



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة حسيبة بن بوعلي

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté de Technologie

كلية التكنولوجيا

Département de Génie des Procédés

قسم هندسة الطرائق

Laboratoire Eau et Environnement
Laboratoire Eau et Environnement

مخبر الماء و البيئة

Mémoire de fin d'études

En Vue de l'obtention du diplôme de Magister (Ecole Doctorale)

Spécialité : *sciences de l'eau et développement durable*

Thème

Impact environnemental et valorisation du lactosérum par procédé biologique

Présenté par

AYADI KHADIDJA

17 Décembre 2014

Devant le jury composé de :

Président	Pr. Labbaci Abdallah	Professeur	UHBC
Examineur	Pr. Allam Rachida	Professeur	UHBC
Examineur	Mr. Mahmoudi Larbi	Maitre Assistant (A)	UHBC
Directeur de thèse	Dr. Kouadri Moustefai Soumia	Maitre de conférences (A)	UHBC
Co-directeur de thèse	Dr. Meziane Malika	Maitre de conférences (B)	UHBC

Remerciements

Nous rendons grâce à Allah le Tout puissant, le clément le miséricordieux, qui nous a permis de voir ce jour solennel. Nous le prions de nous guider sur le droit chemin qui mène au Paradis.

A notre prophète Mohamed Rassouloulahi (Paix et salut sur lui), sa famille, ses compagnons et tous ceux qui suivent son chemin jusqu'au dernier jour.

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur du laboratoire « Eau et environnement », Pr Ouagued Abdallah qui a eu la bienveillance de parrainer l'école doctorale « Eau et environnement ».

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au directeur de cette thèse, Dr Kouadri Moustefai Soumia pour sa disponibilité, ses conseils ainsi que la confiance qu'elle m'a témoignée tout au long de la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également à Dr Meziane Malika pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé avec beaucoup de patience et d'enthousiasme.

J'exprime toute ma gratitude au Pr Labbaci Abdallah pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également aux Pr Allam Rachida pour avoir accepté d'examiner ce travail et de prendre part au jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Mr Mahmoudi Larbi qui a eu la gentillesse de lire et corriger ce travail.

Tout particulièrement, j'adresse mes remerciements aux Dr Abdi Abdallah, Dr Douani Mustapha, Dr djafar Lahcene, Mme Elcherif Faiza et Mme Thabti Merieme qui m'ont encouragé et conseillé au long de ce travail.

Les personnels des laboratoires d'analyses de la laiterie de Sidi Saâda, ADE-Chlef, départements de génie des procédés et de biologie sont vivement remerciés.

J'adresse aussi mes remerciements à tout le groupe de doctorants, Chahira, Fouzia, Zohra, Safia, Elbatoul, Dalila et Merieme sans oublier les mastérants : Zahra, Fatima, Zoulikha, Karima, Hassiba, Hakima et Asma.

J'exprime ma profonde considération et toute ma gratitude à tous mes enseignants à partir de l'école primaire jusqu'à l'université.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A ma mère. Je te dédie ce modeste travail, faible témoignage de ma tendresse et de ma profonde reconnaissance pour tes sacrifices et dévouements. Nous prions le tout puissant pour qu'il t'accorde longévité, santé et bonheur ;

A mon cher père qui m'a appris qu'il faut profiter au maximum de la vie et qu'il ne faut jamais oublier nos rêves ;

كن عالما او معلما او متعلما او محبا و لا تكن خامسا فتهلك

A mon cher mari qui a toujours respecté mes décisions, qui m'a toujours soutenu inconditionnellement de tous côtés ;

A mon cher grand-père et mes chères grand-mères ;

A mes chers beaux parents ;

A mes adorables anges : Mohammed Elfateh, Meriem Elbatoul et Ahmed Yacine ;

*A tous les membres de la famille **AYADI, KARDI** et **ELMILOUDI**: frères, sœurs, belles sœurs, beaux frères, oncles, tantes, neveux et nièces.*

A cette occasion ;

*Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à mon mari **KHALED** qui m'a soutenu, aidé et encouragé énormément tout au long de ce travail.*

Je clos ces remerciements en dédiant ce travail à mes amies que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés, qui m'ont soutenu tout au long de ces années.

Table des Matières

LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	8
CHAPITRE I : POLLUTION INDUSTRIELLE DE L'EAU.....	10
I.1. POLLUTION DE L'EAU.....	10
I.2. TYPES DE POLLUTION DE L'EAU.....	10
I.3. EVALUATION DE LA POLLUTION.....	11
<i>I.3.1. Facteurs clés d'une évaluation des dangers par pollution.....</i>	<i>11</i>
<i>I.3.2. Estimation de la pollution de l'eau.....</i>	<i>11</i>
CHAPITRE II : PREAMBULE SUR L'INDUSTRIE LAITIERE EN ALGERIE.....	18
II.1. ETAT DES LIEUX DU SECTEUR LAITIER SELON LE MINISTERE DE L'AGRICULTURE (2013).....	18
II.2. TECHNOLOGIE LAITIERE.....	19
<i>II.2.1. Composition du lait.....</i>	<i>19</i>
<i>II.2.2. Propriétés physico-chimiques du lait.....</i>	<i>20</i>
<i>II.2.3. Les principaux groupes de produits laitiers.....</i>	<i>21</i>
II.3. ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES A LA TECHNOLOGIE LAITIERE.....	21
II.4. LACTOSERUM.....	23
<i>II.4.1. Composition moyenne du lactosérum.....</i>	<i>23</i>
<i>II.4.2 Importance du lactosérum en Algérie.....</i>	<i>26</i>
<i>II.4.3 Caractéristiques du lactosérum.....</i>	<i>26</i>
<i>II.4.4 Valorisation du lactosérum.....</i>	<i>27</i>
CHAPITRE III. PROCEDES DE FERMENTATION ET BIOREACTEURS.....	29
III.1 FERMENTATION.....	29
<i>III.1.1 Définitions.....</i>	<i>29</i>
<i>III.1.2 Types de fermentation.....</i>	<i>31</i>
III.2 FERMENTEURS OU BIOREACTEURS.....	31
<i>III.2.1 Définition.....</i>	<i>31</i>
<i>III.2.2 Description du bioréacteur.....</i>	<i>31</i>
<i>III.2.3 Procédés de cultures.....</i>	<i>31</i>
<i>III.2.4 Systèmes immobilisés.....</i>	<i>33</i>

III.3.1. Définition.....	39
III.3.2. Détermination des besoins nutritifs	39
III.3.3. Cinétiques de la croissance bactérienne	39
III.3.4. PARAMETRES DE LA CROISSANCE UTILISES LORS DE LA PRODUCTION	40
CHAPITRE IV: CADRE EXPERIMENTAL	43
IV.A. CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DES REJETS LIQUIDES DE LA LAITERIE DE SIDI SAADA.....	43
IV.A.1. EVALUATION SOMMAIRE DES DANGERS ECOLOGIQUES DES EFFLUENTS LIQUIDES.....	43
IV.A.2. SITE EXPERIMENTAL ET POINTS DE PRELEVEMENT	43
IV.A.2.1. Présentation de la laiterie	43
IV.A.2.2. Points de prélèvement	45
IV.A.3. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	47
IV.A.4. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE.....	48
B. VALORISATION DU LACTOSERUM VIA LA PRODUCTION DE L'ETHANOL.....	49
IV.B.1. MATERIELS.....	49
IV.B.1.1. Matériels biologiques.....	49
IV.B.1.2. Matériels non biologique.....	49
IV.B.2. PROCEDURES EXPERIMENTALES	50
IV.B.2.1. Préparation des milieux et leur conservation.....	50
IV.B.2.2. Isolement et purification des levures.....	50
IV.B.2.3. Analyse physicochimique du substrat (lactosérum brut et traité)	52
IV.B.2.4. Supports d'immobilisation.....	54
IV.B.2.5. Suivi de fermentation alcoolique	58
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS	62
V.A. EVALUATION SOMMAIRE DES DANGERS ECOLOGIQUES DES EFFLUENTS LIQUIDES ..	62
V.B. REJETS LIQUIDES INDUSTRIELS	62
V.B.1. CARACTERISATION ORGANOLEPTIQUE.....	62
V.B.2. CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE	64
V.B.2.1.Température.....	64
V.B.2.2. Le potentiel hydrogène (pH).....	65
V.B.2.3. La salinité	66
V.B.2.4. La turbidité	67
V. B.2.5. Oxygène dissous.....	68

<i>V. B.2.6. Distribution de la matière organique</i>	69
<i>V. B.2.7. Distribution des sels nutritifs</i>	75
<i>V. B.2.8. Eléments majeurs</i>	79
<i>V. B.2.9. Les graisses et les huiles</i>	84
V. B.3. PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES	85
V. B.4. DISCUSSION GENERALE	87
V.C. FERMENTATION DU LACTOSERUM	89
V.C.1 PREPARATION DU MILIEU DE FERMENTATION	89
V.C.2 ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU GENRE SACCHAROMYCES SP.	90
V.C.3 FERMENTATION EN BATCH A CELLULES LIBRES	95
<i>V.C.3.1 Etude de la croissance des deux souches</i>	95
<i>V.C.3.2. Evolution du pH</i>	97
<i>V.C.3.3. Evolution de la consommation des sucres et production d'éthanol</i>	97
V.C.4. LA FERMENTATION EN BATC A CELLULES IMMOBILISEES	100
<i>V.C.4.1. Formation du biofilm</i>	100
<i>V.C.4.2. Suivi de la fermentation</i>	102
V.C.5. ETUDE COMPARATIVE	106
CONCLUSION GENERALE	108
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111

Liste des Figures

Figure II- 1 : Composition du lait.....	20
Figure II- 2: Les différentes étapes de l'élaboration du lait traité thermiquement	22
Figure II- 3: Les différentes étapes de l'élaboration de la crème et du beurre	22
Figure II- 4: Aspects environnementaux du processus d'élaboration du fromage	23
Figure III. 1: La glycolyse	30
Figure III. 2: Les différents modes de fonctionnement d'un bioréacteur industriel ou bioréacteur naturel	33
Figure III. 3 : Classification des systèmes d'immobilisation selon quatre classes	35
Figure III. 4: Les quatre classes de cellules immobilisées	36
Figure III. 5: Cinq réacteurs à cellules immobilisées	37
Figure III. 6: Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases	39
Figure IV. 1: Plan de l'infrastructure de la laiterie de Sidi Saâda (2014).	44
Figure IV. 2: Station d'épuration et milieu récepteur (2014).....	45
Figure IV. 4: Le lactosérum acide provenant de la laiterie de Sidi Saâda.	49
Figure IV. 5: Diagramme d'isolement des souches	51
Figure IV. 7: Dispositif de fermentation en culture discontinue "batch" à cellules libres.	59
Figure IV. 8: Dispositif de fermentation en culture discontinue "batch" à cellules immobilisées à 30°C, 100 trs/min pendant 7 jours	60
Figure V- 1: La variation spatiotemporelle de la température des échantillons.	64
Figure V- 2: La variation spatiotemporelle du pH des échantillons.....	66
Figure V- 3: La variation spatiotemporelle de la salinité des échantillons.	67
Figure V- 4: La variation spatiotemporelle de la turbidité des échantillons.	68
Figure V- 5: La variation spatiotemporelle de teneur en oxygène dissous dans les échantillons.	69
Figure V- 6: La variation spatiotemporelle de DBO ₅ des échantillons.	70
Figure V- 7: La variation spatiotemporelle de DCO des échantillons.	71
Figure V- 8: La variation spatiotemporelle de DCO/DBO ₅ des échantillons.....	72
Figure V- 9: La variation spatiotemporelle de Matière Organique (MO) des échantillons.	72
Figure V- 10: La variation spatiotemporelle de matière en suspension(MES) des échantillons.	73
Figure V- 11: La variation spatiotemporelle des résidus secs (RS) des échantillons.	74
Figure V- 12: La variation spatiotemporelle de l'ammonium (NH ₄ ⁺) des échantillons.	75
Figure V- 13: La variation spatiotemporelle de Nitrite (NO ²⁻) des échantillons.	76
Figure V- 14: La variation spatiotemporelle de Nitrate (NO ₃ ⁻) des échantillons	77
Figure V- 15: La variation spatiotemporelle de Phosphore total (PT) des échantillons.....	78
Figure V- 16: La variation spatiotemporelle d'Ortho-phosphates (PO ₄ ³⁻) des échantillons.	78
Figure V- 17: La variation spatiotemporelle du Calcium (Ca ²⁺) des échantillons.....	79
Figure V- 18: La variation spatiotemporelle du Magnésium (Mg ⁺⁺) des échantillons.....	80
Figure V- 19: La variation spatiotemporelle des Chlorures (Cl ⁻) des échantillons.....	81
Figure V- 20: La variation spatiotemporelle du Sodium (Na ⁺) des échantillons.....	82
Figure V- 21: La variation spatiotemporelle de Potassium (K ⁺) des échantillons.	83

<i>Figure V- 22: La variation spatiotemporelle de Sulfates (SO₄²⁻) des échantillons</i>	<i>83</i>
<i>Figure V- 23: La variation spatiotemporelle des graisses et huiles des échantillons.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure V- 24: variation spatio-temporelle des coliformes totaux.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure V- 25: variation spatio-temporelle des coliformes fécaux.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure V- 26: variation spatio-temporelle des streptocoques fécaux</i>	<i>86</i>
<i>Figure V- 27 : Lactosérum brut et du lactosérum autoclavé (de gauche à droite).</i>	<i>90</i>
<i>Figure V- 28: Observation macroscopique des 8 types de colonies de levures isolées à partir du lactosérum et levure commerciale après 5 jours d'incubation à 30°C.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure V- 29: levure commerciale à l'état frais (Observation microscopique grossissement x 100)...</i>	<i>93</i>
<i>Figure V- 30: Coloration de Gram de la levure commerciale (Observation microscopique grossissement x 100).</i>	<i>93</i>
<i>Figure V- 31: Saccharomyces sp à l'état frais (Observation microscopique grossissement x 100).</i>	<i>93</i>
<i>Figure V- 32: Coloration de Gram de Sacharomyces sp. (Observation microscopique grossissement x 100).....</i>	<i>93</i>
<i>Figure V- 33: Evolution de la croissance des cellules en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique à cellules libres à 30°C, sous une agitation de 100t/min.</i>	<i>95</i>
<i>Figure V- 34: Evolution du pH en fonction du temps dans les deux milieux de culture au cours de la fermentation alcoolique à cellules libres à 30°C, sous une agitation de 100 trs/min.</i>	<i>97</i>
<i>Figure V- 35: Consommation des sucres en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique à cellules libres, sous une agitation de 100 trs /min.</i>	<i>98</i>
<i>Figure V- 36: Evolution de la production de l'éthanol en fonction du temps au cours de la fermentation à cellules libres, sous une agitation de 100trs /min</i>	<i>99</i>
<i>Figure V- 37: Evolution du pH en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (sp) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène à 30°C.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure V- 38: Evolution du pH en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (Sc) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène à 30°C.</i>	<i>103</i>
<i>Figure V- 39: Evolution du taux de sucres consommé en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (sp) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène PE à 30°C.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure V- 40: Evolution du taux de sucres consommé en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (Sc) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène PE à 30°C.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure V- 41 : Evolution de la production de l'éthanol en fonction du temps cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (sp) sur pouzzolane, noyaux d'olive et polyéthylène PE à 30°C.....</i>	<i>105</i>
<i>Figure V- 42: Evolution de la production de l'éthanol en fonction du temps cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (Sc) sur pouzzolane, noyaux d'olive et polyéthylène PE à 30°C.....</i>	<i>106</i>

Liste des Tableaux

<i>Tableau I- 1: Principales causes de la pollution des eaux</i>	10
<i>Tableau II- 1: Composition des différents types de lactosérum</i>	24
<i>Tableau II- 2: Composition en acides aminés essentiels de différentes protéines</i>	25
<i>(en g/100g de protéines)</i>	25
<i>Tableau II- 3: Composition moyenne du lactosérum en minéraux</i>	26
<i>Tableau II- 4: Composition moyenne de lactosérum en vitamines</i>	26
<i>Tableau IV- 1 : Gamme de produits et capacités de la laiterie de Sidi Sâada</i>	45
<i>Tableau IV- 2: Résumé des méthodes d'analyses chimiques</i> ,	47
<i>Tableau IV- 3: Composition chimique élémentaire de la pouzzolane de Beni Saf-Algérie</i>	55
<i>Tableau IV- 4: Caractéristiques physiques de la pouzzolane</i>	55
<i>Tableau IV- 5: Composition chimique des noyaux d'olive et amande</i>	56
<i>Tableau IV- 6: Propriétés du polyéthylène (Techniques de l'ingénieur)</i>	56
<i>Tableau IV- 7: Détermination des paramètres d'alimentation par milieu au cours de la fermentation continue</i>	61
<i>Tableau V- 1 : Valeurs préliminaires de quelques paramètres physico-chimiques</i>	62
<i>Tableau V- 2: Caractéristiques organoleptiques</i>	63
<i>Tableau V- 3: Classes de turbidité usuelles (NTU, nephelometric turbidity unit)</i>	67
<i>Tableau V- 4: Niveau moyen de contamination des effluents urbains par les bactéries</i>	87
<i>Tableau V- 6 : Isolement des levures à partir des différents échantillons de lactosérum</i>	91
<i>Tableau V- 7: production de l'éthanol</i>	94
<i>Tableau V- 8: production de la biomasse</i>	94
<i>Tableau V- 9: Le rendement d'extraction des sucres et de leur métabolisation en éthanol</i>	98
<i>Tableau V- 10: Formation du biofilm sur les noyaux d'olives, pouzzolane et polyéthylène après immobilisation pendant 72 h</i>	100
<i>Tableau V- 11: Formation du biofilm en milieu lactosérum</i>	101
<i>Tableau V- 12: Formation du biofilm au milieu OGA bouillon nutritif</i>	101
<i>Tableau V- 13: la porosité et densité des supports</i>	101
<i>Tableau V- 14: Bilan de la métabolisation d'éthanol au cours de la fermentation en batch à cellules libres et en continu à cellules immobilisées sur 3 supports avec 900ml de volume réactionnel durant 72h</i>	107

