

Module 58 :



Optimisation de la boue activée d'une station d'épuration

Projet réalisé en partenariat avec l'entreprise Emin Leydier pour l'obtention du BTS
ANABIOTEC



Emin Leydier

Fiche de synthèse

Notre M58 consistait à identifier, isoler et tester la bactérie la plus présente, dans les bassins aérobies de la station d'épuration d'Emin Leydier, afin de permettre à cette entreprise d'optimiser l'épuration de ses eaux usées. Le M58 est un projet de recherche, effectué en seconde année de BTS. Il a pour but de permettre aux élèves de compléter leur expérience professionnelle, du fait que le stage n'était pas forcément lié à la recherche.

1. Identification

Nous avons effectué des ensemencements de la boue activée sur milieu de culture PCA et Sabouraud. Le premier permettant la pousse de tous les micro-organismes, le second, uniquement des levures et moisissures. Après incubation, les colonies ainsi que leurs fréquences ont été répertoriées. Sur chaque type de colonie un gram a été effectué ainsi qu'une oxydase/catalase en fonction de la coloration obtenue. Ensuite, chaque type de colonie a été isolé sur milieu spécifique. Après incubation, il y a eu ensemencement de galerie approprié, afin de déterminer la bactérie en présence.

La bactérie la plus présente se trouve être un *Bacillus cereus*.

2. Bio réaction

Préparation du bio réacteur avec les eaux usées sortant des bassins anaérobies comme milieu de culture.

Passage du bioréacteur à l'autoclave pour stériliser le milieu.

Enrichissement des *Bacillus cereus*.

Lancement du batch avec inoculation de la souche bactérienne.

Réalisation d'un prélèvement toutes les heures pendant le temps consacré au M58 dans l'emploi du temps.

Nous avons également testé plusieurs méthodes pour doser l'amidon et la cellulose afin de vérifier si le milieu se dégradait au fil du temps mais toutes les tentatives pour doser ces glucides dans le bioréacteur, avec la présence de biomasse, ont échoué. Nous nous basons donc sur l'évolution de la biomasse et de la DCO. Pour la première, l'augmentation montre que les bactéries se développent dans le milieu. On remarque une réduction de DCO au cours du temps, indiquant une dégradation des polluants. Nous pouvons en conclure que la souche de bactérie que nous avons inoculée est bien à l'origine de la dégradation des polluants restant dans le bassin aérobie.

Table des matières

1. Introduction.....	1
2. Identification	2
2.1. Protocole	2
2.2. Résultats :.....	3
2.3. Choix de la souche :.....	4
2.4. Coût de l'analyse :	4
3. Bio réaction	5
3.1. Mise en place de la bio réaction	5
3.2. Inoculation et problèmes	5
3.3. Protocoles et suivis.....	5
3.4. Résultats	7
3.5. Coût des analyses	8
4. Interprétation finale	9
5. Conclusion	9
Annexe 1.....	10

1. Introduction

Notre groupe a travaillé avec la papeterie « Emin Leydier ». Cette papeterie qui fabrique du papier et carton ondulé, depuis 1859, a contacté notre lycée pour proposer le sujet suivant : identifier le micro-organisme le plus actif dans leurs bassins aérobie et vérifier son action sur l'épuration des eaux usées.

Emin Leydier est une entreprise papetière qui épure leurs eaux usées, avant de la rejeter dans le Rhône. Pour cela, elle a une STEP performante : (voir annexe 1)

