

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire /Biologie Moléculaire des
Procaryotes

**Thème : Étude microbiologique et génotoxique des boues des
eaux usées de la ville de Guelma**

Présenté par :

- ABESSA Rahma
- TABET Sara

Devant le jury composé de :

Président : M^r. BENOUARETH Djamel Eddine

Prof. Université de Guelma.

Examineur : M^{me}. TORCHE Asma

M.A.A. Université de Guelma.

Encadreur : M^{me}. KHALLEF Messaouda

M.A.A. Université de Guelma.

Juin 2014

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert
d'amour et d'affection*

A mes frères :

Charrif, Houssam et Issam pour leur extrême serviabilité et compréhension

A Sara mon binome

A mes amies :

Amel, Amina, Meriem, Samiha, Hannan, Sara, mouna, Soumia et Fadhila,

A toute ma famille et surtout mes cousines :

*Ouarda, Rachid, Nadjoua, Moussa, Saiada, Fatiha, Samia, et mes grands
parent*

A toute ma promotion

Rahma

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert
d'amour et d'affection*

A mes sœurs :

Souhila, Sabrina, Lamia et Mouna

A mes frères :

Ahmed, Kamel et Abdelhak, pour leur extrême serviabilité et compréhension

Aux anges de ma maison : mes nièces et mes neveux

À Rahma mon binome

A mes amies :

Zeineb, Asma, Souad, Houda, Sabiha, Nassima, Amira, Ahlem, Hadjer, Warda.

A toute ma famille et surtout mes cousines :

Alima, Nihed, Mounira, Rahma, Nedjwa, Amina et Fouzia

A toute ma promotion

Sara

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail nous tenons à remercier tout d'abord et infiniment notre encadreur Mme KHALLEF Messaouda. qui nous a accordé l'honneur de diriger ce travail, sa compétence et ses conseils pertinents ont été pour nous un solide repère et réconfort dans tous les moments.

Nos remerciements les plus vifs s'adressent également à Pr BENOUARETH Djamel Eddine de nous avoir fait bénéficier de ses encouragements, ses conseils et sa bonne humeur, et d'avoir accepté la présidence du jury de ce mémoire.

Nous exprimons également notre reconnaissance à M^{me} Torche Asma qui a accepté de participer à ce jury et de juger ce travail.

Je tiens aussi à remercier vivement les doctorantes, TABET Mouna et ABDA Ahlem pour leur aide continuel au cours de la réalisation pratique de ce travail.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

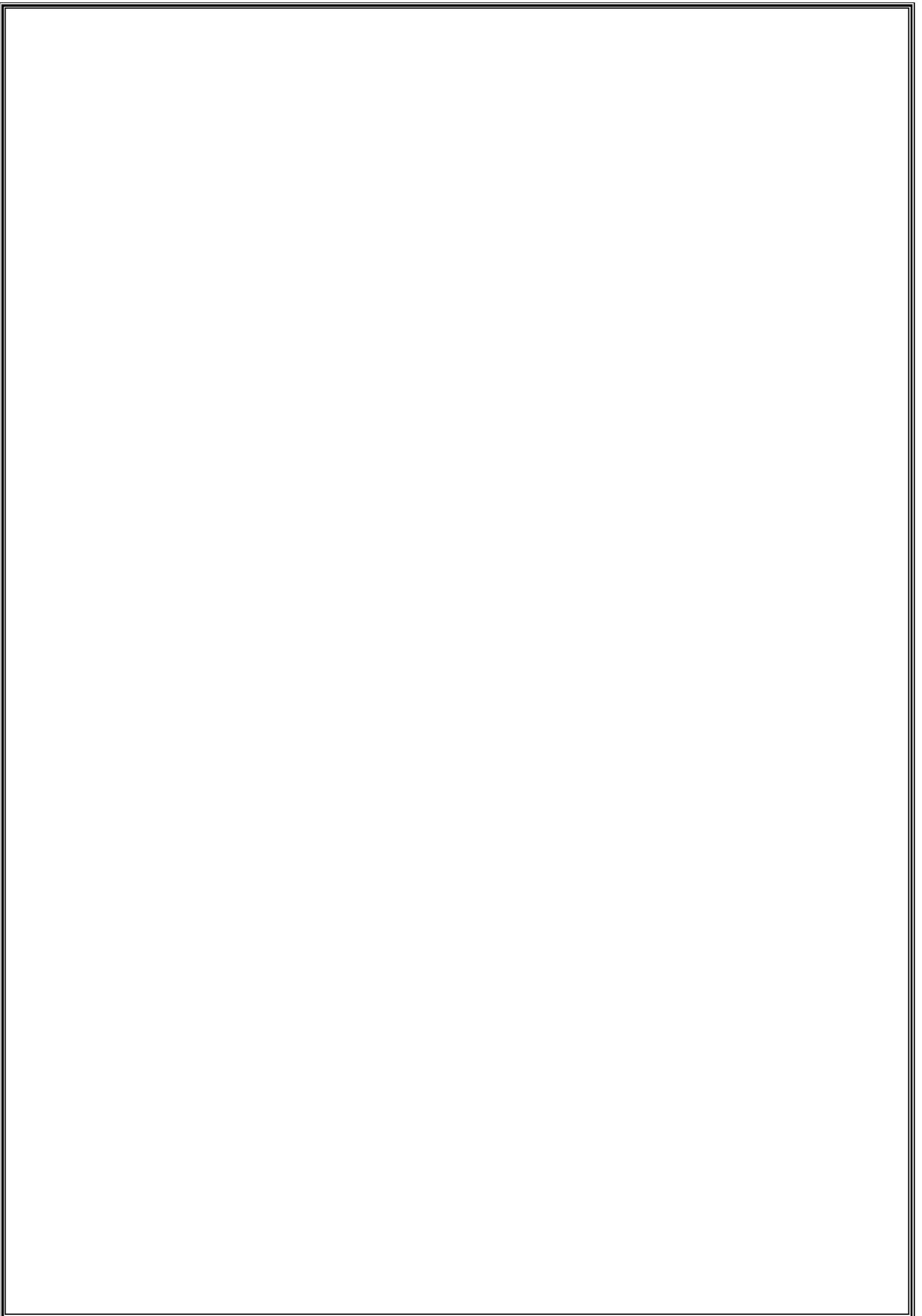


Table des matières

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Liste des abréviations.

Introduction 1

Partie théorique

Chapitre I : traitement des eaux usées

1. Définition des eaux usées	2
2. Origine	2
2.1. Les eaux domestiques.....	2
2.2. Les eaux de ruissellement.....	2
2.3. Les eaux usées industrielles	3
3. Traitement des eaux usées	3
3.1. Le prétraitement.....	4
3.1.1. Le dégrillage.....	4
3.1.2. Le Dessablage.....	4
3.1.3. Le dégraissage/déshuilage	4
3.2. Le traitement primaire (décantation - flottation).....	5
3.2.1. La décantation primaire classique	5
3.2.2. La coagulation-floculation	6
3.3. Traitements biologiques : traitements secondaires.....	6
3.3.1. Les bous activées	6
3.3.2. Les lits bactériens.....	7
3.3.3. Le lagunage.....	8
3.4. Traitements tertiaires.....	10

Chapitre II : boues et leurs destinées

1. Généralités.....	11
2.Caractérisation des boues résiduaires.....	11
2.1. Origine et nature	11
2.1.1. les boues de prétraitement (boues primaires)	12
2.1.2. les boues de l'épuration biologique(boues secondaires).....	12
2.1.3. Boues de traitement physico- chimiques (Les boues tertiaires).....	12
2.1.4. Les boues de fermentation(ou boues de digestion).....	13
2.2. Composition des boues.....	13
2.2.1. Matière organique.....	13
2.2.2. Éléments fertilisants et amendements.....	13
2.2.3. Contaminants chimiques inorganiques et organiques.....	13
2.2.4. Les micro-organismes pathogènes.....	14
3.Propriété physicochimique des boues	16
4.Propriétés biologique de la boue activée.....	17
4.1.Microbiologie des boues	17
4.1.1.Les bactéries.....	17

Table des matières

4.1.2. Les virus.....	19
4.1.3. Les parasites.....	19
4.1.4. Les champignons.....	19
4.1.5. Les algues.....	19
4.1.6. Les protozoaires.....	19
5. Les filières de traitement des boues.....	19
6. Destination finale des boues.....	21
6.1. Amendement des sols.....	21
6.2. Rejet en mer.....	22
6.3. Décharge.....	22
6.4. Récupération de produits.....	22
6.5. Récupération d'énergie.....	23
6.6. Réinjection dans le sol.....	23

Chapitre III : tests de génotoxicité

1. Généralités.....	24
1.1. L'importance des plantes supérieures en génotoxicité.....	24
1.2. Les espèces utilisées de plantes supérieures.....	25
1.2.1. <i>Vicia faba</i>	25
1.2.2. <i>Allium cepa</i>	25
1.2.3. <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Pisum sativum</i> et <i>Zea mays</i>	25
1.3. Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures.....	26
1.3.1. Test d'aberration chromosomique.....	26
1.3.2. Induction de micronoyaux.....	26
1.3.3. Induction des échanges de chromatides soeurs (ECSs).....	26
1.3.4. Test des comètes (single cell gel Electrophorésis : SCGE).....	26
2. <i>Allium cepa</i>	27
2.1. Présentation générale d' <i>Allium cepa</i>	27
2.2. Les critères de génotoxicité déterminés sur <i>Allium cepa</i>	27
2.3. Les différents paramètres Analysés par le test <i>Allium cepa</i>	28
2.3.1. Indice mitotique.....	28
2.3.2. Les Aberrations Chromosomiques (AC).....	29
2.3.3. Les anomalies nucléaires.....	29
2.3.4. Micronoyau.....	29

Partie expérimentale

I . Matériel et méthodes

1. Description de la station d'épuration (STEP).....	30
2. L'étude biologique.....	30
2.1. Le prélèvement.....	31
2.2. Analyses bactériologiques.....	31
2.2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux.....	31
2.2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale.....	32
2.2.2.1 Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux.....	32

Table des matières

2.2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	35
2.2.3. Recherche et dénombrement des spores anaérobies sulfito-réducteurs.....	37
2.2.4. Recherche de Streptomyces.....	39
2.2.5. Recherche des germes pathogènes	39
2.2.5.1. Recherche des staphylocoques	39
2.2.5.2. La recherche des entérobactéries.....	40
2.2.5.3. Recherche des salmonelles.....	40
2.2.5.4. Recherche des Vibrio.....	41
2.2.5.5. Recherche des levures (<i>Candida albicans</i>).....	41
2.2.6. Identification des bactéries isolées.....	42
2.2.6.1 Examen macroscopique des caractères culturaux.....	42
2.2.6.2. Examen microscopique après coloration de Gram.....	42
2.2.6.3. Examen lié aux caractères biochimiques	43
3. Analyse génotoxiques	46
3.1. Matériel végétal et conditions de culture	46
3.2. Traitement des bulbes	46
3.3. Fixation et coloration des extrémités racinaires	47
3.4. Examen des cellules des extrémités racinaires.....	47
3.5. l'analyse statistique.....	47

II. Résultats et discussion

1. Résultats des analyses bactériologiques	49
1.1. Germes totaux	50
1.2. Recherche et dénombrement des indicateurs de contamination fécale	50
1.2.1. Coliformes totaux et fécaux	50
1.2.2. Streptocoques fécaux.....	51
1.3. Le dénombrement des autres entérobactéries.....	52
1.4. Les bactéries pathogènes	53
1.4.1. Les Salmonelles.....	53
1.4.2. Les anaérobies sulfito-réducteurs	55
1.5. Résultats du dénombrement des staphylocoques	55
1.5.1. Résultats d'identification des staphylocoques	56
1.6. Résultats du dénombrement des levures et streptomyces	57
1.7. Identification des espèces bactériennes	58
1.7.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram	58
1.7.2. L'identification biochimique des bactéries	59
2. Résultats du test d' <i>Allium cepa</i>	61
Conclusion	64

Références bibliographiques.

Annexes.

Résumé.

Liste des tableaux

Tableau	Titres	Pages
Tableau I	Avantages et inconvénients des différentes filières de traitement des eaux usées.	9
Tableau II	Les différents agents pathogènes et leur impact sur la santé humaine.	15
Tableau III	Répartition des souches bactériennes isolées des boues.	18
Tableau IV	Exemples des plantes étudiées et tests associés.	25
Tableau V	Résultats des analyses bactériologiques des boues étudiées.	49
Tableau VI	Résultats d'identification des Staphylocoques.	56
Tableau VII	Résultats d'identification des levures.	57
Tableau VIII	Caractères morphologiques et coloration de Gram.	58
Tableau XI	Effets des boues liquides sur l'indice mitotique et les phases de mitoses dans les racines d' <i>Allium cepa</i> .	62
Tableau X	Pourcentage des anomalies chromosomiques des boues liquides dans les racines d' <i>Allium cepa</i> .	63

Liste des figures

Figure	Titre	Pages
Figure 1	Les méthodes de traitement des eaux usées.	3
Figure 2	Étape de dégrillage.	4
Figure 3	Étape de dégraissage.	5
Figure 4	Principe de fonctionnement des boues activées.	7
Figure 5	le lit bactérien.	7
Figure 6	Le lagunage.	8
Figure 7	Lactobacilles.	18
Figure 8	Clostridium.	18
Figure 9	les filières de traitement des boues.	20
Figure 10	Schéma de station d'épuration de la ville de Guelma.	30
Figure 11	Recherche et dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux.	34
Figure 12	Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.	36
Figure 13	Recherche et dénombrement des ASR.	38
Figure 14	lecture de L'oxydase.	44
Figure 15	Galerie API 20E.	44
Figure 16	Protocole du test des aberrations chromosomiques dans les racines d' <i>Allium cepa</i> .	48
Figure 17	Représentation graphique des germes totaux.	50
Figure 18	Représentation graphique des coliformes totaux et fécaux.	51
Figure 19	Représentation graphique des streptocoques.	52
Figure 20	Représentation graphique des entérobactéries.	53
Figure 21	Représentation graphique des salmonelles.	54
Figure 22	Représentation graphique des anaérobies sulfite-réducteurs.	55
Figure 23	Représentation graphique des staphylocoques.	56
Figure 24	Représentation graphique des levures et streptomycetes.	57
Figure 25	Cocci Gram (+)	59
Figure 26	Bacille Gram(-)	59
Figure 27	profile biochimique de <i>Salmonella Spp</i> .	60

Figure 28	profile biochimique d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .	60
Figure 29	profile biochimique <i>vibrio parahaemolyticus</i> .	60
Figure 30	profile biochimique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	60
Figure 31	profile biochimique de <i>Pseudomonas luteola</i> .	61
Figure 32	profile biochimique de <i>Klebsiella oxytoca</i> .	61

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxy ribonucléique.
ACs	Aberrations chromosomiques.
ANs	anomalies nucléaires.
ASR	Anaérobie sulfito-réducteur.
BCP	Pourpre de bromocrésol.
BCPL	Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol.
Cd	Cadmium.
Cr	Chrome.
CF	Coliformes fécaux.
CT	Coliformes totaux.
DCO	Demande chimique de l'oxygène.
DBO₅	Demande biologique de l'oxygène.
ECS	Echanges de chromatides-sœurs.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
Eva Litsky	Bouillon à l'éthyle violet et aide de sodium.
Fe	Fer.
FeS	sulfure de fer.
GNAB	gélose nutritive alcaline biliée.
GN	Gélose nutritive.
H₂O₂	Eau oxygéné.
H₂S	hydrogène sulfuré.
HAP	hydrocarbures aromatiques polycyclique.
IND	Indole.
LDC	La lysine décarboxylase.
MES	Matière en suspension.
MMS	Méthyle méthane sulfonate.
IM	Indice mitotique.

MN	Micronoyau.
Ms	Matière sèche.
NPP	Nombre le plus probable.
Ni	Nickel.
Na₂SO₃	sulfite de sodium.
ODC	Ornithine décarboxylase.
OMS	Organisation mondiale de la santé.
ONPG	O.Nitrophényl.Pyrano.Galactoside.
Ox	Oxydase.
pH	Potentiel d'hydrogène.
Roth	Bouillon à l'azide de sodium.
S/C	Simple concentration.
SS	<i>Salmonella-Shigella</i> .
SCGE	Single Cell Gel Electrophorésis.
STEP	Station d'épuration.
TDA	Tryptophane désaminase.
TGEA	Glucose tryptone extrait agar.
UFC	Unité formant colonie.
VF	Viande Foie.
VP	Voges-Proskauer.

INTRODUCTION

Introduction

Le traitement des eaux, qu'il s'agisse de production d'eau potable ou d'épuration d'eau usée d'origine urbaine ou industrielle, conduit toujours à la formation de boues que l'on sépare de l'eau traitée. Ces boues se présentent à la sortie de la station d'épuration comme un liquide à forte teneur en eau ou sèche, les boues sont considérées comme de bons fertilisants agricoles, riches en matière organique et en macronutriments azotés et phosphatés (Marc, 1997), elles devraient être utilisées lorsque cela présente un intérêt agronomique pour les cultures ou lorsqu'il peut en résulter une amélioration de la qualité du sol.

Cependant, les boues d'épuration sont riches en substances chimiques et en micro-organismes dont les effets sont indésirables soit pour la conservation des sols, soit pour la qualité alimentaire des cultures, soit pour la santé de l'homme et des animaux. Elles peuvent également être chargées en divers polluants : éléments traces métalliques, substances organiques. La présence de ces micropolluants, réglementés ou non, dans les boues de stations de traitement des eaux usées pose la question de leur devenir et de leur impact sur les milieux depuis leur production jusqu'à l'épandage.

C'est dans cette optique que ce travail a été réalisé. Il a concerné une étude microbiologique et génotoxique des boues et ceci pour évaluer l'aptitude de ces boues au traitement, d'estimer les risques de pollution et enfin de connaître leurs possibilités de réutilisation (agricole, énergétique ou autre). Ainsi, notre étude se structure en quatre chapitres : Le chapitre I : consacré à la présentation de différents types du traitement des eaux usées. Le chapitre II : décrit les différents types des boues et leur destinées. Le chapitre III : présente les différents tests de génotoxicité qui utilisent des plantes supérieures tel que *Allium cepa*. Le dernier chapitre présente les différentes méthodes d'analyses microbiologiques et génotoxiques et les principaux résultats obtenus.

PARTIE
THEORIQUE

CHAPITRE I :
TRAITEMENT DES EAUX
USÉES

1. Définition des eaux usées

Une eau usée, appelée encore eau résiduaire ou effluent est une eau qui a subi une détérioration après usage. La pollution des eaux dans son sens le plus large est défini comme « Tout changement défavorable des caractéristiques naturelles (biologiques ou physico-chimiques) dont les causes sont directement ou indirectement en relation avec les activités humaines » (Attab, 2011).

L'aspect des eaux résiduaires fraîches est celui d'un liquide brun gris avec une odeur typique, mais faible. Durant leur transport, ces eaux se modifient d'autant plus vite que la température est élevée ; elles deviennent noires et dégagent une odeur d'œufs pourris, signe de la présence d'hydrogène sulfureux (H_2S), dangereux pour les égoutiers et corrosifs pour le béton et les aciers des égouts. Environ un tiers des matières contenues est en suspension, le reste est en solution (Attab, 2011).

2. Origine

La composition des eaux usées est extrêmement variable en fonction de leur origine (industrielle, domestique, ...etc). Suivant l'origine des substances polluantes, on distingue trois catégories d'eaux usées (Aouadi *et al.*, 2007).

2.1. Les eaux domestiques

Les eaux domestiques proviennent principalement des habitations constituées des eaux résiduaires provenant de la cuisine, de la salle de bain et de la salle de lavage, des commerces et des endroits publics. Elles peuvent contenir des eaux de pluie ou des eaux superficielles. Ces eaux renferment également tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes (Morakchi, 2002).

2.2. Les eaux de ruissellement

Les eaux pluviales peuvent constituer une source de pollution importante des cours d'eau, notamment pendant les périodes orageuses. L'eau de pluie se charge d'impuretés au contact de l'air (fumées industrielles), puis en ruisselant, elle entraîne des résidus déposés sur les toits et les chaussées des villes (huiles de vidange, carburants, résidus de pneus et métaux lourds...) (Attab, 2011).

2.3. Les eaux usées industrielles

Elles ont une composition très différente de celle des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques et des hydrocarbures. Certaines d'entre elles nécessitent un prétraitement de la part des industriels avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte, elles ne sont mêlées aux eaux domestiques que si elles ne présentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des usines de dépollution. Les eaux usées, contiennent, en plus de toutes ces matières, toutes sortes de microorganismes : champignons, protozoaires, bactéries, virus (Madigan et Martink, 2007).