Liste des abréviations

°D: Degrés Dornic	MS : Matière sèche.
ADE : Algérienne des eaux.	N : Normalité.
ADP: Adénosine Diphosphate.	N.O : Noyaux d'olives
ATP: Adénosine Triphosphate.	NTU : Néphelometric Turbidity Unit (unité de mesure de la turbidité).
CE : Commission européenne.	OD : oxygène dissous.
COV : composés organiques volatiles	OGA bouillon nutritif : Oxytétracycline Glucose Agar (bouillon nutritif).
Cp : concentration du paramètre	OROLAIT : L'Office Régional Ouest du lait
CPL : Concentrés de Protéines du Lactosérum	PE : Polyéthylène
DBO, DBO ₅ : La demande Biochimique en Oxygène.	PSU : Practical Salinity Unit (unité de mesure de la salinité)
DCO : Demande Chimique en Oxygène.	P _T : Phosphate total
EPE : entreprise publique économique	Pz : Pouzzolane
GIPLAIT : Groupe Industriel pour la Production de Lait	SARL : société à responsabilité limitée
HR : Humidité Relative.	Sc : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> commerciale
IAA : Industries Agroalimentaires	Sp : <i>Saccharomyces</i> sp. isolées du lactosérum
JORADP : journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire.	SPA : société par action
Kg/J : Kilogramme par jour	STEP : Station d'épuration des eaux usées
M : Molarité.	UFC : unité formant colonie
Mat Oxy : matière oxydable.	Vs : valeur seuil
MES : Matières en suspension.	
MG : Matière grasse	
Mm : milimole	
MO : matière organique	

Introduction

Introduction générale

Actuellement, la préservation de l'environnement constitue l'un des sujets majeurs à étudier et à cerner de très près et ce à l'échelle de tout le globe terrestre. A travers tous les pays, qu'il s'agisse de nations développées ou celles des pays en voie de développement. Les gouvernements ont pris conscience de la gravité du danger inhérent à la dégradation de l'écosystème en général et de l'environnement urbain en particulier [1, 2].

L'intérêt accordé à la valorisation des déchets ainsi que les sous-produits agricoles et industriels est de plus en plus croissant [3]. Ceci est lié à la fois à la crise d'énergie, à la diminution des ressources mondiales en matières premières et à la législation qui devient de plus en plus sévère concernant la protection de la nature et de l'environnement.

Les résidus représentent une source d'énergie importante et disponible à moindre coût avec des possibilités d'être renouvelés et stockés. Le projet qu'apportera cette valorisation est évident puisque les matières premières jusqu'à présent en grande partie inutilisées ou mal exploitées ou source de coût supplémentaire pour les collectivités [3].

Parmi les déchets les moins valorisés en Algérie, le lactosérum, sous-produit rejeté dans la nature qui met en péril son équilibre écologique. Une attention particulière a été accordée aux fermentations visant la récupération de ce déchet agro-industriel et sa transformation en éthanol [4] à forte plus-value afin d'alléger la facture nationale de son importation par notre pays. Aussi, ce domaine constitue une avenue de recherche intéressante dont la fermentation anaérobie en offre la possibilité.

La valorisation du lactosérum via la production de l'éthanol par immobilisation cellulaire sur un support solide semble être une alternative adéquate et prometteuse. Ce travail vise à proposer un outil de valorisation du lactosérum par un procédé qui réduit le caractère polluant de ce sous-produit.

Nous rappelons que dans ce contexte, des études en vue de produire l'éthanol, dans un bioréacteur à cellules immobilisées sur des supports ont été faites en utilisant autres matières alimentaires telles que la mélasse, les rejets de glands, les rejets de figes sèches et les rejets d'amidonnerie. Les résultats obtenus, nous ont encouragés à croire qu'il y a une possibilité d'utiliser le lactosérum et d'améliorer la productivité et le rendement.

Les différents chapitres traduisent fidèlement le cheminement de cette thèse comme suit :

➤ Caractérisation de la production au niveau de la laiterie sise à Relizane.

- Caractérisations physico-chimiques et microbiologiques du lactosérum rejeté par cette laiterie.
- Etude des performances des levures isolées à partir de plusieurs déchets écologiques.
- Suivi de la cinétique de la production de l'éthanol en batch à cellules libres.
- Suivi de la cinétique de la production de l'éthanol en continu à cellules immobilisées sur pouzzolane, noyaux d'olive et polyéthylène.

Partie I

Aperçu

bibliographique

Chapitre I

La pollution industrielle de l'eau

Chapitre I : Pollution industrielle de l'eau

Le monde a connu un développement très important dans le secteur industriel tandis qu'il y a toujours des risques et des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé publique. Pour cela, les écologistes et les biologistes se sont intéressés depuis longtemps aux procédés et techniques qui servent à limiter la pollution engendrée par les industries.

I.1. Pollution de l'eau

Une eau est dite polluée lorsque ses qualités sont dégradées, perturbant la vie aquatique et rendant son utilisation dangereuse pour l'homme et les animaux. Cette dégradation résulte de la présence de polluants en quantité suffisante pour qu'ils puissent être nocifs [5-11].

I.2. Types de pollution de l'eau

Il a été distingué plusieurs types de pollution d'origine domestique, agricole et industrielle classés selon la source et la nature de l'agent causal (Tableau I- 1).

Tableau I- 1: Principales causes de la pollution des eaux [7, 8].

Type de pollution	Nature chimique	Source ou agent causal
Physique		
Thermique	Rejets d'eau chaude	Centrales électriques
Radioactive	Radio-isotopes	Installations nucléaires
Chimique		
Par les fertilisants	Nitrates, Phosphates	Agriculture, lessive
Par des métaux et métalloïdes toxiques	Mercure, Cadmium, Plomb, Aluminium, Arsenic, etc.	Industries, agriculture, Combustions, (pluies acides)
Par les produits pesticides	Insecticides, herbicides, fongicides	Agriculture, industrie
Par les détersifs	Agents tensioactifs	Effluents domestiques
Par les hydrocarbures	Pétrole brut et ses dérivés (carburant)	Industrie pétrolière, transport
Par des composées organochlorée	P.C.B, insecticides, solvants chlorés	Industrie
Par les autres composés organiques de synthèse	Très nombreuses molécules	Industries (usages dispersifs pour certains)
M O fermentescibles	Glucides, lipides, protides	Effluents domestiques, agricoles, d'industries agroalimentaires, papeteries
Biologique		
Microbiologique	Bactéries, virus, Entériques, champignons	Effluents urbains, Elevages, secteur Agro-alimentaire.

I.3. Evaluation de la pollution

I.3.1. Facteurs clés d'une évaluation des dangers par pollution

Les dangers potentiels ou réels liés à la présence d'une pollution sont évalués en trois facteurs qui sont la source, le vecteur et la cible [5, 9].

- Source de pollution : elle peut être mono- ou poly- produit, diffuse ou concentrée, organique minérale ou radioactive, d'origine chronique ou accidentelle.
- Vecteur de pollution : les voies de transport de dispersion des contaminants sont multiples dont la propagation dans les eaux de surface, dans l'air, par infiltration dans le sol et par l'eau souterraine (nappe phréatique) est capitale.
- Cible de pollution : elle peut être, tour à tour ou simultanément, milieu physique, biologique ou socioéconomique, avec des effets immédiats ou différés portant atteinte à des individus et leur diversité. Deux cibles sont identifiables en fonction de leur proximité par rapport à une pollution détectée : le site lui-même et l'entourage plus ou moins immédiat [5, 9].

I.3.2. Estimation de la pollution de l'eau

Toutes les eaux industrielles qui forment les effluents contiennent de nombreuses molécules différentes qu'il est impossible d'identifier et de quantifier individuellement et de manière exhaustive [7].

La caractérisation de manière globale et pertinente du niveau de pollution présent dans les effluents réside à des déterminations des volumes rejetés et la quantité de matière contenant principalement du carbone, de l'azote et de phosphore. Cela n'exclut pas qu'une attention particulière soit portée ponctuellement sur d'autres éléments (les métaux lourds: fer, chrome, zinc, arsenic, cadmium...).

I.3.2.1. Paramètres organoleptiques

- Couleur : liée au déversement de composés chimiques solubles présentant une coloration marquée [12]. Elle est normalement grisâtre, la couleur noire indique une décomposition partielle des autres teintes qui sont d'origine industrielle. La coloration d'une eau est due tant à des substances minérales et organiques dissoutes qu'à des particules en suspension.
- Odeur : une eau destinée à l'alimentation doit être inodore. En effet, toute odeur est un signe de pollution ou de la présence de matières organiques en décomposition [12]. L'eau d'égout fraîche à une odeur fade qui n'est pas désagréable, une odeur nauséabonde

indique une eau qui commence à fermenter par stagnation soit dans le réseau d'égout soit avant rejet [13, 14].

- Saveur : la saveur est liée surtout aux MES (argiles, algues...etc.) sauf dans les eaux très douces et acides notamment l'acide humique[15].

I.3.2.2.Paramètres physico-chimiques

- Potentiel hydrogène (pH) : cologarithme de la concentration des ions hydrogène dans l'eau, exprime l'acidité ou l'alcalinité [12]. la valeur du pH permet de déterminer l'acidité, la neutralité ou la basicité de l'eau, autrement dit la concentration en ions hydrogène. Cette valeur est définie par l'échelle suivante :

- pH de 0 à 6.9 : acide ;
- pH 7 : neutre ;
- pH de 7.1 à 14 : basique.

- Température : c'est un facteur écologique important du milieu, elle influe sur la densité de l'eau [12].

Dans les eaux naturelles et au-dessus de 15°C, il y a risque de croissance accélérée de micro-organismes, d'algues, entraînant des goûts et des odeurs désagréables ainsi qu'un changement de la couleur et de la turbidité. De plus, comme la solubilité des gaz diminue lorsque température augmente, la teneur en oxygène dissous diminue, ce qui est néfaste pour la faune, la flore et pour les facultés d'autoépuration de l'eau [16].

- Salinité : elle est définie comme la somme des matières minérales en solution contenues dans une eau, après conversion des carbonates en oxydes, après oxydation de toutes les matières organiques et après remplacement des iodures et bromures par une quantité équivalente de chlorure. La salinité est inférieure au résidu sec filtrable et elle est exprimée généralement en (PSU). Elle est liée à la conductivité de l'eau, à sa masse volumique et à la teneur équivalente en chlorures [12].

- Conductivité : c'est un indicateur de minéralisation de l'eau. Une eau riche en solutés à une conductivité élevée [17].

- La conductivité électrique des eaux apporte de précieux renseignements sur leur richesse en électrolytes dissous, sa mesure donne une indication rapide que l'analyse chimique, qui peut la renforcer et la préciser [17].
- Oxygène dissous (OD) : il est présent dans l'eau mais n'est pas un élément constitutif. Sa solubilité est en fonction de la température, de la pression partielle dans l'atmosphère et de la salinité. La teneur d'OD varie en fonction de l'origine de l'eau et dépasse rarement 10mg l^{-1} . Les eaux superficielles peuvent en contenir des quantités relativement importantes proches de la saturation [12]. L'oxygène se dissout mieux dans les eaux froides que dans les eaux chaudes.
- Turbidité : les deux propriétés optiques les plus importantes des eaux naturelles sont la couleur et la turbidité. Cette dernière est une notion plus subjective que la notion de couleur ; elle est définie comme l'inverse de la limpidité ou de la transparence. Une eau turbide est plus ou moins trouble. Cette turbidité est liée à des particules en suspension dans l'eau qui diffusent la lumière. Leur origine peut être extrêmement variable tels que l'érosion des roches et l'entraînement des matières minérale ou organique. Plus les particules sont nombreuses, plus le degré de turbidité augmente. La forme, la taille et la composition des particules influencent le degré de turbidité [18-20].
- Matières en suspension (MES) : Ce paramètre (exprimé en mg/l) correspondront à la pollution insoluble particulaire, c'est-à-dire à la totalité des particules solides véhiculées par les eaux résiduaires (représentant le poids, le volume et la nature des particules) [21].
- Demande biochimique en oxygène (DBO_5) : Elle représente la quantité de pollution biodégradable. Cette méthode d'analyse de la pollution correspond à la quantité d'oxygène nécessaire, pendant 5 jours, aux MO (bactéries) contenus dans l'eau pour oxyder une partie des matières carbonées [22].
Elle fournit une des indications importantes permettant de juger de la qualité d'une eau et de son degré de pollution organique. Par contre, c'est un test reconnu trop peu précis pour qualifier les eaux naturelles mais très utilisé pour surveiller l'efficacité des stations d'épuration [23].

- Demande chimique en oxygène (DCO) : Elle représente la quantité totale de pollution oxydable et correspond à la quantité d'oxygène qu'il faut fournir grâce à des réactifs chimiques puissants, pour oxyder les matières contenues dans l'effluent [24].

Il s'agit d'un des paramètres spécifiques que l'on utilise pour déterminer la concentration des polluants principaux. C'est une mesure globale des matières organiques et de certains sels minéraux oxydables (pollution organique totale), à la différence de la DBO₅, qui ne prend en compte que les matières organiques biodégradables. Cette analyse rapide sert essentiellement à la surveillance des eaux usées et des rejets industriels.

Pour l'analyse d'un prélèvement donné, sa valeur est toujours supérieure à celle de la DBO₅, car elle mesure une plus grande quantité d'oxygène (La DCO représente l'ensemble des matières oxydables et la DBO₅ représente la part des matières organiques biodégradables. La différence entre la DCO et la DBO₅ représente la charge en matières organiques peu ou pas biodégradable [12].

- Rapport DCO/DBO₅ : Ce rapport évalue la biodégradabilité d'une eau usée, c'est à dire la faculté de transformation de la matière organique en matière minérale, admissible par le milieu naturel.

Pour un effluent à dominante domestique, ce rapport est généralement compris entre 2 et 3. Pour les effluents d'industries agroalimentaires, il est inférieur, de l'ordre de 1,5 à 2, ce qui traduit une meilleure biodégradabilité. Enfin, lorsqu'il est supérieur à 3 cela traduit l'apport d'un effluent industriel plus ou moins difficilement biodégradable [12].

- Matières oxydables : c'est un paramètre utilisé par les agences de l'eau pour caractériser la pollution organique de l'eau. Il se définit à partir de la DBO₅ et de la DCO, selon la formule [21] :

$$\text{Mat O}_{xy} = (2\text{DBO}_5 + \text{DCO})/3$$

- Azote global (N_{GI}) : c'est la quantité d'azote (exprimé en g.N/l) qui correspond à l'azote organique et ammoniacal et aux formes oxydées de l'azote (nitrites et nitrates) [21].
- Azote Kjeldahl (N_{TK}) : c'est la quantité d'azote (exprimé en g.N/l) correspondant aux formes réduites de l'azote (azote organique et azote ammoniacal) [21].

