

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun, Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :
M^{elle} FODIL Nouzha

Thème

Caractérisation physico-chimique et microbiologique des boues de la STEP de la ville de Tiaret et essai de leur valorisation en biogaz

Soutenu le 12/07/2021, devant le jury composé de :

Président :	Dr. Fettouhi	M.C.B	Université de Tiaret
Examinatrice :	Dr. Medjber	M.C.B	Université de Tiaret
Encadrant :	Pr. Sassi Mohamed	Prof	Université de Tiaret
Co-encadrant :	Dr. Ali-Nehari Abdelkader	M.C.A	Université de Tiaret

Année Universitaire 2020-2021

Dédicaces

À mes très chers parents,

Aucune expression ne pourrait exprimer mon amour, mon respect et ma gratitude envers l'amour inconditionnel que vous m'avez porté, les encouragements, les aides et les sacrifices que vous m'avez consenti durant toute ma vie.

À mon frère Nadjib et À mes sœurs Sabrina et Inçaf,

Merci d'être la plus belle fratrie que je puisse avoir.

À ma sœur Sabrina,

Merci d'être toujours là pour moi, d'avoir toujours cru en moi, d'avoir fait de moi ta priorité, de m'avoir tant aimé et d'avoir toujours vu en moi quelqu'un de meilleur.

À ma grande famille et à tous mes amis.

Remerciements

Je souhaite adresser mes remerciements à mes encadrants M. Sassi Mohamed et M. Alinehari Abdelkader pour leur confiance, leur disponibilité et leurs aides et conseils précieux durant tout le long de cette étude.

Je tiens à remercier également les techniciens du laboratoire « Sciences et technologie alimentaire » et des laboratoires de « Microbiologie » de la faculté, pour leur grande gentillesse, leur disponibilité et leur sens de l'humeur qui nous allégeait le quotidien.

Je remercie l'équipe de l'ONA Tiaret et spécialement de l'ONA Tissemsilt de nous avoir ouvert les portes de leurs laboratoires qui nous a été d'une grande utilité.

Je remercie Sonelgaz Tiaret et particulièrement Melle Benachour Medahia.

J'adresse mes sincères remerciements et toute ma gratitude à ma sœur Fodil Sabrina pour son aide précieuse.

Je remercie chaleureusement tous mes enseignants et toute l'équipe pédagogique ayant contribué à ma formation.

ملخص :

تتمثل هذه الدراسة في توصيف فيزيائي كيميائي وميكروبيولوجي لحمأة مصالحة صرف المياه الصحي ومحاولة لإنتاج غاز حيوي. تصنف هذه التجربة ضمن مجال الطاقة الحيوية في إطار التثمين الطاقوي للكتلة الحيوية والنفايات العضوية. ومن مزايا الطاقة الحيوية التي هي في حد ذاتها بديل للوقود الأحفوري، حماية البيئة عن طريق تخفيض انبعاثات الغازات المسببة للاحتباس الحراري وتخفيض أحجام الحمأة. ولذلك فإن الهدف من هذا البحث هو إلقاء الضوء من خلال تجربة بيداغوجية على مختلف المعايير الفيزيائية الكيميائية وعلى إحدى من المجموعات البكتيرية المشاركة في عملية الهضم اللاهوائي للحمأة .

تمثلت هذه الدراسة في صنع منظومة للهضم اللاهوائي على مستوى مخبر الكلية. استغرقت عملية الهضم اللاهوائي للحمأة 37 يوما تحت درجة حرارة 35 درجة مئوية. أفضت عملية تتبع المعايير الفيزيائية الكيميائية، بما في ذلك معايير خصائص AGV و TAC لإعطاء دلالة على تطور عملية التخمير وحسن أدائها، نسب تخفيض المواد الجافة و المواد العضوية تفسر هضم المواد العضوية و المواد المعدنية للوسط. ومن ناحية أخرى، أبرز تحديد الخصائص الميكروبيولوجية وجود أربعة أنواع بكتيرية خلال المرحلة الأولى من عملية الهضم اللاهوائي للحمأة. وكننتيجة لهذه التجربة تم إنتاج حجم من الغاز الحيوي القابل للاحتراق بلغ حجمه حوالي 5000 مل.

الكلمات المفتاحية: الحمأة، الغاز الحيوي، الهضم اللاهوائي، الطاقة الحيوية، التثمين الطاقوي

Résumé :

La présente étude est une caractérisation physico-chimique et microbiologique de la boue de la STEP et un essai de production d'un biogaz. Cette expérimentation s'inscrit dans le cadre de la bioénergie. Un des avantages de la bioénergie qui est en soi une alternative aux énergies fossiles la protection de l'environnement par la diminution des GES et du volume des boues.

L'intérêt de ce travail est donc de mettre la lumière par une expérimentation pédagogique sur les différents paramètres physico-chimiques et sur une des flores bactériennes intervenant lors de ce processus biologique qui est la méthanisation.

L'étude a consisté en la fabrication d'un digesteur de type discontinu au niveau du laboratoire pédagogique, la digestion anaérobie des boues a duré 37 jours à une température mésophile de 35°C. Le suivi des paramètres physico-chimiques dont le TAC et les AGV a permis de donner une indication sur l'évolution et le bon fonctionnement du fermenteur, les taux d'abattement des matières organiques et des matières sèches expliquent la dégradation des matières organiques et minérales du milieu. La caractérisation microbiologique a, de son côté, mis en évidence la présence de quartes espèces bactériennes lors de la première étape de la méthanisation. A la fin de cette expérimentation un volume avoisinant les 5000 ml de biogaz a été produit. Ce biogaz contient un composant combustible qui est probablement le biométhane.

Mots clés : Boues, biogaz, digestion anaérobie, méthanisation, bioénergie, biométhane, valorisation énergétique.

Absract:

This study is a physico-chemical and microbiological characterization of the waste water treatment sludge and a biogas production test. This experiment is part of the bioenergy framework. One of the advantages of bioenergy, which is in itself an alternative to fossil fuels, is the protection of the environment through the reduction of GHGs as well as the volume of sludge.

The interest of this dissertation is therefore to shed light through an educational experiment on the different physico-chemical parameters and on one of the bacterial flores involved in this biological process which is methanisation.

The study consisted of the manufacture of a batch-type digester at the educational laboratory level, the anaerobic digestion of the sludge lasted 37 days at a mesophilic temperature of 35°C. Monitoring of physico-chemical parameters including TAC and FOS enabled to give an indication of the evolution and the good functioning of the fermentor, organic and dry matter abatement explain the degradation of organic and mineral matter of the medium. The microbiological characterization, on the other hand, highlighted the presence of four bacterial species during the first stage of methanisation. At the end of this experiment a volume of around 5000ml of biogas was produced. This biogas contains a combustible component which is probably biomethane.

Key words: Sludge, biogas, anaerobic digestion, methanisation, bioenergy, biomethane, energetic valorization.

Liste des abréviations

STEP	:	Station d'épuration des eaux usées
GES	:	Gaz à effet de serre
CDER	:	Centre d'enfouissement technique
CET	:	Centre de développement des énergies renouvelables.
HAP	:	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
PCB	:	Polychlobiphényles
CH₄	:	Méthane
µm	:	Microgramme
CO₂	:	Dioxyde de carbone
H₂	:	Dihydrogène
µmax	:	Taux de croissance maximale
TSH	:	Temps de séjour hydraulique
nm	:	Nanomètre
MV	:	Matières volatils
ppm	:	Partie par million
Kg	:	Kilogramme
m³	:	Mètre cube
gN/l	:	Gramme d'azote par litre
pH	:	Potentiel hydrogène
Pa	:	Pascal
Eh	:	Potentiel d'oxydo-réduction
PO₄⁻³	:	Ion phosphate
H₂S	:	Sulfure d'hydrogène
N₂	:	Diazote
ISDND	:	Installation de stockage de déchets non dangereux
PC	:	Pouvoir calorifique
PCs	:	Pouvoir calorifique supérieur
PCi	:	Pouvoir calorifique inférieur
COVSi	:	Composés organique volatils de silicium
Kw/h	:	Kilowatt par heure
GNV	:	Gaz naturel pour véhicule
GHw	:	Gigawattheure

TWh	:	Tétrawattheure
ONA	:	Office National d'Assainissement
SEAAL	:	Société des Eaux et de l'Assainissement d'Alger
SEOR	:	Société des Eaux et de l'Assainissement d'Oran
DMA	:	Déchets ménagers et assimilés
CW	:	Chemin de Wilaya
H₂SO₄	:	Acide sulfurique
NaOH	:	Hydroxide de sodium
MS	:	Matières sèches
MO	:	Matières organiques
DCO	:	Demande chimique en oxygène
TAC	:	Carbonate de calcium
CaCO	:	Titre alcalimétrique complet
AGV	:	Acide gras volatils
NO₃⁻	:	Ion de nitrates
NH₄⁺	:	Ion d'ammonium
ml	:	Millilitre
EDS	:	Eau distillée stérile
ADN_r	:	Acide désoxyribonucléique ribosomique
VF	:	Gélose Viande-Foie
GN	:	Gélose Nutritive
BP	:	Gélose Baird-Parker
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
CPG	:	Chromatographie à phase gazeuse
HCO₃⁻	:	Ion de bicarbonate
ARN_r PSU	:	Acide ribonucléique ribosomique de la petite sous-unité

Table des Matières

Introduction générale	1
Partie I : Partie bibliographique	
CHAPITRE 01 : LES BOUES RESIDUAIRES	4
1 Boues résiduaires	4
2 Composition des boues	4
2.1 Matières organiques	4
2.2 Minéraux et fertilisants	5
2.3 Micro-organismes	5
CHAPITRE 02 : METHANISATION DES BOUES	
1 Définition de la méthanisation	7
1.1 Etape de l'hydrolyse	7
1.2 Etape de l'acidogénèse	8
1.3 Etape de l'acétogénèse	8
1.4 Etape de la méthanogénèse	9
2 Facteurs et procédés d'amélioration des performances de la digestion anaérobie des boues	9
2.1 Facteurs influençant les performances de la méthanisation des boues	9
2.1.1 Température:.....	9
2.1.2 Temps de séjour hydraulique TSH et la charge organique	10
2.1.3 Composition des boues	10
2.2 Procédés d'amélioration des performances de la méthanisation	11

3	Avantages et inconvénients de la digestion anaérobie	11
3.1.1	Avantages de la méthanisation des boues	11
3.1.2	Inconvénients de la fermentation anaérobie	12

CHAPITRE 03 : BIOGAZ

1	Biométhane	13
2	Biométhane comme énergie de substitution	13
3	Valorisation du biométhane en Algérie	14

Partie II : Partie expérimentale

CHAPITRE 01 : MATERIEL ET METHODES

1	Matériel	16
1.1	Fabrication du digesteur Echantillonnage	17
1.1.1	Elaboration du « digesteur »	17
2	Caractérisation physico-chimique des boues	18
2.1	Méthodes:.....	18
2.1.1	Détermination du potentiel hydrogène	18
2.1.2	Détermination de la matière sèche des boues	18
2.1.3	Détermination de la matière organique	19
2.1.4	Détermination du Titre Alcalimétrique Complet et des Acides gras volatils.....	19
2.1.5	Détermination de la DCO	21
2.1.6	Détermination des nitrates	21
2.1.7	Dosage de l'ammonium	22
3	Caractérisation microbiologique	23
3.1	Méthodes	23

3.1.1	Préparation de l'échantillon	23
3.1.2	Recherche de la flore bactérienne.....	23
3.1.3	Identification microbiologique des bactéries.....	27
3.1.4	Tests des dégradations des différents substrats.....	27
4	Production du biogaz	29
4.1	Identification du biométhane.....	29
4.1.1	Test de la flamme	29
4.1.2	Identification du biométhane à l'aide du détecteur de méthane.....	30
	CHAPITRE 02 : RESULTATS ET DISCUSSIONS	32
1	Caractérisation physico-chimique	32
1.1	Détermination du pH	32
1.2	Détermination de la matière sèche, de l'humidité et de la matière organique	32
1.3	Détermination des TAC	32
1.4	Détermination des AGV	33
1.5	Rapport AGV/TAC	34
1.6	Détermination de la DCO	34
1.7	Détermination des nitrates	35
1.8	Détermination de l'ammonium	35
2	Caractérisation microbiologique	37
2.1	Recherche et identification des différentes espèces bactérienne	37
2.2	Hydrolyse des différents substrats	40
3	Résultat et discussions de la production du biogaz	43
3.1	Variation du pH et évolution de la production du biogaz	43

3.2	Identification du biométhane.....	45
	Conclusion.....	47
	Références bibliographiques.....	49
	Annexes.....	55

Liste des tableaux

Tableau 1	: Liste de quelques espèces présentes dans les boues	06
Tableau 2	: Matériel utilisé lors de l'étude	16
Tableau 3	: Résultats de la détermination de la matière sèche, humidité et de la matière organique	32
Tableau 4	: Résultats de la détermination du TAC	33
Tableau 5	: Résultats de la détermination des AGV	33
Tableau 6	: Résultats de la détermination du rapport AGV/TAC.....	34
Tableau 7	: Résultats de la détermination de la DCO	34
Tableau 8	: Résultats de la détermination des nitrates	35
Tableau 9	: Résultats de la détermination de l'ammonium	35
Tableau 10	: Résultats de l'identification des espèces bactériennes.....	37
Tableau 11	: Variation du pH et évolution de la production du biogaz.....	44
Tableau 12	: Résultats de l'évolution de la production du biogaz.....	45
Tableau 13	: Résultats de l'identification du biométhane	45

Liste des figures

Figure 1 : Modèles de la structure des floccs des boues activées	06
Figure 2 : Digesteur fabriqué au laboratoire.	17
Figure 3 : Photo de la poche destinée à accueillir le biogaz.	17
Figure 4 : Détecteur de méthane	30
Figure 5 : Kits LCK 515 lors du dosage de la DCO.....	36
Figure 6 : Kits LCK 340 lors du dosage des nitrates	36
Figure 7 : Kits LCK 303 lors du dosage de l'ammonium	36
Figure 8 : Boite de pétri contenant des colonies pures de <i>Pseudomonass spp</i> sur milieu King B.....	38
Figure 9 : Boite de pétri contenant des colonies pures de <i>Bacillus spp</i> sur milieu King A.....	38
Figure 10 : Tubes à essai contenant des spores de Clostridium sur milieu VF.	38
Figure 11 : Boite de pétri contenant des colonies pures de <i>Staphylococcus spp</i> sur GN.....	38
Figure 12 : Observation microscopique de <i>Bacillus spp</i> sous l'objectif X100 indiquant les spores en cercles rouges.....	39
Figure 13 : Observation microscopique de <i>Staphylococcus spp</i> sous l'objectif X100	39
Figure 14 : Observation microscopique de <i>Pseudomonas spp</i> sous l'objectif X100..	39
Figure 15 : Boite de pétri contenant <i>Staphylococcus spp</i> sur gélose à l'amidon.....	40
Figure 16 : Boite de pétri contenant <i>Bacillus spp</i> sur gélose à l'amidon.....	41
Figure 17 : Boite de pétri contenant <i>Pseudomonas spp</i> sur gélose à l'amidon.....	41
Figure 18 : Boite de pétri contenant <i>Staphyloccos spp</i> sur gélose au lait écrémé.....	41

Figure 19 : Boite de pétri contenant <i>Bacillus spp</i> sur gélose au lait écrémé indiquant les zones de lyse en cercle rouge.....	41
Figure 20 : Boite de pétri contenant <i>Pseudomonas spp</i> sur gélose au lait écrémé indiquant les zones de lyse en cercle rouge.....	42
Figure 21 : Boite de pétri contenant <i>Bacillus spp</i> sur gélose au jaune d'œuf indiquant les zones de lyse en cercle rouge.....	42
Figure 22 : Boite de pétri contenant <i>Staphylococcus spp</i> sur gélose au jaune d'œuf indiquant les zones de lyse en cercle rouge	42
Figure 23 : Boite de pétri contenant <i>Pseudomonas spp</i> sur gélose au jaune d'œuf	42
Figure 24 : Démonstration graphique de la variation de la valeur du pH en fonction du temps	44
Figure 25 : Detecteur de méthane relié à la poche du biogaz.....	46
Figure 26 : Test de la flamme.....	46
Figure 27 : Poches remplies de biogaz.....	46

Introduction générale

Depuis quelques années, l'Algérie a mis en avant des initiatives en matière de développement durable. Le pays s'est engagé pleinement et activement dans le processus de négociation et dans les différentes consultations et initiatives portant sur les objectifs de développement durable aux niveaux national, régional et international. Il s'est également joint au consensus dégagé pour l'adoption de la plateforme des Objectifs de Développement Durable dégagés dans l'Agenda 2030 pour le développement durable. L'Agenda 2030 vise entre autres la promotion d'une croissance économique durable, la protection de la planète des conséquences du dérèglement climatique et la nécessité de préserver aux générations futures les mêmes opportunités et ressources naturelles qui sont disponibles aujourd'hui (Ministère de l'énergie et des mines, 2019).