3. Traitement des eaux usées

Les méthodes de traitement des eaux usées sont diverses et peuvent être classées en quatre catégories : le prétraitement, le traitement primaire, secondaire et tertiaire. On peut également tenter une classification physique et biologique qui revient grossièrement à distinguer d'un côté les traitements primaires et de l'autre les traitements secondaires et tertiaires (Fig. 1), (Moulin *et al.*, 2013).

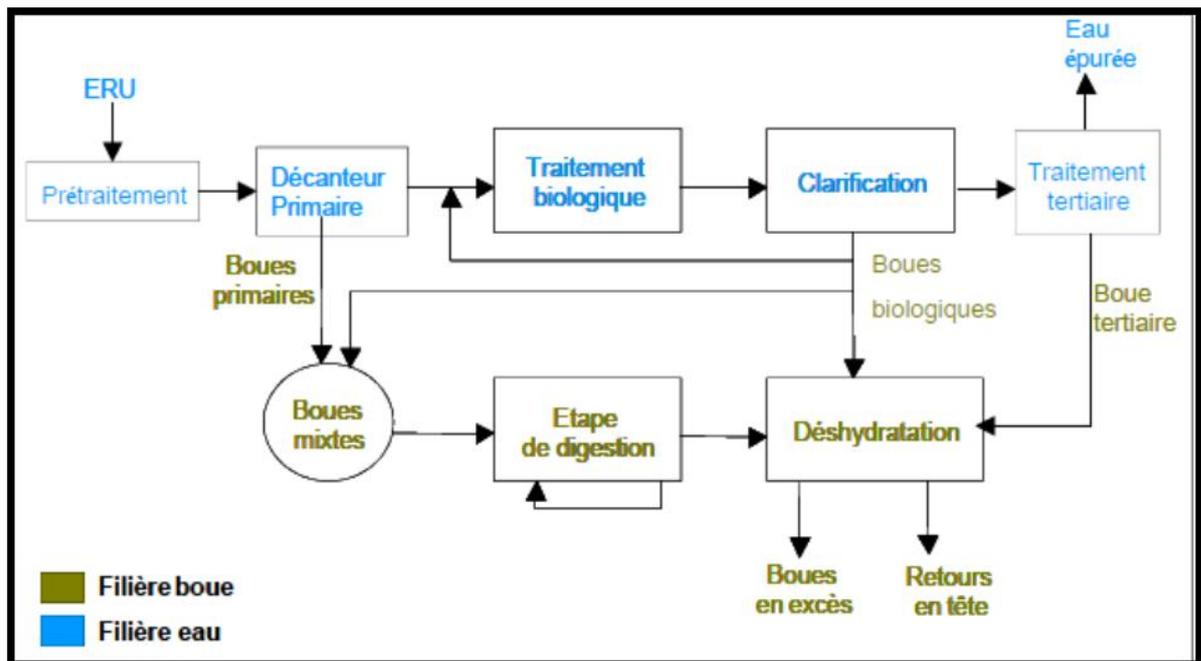


Figure 1 : Les méthodes de traitement des eaux usées (Canler et Perret, 2013).

3.1. Le prétraitement

Il permet d'éliminer la fraction la plus grossière, afin de ne pas gêner les opérations ultérieures : le dégrillage, le dessablage et le dégraissage également appelé deshuilage (Aouadi *et al.*, 2007).

3.1.1. Le dégrillage

La première étape du prétraitement est le dégrillage, qui permet de séparer les déchets solides (papiers et plastiques essentiellement) des eaux usées qui arrivent à la station. Un râteau vient régulièrement débarrasser ceux-ci de la grille. Ces papiers et plastiques sont ensuite collectés pour être envoyés au centre de tri (Fig. 2), (Marsault *et al.*, 2013).



Figure 2 : Étape de dégrillage (Marsault *et al.*, 2013).

3.1.2. Le Dessablage

Le dessablage vise à éliminer les sables et les graviers. L'écoulement de l'eau à une vitesse réduite dans un bassin appelé « dessableur » entraîne leur dépôt au fond de l'ouvrage. Ces particules sont ensuite aspirées par une pompe. Les sables récupérés sont essorés, puis lavés avant d'être envoyés en décharge, soit réutilisés, selon la qualité du lavage (Aouadi *et al.*, 2007).

3.1.3. Le dégraissage/désahuilage

Les opérations dégraissage-désahuilage consistent à séparer de l'effluent brut, les huiles et les graisses par flottation. Ces derniers étant des produits de densité légèrement

inférieure à l'eau. L'injection des micro-bulles d'air permet d'accélérer la flottation des graisses (koller, 2009).

Souvent ces opérations sont combinées dans un même ouvrage où la réduction de vitesse dépose les sables et laisse flotter les graisses. On enlève ainsi de l'eau, les éléments grossiers et les sables de dimension supérieure à 200 microns ainsi que 80 à 90 % de la graisse et matières flottantes (Fig. 3), (Bouziani, 2000).



Figure 3 : Étape de dégraissage (Marsault *et al.*, 2013).

3.2. Le traitement primaire (décantation - flottation)

Si les prétraitements visent à l'élimination des matières solides, des sables, et des matières minérales qu'on peut récupérer par surnage, le traitement primaire élimine plus de la moitié des matières en suspension et constitue une pré-épuration non négligeable quoique insuffisante pour garantir la qualité du rejet en milieu naturel. Il fait appel à différents procédés physiques et / ou chimiques. Les matières décantables se déposent au fond ou flottent à la surface par différence de densité ou après adjonction de produits agglomérant les matières et accélérant leur flottation ou leur sédimentation (Daloz, 2007).

3.2.1. La décantation primaire classique

Elle consiste en une séparation des éléments liquides et des éléments solides sous l'effet de la pesanteur. Les matières solides se déposent au fond d'un ouvrage appelé "décanteur" pour former les "boues primaires". Ces dernières sont récupérées au moyen d'un système de raclage. Ce traitement élimine 50 à 55 % des matières en suspension (Daloz, 2007).

L'utilisation d'un décanteur lamellaire permet d'accroître le rendement de la décantation. Ce type d'ouvrage comporte des lamelles parallèles inclinées, ce qui multiplie la surface de décantation et accélère donc le processus de dépôt des particules.

Une décantation lamellaire permet d'éliminer plus de 70 % des matières en suspension. La décantation est encore plus performante lorsqu'elle s'accompagne d'une floculation préalable (Madigan et Martink, 2007).

3.2.2. Lacoagulation-floculation

Elle permet d'éliminer jusqu'à 90 % des matières en suspension. Cette technique comporte une première phase d'adjonction d'un réactif, qui provoque l'agglomération des particules en suspension, puis une accélération de leur chute au fond de l'ouvrage. Les amas de solides ainsi obtenus sont appelés "flocs" (Daloz, 2007).

3.3. Traitements biologiques : traitements secondaires

Ces traitements permettent d'éliminer les polluants dissous. Pour cela on utilise des populations de micro-organismes capables de les consommer. Dans les cas étudiés, le principe général est de favoriser la croissance de communautés de bactéries aérobies, c'est-à-dire qui prélève l' O_2 pour leur métabolisme (Madigan et Martink, 2007). On en distingue différents types :

3.3.1. Les boues activées

Le procédé de dépollution biologique par les boues activées consiste à provoquer le développement de colonies bactériennes dispersées en flocons, dans un bassin d'eau à épurer qui est suffisamment alimenté en oxygène.

Dans le bassin de décantation, on effectue un brassage pour homogénéiser, en présence d'un gaz enrichi en oxygène, les eaux usées et les flocons bactériens. La matière organique est absorbée par le floc et transformée en produits aérobies.

Après un temps de contact suffisant, le mélange obtenu est évacué vers un décanteur (un clarificateur), destiné à séparer l'eau épurée des boues obtenues. La réduction de la DBO_5 est de l'ordre de 60 à 85 (Fig. 4), (Madigan et Martink, 2007).

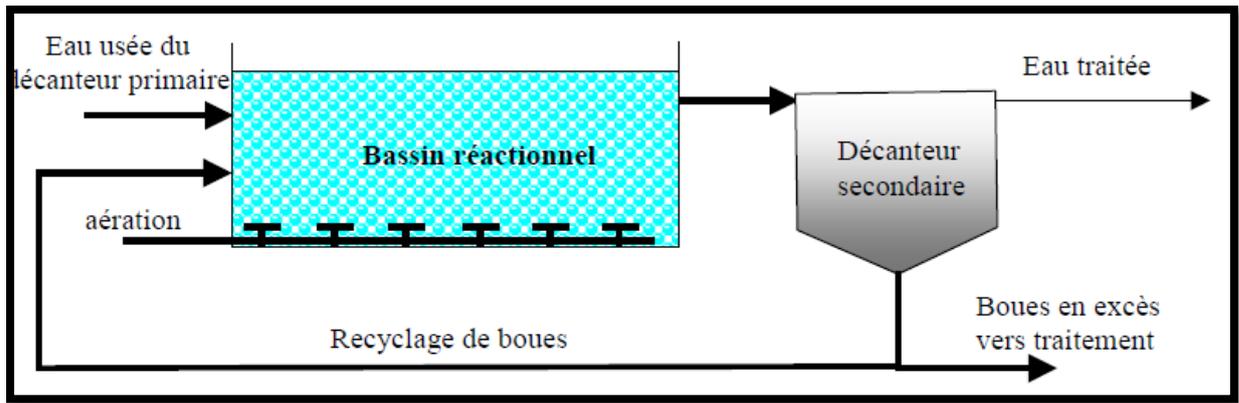


Figure 4 : Principe de fonctionnement des boues activées (Guide, 2010).

3.3.2. Les lits bactériens

Le principe du lit bactérien, appelé également filtre bactérien (filtre percolateur), consiste à faire ruisseler une eau qui a subi une étape de décantation, sur une surface spécifique (des matériaux inertes de 3 à 7 cm : coke, scories mûchefefer cailloutis, morceaux de boriques) servant de support aux micro-organismes épurateurs. Les supports se recouvrent généralement après quelques semaines par des pellicules membraneuses très riches en colonies microbiennes qui vont au fur et à mesure digérer les agents pathogènes et assurer une épuration des eaux usées (Fig. 5), (Bouziani, 2000).

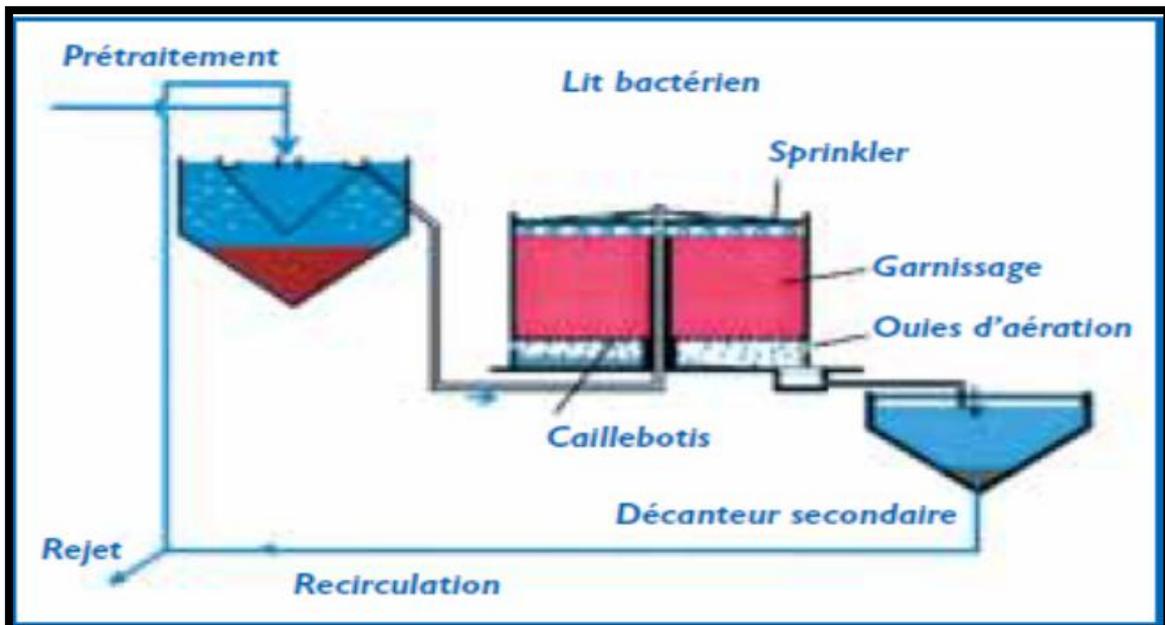


Figure 5 : le lit bactérien (Guide, 2010).

3.3.3. Le lagunage

Le traitement des eaux usées par les procédés de lagunage se caractérise d'abord par sa grande simplicité. Une autre caractéristique importante est son grand pouvoir tampon face aux variations de charges organiques ou hydrauliques, en raison du temps de rétention hydraulique qui est beaucoup plus élevé que dans les autres procédés (Bouziani, 2000).

Il existe plusieurs types de procédés par lagunage. Ces procédés peuvent être :

- aérés mécaniquement ou non ;
- aérobies, anaérobies ou facultatifs (zones aérobies et zones anaérobies) ; à décharge continue, à vidange périodique ou à rétention complète.

Les types de procédés par lagunage les plus usuels pour le traitement des eaux usées domestiques sont les étangs aérés facultatifs et les étangs non aérés facultatifs.

Les étangs anaérobies sont fréquemment utilisés comme première étape de traitement d'eaux usées à forte charge organique. Les étangs aérés aérobies sont des étangs où l'on injecte suffisamment d'air et d'énergie de brassage pour maintenir les solides en suspension et assurer des conditions d'oxygène dissous en tout point. Ces derniers sont à plus court temps de rétention et sont aussi utilisés le plus souvent comme première étape de traitement lorsque les charges sont élevées. Les étangs à rétention complète ou étangs d'évaporation sont plutôt limités à des installations de faibles débits en climat aride où les taux d'évaporation sont élevés par rapport aux précipitations (Fig. 6), (Bouziani, 2000).

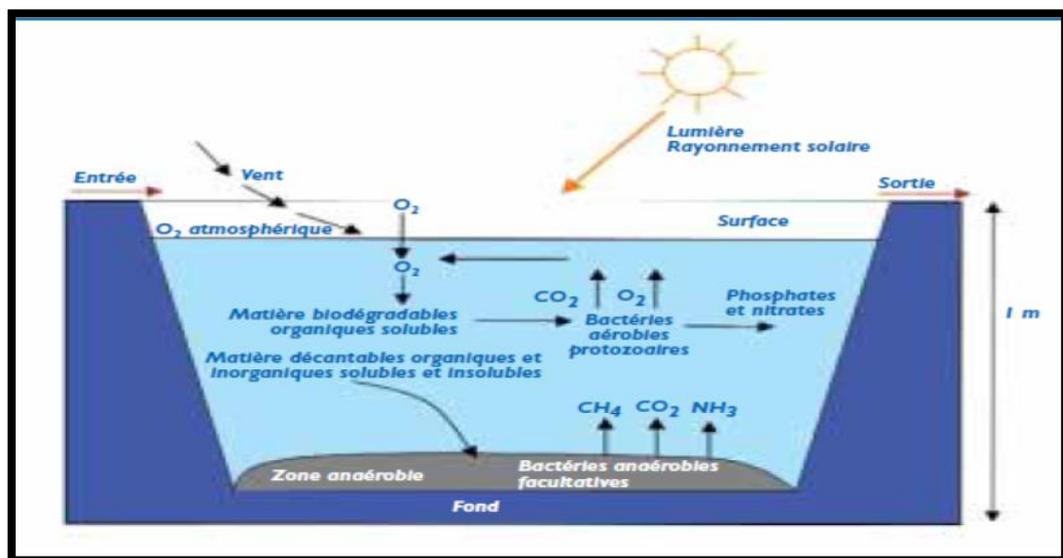


Figure 6 : Le lagunage (Guide, 2010).

Tableau I : Avantages et inconvénients des différentes filières de traitement des eaux usées (Guide, 2010).

Filière	Avantages	Inconvénients
Lit bactérien	<ul style="list-style-type: none"> - faible consommation d'énergie ; -fonctionnement simple demandant moins d'entretien et de contrôle que la technique des boues activées . - bonne décantabilité des boues. -plus faible sensibilité aux variations de charge et aux toxiques que les boues activées. -généralement adaptés pour les petites collectivités . 	<ul style="list-style-type: none"> -performances généralement plus faibles qu'une technique par boues activées. Cela tient en grande partie aux pratiques anciennes de conception. -Un dimensionnement plus réaliste doit permettre d'atteindre des qualités d'eau traitée satisfaisantes. -coûts d'investissement assez élevés (peuvent être supérieurs d'environ 20 % par rapport à une boue activée) ; -nécessité de prétraitements efficaces.
Boues activée	<ul style="list-style-type: none"> -adaptée pour toute taille de collectivité (sauf les très petites). -bonne élimination de l'ensemble des paramètres de pollution (MES, DCO, DBO5, N par nitrification et dénitrification) ; -adapté pour la protection de milieux récepteurs sensibles ; -boues (cf. glossaire) légèrement stabilisées. -facilité de mise en oeuvre d'une déphosphatation simultanée. 	<ul style="list-style-type: none"> -coûts d'investissement assez importants ; -consommation énergétique importante ; -nécessité de personnel qualifié et d'une surveillance régulière ; -sensibilité aux surcharges hydrauliques ; -décantabilité des boues pas toujours aisée à maîtriser ; -forte production de boues qu'il faut concentrer.
lagunage	<ul style="list-style-type: none"> -Bonne élimination de la pollution bactériologique. -Efficace sur des effluents peu concentrés. -Bonne réactivité à des variations de charges polluantes. -Très faible consommation énergétique. 	<ul style="list-style-type: none"> -Performances épuratrices faibles. -Sensible aux effluents concentrés. -Besoin en surface important. -Entretien des berges des bassins.

3.4. Traitements tertiaires

Ces traitements sont à la fois physico-chimiques et biologiques. On les réalise après les traitements primaires et secondaires afin d'éliminer des éléments nutritifs résiduels, des polluants organiques résistants, des métaux et des pigments. Par exemple, on peut utiliser des traitements biologiques avancés pour éliminer le phosphore par le Déplacement Nutritif Biologique (DNF). On fait passer l'eau par différents réservoirs avec des bactéries et dans des conditions environnementales différentes (différence de concentration en dioxygène par exemple). On récupère ensuite les boues lors d'un nouveau passage dans un clarificateur.

Un autre type de traitement que l'on pourrait classer comme tertiaire est le traitement aux UV. On dénature alors des molécules, comme les œstrogènes, sensibles à ces rayons (Moulin *et al.*, 2013).

CHAPITRE II :

BOUES ET LEUR DESTINÉES

1. Généralités

Les éléments polluants et leurs produits de transformation retirés de la phase liquide au cours de tout traitement d'eau. Quelle que soit la nature, se trouvent finalement rassemblés dans la grande majorité des cas dans des suspensions plus ou moins concentrées dénommées boues (Koller, 2009).

On regroupe sous le vocable boues un ensemble de déchets liquides, pâteux ou solides sortant du site de production. On distingue, selon l'origine, deux types de boues :

- **Les boues de procédé**, déchets généralement pâteux issus de la chaîne de fabrication, non rejetés avec les eaux industrielles compte tenu de leurs propriétés (concentration élevée, toxicité pour le traitement biologique des eaux, etc).
- **les boues d'épuration**, qui désignent l'ensemble des phases concentrées issues des opérations de séparation de phase (décantations, filtrations) du traitement des eaux industrielles (Koller, 2009). Les traitements réalisés en Station d'épuration consistent à dégrader, à séparer les polluants de l'eau (particules, substances dissoutes, microorganismes) par des procédés physiques, chimiques et biologique pour ne restituer au milieu aquatique qu'une eau de qualité suffisante au regard du milieu récepteur. Le résultat de ces opérations est la production de boues qui est le principal sous-produit du cycle de l'eau (Baudez, 2003).

Une station d'épuration est généralement installée à l'extrémité d'un réseau de collecte, sur l'émissaire principal. Elle agrège une succession de dispositifs ayant chacun pour objet d'extraire les différents polluants dans les eaux (Monod, 1989).

2. Caractérisation des boues résiduelles

2.1. Origine et nature

Il serait simpliste de croire que les boues urbaines ou industrielles sont toutes de nature identique. Il faut au contraire prendre conscience de l'extrême diversité de ces boues et de leur hétérogénéité de composition en fonction de leur origine (Koller, 2009).