L'azote présent dans l'eau peut avoir un caractère organique (protéines, acides aminées, urées) ou minéral (ammoniaque, nitrates, nitrites). L'azote Kjeldahl représente seulement la forme réduite et ammoniacales de l'azote :

$$N_{\text{Total}} = \underbrace{N_{\text{Organique}} + N_{\text{NH}_4^+}}_{\text{Azote réduit (Kjeldahl)}} + \underbrace{N_{\text{NO}_2^-} + N_{\text{NO}_3^-}}_{\text{Azote oxydé}}$$

- L'ammonium (NH_4^+) est la forme d'azote la plus toxique. Sa présence dans l'eau est liée soit aux rejets urbains et industriels dans les oueds qui donnent des concentrations élevées soit par réduction des formes azotées (nitrates et nitrites) [12].
- Nitrites (NO_2^-) : c'est une forme intermédiaire qui résulte de l'oxydation des matières organiques azotées. Ils ne se maintiennent que dans les milieux peu oxygénés, car ils sont instables et ayant une tendance à s'oxyder en nitrates [21].
- Nitrates (NO_3^-) : Les sels minéraux de l'acide nitrique et les nitrates sont des éléments minéraux nutritifs tant pour les organismes autotrophes terrestres qu'aquatiques. Leur teneur est variable suivant la saison et l'origine des eaux, ils sont dangereux si la concentration atteint 90 ppm [25-27].
- Phosphore totale (P_T) : présent sous formes organique et inorganique est converti en ortho-phosphate ($P\text{-PO}_4$). Il est présent sous forme dissoute et colloïdale (ortho phosphate assimilable par les bactéries durant leur phase de croissance) et sous forme particulaire qui regroupe le phosphore incorporé dans les organismes et le phosphore associé à des particules minérales [28, 29].
- Matière organique : il faut considérer qu'une eau de surface polluée par des matières organiques arrive à la suite de transformations physiques, chimiques et biologiques à se débarrasser spontanément des éléments nocifs qu'elle contient [30]. C'est le phénomène de l'autoépuration qui parvient à préserver le milieu tant que la pollution demeure en dessous d'un seuil critique. La destruction des matières organiques se traduit généralement par une minéralisation donnant naissance à des produits oxygénés tels que H_2O_2 , CO_2 ou NO_3 . Elle sera sous la dépendance de nombreux facteurs, tels que la

richesse du milieu en oxygène et la température, qui règlent la multiplication et l'activité microbiennes.

- **Eléments minéraux majeurs :** Ils sont souvent désignés sous le nom de sels minéraux, bien que leur toxicité soit très réduite, ils peuvent jouer un rôle écologique important [31].
 - Le calcium joue un rôle important dans la dureté de l'eau, elle est souvent exprimée par la dureté ou titre hydrotimétrique (T.H exprimés en degrés français) [12]. Dans la nature, le calcium est présent dans la composition du calcaire et du gypse. La dissolution de ces deux roches libère les ions de Ca^{++} . La dissolution ou la précipitation du calcaire dépend de la teneur en CO_2 et du pH. La teneur en calcium (et magnésium). Il peut avoir un effet néfaste sur certains organismes (incrustations calcaires). Les apports en carbonate de calcium permettent de neutraliser certains milieux acides et d'éviter la présence de composés dissous toxique [32, 33].
 - Le magnésium constitue un élément significatif de la dureté de l'eau. A partir d'une concentration de 100mg.l^{-1} et pour des sujets sensibles, le magnésium donne un goût désagréable. La présence d'autres constituants comme le fer, le manganèse ou l'aluminium qui peuvent apporter une contribution à la dureté totale mais leur concentration n'est généralement pas très importante [34].
 - Le sodium, sous forme de chlorure de sodium, a une grande importance alimentaire et industrielle. Le sodium est un élément constant de l'eau, toutefois, les concentrations peuvent être extrêmement variables allant de quelques dizaines de milligrammes à 500mg/L et même au-delà de cette valeur. Du point de vue agricole, le sodium est un élément des bases alcalines et alcalinoterreuses jouant un rôle dans le maintien de la perméabilité des sols pour l'irrigation [12].
 - La teneur en potassium est constante dans les eaux naturelles ne dépassant pas habituellement 10 à 15 mg/L. Le seuil de perception gustative du chlorure de potassium se situe à environ 20 fois cette valeur. Certains rejets industriels, en particulier de mines de potasse et d'usines d'engrais, peuvent entraîner dans l'eau des quantités de potassium relativement importantes [35].
- **Huiles, graisses, hydrocarbures :** ces composés ont essentiellement pour conséquence une diminution des transferts d'oxygène atmosphérique avec une incidence notable sur la

qualité biologique de l'eau superficielle définie en réalité par la quantité d'oxygène qu'elle contient [36].

- Silice : L'ion silicate SiO_3^{2-} n'est présent qu'à pH élevé, supérieur à 10. Dans les eaux naturelles, la silice peut se trouver à des teneurs environ de 1 à 50 mg. l⁻¹ [31].
- Sulfure de fer : La décomposition de la matière organique consomme l'oxygène dissous dans l'eau, avant de provoquer une réduction des sulfates. Le H_2S ainsi produit réagit avec certains minéraux riches en fer, pour former du sulfure de fer insoluble, de couleur noire, qui se dépose en enduits sur le fond du lit des cours d'eau [37]. Des conditions anaérobies règnent lors d'une surcharge en matières organiques, par des eaux usées ou des feuilles mortes, et lors de la consommation simultanée d'oxygène par les phénomènes de dégradation.
- Autres

La composition des effluents industriels est extrêmement variable en fonction de l'activité industrielle [12]. En effet, d'autres paramètres engendrent des rejets polluants tels que :

- Des métaux lourds ;
- Des éléments radioactifs ;
- De l'eau chaude ;
- Des produits chimiques divers.

I.3.2.3. Paramètres microbiologiques

Les entérobactéries, les virus et les parasites sont les trois principaux groupes couramment sélectionnés comme germes témoin de contamination fécale des rejets [38]. Les coliformes totaux et fécaux se présentent sous forme de bacilles Gram négatif non sporogènes, oxydase négative, aéro-anaérobies facultatifs, capables de fermenter le lactose avec production d'acide organique et de gaz à 37 °C [39-41]. Les streptocoques fécaux sont des bactéries *coccie* Gram positif, sphériques à ovoïdes formant des chaînettes, ne possèdent pas de catalase mais possèdent la structure antigénique caractéristique du groupe D [42].

Chapitre II

Préambule sur l'industrie laitière

Chapitre II : Préambule sur l'industrie laitière en Algérie.

II.1. Etat des lieux du secteur laitier selon le ministère de l'agriculture (2013)

560 millions de litres de lait cru ont été collectées en 2011, soit une production évaluée à 42% de l'objectif tracé, à savoir 1,4 milliard de litres, sachant que l'Algérien consomme en moyenne 120 litres de lait par an, contre 85 litres pour les Tunisiens et seulement 65 pour les Marocains. Sur le plan de l'importation de la poudre de lait, l'Etat avait dégagé une enveloppe de 40 milliards de dinars tout en mettant fin aux perturbations de distribution qui avaient touché plusieurs régions du pays, avec un plan de stockage de poudre de lait importé suffisant pour couvrir la demande du marché intérieur jusqu'à presque la fin de l'année 2012

L'Etat prévoit une importation de 25.800 vaches laitières afin de ne plus importer de lait. Et pour cause, les importations de lait coûtent à l'Etat 700 millions de dollars par an. En Algérie, la production laitière, est estimée à près de 2 milliards de litres par an, provient principalement de l'élevage bovin laitier qui oscille entre 1,2 et 1,4 million de têtes. Entre 1983 et 1997, il a été enregistré une chute de 24% du cheptel bovin, qui est passés 1.255.000 têtes et, avec le plan national de développement agricole et rural (PNDRA) lancé par le gouvernement en 2000, les grosses contraintes liées à la production laitière et au développement de l'élevage bovin ont été plus au moins surmontées.

Les pouvoirs publics ont accordé plusieurs facilités financières pour secourir le secteur qui était déjà en souffrance en octroyant des primes d'incitation à la production fixée à 7DA le litre et une prime à la collecte de lait cru de 4DA par litre. Des résultats encourageants ont été enregistrés dans nombre d'unités de transformation, mais la facture des importations reste tout de même élevée. L'Etat algérien avait mobilisé ces dernières années de gros moyens financiers dans le but de réduire la facture des importations en lait et dérivés qui avait atteint 1,28 milliard de dollars en 2008 alors qu'en 2009 elle était de l'ordre de 862 millions de dollars, un recul dû à la baisse des prix de la matière première sur le marché international.

En 2009, l'Algérie avait importé 121 000 tonnes de poudre de lait et, en 2010, la facture des importations des produits laitiers était de 52 millions de dollars. L'ONIL (Office National Interprofessionnel de Lait), chargé de faire la répartition des quotas de poudre de lait importée d'Allemagne ou d'Italie par les pouvoirs publics au profit d'une centaine de laiteries du pays, distribue une grosse part à ceux de l'Algérois alors que cette filière compte 13.000 éleveurs, 129 laiteries et 650 collecteurs. L'Etat accorde des subventions directes pour encourager la production laitière de 21DA/litre distribuées entre l'éleveur (12DA), le

collecteur (5DA) et le transformateur (4DA). Or, les dérivés du lait, notamment les crèmes glacées, les yaourts et autres comme les fromages, qui sont préparés à base de lait, ne sont pas soutenus par l'Etat. Ces dérivés ont été lancés par des grandes laiteries comme Soummam, Danone, Yoplait, Hodhna et autres. Le marché algérien est dominé par la marque Soummam avec plus de 45% des parts du marché contre 23% pour Danone. A cet égard, il faut savoir que les services du ministère de l'Agriculture ont fait état d'une production globale de 2,6milliards de litres de lait cru à la fin de 2010, soit une croissance de près de 5% par rapport à 2009. Tout laisse à penser que la poudre de lait distribuée en quantité insuffisante aux producteurs et aux transformateurs a déjà causé une réelle insuffisance, selon plusieurs commerçants, dans la distribution de lait en sachet et une pénurie à travers plusieurs régions de l'est du pays alors que l'Etat a accordé à cette filière très importante une subvention de l'ordre de 12 milliards de dinars. Un important potentiel de transformation.

Le marché de transformation est surtout détenu par Candia Algérie, une société issue du partenariat de la société française et l'ancienne entreprise de soda Tchou Tchou, avec 79% des parts du marché, soit une production de 200.000litres par jour. Les collecteurs, quant à eux, font beaucoup d'efforts pour faire durer l'activité. Il faut noter qu'une vache laitière peut donner 20litres par jour avec une ration d'aliment avoisinant les 4quintaux par mois. Concernant les produits laitiers, le groupe Giplait, qui dispose d'une capacité de production de 30millions de litres de lait pasteurisé et de 600 000litres de lait fermenté, domine le marché. Son unité fromage de Draâ Ben Khedda est la plus importante dans la production de produits laitiers de la wilaya de Tizi Ouzou. Le marché du fromage est dominé par quelques marques, notamment la Vache qui rit, le Berbère le Tassili et la Jeune vache alors que les plus grands producteurs de yaourt en Algérie sont Danone, Soummam, Yoplait et Trèfle.

II.2. Technologie laitière

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée [43]. Il doit être recueilli d'une façon propre et ne pas contenir de colostrum. La fabrication des produits laitiers nécessite plusieurs étapes : traitement thermique, homogénéisation, stérilisation et enfin refroidissement et conditionnement.

II.2.1. Composition du lait

La composition du lait [44-46] est représentée sur la Figure II- 1.

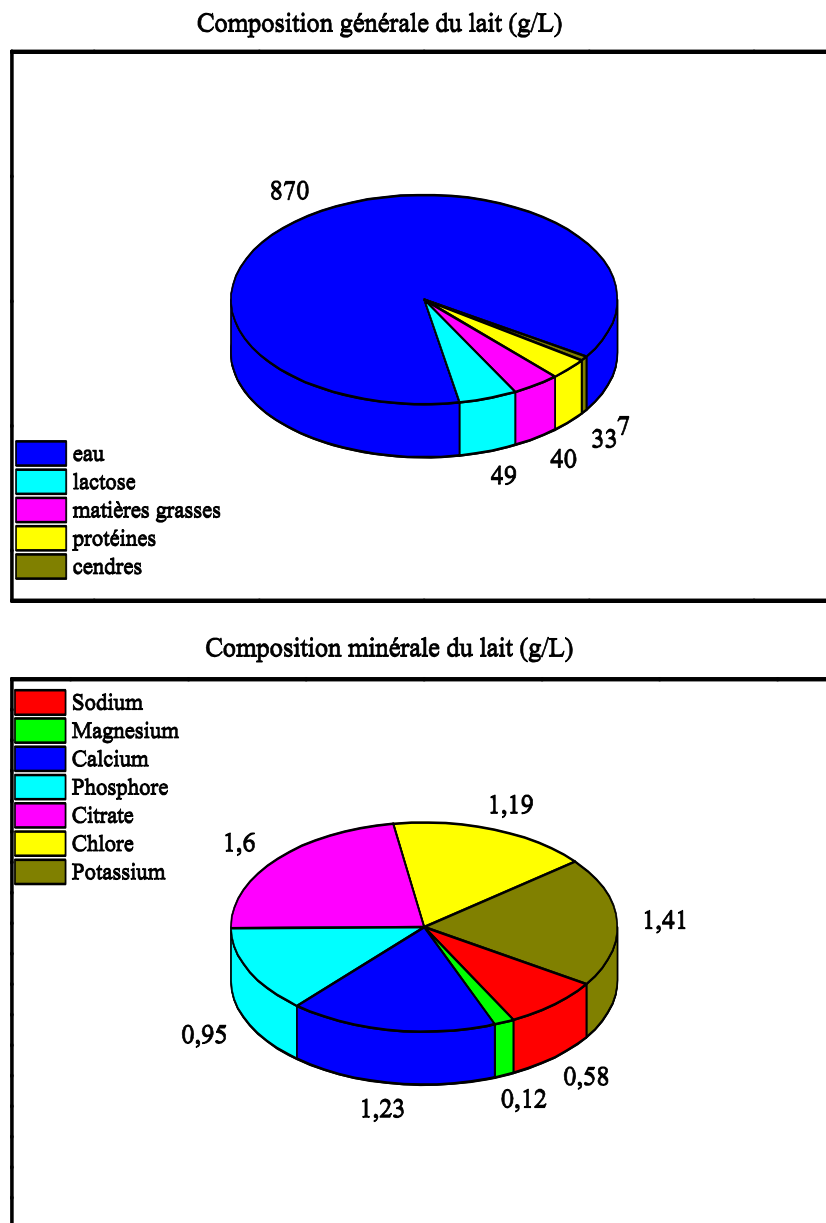


Figure II- 1 : Composition du lait

II.2.2. Propriétés physico-chimiques du lait

Les principales propriétés physico-chimiques utiles dans l'industrie laitière sont [47, 48] :

- La densité du lait à 15°C varie de 1,028 à 1,035 pour une moyenne de 1,023
- Le pH se situe entre 6,6 et 6,8 qui représente l'état de fraîcheur du lait, plus particulièrement en ce qui concerne la stabilité des protéines, c'est-à-dire l'atteinte du point isoélectrique.
- L'acidité du lait frais vrai entre 0.13 et 0.17% d'équivalent d'acide lactique, et degrés Dornic (°D) vrai entre 16 °D et 18°D.
- Le point de congélation du lait est légèrement inférieure à celui de l'eau avec une moyenne à -0.5°C.

- Le point d'ébullition est légèrement supérieure à celui de l'eau, soit 100,5°C.

II.2.3. Les principaux groupes de produits laitiers

Le produit laitier est un produit obtenu à la suite d'un certain traitement du lait qui peut contenir des additifs alimentaires et autre ingrédients fonctionnellement nécessaires au traitement [47, 48].

Les principaux groupes de produits laitiers sont :

- Lait de consommation directe;
- Produits obtenus à partir de la graisse du lait (crème et beurre);
- Lait fermentés (yaourts);
- Fromages;
- Sous-produit laitiers (lactosérum acide et doux; babeurre).

II.3. Aspects environnementaux associés à la technologie laitière

Les principaux aspects environnementaux de l'industrie laitière concernent une consommation importante d'eau et d'énergie.

Il est important de souligner que la quantification de ces aspects peut varier d'une installation à l'autre en fonction de certains facteurs tels que la taille, l'âge de l'installation, les équipements, la manipulation, les plans de nettoyage, la sensibilisation des employés...etc. Les principaux effets sur l'environnement issus de la production du lait traité thermiquement sont présentés ci-dessous (Figure II- 2).

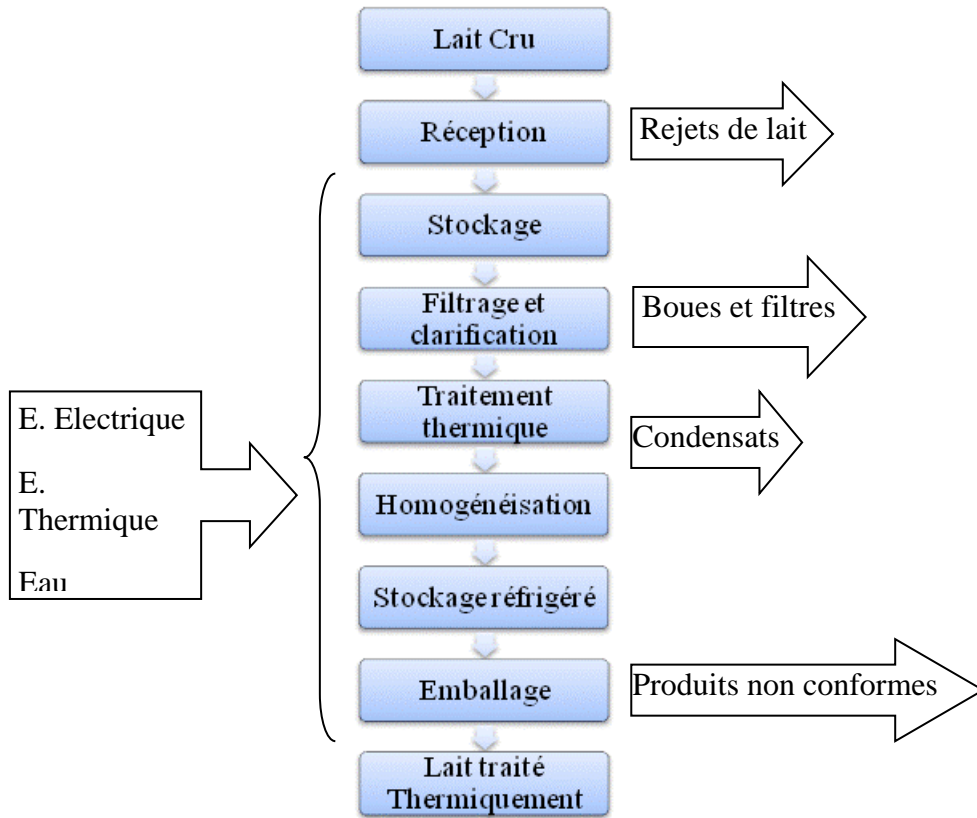


Figure II- 2: Les différentes étapes de l'élaboration du lait traité thermiquement [48]
 Les principaux effets environnementaux dérivés de la production de crème et de beurre sont présentés ci-dessous (Figure II- 3).