De ce fait, le pays, s'est lancé dans la voie des énergies renouvelables en adoptant un programme de développement durable depuis 2011 qui a pour objectif l'installation d'une puissance d'origine renouvelable de l'ordre de 22 000 MW à l'horizon 2030, pour faire face à la problématique de la pollution atmosphérique en se fixant l'objectif de réduction des émissions de CO₂ de 193 millions de tonnes, produites principalement par la transformation des énergies fossiles qui représentent la quasi-totalité de la consommation totale de l'énergie primaire en Algérie (Ministère de l'énergie et des mines, 2019).

En ce qui concerne l'énergie de la biomasse, le programme consiste à atteindre une puissance énergétique de 1000 MW (Ministère de l'énergie et des mines, 2019). Parmi les voies de production énergétique à partir de la biomasse, l'Algérie, dans un essai pilote, s'est récemment intéressée à la production de l'électricité à partir du biogaz au niveau du centre d'enfouissement technique (CET) de Hassi Bounif dans la wilaya d'Oran. En effet, la valorisation du biogaz permet non seulement de s'inscrire dans la démarche de l'efficacité énergétique à travers la production de l'électricité et de la chaleur, mais aussi de réduire les problèmes de pollution.

La production du biogaz à partir des boues des stations d'épuration des eaux usées et des déchets domestiques et agricoles s'avère être une alternative prometteuse depuis le 18^{ème} siècle lors de l'identification par ALESSANDRO VOLTA du méthane dans les gaz des marais. Depuis ce temps-là, les pays développés n'ont cessé d'exploiter les phénomènes de méthanisation, au 19^{ème}

siècle, l'Angleterre (La ville d'Exeter) a élaboré les premiers digesteurs qui utilisent le biogaz comme gaz d'éclairage. Dans les années 1920s, l'Allemagne met au point un système de digestion continu qui permet d'alimenter le réseau de gaz municipal de plusieurs villes. En Algérie, deux installations ont été réalisées au CDER de Bouzaréah en 1986 et en 2001 et depuis, aucun digesteur n'a été développé (Bensmail et Touzi, 2012).

La valorisation énergétique des boues des STEP en biogaz a un fort potentiel écologique que notre pays n'exploite pas à l'heure actuelle, il s'agit de la biométhanisation des boues pour la production d'un biogaz exploitable, ainsi qu'un digestat sous forme de boues stabilisées pouvant servir à l'agriculture, une fois séchée. La méthanisation est une fermentation anaérobie ou plus exactement un processus biochimique très complexe où la matière organique est dégradée par des micro-organismes naturellement présents dans le substrat (Bensmail et Touzi, 2012).

Dans cette étude, nous nous intéressons à ce phénomène complexe de biométhanisation et nous allons tenter à réaliser une caractérisation microbiologique et physico-chimiques des boues et essai de leur valorisation en biogaz” de mettre en lumière ses principes et d'essayer de démontrer le rôle d'une partie de la flore microbienne responsable de ce processus biologique et son impact sur la stabilité physico-chimique des boues, à travers le lancement d'un essai de production de biogaz.

Partie

Bibliographique

CHAPITRE 01 : LES BOUES RESIDUAIRES

1 Les boues résiduelles

Les boues résiduelles sont le produit final de la décantation des eaux usées lors du processus de leur épuration dans les stations d'épuration. Elles se divisent en quatre groupes selon Degremont, (1989).

- **Les boues primaires** : Elles résultent du traitement primaire par simple décantation. Il s'agit de boues fraîches non stabilisées, elles contiennent un taux élevé en matières organiques fortement fermentescibles.
- **Les boues secondaires ou boues activées** : Elles résultent du traitement secondaire par la seconde décantation (clarification), du lit bactérien ou du biofiltre à lit granulaire lors des traitements biologiques des eaux usées. Elles sont caractérisées par la présence d'une biomasse en excès et de matières réfractaires à la dégradation. Ce sont des boues fraîches biologiques, leur pouvoir fermentescible dépend du temps de séjour dans le bassin d'aération communément appelé âge des boues.
- **Les boues mixtes** : Boues très fermentescibles obtenues par mélange des boues primaires et des boues secondaires. Leur composition dépend de la composition des boues primaires et des boues secondaires. Elles subissent par la suite un traitement de stabilisation.
- **Les boues physico-chimiques** : Elles sont obtenues par un traitement utilisant des flocculants minéraux (sel de fer ou d'ammonium) souvent utilisés pour les boues industrielles.

2 La composition des boues :

Les boues sont composées de matières minérales et organiques intimement liées, éléments fertilisants, des métaux lourds ainsi qu'une fraction importante de micro-organismes. En effet, leur composition dépend principalement de l'origine des eaux usées, de la période de l'année, du type de traitement effectué au niveau de la STEP (boues primaires, boues secondaires...) ainsi que de leur type de conditionnement (Jarde ,2003 ; Singh et al., 2004).

2.1 Matières organiques :

Selon le type de boue, les concentrations en matière organique varient entre 30 et 80%. Elles représentent : des lipides (de 6 à 19 %) des polysaccharides, des biomolécules (protéines), d'acides aminés (jusqu'à 33 %), de gros polymères comme la lignine et la cellulose, d'acide

humique, et des produits de métabolisation des micro-organismes résultant des divers traitements. (Inoue et al., 1996, Jarde et al., 2003 done).

D'autres éléments organiques peuvent également faire partie de la composition des boues, certains classés comme polluants comme les Phtalates, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) ou les Polychlobiphényles (PCB) qui sont en général de l'ordre de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Lega et al., 1997).

2.2 Minéraux et fertilisants :

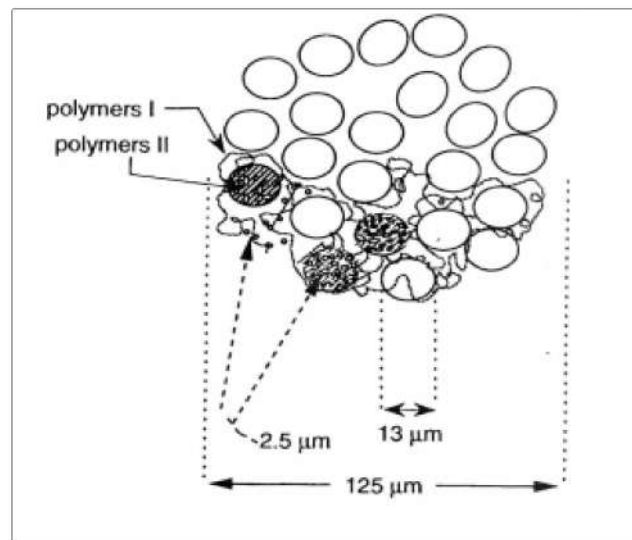
Parmi les minéraux et les fertilisants de la boue on compte le phosphore, l'azote, le magnésium, le soufre, le fer, le calcium et le silicate. D'autres éléments en traces comme le Nickel, le cuivre, le chrome, Cadmium et la Plomb... (Chang et al., 1992 ; Cripps et al., 1992).

2.3 Micro-organismes :

Les boues contiennent une fraction prépondérante de microorganismes vivants diversifiés en nombre et en genre qui jouent un rôle majeur dans le processus d'épuration (Tableau 1). Selon Lehne et al., (2001) les microorganismes constituent 70% des boues activées, essentiellement des bactéries, en effet ces bactéries libres épuratrices forment une structure en floc, s'agglomèrent et forment des agrégats plus denses que l'eau, ces floes sont récupérés lors de la décantation au niveau du clarificateur formant ainsi une grande fraction de boues. Jorand et al. (1995) ont proposé un modèle de la structure de ces floes (Figure 1). Ils seraient constitués en: des bactéries de $2,5 \mu\text{m}$ qui se relient entre elles grâce à des expolymères pour former des micro-floes de $13\mu\text{m}$. Ces micro-floes se relient à leur tour à des bactéries isolées grâce à un autre polymère pour former des particules d'environ $125\mu\text{m}$, de cette façon ce même cycle se répète et les floes se forment au fur et à mesure.

Tableau 1 : Liste de quelques espèces présentes dans les boues (Ramdani, 2007).

Groupe	Genre
Bactéries	Salmonella Shigella Escherichia Vibrio Clostridium Leptospira Mycobacterium
Virus	Poliovirus Coxsackie virus A Coxsackie virus B Echovirus Rotavirus Reovirus Hepatitis virus A
Trematodes	Schistosoma
Cestodes	Taenia
Nématodes	Ascaris Ancylostomum

**Figure 1** : Modèles de la structure des floes des boues activées proposés par Jorand et al. (1995)

CHAPITRE 02 : LA METHANISATION DES BOUES

La méthanisation des boues est utilisée depuis plus d'un siècle pour traiter les boues des stations d'épuration des eaux usées, elle repose sur le principe de la dégradation de la matière organique présente et sa conversion en biogaz à haut potentiel énergétique principalement dû CH_4 à des proportions supérieures à 50 %. Il s'agit d'un traitement des boues considéré comme procédé de dépollution, menant à leur valorisation, d'une part par la production d'une énergie renouvelable sous forme de biogaz, et de l'autre par la diminution du volume des boues considérées comme éléments polluants.

En effet, le pouvoir de la fermentation méthanique sur la dégradation de la matrice organique demeure l'un des procédés les plus puissants du monde biologique car il permet la réduction des quantités importantes de matières organiques (Moletta, 2011).

1 Définition de la méthanisation

La méthanisation est la transformation de la matière organique en biogaz composé principalement de méthane et de gaz carbonique et d'un sous-produit appelé digestat. Il s'agit d'un phénomène naturel qui se réalise dans tous les milieux contenant de la matière organique. Cette transformation est un ensemble de réactions appelé également "digestion anaérobie" ou "fermentation anaérobie". Elle est assurée par un consortium microbien fonctionnant en conditions d'anaérobiose et dans des conditions physico-chimiques variées. Cette réaction a donc lieu dans les marais, les rizières, les boues, les fonds des lacs ainsi que dans les intestins des animaux et des insectes.

La minéralisation du flux carbonique se déroule en 4 étapes successives, l'une dépendante de l'autre, car les produits de chaque étape représentent le substrat de l'autre, impliquant chacune une population bactérienne différente :

1.1 Etape de l'hydrolyse :

Au cours de cette étape les macromolécules comme les protéines, les polysaccharides, les lipides, la cellulase etc... sont dégradés progressivement en composés plus simples (sucres, acides aminés, acides gras, glycérol etc.) Cette étape est assurée par des bactéries hydrolytiques qui forment un groupe phylogénétiquement hétérogène regroupant plusieurs espèces anaérobies

strictes ou aéro-anaérobies facultatives, mésophiles ou thermophiles avec une vitesse de croissance de quelques heures (Degrémont, 1989) en compétition pour les nutriments et les sources de carbones, ces espèces sécrètent des enzymes extracellulaires comme des amylases, des cellulases, des hydrolases etc. Qui mènent à la libération de molécules à faible poids moléculaire pouvant pénétrer dans les cellules où elles seront dégradées par de diverses voies biochimiques.

Dans le cas de la digestion anaérobie des boues, l'étape de l'hydrolyse demeure une étape limitante et lente du fait de sa composition en matières solides (Moletta, 2011). La vitesse réactionnelle est aussi relative à la nature du substrat à dégrader (glucides, protéines, lipides etc.).

Le tableau qui résume les principales espèces bactériennes responsables des différentes réactions d'hydrolyse selon le type du substrat est présenté dans l'Annexe 3.

1.2 Etape de l'acidogénèse :

Les composés produits lors de l'étape de l'hydrolyse sont transformés par l'action de bactéries acidogènes en un mélange de composés contenant des acides organiques, des alcools, de l'hydrogène (H_2), d'hydroxyde de carbone (CO_2), d'ammoniac etc.

Les différentes espèces responsables de cette étape sont résumées dans l'Annexe 3.

1.3 Etape de l'acétogénèse :

Lors de l'étape de l'acétogénèse deux voies sont possibles :

- **Voie hétérofermentaire** : Durant cette étape, il y a production d'hydrogène de dioxyde de carbone et d'autres acides tels que le pyruvate, le butyrate et le propionate.
- **Voie homofermentaire**: il s'agit de la voie où l'acétate est exclusivement produit, soit à partir des produits finaux de la fermentation (formate et H_2 pour les réduire en CO_2) soit à partir de molécules organiques (Tholen et Brune, 1999 ; Zeikus, 1982).

Les espèces responsables de cette étape sont des espèces productrices d'hydrogène (bactéries sulfato-réductrices, et homo-acétogènes), ces espèces ont la particularité d'avoir un taux de croissance rapide de l'ordre de $\mu_{max} = h^{-1}$ (Bitton, 1994).

NB : la thermodynamique des réactions de cette étape est défavorable ($\Delta G > 0$) dans les

conditions standards, elle ne devient possible qu'en faible pression d' H_2 de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} atm, son accumulation provoque l'arrêt de l'acétogénèse, ce qui fait intervenir une réaction consommatrice d' H_2 , l'étape de la méthanogénèse (Moletta, 2011).

1.4 Etape de la méthanogénèse :

Durant cette étape les composés monocarbonés (l'hydrogène et le dioxyde de carbone) et l'acétate produits lors de la phase précédente, sont transformés en méthane CH_4 par deux voies de synthèse assurées chacune par un groupe d'archées méthanogènes anaérobies strictes, qui, avec les bactéries acétogènes forment une relation d'association obligatoire appelée syntrophie (Garcia, 1998).

Les méthanogènes acétoclastes: $Acétate + H_2 \longrightarrow CO_2 + CH_4$

Les méthanogènes hydrogénotrophes: $CO_2 + 4H_2 \longrightarrow 2 H_2O + CH_4$

NB: Il a été remarqué que dans les digesteurs anaérobies, 60% à 70% des réactions sont assurées par les méthanogènes acétoclastes.

2 Facteurs et procédés d'amélioration des performances de la digestion anaérobie des boues :

2.1 Facteurs influençant les performances de la méthanisation des boues

La production du biométhane est le critère le plus simple et le plus représentatif de la performance de la méthanisation des boues. Il existe trois grands paramètres ayant une influence sur sa production (Moletta, 2011).

2.1.1 Température:

Les différents micro-organismes responsables de ce processus ont des températures optimales différentes, il faudrait donc trouver une température qui doit correspondre au développement de toutes les bactéries impliquées. Il en résulte alors trois types de fermentation :

- **Fermentation mésophile 35 - 40 °C** : ce procédé est le plus couramment utilisé. En effet, la réduction de la matière volatile (MV) à des températures de 35-40°C est de 40-50%, et est de 57% quand la température est de 37±2°C.
- **Fermentation thermophile 50 - 60 °C** : rarement utilisée en industrie mais plus efficace car les vitesses de réaction sont accélérées. Ce procédé permet

d'accélérer l'étape de digestion anaérobie des matières solides soit l'étape de l'hydrolyse et d'éliminer les espèces pathogènes nuisibles.

- **Fermentation en deux phases** : il s'agit de favoriser les conditions optimales pour les 2 étapes clés de la fermentation :
 - L'étape de l'hydrolyse en conditions thermophiles pour un temps de séjour de 2-3 jours.
 - L'étape de la méthanisation en conditions mésophiles pour un temps de séjour de 10-12 jours.

2.1.2 Temps de séjour hydraulique (TSH) et charge organique :

Également appelé temps de séjour théorique ou temps de passage, il représente la durée théorique du contact entre la biomasse et l'effluent.

La charge organique est la quantité totale des matières organiques en suspension ou en solutions des boues.

L'objectif fixé de réduction de la teneur en MV des boues par digestion anaérobie mésophile est de 40 à 50 % pour un temps de séjour de 20 jours. La charge organique optimale est de 0.8 à 1.8 kg Mv/m³ /jrs (Moletta, 2011).

2.1.3 Composition des boues :

- a. La teneur en MV des boues fraîches ainsi que leur nature influent significativement sur le rendement, plus les teneurs en MV sont fortes plus le rendement est important. La production spécifique du biogaz dépend du rapport **DCO/MV**.
- b. Absence d'oxygène (les méthanogènes sont sensibles à des pressions d'oxygène de 10 ppm), absence de nitrates, de sulfates (Delbès, 2000, Trably, 2002) et de substances inhibitrices (agents chlorés, antibiotique, métaux lourds...). L'ammoniac (NH₃ libre) doit être compris entre 1,5 - 3 gN/l (Bitton 1994), à fortes doses il s'avère toxique pour les méthanogènes.
- c. **Concentration en acides gras volatils AGV** : inférieur à 2-3 g/l (Edeline 1997), en grande quantité (et principalement le composé le plus toxique, l'acide propionique) ils diminuent le pH et provoquent une inhibition de la phase de méthanisation.
- d. **Pression partielle en hydrogène**: faible 10 -20 Pa max (Degrémont, 1989), l'hydrogène permet d'inhiber la phase acétogénèse, en effet les réactions de celle-ci ne sont

réalisables qu'en faible présence d'hydrogène (10 -20 Pa). Pour garder l'hydrogène faible, les micro-organismes accepteurs d'H₂ or, les méthanogènes doivent être présents.

