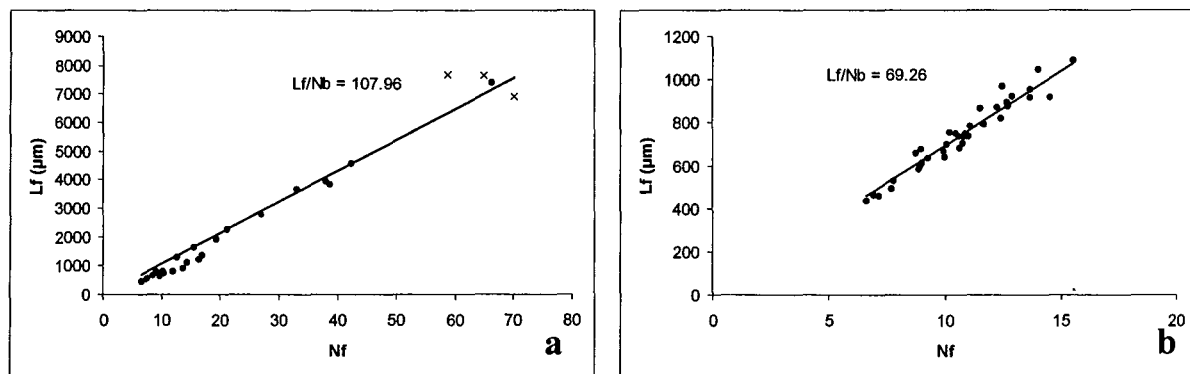


Figure 3.5.6 - Corrélation entre le nombre (N_f) et la longueur totale (L_f) des filaments par image pour le *RPA* (a) et le *RC* (b).

La Figure 3.5.6a montre une régression entre le nombre et la longueur totale des filaments. On observe trois points qui sont éloignés de la droite (identifiés par le symbole x). Ces points correspondent aux jours 23 à 25, quand il y a eu une divergence entre la courbe de la longueur totale des filaments et celle de l'Indice de Mohlman dans la Figure 3.5.5a. Cela semblerait indiquer des phénomènes transitoires pendant l'installation du bulking.

Les résultats obtenus par analyse d'image et lors des tests de décantabilité nous ont permis d'identifier à nouveau une forte corrélation entre l'Indice de Mohlman et la longueur totale des filaments mesurée par analyse d'image. Si on enlève les points de l'installation du bulking, on obtient un coefficient de corrélation (R^2) de 0.95 (Figure 3.5.7a). Pour le réacteur canal (Figure 3.5.7b) l'Indice de Mohlman n'a pas augmenté beaucoup et le nuage de points ne permet pas d'établir une corrélation.

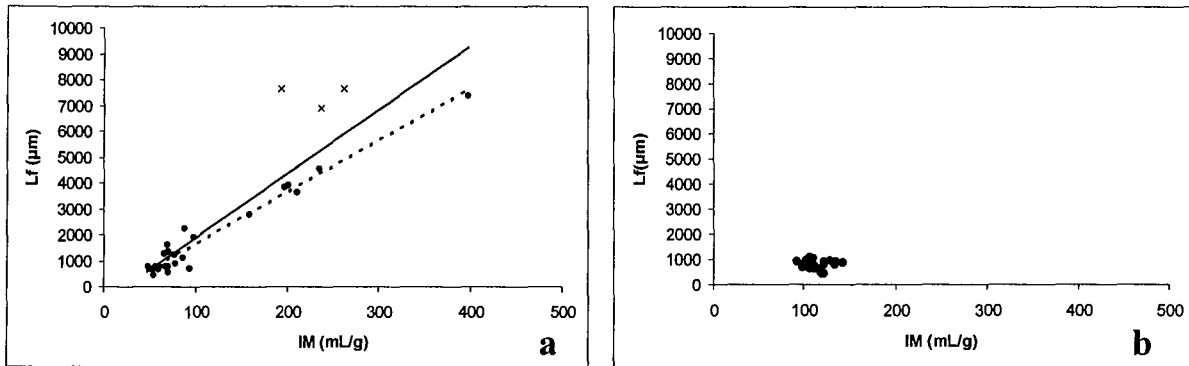


Figure 3.5.7 - Corrélation entre l'Indice de Mohlman (IM) et la longueur totale des filaments par image (L_f) pour les réacteurs RPA (a) et RC (b).

L'analyse de la macrostructure (Figure 3.5.8) confirme les résultats d'une variation plus importante de la dimension fractale macroscopique ($D_f macro$) et du diamètre équivalent macroscopique des floes ($D_{eq macro}$) pour les floes du réacteur parfaitement agité. On peut aussi voir la corrélation de ce diamètre avec la dimension fractale: à mesure que le diamètre se réduit la dimension fractale augmente.

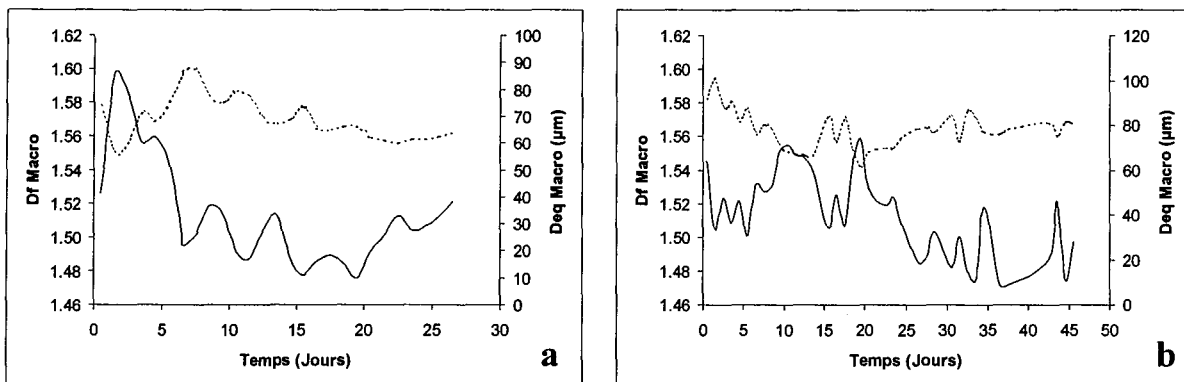


Figure 3.5.8 - Variation de la dimension fractale macroscopique ($D_f macro$) (—) et du diamètre équivalent macroscopique des floes ($D_{eq macro}$) (--) pour les réacteurs parfaitement agité (RPA) (a) et canal (RC) (b) en fonction du temps.

Les résultats obtenus ont montré que le réacteur canal, comme le laissait prévoir les travaux de la littérature, est plus stable et permet une adaptation plus facile de la biomasse. Il n'a pas connu de bulking pendant toute la période analysée, qui a été presque le double de celle du RPA . Les filaments présents avaient une longueur moyenne inférieure, ce qui laisse plus de temps pour prendre des mesures correctives avant l'installation complète du bulking.

3.5.2. Substrat naturel

Les expériences conduites avec le substrat naturel ont été réalisées à la station de traitement des eaux usées de Nancy. Le substrat utilisé était l'eau de sortie du pré-traitement de la station (dégrillée, désablée et déshuilée). Il n'y a pas eu de phase d'adaptation et la boue utilisée comme inoculum a été prélevée à la sortie du bassin d'aération et mis dans les réacteurs sans aucune dilution. L'expérience avec le réacteur parfaitement agité (RPA) a été réalisée du 17/11 au 17/12/2000 et celle avec le réacteur canal (RC) du 23/01 au 23/02/2001.

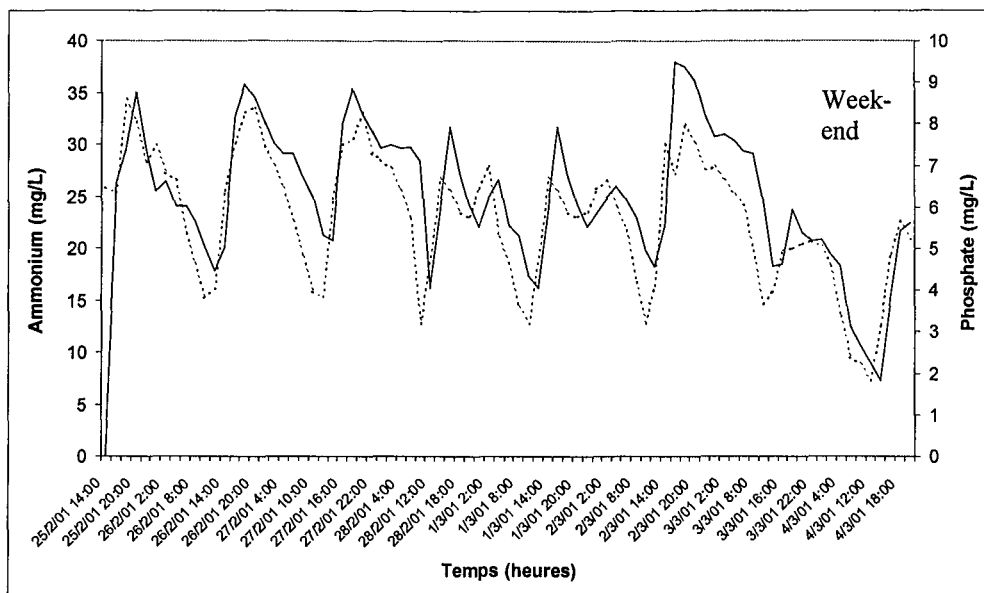


Figure 3.5.9 - Exemple de variation de la concentration d'ammonium (—) et de phosphate (--) de l'effluent d'entrée de la station après le pré-traitement (eau décantée primaire) (Le Bonté, 2001)

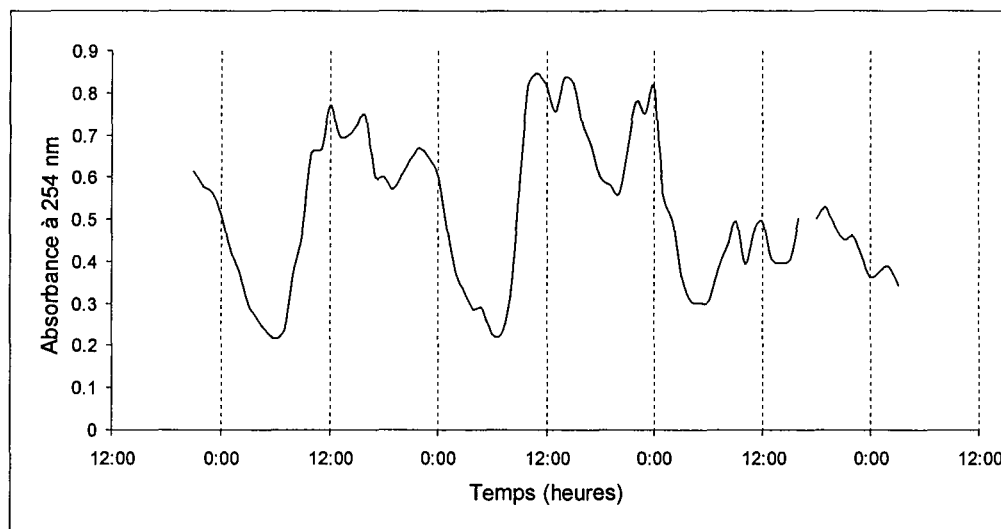


Figure 3.5.10 - Estimation de la variation de la concentration de la demande chimique d'oxygène (DCO) soluble par spectrophotométrie de l'effluent d'entrée de la station (Le Bonté, 2001).

Contrairement au substrat synthétique, le substrat naturel apporte des micro-organismes et sa composition varie au long de la journée. Pour une meilleure approche des conditions de fonctionnement de la station on a cherché à reproduire au mieux ces variations. La Figure 3.5.9 présente les variations des concentrations en phosphate et en ammonium et la Figure 3.5.10 la variation de la demande chimique d'oxygène soluble par absorbance à 254 nm (cf. Chapitre 2.3.7). On observe un cycle journalier avec deux maxima par jour correspondant au maxima de l'activité humaine en milieu de journée et le soir. Ces variations de composition vont se superposer à celles, imposées, du débit (cf. Chapitre 2.1.6). Sur une longue période, on observe aussi les effets des fins de semaine (Figure 3.5.9) et celles liées à la météorologie (pluies qui vont diluer la pollution).

Quand on utilisait du substrat synthétique il y avait toujours une défloculation causée par l'adaptation des micro-organismes au nouveau substrat. Avec le substrat naturel il n'y a pas eu ce problème et même s'il a eu perte de biomasse, elle a été moins importante. Les variations de la matière en suspension (*MES*) et du pourcentage de matière volatile (*MV*) des deux expériences sont présentées dans la Figure 3.5.11.

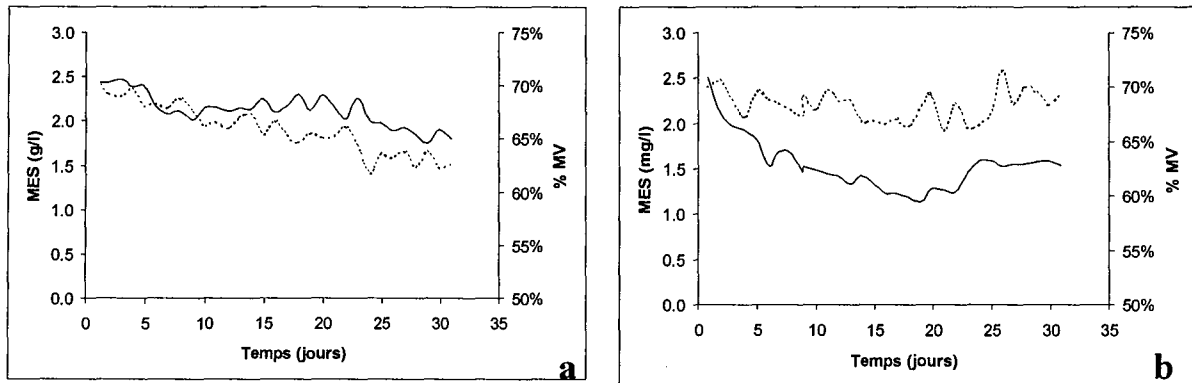


Figure 3.5.11 - Variation de la matière en suspension et du pourcentage de matières volatiles des deux réacteurs: *RPA* (a) et *RC* (b)

Les pertes de biomasse ont été moins importantes dans le réacteur parfaitement agité (*RPA*). On a pu observer un dépôt de biomasse au fond du réacteur canal, dû à une aération non uniforme sur l'axe transversal. Cela peut expliquer en partie la diminution de la concentration en matières en suspension dans le réacteur canal. La matière organique est stable pour le réacteur canal (*RC*) alors qu'elle diminue légèrement pour le *RPA*. Cette baisse des matières en suspension du *RPA* est plus évidente lors de la défloculation vers le 22^{ème} jour.

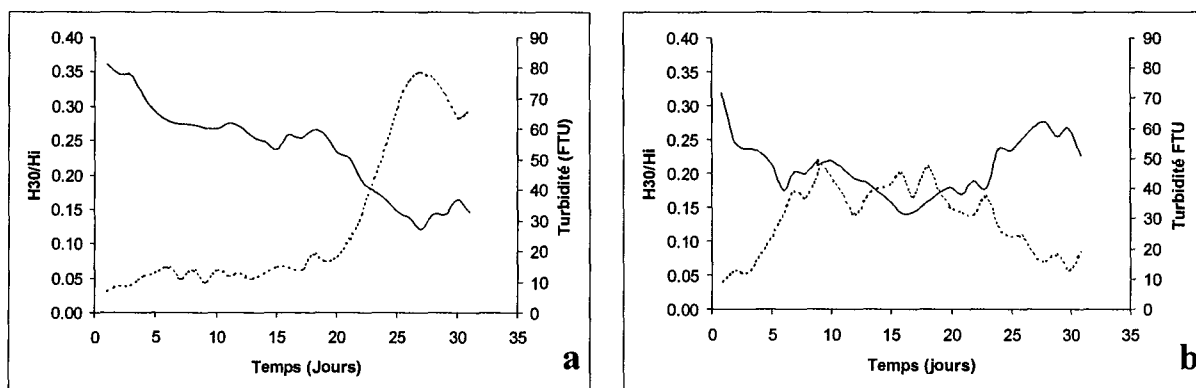


Figure 3.5.12 - Variation de la fraction décantée H_{30}/H_i (—) et de la turbidité (--) pour les réacteurs parfaitement agité (a) et canal (b).

On a déjà montré que la vitesse de chute libre est corrélée à la fraction décantée H_{30}/H_i . On observe sur la Figure 3.5.12a que cette fraction chute faiblement à partir du 3^{ème} jour et de façon plus importante à partir du 18^{ème}. La première chute semble être due à une réduction de la longueur totale des filaments (Figure 3.5.14). La deuxième chute ainsi que celle du *RC* (Figure 3.5.12b) est due à la défloculation. On observe que pendant la période de refloculation qu'il y a eu sur le réacteur canal la fraction H_{30}/H_i a augmenté, ce qui indique une réduction de la vitesse de décantation.

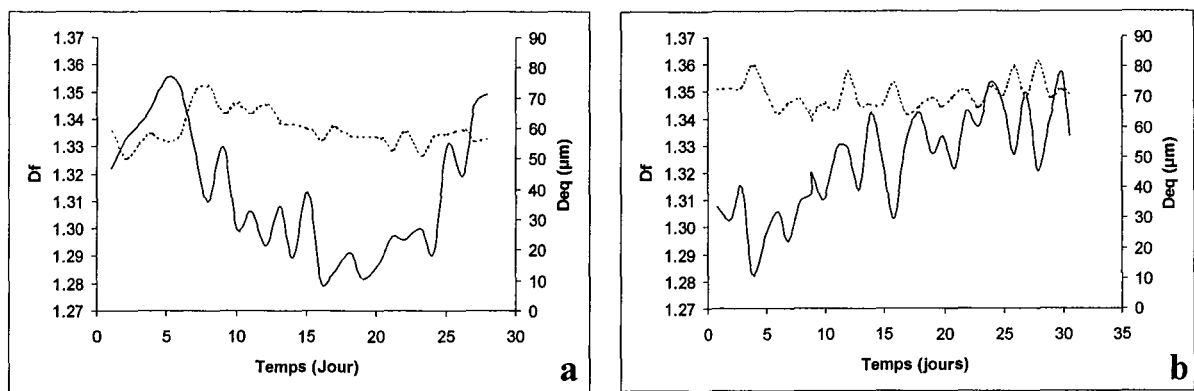


Figure 3.5.13 - Evolution de la dimension fractale mésoscopique (D_f) (—) et du diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq}) (---) pour le RPA (a) et le RC (b)

Le diamètre équivalent mésoscopique des floes pour les deux réacteurs est resté assez stable (Figure 3.5.13). La forte défloculation à la fin de l'expérience avec le RPA a provoqué une diminution de ce diamètre équivalent (Figure 3.5.13a). La défloculation du réacteur canal avec le substrat naturel a la même allure que celle avec le substrat synthétique, indiquant ainsi qu'elle est une adaptation au réacteur et non au substrat.

Le RPA a connu des variations de la dimension fractale des floes plus importantes que le RC (Figure 3.5.13). Si on ne prend pas en compte les variations locales (journalières), dans l'ensemble la dimension fractale des floes du RPA a diminué et ensuite a augmenté, tandis que pour le RC elle a augmenté et ensuite s'est stabilisée.

La présence des filaments dans les réacteurs pilotes a été faible même pendant la période où la station a connu des problèmes de moussage et bulking causés par une grande concentration de bactéries filamenteuses (*Nocardia sp.*) (cf. Chapitre 3.5.3). L'augmentation de la longueur totale des filaments par image (L_f) à partir du 25^{ème} jour (Figure 3.5.14a) est liée à un phénomène de défloculation. Les bactéries qui étaient à l'intérieur des floes vont se retrouver exposées au milieu nutritif et peuvent se développer plus facilement grâce à un accès plus direct au substrat et une concentration en oxygène plus élevée. Le même phénomène se reproduit pour le RC après le 5^{ème} jour (Figure 3.5.14b).

Si on analyse la période entre le 20^{ème} et le 31^{ème} jour de l'expérience avec le RPA (Figure 3.5.14a) on observe au début (entre 20^{ème} et 27^{ème} jour) une diminution de l'Indice de Mohlman (IM) liée à la perte de biomasse (réduction de la concentration en matières en suspension), de la longueur totale des filaments par image (L_f) ainsi qu'une légère réduction du diamètre équivalent mésoscopique des floes ($D_{eq\ meso}$). Ensuite on observe une augmentation de l'Indice de Mohlman, suite à la défloculation, avec une forte augmentation de la longueur totale des filaments par image.

Dans les autres expériences sur les unités pilotes on a observé que le bulking était précédé d'une défloculation. Cela semble indiquer que dans les floes les bactéries filamenteuses ont leur croissance contrôlée par une limitation des substrats, tandis que, lorsqu'elles sont libres, elles prolifèrent rapidement. Avec une limitation de substrat à l'intérieur des floes due aux différentes barrières (couche limite, diffusion à travers les exopolymères, etc.) les bactéries zooglées, avec une capacité d'assimilation des substrats plus élevée, ont des croissances plus rapides que les bactéries filamenteuses. Dans les stations d'épuration on a observé que le

bulking survenait souvent après des périodes de fortes pluies. Ces événements peuvent altérer les caractéristiques des floccs et provoquer une défloculation.

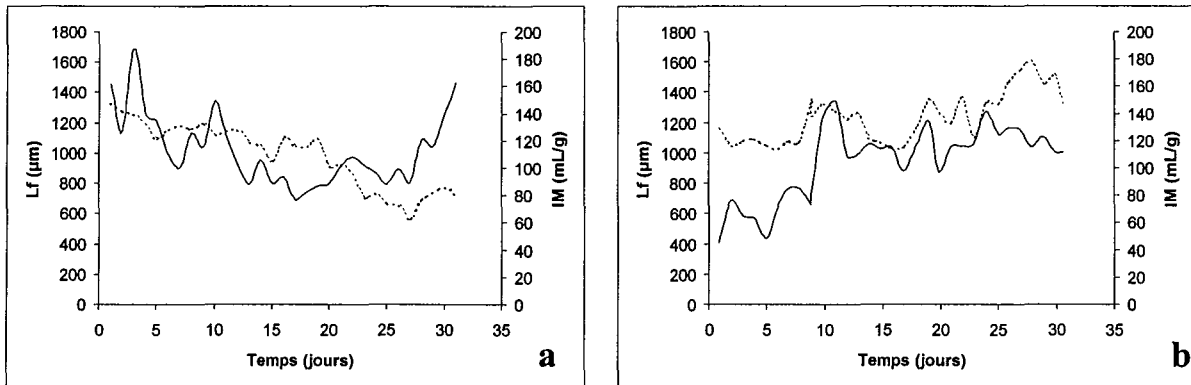


Figure 3.5.14 - Variation de la longueur totale des filaments (L_f) (—) et de l'Indice de Mohlman (IM) (--) pour le RPA (a) et le RC (b)

La corrélation entre l'Indice de Mohlman (IM) et la longueur totale des filaments (L_f) (Figure 3.5.14) nous permet de vérifier que des Indices de Mohlman plus importants ont été obtenus dans le RC pour une même longueur totale des filaments par image. Si on regarde le D_{eq} (Figure 5.3.13) et le pourcentage de matières volatiles (Figure 3.5.11) on trouve des valeurs plus élevées pour le RC. Les points pour les deux expériences avec le substrat naturel sont concentrés dans le même nuage que ceux du RC avec le substrat synthétique. La valeur d'Indice de Mohlman (IM) de 200 mL/g à partir de laquelle on caractérise bien l'état de bulking n'était pas atteinte.

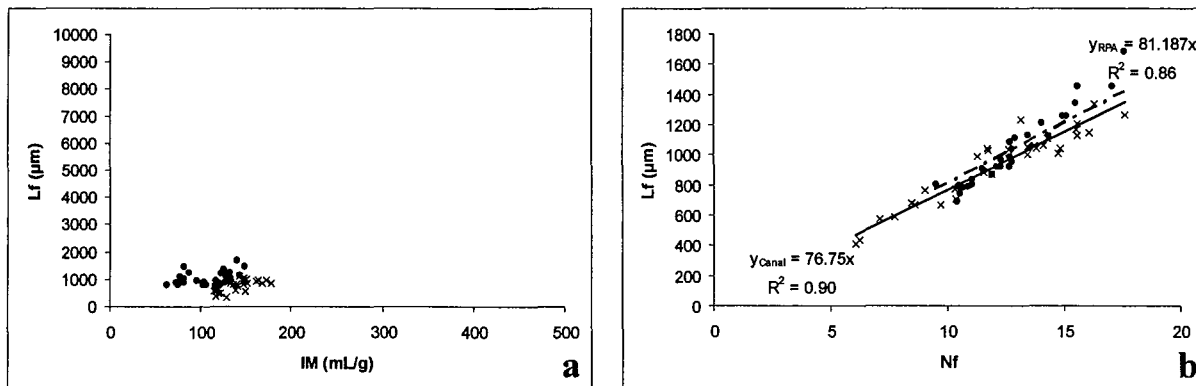


Figure 3.5.15 - Corrélation entre l'Indice de Mohlman (IM) et la longueur totale des filaments par image (L_f) (a) et entre le nombre (N_f) et la longueur (L_f) totale des filaments par image (b) pour le RPA (●) et pour le RC (x).

La longueur moyenne des filaments, rapport de la longueur totale sur le nombre total des filaments par image (L_f/N_f), est présentée sur la Figure 3.5.15. Les résultats ont permis de supposer qu'il semble s'agir d'une même forme de bactérie filamenteuse.

Ainsi comme dans l'expérience avec le substrat synthétique, le RC a présenté des caractéristiques des floccs ainsi que de décantabilité plus homogènes et stables que le RPA. On a pu constater que pour les deux substrats la défloculation initiale a été la même pour le RC, tandis que pour le RPA il n'y a pas eu de défloculation au début mais seulement à la fin des expériences.

3.5.3. L'état de la station d'épuration pendant la même période

Pendant les deux expériences précédentes avec le substrat naturel, un suivi de la station a été réalisé pour observer ses variations dans les mêmes conditions de substrat que les installations pilotes.

Pendant l'expérience avec le réacteur parfaitement agité (*RPA*) les matières en suspension sont restées assez stables, augmentant seulement à la fin (Figure 3.5.16a). Le pourcentage de matières volatiles est, lui aussi, resté stable mais a diminué à la fin de la période de suivi du *RPA*. L'Indice de Mohlman (*IM*), par contre, a dépassé plusieurs fois le seuil de 200 mL/g, indiquant ainsi un début de bulking (Figure 3.5.16b). La fraction décantée (H_{30}/H_i) a confirmé les résultats de l'Indice de Mohlman.

On observe à la fin de cette période une très forte augmentation de cette fraction où le volume décanté après 30 minutes atteignait plus de 90% du volume initial. Sur le réacteur parfaitement agité (*RPA*) ce même phénomène est arrivé quelques jours avant avec une fraction décantée H_{30}/H_i de 80%.

La période pendant laquelle l'expérience avec le réacteur canal (*RC*) a été réalisée a été plus instable. On observe que la matière en suspension a connu une forte augmentation causée par l'installation du bulking filamentueux vers le 80^{ème} jour (13^{ème} jour depuis le début de l'expérience avec le réacteur canal). Le pourcentage de matières volatiles a augmenté de plus de 10% après ce même événement.

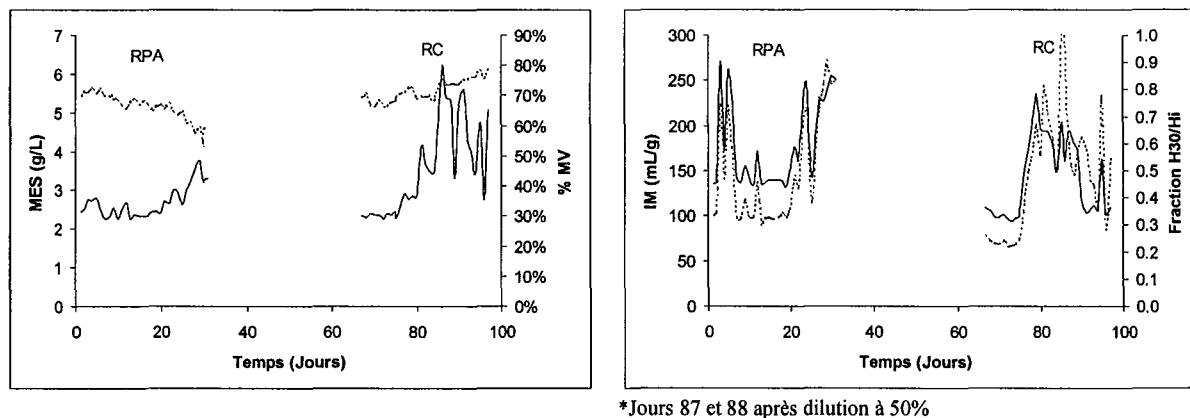


Figure 3.5.16 - Variation des matières en suspension (*MES*) (—) et du pourcentage des matières volatiles (*MV*) (---) (a) et de l'Indice de Mohlman (*IM*) (—) et de la fraction décantée (H_{30}/H_i) (---) (b) en fonction du temps. (*RPA* symbolise la période pendant laquelle l'expérience avec le réacteur pilote a été réalisée et *RC* celle avec le réacteur canal).

Sur la Figure 3.4.16b on observe des Indices de Mohlman plus faibles pour des fractions H_{30}/H_i plus importantes, ceci à cause de la hausse de la concentration en matières en suspension. C'est pour cela que l'on doit autant que possible analyser les deux courbes ensemble. Après le 79^{ème} jour la fraction H_{30}/H_i dépasse 50% et reste même quatre jours à 100% (pas de décantation), entre les 85^{ème} et 88^{ème} jours. Après l'ajout d'hypochlorite de sodium dans le canal de recirculation des boues on observe une baisse de ces valeurs pour revenir à des niveaux acceptables.

Le réacteur pilote canal n'a pas été touché par ce phénomène. Son comportement est resté normal pendant toute la période de l'expérience.

Sur la Figure 3.5.17a, on observe que la dimension fractale mésoscopique des floes (D_f méso) et le diamètre équivalent mésoscopique des floes (D_{eq} méso) ont un comportement inverse. La forte augmentation de la dimension fractale et la chute du diamètre équivalent des floes pendant l'expérience avec le réacteur canal est dû au bulking filamenteux.

La Figure 3.5.17b présente la variation de la longueur totale et des filaments par image (L_f) de la station d'épuration de Nancy-Maxéville et du réacteur canal pilote. Si on compare les courbes de la longueur totale pour la période du *RPA*, on voit qu'elles ont le même comportement. Cela indique l'influence de la composition du substrat dans le comportement du réacteur. Pour le réacteur canal elles ont au début un même comportement, mais le bulking ne s'est pas installé dans le pilote, même pendant les périodes de bulking sur la station. La concentration de bactéries filamenteuses présentes dans le pilote dépasse celle de la station à la fin de l'expérimentation parce que l'on n'a pas ajouté du chlore. La différence de comportement entre les réacteurs est essentiellement due à la différence d'hydrodynamique entre ces deux installations pilote, le réacteur canal ayant un comportement hydrodynamique plus proche de celui d'un réacteur piston.