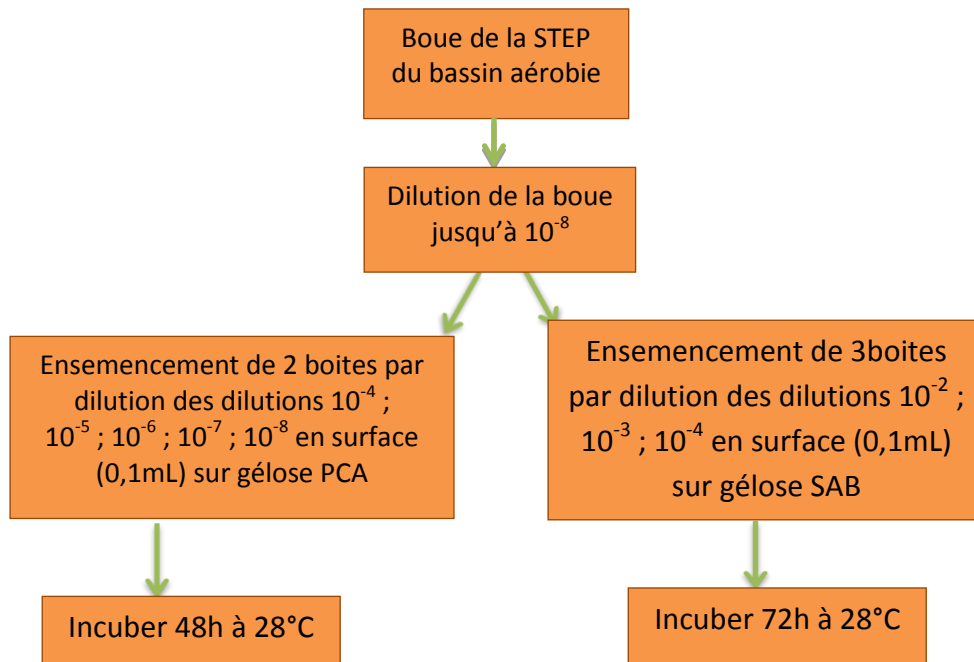
- Les eaux usées passent par des bassins anaérobies où les microorganismes produisent du biogaz par dégradation des « polluants ».
- l'eau continue son trajet vers les bassins aérobie, la dégradation des « polluants » s'y poursuit. C'est sur cette dernière étape de dégradation que notre sujet de M58 va porter.
- Les eaux passent ensuite par le clarificateur, avant d'être rejetées dans le Rhône.



Bassin d'aérobic de la STEP

2. Identification

1. Protocole



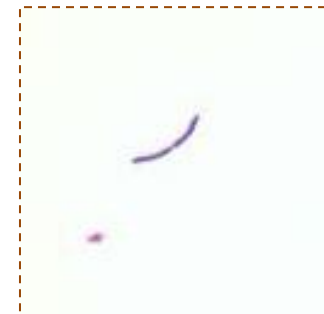
a. Identification des bactéries

Identification microscopique :

- Mettre une colonie dans de l'eau physiologique.
- Réaliser un étalement sur une lame propre
- Fixer le frottis à la lame
- Le laisser refroidir

Coloration de GRAM :

- Mettre la lame 1min dans un bain de violet de gentiane
- Rincer la lame
- Mettre la lame 1min dans un bain de lugol
- Passer la lame 5 secondes à l'alcool à 70°
- Passer la lame 30 secondes dans un bain de fushine
- Rincer la lame, puis la laisser sécher avant de l'observer au microscope à l'objectif $\times 100$



Observation de bacilles gram + ($\times 1000$) au microscope optique

Test respiratoire : effectué selon le gram et d'après une dichotomie

Test oxydase :

- dépôt d'un disque de test oxydase avec une goutte d'eau stérile pour le réhydrater
- dépôt d'une colonie prélevée sur milieu solide à l'aide d'une pipette pasteur
- s'il y a coloration du dépôt en violet/rose la bactérie est oxydase $^+$
- s'il n'y a pas de coloration la bactérie est oxydase $^-$

Test catalase :

- dépôt d'une goutte de réactif H₂O₂
- dépôt d'une colonie dans la goutte à l'aide d'une oese ou d'une pipette
- s'il y a un dégagement gazeux la bactérie est catalase⁺
- s'il n'y a aucune réaction la bactérie est catalase⁻

Milieu d'identification :

Les milieux d'identification ont été choisis selon l'orientation du gram et du test respiratoire.

- Milieu BEA : coque gram⁺ catalase⁻
- Milieu Chapman : coque gram⁺ catalase⁺
- Milieu VRBG : bacille gram⁻ oxydase⁻
- Milieu BCP : bacille gram⁺ catalase⁺



Galerie API 50CH

Galerie d'identification API :

- API 20E
- API STAPH + test coagulase
- API 50CH

b. Identification des levures et moisissures :

Identification microscopique : Etat frais réaliser avec du Bleu de Méthylène.