La composition d'une boue produite dans une station d'épuration dépend à la fois de la nature de la pollution initiale de l'eau et des procédés de traitement auxquels elle a été soumise. On pourra distinguer ainsi :

2.1.1. Les boues de prétraitement (boues primaires)

Qui se forment par le dépôt des matières décantables contenues dans les eaux usées non traitées ; les boues fraîches sont conduites par un racleur dans une trémie à boues d'où elles peuvent être retirées avec une teneur en eau d'environ 90-95 % ; aux boues primaires, on ajoute d'habitude les boues flottantes, dans la mesure où elles ne sont pas trop huileuses et ne doivent donc pas être traitées séparément (Pernin, 2003).

2.1.2. Les boues de l'épuration biologique (boues secondaires)

Qui résultent de l'activité vitale des micro-organismes. Les boues ont une structure floculée et sont séparées dans des décanteurs secondaires (clarificateur). Dans les filtres biologiques (lits bactériens), il s'agit de boues des lits bactériens prélevées dans les décanteurs secondaires ; dans les bassins de boues activées, la plus grande partie est recirculée dans les bassins comme boues de retour et seules les boues en excès sont évacuées (Koller, 2009).

Les boues des filtres biologiques et les boues en excès sont le plus souvent réintroduits dans les eaux usées en tête de station, et se séparent avec les boues primaires des décanteurs primaires. Cette méthode fait diminuer la teneur élevée en eau des boues biologiques (Koller, 2009).

Le mélange de boues primaires et de boues activées ou provenant de lits bactériens s'appelle boues mixtes. Il faut noter que ces boues biologiques auront une composition différente en fonction de la nature du substrat dégradé, de la charge de fonctionnement du réacteur biologique, du traitement de stabilisation (aérobie ou anaérobie) éventuellement pratiqué (Koller, 2009).

2.1.3. Les boues de traitement physico- chimiques (les boues tertiaires)

qui renferment la quasi-totalité de la pollution particulaire et colloïdale enlevée à l'eau (dans les décanteurs placés en aval), ainsi que les quantités de réactifs ajoutés qui se retrouvent dans les boues sous forme d'hydroxydes métalliques ou de précipités minéraux (carbonate, phosphate, etc) (Koller, 2009).

Ce traitement tertiaire a pour principal objectif un rôle d'affinage du traitement. Il s'avère obligatoire derrière une boue activée lorsque les niveaux de rejets demandés sont très contraignants comme une teneur en Matière en suspension (MES) inférieure à 20 mg MES/l, une teneur en phosphore inférieure à 1 mg /l et une concentration en DCO

inférieure à 60 mg/l. Elles sont le plus souvent obtenues par l'ajout de réactifs chimiques et elles sont aussi le plus souvent plus difficiles à déshydrater (Canler et *al.*, 2013).

2.1.4. Les boues de fermentation (les boues de digestion)

Qui sont les boues fraîches soumises à la fermentation méthanique dans les digesteurs. Le processus de digestion réduit leur volume à environ deux tiers de la teneur initiale en matières solides ; elles contiennent, selon leur degré d'épaississement, 90 à 96 % d'humidité (Koller, 2009).

2.2. Composition des boues

La composition exacte des boues varie en fonction de l'origine des eaux usées, de la période de l'année, du type de traitement et de conditionnement pratiqué dans la station d'épuration. Les boues résiduaires représentent avant tout une matière première composée de différents éléments (Matière organique, éléments fertilisants N et P etc ...) d'éléments traces métalliques, d'éléments traces organiques et d'agents pathogènes) (Amir, 2005).

2.2.1. Matière organique

La concentration en matière organique peut varier de 30 à 80 %. La matière organique des boues est constituée de matières particulaires éliminées par gravité dans les boues primaires, des lipides (6 à 19 % de la matière organique), des polysaccharides, des protéines et des acides aminés (jusqu'à 33 % de la matière organique) de la lignine, ainsi que des produits de métabolisation et des corps microbiens résultant des traitements biologiques (digestion, stabilisation) (Amir, 2005).

2.2.2. Éléments fertilisants et amendements

Selon la dose appliquée, les boues peuvent couvrir, en partie ou en totalité, les besoins des cultures en azote, en phosphore, en magnésium, calcium et en soufre ou peuvent aussi corriger des carences à l'exception de celle en potassium.

Les éléments en traces tels que le cuivre, le zinc, le chrome et le nickel présents dans les boues sont aussi indispensables au développement des végétaux et des animaux (Amir, 2005).

2.2.3. Contaminants chimiques inorganiques et organiques

Ces mêmes éléments traces métalliques (cuivre, le zinc, le chrome et le nickel) indispensables au développement des végétaux et des animaux peuvent se révéler toxiques à trop fortes doses d'autres, tels que le cadmium et plomb sont des toxiques potentiels

Ainsi, un polluant peut être défini comme un élément ou un composé chimique ordinaire dont la nocivité n'apparaît qu'à partir d'une certaine concentration. Aussi, dans les boues, une multitude de polluants organiques (Hydrocarbures aromatiques polycycliques :(HAP), Phthalates, ... etc) peut se trouver en concentrations en général de l'ordre de $\mu\text{g}/\text{kg MS}$. La nature et la concentration des eaux usées en polluants organiques et inorganiques sont très dépendantes des activités raccordées au réseau (Amir, 2005).

L'essentiel des contaminations chimiques vient des rejets industriels et dans une moindre mesure des rejets domestiques (utilisation de solvants, déchets de bricolage...). Du fait de la décantation lors du traitement, ces contaminants chimiques se retrouvent dans les boues à de très grandes concentrations par rapport aux eaux usées (Amir, 2005).

2.2.4. Les micro-organismes pathogènes

Les boues contiennent des milliards de microorganismes vivants qui jouent un rôle essentiel dans les processus d'épuration. Seul une infime partie est pathogène (virus, bactéries, protozoaires, champignons, helminthes, etc.) et provient en majorité des excréments humains ou animaux. La concentration d'une eau usée en germes pathogènes dépend du secteur d'activité d'origine : les eaux provenant d'abattoirs ou de toute industrie traitant de produits d'animaux sont très largement contaminées. Ainsi, par mesure de précaution, et afin d'éviter de propager la maladie de la vache folle, il est interdit d'utiliser les boues d'épuration provenant des eaux usées des abattoirs ou des équarrissages pour fabriquer de la fumure ou du compost. D'une façon générale, les boues doivent subir un prétraitement avant leur utilisation en agriculture (Tab. II), (Amir, 2005).

Tableau II: Les différents agents pathogènes et leurs impact sur la santé humaine
(Vilaginés, 2010 : Feix et Wiart, 1997).

Agents pathogènes	Maladies, symptômes des maladies ou organes concernés
<p>Bactéries</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. Coli</i> . • <i>Leptospira</i>. • <i>Salmonelles</i>. • <i>Shigella</i>. • <i>Yersinia enterocolitica</i>. • <i>Clostridium tetani</i>. • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. • <i>Staphylococcus</i>. • <i>Streptococcus</i>. • <i>Klebsiella pneumoniae</i>. • <i>Proteus</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diarrhée(Enterotoxine). • Fièvre, hépatite épidémique, méningite. • Gastro-entérite, Vomissements. • Colite, Colique, Diarrhée. • Fièvre, Entérite, Érythème. • Tétanos. • Inflammation des voies d'urinaires. • Accumulation de pus, inflammation des voies respiratoires. • Infection locale, endocardite, otite. • Pneumonie. • Inflammation des voies d'urinaires.
<p>Levures</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i>. • <i>Candida Crusei</i>. • <i>Cryptococcusneoformans</i>. <p>Champignons</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Aspergillus spp</i>. • <i>A.fumigatus, A. nige</i>. • <i>Trichophyton spp</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Affections des membranes muqueuses (bouche). • Poumons. • Méningo-encéphalite, Granulome. • Mycose broncho-pulmonaire. • Mycose des ongles, Otite, Granulome. • Mycose de la peau.
<p>Virus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polio. • Coxsackie. • Écho. • Hépatite. 	<ul style="list-style-type: none"> • Poliomyélite, Fièvre. • Maladies respiratoires, Méningite, Myocardite. • Méningite, Fièvre. • Hépatite. • Méningite, Encéphalite.

<ul style="list-style-type: none"> • Entérovirus. • Adénovirus. • Coronavirus. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation de l'œil. • Rhume.
<p>Protozoaires</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Entamoebahistolytica</i>. • <i>Giardia lamblia</i> (Lamblia intestinales). • <i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Sarcocystis</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> • Foie, intestin. • Vésicule biliaire. • Organes internes (foie, cerveau, cœur).
<p>Cestodes</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Taenia saginata</i>. • <i>Taenia solium</i>. • <i>Echinococcus granulosus</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Intestin. • Intestin. • Foie, Poumons.

3. Les propriétés physicochimiques des boues

Du point de vue structural, les boues urbaines doivent être considérées comme de véritables systèmes colloïdaux dont la forte stabilité est déterminée par la nature des propriétés de surface des colloïdes et par les interactions entre particules (Koller, 2009).

- **Viscosité apparente en rapport avec le comportement rhéologique**

Les suspensions boueuses sont des liquides non newtoniens : la valeur trouvée pour la viscosité est toute relative et dépend de la contrainte de cisaillement appliquée. La viscosité peut être considérée comme une mesure de l'intensité des forces inter-particulaires. Elle permet d'évaluer le caractère thixotropique d'une boue (aptitude de la boue à se prendre en masse en l'absence de brassage et à redevenir fluide sous une agitation modérée). Cette caractéristique est très utile pour apprécier les possibilités de collecte, transport et pompage (Koller, 2009).

- **Nature de l'eau contenue dans la boue**

L'eau est contenue dans une boue urbaine sous deux états :

- l'eau libre, assez facilement éliminable ;
- l'eau liée ou combinée comprenant : l'eau d'hydratation, colloïdale, l'eau capillaire, l'eau cellulaire et chimique liée.

Il apparaît que l'aptitude plus ou moins grande à la déshydratation est définie par la structure même des boues, dans la mesure où les particules élémentaires qui les constituent possèdent une capacité d'adsorption de l'eau très variable, fonction de leur nature et de leur composition physico-chimique (Koller, 2009).

On peut évaluer les forces de liaison de l'eau avec les particules par des études thermogravimétriques. L'établissement de thermogrammes à partir des boues permet d'estimer les quantités d'eau qu'elles contiennent, en particulier :

- l'eau libre : quantité éliminable à vitesse constante de séchage (S_L étant la siccité de la boue après la perte de cette eau) ;
- l'eau liée : quantité d'eau restant dans la boue au premier point critique.

Il s'avère que l'aptitude à la déshydratation est d'autant plus difficile que le caractère hydrophile de la boue est plus marqué et plus précisément que l'eau liée par rapport à la matière sèche et l'énergie de liaison relative de l'eau absorbée sur les particules, sont plus importantes (Koller, 2009).

4. Les propriétés biologiques des boues

4.1. Microbiologie des boues

Les eaux usées contiennent une flore et une faune variées qu'on retrouve en partie dans les boues (Gamrasni, 1979). Les bactéries ainsi que diverse protozoaires constituent le niveau trophique primaire de l'écosystème très particulier formé par les boues activées d'une station d'eaux usées urbaines.

Parmi tous les microorganismes présents dans ces boues, ce sont les bactéries qui dominent quantitativement, puisqu'on peut trouver jusqu'à 10^8 germes vivants pour 10^3 protozoaires/ml de boues.

La prédominance des bactéries dans cet écosystème est due à la capacité d'adaptation enzymatique relativement rapide et à un rapport surfaces/taille extrêmement élevé, permettant d'intenses échanges de substances nutritives entre le milieu extérieur et la cellule bactérienne (Aouadi *et al.*, 2007).

4.1.1. Les bactéries

On dénombre de très nombreux types de bactéries dans les boues, une partie de celles-ci est d'origine fécale et certaines proviennent de porteurs de germes, elles peuvent

donc être pathogènes, composées à 57 % de Gram⁻ et 53 % de Gram⁺ (Tab III), (Aouadi *et al.*, 2007).

Tableau III : Répartition des souches bactériennes isolées des boues (Aouadi *et al.*, 2007).

57% Bacilles gram (-)	dont 54% <i>Pseudomonas.</i> <i>Alcaliganes..</i> <i>Flavobactérium.</i>
23% Cocci gram (+)	dont 80% <i>Micrococcus</i>
20% Bacilles gram (+)	dont 57% <i>kurthia.</i>

On peut les classer en quatre classes en fonction du type répertoire

- Aérobie stictes: sont nombreuses dans les boues activées.
- Aérobie facultatives : *Aeromonas*.
- Anaérobie facultatives : *Lactobacilles* (fig.7).
- Anaérobie strictes : *Clostridium* (fig. 8), (Gamrasni, 1981)



Figure 7 : Lactobacilles [2].

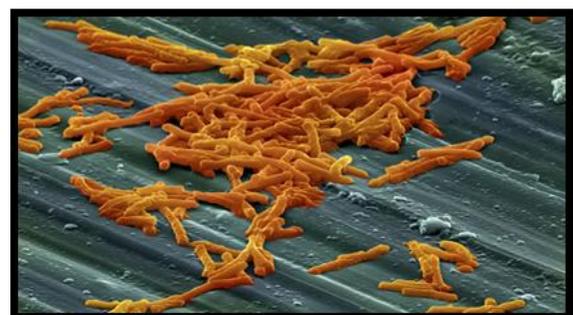


Figure 8 : Clostridium [3].

4.1.2. Les virus

On trouve des entérovirus, des adénovirus absorbés sur les matières solides des boues dans une proportion non négligeable sur environ 30% des échantillons de boues (Aouadi *et al.*, 2007).

4.1.3. Les parasites

On trouve de très nombreux parasites dans les boues d'origine fécale ou tellurique, ce sont les œufs d'ascaris, de trichocéphales, d'helminthes, de *Tenia* et de douve ou des formes en kystes de *Giardia* ou *Trichomonas* (Aouadi *et al.*, 2007).

4.1.4. Les champignons

Ce sont essentiellement les levures et les saprophytes normalement présents dans l'air, ils ne sont pas généralement pathogènes pour les animaux et les hommes sauf pour certains qui peuvent devenir lorsque les conditions sont défavorables, par contre certaines moisissures sont phytopathogènes et doivent être éliminées avant l'utilisation des boues en agriculture comme *Fusarium* (Aouadi *et al.*, 2007).

4.1.5. Les algues

On en trouve peu dans les boues primaires et secondaires par contre dans le lagunage naturel une grande partie des boues est constituée de détrites d'algues (Aouadi *et al.*, 2007).

4.1.6. Les protozoaires

Des abondances remarquables dans les boues activées où ils jouent un rôle important dans la clarté finale de l'effluent, Curds et Cockburn (1970) ont recensé de nombreuses et citent les 5 espèces suivantes comme étant les plus fréquentes : *Chilodonella uncinata*, *Opercularia microdiscum*, *Aspidisca costata*, *Trachelophyllum*, *Carchesium polypinum* (Aouadi *et al.*, 2007).

5. Les filières de traitement des boues

Une fois collectées, les boues doivent subir différents traitements avant leur utilisation. Ces traitements ont trois objectifs majeurs : la réduction du pouvoir fermentescible, la réduction de la masse des boues et la réduction des risques sanitaires. Les boues résiduaires se présentent sous une forme liquide et avec une forte charge en matière organique hautement fermentescible. Ces deux caractéristiques sont gênantes et posent beaucoup de problèmes techniques pour leur évacuation «quelle que soit la

destination », parmi lesquels leur transport et leur stockage qui conduisent souvent à des problèmes de manipulation et des nuisances olfactives. Ceci impose le choix d'une filière de traitement dès l'installation de la STEP (Chibani, 2010).

Les traitements biologiques ou physico-chimiques utilisés pour l'épuration des eaux résiduaires génèrent une production importante de boues diluées (contenant plus de 99% d'eau) et contenant de la matière organique fermentescible, les deux principaux objectifs de la filière de traitement des boues seront donc :

- de stabiliser les matières organiques pour éviter toute fermentation incontrôlée qui entrainerait les nuisances olfactives importantes.
- d'éliminer un maximum d'eau afin de diminuer les volumes de boues à évacuer

Après une étape préalable d'épaississement permettant de concentrer les boues, la stabilisation de la matière organique est réalisée grâce à des procédés biologiques ou physico-chimiques. L'étape finale de déshydratation permettra d'extraire le maximum d'eau et de réduire la charge microbienne (fig. 9), (Chibani, 2010).

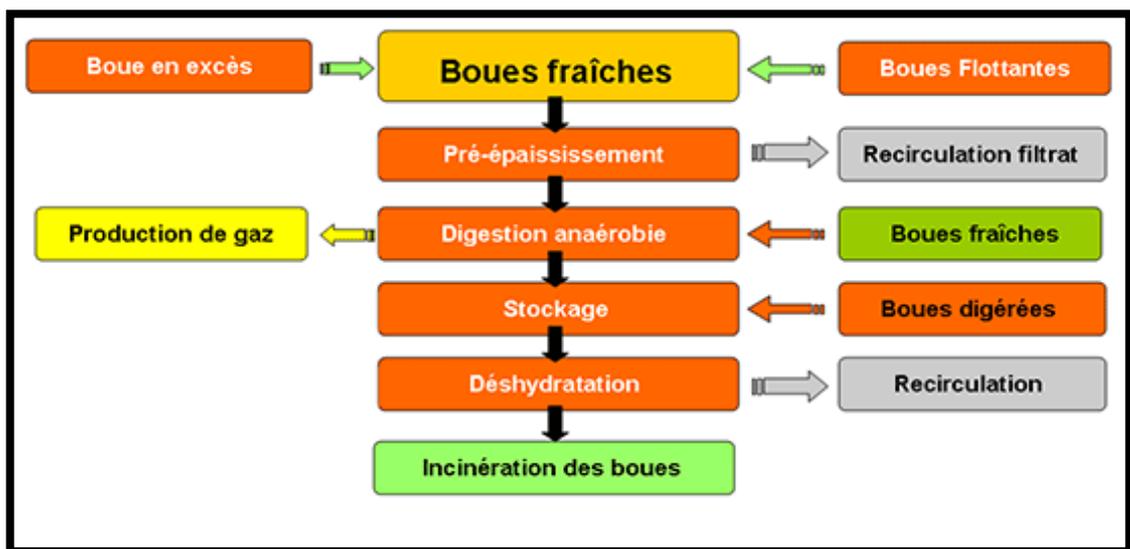


Figure 9 : Les filières de traitement des boues [3].

6. Destination finale des boues

Les boues ont une consistance pâteuse, elles sont constituées de particules solides non retenues par les prétraitements, matières organiques non dégradées, matières minérales et microorganismes. Les boues en sortie de station d'épuration sont constituées de 99% d'eau, de matières organiques et de matières minérales dissoutes ou insolubles. En fonction de leur utilisation future, les boues subissent des traitements qui visent à réduire leur teneur en eau, stabiliser les matières organiques ou à les hygiéniser (Koller, 2009).

Les boues d'épuration peuvent être incinérées ou mises en décharge, mais on les utilise traitées principalement pour l'agriculture au même titre que les engrais. Ce sont les seuls sous-produits de traitement des eaux usées qui peuvent être réutilisés pour l'agriculture, mais il faut encore qu'elles répondent à certaines règles de qualité ce qui peut être dur à gérer car la qualité des boues d'épuration est liée à la qualité des eaux usées produites (Koller, 2009).

La valorisation des boues est souvent aléatoire et leur évacuation constitue presque toujours une charge d'exploitation importante. Sur le plan économique le but à atteindre est en réalité de limiter les frais de leur traitement et de leur transport, cette optimisation dépend des conditions d'écoulement du produit, des besoins en énergie et du coût de celle-ci, du prix de la main d'œuvre, des réactifs de conditionnement etc.... Parallèlement, l'hygiène du travail et la protection de l'environnement imposent le développement de solutions provoquant le minimum de nuisances (Chibani, 2010). Les principales destinations des boues et sous produits issus de leur traitement sont les suivantes :

6.1. Amendement des sols

Les boues digérées présentent l'avantage d'une forte réduction de germes pathogènes et évitent le dégagement de mauvaises odeurs à l'épandage.

En dehors de la présence excessive dans certains cas de graisses ou de fibres le risque potentiel le plus important de l'utilisation des boues en culture est celui lié à la présence de métaux lourds dont l'origine est essentiellement industrielle, les cations dangereux les plus fréquemment sont : Zn, Cd, Cu, Ni... Les quantités de boues d'épandage ne doivent pas conduire à un accroissement notable de l'azote lessivable. On doit savoir les teneurs des sols en métaux lourds avant l'épandage (Monod, 1989).

6.2. Rejet en mer

Cette solution expéditive consiste le plus souvent en un déversement discontinu au large au moyen de barges et chalands.