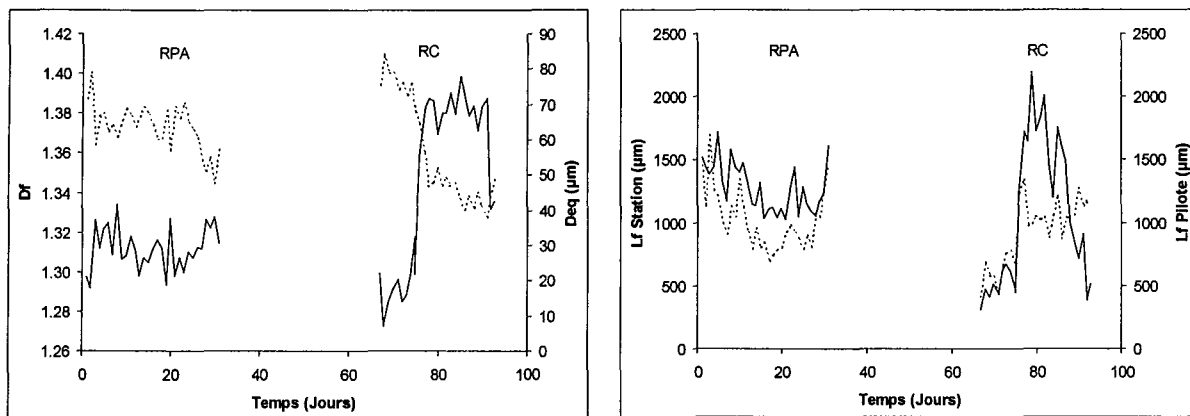


Figure 3.5.17 - Variation de la dimension fractale mésoscopique (D_f) (—) et du diamètre équivalent mésoscopique (D_{eq}) (---) des floes (a) et de la longueur totale des filaments de la station (L_f Station) (—) et de la longueur totale des filaments du pilote (L_f Pilote) (---) (b) en fonction du temps. (*RPA* symbolise la période dans laquelle l'expérience avec le réacteur pilote a été réalisée et *RC* celle avec le réacteur canal).

Ces expérimentations nous ont permis de mettre en évidence la stabilité du réacteur canal (*RC*) alimenté avec un substrat synthétique et ensuite avec de l'eau usée. Dans les deux cas il n'y a pas eu de phénomène de bulking filamenteux. Ce réacteur a présenté des diamètres équivalents des floes et des vitesses de décantation plus uniformes. Les phénomènes de défloculation moins importants ont été observés. On a pu vérifier leur fonctionnement par la réduction de la DCO soluble et la production de nitrates,

Du fait du phénomène de bulking qui s'est produit sur le réacteur parfaitement agité (*RPA*) lors de l'alimentation avec le substrat synthétique, des longueurs moyennes pour les bactéries filamenteuses 50 % plus importantes que celles avec le *RC* ont été observés. Cependant, l'alimentation avec de l'eau usée n'a pas produit de bulking et ces longueurs sont restées alors semblables pour les deux réacteurs.

On a analysé l'influence du substrat sur le fonctionnement des réacteurs pilotes à partir de la comparaison avec le fonctionnement de la station pendant la même période. L'Indice de Mohlman et de la longueur totale des bactéries filamenteuses par image de la station et celui du *RPA* se ressemblent beaucoup. Cependant pour le *RC* les différences qui apparaissent à la deuxième moitié de l'expérience sont probablement dues à l'ajout du chlore dans le réacteur de la station.

3.6. La Coloration de Gram

La caractérisation des bactéries filamenteuses et des floccs réalisée à l'aide de FlocMorph utilise des préparations microscopiques très simples. Ceci a été conçu à dessein, afin de faciliter une implantation sur site.

Mais peut-on aller plus loin ? C'est-à-dire peut-on tenter d'identifier la nature des bactéries filamenteuses. On a vu que cela se faisait à partir de colorations dont les plus simples sont les colorations Gram et Neisser. Il a donc été décidé de tester la facilité de mise en œuvre et la quantification en routine de la coloration Gram.

Sur le réacteur parfaitement agité (RPA) couplé à un décanteur de 9 litres a été réalisée du 07/03/01 au 03/04/01 une expérience ayant comme objectif le développement du programme de quantification de coloration Gram. Pour cette expérience on a utilisé du substrat synthétique avec un débit d'alimentation de 1.5 L/h. La recirculation a été assurée par la même pompe péristaltique, donc avec un même débit.

On a observé une forte variation de la matière sèche (MS) et de la vitesse de décantation dans la zone de chute libre (Figure 3.6.1). Jusqu'au 13^{ème} jour la vitesse de décantation reste assez stable pour ensuite augmenter un peu et puis chuter pour cause de bulking filamenteux. Le bulking a causé une perte importante de biomasse par la surverse du décanteur. Les chutes de la matière sèche avant le bulking sont probablement dues à des phénomènes de défloculation, comme cela a été mis en évidence dans le chapitre précédent.

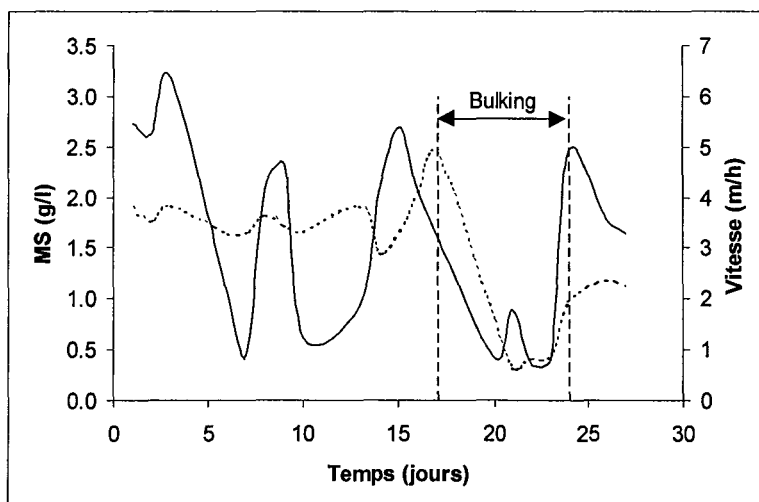


Figure 3.6.1 - Variation de la matière sèche (MS) (—) et de la vitesse de décantation (--) en fonction du temps.

Sur la Figure 3.6.2 on peut observer que les courbes ont les mêmes allures et que les augmentations de l'Indice de Mohlman (IM) et de la fraction décantée (H_{30}/H_t) indiquent le développement de bulking.

Si on compare cette expérience avec celles du Chapitre 3.4 on vérifie que : le temps mis pour son développement (17 jours) se situe entre celui des deux autres expériences (9 et 22 jours). Il faut rappeler que cette expérience a été réalisée dans une période de l'année comprise entre celles des deux autres expériences du chapitre 3.4. La longueur moyenne des filaments (ratio L_f/N_f) pour celle-ci a été de 138 μm , tandis que pour celles du chapitre 3.4 on a obtenu 222

μm pour la première (pendant l'hiver) et $118 \mu\text{m}$ pour la deuxième (pendant l'été). Ces résultats confirment l'analyse de l'influence de la température sur le développement des bactéries filamenteuses.

Les résultats de l'analyse des floccs bactériens, en état frais, par analyse d'image en utilisant le programme FlocMorph, nous ont permis de vérifier que le diamètre des mésostructures n'a pas beaucoup varié. Durant le bulking il y a eu une réduction de ce diamètre due à la compétition entre les bactéries libres et celles à l'intérieur des floccs bactériens (Figure 3.6.3). Cela a déjà été vérifié dans d'autres expériences (Chapitre 3.2). Par contre la dimension fractale a des valeurs plus importantes que dans les dernières expériences et a peu varié après la phase d'adaptation.

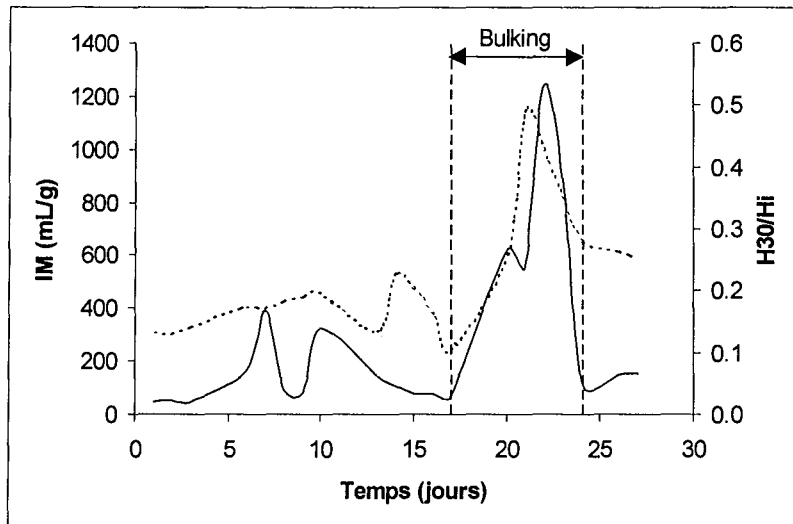


Figure 3.6.2 - Variation de l'Indice de Mohlman (IM) (—) et de la fraction décantée après 30 minutes (H_{30}/H_i) (--) en fonction du temps.

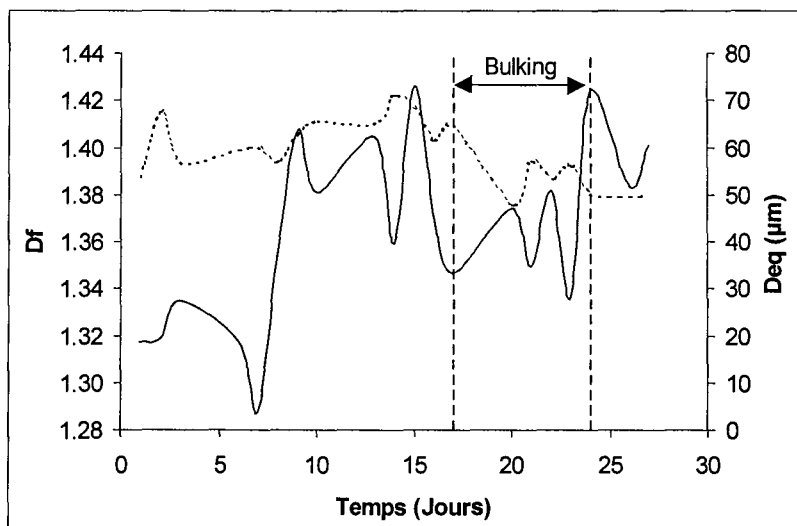


Figure 3.6.3 - Variation de la dimension fractale (D_f) (—) et du diamètre équivalent (D_{eq}) mésoscopique des floccs (--) en fonction du temps.

La Figure 3.6.4 nous permet de confirmer la relation entre la longueur totale des filaments par image, obtenue par analyse d'image, et l'Indice de Mohlman, obtenu par des essais de

décantation. Le pic de la longueur totale des filaments au 2^{ème} jour correspond à une défloculation.

Le programme Gram a permis de quantifier le rapport entre les bactéries Gram positives et Gram négatives. On peut constater, à partir de la Figure 3.6.5, une augmentation de la proportion des bactéries Gram positives pendant la période de la défloculation. Cela est due aux bactéries filamenteuses, Gram positives dans ce cas, qui sont sorties de l'intérieur des floccs. Juste avant l'apparition du bulking (17^{ème} jour), on observe des variations importantes dans la proportion de bactéries Gram positives et négatives. Il conviendra de confirmer ces phénomènes dans des études ultérieures plus approfondies.

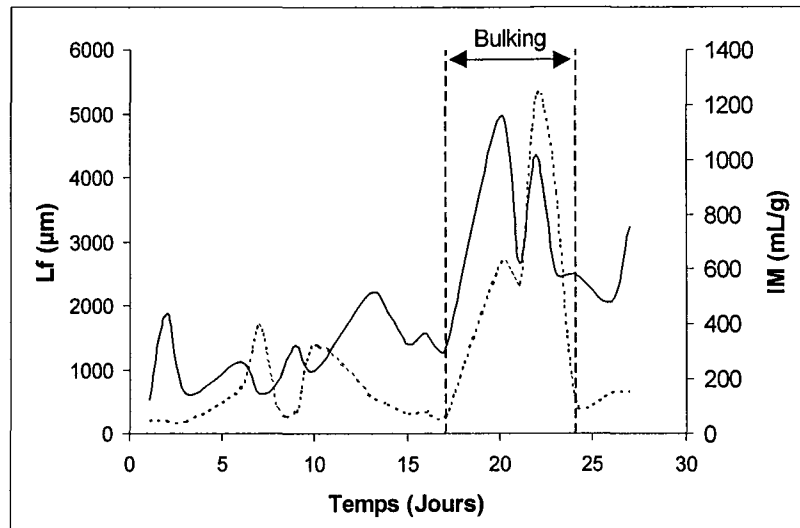


Figure 3.6.4 - Variation de la longueur totale des filaments (L_f) (—) et de l'Indice de Mohlman (IM) (--) en fonction du temps.

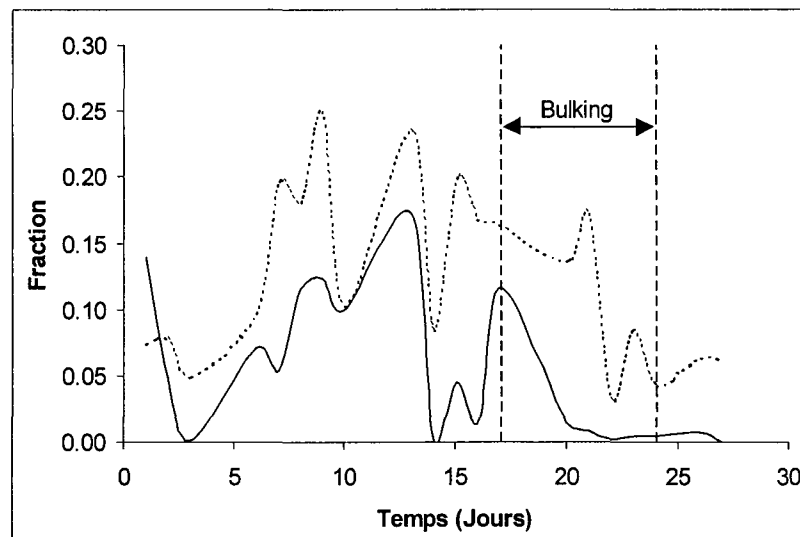


Figure 3.6.5 - Variation de la fraction des bactéries Gram négatives/positives (—) et du ratio filament / biomasse (--) en fonction du temps.

Quand on fait l'acquisition des filaments colorés, on essaye d'éviter, au maximum, de visualiser des floccs. Le rapport filament biomasse peut indiquer la facilité de trouver des filaments isolés.

Cet essai d'analyse automatique d'images de coloration Gram a fait ressortir:

- Que la coloration Gram n'était pas toujours aisée à réussir, c'est-à-dire à fournir des images de qualité constante d'un jour à l'autre.
- Que le réglage de la camera, notamment de sa sensibilité et de la balance des teintes était délicat.

L'analyse des images, par contre, ne présente pas de difficulté particulière. Il s'agit là, bien sûr, d'un premier test, qui doit être re-itéré pour améliorer les procédures, à la fois en ce qui concerne la préparation des lames et en ce qui concerne le traitement des images et les paramètres mesurés.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This not only helps in tracking expenses but also ensures compliance with tax regulations.

In the second section, the author provides a detailed breakdown of the company's revenue streams. This includes sales from various product lines and services. The data shows a steady increase in revenue over the past year, which is attributed to strategic marketing efforts and improved operational efficiency.

The third section focuses on the company's financial health. It highlights the strong liquidity position and the ability to meet all financial obligations. The author also discusses the company's debt-to-equity ratio, which remains within industry standards, indicating a sound financial structure.

Finally, the document concludes with a summary of the company's overall performance. It notes that despite some challenges in the market, the company has managed to maintain its competitive edge and achieve its financial goals. The author expresses confidence in the company's future prospects and the potential for continued growth.

Chapitre 4

Etude des Protozoaires

*"Ce qui ne me tue pas
me rend plus fort"*

FRIEDRICH NIETZSCHE

L'étude des protozoaires présentes dans le bassin d'aération peut fournir des informations importantes sur l'état biologique du bassin d'aération et à partir de cela nous permettre de prévoir le fonctionnement de la station et détecter de possibles problèmes qui peuvent réduire son efficacité. L'utilisation des indices biotiques pour la microfaune fait appel à une identification et à un comptage manuels, ce qui rend nécessaire la présence d'un spécialiste. Ce facteur, associé au temps pour réaliser une analyse, et le fait qu'il s'agit d'une tâche fastidieuse, rendent son utilisation dans les stations d'épuration problématique.

A partir d'une procédure de reconnaissance automatique des protozoaires (ProtoRec v.0), développée par Amaral et al. (1999), nous avons réalisé des modifications afin: d'augmenter le nombre d'espèces présentes dans la base de données et ainsi susceptibles d'être identifiées, de résoudre des problèmes d'isolement des protozoaires de la biomasse qui les entourent et d'augmenter les paramètres morphologiques calculés afin d'obtenir des taux de reconnaissance plus importants. Cette identification est basée sur la morphologie de la silhouette bidimensionnelle des espèces de protozoaires. Après le calcul de ces paramètres l'identification se fait par comparaison avec les informations contenues dans la base de données, par analyse factorielle discriminante.

Dans ce chapitre on présente l'évolution du programme de reconnaissance des protozoaires et des applications sur les stations de Nancy et de Braga au Portugal, ainsi que l'évolution de l'indice de reconnaissance des espèces. On pourra voir que les indices obtenus dans la dernière version sont satisfaisants, surtout par rapport aux groupes et aux sous-groupes de protozoaires (flagellés, ciliés nageurs, ciliés mobiles de fond, ciliés sessiles, carnivores et amibes). L'inclusion des métazoaires dans la base a permis d'avoir plus d'informations sur l'état de la station, principalement par rapport à l'âge des boues.

Ce développement d'une reconnaissance par analyse automatique d'images des protozoaires (et métazoaires) est le fruit d'une collaboration entre l'équipe "Traitement des Eaux" du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique de Nancy et l'équipe du Prof. E. Ferreira du Département du Génie Biologique de l'Université du Minho à Braga (Portugal). Elle s'inscrit dans le cadre de la thèse de doctorat de A.L. Amaral. Cette collaboration a été soutenue par l'ICCTI (Portugal) et l'Ambassade de France au Portugal.

4.1. Reconnaissance des Protozoaires (ProtoRec v.1)

En utilisant le programme de reconnaissance des espèces de protozoaires développé par Amaral et al. (1999), ProtoRec v.0, on a réalisé une validation sur la station de Nancy pendant l'hiver et le printemps 1999. Mais la présence excessive des filaments durant cette période (voir chapitre 3.1) a provoqué des problèmes au niveau de la séparation des protozoaires du reste de l'image. Dans la deuxième version (ProtoRec v.1), on a cherché à améliorer cette séparation et à introduire d'autres espèces qui n'avaient pas été observées lors du développement de la première version.

Pour synthétiser l'information contenue dans les paramètres morphologiques extraits d'individus des 14 espèces présentes on a appliqué une analyse en composantes principales. Le Tableau 4.1 présente les valeurs propres de la matrice de corrélation. Les deux premières composantes principales f_1 et f_2 représentent 79% de la variabilité des données d'entraînement. Si on utilise trois composantes f_1 , f_2 et f_3 , 95% de la variabilité est pris en compte. L'addition d'autres composantes n'apporte pas d'augmentation significative de la prise en compte de la variabilité.

Tableau 4.1 - Valeurs propres et degré de représentativité des variables

Valeurs propres	f_1	f_2	f_3	f_4	f_5
Valeur	2.43	1.54	0.76	0.19	0.07
% de variabilité	49	31	15	4	1
% cumulé	49	79	95	99	100

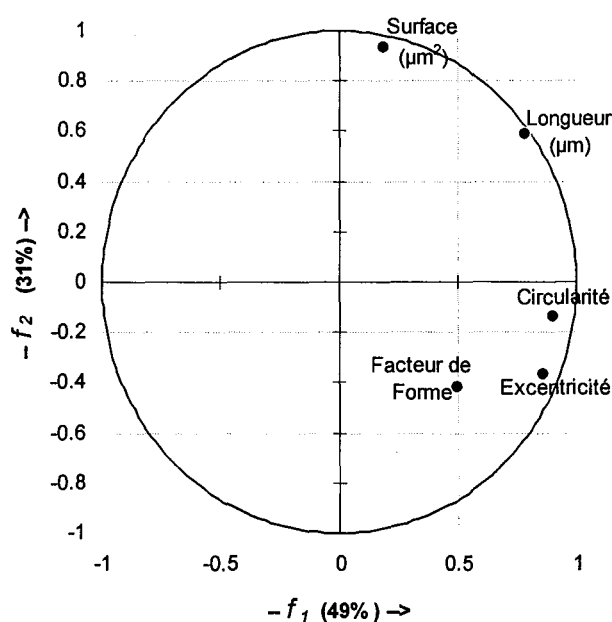


Figure 4.1 - Cercle de corrélation

Le cercle de corrélation résume les relations entre les variables. On observe sur la Figure 4.1 que ces variables sont assez bien distribuées, indiquant ainsi qu'elles peuvent contribuer à la discrimination entre les espèces.

Le tableau 4.2 présente les corrélations entre les paramètres de forme et les composantes principales. La longueur (F_{Max}), l'excentricité (E) et la circularité (C) ont un poids important pour la première composante. Pour la deuxième composante, c'est la surface (S) qui a l'effet le plus fort, tandis que pour la troisième c'est le facteur de forme (FF).

Tableau 4.2 - Corrélation entre les descripteurs de forme des protozoaires et les nouveaux facteurs obtenus par l'analyse en composantes principales (ACP).

	f_1	f_2	f_3	f_4	f_5
Excentricité	0.86	-0.36	-0.14	0.33	-0.02
Facteur de Forme	0.49	-0.41	0.76	-0.08	0.00
Circularité	0.90	-0.13	-0.32	-0.25	-0.12
Surface	0.19	0.93	0.25	0.10	-0.14
Longueur	0.78	0.59	-0.03	-0.06	0.19

Les équations 4.1 à 4.3 donnent les coordonnées de chaque espèce de protozoaire i suivant l'axe j dans l'espace des composantes principales.

$$Co_i^1 = 0.5505 \frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E} + 0.3174 \frac{FF_i - \mu_{FF}}{\sigma_{FF}} + 0.5754 \frac{C_i - \mu_C}{\sigma_C} + 0.1193 \frac{S_i - \mu_S}{\sigma_S} + 0.5009 \frac{F_{Max\ i} - \mu_{F_{Max}}}{\sigma_{F_{Max}}} \quad (4.1)$$

$$Co_i^2 = -0.2928 \frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E} - 0.3335 \frac{FF_i - \mu_{FF}}{\sigma_{FF}} - 0.1063 \frac{C_i - \mu_C}{\sigma_C} + 0.7517 \frac{S_i - \mu_S}{\sigma_S} + 0.4761 \frac{F_{Max\ i} - \mu_{F_{Max}}}{\sigma_{F_{Max}}} \quad (4.2)$$

$$Co_i^3 = -0.1573 \frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E} + 0.8698 \frac{FF_i - \mu_{FF}}{\sigma_{FF}} - 0.3644 \frac{C_i - \mu_C}{\sigma_C} + 0.2916 \frac{S_i - \mu_S}{\sigma_S} - 0.0292 \frac{F_{Max\ i} - \mu_{F_{Max}}}{\sigma_{F_{Max}}} \quad (4.3)$$

où μ_i est la valeur moyenne du paramètre i pour tout l'ensemble des protozoaires et σ_i l'écart type.

Sur la Figure 4.2, la position moyenne de chaque espèce de protozoaire a été représentée dans un espace des composantes principales en trois dimensions. On observe que *V. microstoma* sans pédoncule, *Aspidisca sp.* et *Colpidium sp.* sont très proches. Cependant, *V. microstoma* avec pédoncule est assez bien isolée. Le même problème se pose par rapport à *V. convalaria* et à *Opercularia sp.* On peut ainsi constater que le pédoncule rend l'identification de certaines espèces plus facile.

La position de chaque espèce et l'écart type dû à la variabilité de chaque espèce sont présentés sur le Tableau 4.3. Les flagelles et les pédoncules augmentent les écarts types parce qu'ils peuvent changer de position et de taille. Néanmoins, leur présence assure une meilleure séparation et une meilleure identification des espèces. Le taux de reconnaissance double si on prend en compte les pédoncules. On observe que *Peranema sp.* présente une forte variabilité dans les trois axes. Ceci est dû à la variabilité de sa taille ainsi qu'à la taille et la position de son flagelle. Une des causes de la variabilité du flagelle est liée à sa focalisation et au pourcentage de sa longueur prise en compte lors de la binarisation de l'image.

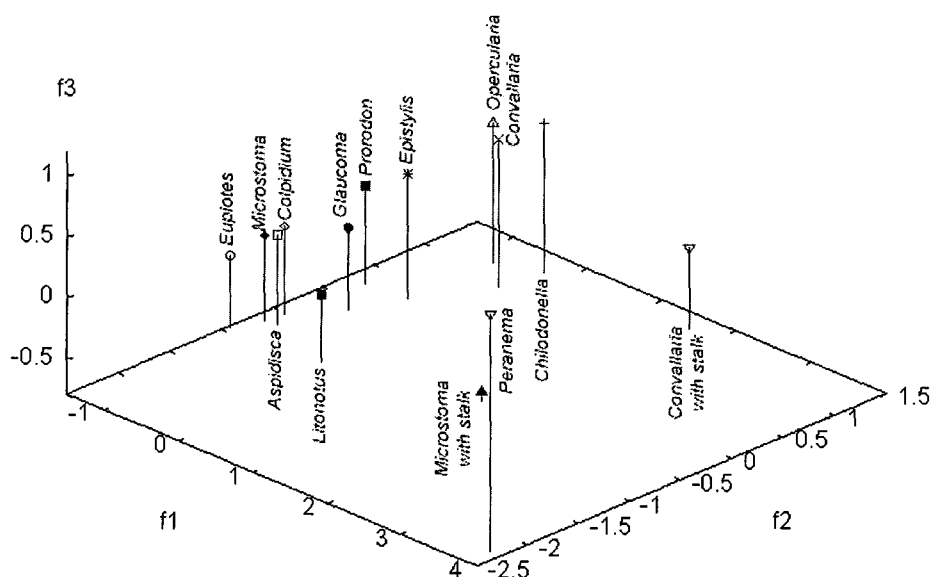


Figure 4.2 - Représentation 3D des espèces de protozoaires dans l'espace ACP (Da Motta et al., 2001)

Tableau 4.3 - Cordonnées de chaque espèce

	Coordonnées			Ecart type		
	f_1	f_2	f_3	f_1	f_2	f_3
<i>Aspidisca</i>	-1.29	-0.53	-0.07	0.32	0.42	0.22
<i>Tritigmostoma</i>	-0.21	1.22	0.43	0.36	0.98	0.51
<i>Colpidium</i>	-1.17	-0.69	-0.05	0.40	0.43	0.24
<i>Convallaria</i>	-0.29	0.83	0.42	0.43	0.74	0.40
<i>Convallaria avec pédoncule</i>	1.66	1.28	-0.13	0.96	1.16	0.92
<i>Epystilis</i>	-0.70	0.25	0.23	0.68	0.81	0.34
<i>Euplotes</i>	-1.45	-0.95	-0.20	0.31	0.19	0.21
<i>Glaucoma</i>	-0.91	-0.17	-0.10	0.25	0.16	0.24
<i>Litonotus</i>	-0.27	-0.91	-0.23	0.42	0.35	0.39
<i>Microstoma</i>	-1.33	-0.69	-0.09	0.34	0.29	0.26
<i>Microstoma avec pédoncule</i>	1.43	-0.57	-0.72	1.58	0.68	0.97
<i>Opercularia</i>	-0.72	1.10	0.35	0.50	1.15	0.35
<i>Peranema</i>	3.88	-2.29	1.16	2.17	1.92	3.09
<i>Prorodon</i>	-1.23	0.22	0.02	0.33	0.63	0.19
<i>Tetrahymena</i>	-1.48	-1.33	-0.07	0.38	0.24	0.28
<i>Trachelophyllum</i>	-0.69	-1.68	-0.11	0.27	0.24	0.56
<i>Zoothamnium</i>	-0.52	0.41	0.31	0.56	0.59	0.39
<i>Zoothamnium avec pédoncule</i>	0.99	1.25	-0.12	0.74	0.61	0.48

On a réalisé un suivi de la population des micro-organismes, sur la station de Nancy-Maxéville, pendant trois semaines. Les résultats de ce suivi sont présentés sur la Figure 4.3. On observe une forte présence des ciliés sessiles, qui indiquent des phénomènes transitoires et une efficacité en baisse (cf. Chapitre 1.4.1). En effet, les fortes pluies qui sont tombées au début du mois de mars/1999 ont provoqué des perturbations dans la station. La population des protozoaires et métazoaires dans une station d'épuration ne varie pas brutalement d'un jour à l'autre, sauf en cas d'entrée de toxiques. Généralement les modifications se mettent en place sur plusieurs jours.

La Figure 4.4 représente le pourcentage des espèces qui ont été collectées pendant le suivi. Quelques espèces n'étaient pas encore incluses dans la base de données et environ 22% des protozoaires n'ont pas été clairement identifiés par les experts. Ceci est dû d'une part à la difficulté de focalisation (parfois le protozoaire est incliné et occupe ainsi plusieurs plans de focalisation); la position du protozoaire par rapport au floc bactérien et d'autre part au fait que pour différencier deux espèces on a besoin d'informations sur la structure interne du protozoaire.

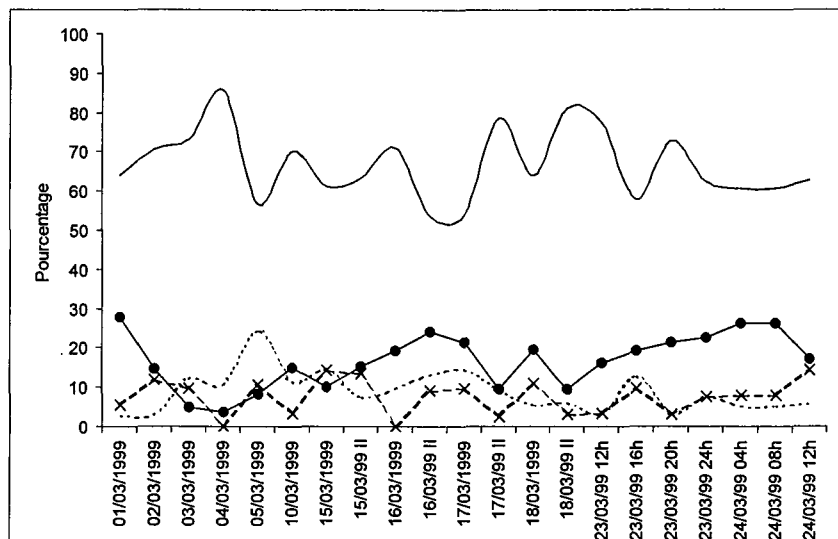


Figure 4.3 - Suivi de la population de protozoaires dans la station de Nancy-Maxéville. (—) ciliés sessiles; (●) ciliés nageurs; (---x---) mobiles de fond et (----) carnivores.

