

# Analyse des Floccs Bactériens et de la Microfaune des Boues Activées par Analyse d'Image

M. Da Motta<sup>1</sup>, M. N. Pons<sup>1</sup>, N. Roche<sup>1</sup>, L. Amaral<sup>2</sup>, E. Ferreira<sup>2</sup>, M. Mota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Science du Génie Chimique, CNRS – INPL – ENSIC

1, rue Grandville , BP 541 , 54001 , Nancy cedex , France

<sup>2</sup>Centro de Engenharia Biológica IBQF, Universidade do Minho, P-4709 Braga, Portugal

## 1 Introduction

Le réacteur biologique d'une station de traitement d'effluents par boues activées est un véritable écosystème, formé par des bactéries et des protozoaires et créé par l'homme dans le but d'éliminer la pollution biodégradable. Les bactéries sont les principales responsables de l'élimination de la pollution. En s'en nourrissant, les protozoaires prédateurs aident à la flocculation, abaissent la turbidité et améliorent la qualité des effluents, tandis que d'autres espèces consomment directement la matière organique quand il n'y a pas de bactéries. Des nombreuses espèces connues de protozoaires, les ciliées sont les plus abondantes et sont utilisées comme indicateur de l'état d'une station [1,2,3].

Le comptage des protozoaires, en utilisant un microscope, est une tâche fastidieuse. Pour faciliter ce travail a été développé [4, 5] un programme pour la reconnaissance semi-automatique des protozoaires (ProtoRec V.0) sous Visilog5 (Noésis, Les Ulis), où chaque espèce a été identifiée selon des paramètres caractéristiques de sa forme. Des 12 espèces de protozoaires testées, plus de la moitié ont été bien ou raisonnablement isolées.

Cependant des essais de validation du logiciel réalisés pendant une période de l'année différente de celle utilisée par les auteurs de ProtoRec ont mis en évidence la présence régulière d'autres espèces de protozoaires. La quantité de bactéries filamenteuses était en outre assez importante, ce qui a causé des problèmes au logiciel initial. Pour ces raisons une seconde version a été développée (ProtoRec V.1), qui peut être utilisée en présence ou en absence de bactéries filamenteuses.

Les bactéries filamenteuses relient les floccs entre eux, provoquant le phénomène de "bulking" et diminuent la vitesse de décantation. Elles sont presque toujours présentes, mais leur absence provoque la formation de petits floccs, qui augmentent la turbidité de l'effluent. On doit alors contrôler sa qualité en utilisant, par exemple, du peroxyde d'hydrogène [6]. Le développement de grandes quantités de bactéries filamenteuses est, en général, dû à des excès de substrats préférentiels ou à des carences relatives en divers substrats au niveau du flocc. Il y a plusieurs espèces de bactéries filamenteuses avec, pour chacune, des facteurs spécifiques de développement [7]. La méthode traditionnellement utilisée pour mesurer la quantité des filaments est aussi le comptage. Pour optimiser cette détermination, un programme (FlocMorph V.0 sous Visilog5) a été développé: il permet de connaître la longueur et le nombre de filaments dans chaque image acquise, ainsi que les caractéristiques morphologiques du flocc.

## 2 Matériels et Méthodes

### *Acquisition des images*

Le système d'acquisition d'image est composé d'une caméra vidéo Hitachi CCTV modèle HV-720E(F) fixée à un microscope Leitz Dialux 20 et d'une carte d'acquisition Matrox implantée dans un PC. Ce système est présenté dans la figure 1.



Figure 1 - Système d'acquisition et traitement d'image

Pour l'acquisition des images des flocs bactériens (grandissement x10) ainsi que pour celles des protozoaires (grandissement x25 ou x40), une goutte de liqueur mixte, prélevée sur la station de traitement des eaux usées du Grand Nancy, est placée sur une lame de verre.

### *Décantabilité*

Parallèlement les paramètres classiques de décantabilité ont été calculés à partir de la méthode de Kynch. Dans une éprouvette de 10 litres, on a mesuré l'évolution de la hauteur du front de décantation en fonction du temps et calculé la vitesse terminale de chute libre, les indices  $n$  et  $k$  des modèles puissance et exponentiel, ainsi que l'indice de Mohlmann (SVI).