Milieu d'identification :

- Milieu Sabouraud

Galerie d'identification API :

- API 20C AUX pour les levures



Galerie API 20 AUX

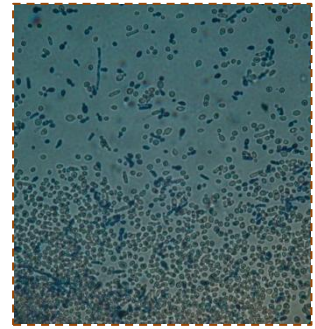
2. Résultats :

a. Souches bactériennes identifiées :

- *Staphylococcus haemolyticus* : coque gram⁺ catalase⁺, isolé sur milieu Chapman, identifié sur galerie API STAPH, coagulase⁻
- *K.pneum.ozanae* : bacille gram⁻, oxydase⁻, isolé sur milieu VRBG, identifié sur galerie API 20E
- *Aneurinibacillus aneurinilyticus* : bacille gram⁺, catalase⁺, isolé sur milieu BCP, identifié sur galerie API 50CH
- *Bacillus mycoïdes* : bacille gram⁺, catalase⁺, isolé sur milieu BCP, identifié sur galerie API 50CH
- *Bacillus cereus 1* : bacille gram⁺, catalase⁺, isolé sur milieu BCP, identifié sur galerie API 50CH

b. Souches de levures identifiées :

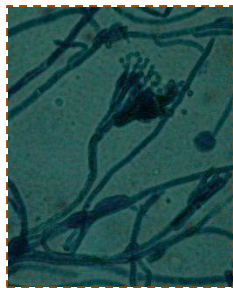
- Suspicion de *Cryptococcus albidus*
- Suspicion de *Rhodoturula rubra*
- Suspicion de *Geóotrichum klebahnii*
- Suspicion de *Trichosporon mucoïdes*
- Suspicion de *Candida tropicalis*
- Suspicion de *Candida guilliermondi*
- Suspicion de *Candida kefyr*
- Suspicion de *Candida inconspicua*



Observation des levures après coloration au bleu de Méthylène (×400)

c. Souches de moisissures identifiées :

- Souche 1 : filament non cloisonné, présence d'organe de fructification
- Souche 2 : filament cloisonné, présence d'organe de fructification, en forme de pinceau



Observation de la souche 2 de moisissures colorées au bleu de Méthylène (× 400)

3. Choix de la souche :

Nous avons choisi de mettre la souche de *Bacillus cereus* en culture car nous sommes partis du fait que la souche bactérienne, présente en plus grand nombre dans la boue, était celle qui dégrade le plus les acides gras volatils présents dans la boue. Or il est apparu que lorsque nous avons mis en culture la boue sur les boites, les colonies majoritairement présentes sont celles qui correspondent à *Bacillus cereus*.

4. Coût de l'analyse :

Le coût total de l'analyse pour l'identification des micro-organismes est de 20100,30 euros, et comprend 19675,00 euros d'appareils (spectrophotomètre, étuve, microscope avec appareil photo...), 104,47 euros de matériels consommables, 41,82 euros de milieux de cultures pour les micro-organismes, 39,00 euros de réactifs pour les colorations de gram et les réactifs pour les galeries, et enfin 240,02 euros de galerie d'identification (galerie API 20^E, 50CH, 20C AUX, STAPH).



Microscope optique avec appareil photo 4

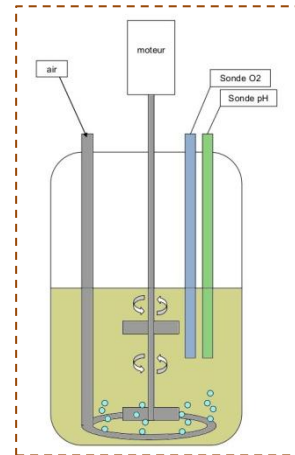
3. Bio réaction

1. Mise en place de la bio réaction

Pour notre bio réaction nous avons choisi de prendre de l'eau sortant du bassin d'anaérobie (avant qu'elle se jette dans le bassin aérobie) car c'est le milieu que doit dégrader la bactérie que nous avons sélectionnée.

Nous l'avons donc passée à l'autoclave, mais lors de l'autoclavage un tuyau s'est déclampé et nous avons eu une perte du milieu.

Schéma du bioréacteur



2. Inoculation et problèmes

Nous avons introduit la souche de *Bacillus cereus* pure qui a été précédemment isolée et remis en culture 24h à 30°C dans 100mL de bouillon BCC (Bouillon Cœur Cervele) pour la revivifier. Nous avons introduit les 100mL de cette souche aseptiquement dans le bioréacteur.

Lors de notre premier prélèvement à H0 nous avons effectué un dénombrement sur cellule de Malassez et nous nous sommes rendu compte qu'il y a eu une contamination dans le bioréacteur par des levures. Nous avons contrôlé la pureté de la souche avant son inoculation, donc nous pensons que cette contamination est due à l'autoclavage (car il y a eu un problème) ou alors les levures ont résisté à une température de 120°C (ce qui est peu probable).