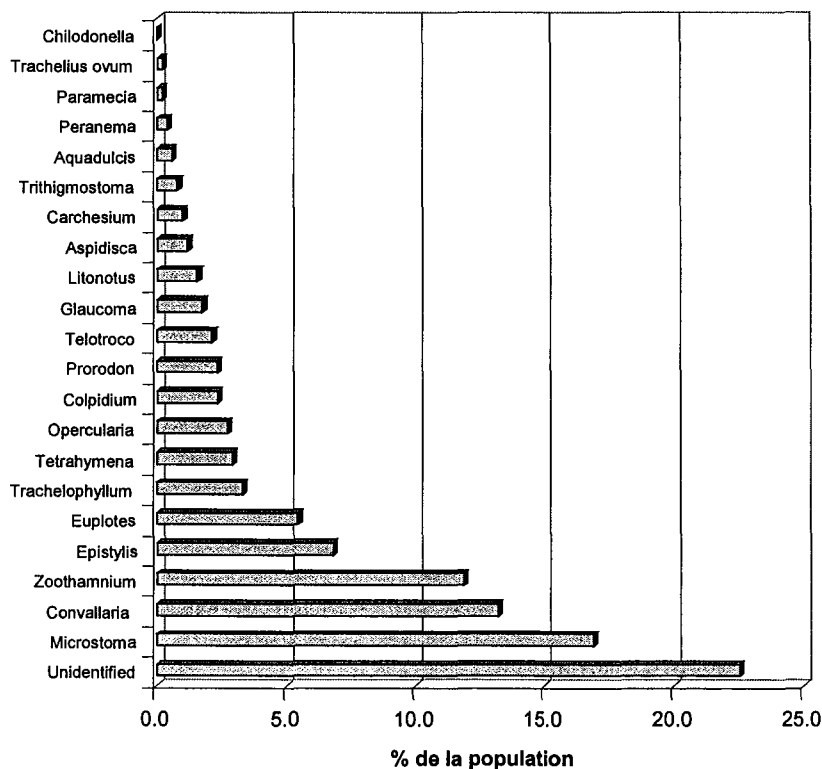


Figure 4.4 - Pourcentage des espèces de protozoaires présentes pendant le suivi de trois semaines sur la station de Nancy-Maxéville.

La procédure de reconnaissance semi-automatique a été appliquée seulement pour les protozoaires identifiés. Cela nous a permis ensuite de quantifier l'indice de reconnaissance (*IR*). Les coordonnées de chaque protozoaire dans l'espace des composantes principales ont été calculées par les Equations 4.1 à 4.3. La distance de chaque protozoaire à la position caractéristique de chaque espèce (Tableau 4.2) est ensuite calculée. Le protozoaire est alors associé à l'espèce pour laquelle la distance est la plus courte.

Les résultats obtenus par la classification ont été comparés avec ceux des experts. Les pourcentages de réussite pour l'identification des espèces présentes dans la base de données sont présentés dans la Figure 4.5.

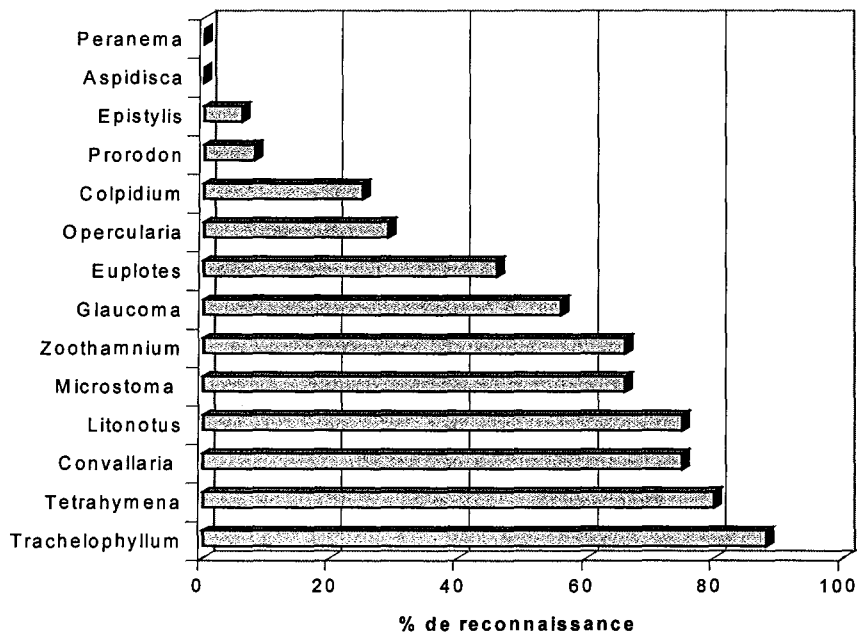


Figure 4.5 - Pourcentage de réussite pour l'identification des espèces de protozoaires.

L'indice de reconnaissance (*IR*) a été supérieur à 50% pour *Zoothamnium*, *V. microstoma* et *V. convalaria*, qui sont les espèces les plus abondantes pendant la période étudiée, ainsi que pour *Tetrahymena* et *Trachelophyllum*. D'autres espèces sont particulièrement difficiles à identifier: *Peranema sp.* et *Aspidisca sp.* *Peranema sp.* (Figure 4.6a) est l'une des nouvelles espèces qui a été introduite dans la base de données à cette époque et dont le nombre d'individus était encore faible. Un autre problème, déjà cité, pour cette espèce est la variabilité de taille et de forme du flagelle. *Aspidisca sp.* (Figure 4.6b et 4.6c) est un protozoaire de petite taille qui se trouve souvent sur la superficie des floes ou au sein du milieu liquide et qui se déplace à des vitesses élevées. Ces caractéristiques rendent difficiles sa focalisation et son isolement et en conséquence, son identification.

La population de protozoaires est un bon indicateur de l'efficacité d'une station d'épuration d'eau usée. La procédure semi-automatique développée a pour but de remplacer l'analyse manuelle qui est fastidieuse et lente. La séparation du protozoaire des floes de boues activées, est la clé pour la réussite du traitement. La nouvelle procédure adoptée a montré des limitations, surtout pour les petits protozoaires.

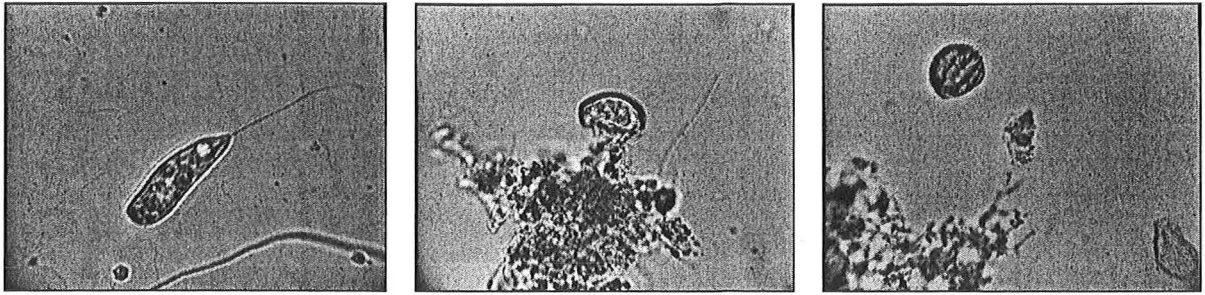


Figure 4.6 - Images des protozoaires de difficile reconnaissance : *Peranema sp.* (a) et *Aspidisca sp.* (b) et (c).

L'identification des espèces de protozoaire par le Programme ProtoRec v.1 à partir de leurs paramètres morphologiques, suivi d'une analyse statistique par analyse en composantes principales, a produit des indices de reconnaissance supérieures à 50 % pour la moitié des espèces étudiés. L'inclusion d'autres paramètres est donc nécessaire pour améliorer la reconnaissance, ainsi que la discrimination entre les espèces.

De plus, une méthode plus performante de classification a été recherchée: c'est l'analyse factorielle discriminante qui sera utilisée et présentée dans la section suivante.

4.2. ProtoRec v.2

Suite aux problèmes d'isolement des protozoaires décrit précédemment, la méthode de traitement d'image a été modifiée. Au lieu de régler le seuillage manuellement pour faciliter la séparation postérieure par segmentation automatique, l'opérateur doit maintenant découper la zone dans laquelle se trouve le protozoaire (chapitre 2.4.2.c).

Pour faciliter la reconnaissance, d'autres paramètres ont été ajoutés. Les descripteurs calculés sont: la surface de la silhouette (S) et son diamètre équivalent (D_{eq}), la longueur et la largeur de l'enveloppe polygonale convexe du protozoaire (données respectivement par les diamètres de Féret maximal (F_{max}) et minimal (F_{min})), son excentricité (E), sa circularité (C), le périmètre de Crofton (P_C), sa robustesse (Ω_1), son indice de plus grande concavité (Ω_2), son indice de concavité en surface (IC_s), l'indice de Féret (ou facteur de forme - FF) et $IP = P_{10}/P$ où P_{10} est le périmètre après une ouverture d'ordre 10.

On a aussi décidé de cibler nos études sur les protozoaires qui donnent le plus d'informations sur l'état de la station. Les protozoaires sélectionnés sont : *Aspidisca*, *Euplotes*, *Trithigmostoma*, *Litonotus*, *Trachelophyllum*, *Epystils*, *Opercularia*, *Carchesium*, *V. convalaria*, *V. aquadulcis*, *V. microstoma*, *Zoothamnium*. Les images de ces espèces ont été acquises pendant un suivi d'un an sur la station de Nancy et deux suivis de courte durée (2 et 4 semaines) sur la station de Braga. Les informations apportées par chacune de ces espèces sont présentées dans l'annexe A.

Pour analyser les différences entre les classes, l'analyse factorielle discriminante (AD) est plus adaptée que l'analyse en composante principale (ACP). L'utilisation de cette méthode requiert une phase d'apprentissage. Pour cette phase des ensembles de 30 individus de chaque espèce ont été sélectionnés, sauf pour *Euplotes* (27 individus) et *Litonotus* (26 individus) en se basant sur les ouvrages de Canler et al. (1999), Curds (1992), Madoni (1996) et en s'entourant de l'avis d'experts.

Des nouvelles variables sont créées, à partir des combinaisons linéaires des variables originales et mettent en relief les différences entre les classes de protozoaires. Compte tenu du fait que l'on travaille sur des êtres vivants, ils peuvent prendre plusieurs positions sous la caméra, ce qui induit une certaine dispersion des paramètres morphologiques et donc certaines difficultés d'identification. Les coordonnées des protozoaires dans le nouveau repère s'expriment par :

$$f_j^i = \sum_{k=1}^M V_j^k X_i^k \quad (4.2.1)$$

où M est le nombre de paramètres originaux ;

X_i^k est la valeur du paramètre k pour l'individu i et

V_j^k le vecteur propre du paramètre X^k sur l'axe j .

Les M paramètres X^k sont : excentricité (EI), Facteur de Forme (FF), circularité (C), robustesse (Ω_1), la plus grande concavité (Ω_2), l'indice de concavité (IC), l'indice de périmètre (IP), la surface (S), le périmètre de Crofton (P_C), la longueur (F_{max}), et largeur (F_{min}). Chaque classe de protozoaires est caractérisée par son centre de gravité dans le nouvel espace.

Dans une seconde phase on teste la classification à partir d'individus n'ayant pas été utilisés pendant la phase d'apprentissage : chaque individu est assigné à une classe de protozoaire en fonction de sa distance minimale, au sens de Mahalanobis (cf. Chapitre 2.4.6), aux centres des classes calculés pendant la phase d'apprentissage.

La classification se fait suivant un arbre de décision, un nouvel apprentissage étant réalisé à chaque étape. On sépare, dans un premier temps, les ciliés sessiles (donc possédant un pédoncule), avec et sans myonème (fibre contractile présente dans le pédoncule de certains protozoaires), des individus mobiles. Les protozoaires ciliés sessiles avec myonème considérés sont : *Carchesium* (Figure 4.2.1a), *Vorticella aquadulcis*, *Vorticella convallaria*, *Vorticella microstoma* (Fig. 4.2.1b) et *Zoothamnium*. Les protozoaires sessiles sans myonème pris en compte sont *Epistylis* (Figure 4.2.1c) et *Opercularia* (Figure 4.2.1d). Les ciliés mobiles, qui ne possèdent pas de pédoncule, sont : *Aspidisca cicada*, *Trachelophyllum*, *Litonotus* (un carnivore qui se nourrit d'autres protozoaires comme les vorticelles), *Trithigmostoma* (Figure 4.2.1e) et *Euplotes* (Figure 4.2.1f). Les protozoaires sessiles sont ensuite classés en fonction de la présence d'un myonème.

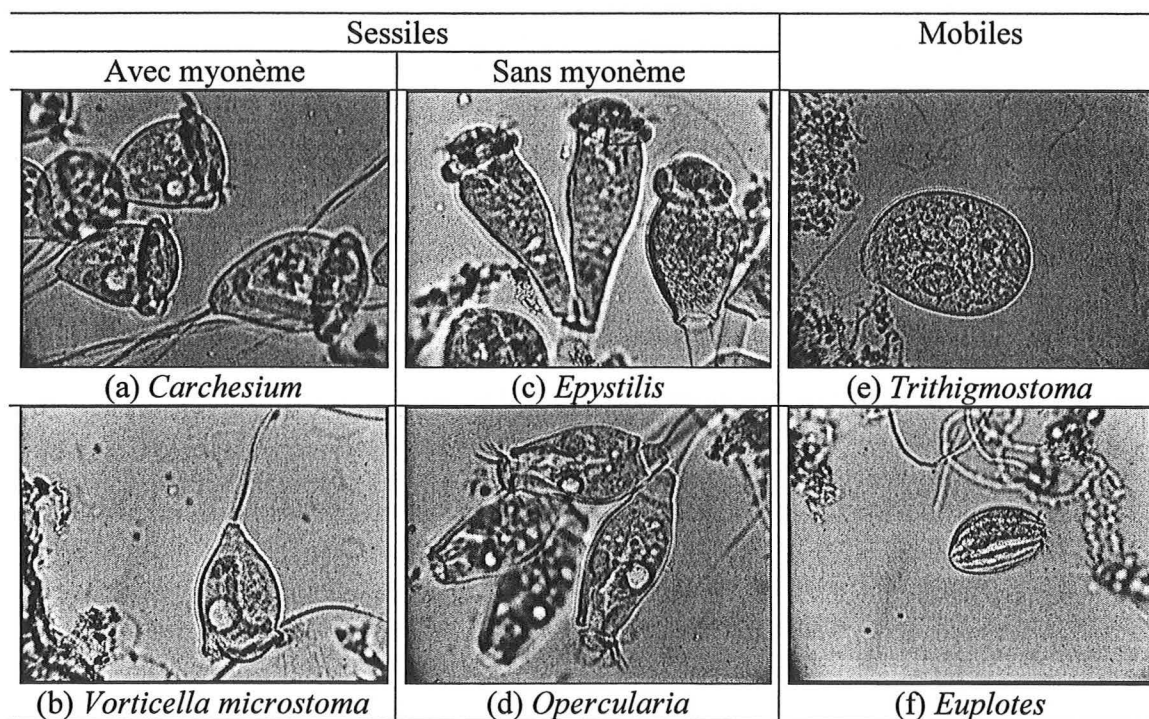


Figure 4.2.1 - Quelques exemples de protozoaires présents dans les stations d'épuration d'eaux usées.

En utilisant l'analyse factorielle discriminante (AD) on peut représenter 100% de la variabilité avec $n-1$ axes, où n est le nombre de classes ou d'espèces de protozoaires. Pour la séparation des espèces avec et sans myonème, ainsi comme pour les espèces sans myonème (*Opercularia* et *Epistylis*), un seul axe représente 100% de la variabilité. Par contre pour les sessiles avec myonème (*Carchesium*, *V. aquadulcis*, *V. microstoma*, *V. convallaria* et *Zoothamnium*) on doit utiliser quatre axes.

Si on analyse les cercles de corrélation (Figure 4.2.2) on observe une distribution des paramètres autour de l'axe f_1 pour le cas des protozoaires sessiles sans myonème. Par contre pour les protozoaires sessiles avec myonème et les mobiles on a une distribution assez uniforme.

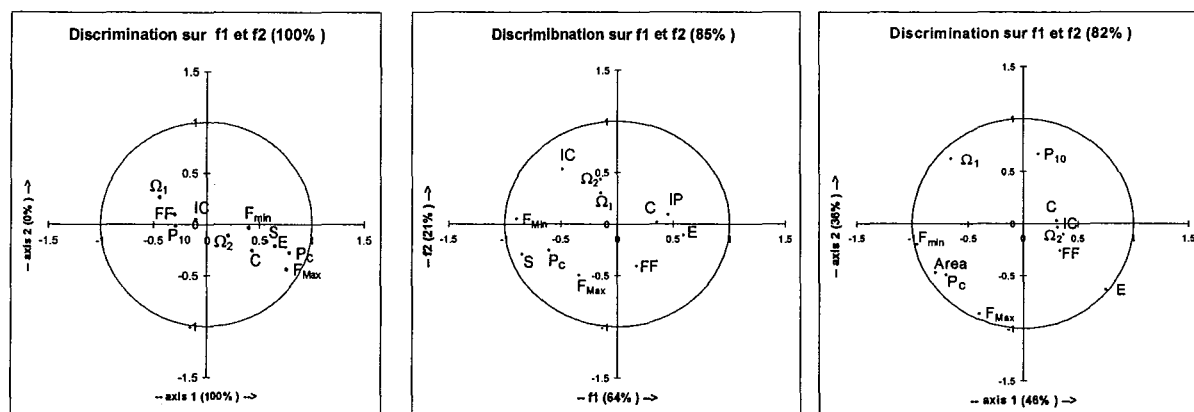


Figure 4.2.2 - Cercles de corrélation pour les axes 1 et 2. (a) sans myonème, (b) avec myonème et (c) mobiles

Tableau 4.2.1 - Valeurs propres et degré de représentativité des variables.

Avec myonème					Mobiles				
	f_1	f_2	f_3	f_4		f_1	f_2	f_3	f_4
Valeurs	2.03	0.66	0.30	0.17	Valeurs	7.10	5.53	2.22	0.58
Variabilité %	64%	21%	10%	5%	variabilité %	46%	36%	14%	4%
Var. cumulée %	64%	85%	95%	100%	Var. cumulée %	46%	82%	96%	100%

Pour la distinction entre les sessiles avec et sans myonème, les paramètres les plus importants sont: E , P_{10} , IC et Ω_1 . Si on veut séparer les espèces sans myonème, les paramètres les plus importants sont: E , Ω_2 , IC , C et Ω_1 .

Le Tableau 4.2.2 présente les corrélations entre les paramètres morphologiques et les nouveaux facteurs pour l'analyse discriminante des sessiles avec myonème et des mobiles. On observe que, dans la première analyse, les paramètres les plus importants, pour différencier les espèces, sont: la robustesse (Ω_1) et l'indice de concavité (IC), l'excentricité (E) suivi de leur indice de périmètre (P_{10}) et de la plus grande concavité (Ω_2). Il faut souligner que trois des cinq paramètres sont obtenus à partir de l'enveloppe convexe du protozoaire. Si on observe le poids des paramètres pour la séparation des mobiles, on voit que les paramètres sont à peu près les mêmes que pour les sessiles avec myonème et que seulement l'ordre d'importance est modifié.

Tableau 4.2.2 - Corrélation entre les descripteurs de forme des protozoaires et les nouveaux facteurs obtenus par AD.

Avec myonème					Mobiles				
	f_1	f_2	f_3	f_4		f_1	f_2	f_3	f_4
E	2.15	3.81	2.68	-0.89	E	6.67	-5.36	-7.30	9.90
FF	-0.17	-0.54	0.72	-0.17	FF	0.05	-1.24	-0.52	0.25
C	0.81	0.86	0.98	0.86	C	-0.30	-1.57	1.83	-2.35
Ω_1	6.77	6.81	-5.97	3.88	Ω_1	1.09	16.43	9.89	3.51
Ω_2	-0.58	-0.57	-6.07	6.21	Ω_2	-0.41	-14.71	12.20	-0.08
IC	-4.24	5.46	9.66	-2.73	IC	0.13	0.81	-2.30	-0.27
S	0.00	0.00	0.00	0.00	S	0.00	0.00	0.00	0.00
P_c	-0.02	0.00	0.01	-0.03	P_c	0.00	0.00	0.01	0.03
F_{Max}	0.02	-0.05	-0.03	0.09	F_{Max}	-0.01	-0.07	0.05	-0.06
F_{Min}	-0.03	0.08	0.03	0.12	F_{Min}	-0.07	-0.03	-0.04	-0.05
P_{10}	-0.03	-1.77	-4.42	-3.58	P_{10}	1.23	11.34	-5.87	2.57

La Figure 4.2.3a montre la bonne séparation entre les individus sessiles avec myonème et ceux sans myonème. Les deux espèces de sessiles avec myonème sont relativement bien séparées (Figure 4.2.3b). Par contre la distinction entre les différentes espèces de sessiles avec myonème (Figure 4.2.3c) s'annonce plus délicate : cela reflète les difficultés rencontrées par les experts lors de l'identification visuelle. Pour les mobiles (Figure 4.2.3d), le seul problème est la séparation entre *Euplotes* et *A. cicada*.

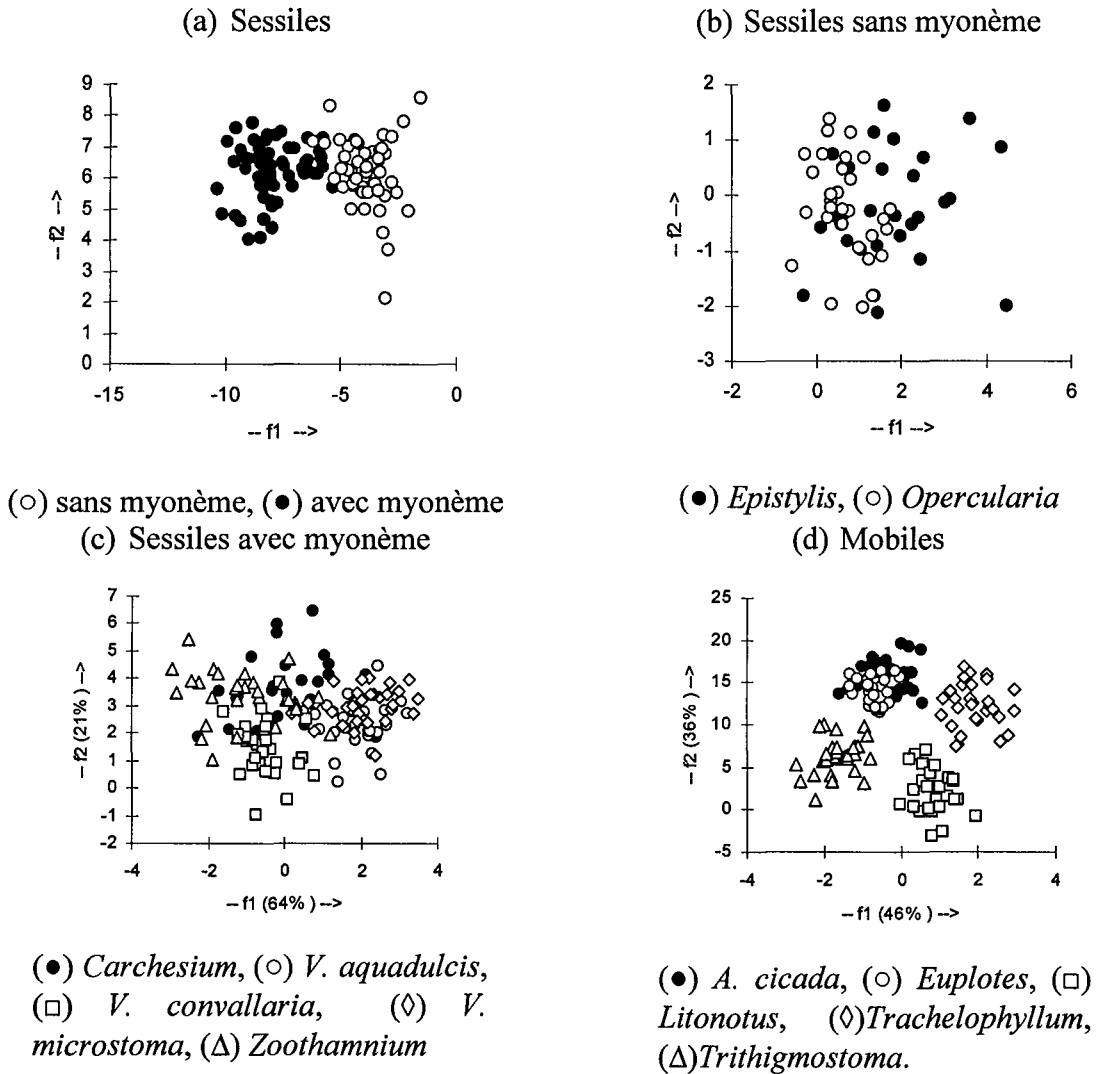


Figure 4.2.3 - Position dans les plans f_1 - f_2 des différentes espèces de protozoaires

Le Tableau 4.2.3 présente les centres de localisation et les écarts types des protozoaires dans l'espace de l'analyse discriminante. Pour les mobiles de fond, on a déjà observé la difficulté de la discrimination entre *Aspidisca* et *Euplotes*.

Si on les regarde au microscope, on peut voir que ces deux protozoaires se ressemblent beaucoup. La différence est que *Euplotes* est légèrement plus grand et plus allongé. Si on regarde leur mobilité, on constate que *Aspidisca* bouge plus fréquemment et à des vitesses plus élevées. La séparation est meilleure si on regarde les axes 1 et 4 plutôt que les axes 1 et 2. Les paramètres qui ont le plus de poids sur l'axe 2 sont : l'excentricité, la robustesse, la plus grande concavité et l'indice des périmètres (P_{10}). La plus grande concavité et l'indice des périmètres, pour les deux espèces, se rapprochent beaucoup. Sur l'axe 4 ces paramètres sont

supprimés ou ont un poids plus faible et de plus, la circularité permet de mesurer l'allongement des protozoaires et ainsi de mieux différencier ces deux espèces.

Tableau 4.2.3 - Centres de localisation et écart type des protozoaires

	Centres de localisation				Ecart type			
	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4
Mobiles								
<i>A. cic.</i>	-0.29	15.97	3.45	4.02	0.54	1.78	0.60	0.31
<i>Eup.</i>	-0.72	14.10	3.57	4.86	0.33	1.53	0.61	0.51
<i>Lit.</i>	0.86	2.07	4.19	4.36	0.45	2.58	0.75	0.23
<i>Trach.</i>	1.92	12.25	1.11	4.47	0.52	2.56	1.02	0.39
<i>Trith.</i>	-1.64	6.38	1.04	4.35	0.48	2.16	1.25	0.26
Sessiles avec myonème								
<i>Carch.</i>	0.14	3.53	-5.18	1.88	1.11	1.17	0.88	1.22
<i>V. aq.</i>	1.87	2.36	-4.64	0.93	0.67	0.86	1.16	0.91
<i>V. conv.</i>	-0.51	1.45	-5.66	1.37	0.54	0.98	0.85	0.81
<i>V. mic.</i>	2.07	3.02	-6.18	1.08	0.81	0.64	0.70	0.80
<i>Zooth.</i>	-1.03	3.35	-5.40	0.56	1.12	0.93	0.97	1.51
Sessiles sans myonème								
<i>Ep.</i>	1.73				1.17			
<i>Op.</i>	0.70				0.59			

Un autre facteur qui favorise la séparation, en utilisant l'axe 4 par rapport à l'axe 2, est un écart type plus faible. Les autres espèces de protozoaires mobiles se trouvent bien isolées (Figure 4.2.4b et d).

Les ciliés sessiles avec myonème ont des centres de localisation proches, surtout les paires *Zoothamnium*, *Carchesium* et *V. microstoma*, *V. aquadulcis*. L'identification de la *V. aquadulcis*, par observation manuelle, se fait en général grâce aux stries de son corps. Ces stries pourraient être utilisées dans l'identification, par analyse d'image, si on réalise une analyse de la texture de sa surface.

Le Tableau 4.2.4 indique les taux de reconnaissance obtenus pendant la phase de validation, au cours de laquelle on classe 30 individus de chaque espèce qui n'ont pas participé à la phase d'apprentissage. La qualité de la reconnaissance a été appréciée en fonction de son degré : elle est qualifiée de bonne (> 70%), de raisonnable (entre 50 et 70%), de faible (entre 30 et 50%) et de mauvaise (en dessous de 30%).

Les sessiles, que l'on rencontre lorsque la qualité du traitement d'épuration est bonne, sont *Carchesium*, *Zoothamnium* et *V. aquadulcis*. On obtient une bonne reconnaissance, en général, sauf pour les *Vorticelles*. En fait l'ensemble des *Vorticelles* peut facilement être séparé des autres protozoaires, mais il est souvent difficile, même pour un expert, de distinguer les différentes espèces de *Vorticelles* entre elles. Or certaines espèces sont indicatrices d'une bonne qualité du traitement, d'autres non; il y a donc un intérêt à pouvoir les isoler. La distinction entre *Carchesium* (degré de reconnaissance 37%), *Vorticella aquadulcis* (53%) et *Zoothamnium* (67%) est plus délicate.

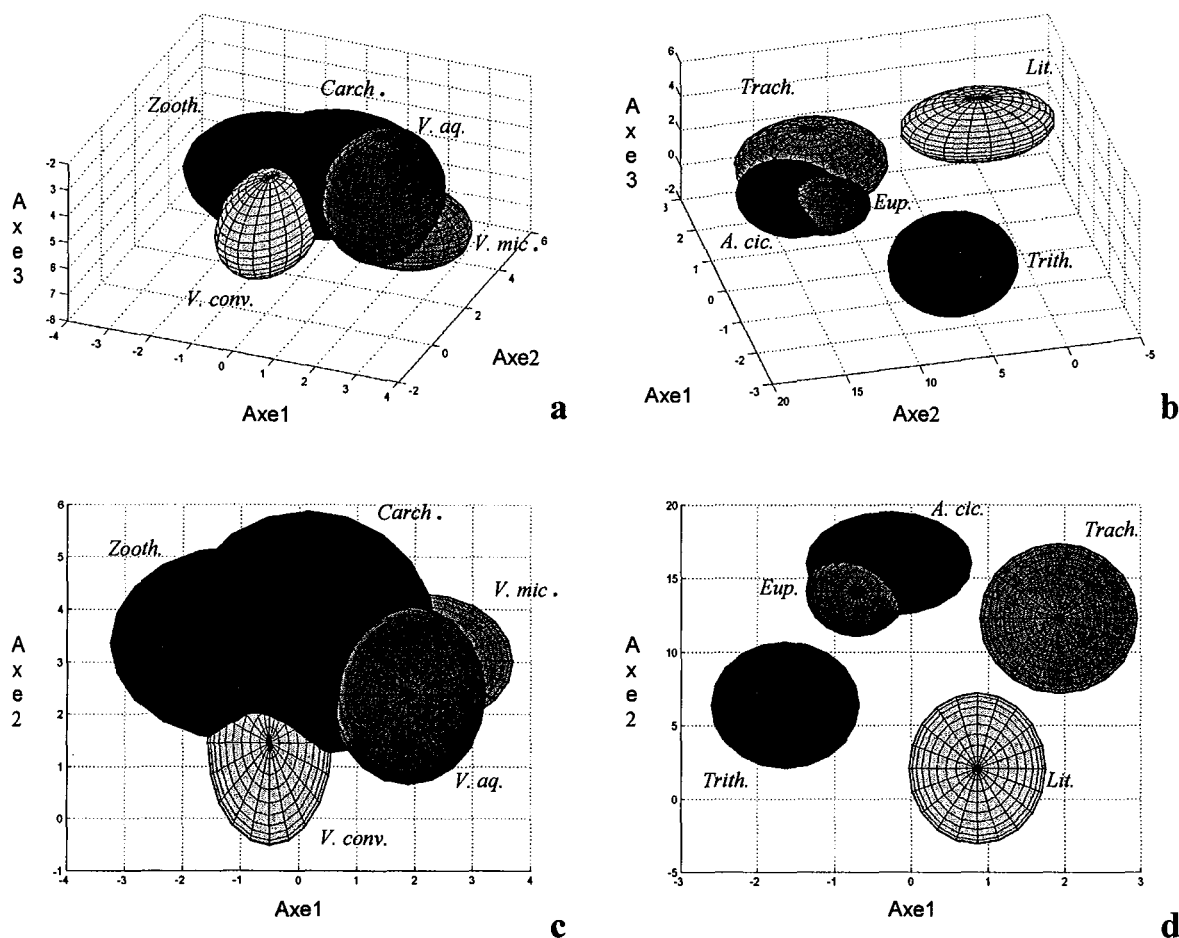


Figure 4.2.4 - Représentation dans l'espace de l'analyse discriminante des ciliés sessiles avec myonème (a) et (c) et des ciliés mobiles (b) et (d).