### *Le Programme ProtoRec V.1*

Les principales étapes du programme sont présentées dans la figure 2.

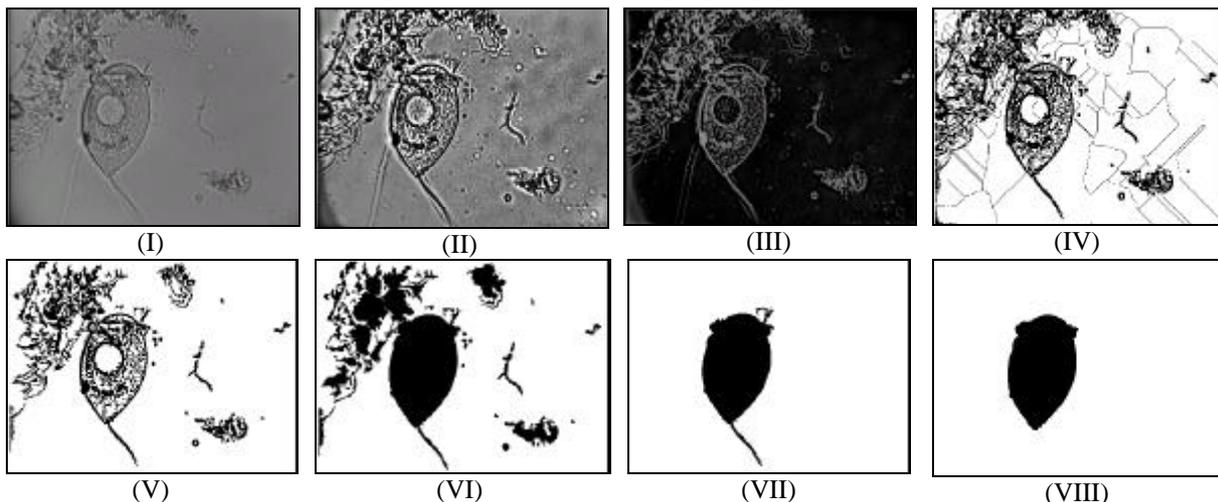


Figure 2 – Étapes de ProtoRec V.1

(I) Image Initiale ; (II) Rehaussement des contours ; (III) Suppression du fond pour éliminer le halo ; (IV) Segmentation automatique et séparation des flocs, (V) Suppression d'une partie des flocs et premier nettoyage ; (VI) Remplissage des protozoaires et séparation des flocs (VII) Suppression des flocs ; (VIII) Suppression des flagelles ou petits filaments attachés

Les paramètres utilisés pour caractériser le protozoaire sont sa taille (surface projetée en  $\mu\text{m}^2$ ), son allongement, son excentricité et sa circularité. Une base de données a été construite et l'identification est basée sur une analyse en composantes principales.

### Programme *FlocMorph V.0*

Jusqu'à la segmentation automatique il est semblable à *ProtoRec*. Ensuite on supprime les floccs initiaux et on repère chaque élément pour obtenir ainsi les filaments. Les floccs sont ensuite eux-mêmes repérés et analysés (taille, allongement, circularité, dimension fractale).