Dans quelques cas cette évacuation est réalisée par un émissaire sous-marin suffisamment long et immergé en profondeur.

Le choix d'un rejet en mer nécessite au préalable un examen minutieux et prolongé des courants ainsi que des études bactériologiques, biologiques, la destruction des germes pathogènes et la dégradation des matières organiques en milieu marin est lente, les boues déversées en mer doivent être débarrassées des matières flottantes (Bougrier, 2005).

6.3. Décharge

C'est encore sans doute la destination finale la plus fréquente des boues produites. Le résidu peut être plus ou moins important, mais même dans les cas d'incinération il demeure un sous produit de volume non négligeable et rassemblant normalement tous les métaux lourds contenus dans les boues cette décharge peut aller de simple « lagune à boues liquides » alimentée en boues stabilisées et dont le drainage et l'évaporation nécessitent des mois ou des années. Une solution parfois envisagée, en particulier pour les boues toxiques, et avant décharge, d'incorporer aux boues liquides des produits solidifiant (silicates, ciments, etc...). Ce mode de traitement présente l'inconvénient de condamner définitivement des surfaces au sol important. De plus, les risques de lixiviation par les eaux de ruissellement ne semblent pas totalement écartés (Koller, 2009).

En fin, la mise en décharge commune des boues avec les ordures ménagères est une pratique encore fréquente (Koller, 2009).

6.4. Récupération de produits

La récupération n'est pas envisageable que pour certains éléments contenus dans les boues, en particulier :

1. de fibres dans l'industrie du papier-carton et du bois.
2. des protéines (en particulier dans les industries de la viande) à des fins de production d'aliments du bétail, ou pour la pisciculture.
3. des produits coagulants dans les boues provenant de la clarification des eaux des rivières.

4. réutilisation du carbonate de calcium et de la chaux des boues provenant de traitement massif à la chaux. Tel est le cas, des boues à prédominance organiques provenant du traitement biologique des eaux résiduaires urbaines.
5. récupération de Zn, Cu, Cr dans les boues provenant d'une épuration d'eaux de traitement de surfaces métalliques.
6. réutilisation de boues minérales après séchage thermique ou de cendres d'incinération, de produits stabilisateurs de sol ou de béton (mais une telle réutilisation n'a jusqu'à ce jour reçu que des applications limitées) (Aouadi *et al.*, 2007).

6.5. Récupération d'énergie

L'emploi des boues comme combustible exportable en dehors de l'usine d'épuration est rare. Tel peut être le cas pour les boues déshydratées provenant de la décantation de certaines eaux usées très chargées en combustible (poussière de charbon) pour des suspensions huileuses ou des graisses récupérées par flottation ou même encore pour des boues organiques séchées sous forme de granules ou de poudre, la récupération d'énergie se réalise sous deux formes principales :

- production de gaz méthane par fermentation, le gaz est utilisé pour chauffage, alimentation des groupes électrogène et le conditionnement thermique de boue elle-même.
- production calorifique dans les fours d'incinération, l'énergie produite sert essentiellement, sinon totalement, à sécher les préalablement les boues.

Toute récupération d'énergie s'accompagne de la réduction totale ou partielle de germes pathogènes dans les boues (Vilaginés, 2010).

6.6. Réinjection dans le sol

Cette solution est envisagée essentiellement pour les boues toxiques, consiste à injecter les boues à l'état liquide à grande profondeur dans les poches poreuses du sous-sol isolées entre des couches continues perméables, une étude géologique très sérieuse est évidemment indispensable (monod, 1989).

CHAPITRE III :

TESTS DE GÉNOTOXICITÉ

1. Généralités

La détection d'agents mutagènes par les tests biologiques sur des plantes supérieures existe depuis de nombreuses années. Ce sont maintenant des systèmes bien établis pour le dépistage (screening) des aberrations chromosomiques et des mutations géniques, et le monitoring environnemental des agents chimiques (Souguir, 2009).

Comme Stich et San (1980) l'ont constaté : « l'introduction récente et réussie de l'utilisation du test sur les poils d'étamines de *Tradescantia* (*Tradescantia Stamen*, Hair bioassay, TSH) » pour détecter les agents mutagènes et carcinogènes en suspension dans l'air, peut être le début de la reconnaissance de divers tests végétaux peu coûteux, faciles à manier et applicables à « l'indoor pollution » aussi bien qu'à « l'outdoor détection » d'agents mutagènes environnementaux (Souguir, 2009).

1.1. L'importance des plantes supérieures en génotoxicité

Plus de 200 tests utilisant des microorganismes, des insectes et des plantes ont été développés pour permettre l'identification des agents causant des dommages à l'Homme. L'utilisation des plantes a permis de mettre au point des tests de génotoxicité très performants. Les avantages de l'utilisation des plantes supérieures dans ce type de tests sont :

- Le nombre et la structure des chromosomes de certaines plantes supérieures. Les anomalies mitotiques sont faciles à détecter lorsque les chromosomes sont longs et en nombre réduit. Par exemple : *Allium cepa* ($2n = 16$), *Pisum sativum* ($2n = 14$), les clones de *Tradescantia* ($2n = 12$), *Vicia faba* ($2n = 12$) et *Crepis capillaris* ($2n = 6$), offrent d'excellents systèmes de cytogénicité et permettent la détection des aberrations chromosomiques lors de la méiose et de la mitose ainsi que l'endommagement de l'ADN.
- le cycle de développement très court de certaines espèces.
- Evaluation aisée de la génotoxicité des polluants chimiques utilisés purs ou en mélange.
- Evaluation de la pollution des sols. En effet, ces plantes participent au transfert des composés polluants le long de la chaîne alimentaire. La facilité de manipulation. Environ 233 espèces ont été utilisées, dans les tests de génotoxicité. Parmi ces plantes : *Allium cepa* ($2n = 16$), *Arabidopsis thaliana* ($2n = 10$), *Crepis capillaris* (Souguir, 2009).

1.2. Les espèces utilisées de plantes supérieures

1.2.1 .*Vicia faba*

C'est l'espèce végétale la plus fréquemment utilisée (grâce à ses larges chromosomes), Pour estimer les dégâts chromosomiques. Plusieurs études ont été réalisées:

1. études d'aberrations chromosomiques dans les cellules somatiques pendant les divisions mitotiques.

2. études des micronoyaux dans les cellules des extrémités des racines *Vicia faba* a été également utilisée dans les expériences sur les radiations dès 1913 (Souguir, 2009).

1.2.2. *Allium cepa*

C'est l'espèce la plus couramment utilisées pour les études sur les aberrations chromosomiques après *Vicia faba* (Khanna et Sharma, 2013).

1.2.3. *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon esculentum*, *Pisum sativum* et *Zea mays*

Peuvent être utilisés pour l'étude aussi bien des mutations génétiques que des aberrations chromosomiques, mais elles ne sont pas les meilleurs végétaux pour les études *in situ* (Cotelle, 1999).

Tableau IV: Exemples des plantes étudiées et tests associés (Souguir, 2009).

Système utilisé	Tests de génotoxicité
<i>Vicia faba</i>	-Division mitotique et aberrations chromosomiques. -MCN(micronoyau).
<i>Allium cepa</i>	-Division mitotique . -aberrations chromosomiques. -MCN(micronoyau). -SCE (échange de chromatide sœurs). -Test des Comètes.
<i>Hordeum vulgare</i>	-Aberrations chromosomiques.
<i>Crepis capillaris</i>	-Aberrations chromosomiques .

1.3. Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures

1.3.1. Test d'aberration chromosomique

L'induction des cassures de chromosomes est considérée comme l'un des tests de base de la génotoxicité. Le test d'aberration chromosomique *in vitro* est pratiqué chez les plantes au niveau de la zone méristématique et chez les animaux au niveau des cellules des mammifères en culture. Il permet de détecter les agents polluants qui provoquent des anomalies touchant la structure des chromosomes (Souguir, 2009).

1.3.2. Induction de micronoyaux

L'observation des micronoyaux en tant qu'indicateur de génotoxicité est apparue dans les années 1940, mais c'est dans les années 1970 que ce test a été développé sur un grand nombre d'organismes. Un micronoyau est défini dans le « Glossary of Genetics and Cytogenetics » de Rieger *et al.* (1968) comme « un petit noyau surnuméraire séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales des chromosomes » (Foltete, 2010).

1.3.3. Induction des échanges de chromatides soeurs (ECSs)

Le test ECSs permet d'identifier des génotoxines même à de très faibles concentrations. Il permet de visualiser les échanges réciproques des bras chromatidiques appartenant à un même chromosome et il a été employé sur différentes plantes : *Allium cepa*, *Vicia faba* et *Nicotiana plumbaginifolia* (Souguir, 2009).

1.3.4. Test des comètes (Single Cell Gel Electrophorésis: SCGE)

Le test des comètes (ou en anglais SCGE) est défini comme une technique microélectrophorétique rapide, simple et sensible qui permet de visualiser les dommages de l'ADN chez les cellules eucaryotes. Il est devenu ces dernières années un des tests les plus utilisés pour évaluer le pouvoir génotoxique d'un composé. En conditions alcaline (pH > 13), ce test peut détecter les cassures simple et double brin, les sites labiles alcalins et les sites incomplets de réparations (Darolles, 2010).

2. *Allium cepa*

2.1. Présentation générale d'*Allium*

Allium cepa l'oignon, fait partie de la famille des alliacées. Différentes variétés d'oignon peuvent être utilisées. Cette plante est cultivée dans de très nombreux pays pour son usage alimentaire. Le caryotype ($2n = 16$) présente cinq paires de chromosome (de 8 à 16 μm) avec des centromères situés de façon médiane à submédiane, deux paires dans lesquelles les centromères sont submédians et une paire de chromosomes satellites (Cotelle, 1999).

Le test d'*Allium cepa* permet l'évaluation de divers critères de toxicité et de génotoxicité. Pour ce qui est de la toxicité, contrairement à *Vicia faba*, l'élongation racinaire d'*Allium cepa* est très souvent déterminée en parallèle avec les études de génotoxicité. Ce critère présente une bien meilleure répétabilité et une plus grande facilité de mesure pour *Allium* que pour *Vicia* car les racines d'*Allium* poussent de façon très homogène et forment ensemble de racines de longueur égale (Cotelle, 1999).

2.2. Les critères de génotoxicité déterminés sur *Allium cepa*

Allium cepa est utilisé depuis longtemps dans les études sur les chromosomes et en particulier sur les effets des rayons X mais c'est Levan qui fut, en 1938 le premier scientifique à évaluer les effets du traitement d'*Allium cepa* à un produit chimique, à savoir la colchicine. La modification du comportement mitotique due à la colchicine fut baptisé c-mitose qui se traduit en fait par une modification du nombre de chromosomes.

D'autres critères ont aussi été étudiés dans les racines d'*Allium cepa* : les échanges de chromatide sœur et très récemment, le test des comètes. Enfin, de la même façon que dans le cas de *Vicia faba*, le critère « micronoyaux » évalué dans les racines d'*Allium* est de plus en plus utilisé dans les études de génotoxicité (test allium-MCN). Au niveau de la sensibilité des deux tests, quelques études sur *Allium cepa* ont démontré qu'il y avait peu de différences entre le test des micronoyaux et le test des aberrations chromosomiques.

Les racines d'*Allium cepa* ont surtout été utilisées pour évaluer le nombre d'aberrations chromosomiques. Ce critère s'est avéré très sensible pour détecter le potentiel génotoxique de produits chimiques, métaux, produits phytosanitaires ou autres substances organiques. La revue de Grant 1982 a montré que, sur 148 produit chimique étudiés avec ce test, 76 % ont donné une réponse positive. L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* est destiné à détecter les agents clastogènes qui provoquent des

aberrations chromosomiques structurales dans des cellules somatiques cultivées, par exemple : les cellules racinaires d'*Allium cepa*.

Les Aberrations chromosomiques induites peuvent être divisés en deux catégories principales Aberrations de type chromosomique, se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides (d'un chromosome) sur le même site et les aberrations chromatidiennes se traduisant par une cassure d'une seule des deux chromatides ou par une cassure et une réunion entre chromatides. Les rayonnements ionisants induisent des aberrations de type chromosomique (aberrations symétriques), comme dicentriques, des inversions, des chromosomes en anneau, sont produits dans la phase G0 ou G1 du cycle cellulaire (avant la réplication), tandis que les aberrations de type chromatides (aberrations asymétriques), comme des pauses et des lacunes, sont produits au cours de la phase S ou G2 (pendant ou après réplication) (Cotelle, 1999).

Ce test s'est également montré efficace dans l'étude de la génotoxicité de :

- sols prélevés dans la région de Tchernobyl et présentant une forte radioactivité.
- lixiviats de déchets d'industries métallurgiques et chimiques.
- eau de rivière.
- eau de pluie dans des régions industrialisées.
- effluents industriels.
- effluents de papeteries et d'industries métallurgiques et chimiques.
- effluents de raffinerie de pétrole.
- effluents de tannerie.
- effluents d'industries, pétrochimiques.

2.3. Les différents paramètres Analysés par le test *Allium cepa*

2.3.1. Indice mitotique

L'indice mitotique (IM), caractérisé par le nombre total des divisions des cellules dans le cycle cellulaire, a été utilisé en tant que paramètre à évaluer la cytotoxicité de plusieurs substances. Le niveau de cytotoxicité d'une substance peut être déterminé par l'augmentation ou la diminution de l'IM. La diminution significative de l'IM en comparant au contrôle négatif indique une altération, découlant de l'action d'une substance chimique sur la croissance et le développement des organismes exposés. D'autre part, Lorsque l'IM est plus élevé que le témoin négatif, ceci est le résultat d'une augmentation de la division

cellulaire, conduit à une prolifération anarchique des cellules et même à la formation de tissus tumoraux (Leme *et al.*, 2009).

2.3.2. Les Aberrations Chromosomiques (AC)

Les ACs sont caractérisés par le changement soit dans le nombre total de chromosomes ou de la structure chromosomique qui se produisent en raison de l'exposition du au traitement chimique. Pour évaluer les différentes anomalies chromosomiques, plusieurs types d'ACs sont considérés à différents stades du cycle cellulaire (Prophase , métaphase, anaphase et télophase). Les ACs ont été regroupés en deux types, les aberrations clastogéniques et physiologiques. Aberrations clastogéniques comprennent les ponts chromosomiques, la rupture chromosomique alors que les aberrations physiologiques comprennent c-mitose, chromosome retardataire et la condensation des chromosomes (stickness) (Khanna et Sharma, 2013).

2.3.3. Les anomalies nucléaires

Certains auteurs ont récemment inclus un autre caractère dans l'analyse des aberrations chromosomiques dans les cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Ce caractère se réfère à des anomalies nucléaires (AN). Les ANs sont caractérisées par des modifications morphologiques dans les noyaux interphasiques, à la suite de l' action de l'agent testé. En général, ces altérations sont observées dans le test d'*A. cepa* comme noyaux lobulées, noyaux portant des bourgeons nucléaires, polynucléaires (Leme *et al.*, 2009).

2.3.4. Micronoyau

les micronoyaux (MN) ont été considérés par de nombreux auteurs comme le critère le plus efficace et le plus simple pour analyser l'effet mutagène des produits chimiques. Cela est dû au fait que les MN résultent des dommages d'ADN, pas ou mal réparés, dans les cellules parentales, étant facilement observés dans les cellules filles comme une structure similaire au noyau principal, mais dans une taille réduite. Ainsi, MN découlent de la mise au point de certaines aberrations chromosomiques, par exemple, les pertes chromosomiques (Leme *et al.*, 2009).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Description de la station d'épuration (STEP)

La STEP de la ville de Guelma est située sur la route nationale N°21, pont Héliopolis près d'oued Seybouse. Elle est fonctionnelle depuis le 18 Février 2008 à raison d'un traitement d'environ 32000 m³/jour au temps sec et 43000 m³/ jour au temps de pluie.

La station est implantée sur un terrain agricole de 7.8 Hectares avec une capacité de 200000 équivalent / habitant (Fig. 10). Elle utilise le procédé de culture libre (boue activée) comme procédé d'épuration.

L'épuration des eaux usées consiste à un prétraitement physique, une décantation primaire, un traitement biologique et une décantation secondaire. Les boues issues du bassin biologique sont récupérées au fond de clarificateur. De là une partie est extraite pour être traitée, puis évacuée, tandis qu'une partie est recirculée.



Figure 10 : Schéma de station d'épuration de la ville de Guelma (Karaali et *al.*, 2008).

2. L'étude biologique

Les analyses bactériologiques et génotoxiques de ce travail ont été réalisées dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie du département de Biologie à l'université 08 Mai 1945 Guelma.

Sachant que les boues sont utilisées dans l'agriculture, la forte charge de ces boues en contaminants et en polluants peut provoquer de nombreuses maladies notamment chez l'Homme et l'animal.

C'est pour cela, nous allons essayer d'étudier la qualité bactériologique des boues mixtes liquides et sèches prélevées de la station d'épuration de Guelma et d'évaluer la génotoxicité des boues liquides en utilisant le test des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa*.

2.1. Le prélèvement

Le prélèvement doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Les techniques de prélèvements sont variables en fonction du but recherché et de la nature de boues à analyser (Rodier *et al.*, 1996).

- **Pour le prélèvement de boues sèches**

Le prélèvement se fait directement, en utilisant une petite pelle, car ce type de boues est sous forme de pâte dans des récipients cylindriques en plastique bien fermés (Rodier *et al.*, 1996).

- **Pour le prélèvement de boues liquides**

Le prélèvement se fait directement sur la tuyauterie de transfert dans des flacons en verre munis d'un large col et d'un bouchon à vis métallique (Rodier *et al.*, 1996).

2.2. Analyses bactériologiques

2.2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux

La recherche et le dénombrement des germes totaux se réalise à deux températures différentes afin de cibler à la fois les micro-organismes à tendance psychrophile à 22°C et ceux franchement mésophiles à 37°C (Rejsek, 2002).

➤ **Mode opératoire**

À partir de la solution mère et des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) :

- Porter aseptiquement 2 fois, 1 ml de chaque dilution dans deux boîtes de pétri vides préparées à cet usage ;
- Compléter ensuite chacune des boîtes avec environ 20 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à $45\pm 1^\circ\text{C}$;
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose.

- Laisser solidifier sur paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose ou de gélose blanche. Cette double couche a un rôle protecteur contre les diverses contaminations (Lebres, 2006).

➤ **Incubation**

- La première série est incubée, couvercle en bas à 22°C pendant 24 heures.
- La seconde est incubée à 37°C pendant 72 heures.

➤ **Lecture**

- La première lecture après 24 heures.
- La deuxième lecture après 48 heures.
- La troisième lecture après 72 heures.

➤ **Dénombrement**

Il s'agit de dénombrer toutes les colonies des boîtes contenant entre 15 et 300 colonies.

2.2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale

La recherche et le dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale se fait par méthode d'ensemencement sur milieu liquide (NPP) qui consiste à ensemercer nombreuses prises d'essai d'un même échantillon et/ou des dilutions de celui-ci dans des tubes de milieu de culture. Cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organismes supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire (Elarfi, 2009).

2.2.2.1 Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux

Elle consiste à ensemercer l'échantillon dans des tubes de milieu BCPL, cette technique fait appel à deux tests consécutifs :

- **Test de présomption**

Réservé à la recherche des coliformes totaux. Après avoir bien homogénéisé l'échantillon afin d'obtenir une répartition homogène des microorganismes, on réalise cinq dilutions décimales successives (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) avec trois répétitions par dilution, les dilutions s'effectuent toujours dans des conditions aseptiques. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 heures (Fig. 11), (Guide, 2007).

- **Lecture**

Les tubes qui présentent à la fois un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune et un dégagement gazeux se considèrent comme positifs. Le dénombrement des coliformes se fait selon les prescriptions de la table du NPP (Guide, 2007).

- **Test de confirmation**

Les tubes de BCPL qui montrent un résultat positif après le test de présomption font l'objet d'un repiquage à l'aide d'un ose bouclé dans des tubes contenant le milieu schubert. L'incubation se fait à 44 °C pendant 24 heures (Rejsek, 2002).

- **Lecture**

Les tubes qui présentent à la fois un anneau rouge en surface : Témoin de la production d'indole par *Escherichia Coli*, après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs et un dégagement gazeux se considèrent comme positifs. Le dénombrement s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (Rejsek, 2002).