Tableau 4.2.4 - Qualité et degré de reconnaissance selon les protozoaires pendant la phase de validation ;
+ = bonne épuration, - = épuration médiocre.

Type de protozoaires	Qualité de la reconnaissance	Taux de reconnaissance (%)	Qualité du traitement d'épuration
<i>Aspidisca</i>	Bonne	73	
<i>Trithigmostoma</i>	Bonne	73	+
<i>Euplotes</i>	Bonne	81	
<i>Litonotus</i>	Bonne	92	
<i>Trachelophyllum</i>	Bonne	77	-
<i>Opercularia</i>	Raisonnable	60	-
<i>Epistylis</i>	Bonne	70	+
<i>Carchesium</i>	Faible	37	+
<i>V. aquadulcis</i>	Raisonnable	53	+
<i>V. convallaria</i>	Mauvaise	20	
<i>V. microstoma</i>	Faible	33	-
<i>Zoothamnium</i>	Raisonnable	67	+
Mobiles de fond	Bonne	81	
Sessiles favorables	Bonne	77	+

En ce qui concerne les mobiles, le taux de reconnaissance est supérieur à 70% pour *Aspidisca cicada* et *Euplotes*.

Si on compare les indices de reconnaissance (Tableau 4.2.4) avec ceux de la version antérieure (Figure 4.1.5), on voit que le taux de reconnaissance a augmenté sensiblement. On est passé d'un taux de reconnaissance moyen de 45% à plus de 70%. On peut constater que le problème de reconnaissance de *Aspidisca* a été résolu (73%). Les ciliés sessiles sans myonème ont connu aussi de très importantes augmentations de leur taux de reconnaissance. Par contre on a eu une forte réduction pour les ciliés sessiles avec myonème, et surtout pour *V. convalaria*, qui a été confondu à plusieurs reprises avec *Zoothamium* (33%) et *Carchesium* (33%).

L'analyse des groupes de protozoaires nous a montré que les fausses identifications d'une espèce la faisait souvent tomber dans une autre espèce du même groupe. Pour les mobiles de fond on a obtenu un taux de reconnaissance de 81% et pour les ciliés sessiles, indicateur de bon fonctionnement de la station, on a eu 77%.

La nouvelle procédure développée, pour la reconnaissance semi-automatique de protozoaires présents dans les boues activées, présente une nette amélioration par rapport à la précédente. La sélection de la zone d'intérêt, où se trouve l'individu sur l'image, a démontré être une bonne solution pour le problème de séparation des protozoaires. Même si cela doit se faire de façon manuelle, cette procédure d'identification reste simple et rapide.

La classification selon l'espèce, par analyse factorielle discriminante, a favorisé la séparation des espèces, mais la dispersion élevée des points (fort écart type) rend parfois difficile la distinction entre les protozoaires. Une augmentation du nombre d'individus, pour la phase d'entraînement et la validation, pourrait réduire cette dispersion.

Durant la phase de validation, un taux de reconnaissance supérieur à 70% a été obtenu pour la plus grande partie des espèces prises en compte, ce qui est supérieur à ce qui avait été obtenu précédemment, sauf pour les *Vorticelles*. De nouvelles modifications de la procédure de calcul ont alors été envisagées, pour analyser les sessiles avec et sans pédoncule, et obtenir ainsi des nouveaux paramètres qui devraient permettre d'améliorer leur identification. Les résultats liés à ces modifications sont présentés dans la section 4.3.

4.3 ProtoRec v.3

Pendant l'hiver 2000-2001, la ville de Braga (Portugal) a été frappée par de fortes pluies. Cela a provoqué plusieurs problèmes à la station d'épuration: débit trop élevé, entrée de sables dans les bassins, forte réduction de la charge organique, etc. A cause des sables elle a dû être arrêtée plusieurs fois pour nettoyage. Compte tenu de ce régime intermittent et des conditions de stress auxquelles a été soumise la microfaune du bassin, un suivi a été effectué jusqu'à l'arrêt complet de la station. Ce suivi a débuté le 19/03/01, quand la station fonctionnait normalement. Le 20/03 l'alimentation du bassin biologique a été coupée, l'aération et la recirculation entre le bassin d'aération et le clarificateur restant en fonctionnement. L'après-midi du 26/03/01, la recirculation a été arrêtée et le jour suivant c'est l'aération qui l'a été. Le suivi de cette station a pris fin à cet instant.

Les résultats de ce suivi avec ceux de la station de Nancy ont permis encore d'améliorer la base de données du programme ProtoRec, avec l'inclusion de nouvelles espèces de protozoaires et de certains métazoaires. Afin d'améliorer la séparation entre les espèces, la procédure de calcul a été légèrement modifiée.

Dans ce chapitre on va d'abord présenter les résultats du suivi de la station de Braga et ensuite les modifications sur le programme d'identification et les résultats obtenus avec cette nouvelle version (ProtoRec v.3).

4.3.1. Le suivi de la station de Braga

Pour analyser les résultats du suivi de la station, on utilise initialement les informations fournies par les groupes de protozoaires et puis celles fournis par les espèces. La Figure 4.3.1 présente l'évolution des groupes de protozoaires et métazoaires. Le vieillissement de la boue est mis en évidence par le développement des sessiles, la réduction des ciliés non sessiles (nageurs et mobiles de fond) et l'apparition des métazoaires.

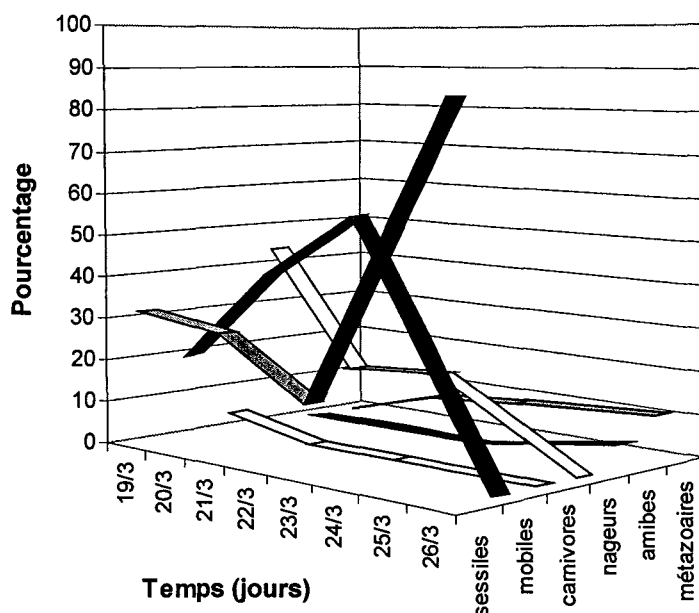


Figure 4.3.1 – Evolution des groupes de protozoaires et métazoaires présents dans la station d'épuration de Braga en fonction du temps.

Au début on observe une réduction des ciliés nageurs (*Trachelophyllum*), qui n'arrivent plus des réseaux d'égout et sont lessivés par surverse du clarificateur. Cette phase est suivie d'une augmentation des mobiles de fond, qui se nourrissent généralement des bactéries qui sont sur la surface des floccs. Avec la réduction du substrat les bactéries commencent à disparaître, provoquant ensuite la réduction de la population des mobiles de fond.

La proportion des ciliés sessiles diminue tandis que celle des mobiles augmente fortement. Cette augmentation est due surtout à la présence des *Opercularia*, qui résistent aux conditions de stress comme la limitation d'oxygène ou de nutriments. Ce changement d'espèce dominante des mobiles de fond aux sessiles indique une chute de l'efficacité de la station. Ces informations nous permettent de conclure que la station peut être relancée en bonnes conditions jusqu'à trois jours après l'arrêt de l'alimentation, si l'aération et la recirculation sont maintenues.

L'analyse par espèces est présentée sur la Figure 4.3.2. La première observation porte sur la réduction de la diversité de la microfaune. Au début on avait 11 espèces différentes dans le bassin d'aération et une semaine après on n'en retrouve plus que la moitié. La première espèce dominante est *Trachelophyllum* qui représente 45% de la population totale. Ce cilié se nourrit de bactéries et petits flagellés et on le trouve dans tous les domaines de charge. Canler et al. (1999) précisent aussi que sa concentration est proportionnelle à la charge: si elle est l'espèce dominante, l'épuration est alors souvent médiocre et ceci indique qu'il se produit des phénomènes transitoires.

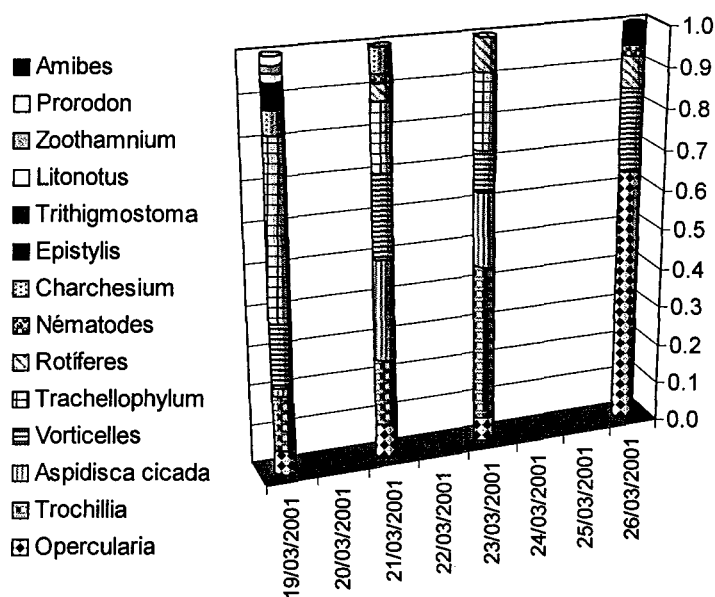


Figure 4.3.2 – Evolution des espèces de protozoaires et métazoaires en fonction du temps.

Au troisième jour d'analyse il y avait une prédominance de l'espèce *Trochillia* qui est un indicateur d'un effluent de bonne qualité (Canler et al., 1999). Cette espèce peut aussi indiquer des phases de catabolisme, où les bactéries consomment leurs réserves énergétiques et libèrent des sels minéraux, dont les nitrates. A la fin on observe une dominance de *Opercularia*. Résistant aux conditions de stress telles que la présence de certains toxiques (sels, métaux lourds, etc.), l'acidité et le manque d'oxygénation, sa présence est associée à des rendements médiocres à bons et à des effluents avec une concentration importante en

ammonium. On peut ainsi confirmer la réduction de la qualité d'épuration de la microfaune après 6 jours sans alimentation.

4.3.2. Reconnaissance des espèces par ProtoRec v.3

Compte tenu des résultats précédents, on a décidé d'augmenter le nombre d'individus de chaque espèce dans la phase d'entraînement et dans la phase de validation. On a ainsi obtenu 50 individus de chaque protozoaire pour la phase d'entraînement de l'analyse discriminante (excepté pour *Trochilia* avec 37 individus) et on a essayé d'avoir 50 individus pour la validation. Cependant cela n'a pas été possible pour tous les protozoaires, comme on le voit sur la Figure 2.38 du chapitre 2.4.3 .

Ensuite, le programme ProtoRec v.3 a été utilisé pour calculer les paramètres morphologiques des floccs. Après l'obtention des paramètres on a procédé au traitement en utilisant l'analyse factorielle discriminante par classes. La première classification prend en compte tous les protozoaires et métazoaires classés en cinq groupes:

Groupe	Protozoaires	Groupe	Protozoaires
avec cils (Cili)	<i>A. cicada</i> <i>Euplotes</i>	Pédoncule Fin (PedF)	<i>Peranema</i> <i>V. aquadulcis</i> <i>V. microstoma</i> <i>Carchesium</i> <i>Suctorina</i> <i>V. convallaria</i> <i>Zoothamnium</i>
Grands (Grnd)	<i>Nématode</i> <i>Aelosoma</i>		
Lisses (Lis)	<i>Euglypha</i> <i>Arcella</i> <i>Trachelophyllum</i> <i>Trithigmostoma</i> <i>Trochilia</i>	Pédoncule Large (PedL)	<i>Epistylis</i> <i>Opercularia</i> <i>Digononta</i> <i>Monogononta</i> <i>Litonotus</i>

Figure 4.3.3 - Classification de tous les protozoaires par groupe, selon leurs caractéristiques morphologiques.

Les métazoaires *Digononta* et *Monogononta* ainsi que le protozoaire carnivore *Litonotus* n'ont pas de pédoncule, mais ils ont été classés en pédoncule large du fait de leur forme.

Les résultats obtenus (Tableau 4.3.1) montrent que, à part pour les grands protozoaires, les autres classes sont assez proches les unes des autres. En utilisant quatre axes de l'analyse discriminante on peut représenter 100% de la variabilité des groupes.

Tableau 4.3.1 - Distance de Mahalanobis entre les groupes de la première classification

entre \ et	Cili	Grnd	Lis	PedF	PedL
Cili	0.00	164.57	16.38	21.77	29.55
Grnd	164.57	0.00	162.06	147.48	135.02
Lis	16.38	162.06	0.00	21.61	16.62
PedF	21.77	147.48	21.61	0.00	12.09
PedL	29.55	135.02	16.62	12.09	0.00

La Figure 4.3.4b montre une représentation bidimensionnelle des groupes, où le centre de chaque ellipsoïde est la coordonnée centrale de chaque groupe et la largeur, l'épaisseur et la hauteur la dispersion dans les axes.

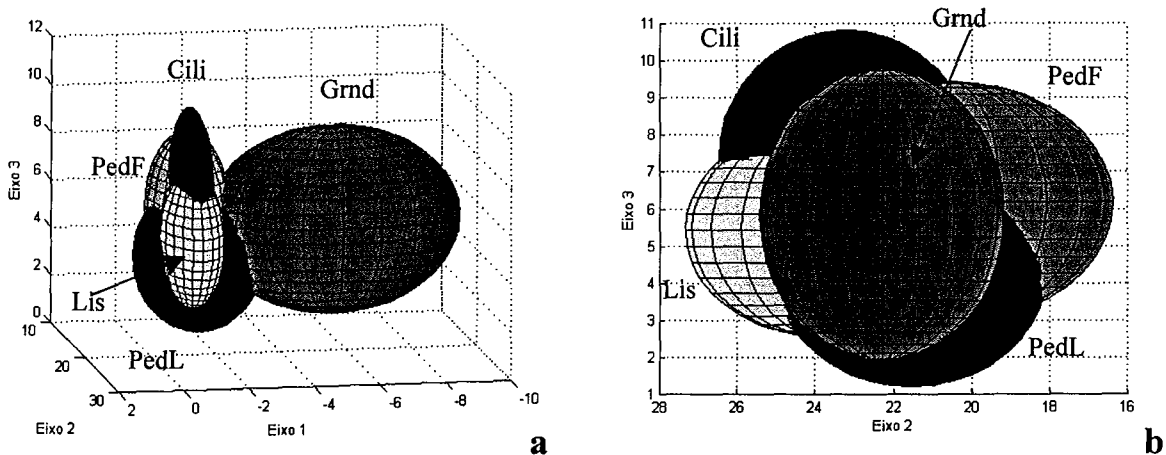


Figure 4.3.4 - Représentation des groupes du premier classement en trois (a) et deux (b) dimensions des protozoaires et métazoaires.

La séparation entre les gros métazoaires *Nématodes* et *Oligochètes* est évidente, même par un opérateur sans beaucoup d'expérience, à cause de la taille et de l'épaisseur plus importante de ces derniers. Par contre la discrimination entre *Aspidisca cicada* et *Euplotes* n'est pas aussi évidente, comme on l'a déjà vu précédemment. Néanmoins une bonne identification de ces espèces de protozoaires a été obtenue.

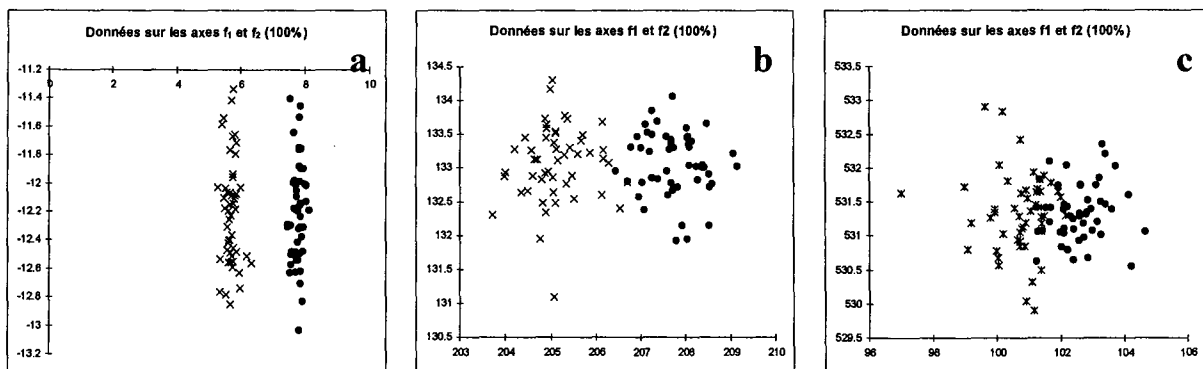


Figure 4.3.5 - Séparation entre *Nématodes* (x) et *Oligochètes* (•) (a), entre *Aspidisca cicada* (x) et *Euplotes* (•) (b) et *Epistylis* (x) et *Opercularia* (•)(c)

Pour la séparations des groupes "Cili" (*Aspidisca cicada* et *Euplotes*), "Grnd" (*Nématodes* et *Oligochètes*) ainsi que pour le sous-groupe des "avec pédoncule" du groupe "pédoncule large" (*Epistylis* et *Opercularia*), un seul axe est suffisant pour séparer les espèces (Figure 4.3.5).

Ensuite les espèces du groupe des "lisses" ont été discriminées (Figure 4.3.6). Même si les ellipsoïdes se touchent, on a obtenu de bons indices de reconnaissance pour ces espèces.

Pour le groupe de protozoaires à pédoncule fin, on a d'abord séparé les protozoaires en deux sous-groupes : "corps fin" (*V. aquadulcis*, *V. microstoma* et *Peranema*) et "corps large" (les *Suctoriens*, *Zoothamnium*, *V. convalaria* et *Carchesium*). La séparation entre *V. microstoma* et *V. aquadulcis* est très difficile: on a déjà vu que souvent on fait appel à leur caractéristique surfacique (rugosité) pour les identifier. Cette ressemblance entre les espèces est mise en

évidence par une distance de Mahalanobis proche à 10. On peut voir sur la Figure 4.3.7 que leurs coordonnées centrales sont très proches. Même avec ces difficultés, des indices de reconnaissance supérieure à 70% pour toutes les espèces de ce sous-groupe ont été obtenus.

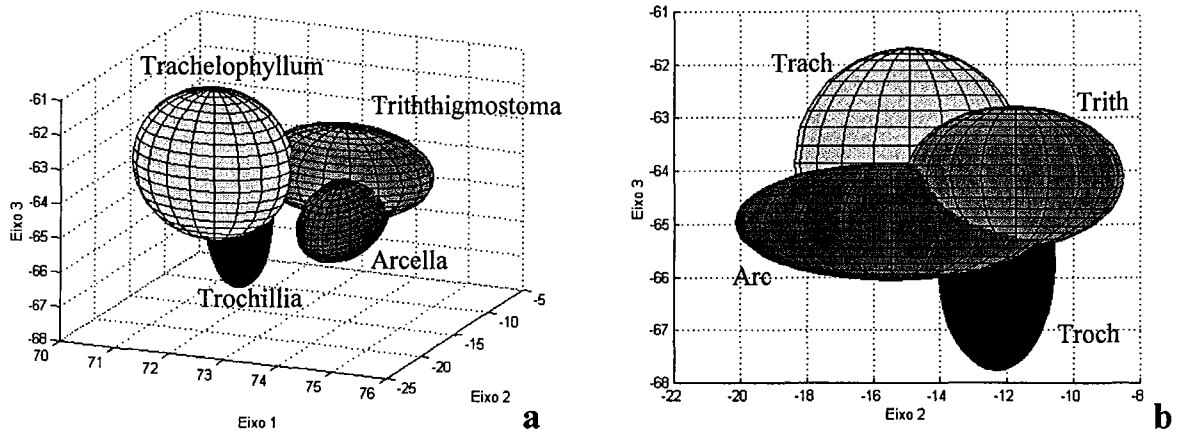


Figure 4.3.6 - Représentation des espèces du groupe "lises" des protozoaires en 3D (a) et 2D (b).

Par contre, pour le sous-groupe des corps larges, à part les *Suctoriens*, les autres espèces sont trop proches (distances de Mahalanobis proches de 5), ce qui rend mauvais les résultats d'identification automatique.

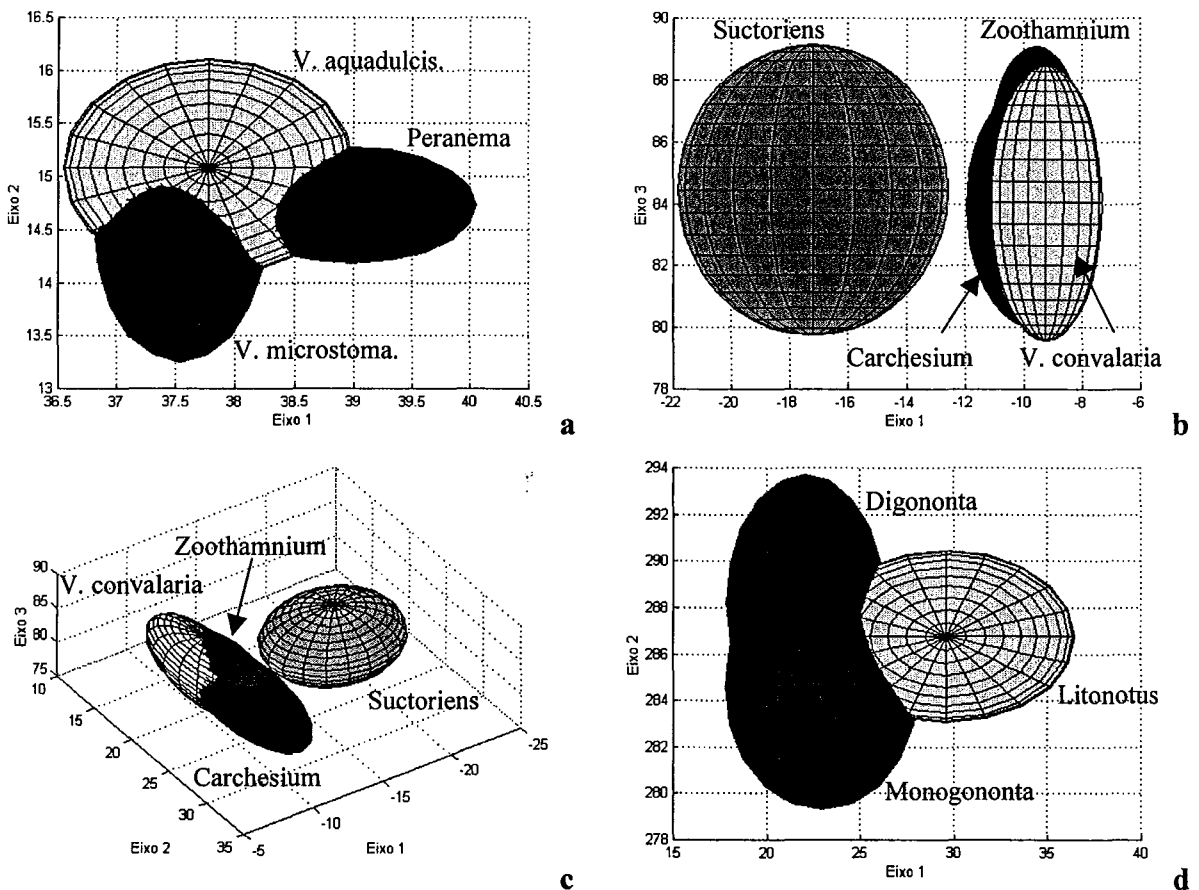


Figure 4.3.7 - Représentation des espèces du groupe "Pédoncule fin" des protozoaires: (a) les corps fins, (b) et (c) les corps larges et (d) du groupe "Pédoncule large", sous-groupe sans pédoncule.

Les protozoaires et métazoaires groupés en "pédoncule large" ont été divisés en deux sous-classes: avec pédoncule (*Epistylis* et *Opercularia*) et sans pédoncule (*Digononta*, *Monogononta* et *Litonotus*). La séparation des espèces du sous-groupe "sans pédoncule" a été assez simple et on a obtenu des indices de reconnaissance entre 70% et 90%.

Ayant pour but d'améliorer la reconnaissance des espèces, une deuxième séparation par classe a été effectuée. Les trois classes prises en compte sont présentées dans le Tableau 4.3.2.

Tableau 4.3.2 - Deuxième séparation par classes

Classe 1	Classe 2	Classe 3
<i>Carchesium</i>	<i>Opercularia</i>	<i>A. cicada</i>
<i>Epistylis</i>	<i>V. aquadulcis</i>	<i>Euglypha</i>
<i>Monogononta</i>	<i>V. microstoma</i>	<i>Euplotes</i>
<i>Trithigmotoma</i>		<i>Litonotus</i>

Les Figure 4.3.8 a 4.3.10 présentent les nouvelles coordonnées centrales et dispersion des espèces de la deuxième classification.

Dans la revue bibliographique (Chapitre 1.4), on a vu que l'on peut obtenir des informations de l'état biologique de la station à partir du groupe de protozoaire dominant et que les métazoaires apporte des informations sur l'âge des boues. Les résultats obtenus pour l'identification de chacun des ces groupes sont présentés dans le Tableau 4.3.3. La moyenne des indices de reconnaissance obtenus pour tous les protozoaires identifiés par groupes est de 92 %.

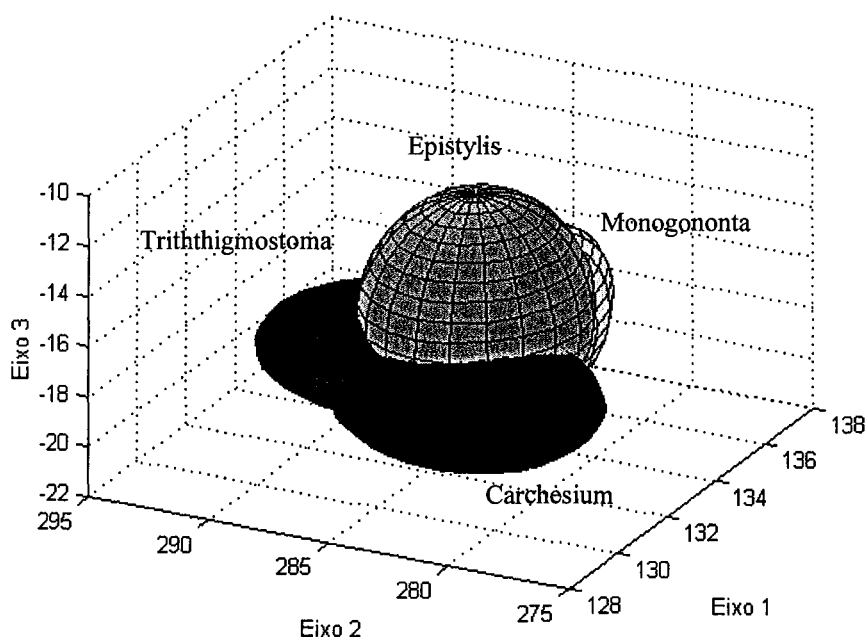


Figure 4.3.8 - Représentation 3D de la classe 1 de la deuxième classification

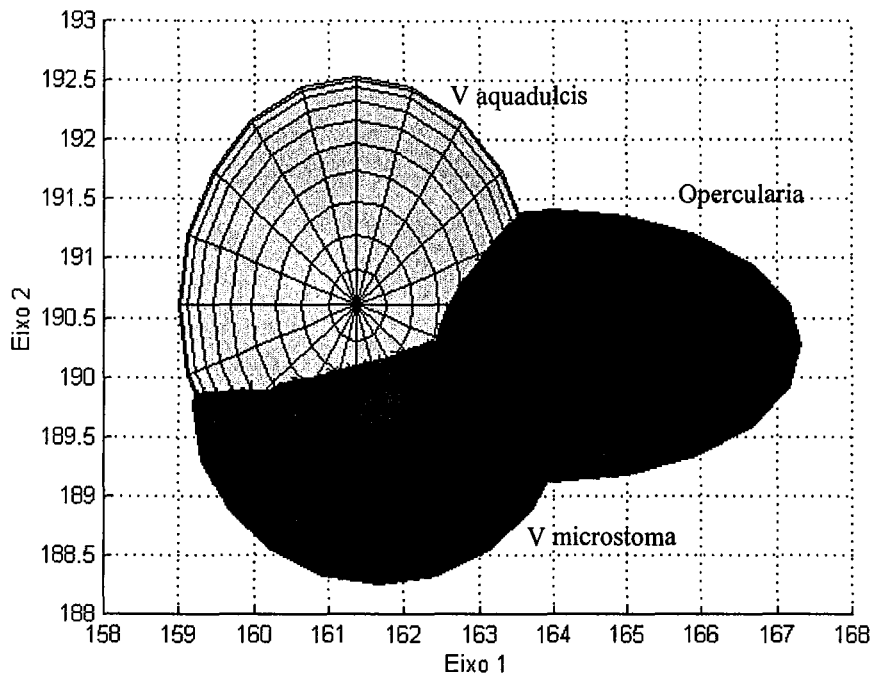


Figure 4.3.9 - Représentation 2D de la classe 2 de la deuxième classification

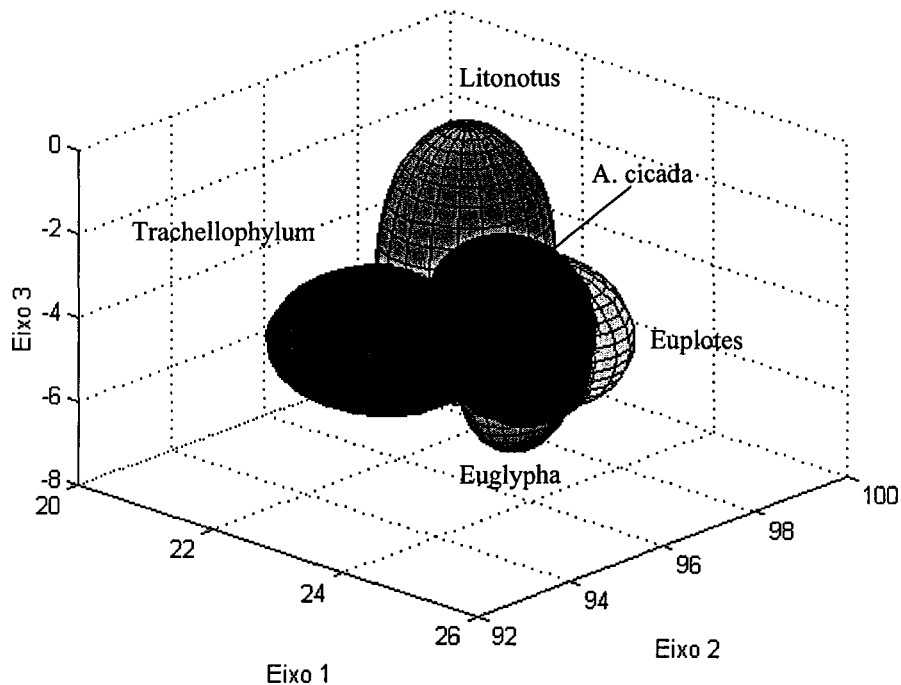


Figure 4.3.10 - Représentation 3D de la classe 3 de la deuxième classification

Dans le groupe des ciliés, on a une séparation selon le régime alimentaire et selon la mobilité (cf. Chapitre 1.4.1 Figure 1.4.2). Les résultats obtenus pour les classes des ciliés sont présentés dans le tableau 4.3.3. Le pourcentage moyenne d'identification de ces classes a été de 91 %.