- e. **Potentiel d'oxydo-réduction Eh:** la baisse de l'Eh favorise la méthanogénèse, il a été démontré qu'une baisse de l'Eh à 200 - 300 mV augmenterait de 10 fois la production du CH₄(Kludze et Delaune, 1995).
- f. **PH:** 6,8 à 7,5 (Edeline, 1997).
- g. **Les cofacteurs:** le fer, le nickel, le magnésium, le calcium, le sodium et le cobalt. Il est impossible de détecter les valeurs exactes requises mais une carence entraîne des conséquences sur l'efficacité du déroulement du processus (Rajeshwari et al, 2000).

2.2 Procédés d'amélioration des performances de la méthanisation :

Durant la digestion anaérobie des boues, l'étape de l'hydrolyse est considérée comme une étape technologiquement limitante en raison de sa longue durée. Afin de contourner ce problème, cette étape a été remplacée par des prétraitements non biologiques qui consistent en l'accélération de la cinétique des réactions dont l'objectif est de digérer le plus de matières organiques pour produire le plus de biogaz. Différents prétraitements sont utilisés :

- Prétraitement thermique.
- Prétraitement enzymatique.
- Prétraitement par ultrasons.
- Prétraitement chimique.

3 Avantages et inconvénients de la digestion anaérobie :

3.1.1 Avantages de la méthanisation des boues :

➤ Aspect produit :

- Traitement naturel des boues et production d'engrais naturels.
- Réduction des volumes des boues.

➤ Aspect énergétique :

- Production d'énergie renouvelable (biogaz).
- Bonne qualité du biogaz (énergie renouvelable).
- Diverses voies d'utilisation et de valorisation du biogaz.
- Production d'un biogaz qui peut être valorisé en énergie (chauffage et cogénération d'électricité).

➤ **Aspect environnemental :**

- Stabilisation des boues (réduire la fermentescibilité) (Moletta, 2011).
- Recyclage de la matière organique stabilisée et sa réutilisation (Moletta, 2011).
- Réduction des émissions du CO₂(gaz à effet de serre) (Moletta, 2011).
- Réduction de la matière sèche de l'ordre de 50% (OTV, 1997).
- Réduction des pathogènes (Elissalde, 1994).
- Dégradation de quelques composés xénobiotiques (Bitton, 1994).
- Demande réduite en énergie par rapport à la fermentation aérobie (absence des installations d'aération).
- Augmentation des concentrations de l'azote ammoniacal NH₄ et des phosphates PO₄⁻³ dus à la dégradation de la matière organique.
- Grande capacité de dégradation des HAP (hydrocarbure aromatique polycyclique) et les PBC (polychlorobiphényles).

3.1.2 Inconvénients de la fermentation anaérobie :

- Une forte sensibilité aux variations des conditions (charge organique, composés toxiques) (Bitton, 1994 ; Edeline, 1997).
- Dégradation plus lente (Bitton, 1994).
- Coûts plus élevés.
- Forte augmentation de production d'odeurs provoquée par la formation des H₂S et des mercaptans.
- Mise en équilibre lente du procédé.
- Le traitement par digestion anaérobie est souvent insuffisant pour rejeter directement les effluents dans le milieu naturel : un post-traitement aérobie de finition est nécessaire pour achever l'élimination du carbone et éventuellement de l'azote et du phosphore (Laskri, 2016).

CHAPIRE 03 : BIOGAZ

1 Biométhane

Le biogaz issu de la méthanisation est un mélange de biométhane (environ deux tiers), de gaz carbonique (un tiers). Il contient également à des valeurs variables du N_2 , du H_2 , des composés soufrés, des COVSi et du H_2O (Annexe 2). Il s'agit d'un gaz combustible provenant de la dégradation de la matière organique par fermentation, d'où le préfixe "bio". Contrairement au gaz naturel, qui est un gaz fossile, le biométhane est renouvelable, il peut être présent sous différentes formes :

- Il est naturellement présent dans différents environnements riches en matières organiques, partiellement ou complètement privés d'air, comme les rizières et les marais d'où l'appellation "gaz de marais".
- Provoqué, lors de la fermentation anaérobie des ordures ménagères dans les alvéoles des installations de stockage des déchets non dangereux (ISDND).
- Intensifié et forcé lors de la méthanisation des boues des stations d'épuration, des déchets des centres d'enfouissement des déchets organiques, les lisiers de porcs ou des papeteries (Moletta, 2011).

L'opération de purification du biogaz consiste à éliminer la vapeur d'eau, les H_2S , les siloxanes, COVSi et le CO_2 par applications de différents procédés dont :

- Adsorption
- Absorption
- Refroidissement
- Procédés biologiques

2 Biométhane comme énergie de substitution

Le volume $1 m^3$ d'un biogaz contenant 70 % de CH_4 et de 30 % de CO_2 , libère par combustion 6000 kcal ce qui équivaut énergiquement à (Laskri, 2016) :

- 0.81 L d'essence
- 1.2 L d'alcool à brûler
- 0.7 L de mazout
- 0.9 Kg de charbon
- 1.5 Kg de bois

- 6.8 Kw/h d'électricité
- 0.66 m³ de gaz naturel.

La valorisation énergétique du biogaz peut prendre différentes formes :

- Production d'électricité
- Valorisation par cogénération : Production simultanée d'électricité et de chaleur
- Piles à combustibles
- Valorisation en Bio GNV
- Injection dans les réseaux de gaz naturel

3 Valorisation du biométhane en Algérie :

L'Algérie dispose d'un énorme potentiel en matière première valorisable, en revanche, il n'existe aujourd'hui qu'une seule station pilote de production d'électricité à partir des déchets urbains, située au niveau du CET (Centre d'enfouissement technique) de Hassi Bounif dans la wilaya d'Oran. L'Algérie compte actuellement 171 stations d'épuration d'eau à travers le territoire national (Algerie eco, 2016).

154 stations d'épuration d'eau sous la direction de l'ONA (Office National de l'Assainissement) avec une capacité épuratoire de 21 Millions de m³/mois ainsi qu'un volume d'eaux usées rejetées de 105 millions de m³ (ONA, 2020).

- 7 Stations d'épuration affiliées à SEAAL (Société des Eaux et de l'assainissement d'ALGER) produisant annuellement 36.000 tonnes de boue brute, contenant 75% d'eau, soit environ 9.000 tonnes de boue sèche (SEAAL, 2021).
- 2 Stations d'épuration SEOR (Société de l'Eau et l'assainissement d'ORAN) (SEOR, 2017).

Ainsi que 89 CET (centres d'enfouissement techniques) (Kratbi, 2017) pour une quantité de déchets ménagers assimilés (DMA) estimée à 13 millions de tonnes en 2018 (APS, 2021).

Partie

Expérimentale

CHAPITRE 01 : MATERIEL ET METHODES

La présente étude est constituée de trois parties :

- Dans la première partie sera discutée la caractérisation physico-chimique des boues
- La seconde partie sera dédiée à leur caractérisation microbiologique
- La dernière partie sera concernée par le suivi de la production du biogaz tout au long de la durée de l'expérience.

1 Matériel :

Le matériel utilisé durant l'expérience est résumé dans le tableau 2.

Tableau 2 : Matériel utilisé lors de l'étude.

Appareillage	Verrerie	Réactifs	Digesteur
<ul style="list-style-type: none"> ● pH-mètre ● Centrifugeuse ● Agitateur magnétique ● Balance magnétique ● Etuve ● Four à moufle ● Bec bunsen ● Microscope photonique 	<ul style="list-style-type: none"> ● Bêchers de différentes capacités ● Fioles de différentes capacités ● Éprouvettes de différents volumes ● Pipettes graduées ● Spatule ● Verres de montre ● Boîtes de pétri ● Tubes à essais stériles ● Flacons de 200ml ● Pipettes pasteur ● Pipettes graduées ● Anse de platine ● Lames de microscope 	<ul style="list-style-type: none"> - Solution de H_2SO_4 0.1N - Solution de NaOH 0.1N - Kit LCK 514 de DCO - Kit LCK 340 de nitrates - Kit LCK 303 d'ammonium - Réactifs de coloration de gram - Alun de fer - Sulfite de sodium - Tellurite de potassium - Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 - Disques oxydase - Amidon - Emulsion de jaune d'œuf - Lait écrémé 	<ul style="list-style-type: none"> - Jerrican de 5L (Contenant d'eau industrielle) - Poche à urine de 2000cm³ pour accueillir le biogaz. - Tuyau type d'aquarium de 4mm de Diamètre - Seringue de 60CC

1.1 Fabrication du digesteur Echantillonnage :

L'échantillon (la boue) a été collecté le 20/04/2021 depuis le digesteur aérobie de la STEP de la ville de Tiaret (Annexe 1) dans le jerrican de 5 L rempli au $\frac{2}{3}$ de sa capacité que nous avons transféré au laboratoire pédagogique de la faculté pour les différentes analyses et essais.

1.1.1 Elaboration du « digesteur » :

Nous avons utilisé le jerrican de 5 L (Figure 2) dans lequel nous avons prélevé l'échantillon (la boue de la STEP de Tiaret) en guise de digesteur de type discontinu.

Ce « digesteur » rempli au $\frac{2}{3}$ a été muni de deux sorties:

-La première au niveau du bouchon du jerrican et reliée à la poche (Figure 2 et 3) destinée à la récupération du biogaz produit.

-La deuxième sortie est dans la partie haute du jerrican, elle permet le passage du tuyau en plastique qui est à son tour relié à la seringue de façon semi-permanente pour effectuer les prélèvements mais aussi dans le but de maintenir l'anaérobiose.

- Nous avons percé le bouchon et le jerrican à l'aide d'un pique en métal à un diamètre légèrement inférieur à celui de la sonde de la poche d'urine et du tuyau en plastique afin de bien maintenir l'anaérobiose et d'éviter les pertes.
- Le "digesteur" est maintenu dans une étuve à une température mésophile de 35 °C.



Figure 2 : Photo de la poche destinée à accueillir le biogaz (Photo originale).

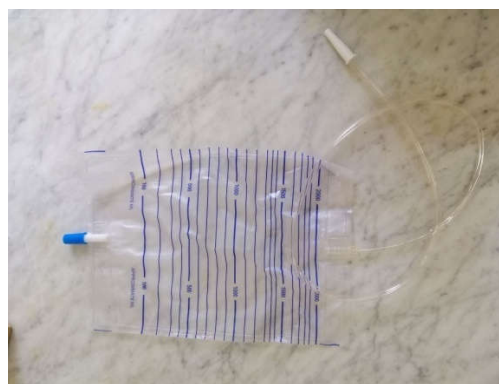


Figure 3 : Photo du « digesteur » fabriqué au laboratoire photo (Photo originale).

2 Caractérisation physico-chimique des boues :

L'analyse de certains paramètres physicochimiques a été effectuée sur place dans le laboratoire de la STEP notamment le dosage de la DCO, des nitrates et des nitrites

2.1 Méthodes:

2.1.1 Détermination du potentiel hydrogène (pH) :

Le pH est déterminé à partir de la quantité d'ions d'hydrogène H^+ ou d'ions hydroxyde OH^- présents dans l'échantillon. Il est mesuré à l'aide d'un pH-mètre en respectant le protocole suivant (CREPA, 2007) :

Protocole :

1. Etalonnage :
 - Introduire l'électrode dans une solution tampon acide, appuyer sur le bouton de mesure et lire la valeur affichée.
 - Rincer l'électrode avec de l'eau distillée et sécher avec du papier joseph.
 - Introduire l'électrode dans une solution tampon basique, appuyer sur le bouton de mesure et lire la valeur affichée.
 - Rincer l'électrode avec de l'eau distillée et sécher avec du papier joseph.
2. Mesure du pH :
 - Introduire l'électrode dans un bécher contenant l'échantillon puis appuyer sur le bouton de mesure et lire la valeur affichée.

2.1.2 Détermination de la matière sèche des boues (siccité) :

La boue est un mélange d'eau et de matières sèches (MS). La siccité représente la teneur des boues en matières sèches.

Protocole :

La matière sèche est déterminée par dessiccation dans une étuve maintenue à $105^{\circ}C$ jusqu'à ce que le poids de l'échantillon à analyser devienne constant (A.O.A.C, 1990). Ainsi le volume évaporé correspond à l'humidité.

- Une masse de boues est prélevée, qu'elle soit M_1 , pesée puis versée dans une capsule d'une masse déterminée M et placée à l'étuve à $105^{\circ}C$ pendant 5 jours (jusqu'à stabilisation du poids) puis pesée à nouveau (Bensmail, 2014).

$$\text{MS \%} = \frac{M - [(M+M1) - (M+M2)]}{M1} \times 100$$

$$\text{L'humidité} = \left(1 - \frac{M2}{M1}\right) \times 100$$

M : Masse de la capsule.

M1 : Masse initiale de l'échantillon.

M2 : Masse finale de l'échantillon après dessiccation.

2.1.3 Détermination de la matière organique :

Lorsque l'échantillon, préalablement séché, est soumis à une incinération à 550°C, la matière organique se consume et la matière résiduelle constitue la matière minérale (A.O.A.C, 1990).

Protocole :

Une masse M du résidu de dessiccation du protocole précédent est prélevée puis placée au four à 550°C dans une capsule nettoyée et séchée de masse déterminée M, pendant 12-18h.

Après refroidissement, la capsule est pesée encore une fois. La différence de masse entre la matière sèche et la matière minérale représente la matière organique (Bensmail, 2014).

$$\text{MO \%} = \frac{[(M+M1) - (M+M2)]}{M1} \times 100$$

M : Masse de la capsule.

M1 : Masse initiale de l'échantillon.

M2 : Masse finale de l'échantillon après incinération.

2.1.4 Détermination du Titre Alcalimétrique Complet (TAC) et des Acides gras volatils (AGV) :

Le dosage des TAC et des AGV a été réalisé par titrimétrie selon la méthode de (BROVKO et CHEN (1977).

Préparation de l'échantillon :

- Un volume de 25 ml de boues est centrifugé une première fois pendant 10 minutes à 5000 t/min. Le surnageant est recueilli dans un bécher.
- 50ml d'eau distillée est ajoutée au culot puis centrifugée encore une fois pendant 10 minutes à 5000 t/min.
- Répéter l'opération du lavage du culot une deuxième fois.

Le liquide obtenu contient du bicarbonate et des acides volatils solubles.

2.1.4.1 Dosage du TAC :

Le titre alcalimétrique complet permet de connaître les doses de carbonates, d'hydroxydes et d'hydrogencarbonates alcalins ou alcalino-terreux, responsables du pouvoir tampon du fermenteur vis-à-vis des acides organiques et acides gras volatils. Cette alcalinité permet de stabiliser le pH à des valeurs neutres même en présence d'acides.

Protocole :

- Mesurer le pH initial, et à l'aide d'une burette ajouter l'acide sulfurique (H_2SO_4) 0.1N sous agitation jusqu'à l'obtention du pH=4. (Boutouta, 2012)

La valeur du TAC s'exprime par les relations suivantes:

$$TAC = \frac{(V \times 0.1 \times 1000)}{25} \text{ (meq/l)}$$

Ou :

Le TAC est souvent exprimé en mg/l de $CaCO_3$ selon la formule

$$TAC = V \times 4 \times 50 \text{ mg/l de } CaCO_3$$

Avec :

V : volume de H_2SO_4 ajouté.

2.1.4.2 Dosage des acides gras volatils :

Pour déterminer la concentration des AGV (Boutouta, 2012) :

- Continuer d'ajouter l'acide sulfurique jusqu'au pH=3.5, puis faire bouillir le liquide pendant 3 min afin de faire dégazer le dioxyde de carbone.
- Après refroidissement, ajouter de la soude 0.1N à l'aide d'une burette et sous agitation, jusqu'à l'obtention du pH=4, noter le volume V_2 , puis continuer à ajouter de la soude jusqu'à pH =7 et noter le volume nécessaire V_3 .

Le calcul des AGV se fait suivant les formules suivantes:

$$AGV = \frac{(V_3 - V_2) \times 0.1 \times 1000}{25} \text{ (meq/l)}$$

Ou:

$$AGV = (V_3 - V_2) \times 4 \times 0.06 \frac{g}{l} \text{ d'acide acétique}$$

2.1.5 Détermination de la DCO :

La dégradation des matières organiques (hydrates de carbone, matières protéiques, acides aminés, lipides et autres matières) entraîne une consommation de l'oxygène dissous dans l'eau et cela se fait au détriment des microorganismes vivants dans le milieu.

La mesure de la DCO permet de mesurer la concentration des matières organiques ou minérales dissoutes ou en suspension dans l'eau au travers de la quantité d'oxygène nécessaire à leur oxydation chimique totale (CREPA, 2007).

Les matières contenues dans les eaux sont oxydées par le bichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$ dans un milieu acide en présence de sulfate d'argent Ag_2SO_4 , en présence d'un agent masquant qui permet d'éviter l'interférence des chlorures. La présence des Cr^{+3} se traduit par une coloration verte et sa concentration sera déterminée par spectroscopie.