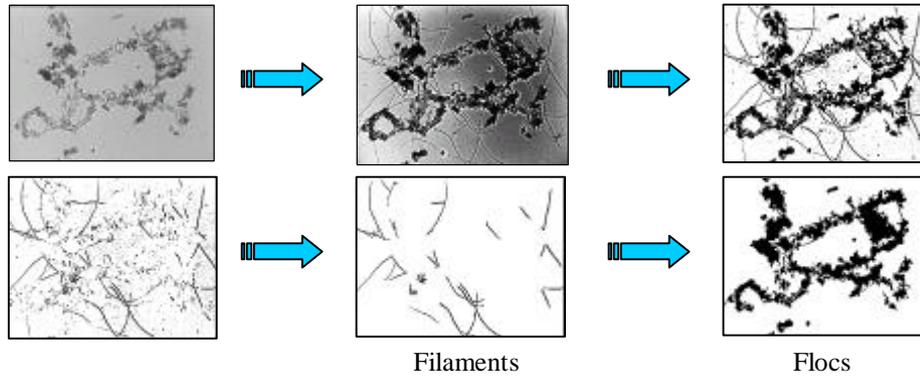


Figure 3 – Etapes du programme *FlocMorph*

## 3 Résultats et Discussions

En analysant les résultats des essais de décantabilité, on a trouvé une bonne corrélation entre H30 (hauteur de boue dans l'éprouvette après 30 minutes de décantation) et la vitesse de chute libre (Figure 4a). L'indice de Mohlman n'est pas corrélé avec la vitesse, mais, par contre, avec le paramètre  $n$  du modèle exponentiel (Figure 4b)

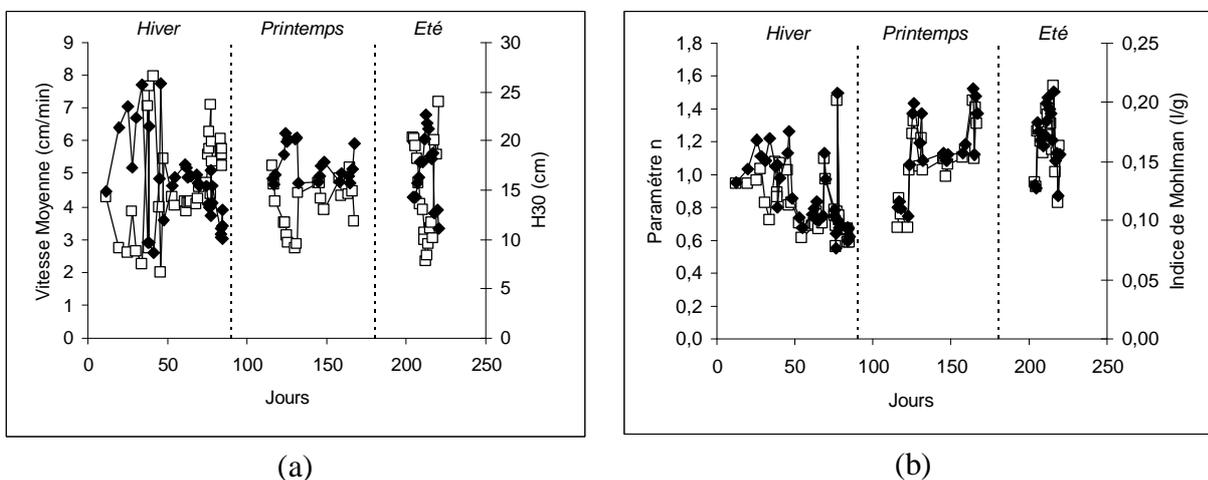


Figure 4 – Variation de la vitesse moyenne ( $\square$ ) et H30 ( $\blacklozenge$ ) (a) et de l'indice de Mohlman ( $\blacklozenge$ ) et du paramètre  $n$  du modèle exponentiel ( $\square$ ) en fonction du temps.

Il n'y a pas de corrélation entre la surface projetée occupée par les floccs par image et la concentration en matière en suspension, mais cela peut être dû à des erreurs sur le volume de la goutte examinée. Ni le nombre de filaments par image (Figure 5a) ni la longueur de filament par image (Figure 5b) ne sont corrélés de façon simple avec l'indice de Mohlman (indices de corrélation linéaire de 0.23 et 0.27).

Le programme ProtoRec V.1. a permis de pouvoir caractériser une dizaine de nouvelles espèces de protozoaires ce qui va enrichir la base de données. Cependant, compte tenu des constantes de temps de l'écosystème, une validation complète demandera encore quelques mois.