Tableau 4.3.3 – Pourcentages de reconnaissance pour chaque groupe

Ciliés	94 %
Flagellés	88 %
Métazoaires	86 %
Amibes	83 %

Tableau 4.3.4 – Pourcentages de reconnaissance pour chaque classe de cilié.

Carnivores	94 %
Mobiles de Fond	92 %
Sessiles	90 %
Nageurs	86 %

Les résultats obtenus pour la validation de cette méthode se trouvent sur le Tableau 4.3.3. La moyenne obtenue pour tous les protozoaires identifiés individuellement a été de 75%.

Tableau 4.3.5 – Pourcentages de reconnaissance pour chaque espèce

	% REC.	
<i>Nématode</i>	100 %	Excellent
<i>Suctoria</i>	98 % *	
<i>Trochilia</i>	95 % *	
<i>Litonotus</i>	90 %	
<i>Peranema</i>	88 %	Bon
<i>Arcella</i>	86 %	
<i>Trachellophyllum</i>	86 %	
<i>Euplotes</i>	84 %	
<i>Aelosoma</i>	81 %	
<i>Euglypha</i>	80 %	
<i>Aspidisca cicada</i>	78 %	
<i>Vorticella Aquadulcis</i>	78 %	
<i>Monogononta</i>	76 %	
<i>Trithigmostoma</i>	74 %	
<i>Digononta</i>	71 %	Raisonnable
<i>Vorticella Microstoma</i>	70 %	
<i>Vorticella Convallaria</i>	66 %	
<i>Epistylis</i>	56 %	
<i>Zoothamnium</i>	52 %	
<i>Carchesium</i>	43 %	Faible
<i>Opercularia</i>	42 %	

* estimation à partir des données d'entraînement

Les résultats obtenus avec le programme ProtoRec v.3 sont très encourageants et cette troisième version doit pouvoir être utilisée rapidement dans les stations d'épuration d'eau usées par voie biologique.

Conclusion Générale et Perspectives

*"La seule chose que j'ai comprise
est que je ne sais rien"*

SOCRATES

L'objectif de cette étude était de développer des procédures d'analyse de la microfaune des boues activées des stations d'épuration des eaux usées par analyse d'image. Ces analyses devaient concerner d'une part la quantification automatique des bactéries filamenteuses et la caractérisation morphologique des floccs bactériens. Les paramètres obtenus par cette analyse devaient pouvoir être mis en rapport avec des mesures classiques de décantabilité des boues (Indice de Mohlman). D'autre part une deuxième procédure devait permettre une identification des espèces de protozoaires présents, afin de quantifier leur présence et d'en tirer ainsi des informations sur l'état biologique du bassin d'aération

L'étude des bactéries

Pour effectuer la quantification des bactéries filamenteuses et le calcul des paramètres morphologiques des floccs bactériens, une procédure d'analyse d'image a été développée sous Visilog5. Les essais de reproductibilité effectués ont démontré qu'avec un suivi précis de la méthodologie d'analyse (cf. Chapitre 2.2.3) des erreurs inférieures à 5% pouvaient être obtenues. Cette procédure automatique repose sur des images dont l'acquisition est simple: la préparation a été volontairement minimisée (état frais entre lame et lamelle).

Le suivi de la station de Nancy-Maxéville nous a permis de vérifier que l'on pouvait détecter l'instant d'entrée en "état de bulking" par analyse d'image. Cependant la "belle" corrélation entre la longueur totale des filaments et l'Indice de Mohlman présentée en Jenkins et al. (1993) n'a pas été observée, parce que les valeurs de l'Indice de Mohlman sont restées presque toujours entre 50 et 200 mL/g. Une autre raison est la variation des caractéristiques des floccs, surtout de leur diamètre équivalent. On a aussi pu constater que les phénomènes de bulking filamenteux se développaient souvent après de fortes périodes de pluie, à cause de la dilution

du substrat. De plus il apparaît que la vitesse de décantation est plus corrélée avec la fraction décantée après 30 minutes (H_{30}/H_i) qu'avec l'Indice de Mohlman (IM). Cela est dû probablement à la variation des propriétés des floccs.

Le suivi sur 12 stations nous a ensuite permis de valider le programme d'analyse d'image sur des floccs bactériens de caractéristiques très distinctes, car ils ont été obtenus sur des installations de différentes capacités et conceptions. Cette étape a permis d'ajuster le programme (deuxième version de FloccMorph).

En analysant la dimension fractale des floccs, obtenue par analyse d'image, on se rend compte qu'elle varie avec la longueur des filaments et inversement avec le diamètre équivalent mésoscopique des floccs. La compétition entre les bactéries qui sont dans les floccs et celles qui sont dans le milieu liquide a été mise en évidence par une corrélation entre le diamètre équivalent mésoscopique des floccs et le nombre des filaments. Les résultats obtenus par l'analyse macroscopique des floccs ont validé l'information que la dimension fractale varie inversement avec le diamètre équivalent des floccs. On a observé que l'utilisation isolée de l'Indice de Mohlman pour évaluer la décantabilité peut provoquer de mauvaises interprétations, le plus sûr étant de l'utiliser conjointement avec la fraction (H_{30}/H_i). Enfin, on a pu constater que moins de 20% des stations visitées fonctionnaient opéraient sans problème de décantation, ce qui renforce la nécessité d'un suivi plus facile de la prolifération des bactéries filamenteuses. La formation de floccs sains avec de bonnes vitesses de décantation et d'épaississement est obtenue par un équilibre entre les bactéries filamenteuses et zoogléales.

Pour étendre la validation à des cas plus extrêmes, des expériences en réacteur pilote ont été réalisées. Elles nous ont apporté les informations suivantes:

- La réalisation de l'étude sur l'effet du volume du décanteur couplé à un réacteur parfaitement agité (*RPA*) nous a montré que le temps pour le déclenchement du bulking était moins important quand on utilisait des décanteurs plus petits. En mesurant la longueur moyenne des filaments, on a pu constater que, pendant le bulking, les bactéries filamenteuses augmentaient en nombre et en longueur. En prenant en compte la différence entre la surface totale de l'image et celle des floccs on arrive à détecter des phénomènes de bulking filamenteux et de défloculation.
- On a constaté que pendant les périodes chaudes, les bactéries filamenteuses avait une longueur moyenne moins importante, conformément aux indications de la littérature. Cela bénéficie au contrôle du bulking, parce qu'il va s'installer plus lentement. Avec un diamètre mésoscopique des floccs plus stable, l'expérimentation réalisée pendant la période chaude a permis d'obtenir de meilleures corrélations d'une part entre la vitesse de décantation et la longueur totale des filaments et d'autre part entre cette longueur et l'Indice de Mohlman.
- Une faible défloculation, des diamètres équivalents mésoscopiques des floccs plus uniformes et l'inexistence du phénomène de bulking même sur une période de fonctionnement de 50% supérieure à celle d'un *RPA*, ont permis de confirmer la meilleure stabilité des réacteurs quand leur hydrodynamique s'approche de celle d'un réacteur piston.

En ce qui concerne l'établissement d'une corrélation entre l'Indice de Mohlman et les paramètres morphologiques, la longueur des filaments est certes un paramètre important, mais le nombre de filaments et le diamètre équivalent mésoscopique améliorent cette corrélation.

Le programme FlocMorph a démontré être un excellent outil pour contrôler la présence des bactéries filamenteuses, pouvant permettre d'éviter ainsi le bulking et/ou moussage filamenteux, pour obtenir des informations sur l'état des floccs et prévenir la formation des floccs "tête d'épingle". Hors le contrôle de ces dysfonctionnements, la procédure permet aussi d'étudier le comportement de la microfaune bactérienne face à des changements de conditions du milieu ainsi que des modifications sur les procédés.

L'analyse macroscopique réalisée à l'aide de FondNoir apporte des informations complémentaires par rapport à celles obtenues par FlocMorph, mais son utilisation isolée est limitée à la caractérisation des floccs. Cependant l'analyse globale des images est essentielle quand on a des floccs trop reliés.

Les résultats préliminaires obtenus par la procédure d'analyse des images de Gram pour l'instant sont très satisfaisants et nous encourageant à poursuivre dans cette voie, même si la mise en œuvre de cette procédure est plus délicate.

L'étude des Protozoaires

Cette étude consiste essentiellement au développement d'une procédure pour la reconnaissance des espèces de protozoaires et métazoaires.

Après plusieurs étapes d'amélioration, une version satisfaisante a été obtenue avec ProtoRec v.2. Le découpage par l'opérateur à l'aide de la souris de la zone où se trouve le protozoaire ("zone d'intérêt") a résolu les problèmes d'isolement par rapport aux floccs. L'utilisation de l'analyse factorielle discriminante, mieux adaptée pour mettre en évidence les différences entre classes (espèces de protozoaires), ainsi que l'introduction de nouveaux paramètres de forme ont augmenté l'indice de reconnaissance des espèces: seulement 3 sur 11 espèces ont des indices d'identification inférieurs à 50%. Avec l'analyse par groupe de protozoaires on atteint des valeurs d'indices de reconnaissance supérieures à 75%.

L'augmentation du nombre d'individus utilisés pour la phase d'entraînement ainsi que du nombre des paramètres a amené à un taux de reconnaissance moyen pour les espèces de 75%, même avec l'inclusion des métazoaires (ProtoRec v.3). Le taux de reconnaissance a été supérieur à 80% pour tous les groupes de protozoaires et pour les métazoaires. Dans le groupe des ciliés, toutes les classes ont des indices supérieurs à 85%.

Perspectives

Certes les procédures FlocMorph et ProtoRec doivent être rendus plus accessibles et conviviales avant que l'on puisse envisager leur emploi dans les stations de traitement des eaux usées. Mais les résultats obtenus lors de cette étude montrent les potentialités de l'utilisation de l'analyse d'image pour aider à améliorer le fonctionnement des installations et la qualité de nos cours d'eau.

L'utilisation de FlocMorph ne se limite pas aux réacteurs continûment aérés. Il a permis de suivre l'évolution de la biomasse dans des réacteurs séquentiels (réputés pour être sujets à des problèmes de bulking), en collaboration avec l'ENSIL (Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges). Les réacteurs anaérobies renferment aussi un grand nombre de

bactéries, plus ou moins filamenteuses. Quelques ajustements sont nécessaires (dilution en particulier car la biomasse est plus concentrée) mais des résultats intéressants sont d'ores et déjà acquis (collaboration avec le Département du Génie Biologique de l'Université du Minho).

Une coopération mise en place entre le Département du Génie Chimique de l'Université Fédérale de Pernambuco (Brésil) et le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique permettra d'utiliser FlocMorph pour la modélisation des stations de traitement des eaux usées dans des conditions de charge et de climat fort différentes de celles rencontrés sous nos latitudes.

Si l'utilisation sur site a guidé nos choix dans la conception des procédures, l'aspect recherche ne doit pas être négligé. Un suivi plus précis de l'évolution du bulking filamenteux en réponse à des actions correctives (ajout de produits aminés ou chlorés, rayonnement ultraviolet, champ magnétique) est autorisé par l'emploi de m'analyse d'images. Par exemple, une étude sur l'utilisation du champ magnétique en collaboration avec le Département Biophysique et du Génie Biomédical de l'Université Fédérale de Pernambuco (Brésil) est prévue.

On a vu que l'analyse des images de Gram ouvrait la voie de l'identification des bactéries. Si le traitement de ces images en tant que telles n'est pas très difficile, c'est plutôt la standardisation des techniques de préparation d'échantillons sur laquelle les efforts doivent tout d'abord porter. Les méthodes FISH offrent de fantastiques perspectives, mais leur utilisation en routine, sur site, semble encore problématique. Les colorations de Gram et Neisser doivent être privilégiées dans un premier temps.

Par rapport à la procédure semi-automatique d'identification automatique des espèces de protozoaires (ProtoRec v.3), il est envisagé l'augmentation du nombre d'individus de chaque espèce présents dans la base de données, ainsi que l'introduction de nouvelles espèces. Cela pourra s'effectuer dans le cadre de la coopération avec le Brésil, où on espère trouver d'autres espèces prédominantes dues aux différences climatiques et de composition et charge des effluents et avec le Portugal, à partir d'un suivi de plusieurs stations.

Ainsi des études sur le rapport entre la composition de la microfaune (protozoaires et métazoaires) et le fonctionnement de la station pourront être réalisées afin de valider les informations qui se trouvent dans la littérature et établir de nouvelles corrélations entre les groupes dominants et l'état biologique des installations.

On espère permettre, avec ces outils, une meilleure gestion des stations d'épuration et une meilleure qualité des eaux épurées, afin de contribuer au développement durable de la planète ... et d'assurer notre avenir à tous.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry, no matter how small, should be recorded to ensure the integrity of the financial data. This includes not only sales and purchases but also expenses and income. The text suggests that a systematic approach to record-keeping is essential for identifying trends and making informed decisions.

In the second section, the author addresses the challenges of budgeting and financial planning. It is noted that many businesses struggle to stay within their budgets due to unforeseen expenses or changes in market conditions. The document provides several strategies to mitigate these risks, such as creating a contingency fund and regularly reviewing the budget to adjust for any deviations.

The third part of the document focuses on the role of technology in modern accounting. It highlights how software solutions can streamline the accounting process, reduce errors, and provide real-time insights into the company's financial health. The text encourages businesses to invest in reliable accounting software and to ensure that their staff is properly trained to use these tools effectively.

Finally, the document concludes with a discussion on the importance of transparency and communication in financial management. It stresses that clear communication with stakeholders, including investors and creditors, is crucial for building trust and ensuring the long-term success of the business. The author advises businesses to provide regular financial reports and to be open to feedback from their financial partners.

Références Bibliographiques

Albertson O.E. (1991) *Bulking sludge control - progress, practice and problems*, Water Science and Technology, 23, p. 835-846.

Al-Yousfi A.B., Mason S.H., Romagnoli R.J., Williams J.B. (2000) *Viscous sludge bulking due to zoogloea proliferation at an industrial wastewater treatment plant: background, causes and remedies*, Proceedings of the 1st World Congress of IWA (CD Rom), Paris (ISBN:2-9515416-0-0).

Amaral A.L., Baptiste C., Pons M.N., Nicolau A., Lima N., Ferreira E.C., Mota M., Vivier H. (1999) *Semi-automated recognition of protozoa by image analysis*, Biotechnology Techniques, 13, p. 111-118.

Andreasen K, Nielsen P.H. (1997) *Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge*, Applied and Environmental Microbiology, 63(9), p. 3662-3668

Barbusinski K., Koscielniak H. (1995) *Influence of substrate loading intensity on floc size in activated sludge process*, Water Research, 29 (7), p. 1703-1710.

Beccari M. (1998) *Biological treatment of wastewaters: State-of-the-art and research needs*, Chem. Biochem. Eng Q., 12 (4), p. 175-181.

Bittner C., Wehnert G., Scheper T (1998) *In situ microscopy for on-line determination of biomass*, Biotechnology and Bioengineering, 60 (1), p. 24-35

Blackall L.L. (1994) *Molecular identification of activated sludge foaming bacteria*, Water Science and Technology, 29 (7), p. 35-42.

Blackall L.L., Seviour E.M., Bradford D., Stratton H.M., Cunningham M.A., Hugenholz P., Seviour R.J. (1996), *Towards understanding the taxonomy of some of the filamentous bacteria causing bulking and foaming in activated sludge plants*, Water Science and Technology, 34 (5/6), p. 137-144.

Brouzes, P. (1973) *Précis d'Épuration Biologique*, Technique et Documentation, Paris.

Bye C.M., Dold P.L. (1999) *Evaluation of correlations for zone settling velocity parameters based on sludge volume index-type measures and consequences in settling tank design*, Water Environment Research, 71 (7), p. 1333-1344.

Canler J.-P., Perret J.-M., Duchène P., Cotteux E. (1999) *Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées*, Cemagref Editions, Paris.

Chao A.C., Keinath T.M. (1979) *Influence of process loading intensity on sludge clarification and thickening characteristics*, Water Research, 13, p. 1213-1223.

Charmot M.L., Roche N., Prost C. (1997) *Influence des cycles d'alimentation sur la décantabilité des boues activées*, Revue des Sciences de l'Eau, 10 (3), p. 377-394

Charmot M.L., Ripoche G., Roche N., Prost C. (1999) *Modelling and simulation of activated sludge process with cyclic feeding for highly wastewater treatment*, Chemical Engineering and Technology, 22 (1), p. 50-56.

Chermant J.-L. (2001) *Why automatic image analysis ? An introduction to this issue*, Cement & Concrete Composites, 23, p.127-131.

Cho S.-H. (1989) *Modélisation du couplage "bassin d'aération-décanteur secondaire" d'une station d'épuration des eaux par boues activées*, Thèse INPL, Nancy.

Clauss F., Helaine D., Balavoine C., Bidault A. (1998) *Improving activated sludge floc structure and aggregation for enhanced settling and thickening performances*, Water Science and Technology, 38 (8/9), p. 35-44.

Coster M., Chermant J.L. (1989) *Précis d'analyse d'images*, 2^e édition, CNRS Editions, Paris.

Cruz M.D., Matos R.P. (1996) *Automatic detection and classification of objets based on morphological features*, Proceedings of the IASTED International Conference: Signal and Image Processing (SIP-96), Orlando, p.298-301.

Curds C.R. (1992) *Protozoa in water industry*, Biology in focus, Cambridge University Press, Cambridge.

Curds C.R., Cockburn A., Vandike J.M. (1968) *An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process*, Water Pollution Control, 67 , p. 312-329

Curds C.R., Cockburn A. (1970a) *Protozoa in biological sewage-treatment process : I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants*, Water Research, 4, p. 225-236.

Curds C.R., Cockburn A. (1970b) *Protozoa in biological sewage-treatment process – II. Protozoa as indicator in the activated-sludge process*, Water Research, 4, p. 237-249.

Dauphin S. (1998) *Connaissance et contrôle du fonctionnement des stations d'épuration, intérêt et limites des moyens métrologiques actuels – Application à la gestion hydraulique d'un décanteur secondaire*, Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Degrémont (1989) *Mémento technique de l'eau*, Vol. 1, Lavoisier, Paris.

Desroches L., Pons M.N., Fargues C. (2001) *Analyse d'image de floccs minéraux: comparaison de techniques de visualisation*, Récents Progrès du Génie des Procédés, Lavoisier, Paris, 15 (78), p. 313-320.

Drakides C. (1978) *L'observation microscopique des boues activées appliquée à la surveillance des installations d'épurations : technique d'étude et interprétation*, TSM-L'EAU, 2, p. 85-98.

- Droppo I.G., Flannigan D.T., Leppard G.G., Liss S.N.** (1996) *Microbial floc stabilization and preparation for structural analysis by correlative microscopy*, Water Science and Technology, 34 (5/6), p. 155-162.
- Duchène P., Cotteux E.** (1998) *La problématique des dysfonctionnements biologiques: bulking et moussage biologique en boues activées*, Tribune de l'Eau, 59 (5), p. 59-66.
- Duthoo D., Mahé P.** (2001) *Contrôle visionique appliqué au soudage laser YAG pulse des crayons combustibles*, Récents Progrès du Génie des Procédés, Lavoisier, Paris, 15 (78), p. 213-221.
- Eckenfelder W.W., Grau P.** (1992) *Activated sludge process design and control: theory and practice*, Volume 1, Technomic Publishing, Lancaster.
- Edeline F.** (1992) *L'épuration physico-chimique des eaux : théorie et technologie*, Cebedoc, Liège.
- Eikelboom D.H., Andreadakis A., Andreassen K.** (1998) *Survey of filamentous population in nutrient removal plants in four european countries*, Water Science and Technology, 37 (4/5), p. 281-289.
- Eikelboom D.H., Grovenstein J.** (1998) *Control of bulking in a full scale plant by addition of talc (PE 8418)*, Water Science and Technology, 37 (4/5), p. 297-301.
- Einax J.W., Zwanziger H.W., Geiss S.** (1997). *Chemometrics in environmental analysis*, VCH, Weinheim
- Ekama G.A., Barnard J.L., Günthert F.W., Krebs P., Mc Corquodale J.A., Parker D.S., Wahlberg E.J.** (1997) *Secondary settling tanks: theory, modeling, design and operation*, Scientific and Technical Report N° 6, International Association on Water Quality, London.
- Elmaleh S.** (1996), *Les procédés biologiques aérobie : principes fondamentaux*, Récents Progrès en Génie des Procédés, 10 (47), p. 61-66, Lavoisier, Paris.
- Eriksson L., Härdin A.-M.** (1984) *Settling properties of activated sludge related to floc structure*, Water Science and Technology, 16 (10/11), p. 56-68.
- Fainsod A., Pagilla K.R., Jenkins D, Pitt P.A., Mamais D.** (1999), *The effect of anaerobic selectors on Norcadiform organism growth in activated sludge*, Water Environment Research, 71 (6), p. 1151-1157.
- Finstein M.S., Heukelekian H.** (1967) *Gross dimensions of activated sludge flocs with reference to bulking*, Journal of Water Pollution Control Federation, 39 , p. 33-40.
- Forster C. F.** (1977) *Bio-Oxidation*, in : Treatment of Industrial Effluents, p. 65-87. Eds Gallely A. G., Forster C. F., Stafford D. A., Hodder and Stoughton, Londres.
- Fuchs A., Staudinger G.** (1999) *Characterising the clarification of the supernatant of activated sludges*, Water Research, 33 (11), p. 2527-2534.

Gautier H., Didelon J., Teiten M.H., Padilla Ybarra J.J., Bolotine L., Merlin J.L., Guillemain F. (2001) *Localisation intracellulaire de molécules d'intérêt en thérapie photodynamique*, Récents Progrès du Génie des Procédés, Lavoisier, Paris, 15 (78), p. 129-134.

Genoveva E., Tellez C., Bautista L.M. (1991) *Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process*, Water Research, 25 (8), p. 967-972.

Geraci A., Fargionne G., Caramagno A. (1996) *Automatic control of industrial production objects by way of digital image processing*, Pixed. Computer Graphics, CAD/CAM, Image Processing, 17 (9), p. 11-15.

Gerardi M.H., Horsfall F.L., et al. (1990) *Wastewater biology: the microlife*, A Special Publication, Water Environment Federation, Virginie.

Golz C., Lange S. (2001) *Analysis of activated sludge using pattern recognition techniques*, 3rd IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Process, Rome (CD Rom)

Gregori J. (1998) *The role of floc density in solid-liquid separation*, Filtration & Separation, May, p. 366-371.

Grijnspeerdt K., Vanrolleghem P., Verstraete W. (1995) *Selection of one-dimensional sedimentation: models for on-line use*, Water Science and Technology, 31(2), p. 193-204.

Grijnspeerdt K., Verstraete W. (1996) *A sensor for the secondary clarifier based on image analysis*, Water Science and Technology, 33(1), p. 61-70.

Grijnspeerdt K., Verstraete W. (1997) *Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge*, Water Research, 31 (5), p. 1126-1134.

Gros Lambert S., Blacher S., Crine M. (2001) *Etude de l'influence de l'hydrodynamique sur une bactérie filamenteuse par analyse d'image*, Récents Progrès du Génie des Procédés, Lavoisier, Paris, 15 (78), p. 153-156.

Härtel L., Pöpel H.J. (1992) *A dynamic secondary clarifier model including processes of sludge thickening*, Water Science and Technology, 25 (6), p. 267-284.

Heine W., Sekoulov I., Burkhardt H., Behrendt J. (2001) *Early recognition of poor sludge due to filamentous organism by image analysis*, 3rd IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Process, Rome (CD Rom)

Higashiyama K., Fujikawa S., Park E.Y., Okabe M. (1999) *Image analysis of morphological change during arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 87 (4), p. 489-494.

Hilligarddt D., Hoffmann E. (1997) *Particle size analysis and sedimentation properties of activated sludge flocs*, Water Science and Technology, 36(4), p. 167-175.

Hwang Y., Tanaka T. (1998) *Control of Microthrix parvicella foaming in activated sludge*, Water Science and Technology, 32 (5), p. 1678-1686.

Jahn T.L., Bovee E.C., Jahn F.F. (1979) *How to know the protozoa*, second edition, The Picture Key Nature series, Iowa.

Jenkins D., Richard, M.G., Daigger, G.T. (1993) *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*, Lewis Publishers, 2nd Edition, Michigan.

Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G., Urbain V., Manem J. (1995) *Chemical structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs*, Water Research, 29 (7), p. 1639-1647.

Kaye B.H. (1991) *Characterizing the structure of fumed pigments using the concepts of fractal geometry*. Part. Part. Syst. Charact., 8, p. 63-71.

Kaye B.H., Clark G.G. and Liu Y. (1992) *Characterizing the structure of abrasive fine particles*. Part. Part. Syst. Charact., 9, p. 1-8.

Konicek Z., Burdych J. (1988) *Effect of activated sludge process on secondary settling tank efficiencies*, Water Science and Technology, 20 (4/5), p. 153-163.

Knoop S., Kunst S. (1998) *Influence of the temperature and sludge loading on activated sludge settling, specially on Microthrix parvicella*, Water Science and Technology, 37 (4/5), p. 27-35.

Kristensen G.H., Jorgensen P.E., Nielsen P.H. (1994) *Settling characteristics of activated sludge in Danish treatment plants with biological nutrient removal*, Water Science and Technology, 29 (7), p. 157-165.

Le Bonté S. (2001) *Communications personnelles*.

Lee D.J., Chen G.W., Liao Y.C., Hsieh C.C. (1996) *On the free-settling test for estimating activated sludge floc density*, Water Research, 30 (3), p. 541-550.

Lee S-E, Koopman B.L., Jenkins D. (1982) *The effect of aeration basin configuration on activated sludge bulking at low organic loading*, Water Science and Technology, 14, p. 407.

Li D.H. and Ganczarczyk J. (1989) *Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes*. Environmental Science and Technology, 23, p. 1385-1389.

Liao B.Q., Allen D.G., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (2001) *Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability*, Water Research, 35 (2), p. 339-350.

Litchfield J.B., Reid J.F., Richburg B.A. (1992) *Machine vision microscopy for on line sampling, analysis and control*. In: Modeling and control of biotechnical process. IFAC, Colorado.

Madoni P. (1994a) *Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm*, Bioresource Technology, 48, p. 245-249.

Madoni P. (1994b) *Microfauna biomass in activated sludge and biofilm*, Water Science and Technology, 29 (7), p. 63-66.

Madoni P. (1994c) *La microfaune nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi*, AGAC di Reggio Emilia - Università degli Studi di Parma, Parma.

Madoni P. (1994d) *A Sludge Biotic Index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis*, Water Research, 28 (1), p. 67-75.

Madoni P., Davoli D., Guglielmi L., Stefanini C. (1996) *Atlante Fotografico : Guida all'analisi microscopica del fangio attivo*, AGAC di Reggio Emilia - Università degli Studi di Parma, Parma.

Madoni P., Davoli D., Gibin G. (2000) *Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy*, Water Research, 34 (6), p. 1767-1772.

Martin-Cereceda M., Serrano S., Guinea A. (1996) *A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants*, FEMS Microbiology Ecology, 21, p. 267-276.

Maruhashi F., Murakami S., Baba K. (1994) *Automated monitoring of cell concentration and viability using an image analysis system*, Cytotechnology, 15, p.281- 289

Matsumura M., Imanaka T., Yoshida T., Taguchi H. (1980) *Morphological differentiation in relation to cephalosporin C synthesis by Cephalosporium acremonium*, J. Ferment. Technol, 58 (3), p. 197-204

Moletta R. (1996), *Les Procédés anaérobies de traitement de la pollution carbonée des eaux usées*, Récents Progrès en Génie des Procédés, Lavoisier, Paris, 10 (47), p. 49-54.

Moll T., Guizard C., Rabatel G. (1995) *Off-line colour machine vision for analysing the biscuit baking process*, Control applications in post-harvest and processing technology (CAPPT'95). A postprint volume from the 1st IFAC/CIGR/EURAGENG/ISHS workshop, Ostenda, pp. 261-266.

Neis U., Tiehm A. (1997) *Particle size analysis in primary and secondary wastewater effluents*, Water Science and Technology, 36 (4), p. 151-158.

Nicolau A., Lima N., Mota M., Madoni P. (1997) *Os protozoários como indicadores da qualidade biológica de lamas activadas*, Boletim de Biotecnologia, 56, p.14-19.

Nielsen P.H., Andreasen K., Lee N., Wagner M. (1999) *Use of microautoradiography and fluorescent in situ hybridization for characterization of microbial activity in activated sludge*, Water Science and Technology, 39 (1), p. 1-9.

Noesis (1996a) *Visilog 4 reference guide*, 3rd Edition, Noesis, Orsay.

Noesis (1996b) *Visilog 5 Documentation*, 1st Edition, Noesis, Les Ulis.

Novak L., Larrea L., Wanner J, Garcia-Heras J.L. (1994) *Non-filamentous bulking caused by zoogloea*, *Water Science and Technology*, 29 (7), p. 301-304.

Packer H.L., Thomas C.R. (1990) *Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis*, *Biotechnology and Bioengineering*, 35, p. 870-881.

Packer H.L., Keshawarz-Moore E., Lilly M.D., Thomas C.R. (1992) *Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chrysogenum* using image analysis*, *Biotechnol. Bioeng.*, 39, p.384-391.

Palm J.C., Jenkins D., Parker D.S. (1980) *Relationship between organic load , dissolved oxygen concentration and sludge settleability in the completely-mixed activated sludge process*, *Journal of Water Pollution Control Federation*, 54, p. 1087.

Palmgren R., Joran F., Nielsen P.H., Block J.C. (1998) *Influence of oxygen limitation on the cell surface properties of bacteria from activated sludge*, *Water Science and Technology*, 37 (4/5), p. 349-352.

Pereira, L.B.B. (1996) *Modélisation et simulation d'une station d'épuration des eaux usées urbaines par boues activées*, Thèse INPL, Nancy.