Préparation de l'échantillon :

Afin de pouvoir observer un changement de couleur, l'échantillon ne doit pas avoir une couleur accentuée, il est nécessaire donc de le diluer.

- 1 ml de boue a été ajouté à 9 ml d'eau distillée pour former la dilution 10^{-1} .

Une seule dilution a été suffisante pour cet échantillon.

Protocole de détermination de la DCO :

La DCO a été déterminée à l'aide d'un kit LCK 514

- Mélanger le contenu du tube pour homogénéiser la solution
- Ajouter soigneusement 2 ml de l'échantillon, fermer le tube et homogénéiser.
- Placer le tube dans un thermostat à $148^\circ C$ pendant 2h.
- Après refroidissement, placer le tube dans la cuve du spectrophotomètre et lire la valeur affichée sur l'écran à une longueur d'onde de 605 nm.

Le calcul de la valeur de la DCO est calculé selon la formule :

$$DCO \text{ (mg/l)} = \frac{\text{Valeur lue} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{La prise d'essai}}$$

2.1.6 Détermination des nitrates NO_3^- :

Principe: les nitrates sont la forme la plus oxydée de l'azote présent dans les sols et les eaux, ils sont issus de la nitrification de l'azote ammoniacal. Sous sels minéraux très solubles et très mobiles, ils représentent les principaux apports azotés des plantes et des microorganismes du sol.

En milieu pauvre en oxygène, les nitrates subissent une dénitrification par des bactéries dénitrifiantes afin d'en tirer l'oxygène nécessaire à leur respiration, les nitrates sont transformés en nitrites puis en oxydes d'azote gazeux (NO et NO₂) et finalement en diazote atmosphérique inerte N₂.

Protocole du dosage des nitrates :

Dilution de l'échantillon :

- Ajouter 1ml de boue à 9 ml d'eau distillée et agiter soigneusement.

Dosage des nitrates:

- Les nitrates ont été dosés avec des kits LCK 340.
- Prélever 0.2ml de l'échantillon et ajouter dans le tube.
- Ajouter 1 ml de la solution LCK 340 A, fermer le tube et agiter soigneusement.
- Attendre 15 min et placer le tube dans la cuve du spectrophotomètre et lire la valeur affichée sur l'écran à une longueur d'onde de 345 nm.

Le calcul de la concentration des nitrates se fait suivant la formule suivante:

$$\text{NO}_3^- \text{ (mg/l)} = \frac{\text{Valeur lue} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{La prise d'essai}}$$

2.1.7 Dosage de l'ammonium NH₄⁺ :

Lors de la minéralisation des matières organiques, l'azote organique est transformé en azote ammoniacal, qui par la suite subit une nitrification où il sera transformé en nitrates et en nitrites par l'action des bactéries nitrifiantes comme Nitrobacter et Nitrosomonas spp.

Protocole du dosage de l'ammonium :

Dilution de l'échantillon :

- Ajouter 1ml de boue à 9 ml d'eau distillée, agiter soigneusement.

Dosage de l'ammonium :

- Le dosage de l'ammonium a été effectué par des kits LCK 303
- Prélever 0.2ml de l'échantillon et l'ajouter dans le tube.
- Homogénéiser le tube et attendre 15 min
- Placer le tube dans la cuve du spectrophotomètre et lire la valeur affichée sur l'écran à une longueur d'onde de 694 nm.

Le calcul de la concentration de l'ammonium se fait suivant la formule suivante:

$$\text{NH}_4 + (\text{mg/l}) = \frac{\text{Valeur lue} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{La prise d'essai}}$$

3 Caractérisation microbiologique :

3.1 Méthodes :

3.1.1 Préparation de l'échantillon :

a) Préparation de la solution mère :

Un volume de 1 ml de l'échantillon (boue) a été prélevé à l'aide d'une seringue lors du 6ème jour de la digestion anaérobie et inoculé, aseptiquement autour d'un bec bunsen, dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile puis agité manuellement.

L'échantillonnage a été effectué lors du 6ème jour afin d'accorder un temps d'adaptation et de stabilisation au processus biologique et pour s'assurer de prélever un échantillon de l'étape d'hydrolyse.

b) Préparation des dilutions décimales :

Un volume de 1ml de la solution mère a été prélevé à l'aide d'une pipette graduée stérile et ajouté aseptiquement dans un tube contenant 9 ml d'EDS puis agité manuellement pour former la dilution 10^{-1} . La même opération a été répétée 3 fois pour arriver à la dilution 10^{-4} .

3.1.2 Recherche de la flore bactérienne :

3.1.2.1 Recherche des *Pseudomonas spp* :

Phylum : g-Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : Pseudomonas

Les pseudomonas sont des bacilles de 0,7-3 μm de longueur et de 0,7-1 μm d'épaisseur, gram négatif, mobiles (1 à 3 flagelles), non sporulés, possédant une oxydase (sauf pour quelques espèces), ils peuvent être isolés, en paires ou en chaînes (Morgaint, 2015).

Les pseudomonas sont regroupés en deux groupes en fonction de l'ADN r. Le premier groupe rassemble des espèces qui n'accumulent pas le poly- β -hydroxybutyrate (réserve de carbone et d'énergie) et qui produisent un pigment fluorescent. Le deuxième groupe rassemble les espèces

qui accumulent le poly- β -hydroxybutyrate et qui ne produisent pas un pigment fluorescent (MORGAIN, 2015).

Le milieu de culture King B qui est un milieu sélectif d'isolement des *Pseudomonas* a été utilisé pour leur culture au lieu du milieu cétrimide à cause de la non disponibilité de ce dernier.

Sur milieu King B La production de pyoverdine se manifeste par une coloration jaune –verte, avec une fluorescence observée sous lampe UV à 340nm (Noémie, 2011).

Mode d'ensemencement :

Ensemencer en surface à l'aide d'un râteau la gélose King B en ajoutant 0.5ml de la dilution 10^{-2} et de la dilution 10^{-4} sur la surface.

Incuber à 37°C pendant 1-4jours.

Lecture :

Les colonies de *Pseudomonas spp* apparaissent sur King B petites et transparentes.

Repiquage sur GN :

Prélever les colonies suspectes de *Pseudomonas* et effectuer un ensemencement en stries à l'aide d'une pipette pasteur à la surface d'un milieu King B ou d'une gélose nutritive (GN) afin d'avoir des colonies pures.

3.1.2.2 Recherche des spores des clostridium :

Phylum : Firmicutes

Classe : Clostridia

Ordre : Clostridiales

Famille : Clostridiaceae

Genre : Clostridium

La gélose Viande-foie complétée à l'alun de fer et au sulfite de sodium à été utilisée pour la mise en évidence des spores des clostridium sulfito-réducteurs et spécialement de *clostridium perfringens* et de *clostridium sporogenes* (Ziri, 2014).

Activation des spores :

- Un volume de 5 ml de la dilution 10^{-2} et de la dilution 10^{-4} à été mis dans des tubes stériles et introduit dans un bain marie pendant 10 min à 80°C, afin de détruire les formes végétatives et d'activer les spores.

Mode d'ensemencement :

Après refroidissement des tubes, ajouter 18 ml de gélose VF, 3 ml de sulfite de sodium et 0.6ml d'alun de fer puis mélanger délicatement en agitant lentement les tubes afin de ne pas former des bulles d'air. Attendre 30 min jusqu'à ce que le milieu se solidifie puis ajouter quelques gouttes d'huile de paraffine pour assurer l'anaérobiose et incuber à 37°C pendant 24 à 72h.

Lecture :

Après 16h d'incubation, réaliser une première observation, les tubes contenant de grosses colonies noires seront considérés comme positifs. La pigmentation noire est issue de la dégradation de l'alun de fer (Sulfite d'ammonium et de fer) en sulfure de fer.

3.1.2.3 Recherche des *Staphylococcus spp*:

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : Staphylococcus

Les staphylococcus sont des cocci de 0.5 à 1µm de diamètre, gram positif, catalase positive, regroupés en amas, elles sont halophiles et souvent hémolytiques. Seulement les espèces *S aureus* et *S intermedius* possèdent une coagulase toutes les autres n'en possèdent pas (Foster, 1996).

Le milieu de culture baird-parker (BP) à été utilisé en raison de la non disponibilité du milieu Chapman qui est un milieu sélectif des staphylocoques.

La gélose BP additionnée d'une émulsion de jaune d'œuf et de tellurite de potassium est utilisée pour la recherche des espèces de Staphylocoques à coagulase positif, possédant une lécithinase et capable de réduire les tellurites en tellure.

Mode d'ensemencement :

- Ajouter 0.1 ml de la dilution 10^{-2} et de la dilution 10^{-4} à la surface des boîtes contenant le milieu BP et procéder à un ensemencement en surface à l'aide d'un râteau.
- Incuber à 37°C pendant 24 - 48h.

Lecture :

Les colonies de staphylococcus capable de réduire la tellurite en tellure apparaissent en gris foncé ou en noir entourées d'un halo transparent brillant indiquant l'activité de la lécithinase par la dégradation de la lécithine présente dans le jaune d'œuf.

Repiquage sur GN :

Prélever les colonies suspectes des Staphylococcus et effectuer un ensemencement en stries à l'aide d'une pipette pasteur à la surface d'une gélose BP ou d'une gélose nutritive GN pour avoir des colonies pures.

3.1.2.4 Recherches des *Bacillus spp* :

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillale

Famille : Bacilliaceae

Genre : Bacillus

Les bactéries du genre Bacillus sont de grands bacilles de 3-9µm de longueur et de 0.6-1µm d'épaisseur, sporulés, gram positif, possédant une catalase, aérobie stricte ou aéro-anaérobie facultative, mobiles pour la majorité des espèces grâce à des cils péritriches.

La recherche des *Bacillus spp* a été effectuée sur un milieu King B en raison de la non disponibilité du milieu Mossel.

Mode d'ensemencement :

- Ajouter 0.1 ml de la dilution 10^{-2} et de la dilution 10^{-4} à chacune des boîtes contenant le milieu King A et effectuer un ensemencement en surface à l'aide d'un râteau.
- Incuber à 37°C pendant 24 h.

Lecture :

Les colonies de *Bacillus spp* apparaissent grandes, blanches et opaques.

Repiquage sur GN :

Prélever les colonies suspectes de Bacillus et effectuer un ensemencement en stries à l'aide d'une pipette pasteur à la surface du milieu King A ou d'une gélose nutritive GN afin d'avoir des colonies pures.

3.1.3 Identification microbiologique des bactéries:

3.1.3.1 Coloration de gram :

Principe : la coloration de gram permet de distinguer les bactéries en deux groupes, des bactéries gram positif possédant de nombreuses couches de peptidoglycane (environ 90% des constituants de la paroi bactérienne) et qui retiennent la couleur mauve, et des bactéries gram négatif constituées d'une ou deux couches seulement (5 à 20% des constituants de la paroi bactérienne) de peptidoglycane et qui retiennent la couleur rose. Les étapes de la coloration de gram sont décrites dans l'annexe 5.

3.1.3.2 Test de l'oxydase :

Principe : La détection de la présence de l'enzyme cytochrome-oxydase chez les bactéries gram négatif, un catalyseur appartenant à la chaîne respiratoire responsable de la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Le principe est de tester les bactéries sur leur capacité à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylés du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques roses violacées.

Les étapes du test de l'oxydase sont décrites dans l'annexe 6.

3.1.3.3 Test de la catalase :

Principe : la catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Elle est produite chez les bactéries comme un processus de défense car elle permet de neutraliser l'effet bactéricide qu'a le peroxyde d'hydrogène pour faciliter la désintoxication cellulaire. Ce test permet également de différencier entre les bactéries aérobies et anaérobies strictes, car ces dernières ne possèdent généralement pas de catalase.

Les étapes du test de l'oxydase sont décrites dans l'annexe 6.

3.1.4 Tests des dégradations des différents substrats :

3.1.4.1 Hydrolyse de l'amidon :

Principe: la mise en évidence de la dégradation de l'amidon par les bactéries.

L'amidon est un glucide complexe composé d'unités de D glucose, par l'effet d'une amylase qui est une saccharidase, l'amidon est hydrolysé en sucre disaccharidiques.

Ensemencement de la gélose d'amidon :

- À l'aide d'une pipette pasteur boutonnée prélever une colonie bactérienne pure et ensemer la surface de la gélose en stries.
- Incuber à 37°C pendant 24-48h.

Lectures possibles :

Couvrir la surface des boîtes avec une solution de Lugol et observer le changement de couleur. (Delarass, 2014).

- Coloration jaune autour des colonies : dégradation de l'amidon par les bactéries, test positif.
- Coloration bleu foncé autour des colonies : présence d'amidon, test négatif.

3.1.4.2 Dégradation de la caséine :

Principe : La mise en évidence des propriétés protéolytiques des bactéries.

La gélose au lait écrémé constitue un substrat riche en protéines principalement des caséines (80% des protéines du lait) ainsi que des lactalbumines et des lactoglobulines en composés azotés solubles.

Une souche est dite protéolytique si elle présente un diamètre de zone de lyse compris en 5 et 15mm (Vuilleumard, 1986).

Ensemencement :

- A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, prélever une colonie bactérienne pure et ensemer la surface de la gélose de GN au lait écrémé en stries séparées.

Lectures possibles :

- Formation d'un halo clair autour des colonies : dégradation de la caséine, test caséinolyse positif.
- Absence d'halo clair autour des colonies : absence de dégradation, test caséinolyse négatif (Delarass, 2014).

3.1.4.3 Test d'hydrolyse de la lécithine :

Principe : la mise en évidence des propriétés lipolytiques des bactéries.

Ce test est réalisé sur un milieu à base d'émulsion de jaune d'oeuf, il permet la mise en évidence de la présence d'une lecnithinase, d'une lipase et d'une lipoprotéinase.

Les lécithinases sont responsables de la dégradation de la lécithine ou la Phosphatidylcholine, un lipide de la classe des phosphoglycérides.

Ensemencement :

- A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, prélever une colonie bactérienne pure et ensemercer la surface de la gélose GN à l'émulsion de jaune d'œuf en stries séparées.

Lectures possibles :

- Halo opaque blanc jaunâtre, bord net, sous la colonie ou à sa limite : Lécithinase positive (Delarass, 2014).
- Pas de halo : Lécithinase négative (Delarass, 2014).

4 Production du biogaz

Le dispositif construit permet de récupérer le biogaz produit dans la poche. Cette poche peut être changée une fois remplie.

4.1 Identification du biométhane :

L'identification des composés du mélange gazeux est réalisée dans le protocole original grâce à une CPG (Chromatographie à Phase Gazeuse). En raison de la non disponibilité de l'appareil au sein du laboratoire de notre faculté, nous avons opté pour le test de la flamme, car le biométhane est le seul composé combustible du mélange gazeux.

Nous avons également essayé de tester la présence du biométhane à l'aide d'un détecteur de méthane *EX-TEC PM4 SEWERIN*, prêté par la direction de la SONELGAZ Tiaret (Figure 4).

4.1.1 Test de la flamme :

Prélever à l'aide d'une seringue un volume du biogaz et presser sur la seringue aux alentours d'une flamme.

Lectures possibles des résultats :

- La flamme tient sur la seringue: test positif, présence du biométhane dans le biogaz.
- La flamme ne tient pas sur la seringue: test négatif, absence du biométhane dans le biogaz.

4.1.2 Identification du biométhane à l'aide du détecteur de méthane *EX-TEC PM4 SEWERIN*

Prélever à l'aide d'une seringue un volume du biogaz. Faire sortir le biogaz de la seringue tout en l'aspirant par la pompe du détecteur.

Lectures possibles des résultats :

- Présence de biométhane : Affichage de la valeur de la concentration du biométhane par le bargraphe et lancement d'un bip.
- Absence de biométhane : Le bargraphe n'affiche aucune valeur et absence de bip.



Figure 2 : Photo du détecteur de méthane EX-TEC PM4 SEWERIN (Photo originale).

Résultats &

Discussions

CHAPITRE 02 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1 Caractérisation physico-chimique

1.1 Détermination du pH :

La valeur du pH de la boue avant la digestion anaérobie était de : 6.37

1.2 Détermination de la matière sèche, de l'humidité et de la matière organique :

Une diminution de 47 % de MS et de 30.58 % de MO entre le début de l'expérience et sa fin (37 jours), est expliquée par la consommation et la dégradation des matières minérales et organiques de la boue par la flore microbienne durant les différentes étapes du processus biologique de la méthanisation.

La teneur élevée en matières organiques des boues avant la digestion (80.17 %) justifie l'intérêt porté à ce substrat.

Ces résultats sont comparables aux conclusions de l'étude Solagro 2001 qui indiquent un taux d'abattement minimum en MS de 48 % et en MO de 36 %.

Un taux de 49.86 % de matières organiques en fin de l'expérience indique qu'après 37 jours de digestion anaérobie le milieu n'est encore pas arrivé à l'épuisement des ces ressources en MO et qu'il possède toujours un potentiel fermentaire si les autres conditions le permettraient.

Tableau 3 : Résultats de la détermination de la matière sèche, humidité et de la matière organique.