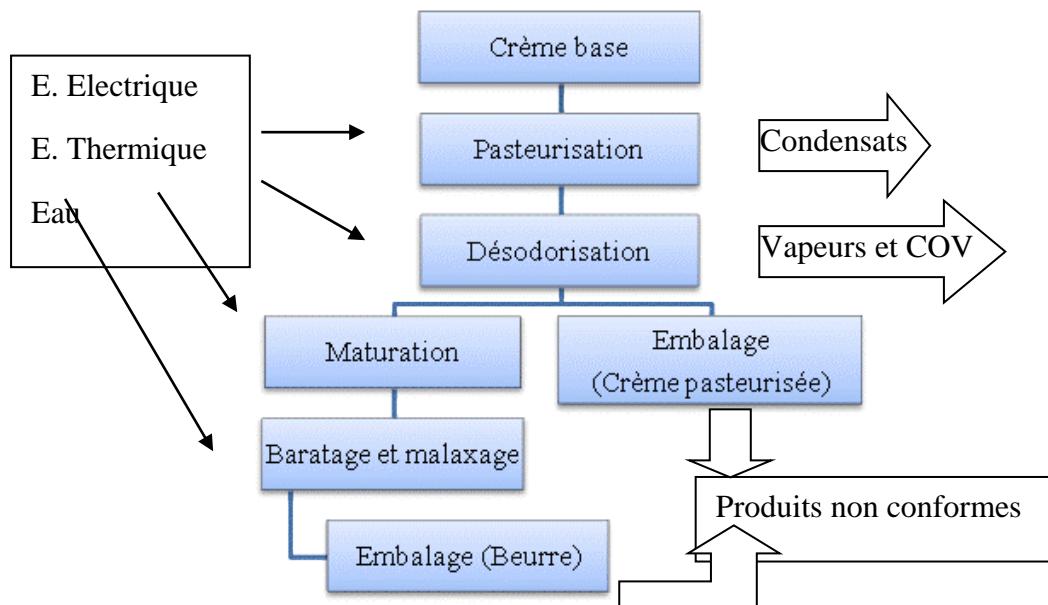


Figure II- 3: Les différentes étapes de l'élaboration de la crème et du beurre [48].

Les principaux effets sur l'environnement dérivés de la production du fromage sont indiqués dans la Figure II- 4.

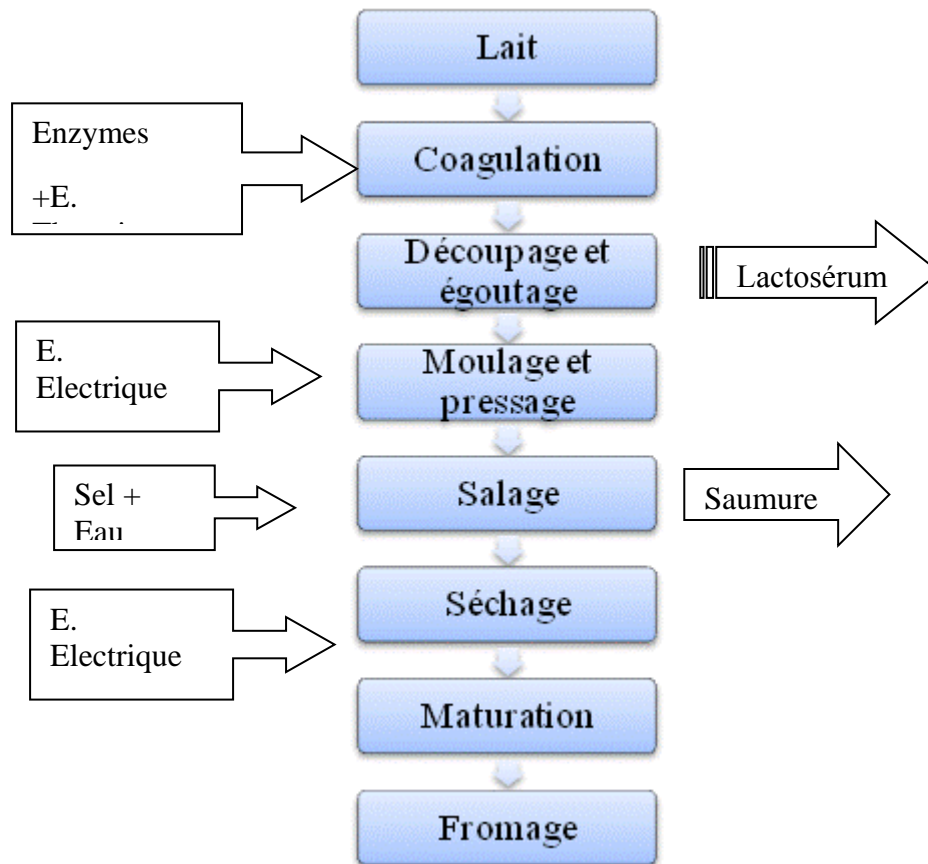


Figure II- 4: Aspects environnementaux du processus d'élaboration du fromage [49]

II.4. Lactosérum

Le lactosérum est le produit laitier liquide obtenu durant la fabrication du fromage, de la caséine ou de produits similaires par séparation du caillé après coagulation du lait et/ou des produits dérivés du lait [49]. D'une façon globale, il dérive de la fabrication fromagère. Deux types de produits lactosérums :

- Lactosérums doux : Résulte de la coagulation du lait par la présure, donc c'est un produit des fromageries de pâtes cuites et pâtes pressées, issu de la fabrication de la caséine dont l'acidité est inférieure à 18°D.
- Lactosérums acide : Résulte de la fabrication des fromages pâtes fraîches ou à pâte molle, issu de la fabrication de la caséine lactique ou acide dont l'acidité est supérieure à 18°D.

II.4.1. Composition moyenne du lactosérum

Le lactosérum est un milieu dilué complexe contenant essentiellement du lactose, des protéines globulaires, une fraction azotée non protéique, de la matière grasse et des minéraux.

La composition (Tableau II- 1) dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines [50].

Tableau II- 1: Composition des différents types de lactosérum [51, 52].

	Lactosérum doux			Lactosérum acide	
	Pâte pressée cuite	Pâte pressée non cuite	Camembert	Pâte fraîche	Caséine
Liquide (%)	93,5	95	93,5	94	94
extrait sec en %	6,5	5,00	6,50	6,00	6,00
pH	6,70	6,50	6,10	6,00	4,60
Composition en g/l					
Lactose	76,00	75,00	75,00	65,5	74,00
Protéines	13,50	13,50	12,00	12,00	12,00
Cendres	8,00	8,00	8,25	9,00	12,00
Acide lactique	1,80	2,80	2,20	10,00	1,80
Matière grasse	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50
Matière minérale :					
Ca en %	0,60	0,65	0,70	1,90	1,80
P en %	0,60	0,65	0,70	1,50	1,50
Chlorure (NaCl)	2,50	2,50	2,50	2,50	7,50

- Matière sèche : Par comparaison avec le lait, le lactosérum est un produit pauvre en matière sèche ; celle-ci est représentée principalement par le lactose. Sa teneur en matières protéiques est faible mais il est riche en matières minérales [53, 54].

Il y a 65 grammes de matière sèche de lactosérum dans un litre de lait. Le lactosérum, qui contient du lactose, des protéines et des sels minéraux possède une valeur nutritive élevée et peut donc être valorisé. Il apporte 2 kilogrammes de matière sèche pour 50 litres, et constitue un apport complémentaire avantageux [53].

- Matière grasse : au cours de l'égouttage de fromages, les quantités de lipides pouvant être entraînées dans le lactosérum sont faibles[55].
- Lactose : c'est le principal constituant du lactosérum issu de la fabrication des fromages, avec un taux beaucoup plus important dans le lactosérum doux que le lactosérum acide [56, 57]. Ce composant revêt un intérêt diététique considérable, puisqu'il représente la seule source d'hydrates de carbone du lait de tous les mammifères. La récupération du lactose se fait par

ultrafiltration du lactosérum, après extraction éventuelle de la matière grasse, des protéines et des sels minéraux, puis par cristallisation du lactose, séparation et séchage des cristaux [58].

- Les protéines : la fraction protéique totale constitue l'attrait majeur du lactosérum par les débouchés qu'elle trouve dans l'industrie alimentaire. En effet, les protéines, et en particulier celles du lactosérum, possèdent des propriétés nutritionnelles et aussi fonctionnelles [59].

La fraction protéique du lactosérum est composée de 6 protéines majeures : la β -lactoglobuline (β -LG), l' α -lactalbumine (α -LA), le sérum albumine bovine (SAB), immunoglobulines (Ig), la lactoferrine (LF) et la lactoperoxydase (LP). La β -LG est majoritaire suivie de l' α -LA (Tableau II- 2). Elles représentent à elles deux 70 % des protéines totales [59]. Les protéines de lactosérum ont à la fois d'excellentes propriétés fonctionnelles et une très haute valeur nutritionnelle, leur composition en acides aminés essentiels répond à toutes les exigences de la nutrition humaine. Elles sont considérées comme des protéines idéales pour la diététique humaine [59].

Tableau II- 2: Composition en acides aminés essentiels de différentes protéines (en g/100g de protéines) [60].

Acides aminés Essentiels	Protéines de lactosérum	Albumine de l'œuf	Caséines	Protéines totales du lait
Isoleucine	6,55	6,45	5,80	6,10
Leucine	14,00	8,30	9,50	10,00
Lysine	10,90	7,05	7,60	7,90
Méthionine	2,35	3,40	2,95	2,60
Cystine	3,15	2,25	0,40	1,00
Phénylalanine	4,05	5,80	5,40	4,80
Tyrosine	4,80	5,04	5,70	5,20
Thréonine	6,70	3,15	4,00	4,70
Tryptophane	3,20	1,50	1,30	1,50
Valine	6,85	7,15	6,80	6,80

- Matière minérale : Environ 8 à 10 % de l'extrait sec constitutif du lactosérum est représenté par la matière saline [54] et principalement par les chlorures, les phosphates, le potassium et à moindre taux le calcium et le sodium (Tableau II-3).

Tableau II- 3: Composition moyenne du lactosérum en minéraux [54].

Eléments minéraux	Unités	Lactosérum par litre		Lactosérum par kg	
		Doux	Acide	Doux	Acide
Calcium	gr	0,5	1,0	07	20
Phosphore	gr	0,5	0,5	08	08
Potassium	gr	1,4	1,4	20	20
Sodium	gr	0,45	0,45	/	/
Chlore	gr	1,0	1,0	16	16
Magnésium	gr	0,04	0,08	01	02
Zinc	mg	0,3	2,3	10	60
Fer	mg	0,9	0,9	/	/
Manganèse	µg	06	26	120	470

- Vitamines : Les vitamines présentes dans le lactosérum en majeure quantité sont des vitamines hydrosolubles (Tableau II- 4). Parmi elles, la riboflavine (B2) se trouve en quantités importantes en donnant la couleur verdâtre au lactosérum ; la pyridoxine (B6), la thiamine (B1), la cobalamine (B12) et la vitamine C [61].

Tableau II- 4: Composition moyenne de lactosérum en vitamines [54].

Vitamines	Unités	Lactosérum par litre	Lactosérum par kg
Thiamine (B1)	Mg	0,4	05
Riboflavine (B2)	Mg	1,4	25
Pyridoxine (B6)	Mg	0,5	/
Cobalamine (B12)	µg	1,5	25
Acide nicotinique (B3)	Mg	02	08
Acide folique (B9)	µg	50	220
Acide pantothénique (B5)	Mg	/	11
Acide ascorbique C	Mg	09	45

II.4.2 Caractéristiques du lactosérum

La demande biologique d'oxygène (DBO) du lactosérum est estimée à 40000 mg d'O₂/litre, c'est-à-dire qu'un litre de sérum nécessite 40g d'oxygène pour l'oxydation microbienne de tous ces constituants organiques. La demande chimique d'oxygène (DCO) est comprise entre 70.000 et 90.000 mg d'O₂ /litre.

La présence de ce type d'agent polluant en milieu aquatique cause une réduction de la concentration d'oxygène mettant ainsi en péril différentes forme de vie.

II.4.3 Importance du lactosérum en Algérie

De nombreux sous-produits de l'industrie alimentaire sont rejetés dans la nature et constituent de ce fait un facteur de pollution de par leur grande quantité. En Algérie, pour la production fromagère, l'industrie laitière rejette quotidiennement 6000 litres/jour de lactosérum (cas de l'unité de Boudouaou), soit pour chaque kilogramme de fromage produit, un résidu de 4 à 12 kg de lactosérum est rejeté [62]. Par sa composition biochimique (lactose, protéines, vitamines), le lactosérum est un excellent milieu de culture pour les micro-organismes et devient un facteur de pollution redoutable. Pour valoriser ces tonnages élevés de lactosérum, la production de l'acide lactique par fermentation constitue une des voies les plus attractives [63].

Après l'indépendance, la fromagerie algérienne est passée de l'état traditionnel vers une fromagerie industrielle avancée et de plus en plus diversifiée.

Ceci est accompagnée d'une surproduction d'un sous-produit d'égouttage des fromages connus sous le nom lactosérum et/ou petit lait (lait sans caséine) et qui est rejeté directement dans les cours d'eau et introduisant dans certaines régions de graves problèmes de pollution

L'industrie agroalimentaire doit faire face à un problème devenu au fil de ces dernières années de plus en plus crucial. Il s'agit de la pollution créée par les déchets et les rejets de cette industrie. L'industrie laitière en est une de l'activité agro-alimentaire. En effet, à l'origine de la production de grandes quantités de lactosérum. Pour remédier à ce problème, de nombreux procédés sont envisageables [50, 64-67].

II.4.4 Valorisation du lactosérum

➤ Déshydratation :

La demande biologique d'oxygène (DBO) du lactosérum est estimée à 40g/l, c'est-à-dire qu'un litre de sérum nécessite 40g d'oxygène pour que ses matières organiques soient détruites par oxydation microbienne [23, 68]. Dans ces conditions, il est devenu indispensable de le traiter de sorte qu'il ne constitue plus une matière polluante.

La présence de ce type d'agent polluant en milieu aquatique cause une réduction de la concentration d'oxygène mettant ainsi en risque différentes formes de vie. Pour éviter la pollution par ces rejets, les industriels ont rapidement trouvé des usages pour ces produits après les avoir dérivés, déshydratés puis réduits en poudre [69].

➤ Utilisations en alimentation humaine :

La poudre de lactosérum a connu une grande utilisation dans l'alimentation humaine grâce à la présence du lactose et des protéines. La richesse en lactose en fait un auxiliaire actif dans le brunissement enzymatique ou apprécié en boulangerie et biscuiterie [70-72].

Les protéines natives du lactosérum possèdent d'excellentes propriétés fonctionnelles reliées à la solubilité, au moussage, à la capacité d'absorption et la fixation de l'eau, à l'émulsifiassions et à la gélification. C'est pour cette raison que le lactosérum trouve une très grande utilisation dans l'industrie agro-alimentaire telle que la fabrication des fromages fondus, des crèmes glacées et des mousses. Il est également employé dans les desserts congelés, les viandes émulsifiées, les vinaigrettes, les confiseries, les sauces et les boissons[70].

➤ Utilisations en alimentation animale

L'alimentation animale constitue le principal passage du lactosérum. Il est destiné à l'élevage industriel des vaches laitières en l'incorporant dans leur ration alimentaire. Il peut également être incorporé aux aliments d'allaitement pour les veaux [73].

Par ailleurs, le lactosérum peut être utilisé d'une part, sous forme de poudre comme source de vitamines hydrosolubles dans l'alimentation des volailles, et d'autre part il peut être donné frais comme boisson [73].

➤ Utilisation comme substrat de fermentation :

Le lactosérum peut être un substrat de fermentation pour de nombreuses espèces microbiennes. La croissance de certaines souches telles que *Streptococcus lactis* serait bonne sur lactosérum seul du fait de la richesse de celui-ci en lactose [56, 74].