3. Protocoles et suivis

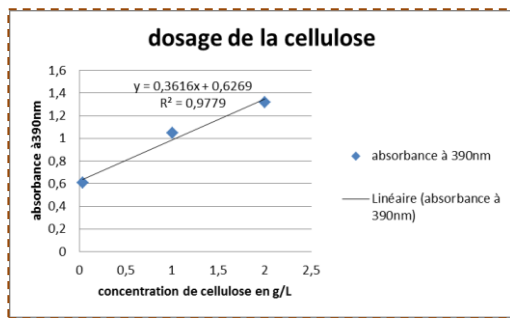
a. Prélèvement :

- A l'aide d'une seringue et du dispositif de prélèvement du bioréacteur en condition d'asepsie.

b. Dénombrement microscopique sur cellule de Malassez :

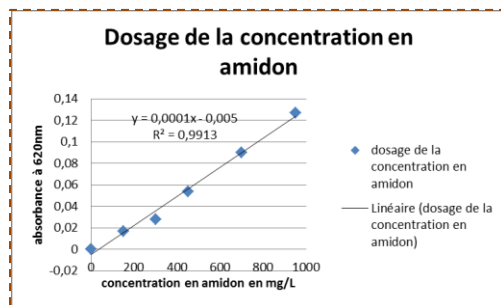
- Bien homogénéiser le prélèvement
- Introduire à l'aide d'une pipette pasteur de l'échantillon entre la lamelle et la cellule de comptage
- Dénombrer 4 carrés au microscope optique à l'objectif $\times 40$, puis faire la moyenne
- Calcul : $m \times 100 \times 1000$ Bactéries/mL d'échantillon (inclure une dilution si elle a été faite).

c. Dosage de la cellulose



Nous avons préparé une solution mère de cellulose puis nous avons fait des solutions filles à différentes concentrations. Nous les avons d'abord dosées seules, puis au Rouge Congo, et enfin nous avons essayé avec le Carmino-Vert dont le dosage a été concluant. Nous les avons ensuite passées au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 390nm (déterminée à l'aide d'un spectre d'adsorption du Carmino-Vert).

d. Dosage de l'amidon



Nous avons préparé une solution mère d'amidon puis nous avons fait des solutions filles à différentes concentrations. Nous les avons colorées avec de l'eau iodée. Puis nous les avons passées au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 620nm (déterminée à l'aide d'un spectre d'adsorption de l'iode).

Nous avons donc une droite d'étalonnage de la concentration en amidon en fonction de l'absorbance à 620 nm.

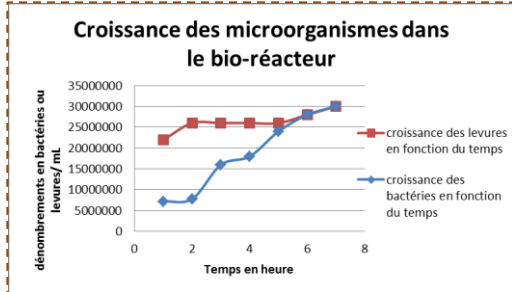
e. Dosage de la DCO

La demande chimique en oxygène (DCO) est la consommation en dioxygène par les oxydants chimiques forts pour oxyder les substances organiques et minérales de l'eau. Elle permet d'évaluer la charge polluante des eaux usées.

Le dosage de la DCO a été réalisé par le laboratoire de notre partenaire Emin Leydier, sur une gamme 1000/10000 mg/L (Microméthode LCK014 de HACH-LANGE) sur les prélèvements décantés.

4. Résultats

a. Biomasse



On voit que la croissance de *Bacillus cereus* n'a cessé d'augmenter avec le temps. Nous avons arrêté de dénombrer au prélèvement 8H car les *Bacillus cereus* formaient des chaînes très longues et complexes qu'il était très difficile de dénombrer. On voit que le nombre de levures n'a pas beaucoup augmenté.

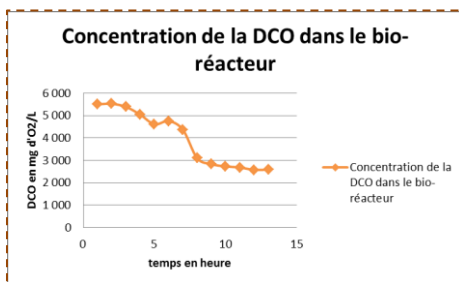
b. Cellulose

Nous avons essayé de doser la cellulose dans les prélèvements tout d'abord à l'aide du Carmino-Vert, mais l'absorbance était trop élevée. Nous avons ensuite effectué des dilutions, puis des filtrations pour enlever la biomasse, sans succès. Le dosage de la cellulose n'a donc pas pu être effectué sur les prélèvements du batch.

c. Amidon

Nous avons essayé de doser l'amidon dans les prélèvements tout d'abord à l'aide de l'iode, mais l'absorbance était trop élevée. Nous avons ensuite effectué des dilutions, puis des filtrations pour enlever la biomasse, sans succès. Le dosage de l'amidon n'a donc pas pu être effectué sur les prélèvements du batch.