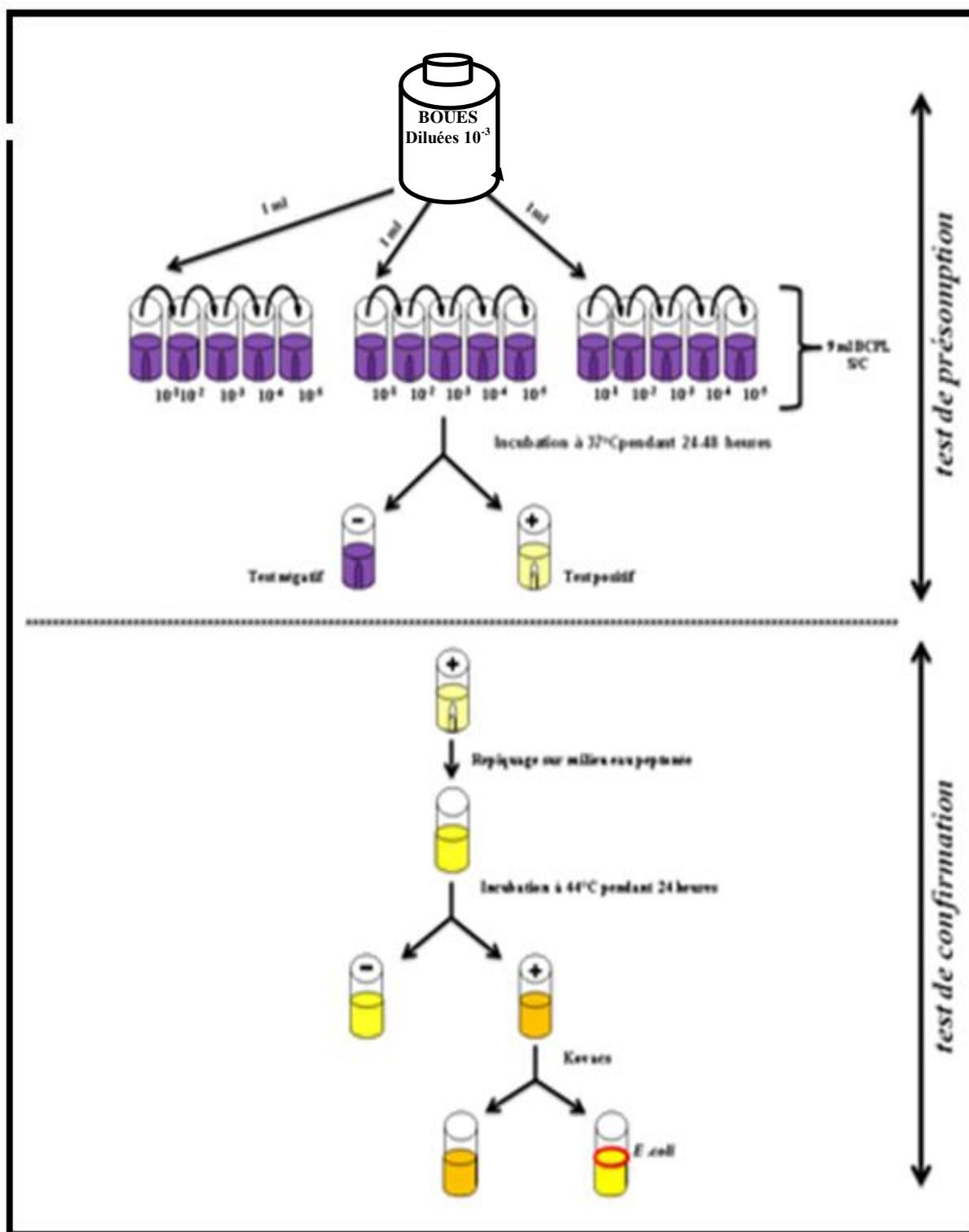


Figure 11 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux (Guide, 2007).

2.2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

Comme la méthode de recherche des coliformes en milieu liquide, la recherche et le dénombrement des Streptocoques fécaux font appel à deux tests consécutifs :

- **Test de présomption**

Réservé à la recherche des streptocoques fécaux après avoir bien homogénéisé l'échantillon, on réalise cinq dilutions décimales successives (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) avec trois répétitions par dilution à partir de boues liquides et sèches, en utilisant des tubes de 9 ml de bouillon glucosé à l'azote (Rothe) à simple concentration, on incube les tubesensemencés à 37°C pendant 24 heures (Fig.12). On laisse séjournés pendant 48 heures les tubes qui présentent un résultat négatif (Elarfi, 2009).

- **Lecture**

Les tubes qui présentent un trouble microbien sont considérés comme positifs.

- **Test de confirmation**

Réservé à la confirmation réelle de la présence des streptocoques fécaux du groupe D à partir des tubes positifs du test de présomption, les tubes du milieu Rothe qui présentent un résultat positif font donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'un ose bouclé dans des tubes contenant le milieu Evalitsky, l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures (Guide, 2007).

- **Lecture**

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- ✓ Un trouble microbien.
- ✓ Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.
- ✓ Le dénombrement s'effectue selon les prescriptions du tableau du NPP (Guide, 2007).

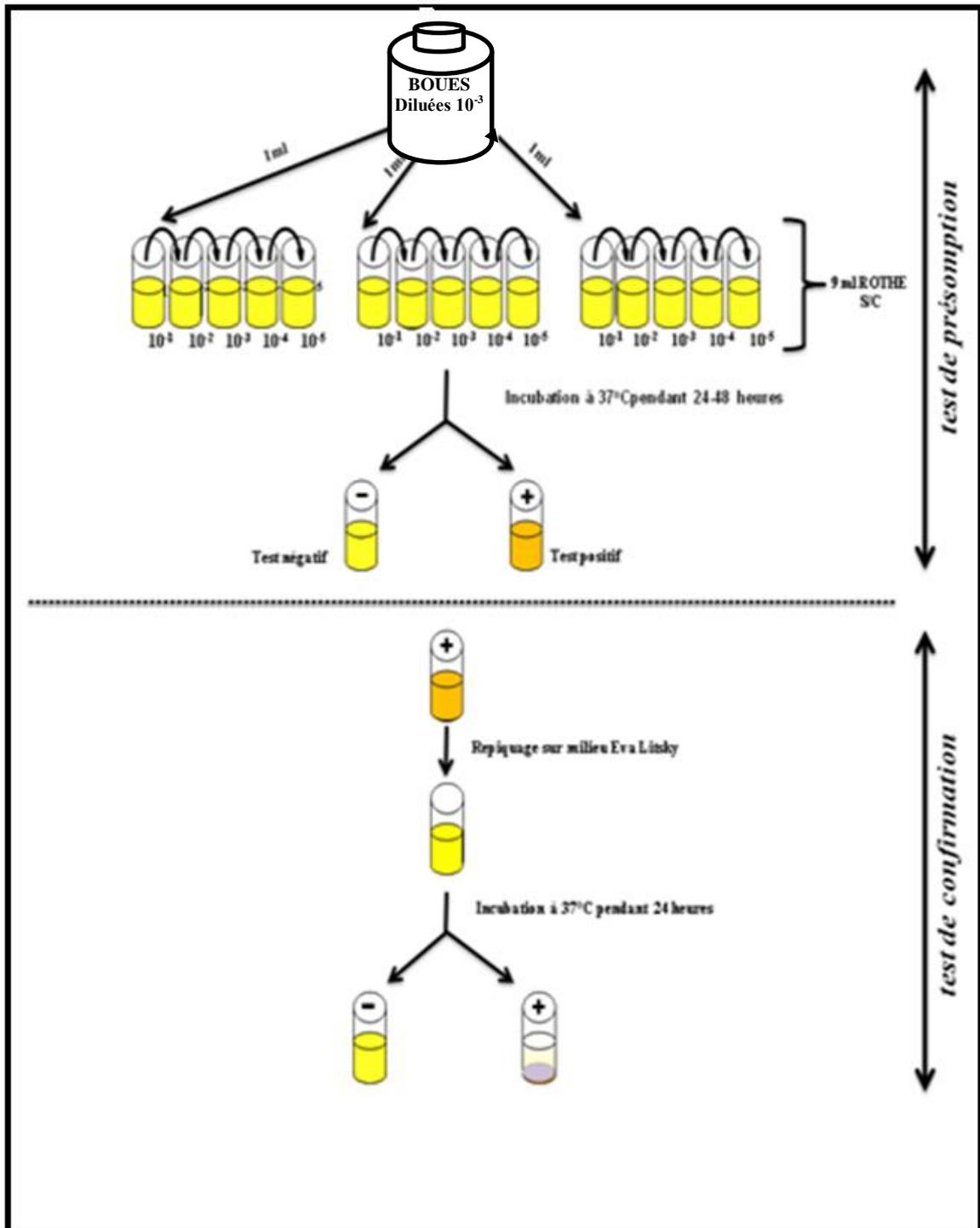


Figure 12 : Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (Guide, 2007).

2.2.3. Recherche et dénombrement des spores anaérobies sulfito-réducteurs

Les ASR se développant de 24 à 48 heures sur une gélose VF en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu en sulfure, qui en présence de Fe^{2+} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire (Rejsek, 2002).

➤ Mode opératoire

À partir de la solution mère :

- Prendre environ 5 ml dans un flacon stérile puis le soumettre à un chauffage à 80°C pendant 8 à 10 minutes dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes.
- Refroidir immédiatement le flacon sous l'eau de robinet.
- Répartir ensuite le contenu de ce flacon dans 4 tubes stériles, à raison de 1ml par tube.
- Ajouter environ 20 ml de gélose VF, fondue et additionnée d'une ampoule d'Alun de fer et d'une ampoule de Sulfite de sodium.
- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air.

Laisser solidifier sur pailleasse pendant 30 minutes environ, ajouter une couche de paraffine puis incubé à 37°C , pendant 24 à 48 heures (fig. 13), (Labres, 2006).

➤ Lecture

- La lecture se fera après 24 heures et après 48 heures.
- Dénombrer toute colonie noire d'environ 0,5 mm de diamètre, poussant en masse (Rejsek, 2002).

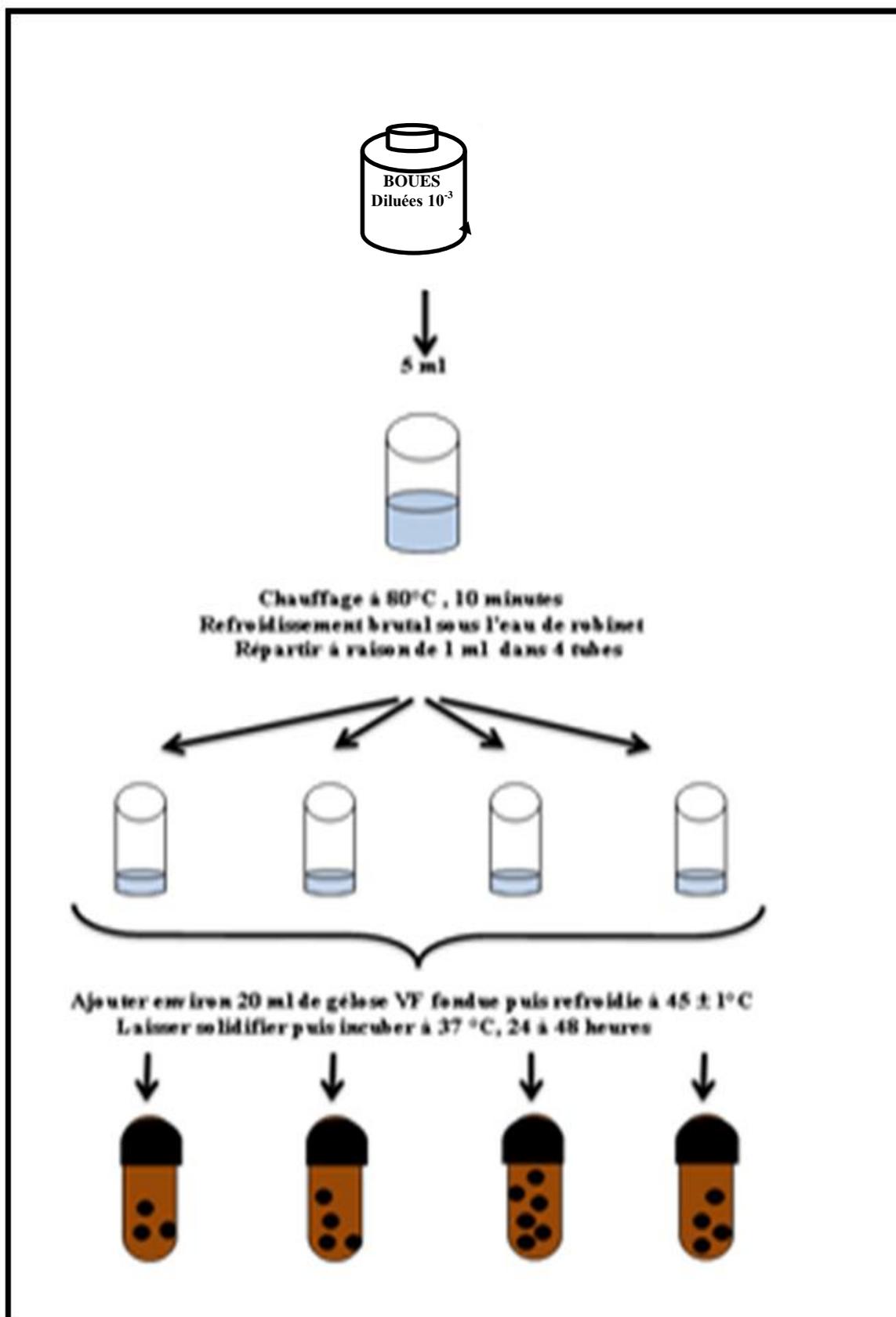


Figure 13 : Recherche et dénombrement des ASR (Rejsek, 2002)

2.2.4. Recherche de Streptomyces

Le milieu CM est un milieu sélectif pour les Streptomyces, il permet le développement de différents types de colonies d'aspect mycélien filamenteux. L'incubation se fait à 30°C pendant une semaine. Après la coloration de Gram des colonies isolées sur milieu CM, une recherche de l'enzyme nitrate réductase a été effectuée et ceci par ensemencement sur le milieu bouillon nitraté (Guenifi et Guemihi, 2008).

2.2.5. Recherche des germes pathogènes

Pour chercher et identifier les bactéries, nous avons utilisé la technique d'ensemencement par râteau sur gélose coulée dans des boîtes de pétri. Les milieux utilisés sont : Hektoen, SS, Chapman, GN, GNAB, Citrimide et Sabouraud (Bouchaala, 2010).

2.2.5.1. Recherche des staphylocoques

➤ Principe

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, permettant la croissance des germes halophiles, ce milieu contient un agent inhibiteur (forte concentration en chlorure de sodium), parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus* (Joffin *et al.*, 2001).

➤ Mode opératoire

À partir de la solution mère, on ensemence 1 ml par râteau toute la surface des boîtes de pétri contenant le milieu Chapman. Par la suite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h (Rodier, 2005).

➤ Lecture

- Les colonies mannitol (+) apparaissent en jaune, ce qui indique la fermentation du mannitol.
- Les colonies suspectes sont confirmées par :
 - ✓ Un examen microscopique après coloration de Gram.
 - ✓ Un test au mannitol mobilité.
 - ✓ Un test à la catalase.
 - ✓ Un test à la coagulase.

2.2.5.2. La recherche des entérobactéries

La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements biologiques d'origine animale, des eaux, des produits laitiers et des autres produits alimentaires (King et Metzger, 1986).

➤ Mode opératoire

Prélever un volume précis de 1 ml à partir des dilutions décimales (10^{-1} et 10^{-3}), on ensemence par râteau toute la surface des boîtes de pétri contenant le milieu Hektoen. Par la suite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h.

➤ Lecture

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur « saumon » les autres donnant des colonies bleues ou vertes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir (King et Metzger, 1986).

2.2.5.3. Recherche des salmonelles

SS Agar (gélose pour *Salmonella Shigella*) est un milieu sélectif et différentiel pour l'isolement des bacilles entériques pathogènes, particulièrement ceux appartenant au genre *Salmonella* issus d'échantillons cliniques (King et Metzger, 1986).

➤ Mode opératoire

Prélever un volume précis de 1 ml à partir des dilutions décimales (10^{-1} et 10^{-3}), on ensemence par râteau toute la surface des boîtes de pétri contenant le milieu SS. Par la suite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h.

➤ Lecture

Après 24 heures à 37°C en aérobiose, en général :

- ✓ Colonies incolores : absence d'acidification du milieu : bactéries lactose.
- ✓ Production d'H₂S : Colonies noires ou à centre noir: production de sulfure de fer noir.

2.2.5.4. Recherche des Vibrio

Les *Vibrionaceae* se présentent sous forme de Bacilles Gram Négatifs droits ou incurvés (BGN), très mobiles, possédant une oxydase, aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose sans production de gaz ni d'H₂S.

➤ Mode opératoire

Prélever un volume précis de 1 ml à partir des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}), on ensemence par râteau toute la surface des boîtes de pétri contenant le milieu GNAB. Ensuite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h.

➤ Lecture

Des colonies caractéristiques et distinctes feront l'objet d'une identification morphologique et biochimique.

2.2.5.5. Recherche des levures (*Candida albicans*)

L'isolement des levures peut être pratiqué sur le milieu Sabouraud qui constitue un milieu classique pour la culture et rendu sélectif par addition de chloramphénicol ou de gentamicine. L'identification des levures est effectuée par une coloration simple, ayant permis d'observer les caractères simples culturels, la forme (sphérique, ovoïde, allongée) et la taille des cellules en milieu solide.

- **Technique**

Ensemencer 1 ml de la solution mère à la surface du milieu Sabouraud. Incuber à 30°C pendant une semaine.

- **Lecture**

La lecture se fait au bout de 48 heures, et peut aller jusqu'à 7 jours. Les colonies *Candida albicans* apparaissent bombées, crémeuses et blanchâtres. Elles sont lisses et peuvent se plisser en vieillissant.

- **Identification**

La technique d'identification classique repose sur le test blastèse : filamentation en sérum. Le diagnostic repose sur l'observation directe au microscope qui montre les levures bourgeonnantes rondes ou ovalaires.

- **Test blastèse**

Ce test permet de détecter la production de tubes germinatifs chez l'espèce *Candida albicans*. Incuber 1 ml de la suspension de la levure avec 1 ml du sérum humain pendant 3 heures à 37°C.

- **Lecture**

Observer au microscope entre lame et lamelle. *Candida albicans* montre des tubes germinatifs, qui sont minces et plus longs que les cellules mères.

2.2.6. Identification des bactéries isolées

2.2.6.1 Examen macroscopique des caractères cultureux

L'aspect des colonies dépend du milieu, de la durée et la température d'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées.

La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments :

- La taille.
- La forme : bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé.
- L'aspect de la surface : lisse, rugueux.
- L'opacité : opaque, translucide, transparent.
- La consistance : grasse, crémeuse, sèche, muqueuse.
- Pigmentation.

2.2.6.2. Examen microscopique après coloration de Gram

➤ **Les étapes de coloration de Gram**

- À partir de la culture à étudier préparer un frottis.
- Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute. Ajouter le Lugol et laisser agir pendant 1 minute.
- Laver à l'eau puis à l'alcool.
- Recolorer avec la Fuchsine, laissé agir pendant 30 secondes (Delarras *et al.*, 2003).

❖ **Lecture**

Observer au microscope :

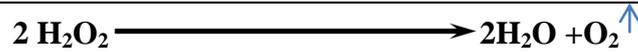
- Les bactéries Gram- sont roses.
- Les bactéries Gram+ sont de coloration violette.
-

2.2.6.3. Examen lié aux caractères biochimiques

❖ Test catalase

• Principe

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La catalase permet la dégradation de l'H₂O oxygénée en eau et oxygène libre qui se dégage sous forme gazeuse selon la réaction suivante :



La technique consiste à déposer une colonie de la culture à tester sur une goutte d'eau oxygénée. Si les bactéries examinées possèdent une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses. Si un dégagement de bulles de gaz (oxygène) apparaît, le test est dit positif (Delarras, 2003).

❖ Test d'oxydase

L'oxydase est une enzyme catalysant une réaction d'oxydo-réduction impliquant une molécule de dioxygène (O₂) comme accepteur d'électron. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau (H₂O) ou en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Une bactérie possède l'enzyme respiratoire, appelée le cytochrome oxydase (dernière enzyme de la chaîne respiratoire, alors elle peut faire la réaction suivante :



La technique consiste à utiliser des disques (OX) commercialisés par l'institut Pasteur, ces disques sont imprégnés de l'oxalate de diméthyle paraphénylène diamine, ce composé est oxydé par le système cytochrome C des bactéries dites positive en un composé violet. En pratique, le disque est imbibé avec une ou deux gouttes d'eau distillée stérile et une parcelle de culture prélevée à l'aide d'une anse de platine est alors étalée sur ce disque. La présence d'oxydase se manifeste alors par le développement d'une coloration violette (Mechai, 2009).