Le lactosérum est un bon milieu de culture permettant le développement des levures qui utilisent le lactose comme source de carbone [75].

Le lactosérum est un bon milieu de culture pour la production d'acide lactique à l'aide des bactéries lactiques [63, 76-80].

La composition du lactosérum et sa déficience en facteurs de croissance et en certains composés, fait que plusieurs chercheurs ont tenté de l'enrichir par l'addition de certains facteurs stimulant la croissance tels que l'extrait de levure, le bicarbonate de sodium et autres.

Il existe de nombreuses utilisations possibles du lactosérum dans l'alimentation humaine et animale, mais sa forte teneur en eau (94 %), sa salinité élevée et son altérabilité, rendent souvent difficiles sa valorisation [57, 81, 82].

Chapitre III

Procédés de fermentation et bioréacteurs

Chapitre III. Procédés de fermentation et bioréacteurs

Durant ces dernières décennies, les techniques biologiques sont de plus en plus utilisées, ces techniques sont devenues incontournables en matière de production des agents conservateurs et antibactériens dans l'alimentation humaine et animale. En effet, l'utilisation de micro-organismes présente une excellente capacité de production des substances antimicrobiennes notamment les acides organiques et les bactériocines avec cependant une étape de purification coûteuse [83].

III.1 Fermentation

III.1.1 Définitions

Le mot fermentation présente deux significations différentes pour les biochimistes et les microbiologistes industriels. En biochimie, les fermentations sont des voies cataboliques anaérobies au cours desquelles des composés organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons, la synthèse d'ATP étant réalisée par phosphorylation au niveau du substrat [84].

En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes [85].

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate (Figure III. 1). Dans la respiration, les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. La fermentation ne nécessitant pas l'absence totale d'oxygène, certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et certaines bactéries comme *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) utilisent la fermentation en présence d'oxygène pour dégrader les sucres [41].

Les sucres tels que le glucose, le fructose, le lactose ou le saccharose sont les substrats les plus utilisés pour la fermentation, engendrant la production d'énergie et de métabolites comme l'acide lactique et l'éthanol avec un dégagement de gaz (CO₂) dans certains cas [76]. Cependant d'autres métabolites, moins communs comme l'acide butyrique et le butanol sont produits au cours de la fermentation [61].

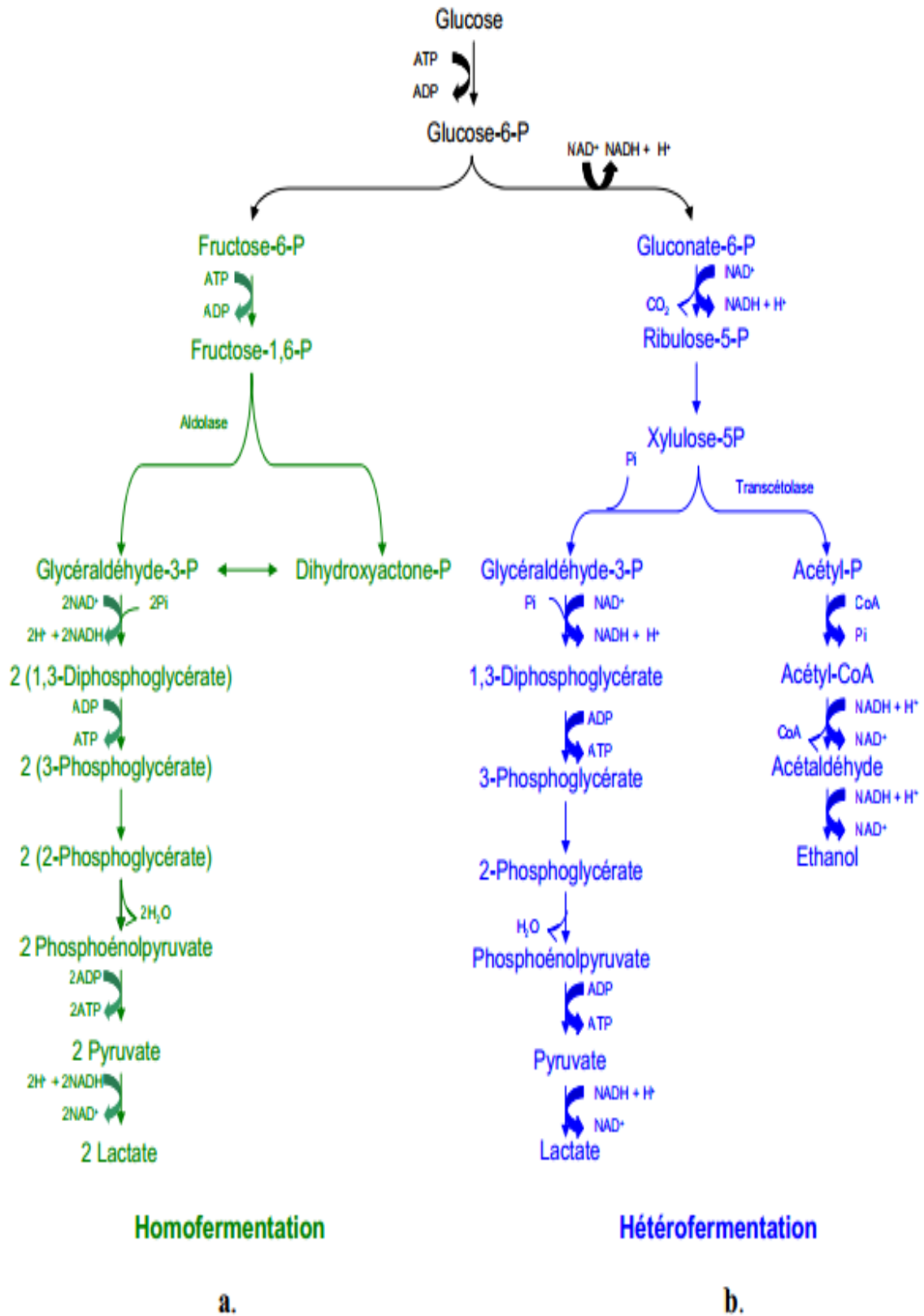
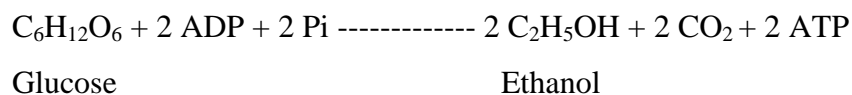


Figure III. 1: La glycolyse [84]

III.1.2 Types de fermentation

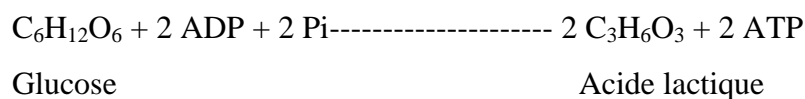
Il existe plusieurs voies de fermentations, dont la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, la fermentation butyrique et la fermentation propénoïque. Les fermentations alcoolique et lactique sont les plus connues et les plus couramment utilisées par les microorganismes. La fermentation alcoolique, principalement réalisée par les levures telle que *S. cerevisiae*, produit de l'éthanol et du CO₂. Elle est souvent utilisée pour la production de boissons alcooliques [84].

La réaction bilan de la fermentation alcoolique est :



La fermentation lactique est réalisée par les bactéries lactiques pour produire principalement de l'acide lactique et d'autres métabolites tels que l'éthanol et le CO₂ [63].

La réaction bilan de la fermentation lactique est :



III.2 Fermenteurs ou bioréacteurs

III.2.1 Définition

Le bioréacteur (ou fermenteur) est une enceinte permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés [86].

III.2.2 Description du bioréacteur

Le bioréacteur ou fermenteur est généralement constitué d'une cuve fermée, étanche à l'air et de préférence isolée thermiquement de l'extérieur dans laquelle différents microorganismes se côtoient pour dégrader chimiquement et biologiquement les déchets et effluents organiques et produire des métabolites (acides organiques, substances volatiles, biogaz) [86-88].

III.2.3 Procédés de cultures

La fermentation peut se faire selon trois modes principaux : en lot (batch), en continu ou en lot réalimenté (fed-batch) avec ou sans recirculation. Le choix du mode est guidé en partie par le type de produit recherché. La croissance exponentielle d'une culture peut être prolongée par l'addition continue de milieu frais au réacteur et il est possible d'ajuster le taux de dilution à un rythme qui maintient la concentration de produit au maximum [89].

Les bioréacteurs peuvent être classés selon :

- le mode d'alimentation : batch, continu ou semi-continu ;
- le type de substrats : solide, semi-solide ou liquide ;
- le nombre d'étages : mono-, bi- ou poly-étage.

III.2.3.1. Réacteurs en « batch »

La réaction est conduite de façon discontinue. Ce mode de réaction est préconisé dans le cas de faibles volumes. Le système est clos durant le temps de réaction. Une pointe d'addition peut être ajoutée au système en cas de régulation de pH , mais aucun substrat ou enzyme n'est ajouté au système. Le volume réactionnel est le même et l'agitation peut être conduite de façon homogène tout le temps de la réaction (Figure III. 2) [90, 91].

III.2.3.2. Réacteurs en « fed batch »

La réaction dans ce cas est conduite différemment. La réaction commence avec un petit volume de substrat. La quantité du matériel biologique présente est en plus forte concentration que lors d'un système en batch et la réaction démarre plus vite. La matrice à transformer est ensuite introduite en continu dans le réacteur. Le volume total est en augmentation constante. Cette technique est utilisée dans le cas de fermentation microbienne (Figure III. 2) [92, 93].

III.2.3.3. Réacteurs continus

Dans ce type de réacteur, la cuve est alimentée et soutirée en continu. Pour réaliser la transformation, l'enceinte de la cuve est différente des deux autres précédemment citées puisque une évacuation sélective est réalisée de façon à ce qu'uniquement le produit sorte de l'enceinte (Figure III. 2) [94, 95].

Un des problèmes majeur de ce type de procédé est l'encrassement par les différentes substances colmatantes résultant de l'opération de transformation (en effet, ce type de système nécessite un milieu réactionnel peu colmatant, sinon la mise en place de systèmes de pré-filtration (tamis, filtre...)).

Afin d'augmenter l'activité spécifique de la biomasse, la formation d'un biofilm à l'intérieur du réacteur est apparue comme une solution intéressante. Le biofilm constitue un ensemble de microorganismes inclus dans une matrice poreuse de polymères biologiques. Il est fixé ou non à un support [96, 97].

Parmi les réacteurs à biomasse fixée, les réacteurs à lit fixe sont des réacteurs les plus utilisés, ils se composent d'un milieu réactionnel rempli d'un solide sur lequel vont se fixer les

bactéries. Le garnissage est un support inerte de nature variée (roche, verre, plastique) et de forme diverse (sphères, cubes, grillage, lamelles). Ces réacteurs fonctionnent avec un flux ascendant ou descendant. Les principaux avantages de ce type de procédés sont leur facilité de fabrication et l'absence de mélange mécanique. Ils présentent également une robustesse et une bonne stabilité vis à vis des chocs organiques, ainsi qu'un recouvrement rapide d'activité après une longue période d'arrêt [96, 97].

Cependant, il a été prouvé qu'une grande partie de la biomasse retenue dans le réacteur n'est pas attachée et reste dans les interstices du support. Ceci engendre le colmatage de certaines zones du réacteur et réduit ses performances jusqu'à un dysfonctionnement complet. L'application d'un flux descendant a permis de réduire le problème majeur du colmatage [94].

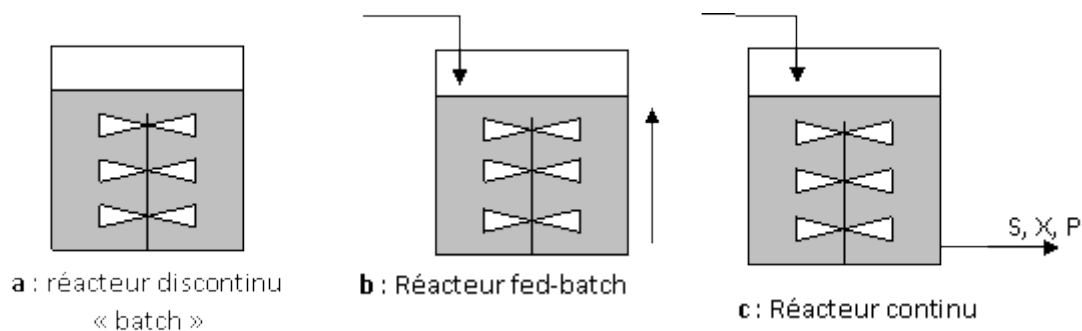


Figure III. 2: Les différents modes de fonctionnement d'un bioréacteur industriel ou bioréacteur naturel [62].

III.2.4 Systèmes immobilisés

III.2.4.1 Définition

Le terme d'immobilisation a été défini comme 'le confinement ou localisation physique de cellules intacts dans une certaine région de l'espace tout en préservant certaines activités catalytiques souhaitées'. L'immobilisation permet de disposer d'une population microbienne dense, active et facilement utilisable [56].

Les intérêts de développer de tels systèmes sont multiples. Parmi eux, il est à noter notamment une réponse aux problématiques industrielles habituelles que sont entre autres les gains de productivité, la facilité d'opération, le recyclage de la biomasse. Un autre avantage recherché est aussi la possibilité de contrôler directement les réactions mises en jeu.

III.2.4.2. Biofilm

❖ Définition

Les bactéries vivent le plus souvent attachées à des supports et leur mode vie est sessile (par opposition au mode de vie planctonique ou vie à l'état libre observée dans des milieux liquides) [98].

Le biofilm est un ensemble de microorganismes immobilisés sur une surface substrat, typiquement enrobé dans une matrice polymérique organique d'origine bactérienne [99]. Les bactéries vivant dans le biofilm ont des propriétés sensiblement différentes des bactéries libres de la même espèce [100].

❖ **Formation du biofilm**

La formation du biofilm est un phénomène complexe se déroulant en plusieurs étapes.

a) Phase de latence

Cette période correspond au temps nécessaire pour la formation de la première couche de cellules fixées. C'est la succession de deux étapes :

- Conditionnement organique de la surface du solide.
- Adhésion des cellules sur le support

b) La croissance du biofilm

Les cellules se développent en micro-colonies et se développent rapidement à la surface du support. La phase de croissance est rapide; elle suit une phase exponentielle avec une consommation du substrat qui augmente jusqu'à une épaisseur critique du biofilm (épaisseur active) au-delà de laquelle le taux de consommation du substrat n'évolue plus [101]. Ce phénomène est attribué aux limitations de diffusion du substrat à l'intérieur de la biomasse fixée. La durée de la phase de croissance dépend de la quantité de substrat disponible dans le milieu, c'est-à-dire de la charge nominale du réacteur.

c) Phase d'équilibre

Le biofilm atteint son épaisseur maximum avec une stabilisation de la biomasse fixée lorsque la production de biomasse est compensée par le détachement du biofilm à la surface du fluide. Cette couche biologique est donc un système dynamique en équilibre entre la production des nouvelles cellules, liée à la croissance, et le détachement [101].

d) Détachement

Le détachement est le résultat de plusieurs phénomènes :

- La consommation des bactéries de la surface du biofilm par les protozoaires.
- La mort cellulaire
- L'érosion (la perte permanente de petites particules de la surface du biofilm, essentiellement provoquée par les forces de cisaillement).
- L'abrasion (analogue à l'érosion, mais provoquée par les collisions de particules).

III.2.4.3. Différentes méthodes d'immobilisation

De nombreuses techniques d'immobilisation ont été développées. Suivant plusieurs auteurs [102-105], elles sont regroupées en 4 catégories : l'attachement à une surface, l'inclusion, la floculation, et le maintien derrière une barrière (Figure III-3, Figure III-4).