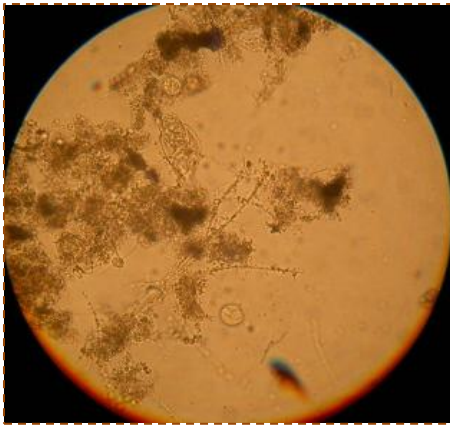
d. DCO



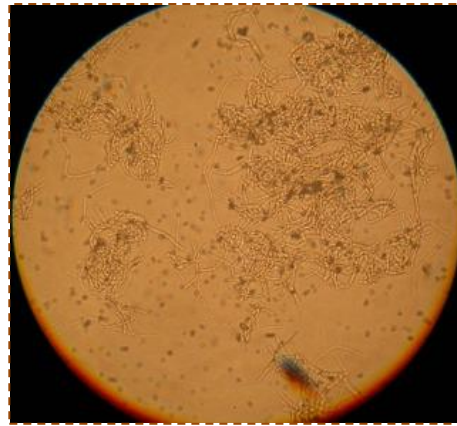
On voit que la DCO a diminué au cours du temps. Or, on sait que plus la concentration en DCO diminue, plus la pollution de l'eau est diminuée.

e. Comparaison

Nous avons décidé de comparer notre souche bactérienne de *Bacillus cereus* avec des bactéries filamenteuses pour être sûrs que nous ne cultivions pas des bactéries filamenteuses (qui est la « bête noire » des STEP). Nous avons fait pour cela des états frais :



Bactéries filamenteuses (×400)



Bacillus cereus(×400)

On voit bien la différence de morphologie entre les bactéries filamenteuses et les *Bacillus cereus*.

5. Coût des analyses

Le coût total de l'analyse pour la bio réaction est de 41096,68 euros, dont 41013,00 euros de matériels (bio fermenteur, étuve, spectrophotomètre...) 79,52 euros de matériels consommables et 4,16 euros de milieux de culture.

4. Interprétation finale

Nous avons tout d'abord réussi à identifier la bactérie la plus présente dans la boue du bassin aérobie qui s'est avérée être un *Bacillus cereus*. Nous n'avons pas réussi à identifier tous les germes que nous avons observés sur les boîtes grâce aux galeries API, sûrement car nous avons des germes non identifiables sur les galeries. En effet les galeries permettent d'identifier un grand nombre de germes mais pas tous car il en existe beaucoup qui sont encore aujourd'hui inconnus. De plus, ces galeries API sont essentiellement faites pour le monde médical et l'agroalimentaire, ce qui rend difficile l'identification des bactéries environnementales

Nous avons ensuite prouvé grâce à la bio réaction que notre souche isolée *Bacillus cereus* dégrade une partie des polluants car il y a une baisse conséquente de la concentration en DCO. Il semblerait que les levures n'influent pas sur la concentration de la DCO. Nous ne savons pas si c'est l'unique micro-organisme qui dégrade des polluants mais ce qui est sûr c'est que cette bactérie en dégrade une grosse partie.

Nous avons donc répondu à la problématique qui était d'identifier le micro-organisme le plus actif dans le bassin aérobie de la STEP de la papeterie Emin Leydier et vérifié son action sur l'épuration des eaux usées.

5. Conclusion

Ce que l'on peut dire, c'est que le test d'identifier, de développer et de réensemencer dans un milieu la bactérie la plus présente dans la boue a fonctionné. Nous avons, de plus, prouvé que *Bacillus cereus* dégrade les polluants présents dans les eaux usées.

Notre partenaire Emin Leydier est satisfait de nos résultats et compte poursuivre la collaboration avec d'autres élèves de notre lycée, l'année prochaine, afin de produire 1m³ de bouillon en essai industriel.

Annexe 1