	% MS	% Humidité	% MO	Taux d'abattement MS	Taux d'abattement MO
Avant la digestion anaérobie	56%	44%	80.17%	30.58%	47%
A la fin de la digestion anaérobie	09%	91%	49.86 %		

1.3 Détermination des TAC :

On observe une augmentation significative du TAC au 19ème jour, cette augmentation est en effet une réponse aux diminutions des valeurs du pH lors de cette phase afin alcaliniser le milieu, cela implique qu'il s'agit bien de la phase durant laquelle les AGV sont fortement produits et qu'il s'agit bien de la phase d'acidogénèse.

A la fin de la digestion anaérobie, la valeur du TAC diminue suivant la diminution de la valeur des AGV dans le milieu. Ce résultat indique le bon fonctionnement du digesteur car il prouve son bon pouvoir tampon.

L'alcalinité de référence en bicarbonate est de 1000 à 3000 mg/l exprimée en CaCO₃ (Moletta R, 1989), nos résultats avoisinent cet intervalle.

NB : Les AGV et les TAC ont été dosés au 19^{ème} jour lorsque le pH était de 5.93 pour coïncider avec la phase d'acidogénèse là où les AGV sont en grandes concentrations.

Tableau 4 : Résultats de la détermination du TAC.

	TAC (g/L de CaCO₃)
Avant la digestion anaérobie	1.64 g
Au 19^{ème} jour	3.4 g
A la fin de la digestion anaérobie	1.36 g

1.4 Détermination des AGV :

La concentration des AGV est un paramètre important car il indique la perturbation de l'état biologique du processus (Laskri, 2016).

L'augmentation des AGV remarquée durant le 19^{ème} jour, est expliquée par leur production et l'accumulation dans le milieu par l'action de bactéries acidogènes et hydrolytiques. A la fin de la digestion anaérobie, la valeur des AGV diminue significativement, cela revient à leur transformation en acétate durant la phase d'acétogénèse puis en biogaz durant l'étape de la méthanogénèse, ce qui prouve également le bon déroulement du processus biologique car une concentration trop élevée en AGV risque d'inhiber la méthanisation.

Tableau 5 : Résultats de la détermination des AGV.

	AGV (g/L d'acide acétique)
Avant la digestion anaérobie	0.912 g
Au 19^{ème} jour	2.088 g
A la fin de la digestion anaérobie	0.6 g

1.5 Le rapport AGV/TAC :

Le rapport AGV/TAC permet de donner une indication sur l'état du fermenteur, un bon rapport entre la disponibilité d'une source de carbone par rapport à la valeur du pH est essentiel à une bonne croissance de la flore bactérienne et donc à une production optimale du biogaz.

Relation entre le rapport AGV/TAC et l'état du fermenteur (Metrohm, 2020).

- Les valeurs entre 0.5 et 0.6 indiquent un fermenteur suralimenté.
- Les valeurs entre 0.4 et 0.5 indiquent un fermenteur hautement chargé.

Les résultats obtenus durant les trois tests sont tous satisfaisants, les conditions du fermenteur en termes du pH et de source de carbone ne ralentissaient en aucun cas la croissance bactérienne.

Tableau 6 : Résultats de la détermination du rapport AGV/TAC.

	AGV/TAC
Avant la digestion anaérobie	0.55
Au 19ème jour	0.61
A la fin de la digestion anaérobie	0.44

1.6 Détermination de la DCO :

La valeur de 51.4 mg/l de la DCO a été éliminée soit 16%, ces valeurs indiquent un bon fonctionnement du digesteur car ils relatent une diminution de la valeur de la DCO et donc une consommation continue et non une accumulation de la matière organique dans le milieu.

Tableau 7 : Résultats de la détermination de la DCO.

	DCO mg/l
Avant la digestion anaérobie	315.7 mg/l
A la fin de la digestion anaérobie	264.3 mg/l

1.7 Détermination des nitrates :

La consommation des nitrates est une preuve des réactions du processus de la dénitrification. L'hydrogène produit lors de la phase d'hydrolyse et d'acidogénèse est oxydé par les bactéries dénitrifiantes en azote gazeux N₂. La DCO et les composés carbonés produits lors de la phase d'acidogénèse et d'acétogénèse servent à ces bactéries comme donneurs d'électrons.

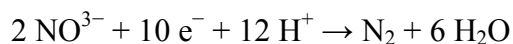


Tableau 8 : Résultats de la détermination des nitrates.

	NO₃⁻ mg/l
Avant la digestion anaérobie	6.13 mg/l
A la fin de la digestion anaérobie	1.97 mg/l

1.8 Détermination de l'ammonium :

La consommation de l'ammonium est expliquée par le processus de nitrification assuré par les bactéries nitrifiantes. Les bactéries nitrifiantes utilisent le carbone minéral (HCO₃⁻, CO₂) issu de l'oxydation de l'acide acétique et des autres acides produits comme source de carbone, et des molécules inorganiques (NH₄⁺) comme source d'énergie pour la production des nitrates et des nitrites.

Tableau 9 : Résultats de la détermination de l'ammonium

	NH₄⁺ mg/l
Avant la digestion anaérobie	6.77 mg/l
A la fin de la digestion anaérobie	1.71 mg/l



Figure 3 : Photo des kits LCK 515 + l'échantillon (boue) lors du dosage de la DCO avant (A) et après (B) la digestion anaérobie (Photo originale).



Figure 4 : Photo des kits LCK 340 + l'échantillon (boue) lors du dosage des nitrates avant (A) et après (B) la digestion anaérobie (Photo originale).

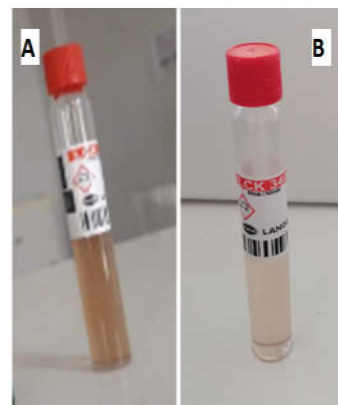


Figure 5 : Photo des kits LCK 303 + l'échantillon (boue) lors du dosage de l'ammonium avant (A) et après (B) la digestion anaérobie (Photo originale).

2 Caractérisation microbiologique

2.1 Recherche et identification des différentes espèces bactérienne :

Les résultats de la recherche de la flore bactérienne sont les suivants :

- Les colonies ayant poussés sur milieu King A ont été repiqués sur le même milieu (Figure 9). La coloration de gram, l'observation microscopique (Figure 12) et le test de catalase ont permis de distinguer le genre *Bacillus spp* (Tableau 10).
- Les colonies ayant poussés sur milieu King B ont été repiqués sur le même milieu (Figure 8). La coloration de gram et l'observation microscopique (Figure 14) ont permis de distinguer le genre *Pseudomonas spp* (Tableau 10).
- Les colonies ayant poussés sur milieu BP ont été repiqués sur GN (Figure 11). La coloration de gram et l'observation microscopique (Figure 13) ont permis de distinguer le genre *Staphylococcus spp* (Tableau 10).
- Les colonies de couleurs noires ayant poussées sur milieu VF indiquent la forte présence des spores de Clostridium (Figure 10) car les deux tubes ont été surchargés (tubes complètement noirs).

Tableau 10 : Résultats de l'identification des espèces bactériennes.

Espèces bactérienne	Présence/ Absence	Forme des colonies	Coloration de gram	Oxydase	Catalase
<i>Pseudomonas spp</i>	+	Petites colonies, transparentes	Petits bacilles à Gram négatif	+	+
<i>Staphylococcus spp</i>	+	Petites colonies, translucides	Coccis, Gram positif	-	+
<i>Bacillus spp</i>	+	Grandes colonies, blanches et opaques.	Grands bacilles, sporulés à gram positif.	+	+
Spore de clostridium	+	Colonies noires.	/	/	/

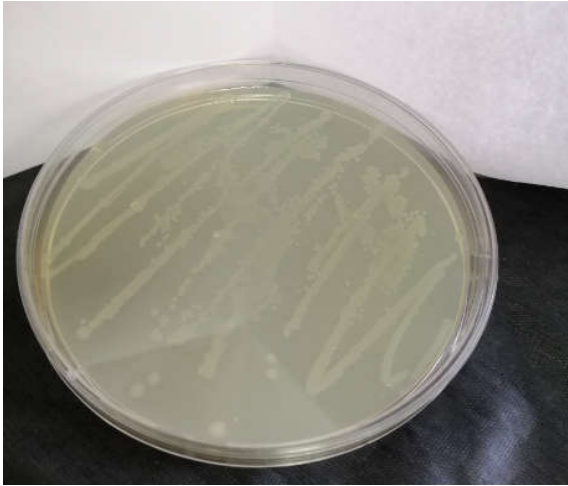


Figure 8 : Photo d'une boîte de pétri contenant des colonies pures de *Pseudomonas spp* sur milieu King B (Photo originale).



Figure 9 : Photo d'une boîte de pétri contenant des colonies pures de *Bacillus spp* sur milieu King A (Photo originale).



Figure 10 : Photo de tubes à essai contenant des spores de *Clostridium* sur milieu VF (Photo originale).



Figure 11 : Photo d'une boîte de pétri contenant des colonies pures de *Staphylococcus spp* sur GN (Photo originale).

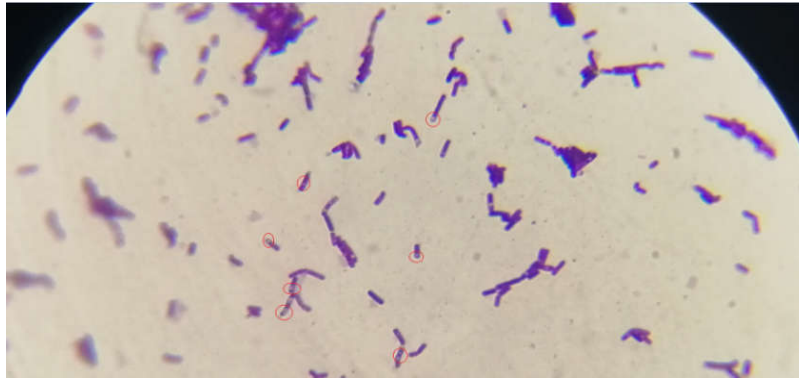


Figure 12 : Observation microscopique de *Bacillus spp* sous l'objectif X100 indiquant les spores en cercles rouges (Photo originale).

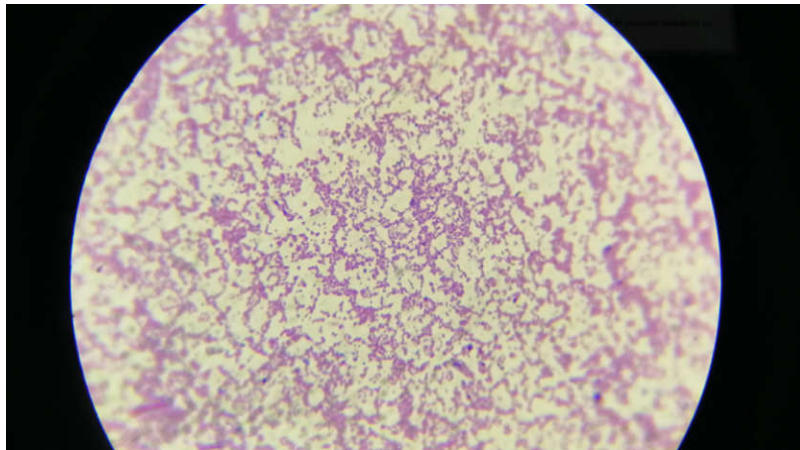


Figure 13 : Observation microscopique de *Staphylococcus spp* sous l'objectif X100 (Photo originale).

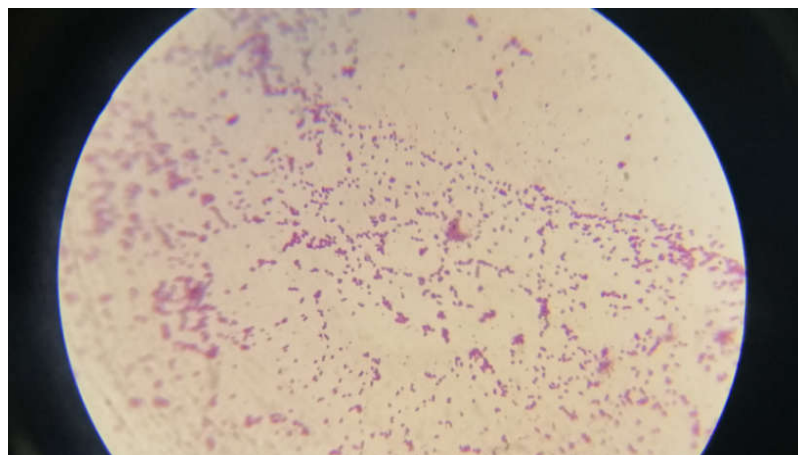


Figure 14 : Observation microscopique de *Pseudomonas spp* sous l'objectif X100 (Photo originale).

2.2 Hydrolyse des différents substrats :

Les résultats des tests d'hydrolyse (Tableau 14) témoignent de la présence d'une activité enzymatique chez les espèces *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp* et *Bacillus spp* à l'égard des substrats glucidiques, lipidiques et protéiques. Cette activité enzymatique est responsable de la dégradation des substrats macromoléculaires lors de l'étape de l'hydrolyse.

- Les espèces *Bacillus spp* (Figure 16) et *Staphylococcus spp* (Figure 15) ont été testées positives à l'hydrolyse de l'amidon (coloration jaune autour des colonies) contrairement à l'espèce *Pseudomonas spp* (Figure 17) qui ne présente pas d'activité amylolytique (coloration noire).
- L'activité protéolytique est faiblement présente chez les trois espèces *Bacillus spp* (Figure 19), *Pseudomonas spp* (Figure 20) et *Staphylococcus spp* (Figure 18). La taille de la zone de lyse est très réduite chez les trois espèces, elle est comprise entre 1 et 2mm.
- L'activité lipolytique est manifestée chez les espèces *Bacillus spp* (Figure 21) et *Staphylococcus spp* (Figure 22) par un halo blanc à la limite et autour des colonies d'un diamètre allant de 1 à 2mm. L'espèce *Pseudomonas spp* (Figure 23) ne possède pas d'activité lipolytique.

L'activité protéolytique et lipolytique réduite n'est pas liée seulement à la performance de l'espèce, mais elle dépend également du choix de la source de carbone, du pH du milieu, de la température et de la concentration des substrats utilisés. L'optimisation de ces conditions pour chaque espèce permet d'avoir une activité enzymatique optimale.



Figure 15 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Staphylococcus spp* sur gélose à l'amidon (Photo originale).



Figure 16 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Bacillus spp* sur gélose à l'amidon (Photo originale).



Figure 17 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Pseudomonas spp* sur gélose à l'amidon (Photo originale).

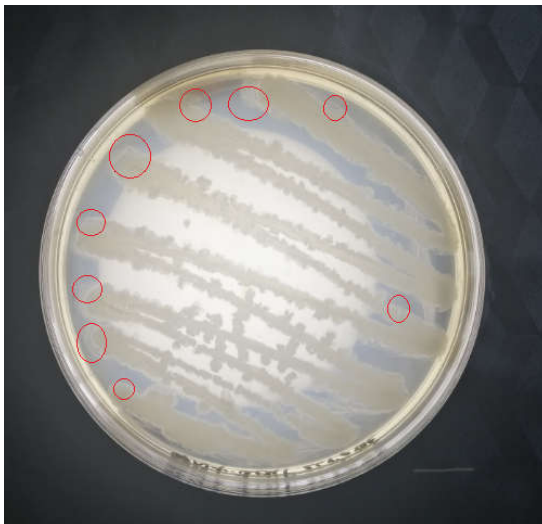


Figure 18 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Staphylococcus spp* sur gélose au lait écrémé (Photo originale).

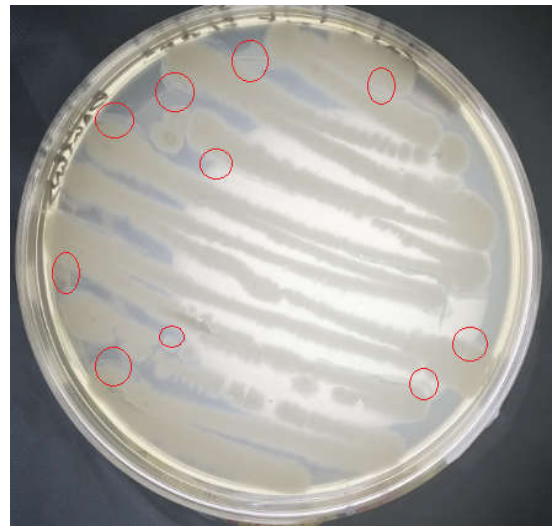


Figure 19 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Bacillus spp* sur gélose au lait écrémé indiquant les zones de lyse en cercle rouge (Photo originale).