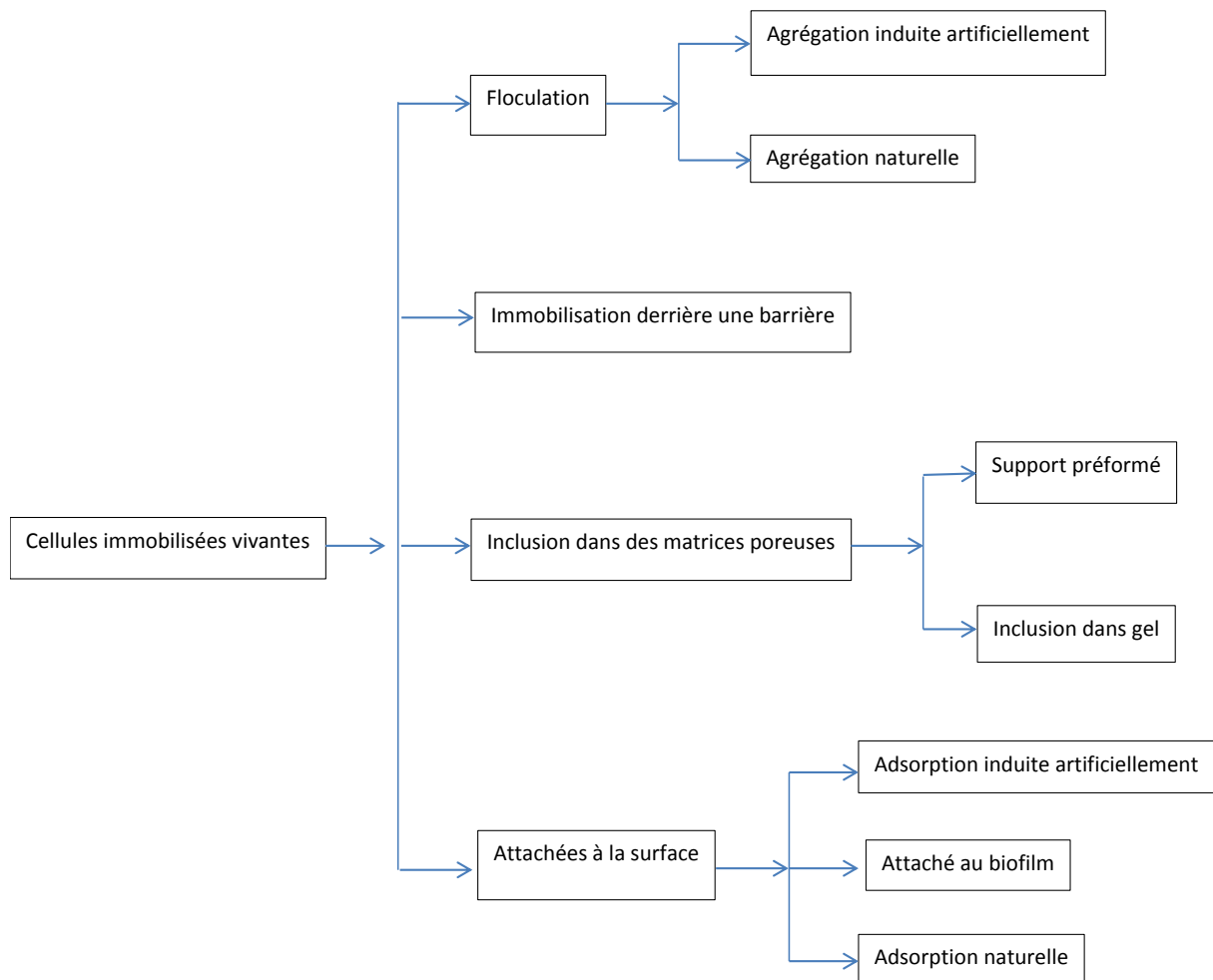


Figure III. 3 : Classification des systèmes d'immobilisation selon quatre classes [106]

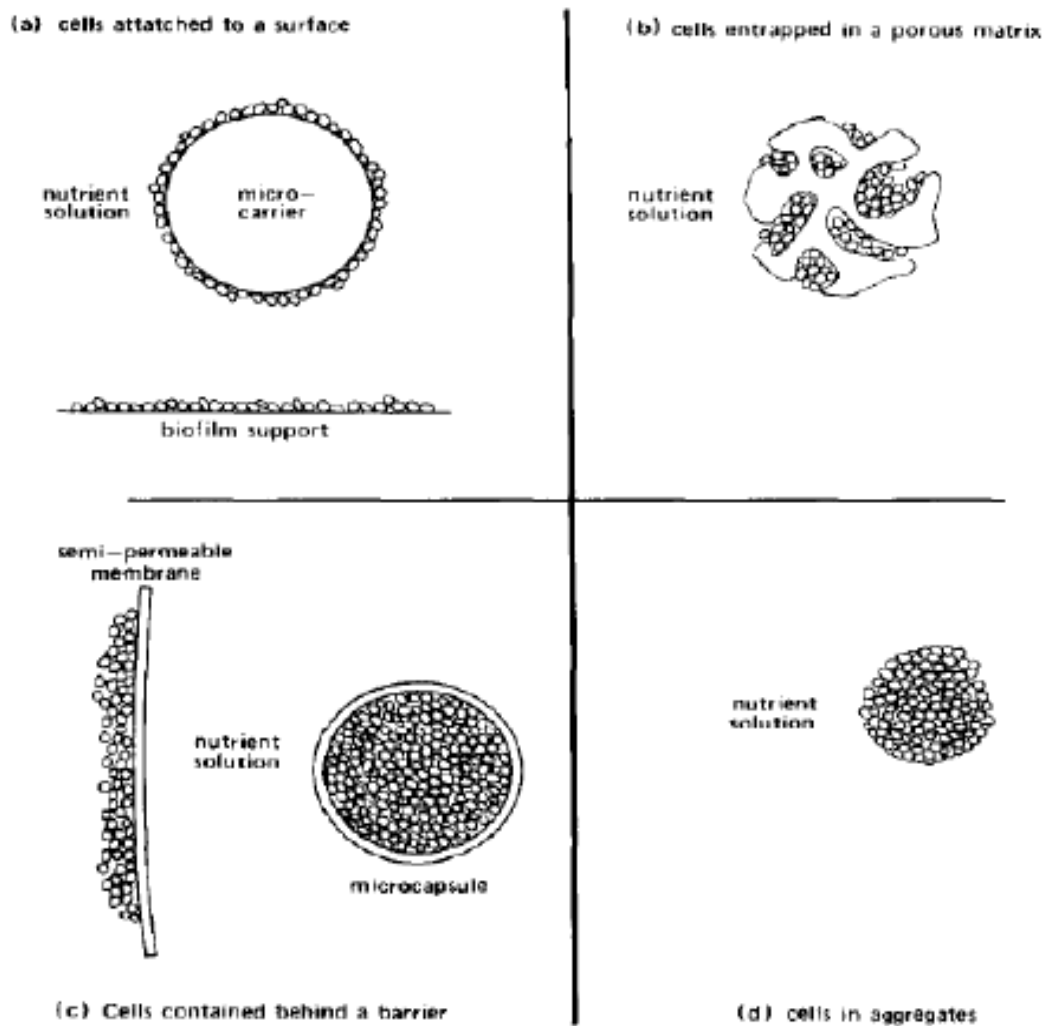


Figure III. 4: Les quatre classes de cellules immobilisées [102].

- ✓ **Adhésion à la surface** : L'immobilisation des cellules peut être réalisée par adhésion à la surface de différents supports. Les forces participant à l'adhésion d'une cellule au support sont la force de Van der Waals, les liaisons ioniques, les ponts hydrogènes et les interactions covalentes [107].
- ✓ **Inclusion dans des matrices poreuses** : Un autre moyen d'immobilisation est l'inclusion des cellules dans une matrice poreuse qui peut être soit un gel, soit un support préformé [106].
- ✓ **Immobilisation derrière une barrière** (ex. réacteurs avec membrane) : Les procédés membranaires sont très séduisants, ils permettent en fait le recyclage intégral des

cellules et permettent de retenir dans le réacteur une biomasse importante. La microfiltration ou l'ultrafiltration ont déjà été appliquées avec succès pour la production d'acide lactique, ou d'éthanol [108].

✓ **La floculation :** La floculation des microorganismes est un phénomène qui se rencontre naturellement chez de nombreuses souches et qu'on peut aussi provoquer artificiellement. Il s'agit là d'une méthode de rétention séduisante car elle fait appel à la méthode de séparation liquide-solide la plus élémentaire la décantation [108].

III.2.4.4. Types de bioréacteurs

D'une manière générale, pour les fermentations mettant en œuvre des cellules immobilisées, cinq types de bioréacteurs sont utilisés (Figure III.5). Le bioréacteur contient alors trois phases : solide (le microorganisme immobilisé), liquide (le milieu de fermentation), gazeuse (gaz soit injecté soit produit). Le choix de la configuration est lié à la méthode d'immobilisation, au métabolisme cellulaire et aux transferts de masse et de chaleur nécessaires.

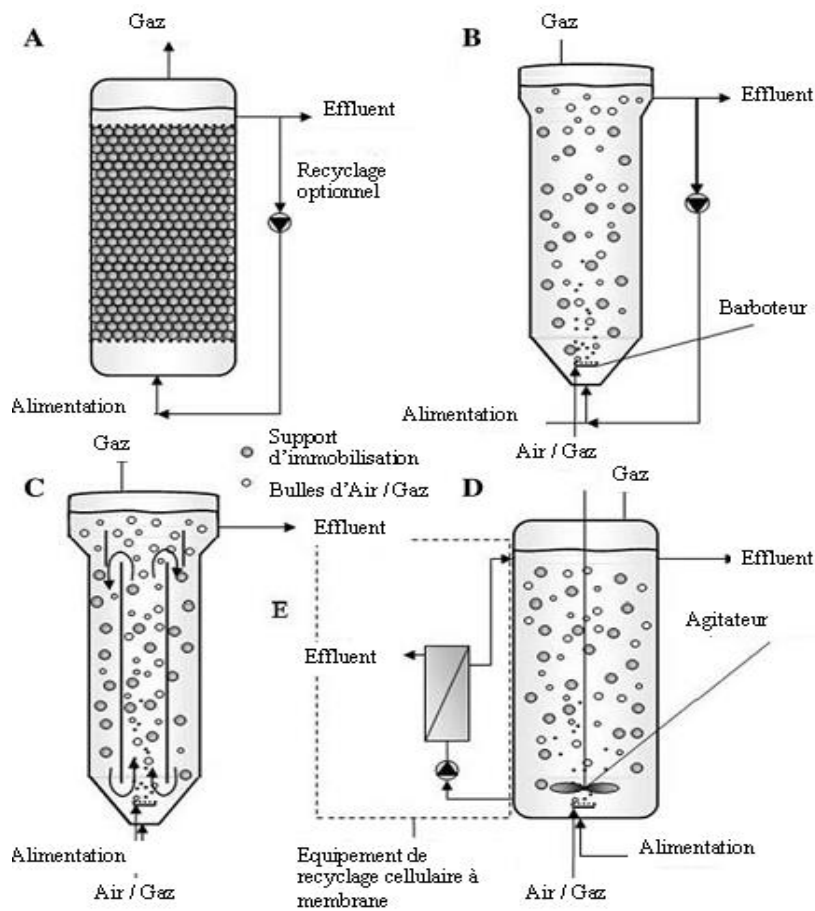


Figure III. 5: Cinq réacteurs à cellules immobilisées [105]

A- Réacteur à lit fixe ; B- Réacteur à lit fluidisé ; C- Réacteur à Air-lift ; D- Colonne à bulles ou réacteur agité ; E- Réacteur à recyclage membranaire.

A. Lit fixe

Dans la configuration lit fixe, l'ensemble du réacteur est rempli par le biocatalyseur, et le milieu de fermentation passe au travers de ce lit. Ce type de réacteur a un fonctionnement semblable au réacteur de type piston, qui permet de mimer théoriquement les différentes phases de la fermentation en batch. Ses avantages sont sa facilité de mise en œuvre et son faible coût. Cependant, dans la pratique, ce type de fonctionnement n'est pas idéal, du fait de problème d'accumulation de biomasse, d'évacuation des gaz et de limitations de transferts de masse qui peuvent éventuellement être observés [105].

B. Lit fluidisé

Ce réacteur consiste en une colonne dans laquelle les cellules immobilisées sont maintenues en suspension les unes par rapport aux autres grâce à un flux continu et important, de substrat liquide ou de gaz. Ce mode de fonctionnement permet un mélange important des phases liquide / solide et gaz. Avec un fonctionnement de type piston dispersé, la fluidisation permet un meilleur transfert de masse, l'évacuation de cellules en suspension (limitation de l'accumulation de biomasse), ainsi que la libération de grande quantité de CO₂. Mais la limitation réside dans le fait que pour assurer la fluidisation un débit important de liquide ou gaz est nécessaire. Il s'agit donc d'un procédé intéressant pour des fermentations à vitesse de réaction élevée ou qui nécessitent une forte aération.

C. Gaz-lift réacteur

Dans ce type de réacteur, le volume de fluide est divisé en deux compartiments interconnectés. Le liquide de la zone centrale est entraîné par l'injection de gaz qui se dégage en haut de colonne provoquant la descente du liquide dans les zones de côtés. Cela permet un mélange efficace, de bons transferts et un coût de fonctionnement réduit par rapport aux réacteurs agités.

D. Réacteurs agités

L'objectif de ces réacteurs est d'augmenter les transferts de masse au moyen d'une agitation forcée. Leur utilisation est simple mais coûteuse. Et des précautions doivent être prises lors de leur utilisation avec des cellules immobilisées puisque l'agitation peut endommager le support.

E. Bioréacteur à membrane

Dans ce type de procédé, le module membranaire constitue le mécanisme d'immobilisation du microorganisme. Celui-ci est généralement placé à l'extérieur du réacteur et permet un 'recyclage' de la biomasse. Le bioréacteur à membrane présente un fort intérêt

notamment lorsque le produit de fermentation est inhibiteur et peut être séparé du milieu en continu. Néanmoins son coût reste souvent le facteur limitant son installation.

III.3. Croissance bactérienne

III.3.1. Définition

La croissance bactérienne est le dédoublement à intervalle de temps régulier de la masse cellulaire et du nombre de cellules d'une culture bactérienne donnée. La croissance est souvent limitée par la disponibilité des nutriments et beaucoup d'autres facteurs de l'environnement [109].

III.3.2. Détermination des besoins nutritifs

La croissance des bactéries dépend des conditions nutritionnelles et environnementales qu'elles rencontrent. En effet, les micro-organismes ne peuvent se développer de façon optimale que dans une gamme limitée de facteurs physico-chimiques (tels que la température, le pH, la salinité, etc.) et nécessitent un apport en carbone, azote et phosphate, requis pour la synthèse des constituants cellulaires (protéines, acides nucléiques, etc.) [110].

III.3.3. Cinétiques de la croissance bactérienne

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide non renouvelé. Il existe 07 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance [111, 112] (Figure III.6).

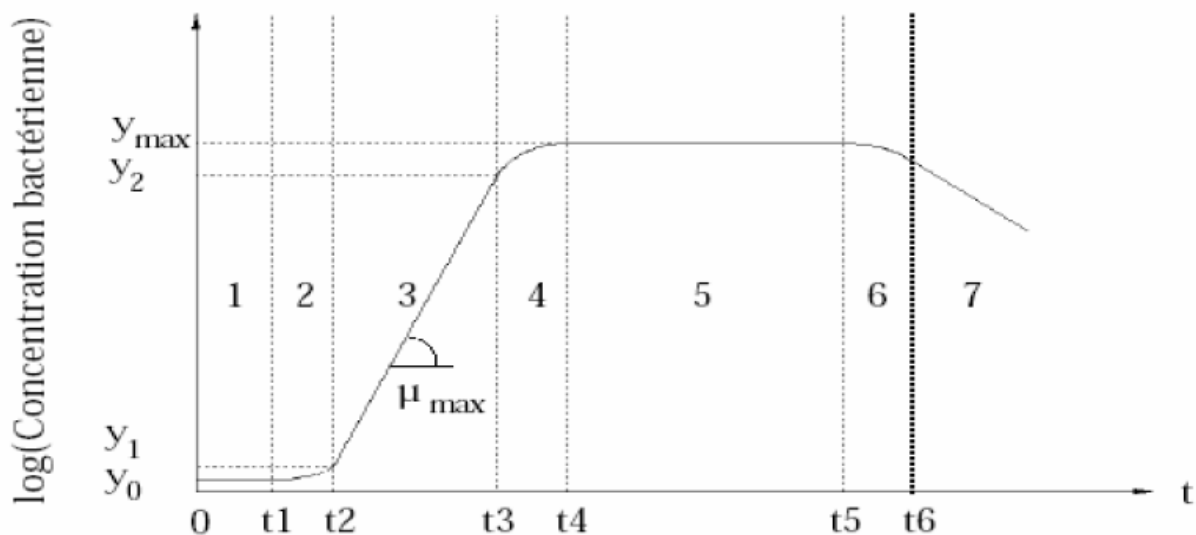


Figure III. 6: Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases [62]

1. **la phase stationnaire initiale ou phase de latence** : elle est caractérisée par une vitesse de multiplication nulle. Cette phase correspond à une période d'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l'inoculum.
2. **la phase d'accélération** ou la phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale.
3. **la phase de croissance à vitesse constante maximale ou phase de croissance exponentielle** : elle se présente sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps. Les cellules se trouvent dans leur état physiologique maximal. La vitesse de reproduction atteint son maximum et reste constant pendant toute cette phase.
4. **la phase de ralentissement** : dans cette phase, on remarque un épuisement du milieu de culture suite à la disparition d'un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance bactérienne tels que (C, N, P...). Le taux de croissance va diminuer progressivement pour s'annuler à la fin.
5. **la phase stationnaire maximale** ou plus simplement phase stationnaire qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des microorganismes. Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.
6. **la phase de la décroissance.**
7. **la phase de déclin**: Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques, induisant diminution d'organismes viables (mort des bactéries et lyse cellulaire).