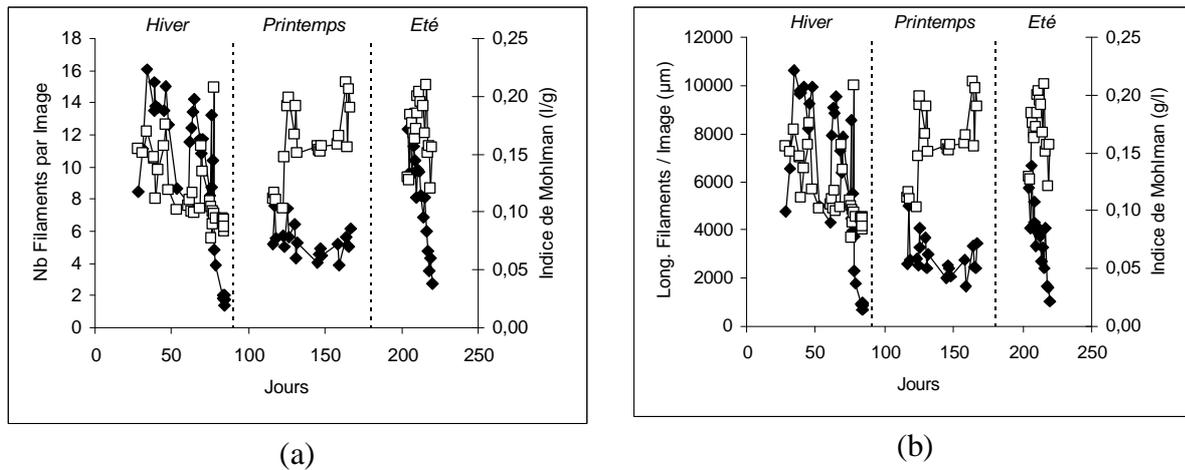


Figure 5 – Evolution de l'indice de Mohlman (□) et du nombre de filament par image (◆) (a) et de la longueur de filament par image (◆) (b)

#### 4 Conclusions

Des procédures automatiques et semi-automatiques de quantification des bactéries filamenteuses et de caractérisation des floccs bactériens et des protozoaires présents dans les boues activées de stations d'épuration ont été développées. Elles fournissent des outils permettant une analyse systématique, rapide et fiable des boues activées dont les résultats peuvent être utilisés pour en caractériser l'état microbiologique.

#### 5 Bibliographie

- [1] MADONI, P. (1994) A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge, *Wat. Res.* **28**:67-75
- [2] CURDS, C. R., COCKBURN, A., VANDIKE, J.M. (1968) An Experimental Study of the Role of the Ciliated Protozoa in the Activated-Sludge Process, *Wat. Pollut. Control*, **67**:312-329
- [3] NICOLAU, A., LIMA, N., MOTA, M., MADONI, P. (1997) Os Protozoários como Indicadores da Qualidade das Lamas Activadas, *Boletim de Biotecnologia*, **56**
- [4] AMARAL, A. L. P. (1998) Reconhecimento Semi-Automatico de Protozoários por Análise de Imagem in : Desenvolvimento de Técnicas de Análise de Imagem para Aplicação em Processos Biotecnológicos, M. Sc. Thesis, Dept. Biological Engineering, Minho University, Portugal.
- [5] AMARAL, A.L., BAPTISTE C., PONS, M.N., NICOLAU, A., LIMA, N., FERREIRA, E.C., MOTA, M., VIVIER, H. (1999) Semi-automated recognition of protozoa by image analysis, *Biotechnology Techniques*, **13**:111-118
- [6] SEZGIN, M., JENKINS, D. (1978) A Unified Theory of Filamentous Activated Sludge Bulking, *J.-Water Pollut. Control Fed.*, **50**:362-381
- [7] DUCHENE, P., COTTEUX, E. (1998) La Problématique des Dysfonctionnements Biologiques : Bulking et Moussage Biologique en Boues Activées, *Tribune de l'Eau*, **55**: 59-66.

Remerciements : Les auteurs remercient pour leur soutien le Conseil National de Développement Scientifique et Technologique du Brésil (CNPq), l'Ambassade de France au Portugal et l'ICCTI.