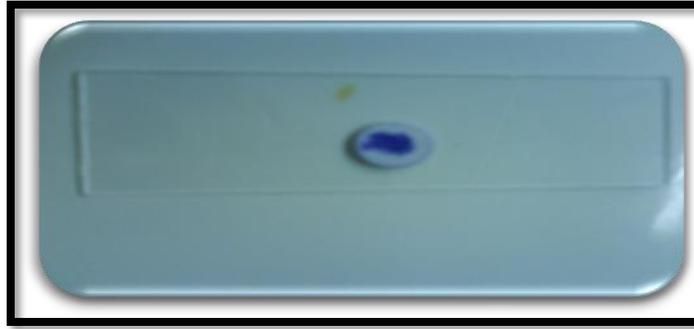


Figure 14 : Le test d'oxydase.

❖ Test de la coagulase

Les souches *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma oxalaté du lapin en 24 heures, ainsi que des espèces de staphylocoques animales (*S. intermedius*). Les autres espèces d'origine animale et humaine sont à coagulase négative (Karaali *et al*, 2003). On ensemence un bouillon cœur cerveau par les colonies isolées sur milieu Chapman puis on incube à 37°C pendant 24h. Par la suite, on ajoute 0.1 ml du bouillon cœur cerveau au plasma du lapin. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

Le résultat positif traduit par la coagulation du plasma qui occupe plus de $\frac{3}{4}$ du volume du liquide initial.

➤ La Galerie API 20E

La galerie API 20E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatifs, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

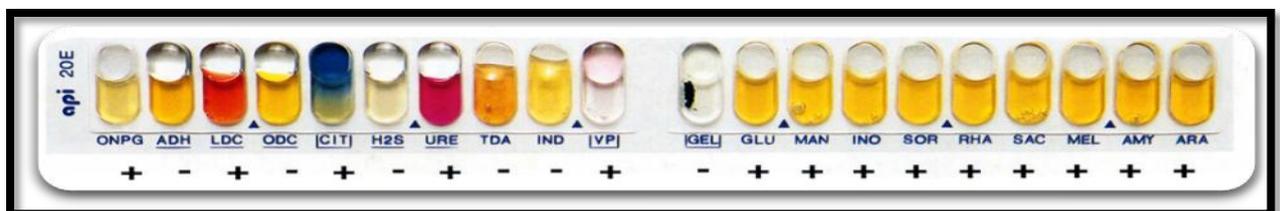


Figure 15 : Galerie API 20E.

➤ Principe

La galerie API 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

➤ Mode opératoire : L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL, avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

➤ **Lecture**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées et révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test VP : ajouter une goutte de réactifs VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.
- Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kovacs. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E.

➤ **La galerie API 20 NE**

C'est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (exp : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*etc).

➤ **Principe**

La galerie API 20 NE comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux.

- **Mode opératoire :** L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :
- **préparation de la galerie**
 - Inscrire la référence de la souche sur languette latérale du biote.

- Réunir fond et couvercle du biote d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée pour créer une atmosphère humide.
 - Sortir la galerie de son emballage individuel et la placer dans la boîte d'incubation.
- **Préparation de l'inoculum**
- À partir d'une culture jeune (18-24h), on réalise une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile.
 - Mettre 0.2 ml de suspension bactérienne à l'aide d'une pipette dans l'API medium.
- ❖ **L'inoculation de la galerie**
- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG.
 - Les tests GLU, ADH, URE vont être complété avec l'huile de vaseline.
 - Remplir les tubes et les cupules des tests de IGLU à IPAC.
 - La boîte d'incubation est refermer et incuber à 37°C pendant 24h pour une première lecture et 48h pour une deuxième lecture.
- ❖ **Lecture et interprétation**
- Les résultats doivent être notés sur la fiche de résultat.
 - La lecture se fait à l'aide d'un tableau de lecture et d'un logiciel d'identification.

3. Étude génotoxique

L'analyse génotoxique est réalisée par le test d'aberrations chromosomiques sur *Allium cepa*. Cet essai est basé sur la détection des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa*, le protocole de ce test est inspiré de celui de Recep *et al.*, (2010). Les principales étapes sont résumées dans la figure 16.

3.1. Matériel végétal et conditions de culture

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est la plante *Allium cepa*. Les bulbes de l'oignon *A. cepa* (2n = 16) ont été achetés auprès d'un supermarché turc et sont cultivées dans de l'eau distillée pendant 48h à l'obscurité.

3.2. Traitement des bulbes

Il s'agit de placer les bulbes germés sur un tube à essai contenant l'échantillon à tester de façon à ce que seules les racines soient immergées. Le Méthyl méthane sulfonate (MMS) est utilisé comme contrôle positif et l'eau distillée comme contrôle négatif. La durée de l'exposition aux échantillons testés est de 24h. Afin de limiter la variabilité intra-

individuelle, cinq réplicats par échantillon présentant la plus forte croissance racinaire sont conservées pour les critères étudiés.

3.3. Fixation et coloration des extrémités racinaires

Les racines sont nettoyées à l'eau distillée et les deux derniers centimètres sont prélevés et fixés à 4°C pendant une durée minimale d'une nuit dans un mélange éthanol/acide acétique glacial (3V : 1V) préparé extemporainement. Ce mélange appelé solution de Carnoy est très instable. Il peut se produire une estérification s'il n'est pas préparé au moment de l'utilisation. L'éthanol a pour effet de précipiter et dénaturer les protéines, de dissoudre certains lipides et de durcir les tissus. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes, il précipite les protéines du noyau.

Les extrémités racinaires peuvent ensuite être conservées à long terme dans de l'éthanol à 70% pour une observation différée ou bien être hydrolysées dans le cas d'une observation immédiate. Les extrémités racinaires sont alors placées dans de l'eau distillée pendant 10 min, hydrolysées dans HCL 1N pendant 8 min et à nouveau transférées dans de l'eau distillée pendant 5 min, changer l'eau distillée 3 fois (5min/fois). Les racines sont ensuite colorées à l'obscurité avec le réactif Feulgen pendant 20 min à 25min. après la coloration, les racines sont ensuite transférées dans de l'eau distillée pendant 2 min.

Il s'agit ensuite de poser les racines sur les lames et couper la partie claire de la partie foncée et celle-ci est coupée en très petits morceaux. Mettre sur chaque racine une goutte de 45% d'acide acétique glacial, couvrir par une lamelle et appuyer par un papier filtre. Après cette étape, utiliser le vernis à ongle pour fermer les lamelles et éviter l'évaporation de l'eau.

3.4. Examen des cellules des extrémités racinaires

Les cellules sont examinées au microscope optique en utilisant l'objectif $\times 640$ pour le mitotique index et l'objectif $\times 960$ pour les aberrations chromosomiques. Pour le MI, les différentes étapes de mitose ont été comptées dans un total de 5000 cellules (1000 cellules / lame) et exprimées en pourcentage. Pour les aberrations chromosomiques, 100 cellules par lame étaient examinées.

3.5. L'analyse statistique

Les données du IM, les phases de la mitose, exprimée en pourcentage, et les niveaux de signification dans les différents groupes de traitement ont été analysés. Les tests de comparaisons multiples de Duncan ont été effectués en utilisant une analyse unidirectionnelle de variance (Anova) sur la version SPSS 15.0 for Windows.

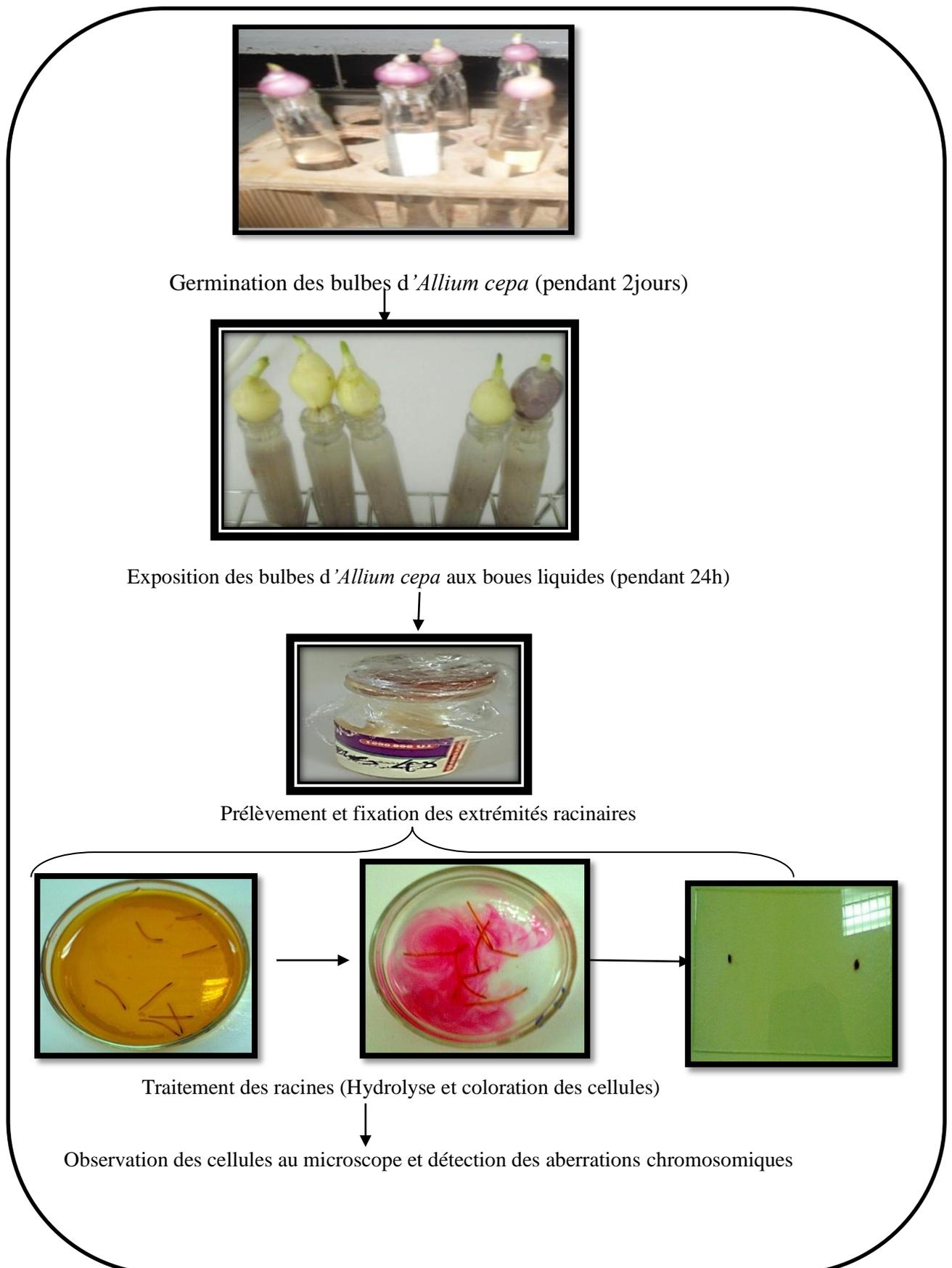


Figure 16 : Les étapes du test des AC dans les racines d'*Allium cepa*.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats des analyses bactériologiques

Les résultats obtenus des analyses bactériologiques des boues liquides et sèches prélevées sont présentés dans le tableau V et dans les histogrammes ci-dessous.

Tableau V : Résultats des analyses bactériologiques des boues étudiées.

Types de recherche		La moyenne du nombre bactérien en UFC/g de boue	
		Boues liquides	Boues sèches
Germes totaux	à 37°C	233500	215500
	à 22°C	18500	136000
Coliformes totaux		112666,67	803333,3
Coliformes fécaux		163333,33	493333,33
Streptocoques fécaux		273333,33	2000000
Entérobactéries		54500	57333,33
Salmonelles		1490	1243,33
Anaérobies sulfito-réducteurs		14,33	36,33
Staphylocoques		166,33	179,33
Levure		40500	416,66
Streptomyces		81000	600

1.1. Germes totaux

L'histogramme ci-dessous (Fig. 17) représente les résultats du dénombrement des germes totaux à 37 °C et à 22°C.

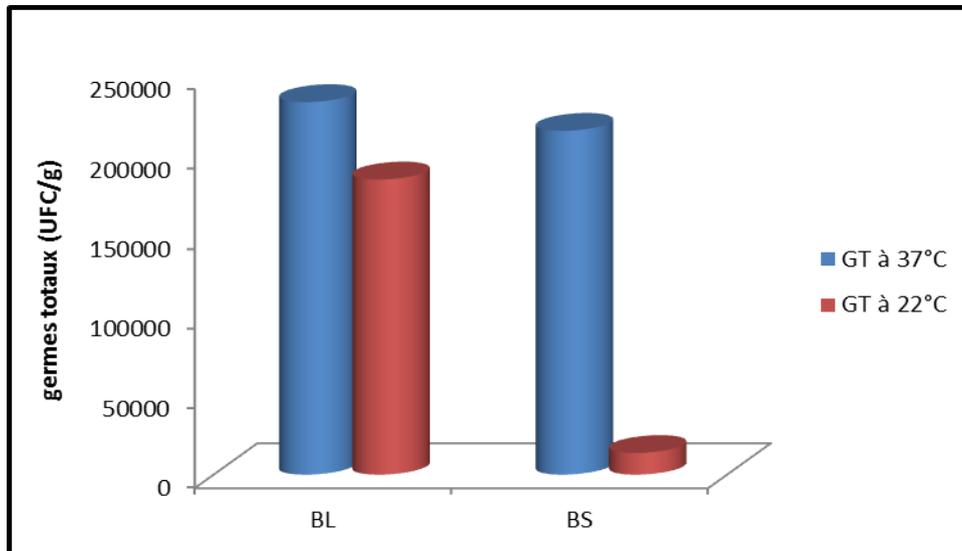


Figure 17 : Représentation graphique des germes totaux.

La flore mésophile totale sur milieu TGEA a montré l'impossibilité de la lecture dans les premières dilutions (10^{-1} et 10^{-2}) et la possibilité de la lecture sur la dilution (10^{-3}). D'après le graphe et le tableau, on observe une forte charge des germes totaux dans les boues liquides et sèches. On note que la charge microbienne diminue de 7 % dans les boues sèches, ceci peut être expliqué par la sensibilité de ces germes aux conditions environnementales en dehors du tractus digestif de leur hôte et leur nombre décroît lors de l'exposition à la lumière dans les lits de séchage ceci est en conformité avec les travaux d'Iddou et Ouali, (2005) et les travaux de Jacob *et al.*, (2002).

1.2. Recherche et dénombrement des indicateurs de contamination fécale

Les indicateurs de contamination fécale regroupent les coliformes et les streptocoques qui montrent une même cinétique de croissance dans les boues :

1.2.1. Coliformes totaux et fécaux

Les résultats du dénombrement des coliformes totaux et fécaux sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Fig. 18).

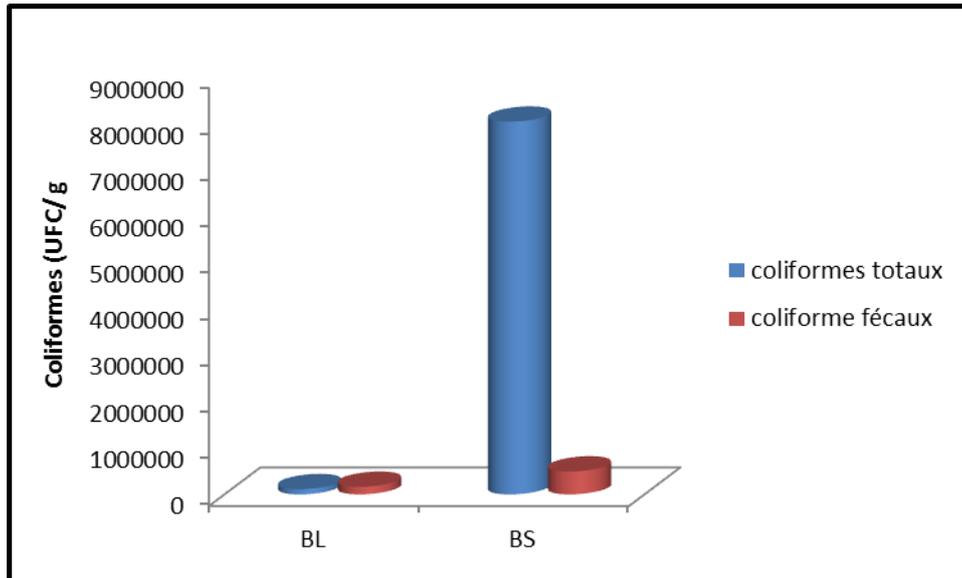


Figure 18 : Représentation graphique des coliformes totaux et fécaux.

Les coliformes sont des bactéries habituelles du tube digestif de l'Homme et des animaux. Sa détection dans l'eau et dans les boues doit faire sérieusement soupçonner une contamination d'origine fécale (John et Donald, 2010).

D'après le tableau et le graphe (Fig. 18), Les boues sont fortement chargées en coliformes totaux et fécaux, ce qui signifie que ces boues sont issues des eaux usées très chargées par les excréments humains. La composition des boues produites dépend du traitement des eaux usées (Vasseur *et al.*, 1994). La forte charge des coliformes dans les boues sèches peut être due à l'alimentation de celles-ci par des boues fraîches lors du traitement d'épuration (Marc, 1997) ainsi que par la richesse de ces boues en matière organique (Marc, 1997), ce qui favorise le développement de ces germes de plus l'augmentation de la température dans les lits de séchage par rapport aux conditions des bassins de traitement et la réduction de la quantité d'oxygène, les travaux de Jacob *et al.*, (2002) ont montré que durant les premières semaines de stockage des boues, une activité microbienne a été observée en raison de la température modérée.

1.2.2. Streptocoques fécaux

Les résultats du dénombrement des Streptocoques fécaux sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Fig. 19).

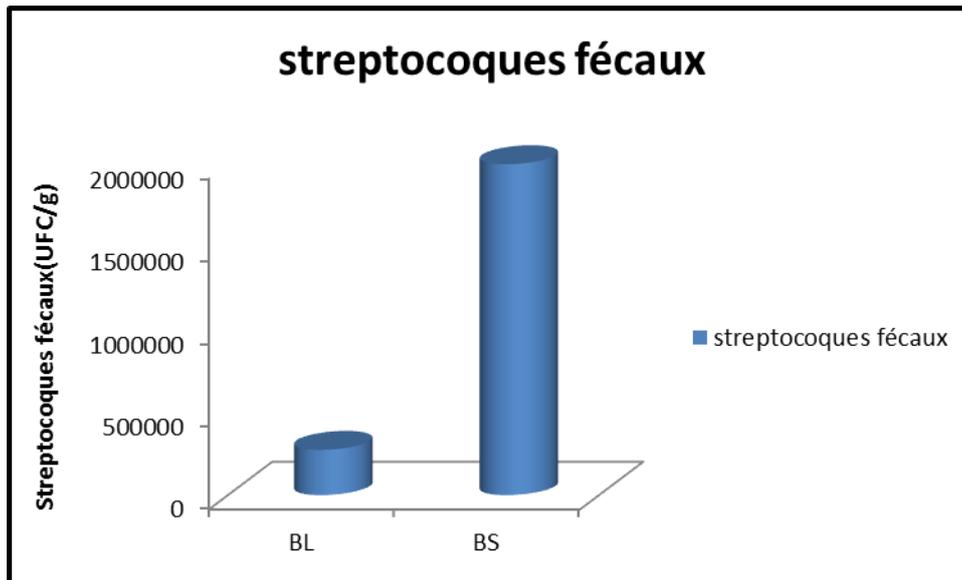


Figure 19 : Représentation graphique des streptocoques.

La présence des streptocoques fécaux est liée à la quantité et la concentration de la matière organique fécale, ce sont des indicateurs d'une contamination ancienne. D'après le graphe (fig. 19) on observe la présence des streptocoques dans les boues sèches et les boues liquides ce qui traduit la résistance des streptocoques dans le milieu aquatique contenant des rejets des eaux usées. Ces germes sont associés aux coliformes fécaux, ils sont considérés comme un bon indicateur de pollution, aussi utilisés comme indicateurs d'efficacité du traitement, car ils sont nettement plus résistants que les coliformes et autres entérobactéries pathogènes (Leyral *et al.*, 2002).

1.3. Le dénombrement des autres entérobactéries

Les résultats du dénombrement des entérobactéries sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Fig. 20).