III.3.4. Paramètres de la croissance utilisés lors de la production

Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres suivants pour caractériser ces différentes phases :

III.3.4.1. La loi de croissance

La loi de croissance [112] s'écrit comme suit :

$$\frac{dN}{dt} = NK \quad (N : \text{Nombre de bactéries, } t : \text{Temps}) : \text{formule de base.}$$

III.3.4.2. Taux de croissance (μ)

Le taux de la croissance ou vitesse spécifique de la croissance : Il correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe $\text{Log } y = f(t)$.

$$\mu = (\text{Log } X_2 - \text{Log } X_1) / (t_2 - t_1)$$

Chaque cellule microbienne donne après multiplication deux cellules identiques. Après n génération, le nombre initial de cellule x_0 pour t_0 , devient au temps t , x [112] :

$$x = x_0 2^n \quad x = x_0 2^{\mu t} \quad \ln x = \ln x_0 + \mu t \cdot \ln 2$$

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t \cdot \ln 2} \quad \left\{ \begin{array}{l} x_0 : \text{nombre de cellules à } t_0 \\ x : \text{nombre de cellules à } t \\ \mu : \text{taux de croissance h}^{-1} \end{array} \right.$$

Le modèle de Monod de limitation de la vitesse spécifique de croissance est fonction de la concentration des substrats [112] :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / (K_s + S)$$

μ_{\max} : le taux de croissance maximum.

S : la concentration limitée du substrat considéré (sucre, acide aminé,...)

K_s : la concentration du substrat pour laquelle $\mu = \mu_{\max} / 2$ (varie selon la souche et le substrat)

○ le temps de génération :

C'est le temps nécessaire au doublement de la population en minutes ou en heures. On définit le nombre de division par :

$$G = t / n$$

G : le temps de génération

t : Temps nécessaire

n : nombre de générations par unité de temps

III.3.4.3. Rendement métabolique

La consommation du substrat, provoquée par des milliers de réactions élémentaires du métabolisme, peut être subdivisée en trois (3) grandes fractions:

1. La fraction qui apporte l'énergie nécessaire aux synthèses;
2. La fraction qui apporte l'énergie nécessaire à l'entretien de la vie cellulaire.

En effet, les fractions (1) et (2) représentent la part du substrat utilisée pour la croissance.

3. La fraction (3) représente le ratio nécessaire au maintien des cellules en vie (maintenance).

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta \text{Biomasse formé}}{\Delta \text{substrat carboné consommé}}$$

$Y_{x/s}$: rendement métabolique de bioconversion du substrat (Y) en biomasse.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta \text{produit formé}}{\Delta \text{substrat carboné consommé}}$$

$Y_{p/s}$: rendement de conversion du substrat (Y) en produit 'métabolites

Partie II

Partie expérimentale

Chapitre IV

Cadre expérimental

Chapitre IV: Cadre expérimental

IV.A. Caractérisation physicochimique et microbiologique des rejets liquides de la laiterie de Sidi Sâada

La première partie de notre travail expérimental a été réalisée au niveau de la laiterie de Sidi Saada sise à Relizane. La deuxième partie est effectuée au niveau des laboratoires de génie des procédés, méthodes d'analyse physicochimique alimentaire (MPCA) et microbiologique alimentaire (MC) de l'Université Hassiba Benbouali de Chlef «UHBC» ainsi que les laboratoires de l'ADE-Chlef.

IV.A.1. Evaluation sommaire des dangers écologiques des effluents liquides

Les valeurs limites fixées par la législation algérienne ont été considérées dans cette étude pour estimer les dangers générés par les rejets d'effluents de la laiterie de Sidi Saada sur l'écosystème. La législation englobe :

- Article 10 de la loi n° 03-10 du 19 Joumada El Oula 1424 correspondant au 19 juillet 2003 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable.
- Décret exécutif n° 93-160 du 10 juillet 1993 règlementant les rejets d'effluents liquides industriels ;
- Décret exécutif n° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels.
- Selon les textes sus cités, les principaux paramètres sélectionnés pour l'évaluation sommaire des dangers liés aux rejets des effluents liquides industriels sont :
 - pH : Potentiel d'hydrogène
 - DBO₅ : Demande biologique en oxygène pour une période de cinq (5) jours
 - DCO : Demande chimique en oxygène
 - MES : Matière en suspension

IV.A.2. Site expérimental et points de prélèvement

IV.A.2.1. Présentation de la laiterie

La laiterie de Sidi Saâda sise à Relizane est une société publique par action, qui a été conçue pour la fabrication de produits laitiers.

Elle est limitée par des logements d'astreinte et terrains agricoles vers le Nord, des terrains vagues, Marabout Sidi Saâda vers le Sud, Oued Sidi Saada et groupe d'habitants vers l'Est et chemin de Wilaya N°12 et terrains agricoles vers l'Ouest.

Le projet de la laiterie a été lancé en 1987 par l'office régional Ouest du lait (OROLAIT), l'usine a été exploitée en 1993, elle a été passée sous la tutelle de GIPLAIT après dissolution des offices régionaux en octobre 1997. La cession de la totalité des actions de l'EPE Laiterie/Fromagerie de Sidi Saâda SPA à la SARL Produits Laitiers Trèfle a été effectuée en 2007.

L'infrastructure de l'Entreprise laiterie fromagerie de Sidi Saâda occupe une surface totale de 98000m² dont 23000m² en bâtis et est présentée sur la Figure IV.1.



Figure IV. 1: Plan de l'infrastructure de la laiterie de Sidi Saâda (2014).

1 : Ateliers de production de fromage (fromagerie), 2 : Recombinaison plus Récupération de lait cru, 3 : Bâtiment laiterie (Beurre, Lait en sachet, Fromage fondu, Laibni), 4 : Magasin ou dépôt de matière première, 5 : Magasin des produits chimiques, 6 : Réservoir d'eau (900 m³), 7 : Station de traitement des eaux brutes, 8 : Locaux commerciales, 9 : Bâtiment administratif, 10 : Poste de garde, 11 : Bloc laboratoire (physico-chimique et microbiologique), 12 : Ateliers maintenance, 13: Magasin pièce de recharge, 14 : Station d'épuration, 15 : Milieu récepteur (Oued Yellel (Béni Chougran)).

La laiterie/fromagerie de Sidi Saâda a une capacité de stockage de 5256m² et 16.000m² de stockage de matière première et emballage. Elle produit le camembert, lait

pasteurisé en sachets, fromage fondu (LAIBNI), et le fromage Fondu Barre de 300g dont les capacités sont énoncées dans le Tableau IV- 1.

Tableau IV- 1 : Gamme de produits et capacités de la laiterie de Sidi Sâada.

Gamme de produits	Capacités
Camembert	50.000 L/J
Lait pasteurisé en sachets	40.000 L/J
Fromage Fondu (LAIBNI)	8 T/J
Fromage Fondu Barre de 300 g	200 kg/J

Le débit des eaux traitées au niveau de l'usine est estimé à $400\text{m}^3/\text{J}$ dont le débit horaire(Q) est de $16,67\text{m}^3/\text{h}$. La nature des rejets de la laiterie réside dans les eaux usées traitées par station d'épuration à l'intérieur de l'usine et évacuée vers l'oued (coté Est) et solides tels que le polystyrène et carton dont leur débit respectivement est de $91250\text{m}^3/\text{an}$ (liquide) et $500\text{ Kg}/\text{an}$ (solide).

Les rejets liquides de l'usine contiennent principalement une grande quantité de lactosérum issu de la production de fromage, en plus des rejets issu de la production de lait et des autres produits. Les rejets contiennent aussi des pertes de lait, et les eaux issues des différentes opérations de lavages, des nettoyages, des rinçages et désinfection des ateliers, des tanks, et l'utilisation des détergents (la quantité des eaux rejetée est supérieure à celle qui a été traitée).

Les eaux usées de la laiterie sont traitées par la station d'épuration à l'intérieur de l'usine et évacuée vers l'Oued (coté Est) comme montrée sur la Figure IV.2.

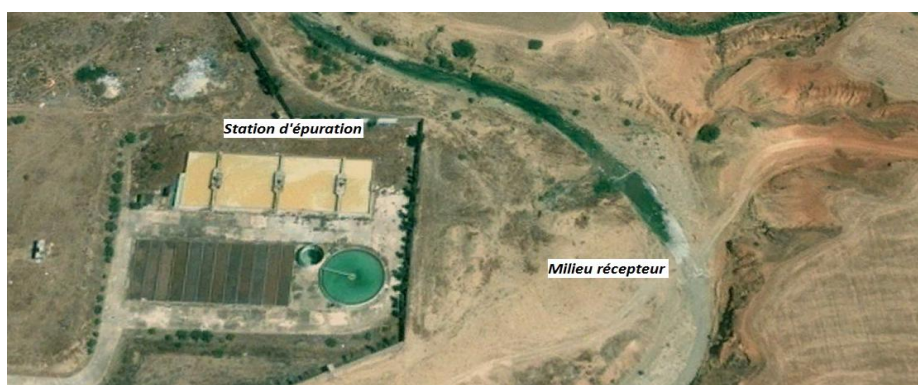


Figure IV. 2: Station d'épuration et milieu récepteur (2014)

IV.A.2.2. Points de prélèvement

Les échantillons ont été prélevés partant de l'hypothèse que les polluants pourraient être plus mobiles (Février, 2011).

Une série de 3 échantillons par point sélectionné a été effectuée en utilisant la méthode de prélèvement manuel instantané durant la période allant du 12/04/2011 au 12/05/2011. Huit points ont été sélectionnés sur le site expérimental pour prélever les échantillons à analyser, ils sont notés P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 et sont illustrés par la Figure IV.3.

Le choix de bouteilles en verre opaque a été fait. Au moment du prélèvement, ces dernières ont été rincées trois fois avec l'eau à analyser puis complètement remplies, les bouchons placés de telle façon qu'il n'y ait aucune bulle d'air. Les échantillons sont soigneusement étiquetés et transportés à 4 °C jusqu'au laboratoire dans un laps de temps ne dépassant pas 3 heures.



P1 : Point de rejet de production
(Lactosérum)



P2 : Point de rejet de l'eau de lavage



P3 : Point d'entrée de la STEP



P4 : Point de sortie de la STEP



P5 : Point de rejet final à l'extérieur de
l'usine



P6 : Point en amont de l'oued



P7 : Point de rencontre avec l'oued (au centre)



P8 : Point en aval de l'oued

Figure IV. 3: Points de prélèvement des rejets liquides de la laiterie de Sidi Sâada.

IV.A.3. Analyses physico-chimiques

Des analyses quotidiennes ont été réalisées pour tous les échantillons. Les mesures in situ des paramètres physiques tels que la température ($^{\circ}\text{C}$) et la salinité (Practical Salinity Unit ou PSU.), les teneurs d'oxygène dissous et le pH ont été effectuées à l'aide d'un multi-paramètre modèle WTW 340I (Annexe 1).

Les mesures de débit ont été faites d'une façon intuitive (approximative), les relevés de la turbidité ont été déterminés par un turbidimètre WTW 430 IR au laboratoire (Annexe 1).

Les analyses chimiques sont effectuées dans le laboratoire selon les méthodes qui sont succinctement résumées dans le Tableau IV- 2.

Tableau IV- 2: Résumé des méthodes d'analyses chimiques, DBO₅, DCO, MO et CP [12, 21].

Eléments	Méthodes
Azote ammoniacal (NH_3^+ , NH_4^+)	Dosage spectrophotométrie ($\lambda = 630 \text{ nm}$)
Nitrates (NO_3^-)	Dosage spectrophotométrie ($\lambda = 543 \text{ nm}$)
Nitrites (NO_2^-)	Réduction des nitrates en nitrites et dosage spectrophotométrie des nitrites ($\lambda = 543 \text{ nm}$)
Ortho-phosphate (PO_4^{3-})	Dosage spectrophotométrie: ($\lambda = 885 \text{ nm}$)
Demande Chimique en Oxygène (DCO)	Méthode ST-DCO utilise moins de réactifs que la méthode DCO traditionnelle, à l'aide d'un spectrophotomètre modèle WTW.
Demande Biologique en Oxygène (DBO ₅)	Equivalence libération de CO_2 Consommation d'oxygène lu sur un DBO mètre type OXITOP SI 12 WTW.
Matières en suspension (MES)	Double Pesées à 105°C (séchage à 105°C).
Résidus secs (RS)	Double pesées à 105°C
Sulfate (SO_4^{2-})	Dosage spectrophotométrie: ($\lambda = 650 \text{ nm}$)

Azote Kjeldahl (NK)	Méthode de Kjeldahl
Phosphore total (PT)	Dosage spectrophotométrie : ($\lambda=885\text{nm}$)
Calcium (Ca^{++}) et Magnésium (Mg^{++})	Dosage titrimétrique par EDTA
Sodium (Na^+), et potassium (K^+)	Dosage spectrophotométrie à flamme
Chlorures Cl^-	Dosage titrimétrique par nitrates d'argent
Graisses et Huiles	Dosées gravimétriquement après évaporation du solvant.
CT/CF/St.F	Milieux liquides par la technique du NPP

Toutes ces méthodes sont décrites en détail en annexe I.

IV.A.4. Analyse microbiologique

Les germes recherchés sont les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux [12]. Ces germes sont peu ou pas pathogènes. Ils sont révélateurs de contamination fécale et entraînent par leur abondance la présomption de contamination plus dangereuse.

La méthode de détermination du nombre le plus probable (NPP), a été utilisé par inoculation des tubes en milieu liquide pour la recherche des germes.

La détermination du nombre caractéristique (le nombre de tubes positifs) permettra l'établissement du nombre le plus probable à l'aide de la table de Mc Grady (Annexe 2).

IV.A.4.1 Dénombrement des coliformes

La méthode standard [12], fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- Le test présomptif : réservé à la recherche des coliformes totaux, réalisé sur bouillon lactosé, sa fermentation se manifeste par un trouble et un dégagement de gaz observé dans la cloche de Durham.
- Le test confirmatif : réservé à la recherche des coliformes fécaux dits coliformes thermo tolérants, à partir des tubes positifs du test précédent.

IV.A.4.2 Dénombrement des Streptocoques fécaux

La technique de recherche des Streptocoques fécaux, nécessite deux tests consécutifs [12] :

- Un test présomptif réalisé sur le milieu de Rothe.
- Un test confirmatif qui consiste à repiquer les tubes positifs sur le milieu d'Eva Litsky.
- Ensemencement : à partir de la solution mère et des dilutions décimales, on porte aseptiquement ~0.1ml (2gouttes) dans les boîtes de pétri qu'on étale à l'aide d'un râteau (ou en utilisant la méthode des cadrans).
- Incubation : elle se fait à 37°C pour les coliformes totaux et 45°C pour fécaux pendant 48 heures.

B. Valorisation du lactosérum via la production de l'éthanol

IV.B.1. Matériels

IV.B.1.1. Matériels biologiques

Les levures ont été procurées à partir de:

- l'environnement (isolement à partir du lactosérum) ;
- levains d'origine industrielle (levure commerciale *Saccharomyces cerevisiae*) ;
- Lactosérum rejeté par la laiterie de Sidi Sâada issu par la production du camembert en 2013 (Figure IV.4).



Figure IV. 4: Le lactosérum acide provenant de la laiterie de Sidi Sâada.

IV.B.1.2. Matériels non biologique

IV.B.1.2.1. Diluants et réactifs

L'eau physiologique est un diluant préparé par dissolution de 9 g de NaCl dans un litre d'eau distillée suivi d'un autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

Les réactifs chimiques sont:

- l'hydroxyde de sodium (NaOH),
- l'acide sulfurique (H₂SO₄),
- chlorure de sodium (NaCl),
- éthanol absolu 96° alcoolique,

Les autres réactifs chimiques qui ont été utilisés dans les expérimentations seront cités dans les méthodes d'analyses.

Les réactifs microbiologiques sont:

- OGA bouillon nutritif ;
- Sucres ;

- Colorants cytologiques (Rouge neutre, Lugol, Bleu de méthylène) ;

Les autres réactifs microbiologiques qui ont été utilisés dans les expérimentations seront cités dans les méthodes d'analyses.

IV.B.1.2.2. Appareillage

L'appareillage suivant a été utilisé pour la réalisation de ce travail :

Un pH mètre de marque Hanna ; Un spectrophotomètre à double faisceau (Schindra, UV 15-02) ; Un réfrigérateur réglé à 20 °C de marque Electrostar ; Un congélateur réglé à 4°C de marque Electrostar ; Une loupe binoculaire optique de marque Zeiss ; Un polarimètre de marque Shidru ; Une balance analytique de paillasse de marque Rayna ; Une étuve réglée à 30°C de marque Memmert ; Un bain marie réglable de marque Digitale Water Batch ; Un autoclave de marque Raypa ; Un microscope optique de marque Leica ; Agitateur de marque Ikacmag ; Autres appareillages qui ont été utilisés dans les expérimentations seront cités dans les méthodes d'analyses.

IV.B.2. Procédures expérimentales

IV.B.2.1. Préparation des milieux et leur conservation

Les milieux de fermentation, d'isolement, d'identification et de purification ont été préparés et stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes, refroidis dans un bain marie à 45°C puis dans des conditions stériles près de la flamme d'un bec benzène distribués dans des boîtes de pétri, dans des tubes à essai, dans des flacon, dans des bombonnes ou dans des colonnes stériles. Les milieux sont conservés à 4°C.