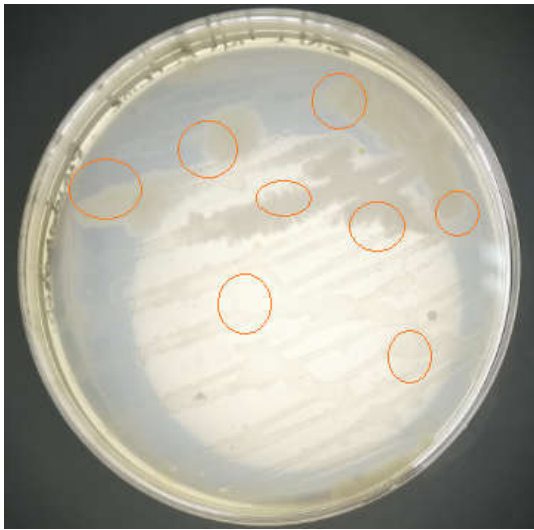


Figure 20 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Pseudomonas spp* sur gélose au lait écrémé indiquant les zones de lyse en cercle rouge. (Photo originale)

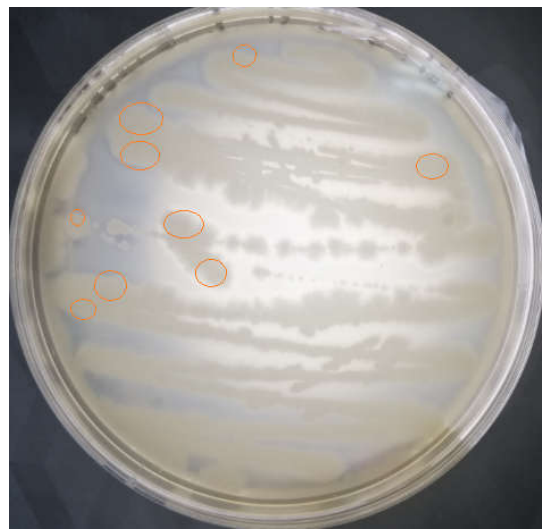


Figure 21 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Bacillus spp* sur gélose au jaune d'œuf indiquant les zones de lyse en cercle rouge (Photo originale).

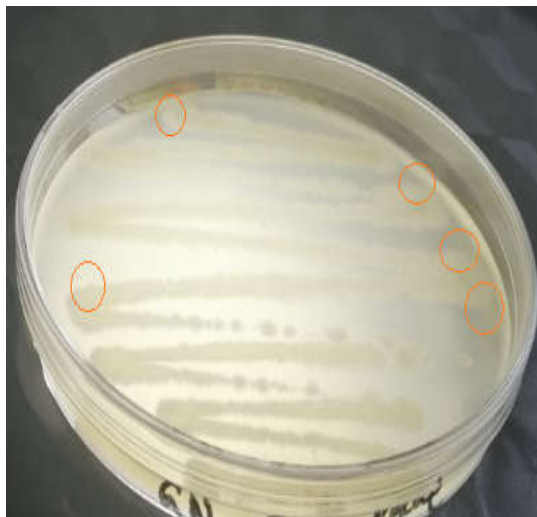


Figure 22 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Staphylococcus spp* sur gélose au jaune d'œuf indiquant les zones de lyse en cercle rouge (Photo originale).



Figure 23 : Photo d'une boîte de pétri contenant *Pseudomonas spp* sur gélose au jaune d'œuf (Photo originale).

3 Résultat et discussions de la production du biogaz :

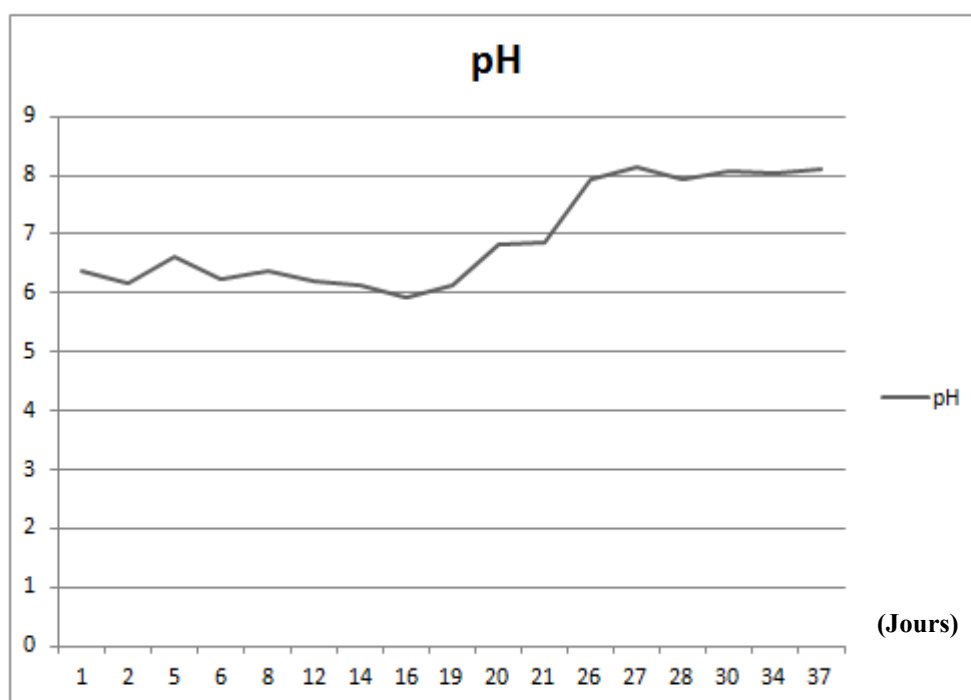
3.1 Variation du pH et évolution de la production du biogaz :

Les résultats de variation du pH (Figure 24) et de la production du biogaz sont résumés dans le tableau 11.

- Durant la période du 1er jusqu'au 8ème jour, on remarque des fluctuations dans les valeurs du pH sans production de biogaz, cette étape peut expliquer l'étape de l'hydrolyse où les macromolécules sont dégradées en composés simples.
- Du 8ème au 16ème jour, on remarque une acidification du milieu avec production du biogaz. La chute des valeurs du pH peut expliquer l'étape de l'acidogénèse responsable de la production des acides gras volatils dans le milieu et de leur accumulation.
- Du 16ème au 27ème jour, le biogaz continu à être produit et le pH augmente progressivement. Cette augmentation dans les valeurs du pH pourrait être liée à la transformation des acides produits lors de la phase précédente en acétate par la flore du milieu.
- Du 27ème au 37ème jour, le pH est plus ou moins stable et la production du biogaz continue progressivement. Cette stabilité du pH pourrait être expliquée par un équilibre entre la production des AGV et leur consommation. Ainsi, l'arrêt de production du biogaz pourrait être lié soit à l'épuisement du milieu soit à la présence d'un facteur inhibiteur d'une étape ou de plusieurs étapes du processus biologique.

Tableau 11 : Variation du pH et évolution de la production du biogaz.

Jour	pH	Production du biogaz	Jour	pH	Production du biogaz
01	6.37	-	20	6.84	+
02	6.17	-	21	6.87	+
05	6.62	-	26	7.95	+
06	6.24	-	27	8.16	+
08	6.37	+	28	7.95	+
12	6.21	+	30	8.09	+
14	6.13	+	34	8.04	+
16	5.93	+	37	8.12	+
19	6.14	+			

**Figure 24** : Démonstration graphique de la variation de la valeur du pH en fonction du temps lors de la digestion anaérobie.

Le volume total du biogaz produit n'a pas été mesuré avec exactitude mais il a été référé à la capacité de la poche utilisée ce qui fait un volume totale de 5000 ml \pm 100ml. Ce résultat est estimée satisfaisant, il est en concordance avec celui obtenu par Laski qui est de 4586 ml pour une durée de 25 jours de digestion. Les résultats de l'évolution de la production du biogaz sont résumés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Résultats de l'évolution de la production du biogaz.

Résultats			
Quantité du biogaz	Date	Volume de biogaz (ml)	La poche de biogaz a été remplacée 3 fois. <ul style="list-style-type: none"> • La 1ère poche à été complètement remplie et retirée au 19ème jour ($v \approx 2000$ml) • La seconde poche à été complètement remplie et retirée au 33 ème jour ($v \approx 2000$ml) • La 3ème poche à été remplie à sa moitié au bout du 37^{ème} jour ($v \approx 1000$ml).
	J=19	≈ 2000	
	J=33	≈ 4000	
	J=37	≈ 5000	
	Total	≈ 5000	

3.2 Identification du biométhane

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 13.

Le biogaz obtenu contient du biométhane car le test de la flamme à été positif (Figure 26), mais aussi d'autres gaz à des proportions différentes. De fortes teneurs en CO₂ (à peu près le tiers du mélange), du H₂, N₂, H₂S, H₂O et d'autres gaz et composés à des concentrations plus faibles (Moletta, 2011).

Tableau 13 : Résultats de l'identification du biométhane.

Test de la flamme	Positif, flamme non constante (Figure 26).
Test par le détecteur EX-TEC PM4 SEWERIN	Négatif pour cause : Cet appareil nécessite de fortes pressions de méthane (Figure 25).



Figure 25 : Photo du détecteur de méthane EX-TEC PM4 SEWERIN relié à la poche du biogaz lors de l'essai de l'identification du biogaz. (Photo originale).



Figure 26 : Photos du test de la flamme. (Photo originale).

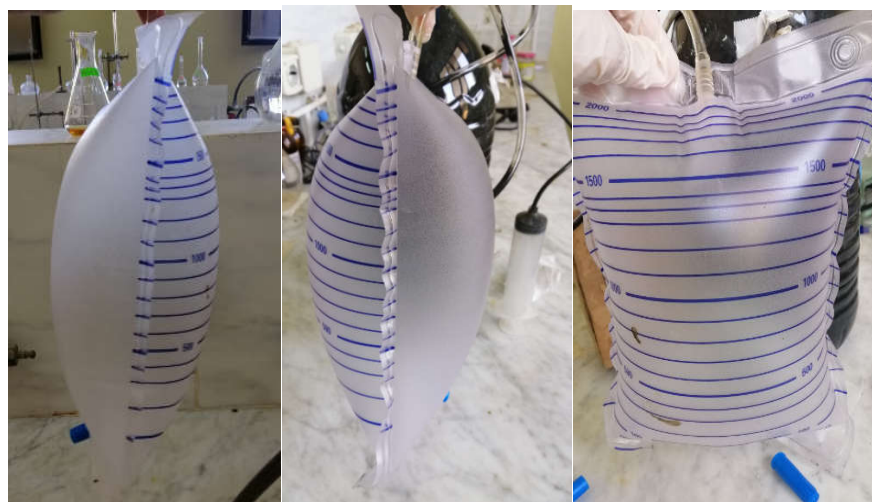


Figure 27 : Photos des poches remplies de biogaz (Photo originale).

Conclusion

Les résultats obtenus durant cette étude ont permis d'avoir sur le plan:

- **Physico-chimique** : le dosage des différents paramètres au début de l'expérimentation, pendant et à sa fin à permis de délimiter dans le temps les différentes étapes de la méthanisation et de suivre la consommation de la matière organique durant ce processus biologique, il a été noté par conséquent, et à travers la disponibilité de la matière organique à la fin de la digestion anaérobie et de la continuité de la production du biogaz, que l'expérience pouvait être maintenue encore plus longtemps que 37 jours si les autres paramètres le permettaient. Ces résultats ont également contribué à avoir un indice sur le bon fonctionnement du digesteur notamment par la l'augmentation suivie de la diminution du TAC et des AGV car elle indique une autorégulation du digesteur.
- **Microbiologique** : Une présence d'une flore bactérienne durant l'étape de l'hydrolyse composée des espèces *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp*, *Bacillus spp* et des spores des clostridium sulfito-réducteurs. Les tests de dégradation des différents substrats glucidiques (amidon) lipidiques (lécithine) et protéiques (caséine) par ces espèces bactériennes ont montré une activité enzymatique réduite, mais n'éliminent pas complètement le rôle de ces dernières dans la dégradation des substrats durant l'étape de l'hydrolyse.
- **Production du biogaz** : l'essai de production de biogaz a été réussi, le test de la flamme a permis de confirmer la présence d'un biogaz combustible qui probablement est le biométhane. Le volume de biogaz produit d'environ 5000 ml est estimé satisfaisant .Ce résultat est encore une fois un témoin du bon fonctionnement du digesteur car le biogaz représente le composé cible de la méthanisation.

Les aboutissements de cette recherche relatent un bilan positif par rapport aux moyens modestes utilisés. D'autres axes et horizons doivent encore être étudiés de près afin de maîtriser tous les paramètres microbiologiques et physico-chimiques de la méthanisation pour aller dans le sens de la valorisation maximale de cet effluent organique qui est la boue et ainsi d'optimiser le rendement du biogaz.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

Algérie Eco, (2016). Jael Galichet Lamouri. 172 stations d'épuration : l'Algérie est le premier pays d'Afrique dans ce domaine.

Algérie Presse Servie, (2021). La quantité des déchets ménagers en Algérie dépassera 20 Millions de Tonnes en 2035.

Barbaux, (2021). L'usine nouvelle, Décarboner la méthanisation, en recyclant à l'hydrogène son CO2 en méthane.

Bensmail (2014). Contribution à la production du biométhane à partir des déchets ménagers de la ville de Bechar. Thèse Doctorat. Université de Bechar.

Bensmail L, & Touzi A, (2012). Valorisation De La Biomasse à Des Fins énergétiques : Contribution De La Production De Biogaz Au Développement Durable, Journal of Scientific Research, Volume 2, Numéro 3.

Bitton, (1994). Wastewater microbiology, Wiley-Liss Editor, New York.

Boutouta I., (2012). Valorisation énergétique des déchets solides urbains de la ville de Blida, mémoire de master Université de Blida, Blida, Algérie.

Chang A.C & al., (1992). A methodology for establishing phyto-toxicity criteria for chromium, copper, nickel and zinc in agricultural land application of municipal sewage sludges. J. Environ.Qual. 21, 521-536.

Cheeseman P, & al., (1972). Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from Methanobacterium strain M.o.H, Journal of Bacteriology vol 112, N°01 page 527-531.

Concawe & al., (2007). Well-to-wheel analysis of future automotive fuels and powertrains in the European context.

Couturier, (2009). Techniques de production d'électricité à partir de biogaz et de gaz de synthèse. Record, Solagro.

- CREPA, (2007).** Centre régional pour l'eau potable et l'assainissement à faible cout, Centre collaborant de l'OMS, Contrôle et suivi de la qualité des eaux usées protocole de détermination des paramètres physico-chimiques et bactériologiques.
- Degrémont, (1989).** Mémento technique de l'eau, 9eme Edition, Tome 1 et 2, Editions Lavoisier, Paris.
- Delarass, (2014).** Pratique de Microbiologie Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Tec & Doc Lavoisier. ISBN-10 : 2743015659.
- Delbès, (2000).** Diversité et dynamique structurales et fonctionnelles.
- Edeline, (1997).** L'épuration biologique des eaux. Théorie & technologie des réacteurs. CEDEBOC Editeur, Paris.
- Elissalde, (1994).** Les germes pathogènes dans les boues résiduares des stations d'épurations urbaines, Contrats ADEME n° 2750010 et 2750009, 90p.
- Fickers P, (2007).** Jacqueline Destain & Philippe Thonart, Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications, 2007.
- Foster T, (1996).** Medical microbiology, 1996 Timothy Foster 4ème édition, chap 12 les staphylococcus, Éditeur: Samuel Baron. ISBN-10: 0-9631172-1-1.
- Garcia J.L., (1998).** Les bactéries méthanogènes. C.R. Acad. Agric. Fr., 84, 23-33.
- Gogarten & al., (1989).** Evolution of the vacuolar h⁺- AtPase: implications for the origin of eukaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 86, 6661-6665.
- GRDF, (2011).** Projet méthanisation, la dynamique du marché. SDES, Tableau de bord : biogaz pour la production d'électricité, quatrième trimestre 2020, n°340.
- Gribaldo S & al., (2008).** Les Archaea : évolution et diversité du troisième domaine du vivant, Bull.Soc.Fr.Microbiol., 23, (3).
- HAMMES &al., (1979).** The sensitivity of the pseudomurein containing genus *Methanobacterium* to inhibitors of murein synthesis. Arch. Microbiol., 123 : 275 - 279.

- IBGE, (2009).** Guide de cogénération, comment estimer la pertinence d'une installation de cogénération.
- Irena, (2020).** Renewable Energy Statistics 2020, The International Renewable Energy Agency, Abu Dhabi.
- Iwabe & al., (1989).** Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 86, 9355-9359.
- Jarde, & al., (2003).** Characterization of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids. Org. Geochem. 34 (4), 615 – 627.
- Jorand F & al., (1995).** Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. Water Research. 29, 1639-1647.
- KANDLER, O. & KONIG, H., (1978).** Chemical composition of the peptidoglycan free cell walls of methanogenic bacteria. Arch. Microbiol., 118:141-152.
- Kludze, DeLaune., (1995).** Gaseous exchange and wetland plant response to soil redox intensity and capacity. Soil sci 146:335-349.
- Kratbi A, (2017).** Gestion de déchets en Algérie, Conférence Internationale de Dakar, Sénégal « Des solutions pour la gestion des déchets dans les pays en développement ». Plateforme ReSource.
- Laskri N, (2016).** Dépollution des déchets riches en matière organique (boues de station d'épuration et déchets d'abattoir) Par digestion anaérobie : Valorisation énergétique et production du méthane. Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de Doctorat en Science: Génie chimique. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie.
- Lega, R& al., (1997).** Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. Chemosphere 34, 1705–1712.
- Lehne G & al., (2001).** Mechanical disintegration of sewage sludge, Water Science and Technology, 43, (1), pp. 19-26.