Pernelle J.-J, Galval G., Cotteux E., Duchène P. (2001), *Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant*, *Water Research*, 35 (1), p. 129-134.

Pichon D., Vivier H., Pons M.N. (1991) *Quantitative image analysis in bioengineering process*, 8Th International Congress of Stereology, Los Angeles.

Pipes W.O. (1979) *Bulking, deflocculation and pin-point floc*, *Journal of Water Pollution Control Federation*, 51, p. 62.

Pons M.-N., Vivier H. (1998), *Beyond Filamentous species...*, in: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, vol. 60, Springer-Verlag, Berlin.

Pöpel H.J., Fischer A. (1998) *Combined influence of temperature and process loading on the effluent concentration of biological treatment*, *Water Science and Technology*, 38 (8/9), p. 129-136.

Potier O. (1993) *Etude des stations d'épuration des eaux usées urbaines par boues activées: modélisation de l'aérateur canal*, Thèse INPL, Nancy

Prendl L., Kroiß H. (1998) *Bulking sludge prevention by an aerobic selector*, *Water Science and Technology*, 38 (8/9), p. 19-27.

Pujol R., Canler J.P. (1994) *Contact zone: French practice with low F/M bulking control*, *Water Science and Technology*, 29 (7), p. 221-228.

- Rasmussen M.R., Larsen T.** (1996) *A method for measuring sludge settling characteristics in turbulent flows*, Water Research, 30 (10), p. 2363-2370.
- Rasmussen M.R., Larsen T.** (1997) *On-line measurement of settling characteristics in activated sludge*, Water Science and Technology, 36 (4), p. 307-312.
- Reichl U., King R., Gilles E.D.** (1992) *Characterization of pellet morphology during submerged growth of Streptomyces tendae by image analysis*. Biotechnology and Bioengineering, 39, p. 164-170.
- Richard M.** (1989) *The bench sheet monograph on activated sludge microbiology*, The Water Pollution Control Federation, Virginia.
- Ridet J.-M., Platel R., Meunier F.J.** (1992) *Zoologie: des protozoaires aux échinodermes*, Editions Ellipses, Paris.
- Roche N.** (1989) *Influence de l'hydrodynamique du bassin d'aération sur la décantabilité des boues activées*, Thèse INPL, Nancy.
- Rossetti S., Carucci A., Rolle E.** (1994) *Survey on the occurrence of filamentous organisms in municipal wastewater treatment plants related to their operating conditions*, Water Science and Technology, 29(7), p. 305-308.
- Russ J.C.** (1995) *The image processing handbook*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton.
- Saida H.; Ytow N.; Seki H.** (1998) *Photometric application of the gram stain method to characterize natural bacterial populations in aquatic environments*, Applied and Environmental Microbiology, 64 (2), 1998, p. 742-747.
- Sanin F.D., Veselind P.A.** (1999) *A comparison of physical properties of synthetic sludge with activated sludge*, Water Environment Research, 71(2), p. 191-196.
- Sasahara T., Ogawa T.** (1983) *Treatment of brewery effluent. Part IV: protozoa and metazoa found in activated sludge process for brewery effluent*, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 11, p. 433-448.
- Seviour R.J., Blackall L.L.** (1999) *The microbiology of activated sludge*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sezgin M.** (1977) *The effect of dissolved oxygen concentration on activated sludge process performance*, Ph.D. dissertation, Univ. of California, Berkeley, CA.
- Sezgin M., Jenkins D., Parker D. S.** (1978), *A unified theory of filamentous activated sludge bulking*, Journal of Water Pollution Control Federation, 50, p. 362-381
- Sladeczek V.** (1973) *System of water quality from the biological point of view*. Arch. Hydrobiol. Ergeb. Limnol, 7, p.1-217.

UNIVERSITE DE BORDEAUX I
Bibliothèque Universitaire de Sciences et Techniques
SERVICE DU PRET-INTER
Tél. : 05.40.00.89.89.
Fax : 05.56.37.56.36

Talence, le jeudi 15 mars 2007

A Mme BIRAS Christine
OENOLOGIE

Nous avons le plaisir de vous informer que le document **: A01479 4179**

**Titre : APPLICATIONS DE L'ANALYSE D'IMAGE A LA CARACTERISATION DE
LA MICROFAUNE DE STATIONS D'EPURATION DES EAUX USEES**

est arrivé au Service du PEB

En prêt jusqu'au **: 11 AVRIL 2007**

Vous pouvez venir le retirer aux heures d'ouverture.

Soddell J., Seviour R. (1996) *Growth of an activated sludge foam-forming bacterium, Norcardia pinensis, on hydrophobic substrates*, Water Science and Technology, 34 (5/6), p. 113-118.

Snidaro D., Zartarian F., Jorand F., Bottero J.-Y., Block J.-C., Manem J. (1997) *Characterization of activated sludge flocs structure*, Water Science and Technology, 36 (4), p. 313-320.

Suhr H., Wehnert G., Schneider K., Bitter C., Scholz T., Geissler P., Jähne B., Scheper T. (1995) *In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus*, Biotechnol. Bioeng, 47, p.106-116.

Thomas C., Packer H. (1990) *Morphological and structural measurements on filamentous microorganisms*, Binary, 2, p.47-54.

Tsutsumi H., Kono M., Manabe T., Haraguchi M., Yamamoto I., Oppenheimer C. (2000) *Bioremediation on the shore after an oil spill from the Nakhodka in the sea of Japan. III - Field tests of a bioremediation agent with microbiological cultures for the treatment of an oil spill*, Marine Pollution Bulletin, 40 (4), p. 320-324.

Valet G., Sanchez S., Daul Ch., Wolf D., Karcher G. (2001) *Segmentation et recalage en image cardiaque multi-modalités*, Récents Progrès du Génie des Procédés, Lavoisier, Paris, 15 (78), p. 181-186.

Vanderhasselt A., Verstraete W. (1999) *Short-term effects of additives on sludge sedimentation characteristics*, Water Research, 33(2), p. 381-390.

Vanderhasselt A., Fuchs A., Vanrolleghem P., Staudinger G., Verstraete W. (1999) *Monitoring of the effects of additives on sludge separation properties by using sensors*, Water Environment Research, 71 (3), p.355-362.

Vanhoutte B., Pons M.N., Thomas C.R., Louvel L., Vivier H. (1995) *Characterization of Penicillium chrysogenum physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis*, Biotechnology & Bioengineering, 48, p. 1-11.

Vanrolleghem P., Van der Schueren D., Krikilion G., Grijspeerd K, Willems P., Verstraete W. (1996) *On-line quantification of settling properties with in-sensor-experiments in an automated settlometer*, Water Science and Technologie, 33 (1), p. 37-51.

Vaxelaire J. (1992) *Etude et modélisation de l'aération des stations d'épuration des eaux usées urbaines par agitation mécanique de surface*, these INPL, Nancy.

Veselind P.A., Dick R.I. (1969) *Initial depth as a variable in activated sludge settling tests*, Effluent and Water Treatment Journal, 9, p. 263-267.

Vivier H., Pons M.N., Bernard-Michel B. (2000) *Imaging in process engineering of powder. From visualization to measurement. Application to shape quantification*, Can. Journal of Chemical Engineering, August, p.682-693.

Wanner J. (1994) *The implementation of bulking control in the design of activated sludge systems*, Water Science and Technology, 29 (7), p. 193-202.

Wanner J., Ruzickova I., Jetmarova P., Krhutkova O. and Paraniakova J. (1998) *A national survey of sludge separation problems in the Czech Republic: filaments, floc characteristics and activated sludge metabolic properties*, Water Science and Technology, 37 (4-5), p. 271-279

Westlund A.D., Hagland E., Rothman M. (1996) *Bulking and foaming caused by Microthrix parvicella at three large sewage treatment plants in the Greater Stockholm area*, Water Science and Technology, 34 (5/6), p.281-287.

Wilén B.-M., Balmer P. (1999) *The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs*, Water Research, 33 (2), p. 391-400.

Williams T.M., Unz R.F. (1985) *Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge*, Applied Microbiology and Biotechnology, 22, p. 273-282.

Woodiwiss F. (1980) *Biological monitoring of surface water quality*. Summary Report E.E.C. ENV/787/80-EN, Bruxelles.

Yamamoto-Ikemoto R., Matsui S., Komori T., Bosque-Hamilton E.K. (1998) *Control of filamentous bulking and interactions among sulfur oxidation-reduction and iron oxidation-reduction in activated sludge using an iron coagulant*, Water Science and Technology, 38 (8/9), p. 9-17.

Yuan Y., Li X.Y. (2000) *Settling velocities of biological aggregates*, Proceedings of the 1st World Congress of IWA (CD Rom), Paris (ISBN:2-9515416-0-0).

Annexe A

*" Ce ne sont pas seulement les machines et les crédits qui font le progrès.
C'est avant tout, la valeur des hommes"*

CHARLES DE GAULLE

Programmes

(Annexe Confidentielle)

Annexe B

*"Le sage ne calcule pas s'il réussira ou échouera,
Les chances pour et contre.
Il fixe le but, puis il tend."*

LIE-TSEU

Annexe B1 - Les Bactéries Filamenteuses	B - 2
Annexe B2 - Petit Guide d'identification des Protozoaires et Métazoaires	B - 6

Annexe B1

Les Bactéries Filamenteuses

L'identification manuelle des bactéries filamenteuses se fait à partir d'une clé (Figure B.1) en utilisant les méthodes manuelles par coloration et en étudiant leur forme ainsi que la présence de granules de soufre.

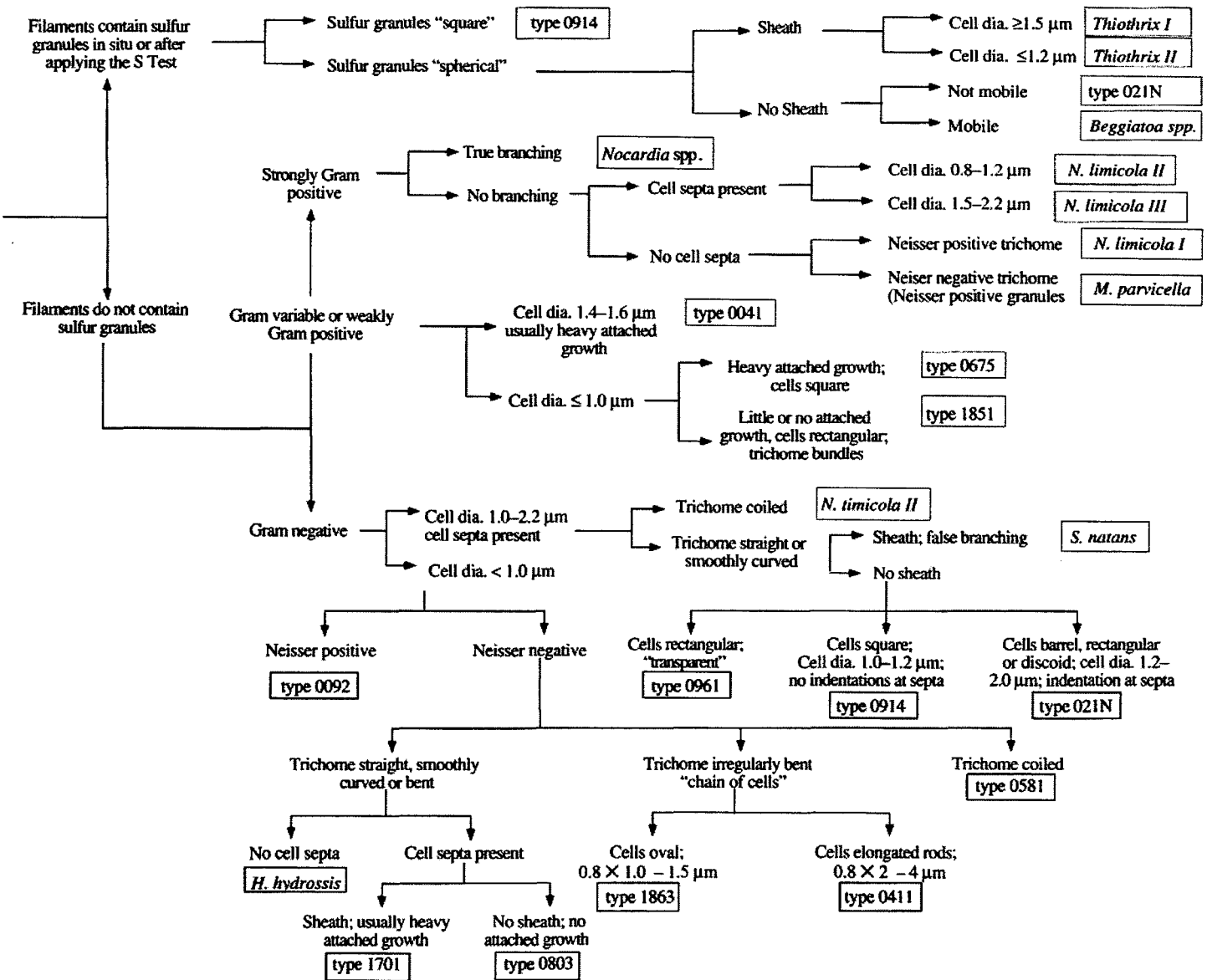


Figure B.1 - Schéma d'identification des organismes filamenteux (d'après Jenkins et al., 1993)

1.1. Test d'Oxydation du Sulfure (S test)

Solution de sulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 1.0 g/l, valable pour une semaine.

- Sur une lame de verre mélanger une goutte du liqueur mixte et une goutte de la solution de sulfite de sodium
- Laisser en contact avec l'air pendant 10 à 20 minutes
- Couvrir la préparation avec la lamelle et presser légèrement pour enlever l'excès de solution.
- Réaliser l'observation en utilisant un grossissement de 1000x à contraste de phase. Les granules de sulfure réfractent beaucoup et ont une coloration jaune.

1.2. Coloration de Gram

Cette coloration utilise le cristal violet, qui se fixe sur la couche épaisse de peptides des bactéries Gram positives, les différenciant des Gram négatives qui sont colorées en rouge par la safranine. La méthode classique de coloration de Gram est présentée ci-dessous:

Solution 1 (préparer séparément A et B puis les mélanger)

A		B	
Cristal violet	2 g	Oxalate d'ammonium	0.8 g
Alcool éthylique, 95%	20 ml	Eau distillée	80 ml

Solution 2

Iode	1 g
Iodure de potassium	2 g
Eau distillée	300 ml

Solution pour décolorer

Alcool éthylique à 95%

Solution 3

Safranine O (2.5 % p/v en 95 % de éthanol)	100 ml
Eau distillée	100 ml

- Sur une lame de verre mettre une goutte de l'échantillon et laisser sécher pour bien fixer;
- Colorer pendant 1 minute avec la solution 1 et ensuite rincer pendant 1 seconde avec de l'eau;
- Ajouter la solution 2 pendant 1 minute et ensuite bien rincer avec de l'eau;
- Incliner la lame et décolorer, ajoutant l'alcool goutte par goutte pendant 25 secondes. Attention à ne pas dépasser ce temps, pour éviter une sur décoloration;
- Laisser sécher;
- Colorer avec la solution 3 pendant 1 minute, rincer bien et laisser sécher;
- Examiner au microscope optique à un grossissement de 1000x avec huile d'immersion avec une illumination directe. Les bactéries en bleu sont positives et en rouge, négatives.

Dans nos expériences on a utilisé un kit de coloration de GRAM-HÜCKER d'action lente de Réactifs RAL (France) et on a suivi la procédure indiquée par le fournisseur.

1.3. Coloration de Neisser

La coloration de Neisser met en évidence les réserves d'énergie des bactéries, sous forme de polyphosphate. Le bleu de méthylène, composant actif de cette coloration, étant un composant cationique, va se fixer sur les sites sélectifs anioniques de la chaîne polymérique. La réaction positive de Neisser est confirmée par la coloration bleu-violet des bactéries ou de leurs granules intracellulaires

Solution 1 (préparer séparément A et B puis les mélanger)

A		B	
Bleu de méthylène	0.1 g	Cristal de violet (10% p/v en 95% d'éthanol)	3.3 ml
Ethanol à 95%	5 ml	Ethanol (95%)	6.7 ml
Acide acétique glacial	5 ml	Eau distillée	100 ml
Eau distillée	100 ml		

Mélanger deux volumes de A avec un volume de B

Solution 2

Brun de Bismark $C_{18}H_{18}N_8$ (1% p/v aqueux)	33.3 ml
Eau distillée	66.7 ml

- Préparer une lame avec l'échantillon et laisser sécher à l'air pour bien fixer;
- Colorer pendant 30 secondes avec la solution 1 et rincer pendant 1 seconde avec de l'eau;
- Colorer pendant 1 minute avec la solution 2, bien rincer avec de l'eau et laisser sécher;
- Examiner au le microscope optique à 1000x sous huile d'immersion avec illumination directe. Les bactéries en bleu-violet sont positives (la bactérie entière ou les granules intracellulaires) et les bactéries jaune-marron sont négatives.

Annexe B2

Petit Guide d'identification des Protozoaires et Métazoaires

1. Les Protozoaires

Les protozoaires peuvent être classés en flagellés, amibes et ciliés. Les ciliés, selon leur régime alimentaire peuvent être groupés en carnivores et bactériophages. Les bactériophages, selon leur mobilité sont divisés en mobiles de fond, ciliés nageurs et sessiles.

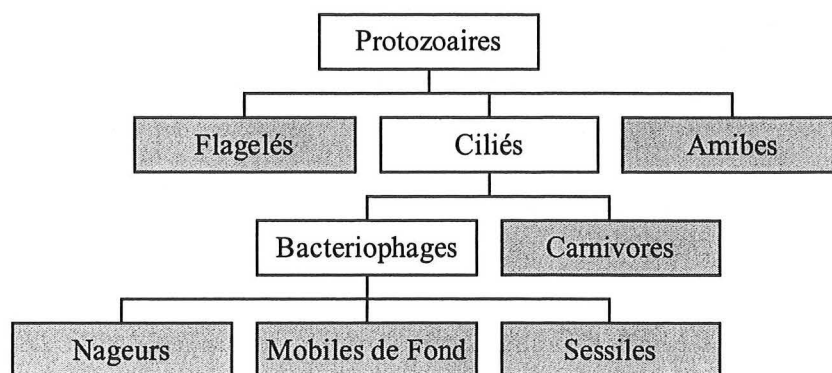


Figure B.2 - Classification des Protozoaires

1.1. Les ciliés

1.1.1. Bactériophages

A. Mobiles de fond

- *Aspidisca cicada*

Aussi connu comme *Aspidisca costata*, ce petit protozoaire (longueur entre 25 et 45 μm) a une très forte mobilité, ce qui rend parfois difficile sa prise de vue. Il a une forme ovoïde et possède une carapace ondulée. Par une vue de dessus ou dessous, on voit des cirrhes qui dépassent la longueur du corps. On le trouve souvent dans les stations d'épuration et son abondance est liée à des charges plutôt élevées.

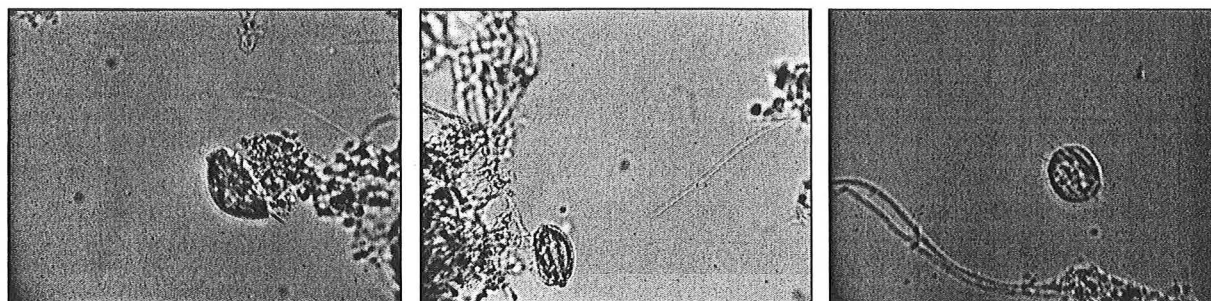


Figure B.1.1 - Images de *Aspidisca cicada* à un grossissement de 400x.

- *Euplotes*

Comme *Aspidisca cicada*, *Euplotes affinis* possède une carapace ondulée. La différenciation se fait par sa taille plus importante (40-70 μm), une forme plus allongée et des périodes de mobilité séparées par des pauses et la présence de cirrhes sur la face ventrale. Sa présence indique de faibles charges (liqueur mixte diluée).

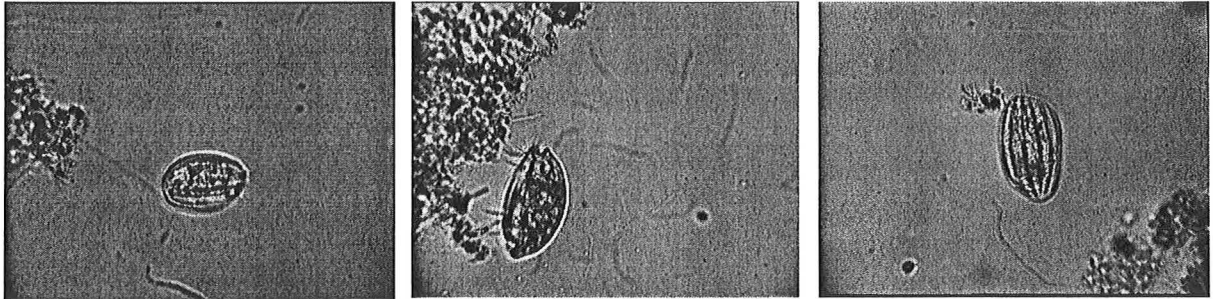


Figure B.1.2 - Photos de *Euplotes* prise à partir d'un microscope optique à 400x.

Trithigmostoma

Très semblable à *Chilodonella*, *Trithigmostoma* possède des dimensions plus importantes (entre 75 et 300 μm) et un nombre supérieur de vacuoles contractiles.

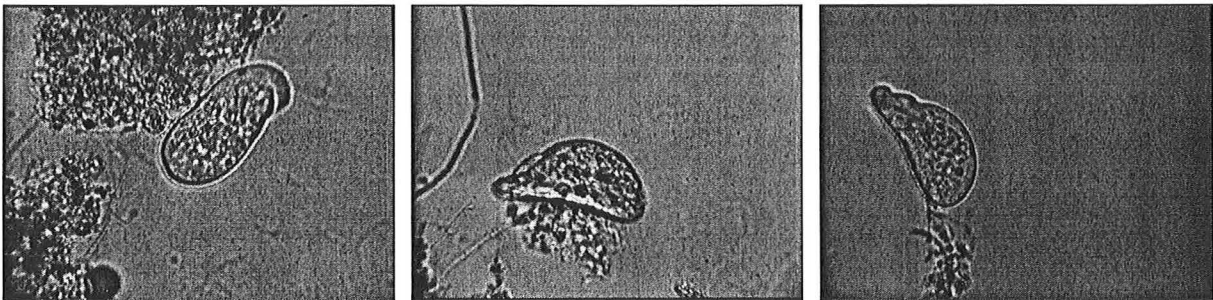


Figure B.1.3 - Images de *Trithigmostoma* prises à partir d'un microscope optique à 400x.

Trochilia

La présence de *Trochilia* est associée à une forte concentration de bactéries filamenteuses. Sa forme est ovoïde et sa longueur se situe généralement entre 25 et 40 μm .

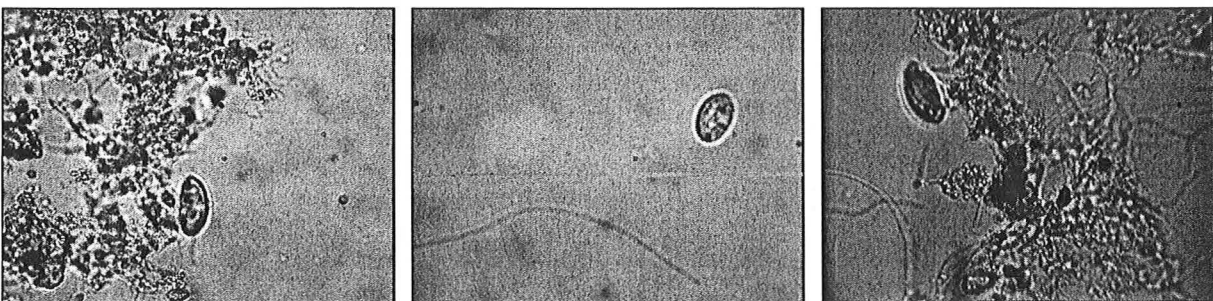


Figure B.1.4 - Images de *Trochilia* prises à partir d'un microscope optique avec un grossissement total de 400x.

B. Ciliés Sessiles

Les ciliés sessiles possèdent un pédoncule que leur permet de s'attacher aux floccs bactériens. A l'intérieur du pédoncule (excepté pour *Opercularia* et *Epystilis*) se trouve le myonème (un muscle) qui permet sa contraction. Le présence du myonème ainsi que la largeur du pédoncule sont des paramètres qui aident à la distinction entre les différentes espèces de protozoaires ciliés sessiles.

- *Carchesium* sp.

Carchesium est un cilié qui mesure entre 80 et 140 μm . Il se trouve généralement en colonies qui peuvent dépasser 3 mm. Son corps est en forme de campanule et le noyau est en forme de "C", comme pour *Vorticella convalaria*. Contrairement à *Zoothamnium*, chaque individu de la colonie peut se contracter indépendamment. Canler et al. (1999) indique que ce protozoaire a un important besoin en oxygène et qu'il est un indicateur d'effluent de bonne voire de très bonne qualité.

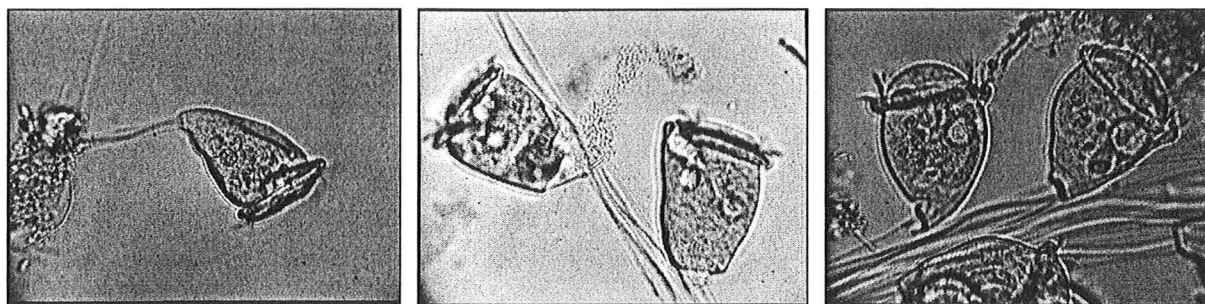


Figure B.1.5 - Quelques images de *Carchesium* sp. à 400x.

- *Zoothamnium* sp.

Comme *Carchesium*, ce protozoaire se trouve souvent en colonie. Sa dimension varie entre 50 et 100 μm . Son corps est plus cylindrique que celui du *Carchesium*.

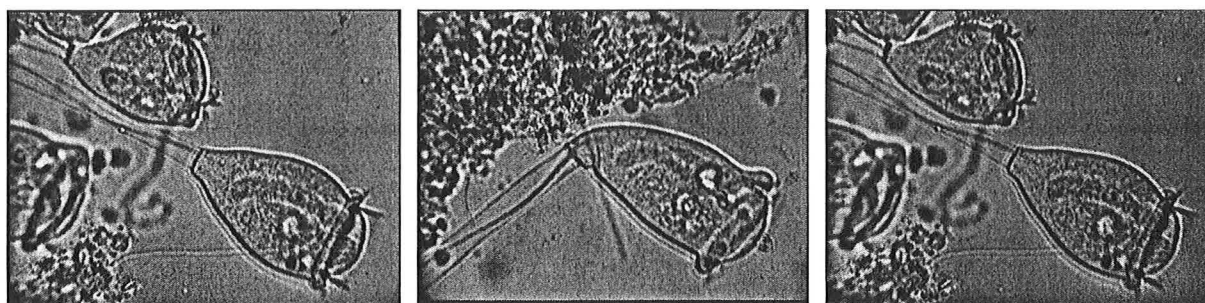


Figure B.1.6 - Photographies de *Zoothamnium* sp. à 400x.

- *Epystilis* sp.

Epystilis est un micro-organisme colonial, qui mesure entre 70 et 200 μm . Son corps a la forme d'un vase et le noyau se situe souvent en position perpendiculaire, proche à la cavité buccale. Le pédoncule n'a pas de myonème. Sa présence est liée à un effluent de bonne qualité et à une station avec un fonctionnement stable et correct.

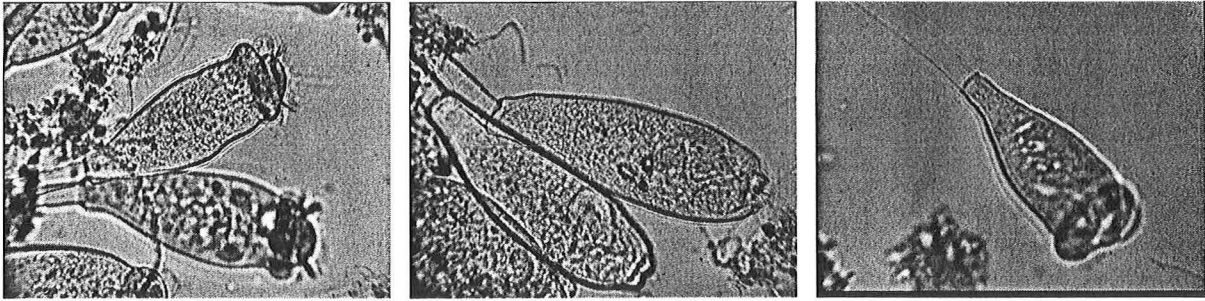


Figure B.1.7 - *Epystilis sp.* à 400x

- *Opercularia sp.*

Protozoaire sessile cilié, dépourvu de myonème, il se trouve souvent en colonies. Ce micro-organisme ressemble beaucoup à *Epystilis*, mais les colonies formées ont peu d'individus (4 à 8) et leur noyau est situé au milieu de la longueur (peristoma). La cilliatrice buccal s'étend du peristoma, qui est légèrement gonflé, jusqu'à la partie supérieure.

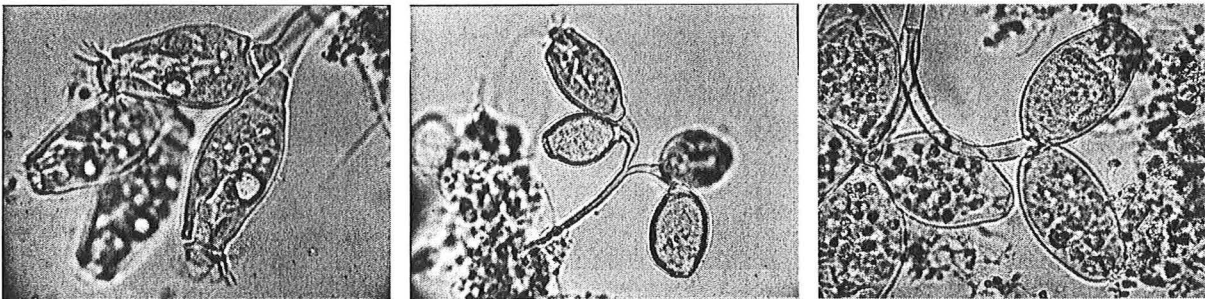


Figure B.1.8 - Images de *Opercularia sp.* à 400x.