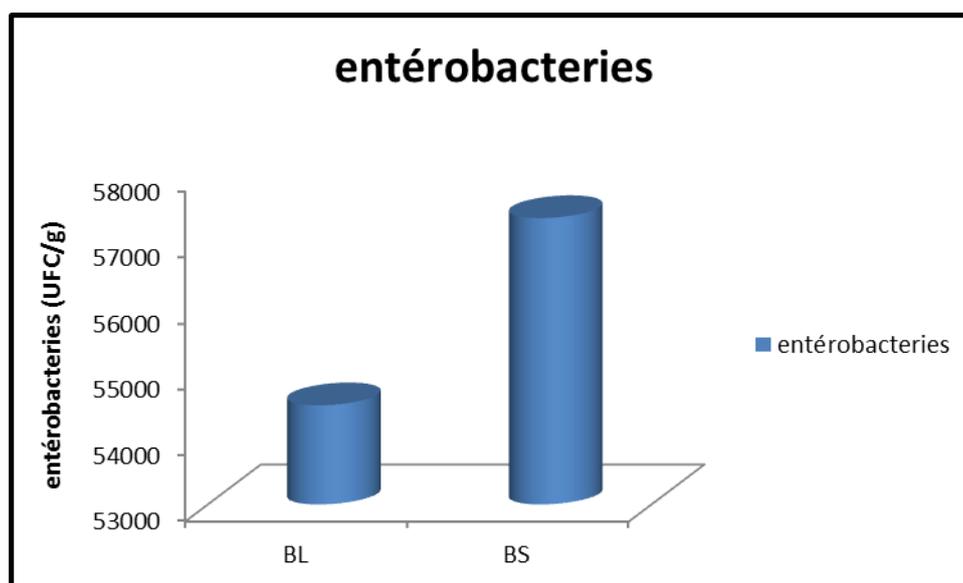


Figure 20 : Représentation graphique des entérobactéries.

D'après le graphe (Fig. 20) et le tableau, on observe que les boues liquides et sèches sont fortement chargées en différentes espèces de la famille des entérobactéries, cette charge est issue des eaux usées qui sont traitées dans la station d'épuration (Filiz et Celai, 1999). Les travaux de Pourcher *et al.*, (2005) ont montré que les enterobactérieies sont des indicateurs de l'efficacité du traitement et qu'ils ont la même cinétique de croissance d'*Escherichia coli* dans les boues ce qui concorde bien avec nos résultats.

1.4. Les bactéries pathogènes

De nombreuses bactéries pathogènes ont été répertoriées dans les boues issues des eaux usées dont la concentration est en fonction de leur affinité pour les fractions solides des boues parmi lesquelles :

1.4.1. Les Salmonelles

Les résultats du dénombrement des Salmonelles sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Fig. 21).

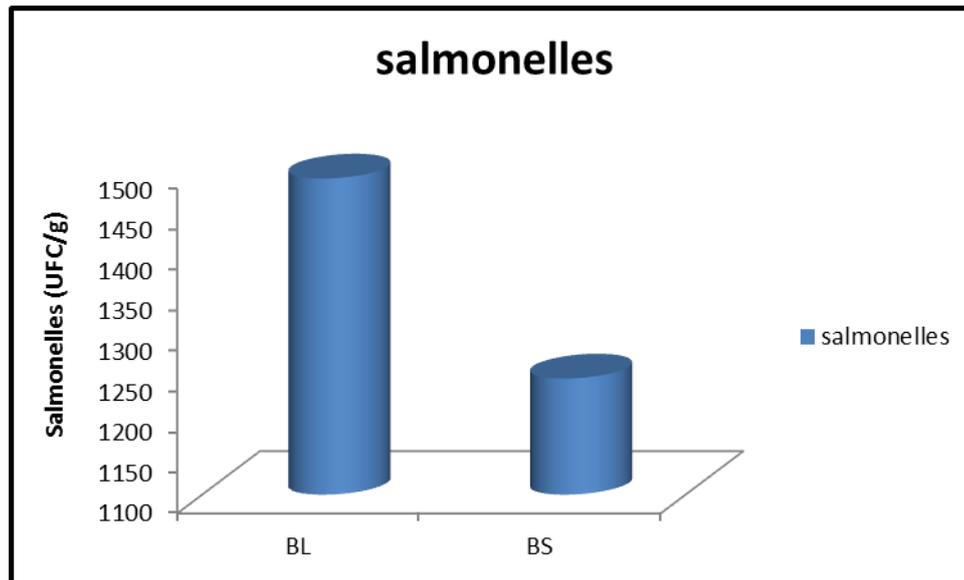


Figure 21 : Représentation graphique des salmonelles .

La charge en agents pathogènes dépend des concentrations initiales dans les eaux usées, de la survie, de la croissance pendant les traitements, de l'association des agents avec la boue, du temps de séjour des boues et de la technique d'extraction des pathogènes des boues utilisées (jacob *et al.*, 2002).

Les Salmonelles sont des entérobactéries, qui sont des bacilles à Gram négatifs dont la plupart sont mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriche. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives (Nauciel, 2000). Selon l'OMS, la salmonelle provoque la salmonellose qui est l'une des toxi-infections alimentaires les plus courantes et les plus répandues. Elle représente une charge importante pour la santé publique et un coût considérable pour la société de nombreux pays. Chaque année des millions de cas sont signalés partout dans le monde, entraînant des milliers de décès.

Les études de Sahlstrom *et al.*, (2004) ont montré que *Salmonella* est habituellement présente dans les boues d'épuration. Les souches de *Salmonella* isolées à partir des humains sont indissociables des souches de *Salmonella* isolées à partir des BSE (boues de station d'épuration) et qu'elles pourraient survivre après traitement, y compris les digestions anaérobies mésophiles (environ 35°C) dans les stations d'épuration (Sahlstrom *et al.*, 2006). Bien qu'un temps de survie faible d'un mois a été rapporté dans les boues appliquées à la terre, les salmonelles peuvent survivre jusqu'à 3 mois dans les boues stockées (Nicholson *et al.*, 2005). Et un maintien de certains facteurs de virulence a également été signalé (Cappelier *et al.*, 1998). Le traitement effectué aux boues est très limitant quand à l'élimination des germes pathogènes principalement les salmonelles

quimontrent une résistance au temps de séchage, à la durée de stockage et aux faibles températures (Feix et Wiart, 1997; Pourcher *et al.*, 2005 ; Pourcher *et al.*, 2008).

1.4.2. Les anaérobies sulfito-réducteurs

Les résultats du dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Fig. 22).

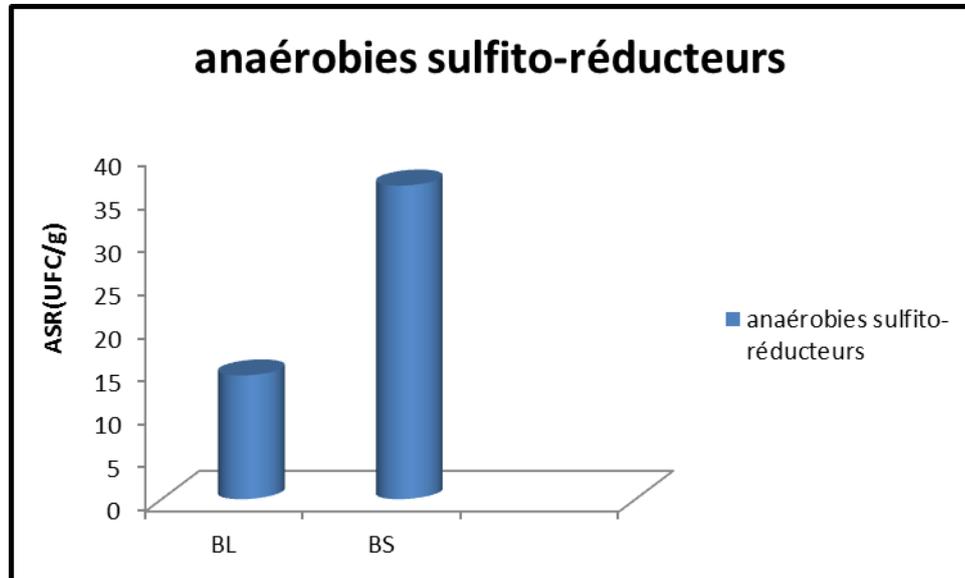


Figure 22 : Représentation graphique des anaérobies sulfito-réducteurs.

Les Clostridium sulfito-réducteurs sont des germes capables de sporuler et de se maintenir longtemps dans l'eau. Ils sont donc les témoins d'une pollution ancienne. Plus difficilement tués que les coliformes par les désinfectants (Georges et Pierre, 2002). D'après les résultats obtenus, on observe la présence des germes anaérobissulfito-réducteurs dans les boues sèches et liquides.

On déduit que la diminution du nombre des ASR dans les boues liquides est relative au système d'oxygénation qui est un inhibiteur pour ces germes (Pourcher *et al.*, 2005).

1.5. Résultats du dénombrement des staphylocoques

Les résultats du dénombrement des staphylocoques sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Fig. 23).

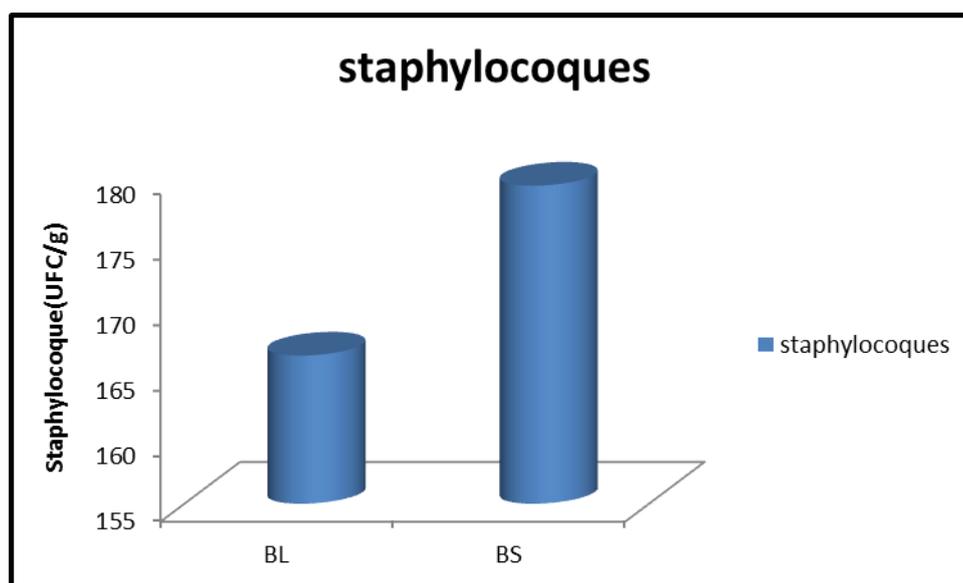


Figure 23 : Représentation graphique des staphylocoques.

D'après le graphe, on observe une présence de ces germes dans les boues liquides et sèches. La présence des staphylocoques dans les boues est due à la présence de ceux-ci dans les rejets des eaux usées (déchets humains, salive, crachat et sécrétions nasales...etc.) (Marc, 1997). La présence des staphylocoques est un signe du risque sanitaire pour l'amendement des boues (Jacob *et al.*, 2002), la présence de ces bactéries nous donne une idée importante sur l'efficacité du traitement.

1.5.1. Résultats d'identification des staphylocoques

Les tests catalase, étude de mobilité et coagulase, nous ont permis d'identifier l'espèce *Staphylococcus aureus* dans les boues liquides et l'espèce *Staphylococcus epidermidis* dans les boues sèches. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VI : Résultats d'identification des Staphylocoques.

Caractères	Boues sèches	Boues liquides
Mannitol /mobilité	+/-	+/-
Catalase	+	+
Staphylocoagulase	+	-
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

1.6. Résultats du dénombrement des levures et streptomycètes

Les résultats du dénombrement des levures et streptomycètes sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (Fig. 24).

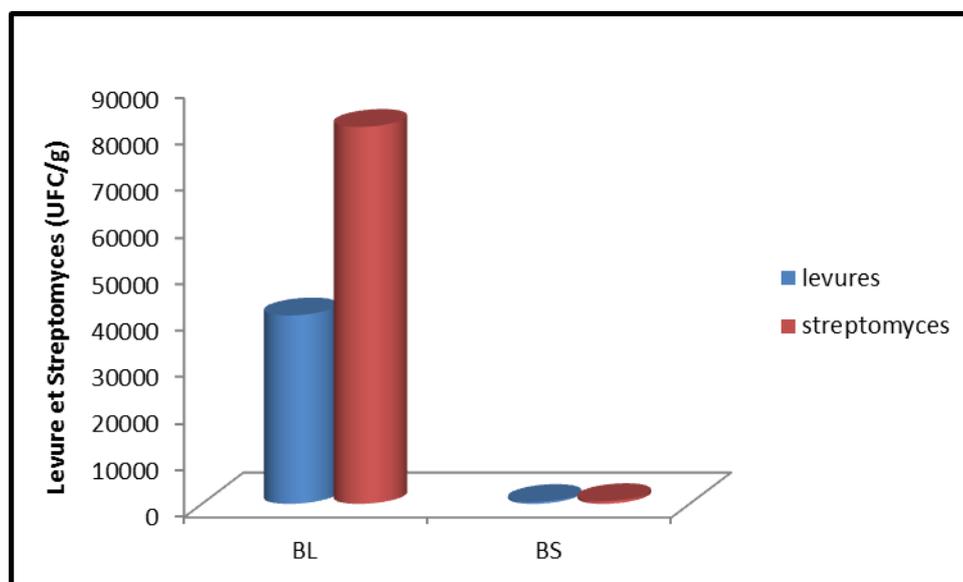


Figure 24 : Représentation graphique des levures et streptomycètes.

On observe une forte charge des levures et des streptomycètes qui représentent les microorganismes de base du traitement par boues activées (Feix et Wiart, 1997) dans les boues liquides. La diminution de cette charge dans la boue solide est le résultat du séchage et des conditions environnementales complètement différentes de celle du bassin d'aération (forte concentration en oxygène) en plus de la source de nutriments qu'elle représente, la matière organique des boues est favorable aux microorganismes pathogènes. L'activité biologique du milieu diminue la résistance des microorganismes par compétition pour les nutriments (Jacob *et al.*, 2002).

Tableau VII : Résultats d'identification des levures

Espèce identifiée	Test blastèse
<i>Condida</i>	Négatif

1.7. Identification des espèces bactériennes

1.7.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram

Les colonies qui ont poussé sur les milieux de culture utilisés sont soumises à une observation macroscopique afin de déterminer la taille, la forme et la couleur etc... Puis à une observation microscopique après coloration de Gram. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau et (fig. 25), (fig. 26) suivant :

Tableau VIII : Caractères morphologiques et coloration de Gram.

Milieux de culture	Observation macroscopique	Observation microscopique
 <p>Chapman</p>	<p>-Colonies petites et moyennes, plus au moins plates, lisses, opaques, crémeuses, à contour régulier, de couleur blanche et jaune.</p>	<p>Cocci à Gram (+), groupés en amas.</p>
 <p>Hektoèn</p>	<p>-Petites colonies bombées à contour régulier, soit pigmenté en :</p> <ul style="list-style-type: none"> -vert ou bleu vert pour les germes lactose négatif. - jaunes quand le lactose est positif. 	<p>-Bacilles isolés, Gram négatif.</p>
 <p>Citrimide</p>	<p>-Colonies moyennes, lisses et de couleur verte.</p>	<p>-Bacilles isolés, Gram négatif.</p>

 <p style="text-align: center;">GNAB</p>	<p>-Colonies petites et moyennes, plus au moins plates, lisses, à contour régulier.</p>	<p>-Bacilles isolés, Gram négatif</p>
 <p style="text-align: center;">Sabouraud</p>	<p>-Colonies circulaires, bombées et blanchâtres.</p>	<p>- Pour les levures : Des cocci ovoïdes plus volumineux que les bactéries, de couleur bleue. - Des langues hyphes roses pour les champignons.</p>
 <p style="text-align: center;">CM</p>	<p>-Petites colonies lisses, bombées, à contour régulier, circulaires et de couleur blanche.</p>	<p>-Bacilles isolés à Gram positif, nitrate reductase positif .</p>

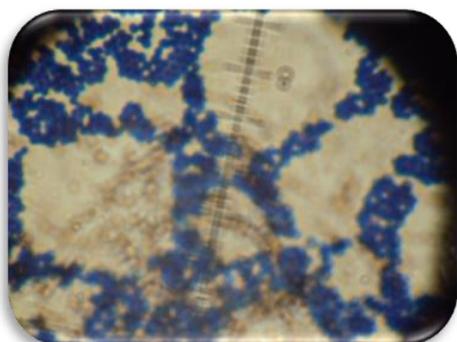


Figure 25 : Cocci Gram (+)

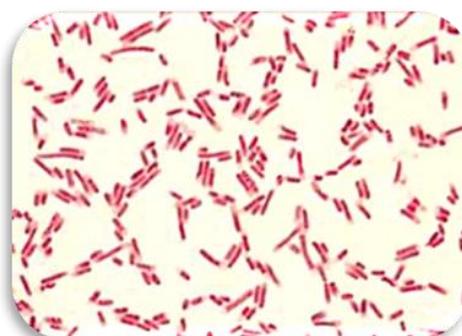


Figure 26 : Bacille Gram (-)

1.7.2. L'identification biochimique des bactéries

L'utilisation des galeries biochimiques Api 20E et Api 20NE, nous a permis d'identifier les espèces suivantes : *Salmonella Spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola*, *Klebsiella oxytoca*.

Ces germes sont pathogènes (Feix et Wiart, 1997) et représentent un risque majeure de santé publique lors de l'utilisation de ces boues pour une valorisation agricole ainsi que pour le personnel de la station de traitement des eaux usée (Altemeyer *et al.*, 1990).

Les profils biochimiques de ces espèces sont présentés dans les figures suivantes :



Figure 27 : profile biochimique de *Salmonella Spp.*

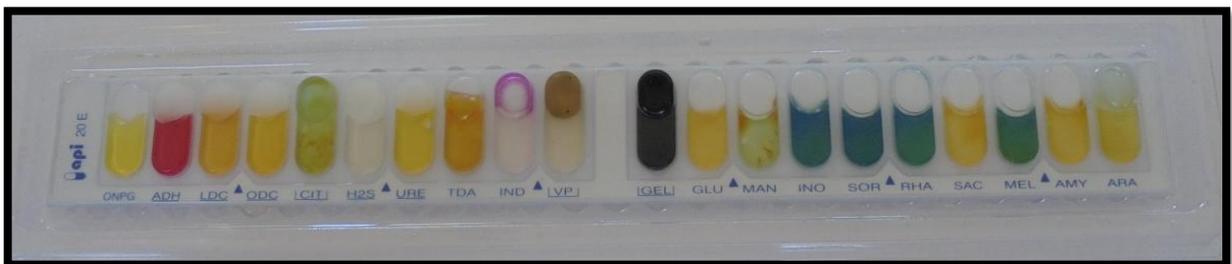


Figure 28 : profile biochimique d'*Aeromonas hydrophila.*



Figure 29 : profile biochimique de *vibrio parahaemolyticus.*



Figure 30 : profile biochimique de *Pseudomonas aeruginosa.*



Figure 31: profile biochimique de *Pseudomonas luteola*.



Figure 32 : profile biochimique de *Klebsiella oxytoca*.

2. Résultats du test d'*Allium cepa*

Les résultats du test d'*Allium cepa* sont présentés dans les tableaux (XI et X). La caractérisation de la cytotoxicité et de la génotoxicité des boues liquides prélevées a été surveillée par l'analyse de l'indice mitotique et par la fréquence des aberrations chromosomiques respectivement.

Une diminution significative dans l'indice mitotique (IM) a été enregistrée pour les boues testées ($18,35 \pm 1,39$) et ceci par rapport au IM du contrôle négatif ($31,92 \pm 3,13$). Le niveau de la cytoxicité peut être déterminé par la diminution ou l'augmentation de l'IM. Dans notre travail, la diminution du IM indique que la croissance et le développement des organismes exposés ont été affectés par les composés des boues liquides (Recep *et al.*, 2010). Les valeurs du pourcentage des phases mitotiques du contrôle négatif étaient ($82,65 \pm 2\%$) pour la prophase, ($5,51 \pm 1,5\%$) pour la métaphase, ($6,39 \pm 1,85b$) pour l'anaphase et ($5,45 \pm 1,48\%$) pour la télophase. Une diminution significative dans le pourcentage de la prophase a été observée ainsi que dans le pourcentage de l'anaphase. Une augmentation dans le pourcentage de la télophase a été enregistrée ainsi que pour la métaphase.