- Metrohm, (2020).** FOS/TAC Quotient for the optimization of methane production from biomass. Disponible à l'adresse: www.metrohm.com
- Ministère de l'énergie et des mines, (2019).** Energies Nouvelles, Renouvelables et Maîtrise de l'Énergie, 2019. Disponible à l'adresse: www.enery.gov.dz.
- Moletta R, (1989).** Contrôle et conduite des digesteurs anaérobie, Revue des sciences de l'eau vol.2,n°02. ISSN numérique: 1718-8598.
- Moletta R,(2011).** La méthanisation 2e édition, Lavoisier, 11 rue Lavoisier F75000 Paris, France..ISBN: 978-2-7430-1271-7.
- Morgaint B, (2015).** Identification et caractérisation des Pseudomonas associées à la bactériose de l'abricotier en vallée du Rhône, Mémoire de stage de Master 2 PVIA, Université de Picardie Jules Verne.
- Noëmie, (2011).** Les milieu de cultures en bactériologie. bio303.1-12p.
- OFATE (2019).** Müller-Lohse L. Regard croisés sur le biogaz en Allemane et en France.
- Office National d'Assainissement, (2020).** L'office, L'ONA en chiffre, chiffre clés du mois de janvier 2020.Disponible à l'adresse: www.ona-dz.org
- OTV, (1997).** Traiter et valoriser les boues, Ed. OTV.
- Rajeshwari KV & al, (2000).** State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. Renewable and Sustainable Energy Review 4(2):135-156.
- Ramdani N, (2007).** Contribution à l'étude des boues urbaines de la station d'épuration des eaux usées résiduaires. Effet sur la fertilité d'un sol sableux, Université d'Oran.
- Record, (2009).** Techniques de production d'électricité à partir de biogaz et de gaz de synthèse, 253 p, n°07-0226/1A.
- Sharp & al., (1998).** Taxon specific associations between protozoal and methanogens populations in the rumen and a model rumen system. FEMS Microbiology Ecology 26, 71-78.

Singh & al.,(2004). Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area, *Chemosphere* 55 (2004) 227-255.

Société des Eaux et de l'Assainissement d'Alger, (2021). Epuration des eaux, Nos stations d'épuration. Disponible à l'adresse: www.seaal.dz

Société des Eaux et de l'Assainissement d'Oran, (2017). Stations d'épuration, Disponible à l'adresse: www.seor.dz

Tholen, (1999) « Localization and in situ activities of homoacetogenic bacteria in the highly compartmentalized hindgut of soil feeding higher termites (*Cubitermes* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10): 4497-4505.

Tokura & al., (1997) Methanogens associates with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 137-143.

Trably, E. (2002) Etude et optimisation de la biodégradation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et de Polychlorobiphényles (PCBs) au cours de la digestion anaérobie et aérobie de boues urbaines contaminées, Génie des procédés, Université Montpellier II, Montpellier.

Vuillemard J.C., (1986) Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactique. Tec et Doc, Lavoisier, Paris.

Woese C. (2007) The birth of *Archaea*: a personal retrospective, Blackwell.

Zeikus, J.G, (1982) Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion. Anaerobic digestion 1981. Proc. symposium, Travemunde.

Ziri M.A, (2014) Etude éco-bactériologique et enzymatique de quelques zones humides classées en convention internationale de Ramsar de la région biogéographique d'Oran (Lac Télamine et Lagune du Macta) et de Bechar (Barrage de Djorf torba), Mémoire de Magister en Biotechnologie, Université Oran.

Annexes

Annexe 1

STEP de la ville de Tiaret

1 Présentation de la STEP

La station d'épuration des eaux usées de la ville de Tiaret est située dans la commune de Ain Bouchekif, à 4.5 km à l'Est de la ville de Tiaret. Elle est accessible par le chemin de wilaya CW 07.

Cette STEP assure le traitement des eaux résiduaires et pluviales arrivées par un réseau joignant cinq principaux collecteurs, ainsi que le traitement des boues qui en résultent.

Le traitement des eaux consiste principalement à les décharger des matières solides et des huiles pour être ensuite injectées au Barrage de Dahmouni situé 25.2 Km plus loin, alors que le traitement des boues s'agit exclusivement de leur séchage.

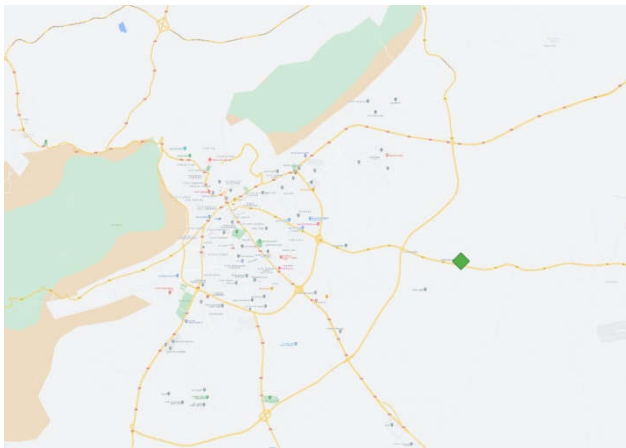


Figure 01 : Situation de la STEP de Tiaret.



Figure 02: Vue aérienne de la STEP de Tiaret.

2 Traitements effectués au niveau de la STEP de Tiaret

2.1 Traitement des eaux :

2.1.1 Prétraitement

L'objectif de cette première étape est de séparer les différentes matières solides et les huiles présentes dans l'eau grâce à leur passage successif dans différents engins.

- **Dégrillage :** Les grilles composant le dégrilleur permettent de piéger les composés solides selon leur taille. Le premier bâtiment de la STEP contient deux dégrilleurs composés de grilles écartées par 30 mm d'espace appelés dégrilleurs gros, deux bandes de transporteuses pour les déchets évacués et trois pompes de relevage. Les eaux sont ensuite dirigées vers un deuxième bâtiment où se trouvent deux autres

dégrilleurs avec un espace entre les grilles de 8 mm, appelés dégrilleurs fins et une presse laveuse qui permet de compacter et de laver les déchets piégés par les dégrilleurs fins.

- **Déssablage déshuilage** : Le dessablage permet de débarrasser les eaux usées des particules de sable et de gravier par sédimentation. La première section du déssableur contient des bulles d'air obtenues par insufflation d'air, elles permettent d'entraîner le sable et le gravier vers le fond. Le mélange eau-sable déposé au fond du déssableur sera ensuite aspiré par deux pompes vers la chambre à sable puis mené vers le classificateur où les eaux seront extraites du sable.

Au même moment, l'insufflation d'air permet de faire remonter les graisses et les huiles à la surface des eaux qui seront accumulées à l'aide d'un racleur puis pompées vers l'épaississeur, il s'agit du déshuilage.

2.1.2 Traitement primaire

L'objectif de cette étape est de faire décanter les eaux usées afin de les séparer des boues. Cette étape s'effectue dans un décanteur, il existe deux types de décanteurs : un décanteur primaire et un décanteur secondaire.

- **Décantation primaire** : La station possède deux décanteurs primaires d'un volume de 2168.5m³. La décantation permet de séparer les matières en suspension des eaux par l'effet de la pesanteur pour obtenir une eau plus au moins éclairée. Ainsi, les matières en suspension déposées au fond du bassin, et qui constituent les boues, seront pompées vers l'épaississeur, et les eaux seront dirigées vers des puits collecteurs pour être destinées à la sortie de la STEP.

2.2 Traitement des boues

Les traitements effectués sur les boues au niveau de la STEP englobent l'épaississement et le séchage.

- **Épaississement** : La STEP possède 2 épaississeurs, le premier à une capacité de 2162.48 m³ et le deuxième de 1491.5m³. L'épaississement permet la réduction du volume des boues en réduisant leur volume d'eau.

La stabilisation aérobie des boues stockées par insufflation d'air pendant de longues durées, car en présence d'oxygène le pouvoir fermentescible des boues diminue et les odeurs désagréables issues du métabolisme des flores bactériennes ne se développent pas.

- **Séchage :** Après stabilisation, les boues subissent un séchage soit par déshydratation mécanique durant les périodes de froid, soit naturelle dans les deux lits de séchage quand les températures climatiques le permettent.



Figure 03 : Photo d'un aérateur de la STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).



Figure 04 : Photo du digesteur aérobie de STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).



Figure 05 : Photo de la maquette de la STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).



Figure 06 : Photo de la maquette de la STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).



Figure 07 : Photo du bassin de décantation de la STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).



Figure 08 : Photo du lit de séchage des boues de la STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).



Figure 09: Photo du déssableur/déshuileur de la STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).



Figure 10 : Photo du dégrilleur de la STEP de la ville de Tiaret (Photo originale, 2021).

Annexe 2

Biogaz

1 Composition du biogaz.

Tableau 01 : Composition du biogaz, (Moletta, 2011).

Composés	Teneur moyenne en %vol.
CH ₄	30-60
CO ₂	20-50
N ₂	<10
O ₂	<2
H ₂	Traces
CO	Traces
Composés soufrés (H ₂ s, mercaptants)	Traces
NH ₃	Traces
Hydrocarbures	Traces
Composés organo-halogénés	Traces
COVSi	Traces
H ₂ O	Saturation
Particules	Traces

2 Schéma du principe de la valorisation du biogaz par cogénération.

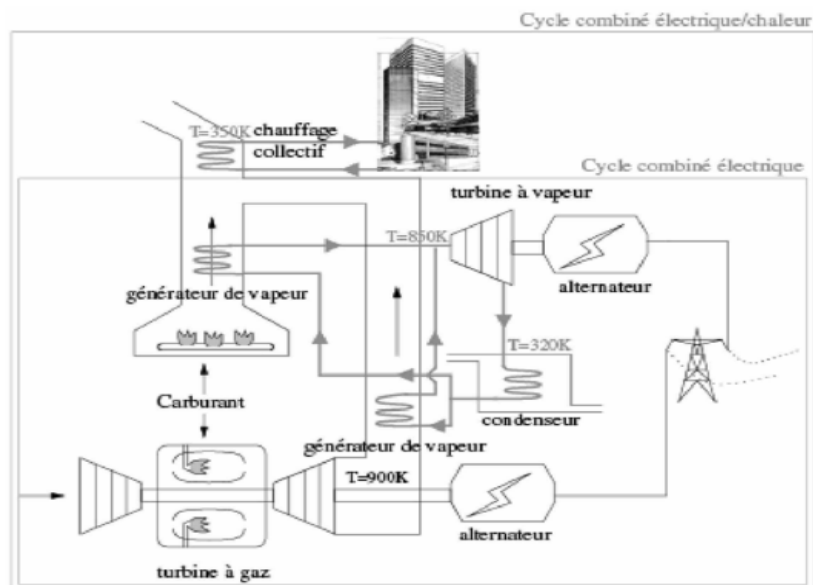


Figure 11 : Schéma explicatif du principe de la cogénération (Couturier, 2009).

3 Emission des GES par les différents carburants

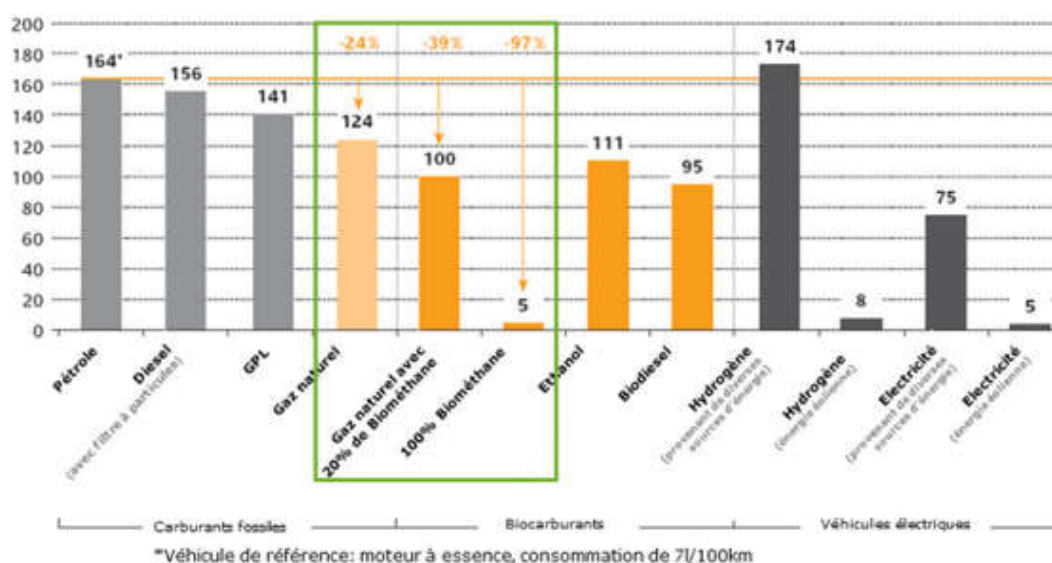


Figure 12 : Emissions de GES en gramme de CO2/km pour différents carburants (Concawe 2007).

4 Valorisation du biométhane dans le monde

La production mondiale du biogaz était estimée en 2018 à 426 830 GHw, quelques exemples de pays producteurs de biogaz sont cités dans le tableau 02.

Tableau 02 : Valorisation du biométhane au monde.

Pays	Production du biogaz
Allemagne	<ul style="list-style-type: none"> En 2019, l'Allemagne comptait plus de 9400 unités de valorisation du biogaz, dont: 9200 unités (95%) adoptant la voie de la valorisation en électricité et en chaleur. En 2017, la production électrique issue du biogaz à été de l'ordre de 30 TWh, soit 4.5% de l'énergie électrique totale Allemande et 13.6% de l'énergie électrique renouvelable. (OFATE, 2019)
La France	<ul style="list-style-type: none"> La France comptait en 2020, 1023 unités de valorisation de biogaz en énergie électrique et thermique, dont 214 unités d'injection du biométhane dans les réseaux de gaz naturel avec une capacité de 3.9TWh/an et 861 unités de production d'électricité avec une capacité de production de 2.6TWh soit 0.6% de la production électrique française (GRDF, 2011).

La chine	<ul style="list-style-type: none">● En chine, la production du biogaz est une culture et un moyen ancestral utilisé depuis plusieurs siècles. Dans le cadre de la promotion d'un plan national de la production du biogaz dans les milieux ruraux, 30 millions de digesteurs domestiques ont été installés durant les années 30, alimentés principalement de déchets domestiques et agricoles. Ce projet a fait de la chine un des pays les plus avancés au monde dans le domaine de la transformation des énergies renouvelables. En 2018, la chine comptait une production brute de chaleur et d'électricité à partir de la digestion des déchets équivalente à 23 264 GWh. (IRENA, 2020) Actuellement, la chine se pose de nouveaux défis et s'investit dans la récupération des déchets issus des déchets traités en développant des systèmes qui permettent la récupération et la valorisation du CO₂ libérés lors de la purification du biogaz sous le slogan de la décarbonation de la méthanisation (Barbaux, 2021).
-----------------	---

Annexe 3

Principales espèces responsables de la dégradation des substrats

1 Principales espèces bactériennes responsables de la dégradation des substrats

Tableau 03 : Principales espèces bactériennes responsables de la dégradation des substrats de l'étape de l'hydrolyse (Garcia, depuis (Moletta, 2011).