- *Vorticella convallaria.*

C'est une grande vorticelle avec une longueur du corps entre 40 et 120 μm et de pédoncule entre 200 et 500 μm , qui se trouve généralement sous forme isolée. Son corps ressemble à une cloche et le noyau a une forme de "C". Elle est dotée d'une couronne de cils et d'un myonème à l'intérieur du pédoncule. Sa présence en abondance est liée à une bonne oxygénation et indique une bonne efficacité d'épuration.

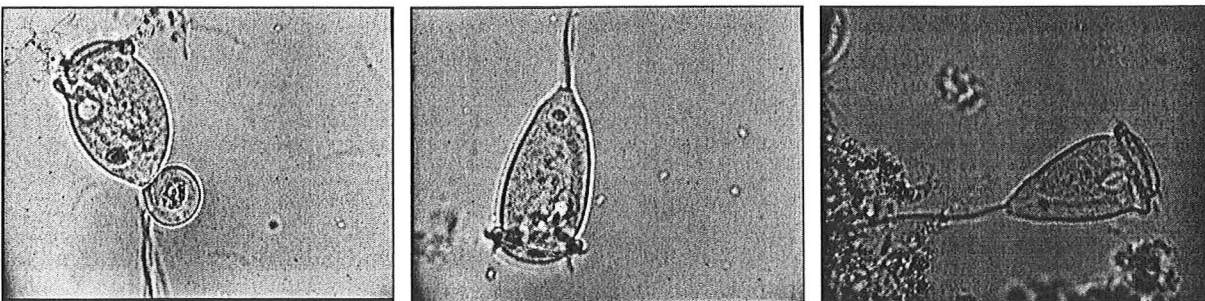


Figure B.1.9 - Quelques images de *Vorticella convallaria* à 400x.

- *Vorticella microstoma*.

De corps légèrement sphérique et de petite taille (corps entre 20 et 60 μm), ce protozoaire possède aussi un myonème à l'intérieur du pédoncule et une couronne de cils à l'ouverture buccale. La couronne de *V. microstoma* est rétrécie par rapport au corps et le noyau est allongé. Sa prédominance est liée à de faibles rendements associé à une carence en oxygène.

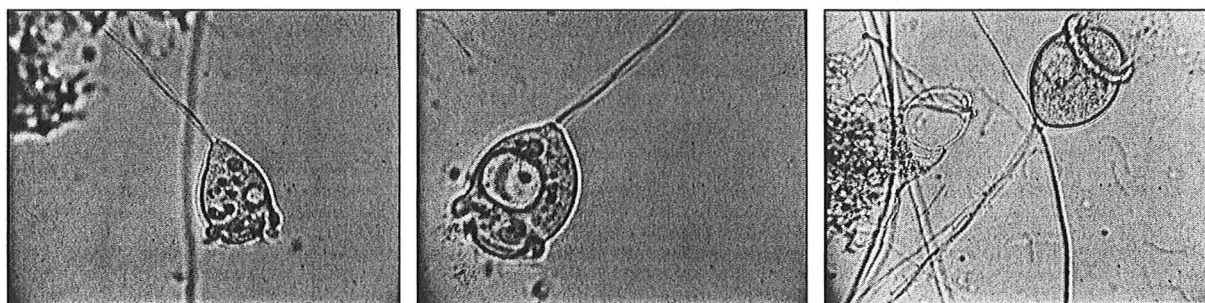


Figure B.1.10 - Photographies de *Vorticelles microstoma* prises à 400 x.

- *Vorticella aquadulcis*.

Vorticella aquadulcis a une forme similaire à *Vorticella convalaria*, mais sa taille est plus petite (longueur entre 25 et 50 μm) et son corps est strié. Sa prédominance est associée à une bonne oxygénation.

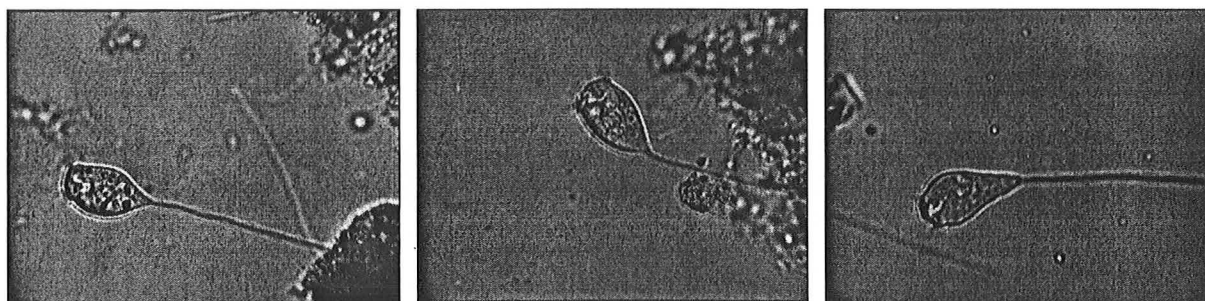


Figure B.1.11 - Images à 400x de *Vorticelle aquadulcis*.

C. Les ciliés nageurs

Dû à la faible occurrence des ciliés nageurs dans les stations suivies, ils n'ont pas été pris en compte dans cette étude.

1.1.2. Les Carnivores

- *Litonotus sp.*

Cilié doté d'un corps allongé et flexible, il possède une vacuole à l'extrémité postérieure très visible et sa tête est légèrement courbée. De longueur très variée (50 à 200 μm), il se nourrit préférentiellement des ciliés sessiles. Il se rencontre souvent dans des stations à charge moyenne et indiquent un état non-stationnaire.

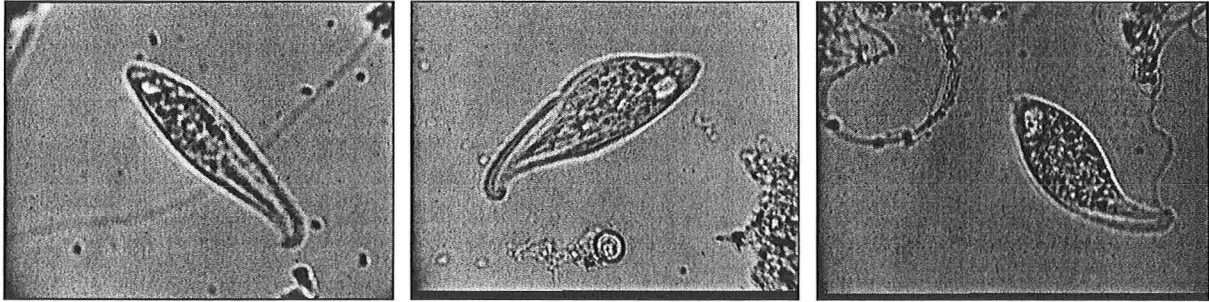


Figure B.1.12 - Photographies à 400x de *Litonotus sp.*

Suctoriens

Compte tenu du faible nombre d'individus, on a décidé de grouper tous les suctoriens pour faire l'identification semi-automatique par analyse d'image. Ces protozoaires ont des tentacules qui peuvent être dispersés sur la surface du corps (*Podophrya*) ou groupés (*Tokophrya* et *Acineta*).

- *Acineta sp.*

Ce sont des protozoaires carnivores, dotés de deux groupes de tentacules. Le noyau est arrondi et situé dans la partie centrale. Leur taille varie de 30 à 300 μm . L'espèce la plus petite est *A. cuspidata* et la plus grande *A. grandis*. Canler et al (1999) indique que *A. grandis* et *A. cuspidata* se rencontrent sur des installations dans lesquelles l'effluent est de très bonne qualité. Par contre la présence de *A. foetida* indique que l'effluent a une qualité moyenne à faible.

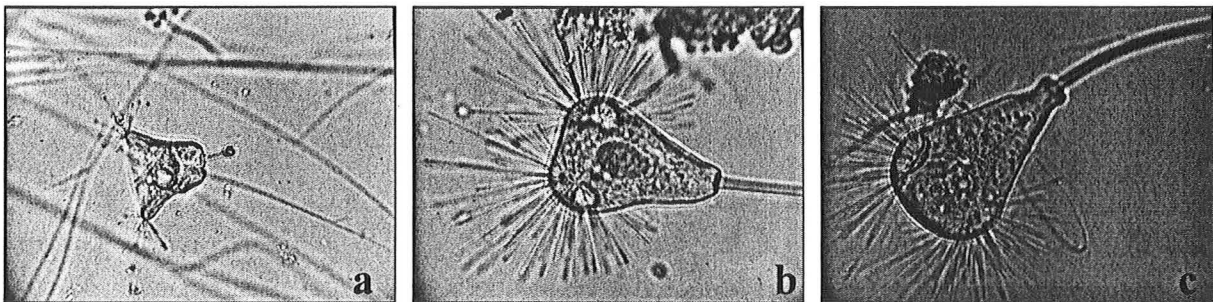


Figure B.1.13 - Photographie d'une *Acineta foetida* (a) et de deux *Acineta grandis* (b) et (c).
Images prises à un grossissement de 400x.

- *Podophrya sp.*

La forme de son corps est arrondie, ainsi que le noyau. Les tentacules sont réparties sur la surface de son corps mais, contrairement à *Sphaerophrya*, un pédoncule fixe le protozoaire au floc. Sa taille varie de 100 à 250 μm et sa présence est associée à un effluent de qualité moyenne à bonne.

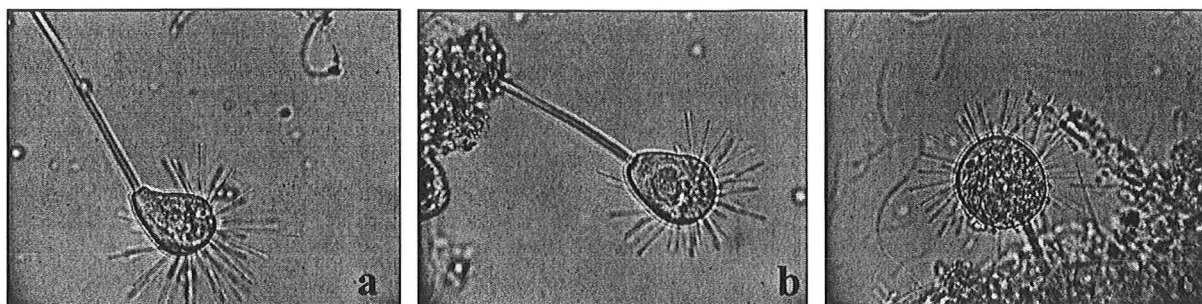


Figure B.1.14 - Quelques images de *Podophrya fixa* (a) et (b) et de *Podophrya maupasi* (c). Photographies prises à partir d'un microscope optique à 400x.

- *Tokophrya sp.*

Ces protozoaires carnivores possèdent un corps de forme pyramidale et le noyau est allongé. Les tentacules sont regroupés en deux (*T. mollis*) ou quatre (*T. quadripartida*) touffes. Leur dimension varie de 50 à 200 μm (50 à 70 pour le corps). Selon Madoni (1996), leur présence est fréquente dans les boues activées, surtout en ce qui concerne l'espèce *T. quadripartida*.

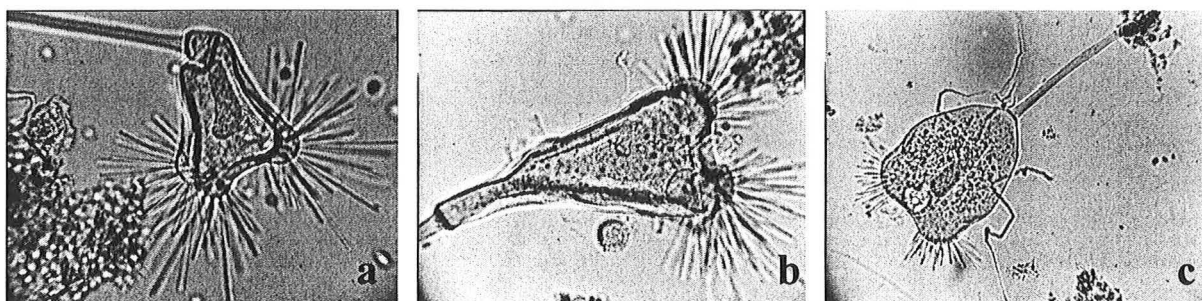


Figure B.1.15 - *T. quadripartida* (a) et (b) et *T. mollis* (c) prises à 400x.

1.2. Les Flagellés

- *Peranema*

C'est un grand flagellé de 20 à 100 μm , avec un corps cylindrique. A une extrémité on trouve le flagelle dressé droit, dont seulement la pointe (1/3) ondule quand il se déplace. L'autre extrémité peut être arrondie, inclinée ou carrée. C'est un organisme hétérotrophe et il peut ingérer des proies relativement grandes.

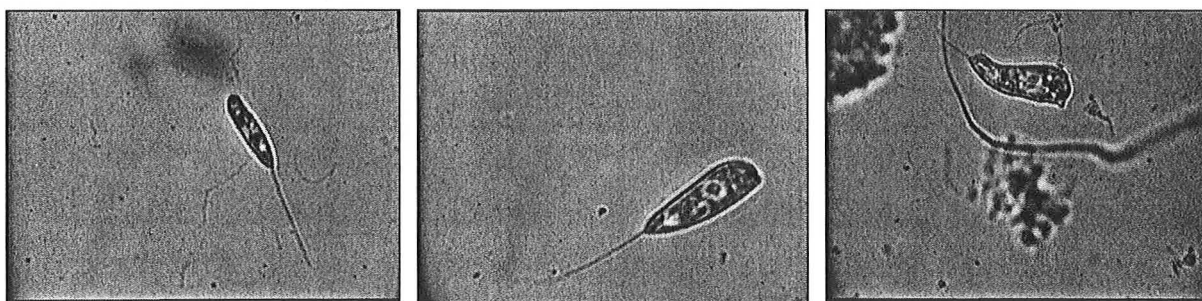


Figure B.1.16 - Quelques images de *Peranema* en train de se déplacer. Images acquise à 400 x.

1.3. Les Amibes

Dans nos suivis les Rhizopodes (*Amébiens* et *Thécamébiens*) étaient les plus fréquents. Comme les amibes libres n'ont pas une forme définie, on a restreint l'identification aux amibes avec une thèque (*Thécamébiens*).

- *Arcella* sp.

Ce genre d'amibe possède une carapace circulaire, quand on le voit par le dessus ou dessous, transparente, lisse et avec une ouverture centrale par où sortent les pseudopodes. Sa dimension varie entre 30 et 250 μm et ses pseudopodes sont très difficiles à observer. L'amibe *Arcella* est présente dans des installations qui fonctionnent à faible charge ou à aération prolongée et sont indicatrices d'une bonne performance de nitrification.

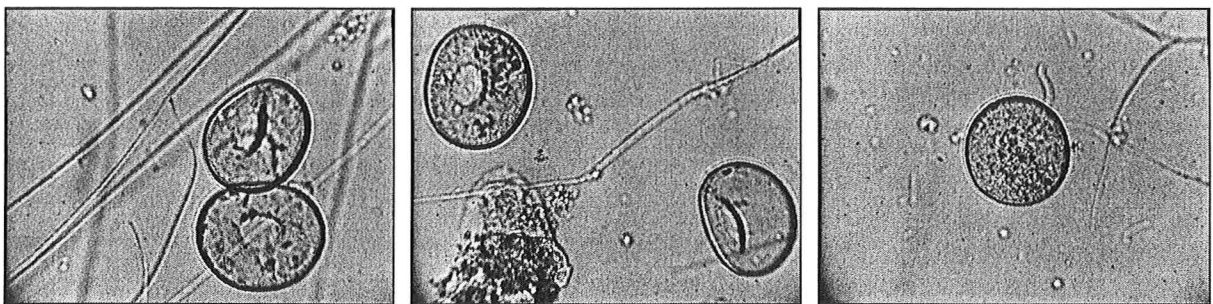


Figure B.1.17 - Images des thèques (coquilles) de *Arcella*. Image prise à partir d'un microscope optique avec un grossissement total de 400X.

- *Euglypha* sp.

C'est un amibe avec une thèque ellipsoïde, transparente et à une surface rugueuse. L'ouverture se trouve à une extrémité. Il a une taille qui varie entre 20 et 150 μm . Comme *Arcella*, *Euglypha* se trouve dans le domaine de l'aération prolongée ou de faible charge.

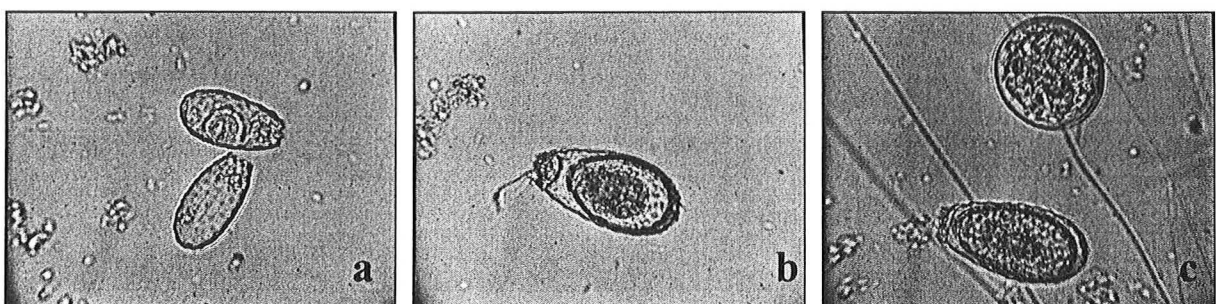


Figure B.1.18 - Photographies de *Euglyphas* (a) et (b) et de *Euglypha* avec une *Arcella* (c)

2. Les Métazoaires

2.1 Rotifères

Les Rotifères sont dotés d'un appareil rotatoire qui filtre l'eau qui circule. Ils peuvent être libres ou sur la surface des floes. Leur présence indique un fonctionnement stable de la station et un âge des boues élevé. Leur taille varie entre 50 et 500 μm .

2.1.1. *Monogonontas*

Ces rotifères possèdent une espèce de carapace, et un ou deux pieds que leur permet de se fixer sur la surface des floes. Ils possèdent seulement une couronne de cils.

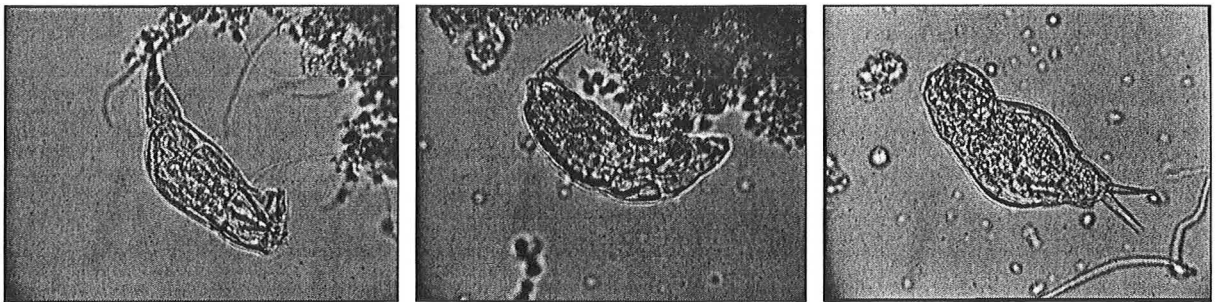


Figure B.2.1 - Images des *Monogonontas* au microscope optique à un grossissement de 400x

2.1.2. *Digonontas*

Son corps télescopique possède deux couronnes de cils à l'ouverture bucale. Lorsqu'il est déployé son pied est plus long que son corps.

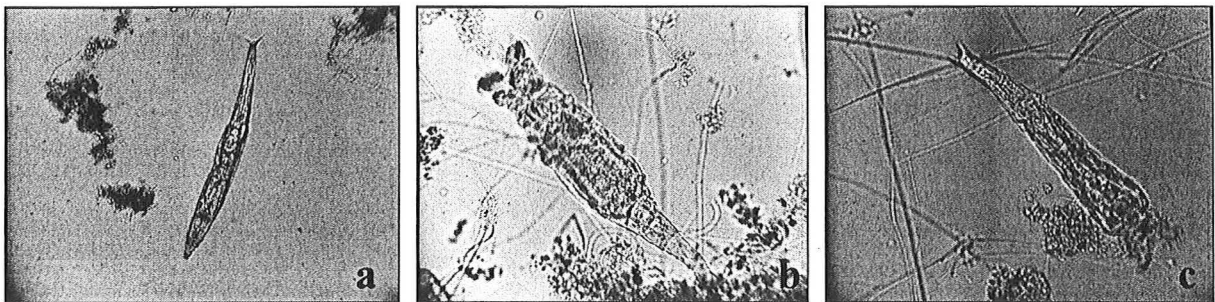


Figure B.2.2 - Images des *Digonontas* capturé avec un microscope optique à un grossissement de 100x (a) et 250 x (b) et (c)

2.2. Nématodes

Les Nématodes sont des Rotifères qui ont une taille supérieure à 150 μm . Leur corps est lisse et ne présente pas de cils. Leur présence en grande concentration peut indiquer la formation de dépôts à l'intérieur du bassin d'aération ou du décanteur.

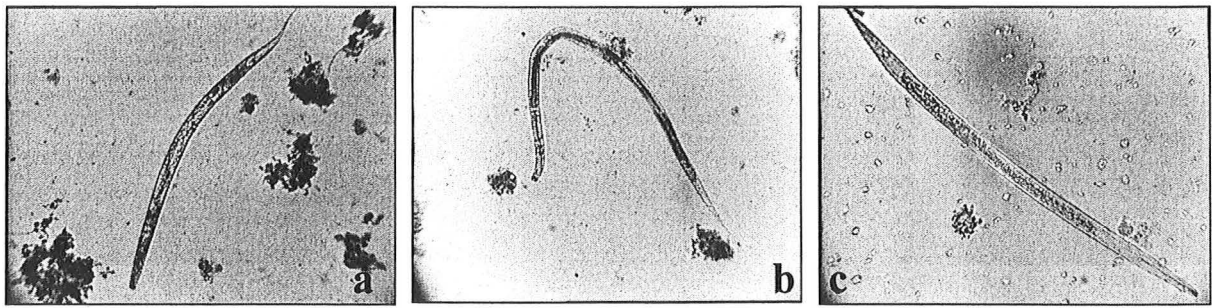


Figure B.2.3 - Photos des *Nématodes* à un grossissement de 100x (a) et (b) et 250 x (c).

2.3. Oligochètes

Les Oligochètes ont une taille qui varie généralement entre 0.5 et 4 mm et possèdent des touffes de soies distribués le long du corps. Ce sont des vermiformes segmentés en anneaux (contrairement aux *Nématodes*) et leur tête est arrondie. Leur présence indique des âges de boues élevés. Selon Canler et al. (1999), ils peuvent aussi indiquer une bonne qualité de l'eau de sortie, une sur-oxygénation et la présence de nitrates.

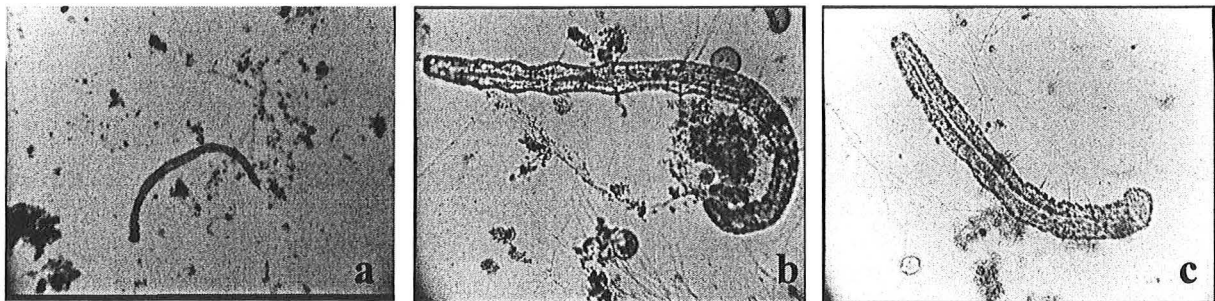


Figure B.2.4 - Photos des *Oligochètes* genre *Aelosoma* à un grossissement de 25x (a) et 100 x (b) et (c).

Annexes C

*"Être homme est facile
Être un homme est difficile"*

Proverbe Chinois

Stations d'Épuration

Annexe C1 - Station de Nancy-Maxéville	C - 2
Annexe C2 - Station de Braga	C - 3
Annexe C3 - Station de Gelfa	C - 3
Annexe C4 - Station de Caminha	C - 4
Annexe C5 - Station de Metz	C - 5
Annexe C6 - Station de Toul	C - 6
Annexe C7 - Station de Damelevières	C - 6
Annexe C8 - Station de Pont-à-Mousson	C - 7
Annexe C9 - Station de Dombasle	C - 7
Annexe C10 - Station de Liverdun	C - 7

Quelques informations sur les stations d'épuration visitées, données par leurs responsables, sont présentées dans cette annexe.

C.1. Station de Nancy- Maxéville

La station de Nancy-Maxéville, située au bord de la Meurthe, possède deux filières: urbaine et industrielle. La filière industrielle traite essentiellement les effluents de la brasserie Kronenbourg de Champigneulle. Cette filière reçoit un débit de 3000 m³/j avec une DCO de 2300 mg/L et une DBO₅ de 1150 mg/L. Après le pré-traitement et une première étape de traitement à l'oxygène pur, il y a une dilution avec l'effluent urbain dans le bassin d'aération (30% des effluents urbains sont envoyés dans le second bassin d'aération industriel).

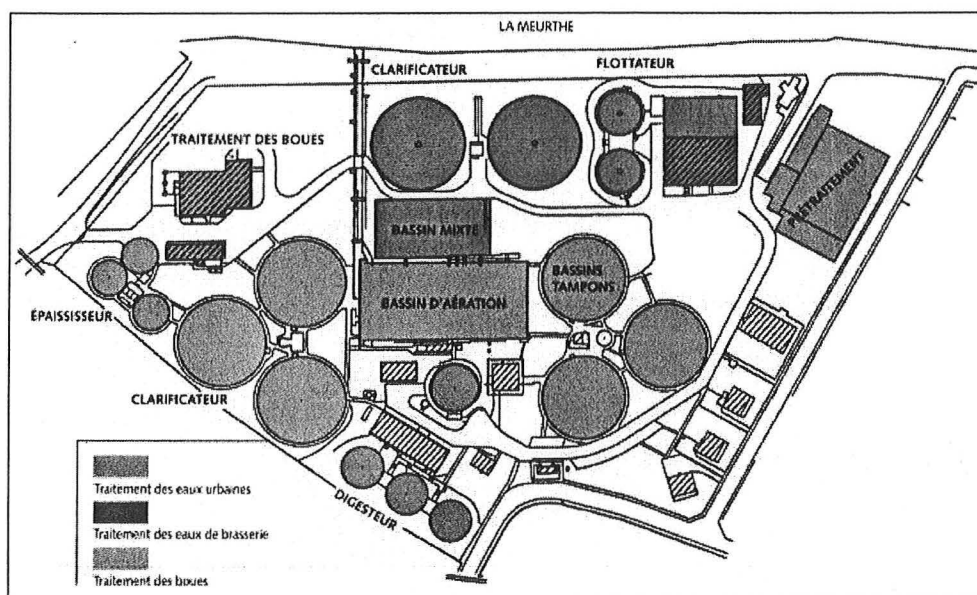


Figure C.1 - Plan de la station de Nancy - Maxéville

La filière urbaine a une capacité de 300 000 équivalents habitants, soit 7 200 m³/h. Le débit moyen est de 100 000 m³/j avec une DCO de 260 mg/L et une DBO₅ de 120mg/L. Le pré-traitement est constitué d'un pré-dégrillage suivi d'un dégrillage fin. Ensuite l'eau passe par un module qui combine le dessablage, le dégraissage et la décantation primaire dans un décanteur à lamelles. En cas d'orage, la station compte avec trois bassins d'une capacité totale de 12 000 m³.

Au moment de ce travail le traitement biologique était réalisé dans trois réacteurs canal (volume total de 9 000 m³) dotés d'un système d'aération par insufflation d'air à travers des dômes poreux. La séparation des boues de l'eau épurée était réalisée par trois clarificateurs (volume unitaire de 5 000 m³). Les boues en excès passent par un digesteur anaérobie, par un épaisseur et par une centrifugeuse pour ensuite être séchées avec le gaz produit pendant la digestion.

Des travaux de mise aux normes sont en cours de réalisation. Les clarificateurs ont été complètement refaits et un nouveau bassin pour le traitement de l'azote a été construit. Des modifications sur les bassins d'aération sont prévues pour la fin de l'année 2001.

C.2. Station de Braga

La station d'épuration principale de la ville de Braga est la station de Frossos. Elle reçoit un débit moyen de 23 000 m³/j d'un effluent composé en sa majeure partie (90%) par des effluents urbains. La DCO moyenne se situe entre 460 et 420 mg/L et la DBO₅ correspond à 40-45% de cette valeur. Dans la station, l'eau est pompée par trois vis d'Archimède (deux en marche permanente et une au repos) et ensuite passe par un dégrillage suivi d'un dégraissage et d'un déshuilage. Avant d'alimenter les réacteurs biologiques l'eau est décantée dans les trois décanteurs primaires. Les trois réacteurs (deux fonctionnent et l'un est en maintenance) sont dotés de deux aérateurs de surface chacun. L'eau épurée est ensuite séparée de la biomasse dans les clarificateurs (en nombre de trois) et envoyée à la rivière. Le débit de recirculation est de 15 000 m³/j. L'âge des boues est un peu près de 7 jours.

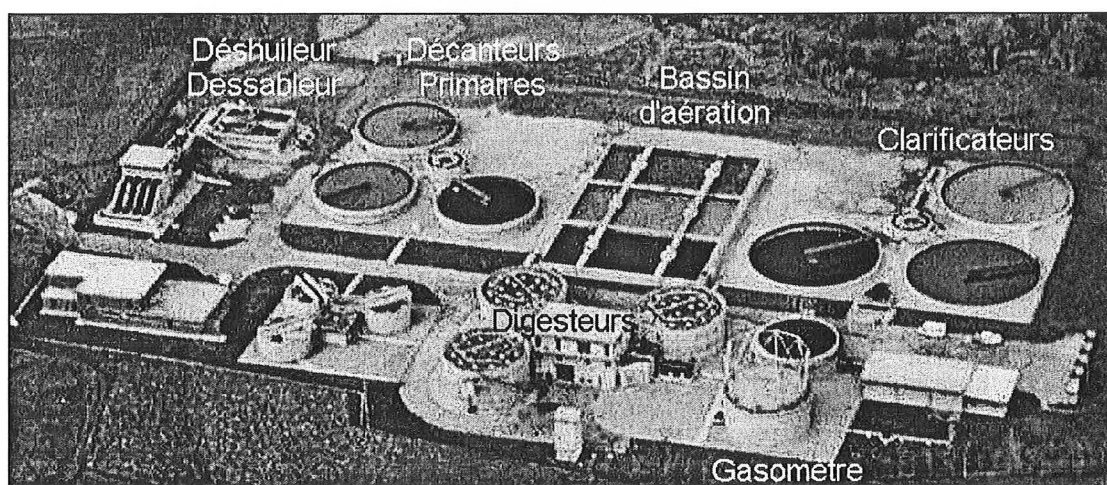


Figure C.2 - Vue aérienne de la station de Frossos (Braga - Portugal)

La boue en excès est prélevée à un débit de 800 m³/j. Ensuite elle est envoyée dans un digesteur anaérobie puis déshydratée. Le méthane produit lors de la digestion des boues, est utilisé pour le chauffage des boues dans le procédé de digestion et pour la génération d'énergie électrique, par cogénération. L'eau épurée est utilisée dans les opérations de nettoyage de la station ainsi que pour l'arrosage des jardins.