La diminution significative de l'activité mitotique indique un effet mito-dépressif de micropolluants des boues, pourrait interférer avec le développement normal de la mitose,

ce qui empêche un certain nombre de cellules de pénétrer dans la prophase et en bloquant le cycle de la mitose durant l'interphase (Yıldız *et al.*, 2009) et ceci a été détecté dans notre étude par la diminution du pourcentage de la prophase.

Les échantillons des boues liquides testées causent un changement dans la fréquence des aberrations chromosomiques par rapport à celles du contrôle négatif notamment pour l'anomalie (chromosome retardataire). Une augmentation dans la fréquence des aberrations chromosomique a été observé dans les racines traitées par les boues testées ($5,2\pm 0,44$) et ceci en comparant avec le contrôle négatif ($4,6\pm 1,1$), elle reste inférieure à celle du contrôle positif ($8\pm 1,41$) mais cette différence n'est pas statistiquement significative donc on peut dire que les boues de la station de traitement des eaux usées urbaines ne présente pas d'effet génotoxique, ce résultat concorde aux travaux de Sliva *et al.*, (2012) qui ont montré l'absence d'effet génotoxique ou carcinogène de boues résiduaire examinées par des tests eucaryotes *in vivo*. D'autres travaux sur végétaux supérieurs, Mielli *et al.*, (2008), ont montré un effet génotoxique sur les cellules de *Tradescantia pallida* (test Trad-MN) mais sans relation dose réponse, ce qui met en question le potentiel génotoxique.

Dans notre travail, Les boues liquides testées possèdent un effet cytotoxique par la diminution de l'IM mais sans aucun effet génotoxique significatif par le test d'*Allium cepa* sur les extrémités racinaires.

Tableau XI : Effets des boues liquides sur l'indice mitotique et les phases de mitose dans les racines d'*Allium cepa*

Traitement	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	NCC	IM \pm DS	Phases mitotiques (%) \pm standard deviation			
				Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase
Contrôle	-	5152	$31.92\pm 3.a$	$82.65\pm 2.a$	$5.51\pm 1.5a$	$6.39\pm 1.85b$	$5.45\pm 1.48a$
MMS	10	5165	$7.37\pm 07b$	$60.8\pm 2.b$	$11.81\pm 1.b$	$8.89\pm 2.93b$	$18.5\pm 2.58b$
Boues		5210	$18.35\pm 1.c$	$71.55\pm 3c$	$6.63\pm 1.5a$	$3.5\pm 1.93a$	$18.32\pm 2.2b$

a, b, c : les mêmes lettres indiquent qu'il n'y a pas de différence significative.

NCC : nombre de cellules comptées.

Tableau X : Pourcentage des anomalies chromosomiques des boues liquides dans les racines d'*Allium cepa*

Traitement	Doses (µg/ml)	Anomalies dans l'Anaphase-Telophase					
		NCC	PAT	V	C	P	TA± DS*
Controle	-	500	1.2	0.4	1	2	4.6±1.14a
MMS	10	500	4.2	0.8	0.8	2.2	8±1.41b
Boues		500	1.8	1.4	0.8	1.2	5.2±0.44a

a, b, c : les mêmes lettres indiquent qu'il n'y a pas de différence significative.

NCC : nombre de cellules comptées, **PAT** : Perturbation d'anaphase- télophage.

V : chromosome Vagabond, **C** : Condensation des chromosomes, **P** : Pont chromosomique.

CONCLUSION

Conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié la qualité bactériologique et génotoxique des boues de la station d'épuration de la ville de Guelma. L'analyse bactériologique a porté principalement sur le dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale à savoir les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et la recherche de bactéries pathogènes à savoir les staphylocoques, les Salmonelles et les *Clostridium* sulfite-réducteurs.

Les tests d'identification des bactéries isolées ont permis d'identifier les espèces suivantes : *Salmonella Spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola*, *Klebsiella oxytoca*, *Candida albicans*.

L'étude microbiologique des boues liquides et solides nous indique l'inefficacité du traitement effectué au niveau de la STEP Guelma, seulement par lit de séchage. Ce traitement conduit à l'augmentation de la flore contaminante (indicateurs de contamination fécale) et les bactéries pathogènes en dépit de la flore saprophyte (spécialement les Streptomyces) grâce à la température ambiante aux lits de séchage et aux conditions statiques en plus de la présence de charge organique importante dans les boues. De ce fait on peut proposer à la STEP de changer le traitement actuel par un traitement à température plus élevée, d'augmenter la durée de stockage des boues (plus d'un mois) pour inactiver les germes pathogènes telles que les Salmonelles ou de faire l'amendement direct des boues issues des bassins d'aération qui sont plus riches en microorganismes saprophytes.

Concernant, les résultats du test de génotoxité (*Allium cepa*) des boues testées ont montré un effet cytotoxique par la diminution dans l'IM mais non aucun effet génotoxique significatif. Ce résultat est autant important comme ces boues sont destinées à une valorisation agricole sur des végétations et des sols.

À partir de ce travail, il sera intéressant d'envisager d'autres travaux de recherche qui viseront la recherche et l'identification des substances génotoxiques et des bactéries présentes dans ces boues avec des méthodes plus performantes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Altmeyer A., Abadia G., Schmitt S., leprince A., (1990). Risques microbiologiques et travail dans les stations d'épuration des eaux usées. *Midico technique*, 374-384.
2. Amir S., (2005). Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse, 312p.
3. Ana M., Marcus E. M. M., Armen N., Paulo H. N.S., Gisela A. U., (2008). Evaluation of the genotoxicity oftreated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research*, 672, 14-20.
4. Aouadi H., Bensouilh M., Douakha R., (2007). Le procédé de traitement biologique par boues activée. Mémoire de fin détude. Université 08 mai 1945, Guelma, 50p.
5. Attab S., (2011). Amélioration de la qualité microbiologique des eaux epurees par boues activees de la station d'epuration haoud berkaoui par l'utilisation d'un filtre a sable local. Mémoire de magister de l'universite Kasdi Merbah-Ouargla, 152p.
6. Baudez, (2003). Rhéologie et physico-chimie des boues résiduares pâteuses pour l'étude du stockage et d'épandage. Thèse doctorat. Spécialité : science de l'environnement. Paris. 250p.
7. Bouchaala L., (2010). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'Oued-Zénati(Guelma). Mémoire de magister. Université 8 Mai 1945 de Guelma, 135p.
8. Bouziani M., (2000). « L'eau de la pénurie l'eau de la pénurie aux maladies ». Edition Ibn - khaldoun, Oran, Algérie, 247p.
9. Canler P., Perret M., (2013). La réduction de boues par voie biologique par le procédé MycET : Document de Synthèse, Centre de Lyon. 51p.
10. Cappelier J.M., et Federighi M., (1998). Viable but non culturable state in bacteria. *Science et Technique*, 5 : 110-118.
11. Chibani S., (2010). Analyse physico- chimique et rhéologique des boues d'épuration des eaux usées de la ville de Guelma. Mémoire de magister. Université 08 mai 1945 Guelma, 121p.
12. Cotelle S., (1999). Etude de la génotoxiques de matrice coplexe à l'aide de plante supérieurs. Thèse de doctorat. Université Ecotoxicologie, Biodivcersité et Santé environnementale, 257p.

13. Daloz A., (2007). L'épuration des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes. Mémoire de fin d'étude. Ecole Nationale Supérieure d'Architecture de Lyon, 26p.
14. Darolles C., (2010). Discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'uranium: définition de marqueurs biologiques pour l'évaluation des risques professionnels dans l'industrie du nucléaire. Thèse de doctorat. Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, 459p.
15. Delarras C., Trebaol B., (2003). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux: Réglementation - prélèvements - analyses. TEC & DOC, 269p.
16. Elarfi A., (2009). Contribution à l'étude de la pollution des eaux de bassin de la Seybouse : cas des rejets industriels de l'unité de merbre et du carrelage. Suivi de la qualité physico-chimique et bactériologique. Mémoire de magister. Université 8 Mai 1945 de Guelma, 135p.
17. Feix I., Wiart J., (1998). Connaissance et maîtrise des aspects sanitaires de l'épandage des boues d'épuration des collectivités locales, 67p.
18. Filiz B. Dilek, Celai F. Gökçay, (1996). Microbiology of activated sludge treating waste water containing Ni (II) and Cr (VI). Water Science and Technology, vol 34, 183-191.
19. Foltete A., (2010). Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine – Metz , 245p.
20. Gamarsani M., (1981). Utilisation agricole des boues d'origine urbaines réalisées. Editeur ministère de l'agriculture, Maison énergie, 119p.
21. Georges T., Pierre J., (2002). L'eau, patrimoine mondial commun, Belgique, presses Universitaires de Namur, 303p.
22. Guenifi A., Guemihi, (2008). L'identification des microorganismes (streptomyces). Mémoire de fin d'études. Université de Guelma, 45p.
23. Guide, (2010). Procédé extensifs d'épuration des eaux usées Luxembourg: Office des publications officielles des communautés européennes, 44p.
24. Guide, (2007) Contrôle et suivi de la qualité des eaux usées protocole de détermination des paramètres physico-chimique et bactériologique, 52p.
25. Guide, (2007). Base scientifique de l'évaluation des risques sanitaires relative aux agents pathogènes, 172p.

26. Iddou A., Ouali M., (2005). Étude de l'élimination de Cr (VI) par une boue biologique après épandage. *Water Qual. Res*, Vol 40,184-190.
27. Jacob B., Korsak N., Grooven B., Flament E., Daube G., (2002). Incidence d'une station d'épuration biologique sur le niveau de contamination en salmonelles des eaux et des boues résiduaires. *Méd.Vét*, 146, 303-310.
28. Joffin J., Leyrol G., (2001). *Microbiologie technique 1: dictionnaire des techniques*, 3^{ème} édition .CRDP d'aquitaine, 320p.
29. Karaali R., Khettal M., Reggam R., (2008). Etude comparative de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux usées avant et après épuration :cas de la station d'épuration de la ville de Guelma (Nord-est Algérien). Mémoire d'ingénieur. Université 8 Mai de Guelma, 110p.
30. Khanna N., Sharma S., (2013). *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration, *Indian J. Pharm. Biol. Res*, Vol.1(3),105-119. ISSN : 320-9267.
31. King S., Metzger W., (1986). A New Plating Medium for the Isolation of Enteric Pathogens: I. Hektoen Enteric Agar. *Applied and Environmental Microbiology*, 577-578.
32. Koller M., (2009). *Traitement des pollutions industrielles*, 2^{ème} édition. Dunod 566 p.
33. Lebres E., (2002). *Manuel des travaux pratiques : analyse des eaux*. Institut Pasteur d'Algérie. 60 p.
34. Lebres E., (2005). *Manuel des travaux pratiques : analyse des eaux*. Institut Pasteur d'Algérie. 60 p.
35. Lebres E., (2006). *Cours D'hygiène et De Microbiologie Des Eaux (Manuel De Travaux Pratiques Des Eaux)*. Institut Pasteur d'Algérie. 60p.
36. Leme D., Aparecida M., Marin-Morales M., (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutation Research*, 682 71–81.
37. Leyral G, Ronnefoy C, Guillet. F., (2002). *Microbiologie et qualité des industries Agroalimentaire*, Paris, 245p.
38. Madigan M., Martink J., (2007). *Brock - biologie des micro-organismes : « traitement des eaux usées et purification de l'eau, maladie microbienne d'origine hydrique »*, 11^{ème} Edition, Pearson éducation France, Paris, 1088p.
39. Marc St M., (1997). Impacts des boues d'épuration sur la microflore des sols, développement d'une méthode de détection microbienne pour des échantillons de sol et différenciation des espèces streptomyces ca wscabies et strlfptomycs scabies. Mémoire de l'université de Sherbrooke, 184p.

40. Marsault F., Naylor B., Reigue A., (2013). Traitement et valorisation des eaux usées : l'exemple de la station de lagunage de Rochefort, 12p.
41. Mechai A., (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, 160 p.
42. Monod J., (1989). Mémento technique de l'eau, 9^{ème} édition .T2 Dégémont.france. 1458p.
43. Morakchi H., (2002). Caractéristique physico-chimique et bactériologique des eaux usées d'Ouargla avec un essai d'épuration biologique en vue de leur utilisation en irrigation. Mémoire de magister. Université Badji Mokhtar , Annaba, 189 p.
44. Moulins., Rozen d., Milena S., (2013). Traitement des eaux usées, 13p
45. Nauciel C., (2000). Bactériologie médicale, Masson, Paris, 275 p.
46. Nicholson FA., Groves SJ., Chambers BJ., (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour. Technol.* 96 : 135-143.
47. Porcher M., Mourned P., Picard F., Billaudel S., Monpoeho S., federighi M ., ferre V moguedet G., (2005). Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture, *Applied Microbiologie*, 99, 528-539.
48. Prnin C., (2003). Épandage des boues d'épuration en milieu sylvo-pastoral. Étude des effets in situ et en mésocosmes sur la mésofaune du sol et décomposition d'une l'itère de chêne liège (*quercus suber L*), 220p.
49. Recep L., Dilek A., Yasin E., Muhsin K., (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and Allium test, *Chemosphere* 80 : 1056–1061
50. Rejesk F., (2002). « Analyse des eaux ; aspects réglementaires et techniques » ; centre régional de documentaires techniques pédagogique d'aquitaine, 358p.
51. Rodier J., (1996). L'analyse De L'eau; eaux naturelles, eaux résiduelles, eaux de mer. 8ème édition. Dunod. 1383 p.
52. Sahlstrom L., Aspa A, Bagge E., Tham MLD., Albihn A., (2004). Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Research*, 38, 1989–1994.
53. Sahlstrom L., de Jong B., Aspan A., (2006). Salmonella isolated in sewage sludge traced back to human cases of salmonellosis. *Letters in Applied Microbiologie*, 46-52. ISSN 0266-8254.

54. Silva P. R. , Luis F. B., Maria L., Zaidan D., Paulo H., Nascimento S.,(2012). Sewage sludge does not induce genotoxicity and carcinogenesis, *Environmental Contamination*, 57-63.
55. Soughir D., (2009). Modification métaboliques, moléculaires et génotoxicité par le cadmium chez *vicia f.* Thèse de doctorat. Université de Carthage, 238p.
56. Tedesco S., Laughinghouse H., (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test, *Environmental Contamination*,138-154. ISBN: 978-953-51-0120-8.
57. Vasseur, L., De coiwinck M., Séguin J., Sgermains., et Anseau C., (1994). The stoper model for ecosystem management at the regional level; a case study on municipal sewage sludge. SherbrookeUniversity, 27 p.
58. Vialaginé R., (2010). Eau, environnement et santé publique introduction à l'hydrologie 3^{ème} édition. Tec et Doc ,213p.
59. Yıldız, M., Hakkı Cigerci, I., Konuk, M., Fatih Fidan, A., & Terzi, H., (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 75, 934–938.

ANNEXES

Annexe I

❖ Matériel utilisé

1. Verrerie :

- ✓ Tube à essai.
- ✓ Béchers.
- ✓ Pipettes graduées.
- ✓ Pipettes Pasteur.
- ✓ Flacons.
- ✓ Lames et lamelle.
- ✓ Boîtes de pétri en verre

2. Appareillage :

- ✓ Étuve.
- ✓ Autoclave.
- ✓ Réfrigérateur.
- ✓ Balance.
- ✓ Bain marie.
- ✓ Four Pasteur.
- ✓ Microscope optique (objectif à immersion).
- ✓ Agitateur et barreau magnétique.

3. Autre matériel :

- ✓ Bec Bunsen.
- ✓ Anse de platine.
- ✓ Boîte de pétri.
- ✓ Portoirs.
- ✓ Micropipettes et cones.
- ✓ Lame gilette.
- ✓ Vernet d'angles.
- ✓ Papier filtre.
- ✓ Pipettes en plastique.

Annexe II

❖ Milieu BCPL (Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol) : S/C Composition pour 1L

Composition pour 1L

✓ Peptone	05,00g
✓ Extrait de viande	03,00g
✓ Lactose	05,00g
✓ Bromocrésol pourpre	0,025g

Préparation :

Dissoudre les composants dans de l'eau distillée, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique puis ajuster Le pH doit être 6.9, stériliser le milieu à l'autoclavage à 120°C pendant 20 min.

❖ Milieu ROTHE : S/C

Composition pour 1L

✓ Peptone	20,00g
✓ Glucose	05,00g
✓ Azide de sodium	00,20 g
✓ Chlorure de sodium	05,00g
✓ Phosphate bipotassique	02,70g
✓ Phosphate mono potassium	02,70 g

Préparation :

Dissoudre les composants dans de l'eau distillée, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique puis ajuster Le pH doit être 6.8 à 7, stériliser le milieu à l'autoclavage à 120°C pendant 20 min.

❖ La solution HCl (1N) à 8%

Préparation :

8ml d'HCl + 92 ml d'eau distillé dans un flacon stérile.

❖ La solution d'Acide Acétique Glacial à 45%:

Préparation:

Mélanger 45 ml d'acide acétique glacial + 55 ml d'eau distillée dans un flacon stérile.

❖ **fixative de Carnoy**

Utilisé dans le test *Allium*

1 volume de l'acide acétique glacial + 3 volumes d'éthanol 100% : mixer et conserver à 4°.

❖ **colorant Feulgen**

Utilisé dans le test *Allium*

Ajouter à **0,25 g de Fushine basique** 50 ml d'eau distillée bouillante (100°), attendre 10 minutes jusqu'à ce que le mélange atteint une température de 50° puis ajouter 5 ml d'une solution **1N d'HCl** et mixer puis ajouter **0,5 g de métrasulfite de Potassium K₂S₂O₅**, couvrir la solution par papier aluminium et la conservée à 4°C. Après 24h la solution est filtrée et peut être utilisé.

❖ **Le milieu CM :**

Composition

✓ Glucose	01,00g
✓ Extrait de malt	00.20g
✓ Extrait de levure	01,00g
✓ Agar	04,00g
✓ L'eau distillé	200 ml

Préparation :

Dissoudre les composants dans un flacon contenant 200 ml d'eau distillé, le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant l'addition du glucose et de l'agar puis mélanger les composants. Enfin stérilisé le milieu dans autoclave à 121°C pendant 16min puis coulé dans des boites de pétri.

RÉSUMÉ

Résumé

Les boues sont fortement chargées en polluants et en contaminants divers, ce qui pose le problème de pollution de l'environnement, c'est pour cela qu'il est impératif de protéger ce dernier par le traitement de ces boues. Les résultats des analyses bactériologiques de ces boues nous ont montré une contamination fécale avec une forte concentration en coliformes totaux et fécaux, en streptocoques fécaux et en anaérobies sulfito-réducteurs au niveau des boues solides supérieure à celle dénombrés en boues liquides. Durant cette étude, on a pu également identifier les bactéries *Salmonella Spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas luteola*. Les résultats des analyses génotoxiques ont montré que les boues possèdent un effet cytotoxique par la diminution dans l'IM mais ne montrent aucun effet génotoxique par le test des aberrations chromosomiques sur *Allium cepa*.

Mots clés :

Boues, Station d'épuration, Qualité bactériologique, Indice mitotique, Qualité génotoxique.

Abstract

The sludge is heavily loaded with pollutants and various contaminants, which poses the problem of environmental pollution, which is why it is imperative to protect the latter by treating sludge. The results of bacteriological analyzes of the sludge showed a high concentration of total and fecal coliforms, fecal streptococci and SRA at higher in solid sludge than counted in slurry sludge. During this study, it was also able to identify the bacteria *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas luteola*. The results of the genotoxic analyzes showed that sludges have a cytotoxic effect by the reduction in the MI but show no genotoxic by the chromosomal aberration test on *Allium cepa*.

Keywords :

Sludge, Treatment plant, Bacteriological quality, Mitotic index, Genotoxic quality.

الملخص

تحتوي الحمأة على مختلف عناصر التلوث وهذا يشكل ظاهرة التلوث البيئي، لهذا السبب لا بد من معالجة الحمأة. اظهرت التحاليل البكتريولوجية للحمأة تلوث برازي مع تركيز عال من مجموع القولونيات البرازية و العقديات البرازية و البكتريا اللاهوائية في الحمأة الصلبة اكثر من السائلة. من خلال هذه الدراسة استطعنا تحديد البكتريا التالية : *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas luteola*. اظهرت نتائج التحاليل السمية ان الحمأة لها تأثير على الخلايا و تكاثرها لكن ليس لديها تأثير سمي أي لم تظهر أي سمية جينية من خلال اختبار انحراف الكروموسومات للبصل.

الكلمات الرئيسية :

محطة المعالجة ، الجودة البكتريولوجية، مؤشر الانقسامية، نوعية السمية.