Substrat	Espèces	
Condition mésophiles		
Cellulose	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> <i>Bacteroides succinogenes</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Clostridium aldrichii</i> <i>Clostridium cellulobioparum</i> <i>Clostridium cellulolyticum</i> <i>Clostridium chartatabidum</i> <i>Clostridium lochheadii</i> <i>Clostridium longisporum</i> <i>Clostridium paradoxum</i> <i>Clostridium populeti</i>	<i>Acetivibrio cellulosolvens</i> <i>Bacteroides cellulosolvens</i> <i>Cillobacterium cellulosolvens</i> <i>Ruminococcus flavifaciens</i> <i>Clostridium celerecerscens</i> <i>Clostridium cellulofermentens</i> <i>Clostridium cellulovorans</i> <i>Clostridium josui</i> <i>Clostridium lerntocellum</i> <i>Clostridium papyrosolvens</i> <i>Clostridium polysaccharolyticum</i> <i>Clostridium termitidis</i>
Hémicelluloses	<i>Bacteroides ruminicola</i>	
Pectines	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium multif fermentans</i>	<i>Clostridium felsineum</i> <i>Lachnospira multiparus</i>
Amidon	<i>Bacillus spp</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Lactobacillus spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>	<i>Bacteroides spp</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Succinomonas amylolytica</i>
Lipides	<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Syntrophomonas spp</i>	<i>Bacillus spp</i>
Protéines	<i>Bacillus spp</i> <i>Clostridium</i> <i>Staphylococcus spp</i>	<i>Bifidobactérium spp</i> <i>Peptococcus anaerobius</i>
Conditions thermophiles		
Cellulose	<i>Anaerocellum thermophilum</i> <i>Clostridium stercorarium</i> <i>Clostridium thermocopriae</i>	<i>Clostridium cellulosi</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Clostridium thermopapyrolyticum</i>
Hémicellulose	<i>Clostridium thermobutyricum</i> <i>Clostridium thermocopriae</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
Pectines	<i>Acetomicrobium faecalis</i> <i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Clostridium thermolacticum</i> <i>Clostridium thermosulfurogenes</i>
Amidon	<i>Acetomicrobium flavidum</i> <i>Clostridium stercorarium</i> <i>Clostridium thermocopriae</i> <i>Clostridium thermolacticum</i>	<i>Clostridium fervidus</i> <i>Clostridium thermobutyricum</i> <i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> <i>Clostridium thermopalmarium</i>

	<i>Clostridium thermoscharolyticum</i> <i>Thermonaerobacter finni</i> <i>Thermonaerobacter acetoethylicus</i>	<i>Thermonaerobacter ethanolicus</i> <i>Thermonaerobacter brockii</i>
Protéines	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>	

Tableau 04 : Principales espèces bactériennes responsables de la dégradation des substrats de l'étape de l'acétogénèse (Garcia, depuis (Moletta, 2011)).

Métabolites	Espèces	
Acétate	<i>Acetivibrio spp</i> <i>Acetoanaerobium noterae</i> <i>Acetofilamentum rigidum</i> <i>Acidominobacter hydrogenoformans</i> <i>Clostridium acidurici</i> <i>Clostridium formicoaceticum</i> <i>Clostridium magnum</i> <i>Eubacterium limosum</i> <i>Peptococcus glyconophilus</i> <i>Syntrophococcus sucormutans</i>	<i>Acetobacterium spp</i> <i>Acetobacterium flavidum</i> <i>Acetobacterium ruminis</i> <i>Clostridium aceticum</i> <i>Clostridium ijungdahlii</i> <i>Clostridium mayombei</i> <i>Pelobacter spp</i> <i>Sporomusa spp</i>
Acétate, Butyrate	<i>Acidaminococcus fermentans</i> <i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	<i>Eubacterium spp</i>
Acétate, Butyrate, Ethanol	<i>Clostridium spp</i>	
Acétate, Propionate	<i>Anaerovibrio lypolytica</i> <i>Propionibacterium spp</i> <i>Selenomonas spp</i>	<i>Anaerovibrio glycerini</i> <i>Propionispira arboris</i> <i>Veillonella spp</i>
Acétate, Ethanol, Lactate	<i>Lachnospira spp</i>	<i>Lactobacillus spp</i>
Acétate, Lactate	<i>Bifidobacterium spp</i>	
Acétate, Lactate, Formate	<i>Ruminococcus spp</i>	
Lactate	<i>Lactobacillus spp</i> <i>Streptococcus spp</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
Succinate	<i>Anaerobiospirillum succinoproducens</i> <i>Succinovibrio dextrinosolvans</i>	<i>Succinomonas amylolytica</i>
Butyrate	<i>Butyrobivrio spp</i> <i>Roseburia cecicola</i>	<i>Fusobacterium spp</i>
Acétate, Propionate, Butyrate, Valerate, Caproate		<i>Megasphaera elsdenii</i>

2 Méthanogènes responsables de la méthanisation:

2.1 Origine des archées méthanogènes :

Le règne des archées a été découvert par Woese et Fox à la fin des années 70s lors de leur analyse de l'ARN de la petite sous-unité du ribosome (ARN PSU) dans le cadre de l'étude de la classification des organismes cellulaires. Leurs résultats avaient montré qu'il existait une large différence entre les ARNr PSU des eucaryotes et des procaryotes, ce qui fut normal du fait qu'ils formaient deux règnes différents, sauf que l'analyse des ARN PSU des procaryotes avait permis l'identification de deux groupes distincts aussi différent l'un de l'autre.

Le premier groupe qu'ils nommèrent "Eubactéria" regroupe L'ARNr PSU de la plupart des bactéries classiques, des extraits des mitochondries et des chloroplastes eucaryotes (ce qui confirma la théorie symbiotiques de ces organelles et mettra fin à ce débat).

Le deuxième groupe regroupe l'ARNr PSU de quelques bactéries anaérobies strictes productrice de méthane.

Ce métabolisme unique et particulier des méthanogènes, qui, supposé être très primitif à cause de la composition atmosphérique ancienne de la terre, avant l'apparition massive de l'oxygène (il y'a 3 - 4 milliards d'années), qui mena les chercheurs à les classer comme un groupe à part nommé "Archaeobacteria". (Gribaldo et al, 2008).

Une autre particularité propre aux méthanogènes à été remarquée et a permis de les différencier catégoriquement des autres bactéries classiques, leur membrane cellulaire était constituée de lipides atypiques contenant un glycérol-1-phosphate, une liaison éther et des chaînes isoprénoïdes au lieu d'un glycérol-3-phosphate, une liaison ester et des chaînes d'acides gras comme pour les autres bactéries (Woese, 2007).

D'autres recherches ont par la suite conduit à conclure que les Archéobactéries sont plus proches évolutivement des Eucarya que les Eubacteria (Gogarten et al., 1989 ; Iwabe et al., 1989) ils seraient des groupes-frères c'est à dire qu'ils partagent un ancêtre commun (Gribaldo et al, 2008). Woese proposa alors d'enlever le suffixe "bacteria" du terme Archaeobacteria pour finalement avoir les trois domaines: Archaea, Bacteria, Eucarya.

Le développement des différentes sciences et des méthodes d'identification des espèces avait permis de briser l'idée que les archaea sont des organismes restreints aux environnements extrêmes (hyperthermophiles, hyperacides, hypersaline) et qu'ils seraient présent et dominants dans des environnements habitables comme les océans, les lacs et les sols. Ces avancées scientifiques ont également tenté d'adapter des techniques appropriées pour leur isolement et leur culture, mais en vain car l'opération s'annonce délicate et ne réussit que pour peu d'espèces.

Les bactéries méthanogènes appartiennent au phylum des Euryarchaeota, une des deux lignée des Archaea au côté de Crenarchaeota, un phylum qui contient 9 ordres différents écologiquement d'où le préfixe Euryos= varié, et qui se divise en quatorze genres (Garcia J.L (1998).

Les méthanogènes représentent les archaea les plus dominants du tube digestif des ruminants précisément au niveau du rumen, mais ils sont présents également par fixation sur les protozoaires ciliés (Sharp et al 1998, et Tokura et al, 1997). La méthanogénèse chez les

mammifères est principalement un processus hydrogénotrophe, l'H₂ produit au cours des divers processus biochimique est utilisé pour réduire le CO₂ et former le CH₄ selon l'équation: $H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2 H_2O$.

PS: Le Formate peut également être donneur d'électrons mais les voies biochimiques exactes ne sont encore pas bien connues (Moletta, 2011).

2.2 Caractéristiques des Archaea méthanogènes:

Les Archaea méthanogènes sont toutes unies par la particularité de la production du méthane comme produit final de leur métabolisme, hormis les voies métaboliques différentes:

- 80% sont hydrogénotrophes : elles utilisent le H₂ comme substrat pour réduire le CO₂ en méthane. Beaucoup d'espèces hydrogénotrophes peuvent utiliser également le formate comme donneur d'électrons, mais les voies biochimiques exactes ne sont pas bien connues.
- 26% sont méthylotrophes : dont 13 espèces méthylotrophes obligatoires, elles utilisent les composés méthylés comme le méthanol, les méthylamines et le méthyldisulfure.
- 11% sont acétoclastes (ou acétotrophes) : Utilisent l'acétate comme substrat.
- 3% sont hydrogéo-méthylotrophes : utilisent le H₂ pour réduire le méthanol en méthane.
- Quelques espèces sont acloolotrophes : elles produisent du méthane en présence du CO₂ et de quelques alcools secondaires comme donneurs d'hydrogène.
- Les méthanogènes sont caractérisés par la présence de plusieurs coenzymes comme le facteur F430, le méthanofurane, la méthanopetrine, ou le coenzyme M, mais le plus particulier est le facteur F420, un transporteur d'électrons de bas potentiel responsable de la fluorescence des cellules exposées à une lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 420nm. Ce facteur intervient dans les réactions d'oxydo-réduction, plus précisément dans la réduction du NADP durant la méthanogénèse, il est associé à une enzyme, qui, en présence d'oxygène se dénature et devient de ce fait non fonctionnelle (Cheeseman et al, 1992).
- Les bactéries méthanogènes ne possèdent pas de peptidoglycane (Muréine) au niveau de leur paroi cellulaire (KANDLER et KONIG, 1978), en effet l'acide N-acétylmuramique qui compose ce polymère est remplacé par les résidus de l'acide N-acétyltalosaminuronique (Hammes et al., 1979).
- Tous les acides aminés sont présents sous la forme L (Garcia, 1998).

- La diversité écologique des espèces méthanogènes dépend de leur adaptation aux différentes conditions de température, de pH et de salinité.
 - Les gammes de température explorées varient de 4°C à 110°C, avec une seule espèce psychrophile, et une majorité d'espèces mésophiles (30-40°C) (Garcia, 1998).
 - Le pH varie entre 6 et 8 (Aucun isolat acidophile n'a été exploré (Garcia, 1998).
 - La salinité varie selon les espèces, les espèces marines sont les plus halophiles.

Annexe 4

Préparation des milieux de culture (King A, King B, BP, VP)

1 Préparation du milieu de culture King A

Composition du milieu de culture King A	45g/l
Peptone tryptique de gélatine (péptone A)	20g
Sulfate de potassium anhydre	10g
Chlorure de magnésium anhydre.....	1.4g
Agar	15g

Préparation du milieu de culture King A :

- Ajouter dans un bécher 8.1 g du milieu King A déshydraté à 180ml d'EDS et porter à ébullition sous agitation.
- Ajouter le milieu dans un flacon et procéder à la stérilisation dans un autoclave à 121 °C pendant 20 min.
- Répartir en boîtes de pétries et laisser refroidir le couvercle semi ouvert.

2 Préparation du milieu de culture King B

Composition du milieu de culture King B	43g/l
Polypeptone (Péptone B).....	20g
Sulfate de potassium anhydre	10g
Chlorure de magnésium anhydre.....	1,4g
Agar	15g

Préparation de la gélose King B:

- Ajouter dans un bécher 7.74 g du milieu King B déshydraté à 180ml d'EDS et porter à ébullition sous agitation.
- Ajouter le milieu dans un flacon et procéder à la stérilisation dans un autoclave à 121 °C pendant 20 min.
- Répartir en boîtes de pétries et laisser refroidir le couvercle semi ouvert.

3 Préparation du Milieu de culture Viande foie (VF)

Composition du milieu de culture VF.....	48g/l
---	--------------

Milieu de base :

Base viande foie.....	30g
Glucose.....	2g
Amidon.....	2g
Agar.....	11g

Annexes

Gélose complète :

Milieu de base auquel sont ajoutés :

Sulfite de sodium 5%.....	50ml
Alun de fer ammoniacal 5%.....	10ml

Préparation de la gélose Viande-foie (VF):

- Ajouter dans un bécher 2.88 g du milieu VF déshydraté à 60 ml d'EDS et porter le mélange à ébullition sous agitation.
- Ajouter le milieu dans un flacon et procéder à un autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

4 Préparation de la gélose nutritive (GN)

Composition du milieu	28g/l
Peptone pepsique de viande.....	5g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	15g

Préparation de la gélose nutritive (GN):

- Ajouter dans un bécher 5.04 g du milieu King A déshydraté à 180ml d'EDS et porter à ébullition sous agitation.
- Ajouter le milieu dans un flacon et procéder à la stérilisation dans un autoclave à 121 °C pendant 20 min.
- Répartir en boîtes de pétries et laisser refroidir le couvercle semi ouvert.

5 Préparation du milieu de culture Baird-Parker (BP)

Composition du milieu	33g/l
Milieu de base	
Tryptone.....	10g/l
Extrait de viande.....	5g/l
Extrait autolytique de levure.....	10g/l
Sodium pyruvate.....	10g/l
Glycine.....	12g/l
Lithium chlorure.....	5g/l
Agar.....	20g/l

Gélose complète

Annexes

Emulsion de jaune d'œuf.....	47ml
Tellurite de potassium à 3.5%.....	3ml

Préparation de la gélose BP:

- Ajouter dans un bécher 5.94 g du milieu BP déshydraté à 180ml d'EDS et porter le mélange à ébullition sous agitation.
- Ajouter le milieu dans un flacon et procéder un autoclavage à 121 °C pendant 20 min.
- Ajouter 3 ml d'émulsion de jaune d'œuf et 0.5ml de tellure de potassium au milieu quand sa température soit supportable à la pomme des mains, et mélanger lentement pour éviter la formation d'une mousse.
- Répartir le milieu en deux boîtes de pétri et laisser refroidir le couvercle semi ouvert.

6 Préparation de la gélose à l'amidon

Composition de la gélose

Peptone.....	5g/l
Amidon 1%	10g/l
Agar.....	10g/l

Préparation de la gélose d'amidon 1% :

- Dans un bêcheur contenant 180ml d'EDS ajouter 0.9 g de peptone, 1.8 g d'amidon et 1.8 g d'agar. Porter à ébullition sous agitation puis verser le milieu dans un flacon et procéder à un autoclavage à 121°C pendant 20 min.
- Répartir le milieu en boîtes de pétri et laisser refroidir le couvercle semi ouvert.

7 Préparation de la gélose au lait écrémé

Composition de la gélose

Milieu de base :

Gélose nutritive

Gélose complète

Lait écrémé	10ml
-------------------	------

Préparation de la gélose nutritive au lait écrémé:

- Dans un bêcheur contenant 180ml d'EDS ajouter 5.04 g de GN déshydraté. Porter à ébullition sous agitation puis verser le milieu dans un flacon et autoclaver à 121°C pendant 20mn.
- Ajouter 1.8ml de lait écrémé à l'aide d'une pipette graduée stérile et homogénéiser soigneusement pour ne pas former des bulles d'air.
- Répartir en boîtes de pétri et laisser refroidir le couvercle semi ouvert.

Annexe 5

Coloration de gram

Étapes de la coloration de gram:

1 Réalisation d'un frottis fixé:

- Nettoyer la lame du microscope à l'aide de l'alcool et du papier joseph
- Ajouter une goutte d'eau
- Prélever une colonie bactérienne à l'aide d'une anse en platine stérile et étaler la délicatement afin de ne pas détruire des parois bactériennes
- Sécher la lame au-dessus de la flamme du bec bunsen jusqu'à ce que l'eau s'évapore en la maintenant bien haute pour éviter qu'elle ne s'échauffe et se casse.
- Fixer le frottis en passant la lame 3 fois dans la flamme.

2 La coloration :

- Couvrir le frottis avec du Violet de Gentiane et verser l'excès dans le bac, laisser agir 1 minute et rincer à l'eau distillé
- Couvrir le frotti avec une solution de lugol pour fixer le violet de gentiane dans le cytoplasme des bactéries, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau
- Décolorer le frottis en ajoutant de l'acétone pendant 5 - 10 secondes. La paroi des bactéries gram positif est imperméable à l'alcool, les bactéries restent donc colorées en mauve contrairement aux bactéries gram négatif qui se décolorent.
- Contre colorer les bactéries gram négatif en couvrant la lame avec de la Fuchsine pendant 1 mn puis rincer à l'eau distillée
- Sécher la lame au-dessous de la flamme.

3 L'observation microscopique

- Observer au microscope à l'objectif X40 en premier lieu afin de déterminer le champ de vision puis ajouter une petite goutte d'huile d'immersion et passer à l'objectif X100.

Annexe 6

Test de l'oxydase et de la catalase

1 Test de l'oxydase

Étape du test oxydase:

- Placer un disque oxydase sur une lame propre à l'aide d'une pince flambée et l'imbiber avec une goutte d'EDS.
- Prélever une colonie bactérienne à l'aide d'une anse en platine ou d'une pipette pasteur boutonnée et frotter doucement le disque.
- Attendre 30 -60 secondes.

Lectures possibles

- Apparition d'une couleur violette: la bactérie possède l'enzyme, test positif
- Aucun changement de couleur: la bactérie ne possède pas l'enzyme, test négatif.

2 Test de la catalase

Étape du test de la catalase:

- Sur une lame propre déposer une colonie bactérienne prélevée à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une anse de platine.
- A l'aide d'une pipette graduée, déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 3% sur la colonie.

Lectures possibles

- Observation immédiate d'effervescence: la bactérie possède la catalase, test positif.
- Absence d'effervescence: la bactérie ne possède pas la catalase, test négatif.