C.3. Station de Gelfa (Vila Praia de Ancora)

La station de Gelfa traite l'eau de la communauté de Vila Praia de Ancora, situé dans la région du Minho (Portugal) au bord de la mer et de la rivière Ancôra, à 15 km de Viana do Castelo, siège du district, et à 8 Km de Caminha, siège du "canton" (conselho). Cette station, ainsi que celle de Caminha, sont de petite taille, compte tenue du faible nombre d'habitants. Tout le "canton", qui abrite 20 communes (freguesias) possède 16 000 habitants.

La station a été conçue pour un débit maximal de 4390 m³/j mais opère à un débit moyen de 3140 m³/j. L'Indice de Mohlman moyen pour le mois d'avril 2000 a été de 316 mL/g, les matières en suspension de 1.92 g/L et le pourcentage des matières volatile de 75%. L'efficacité de l'épuration est supérieure à 80%, avec une moyenne pour le mois d'avril 2000 pour la DCO d'entrée de 330 mg/L et pour la DBO₅ de 227 mg/L.

Le réseau d'assainissement comporte plusieurs puits d'où l'eau est ensuite pompée jusqu'à la station d'épuration. Ces puits fonctionnent comme des pré décanteurs et des dégrilleurs. Dès

son arrivée à la station l'eau passe par deux déssableurs pour ensuite être épurée dans le bassin biologique. Ce bassin est constitué de deux bassins d'aération avec un volume total de 2000 m³ et l'aération est réalisée par deux paires d'aérateurs de surface. La séparation de la biomasse est réalisée dans deux décanteurs de 500 m³ chacun. Avant d'être envoyée à la rivière, l'eau passe encore par un filtre de sable.

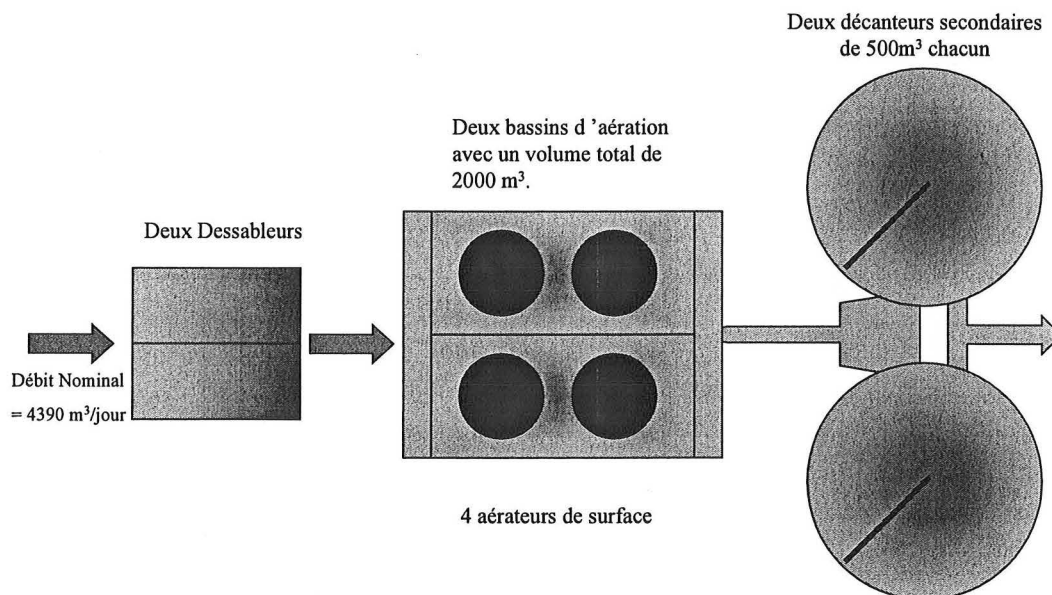


Figure C.3 - Schéma de la station d'épuration de Gelfa.

C.4. Station de Caminha

La station d'épuration de Caminha a une capacité moitié de celle de Gelfa. Elle a été bâtie et est exploitée par la même entreprise (EFACEC environnement). A la sortie du clarificateur, l'eau passe par un bassin de rétention pour ensuite être chlorée dans le bassin de contact.

Les conditions de décantabilité de cette station étaient meilleures que pour celle de Gelfa pendant le mois d'avril 2000. L'Indice de Mohlman moyen pour le mois d'avril 2000 a été de 93 mL/g. La DCO était plus importante (513 mg/L) ainsi que la DBO₅ (370 mg/L). La matière en suspension moyenne pour cette même période a été de 2.96 g/l avec un pourcentage de matière volatile de 71%.

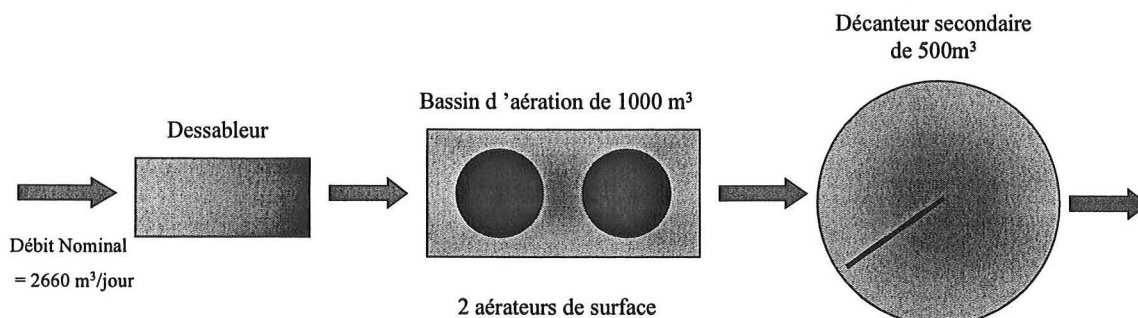


Figure C.4 - Schéma de la station d'épuration de Caminha.

C.5 Station de Metz

La station d'épuration des eaux usées de Metz est en opération depuis 1974. Dans les années 90 elle a subi des modernisations et extensions, notamment pour le traitement de l'azote et des phosphates. Les besoins de traitement de la communauté de Metz sont de 55 000 m³/j. Avec l'adhésion des nouvelles communes cela peut atteindre 72 000 m³ par temps sec. La station a une capacité de traitement de 240 000 m³/j, débit qui peut être atteint en périodes de fortes pluies.

En termes de pollution, la station est prévue pour traiter de 20 à 40 tonnes par jour de matière en suspension; une *DBO₅* de 14 à 24 tonnes par jour et un *DCO* de 30 à 60 tonnes par jour. Par rapport aux nouvelles normes elle peut traiter 3 à 5 tonnes de azote (azote global) et de 1 à 2 tonnes de phosphore par jour.

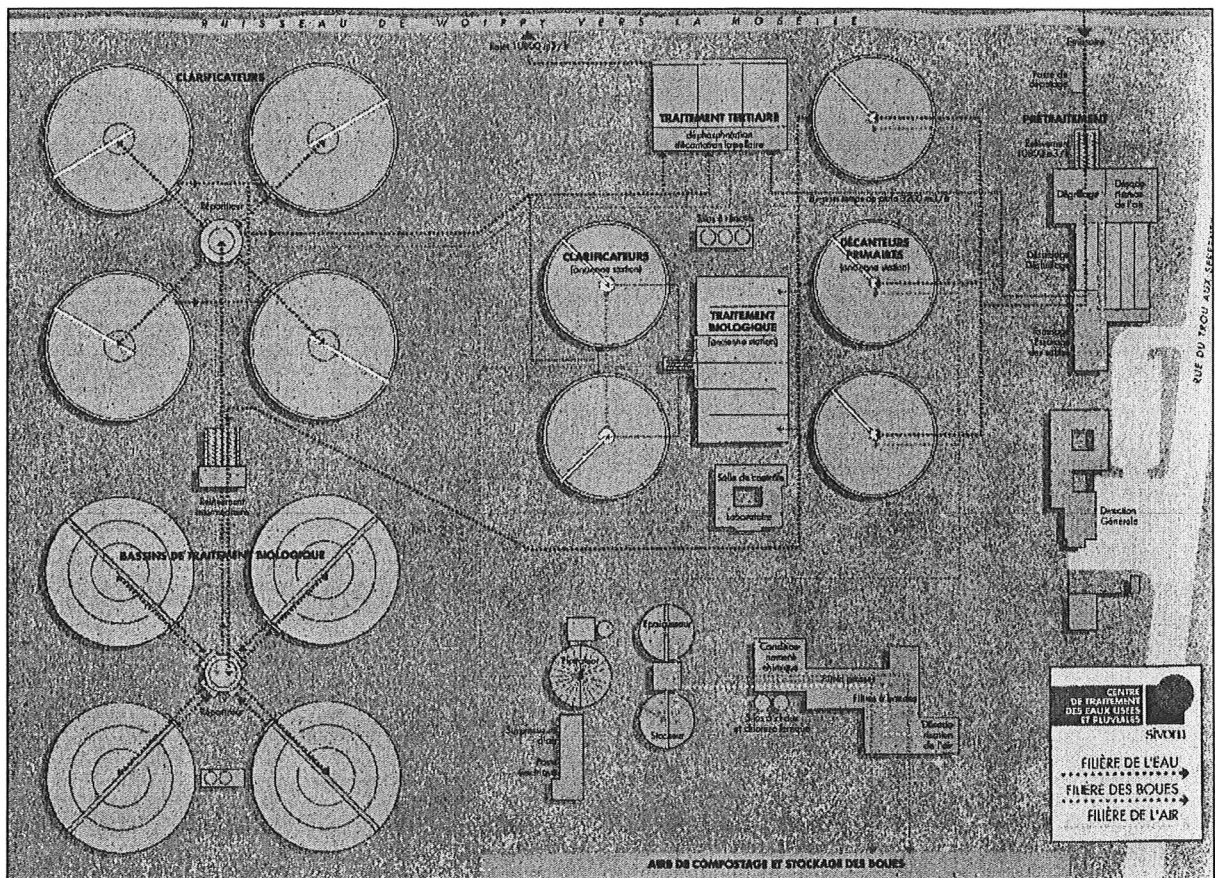


Figure C.5 - Schéma simplifié de fonctionnement de la station d'épuration de Metz

En entrant dans la station, l'eau brute passe d'abord par un pré-traitement composé d'une dégrillage pour les grosses particules (> 20 mm), d'un dégraissage et d'un dessablage dans un bassin avec insufflation d'air et un dégrillage fin (> 6 mm). Ensuite l'eau passe par un décanteur primaire puis est amenée dans le bassin biologique. Ce bassin est circulaire et formé par trois zones: zone anaérobie (centrale) par où arrive l'alimentation; zone aérobie (anneau intermédiaire) suivie de la zone endogène (anneau externe). Ce système permet d'éliminer les pollutions dissoutes carbonées et azotées. La séparation de l'eau épurée est faite dans le décanteur secondaire et ensuite la pollution phosphorée est éliminée par l'addition de chlorure ferrique suivie d'une décantation. L'eau, délivrée de toute sa pollution, est rejetée dans un ruisseau qui l'amène vers la Moselle.

C.6. Station de Toul

Les eaux usées du secteur "Croix de Toul" (nombre d'habitants de l'agglomération: 22 639) arrivent sur le poste de relèvement qui va alimenter le bassin "toutes eaux". S'il est trop chargé une partie du débit va vers le bassin d'orage pour être traité quand le débit d'entrée aura diminué. Le pré-traitement est formé par un dégrilleur et un dégraisseur. L'eau entre ensuite dans le bassin biologique qui est divisée en deux parties. A l'entrée se trouve une zone d'anoxie (traitement de l'azote), suivie d'une zone aérée (traitement de la matière carbonée). Dans la zone d'anoxie trois agitateurs maintiennent la biomasse en suspension. L'aération est réalisée par quatre turbines de surface. A l'entrée du bassin d'aération du chlorure ferrique est injecté pour le traitement du phosphore.

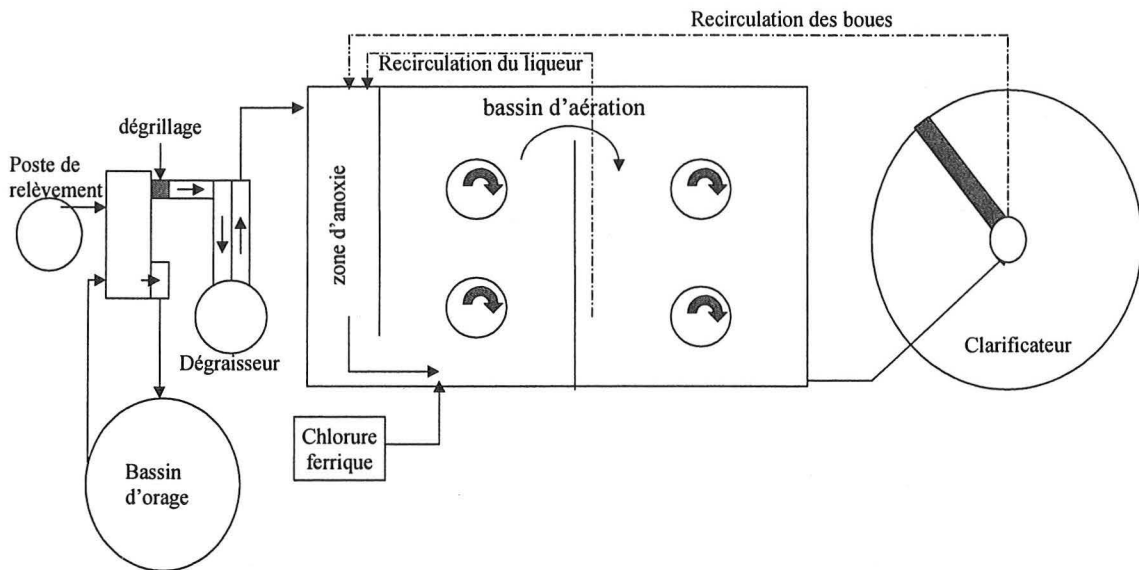


Figure C.6 - Schéma de la station de Toul

C.7. Station de Damelevières

La station de traitement des eaux usées de Damelevières (nombre d'habitants de l'agglomération: 6 532) est du type compact et traite seulement la pollution carbonée.

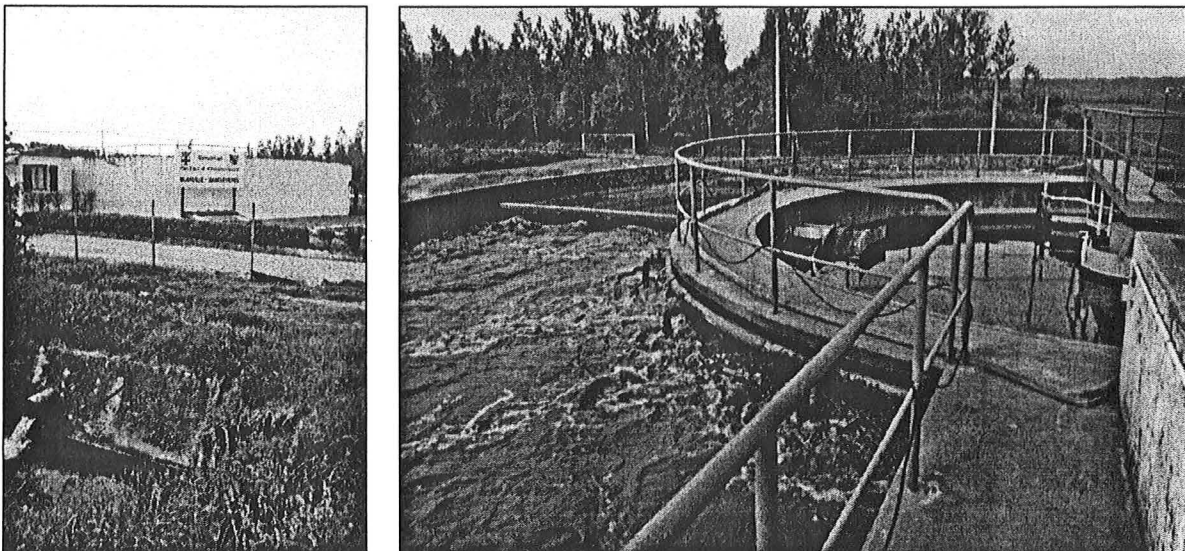


Figure C.7. - Photos de la station d'épuration des eaux usées de Damelevières

C.8. Station de Pont-à-Mousson

La station de Pont-à-Mousson (nombre d'habitants de l'agglomération: 23 677) utilise un bassin d'aération circulaire avec aération séquentielle pour le traitement de l'azote. Du chlorure ferrique est ajouté pour le traitement du phosphore.

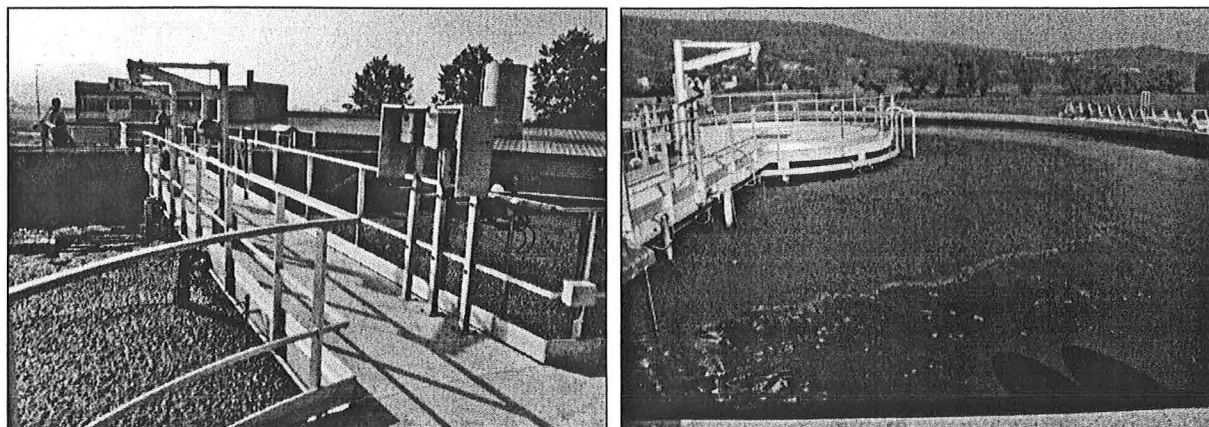


Figure C.8 - Photos du bassin d'aération de la station d'épuration de Pont-à-Mousson

C.9. Station de Dombasle

La station de Dombasle (nombre d'habitants de la ville: 9 133) est du type bassin unique. L'eau qui arrive dans la station est remontée par une vis d'Archimède dans la station de relèvement et ensuite est dégrillée. Ensuite, elle est aspergée dans le bassin d'aération. Le traitement se limite à celui de la pollution carbonée.

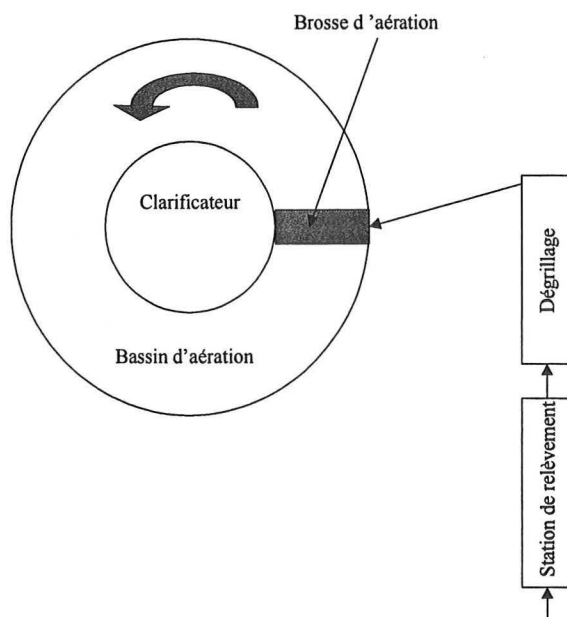


Figure C.9 - Schéma simplifié de la station d'épuration de Dombasle.

C.10. Station de Liverdun

Il s'agit d'une petite station (nombre d'habitants de la ville: 6 436) comportant un pré-traitement, un bassin biologique avec aération de surface et une clarification. L'eau épurée est rejetée sur la Moselle.

Annexe D

*"L'expérience est une lanterne accrochée dans le dos,
qui n'éclaire que le chemin parcouru"*

CONFUCIUS

Liste des Publications

Dans cet annexe sont présentés les articles issues des résultats obtenues au cours de cette thèse et qui ont été publiés en journaux ou présentés à des congrès et publiés dans leurs actes.

Articles Publiés

- 1 **DA MOTTA M., PONS M.N., ROCHE N.** (2001) *Estudo da decantabilidade dos flocos de lamas ativadas de uma estação de tratamento de efluentes por análise de imagem* (Etude de la décantabilité des floccs de boues activées d'uns station d'épuration par analyse d'image), *Energías Renovables y Medio Ambiente*, 9, p. 43-48. (en portugais).
- 2 **DA MOTTA M., AMARAL A.L., PONS M.N., FERREIRA E.C., VIVIER H., MOTA M.** (2001) *Estudo por análise de imagem do comportamento de uma estação de tratamento de efluentes sob condições transientes* (Etude par analyse d'image du comportement d'une station de traitement des eaux usées sous conditions transitoires) *Energías Renovables y Medio Ambiente*, 9, p. 49-55 (en portugais).
- 3 **DA MOTTA M., PONS M.N., ROCHE N.** (2001) *Characterization of activated sludge by automated image analysis*. *Biochemical Engineering Journal*, accepté et sous presse.
- 4 **DA MOTTA M., PONS M.N., ROCHE N.** (2001) *Automated monitoring of activated sludge in a pilot plant using image analysis*. *Water Science and Technology*, 43 (7), p. 91-96.
- 5 **DA MOTTA M., PONS M.N., VIVIER H., AMARAL A.L., FERREIRA E.C., ROCHE N., MOTA M.** (2001) *Study of protozoa population in wastewater treatment plants by image analysis*, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 18 (1), p. 103-111.
- 6 **ALVES M.M., CAVALEIRO A.J., FERREIRA E.C., AMARAL A.L., MOTA M., DA MOTTA M., VIVIER H., PONS M.N.** (2000) *Characterisation by image analysis of anaerobic microbial aggregates under shock conditions*. *Water Science and Technology*, 41 (12), p. 207-214.

Communications

1. **DA MOTTA M., PONS M. N., ROCHE N.** (2002) *Quantification by image analysis of filamentous bacteria abundance and Gram-icity*, XIVBrazilian Congress of Chemical Engineering, Natal (Brésil), (Article accepté)
2. **DA MOTTA M., AMARAL A.L., NEVES L., ARAYA P., FERREIRA E.C., ALVES M.M., PONS M.N., ROCHE N., VIVIER H., MOTA M.** (2002) *Efeito da diluição na caracterização da biomassa de sistemas de tratamento de efluentes por análise de imagem* (Effet de la dilution dans la caractérisation de la biomasse de systèmes de traitement des eaux usées par analyse d'image), XIVBrazilian Congress of Chemical Engineering, Natal (Brésil), (Article accepté)
3. **DA MOTTA M., PONS M. N., ROCHE N.** (2001) *Comparaison du fonctionnement de deux bioréacteurs à boues activées par analyse d'image*, 8^{ème} Congrès Francophone du Génie des Procédés, in: Récents Progrès du Génie des Procédés, Nancy (Paris).
4. **AMARAL, A.L., PEREIRA M. A., NEVES L., DA MOTTA M., PONS M.N., VIVIER H., FERREIRA E. C., ALVES M. M.** (2001) *Characterisation by image analysis of anaerobic sludge from two ESGB reactors treating oleic acid : Automatic detection of granules disintegration*, 9th World Congress on Anaerobic Digestion, Anvers (Belgique)
5. **DA MOTTA M., AMARAL A.L., CASELLAS M., PONS M.N., DAGOT C., ROCHE N., FERREIRA E.C., VIVIER H.** (2001) *Characterisation of activated sludge by automated image analysis : validation on full-scale plants*, 8th International Conference on Computer Applications in Biotechnology (CAB8), Québec (Canada), p.452-456.
6. **DA MOTTA M., PONS M. N., ROCHE N.** (2001) *Study of filamentous bacterias by Image Analysis and relation with settleability*, 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Process, Rome (Italie), p.265-272
7. **AMARAL A.L., DA MOTTA M., PONS M.N., VIVIER H., MOTA M., FERREIRA E.C.** (2001) *Survey of an wastewater treatment plant microfauna by image analysis*, 8th International Chemical Engineering Conference, Aveiro (Portugal).
8. **DA MOTTA M., PONS M.N., VIVIER H., ROCHE N., AMARAL A.L., FERREIRA E.C., MOTA M.** (2001) *Reconnaissance Semi-Automatique de la Microfaune des Boues Activées des Stations d'Épuration des Eaux Usées: Protorec V2.0*, Congrès Visualisation, Image, Modélisation (VIM 2001), In: Visualisation, Image, Modélisation. Collection Récents Progrès en Génie des Procédés, v.14, p.167-172, Nancy (France)
9. **DA MOTTA M., PONS M.N., ROCHE N.** (2000) *Automated monitoring of activated sludge in a pilot plant using image analysis*, 5th International Symposium Systems Analysis and Computing in Water Quality Management (WATERMATEX), Gent (Belgique), p. 2.1-2.6.
10. **DA MOTTA M., PONS M.N., ROCHE N., AMARAL A.L, FERREIRA E.C.,**

ALVES M.M., MOTA M., VIVIER H. (2000) *Automated monitoring of activated sludge using image analysis*, 1st World Water Congress of the International Water Association, Paris (France).

11. **DA MOTTA M., PONS M.N., ROCHE N.** (2000) *Expérimentation avec un écosystème complexe: le cas des boues activées*. Séminaire de l'Ecole Doctorale PROMEMA. In: *Prospectives en expérimentations: Quelques Aspects en Science pour L'Ingénieur - Collection Récents Progrès en Génie des Procédés*, v.14, p.41-46, Nancy (France).
12. **ALVES M.M., CAVALEIRO A.J., FERREIRA E.C., AMARAL A.L., MOTA M., DA MOTTA M., VIVIER H., PONS M.N.** (2000) *Characterisation by image analysis of anaerobic microbial aggregates under shock conditions*, 4th International Symposium on Biotechnology, Noordwijkerhout (Pays-Bas), p.127-130.
13. **DA MOTTA M., PONS M.N., VIVIER H., AMARAL A.L., FERREIRA E.C., ROCHE N., MOTA M.** (2000) *Study of protozoa population in wastewater treatment plants by image analysis*. XIII Brazilian Congress of Chemical Engineering, Aguas de São Pedro (Brésil).
14. **DA MOTTA M., PONS M.N., ROCHE N., AMARAL A.L., FERREIRA E.C., MOTA M.** (1999) *Analyse des Flocs Bactériens et de la Microfaune des Boues Activées par Analyse d'image*, 3^{ème} Congrès International L'eau et sa Réutilisation, Toulouse (France), p.321-326.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR
Monsieur GRASMICK Alain, Professeur, Université de Montpellier II, Montpellier
Monsieur IMPE Jan Van, Professeur, Labb. Ind. Microbiol. & Biochemie, Belgium

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur DA MOTTA SOBRINHO Mauricio Alves

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

«Applications de l'analyse d'image à la caractérisation de la microfauune des stations
d'épuration des eaux usées».

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : «GENIE DES PROCÉDES»

Fait à Vandoeuvre le, 10 octobre 2001

Le Président de l'IN P.T.

J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F. - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé

Dans une station d'épuration d'eaux usées par boues activées on trouve un écosystème formé en majeure partie par des bactéries, protozoaires et métazoaires. Les bactéries s'agglomèrent sous la forme de floccs qui sont formés par des bactéries filamenteuses et par les exopolymères produits par les bactéries zoogléales. Un déséquilibre de concentration entre ces deux groupes de bactéries cause des dysfonctionnements tel que le bulking filamenteux et le flocc dit "tête d'épingle". Les espèces de protozoaires présents sont sensibles aux variations du procédé, ce qui en fait de bons indicateurs de l'état de la station. Afin d'automatiser les tâches de quantification de ces espèces, deux procédures par analyse d'image ont été mises en place pour le comptage des filaments et des caractéristiques morphologiques des floccs (*FlocMorph v.2*) et pour l'identification et comptage des protozoaires (*ProtoRec v.3*). Le suivi d'une grande station urbaine (Nancy-Maxéville, 350 000 équivalent-habitants) ainsi que des analyses sur 11 autres stations en France et au Portugal nous ont permis de valider la procédure *FlocMorph v.2* et de détecter les situations de crise (bulking, défloculation). En complément des expériences sur réacteur pilote ont été réalisées. Sur le réacteur pilote parfaitement agité (*RPA*), l'effet du volume du décanteur ainsi que de la température sur le comportement des bactéries a été mis en évidence. Des longueurs plus importantes de bactéries filamenteuses ont été observées pendant la période la plus froide et pendant le bulking. La comparaison du *RPA* avec un réacteur canal (*RC*) a démontré la stabilité plus importante de ce dernier par rapport au développement du bulking et de la morphologie des floccs. Des analyses multiparamétriques ont montré que l'Indice de Mohlman est une fonction de la longueur totale et du nombre des filaments et du diamètre équivalent des floccs. Les résultats obtenus par *ProtoRec v.3* sont satisfaisants puisque l'on a obtenu des indices de reconnaissance moyens de 72% pour les espèces et au-dessus de 80% pour les groupes de protozoaires. Ces outils permettent de remplacer des opérations manuelles délicates et fastidieuses réalisées par des experts, et leur implantation sur site est rapidement envisageable.

Abstract

In wastewater treatment plants by activated sludge, a large part of ecosystem consists in bacteria, protozoa and metazoa. Bacteria are agglomerated in floccs, formed by filamentous bacteria and by exopolymers produced by zooglycal bacteria. A misbalance between these two bacterial groups induces malfunctions such as filamentous bulking or "pin-point" floc formation. Protozoa are sensitive to process perturbations, which make them good indicators of the plant state. In order to automate the quantification of those species, two image-analysis procedures have been developed, to count filaments and characterise the morphology of floccs (*FlocMorph v.2*) and to identify and count protozoa (*ProtoRec v.3*). The procedure *FlocMorph v.2* has been validated through the monitoring of a large municipal wastewater treatment plant (Nancy-Maxéville, 350 000 equivalent people) and by samples collected in 11 plants in France and Portugal. Critical situations such as bulking and defloculation can be detected. Moreover, pilot-scale experiments have been performed. On a well-stirred tank (*RPA*), the effect of the clarifier size as well as of the temperature on the behaviour of bacteria has been shown. Filamentous bacteria are longer during the cold period and during bulking. By comparing the *RPA* with a channel-type reactor (*RC*) it could be shown that the latter is more stable with respect to bulking and floc morphology. Multi-parameter analysis has shown that the Sludge Volume Index is function of the number and total length of filaments and of the floc equivalent diameter. The results obtained with *ProtoRec v.3* are satisfactory as average recognition rates of 72% for protozoa species and larger than 80% for protozoa groups have been obtained. These tools can replace delicate and tedious manual operations done by experts and their on-site implementation can be rapidly considered.