IV.B.2.2. Isolement et purification des levures

Les analyses ont été effectuées par les réactifs et l'appareillage sus-cités.

IV.B.2.2.1. Isolement des levures

Des dilutions dans l'eau physiologique sont effectuées à partir de la suspension (lactosérum) (1ml/9ml). 1ml de chaque dilution est étalé sur la surface d'un milieu solide sélectif aux levures (milieu OGA bouillon nutritif à l'oxytétracycline) en boîtes de Pétri. Après incubation à 25°C pendant 5 à 7 jours, sont retenues les boîtes présentant des colonies isolées et qui sont faciles à prélever (Figure IV.5). Chaque colonie va servir à ensemercer un tube de milieu nutritif OGA à l'oxytétracycline.

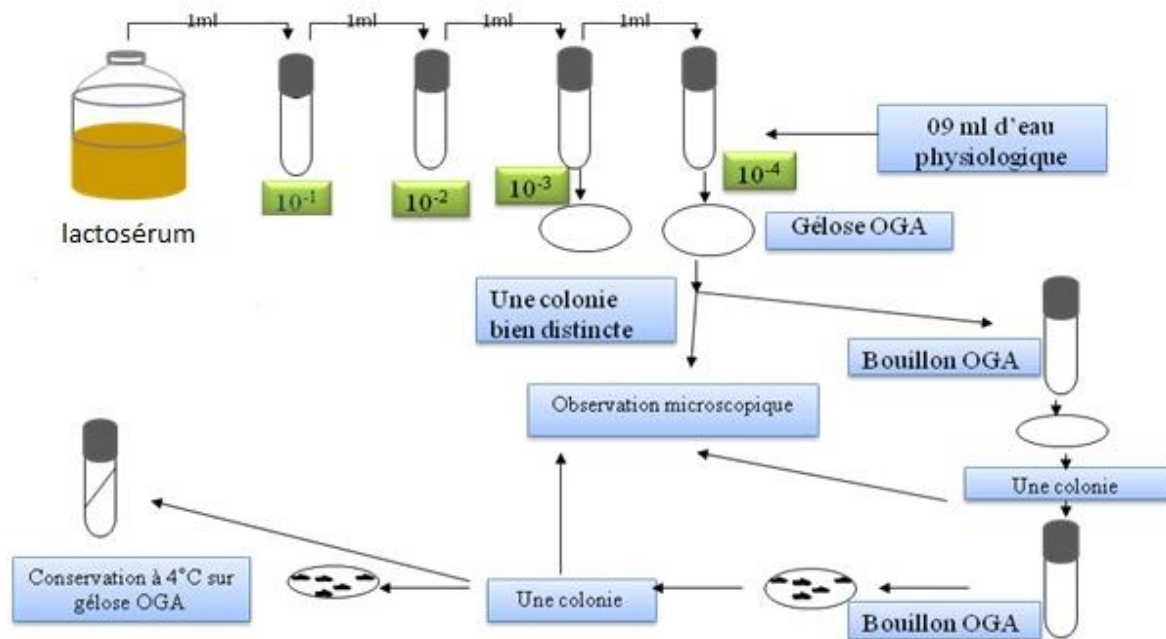


Figure IV. 5: Diagramme d'isolement des souches [62].

IV.B.2.2.2. Purification et identification des levures isolées

La pureté des levures isolées est contrôlée au microscope de marque Leica; modèle CME par un examen à l'état frais. L'identification est basée sur les caractères morphologiques et biochimiques. Afin d'identifier nos souches isolées [75], nous avons utilisé les critères suivants :

- La forme des cellules ;
- La coloration (Annexe 3) ;
- L'examen à l'état frais (coloration simple) (Annexe 3).
- Etude des caractères morphologiques et cellulaires : Un frottis est préparé à partir d'une culture jeune de 24 à 48h de développement en milieu solide puis examiné au microscope.
- Morphologie cellulaire normale et mode de multiplication végétative (aptitude à la filamentation) : pour ce test, la levure est ensemencée en une strie longitudinale sur une lame recouverte de bouillon nutritif (annexe 3) et placée dans une boîte de Pétri contenant un peu d'eau distillée stérile pour éviter la dessiccation du milieu ; recouvrir la lame d'une lamelle et incubé une semaine à 30 °C. Après cette période d'incubation, la préparation est examinée au microscope.
- Tests biochimiques et physiologiques (Fermentation des sucres) : l'étude du métabolisme des glucides par la voie fermentaire, est réalisée en tube de Durham. Les différents sucres testés sont : glucose, galactose, maltose, saccharose, lactose et le raffinose. Tous les sucres sont utilisés à la concentration de 2% dans 10ml de milieu de fermentation (annexe 3), composé du

carbohydate à tester comme seule source de substance fermentescible. En présence de sources azotées (peptone, extrait de levure) et de facteurs de croissance.

Après incubation à 30 °C, la lecture se fait sur une période de 15 jours à raison d'une observation tous les deux jours. La fermentation se traduit par l'observation d'un dégagement gazeux dans la cloche de Durham.

IV.B.2.2.3. Repiquage et revivification de la souche de référence (commerciale)

Les levures sont simplement réhydratées dans une solution saline : une concentration a été testée (9g/l) correspondant à une force ionique de 150mM. Les suspensions sont préparées par dispersion et réhydratation de 2g/l d'agrégats de levures, sous agitation douce et à température ambiante pendant 10min. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation, lavées deux fois et re-suspendues dans le milieu salin adéquat. Le pH de ces solutions est d'environ 5,5.

La souche utilisée sous forme poudre lyophilisée en culture pure est activée et maintenue par un repiquage avec 1ml d'inoculât dans 9ml de bouillon nutritif, puis incubée à 30°C pendant 72heures et ensuite stockée à 4°C. La souche de levure à tester, est repiquée sur la gélose de bouillon nutritif à pH 5,6 puis, les boites sont incubées à 30°C pendant 24 h. Deux à trois colonies de chaque culture, sont inoculées dans le bouillon nutritif (annexe 3). Les suspensions levuriennes sont ensuite placées dans une étuve réglée à 30 °C d'une durée variable entre 72h et 7 jours.

La pureté de la levure est contrôlée au microscope par un examen à l'état frais. La vérification de la pureté de la souche utilisée a été réalisée à partir des caractères cultureux, morphologiques, cellulaires, sexuelles, biochimiques et physiologiques.

IV.B.2.3. Analyse physicochimique du substrat (lactosérum brut et traité)

IV.B.2.3.1. Détermination de la matière sèche

L'extrait sec réel s'obtient par dessiccation à l'étuve à 105°C et pesé jusqu'à poids constant. Pour cela, une prise d'essai de 5 g de lactosérum est mise dans une capsule de porcelaine préalablement séchée et pesée que l'on place dans une étuve réglée à une température de 105°C. Après son retrait de l'étuve, la capsule est placée dans un dessiccateur jusqu'à son refroidissement pour être pesée. La dessiccation est poursuivie jusqu'à ce que la différence entre deux pesées successives ne dépasse pas les 2 mg. Les pesées doivent être faites rapidement; le résidu étant hygroscopique. La matière sèche en g pour 100g (%) est exprimée comme suit :

$$MS(\%) = \left(\frac{P}{P'} \right) \times 100$$

Avec : P: Le résidu sec et P': La prise d'essai de lactosérum évaluée en g.

IV.B.2.3.2. Détermination des cendres

Les cendres ont été obtenues par incinération de la matière organique à une température de 530°C pendant 2 heures dans un four à moufle. Pour cela, une prise d'essai de 5g de lactosérum séchée est placée dans une capsule en porcelaine préalablement séchée à l'étuve et tarée. Cette capsule est introduite dans un four à moufle où l'incinération est poursuivie jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres. La teneur en cendres (C exprimé en %).

Avec P₂: Poids en g des cendres obtenus et P₁: Poids en g de la prise d'essai.

$$C(\%) = \left(\frac{P_2}{P_1} \right) \times 100$$

IV.B.2.3.3. Analyse des éléments minéraux

L'analyse des minéraux est précédée par la préparation du minéralisât à partir des cendres obtenus que l'on récupère avec de l'eau distillée tiède et que l'on filtre. La capsule de porcelaine est également rincé à plusieurs reprises avec de l'eau distillée et les eaux de rinçages rejoignent ceux du minéralisât, le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillé. Le filtrat ainsi préparé constitue le minéralisât dans lequel seront dosés tous les éléments minéraux.

IV.B.2.3.4. Dosage du calcium et du magnésium

Le dosage de ces deux ions a été effectué par complexométrie dont le principe repose sur la capacité de ces deux minéraux à réagir avec le sel di-sodique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA-Na₂) pour former des complexes stables à pH 10 (annexe1).

IV.B.2.3.5. Dosage des chlorures

La méthode de Mohr consiste à doser les chlorures en milieu neutre par la solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium, la fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent.

IV.B.2.3.6. Dosage des sulfates

Le dosage des sulfates consiste à les précipiter sous forme de sulfate de baryum par réaction avec du chlorure de baryum. La méthode détaillée du dosage des éléments minéraux est décrite en annexe1.

IV.B.2.3.7. Dosage des acides aminés (indice de formol : méthode de Sørensen)

Pour doser les petites quantités d'acides aminés libres dans lactosérum autoclavé, on introduit dans un bécher 10 ml de l'échantillon puis 1 ml de phénophtaléine et 0,4 ml de solution d'oxalate de potassium. On Laisse ces produits deux minutes puis on titre par 0.1N de NaOH jusqu'au virage violet(ne pas prendre en considération la quantité de NaOH nécessaire à ce virage).On ajoute 2ml de formol et on observe directement la disparition de la couleur violette. Ensuite, on Titre pour la deuxième par le NaOH 0,1N jusqu'au point d'équilibre on prenant en considération la quantité de NaOH nécessaire pour cet équilibre (n).Le témoin est préparer de la même façon, on remplaçant l'échantillon lactosérum avec 10 ml d'eau distillée. La quantité de NaOH nécessaire à l'équilibre est notée (n').

Le pourcentage des acides aminés libres = $(n - n') \cdot 1,7\%$

Avec 1,7: facteur exprimant la quantité de soude utilisée dans le titrage, exprimé en ml de solution à 0,1 mol/l pour 10 ml de l'échantillon.

IV.B.2.4. Supports d'immobilisation

Nous avons utilisé deux supports organiques tels que les noyaux d'olives et le polymère polyéthylène(PE) et un support inorganique la pouzzolane

IV.B.2.4.1. Description des supports

IV.B.2.4.1.1. Pouzzolane

La pouzzolane qui est une roche siliceuse, choisie en premier lieu pour sa disponibilité sur le marché Algérien et pour ses caractéristiques qualifiées excellentes pour la fixation des cellules [113] par adsorption grâce à leur porosité (Figure IV.6).

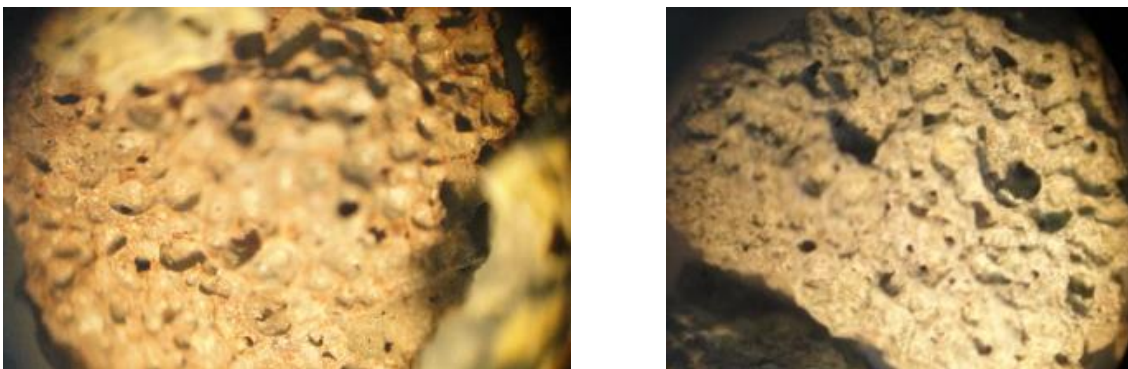


Figure IV. 6: La pouzzolane (vue sous une loupe binoculaire).

La pouzzolane est une roche formée de fragments de magma projetés dans l'atmosphère lors d'éruption volcaniques et refroidis au cours de leur parcours aérien. Elle est le plus souvent rouge ou noire, avec l'ensemble des teintes intermédiaires, exceptionnellement

grise [114, 115]. La pouzzolane utilisée dans ce travail a été extraite du gisement de Bouhamidi situé au sud de Béni-Saf, représenté par une montagne de forme conique appelée El-Kalcoul situé à la côte absolue de 236 m. Sa composition chimique ainsi que les caractéristiques physiques [116] sont résumés sur le Tableau IV- 3 et le Tableau IV- 4.

Tableau IV- 3: Composition chimique élémentaire de la pouzzolane de Beni Saf-Algérie.

Eléments chimiques	Caractérisation chimique en %
Silice (SiO ₂)	47,81±5,84
Alumine (Al ₂ O ₃)	16,98±0,49
Oxydes ferriques (Fe ₂ O ₃)	09,80±0,94
Chaux (CaO)	10,71±1,35
Magnésie (MgO)	03,30±1,05
Oxyde de sodium (Na ₂ O)	03,73±0,46
Oxyde de potassium (K ₂ O)	01,56±0,21
Protoxyde de fer (FeO)	/
Oxyde de titane (TiO ₂)	/
Trioxyde de soufre (SO ₃)	0,64 ±0,04
Carbonate de calcium (CaCO ₃)	10,75±0,5
Anhydride sulfurique (SO ₂)	/
Anhydride phosphorique (P ₂ O ₃)	/
Alcalis totaux (Na ₂ O)	03

Tableau IV- 4: Caractéristiques physiques de la pouzzolane.

Caractéristiques physiques	Valeurs
Densité apparente	0,8 à 1,1
pH	6,7±0,3
Masse volumique absolue (g/cm ³)	2,49
Surface spécifique Blaine (cm ² /g)	2670 et 4326
Absorption (%)	10 à 12
Porosité (%)	63,5 ± 1,4
Humidité (%)	19 à 26
Perte au feu (%)	5,35±1,63

IV.B.2.4.1.2. Les noyaux d'olives

Les noyaux d'olives sont des sous-produits naturels d'origine végétale issus essentiellement de procédés tels que la préparation d'huile d'olive et l'obtention d'olives dénoyautées pour le commerce. Ces déchets sont des matériaux carbonés habituellement utilisés dans différents domaines, pour l'alimentation animale, pour produire de l'huile de grignons d'olive, pour la fabrication de quelques produits cosmétiques et depuis quelques années, ces derniers sont utilisés comme combustible aussi bien dans l'industrie qu'à des fins domestiques.

Vu leur structure carbonée et leur abondance, des recherches ont été effectuées sur l'utilisation des noyaux d'olives pour la préparation de charbons utilisés dans le traitement des eaux [117, 118].

Composition des noyaux d'olive. L'olive est une drupe, dont la peau (épicarpe) est recouverte d'une matière cireuse imperméable à l'eau, avec une pulpe (mésocarpe) charnue riche en matière grasse. Le noyau très dur, osseux, est formé d'une enveloppe (endocarpe) qui se sclérifie l'été à partir de la fin juillet, et contient une amande avec deux ovaires, dont l'un est généralement stérile et non fonctionnel: cette graine (rarement deux) produit un embryon, qui donnera un nouvel olivier si les conditions sont favorables. La composition chimique des noyaux d'olives est énumérée dans le Tableau IV- 5 [118].

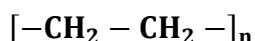
Tableau IV- 5: Composition chimique des noyaux d'olive et amande.

Caractérisation chimique	Valeurs (%)
Matières azotés totales	1.2
Matières grasses	0.8
Cellulose brute	74.1
Matières minérales	1.2
Extractif non azoté	22.7

IV.B.2.4.1.3. Matière en polyéthylène

Le polyéthylène est de la famille des polymères de l'éthylène et des copolymères avec d'autres oléfines linéaires (butène, hexène, octène), et parfois avec le propylène.

Comme l'éthylène est un dérivé du pétrole, c'est une matière relativement bon marché. Les PE présentent aussi l'intérêt d'être facilement recyclés et de se mélanger assez bien entre eux ; la combustion ne présente pas de produits toxiques. Le polyéthylène est un des polymères les plus simples et les moins chers [119]. Sa nature paraffinique explique sa grande inertie chimique. Sa structure chimique est représentée comme suit :



Ces propriétés peuvent être résumées sur le tableau suivant (Tableau IV- 6) :

Tableau IV- 6: Propriétés du polyéthylène (Techniques de l'ingénieur).

Famille	Polyéthylène.
Type	Thermoplastique Semi-cristallin.
Caractéristiques physiologiques	Les PE ont une bonne inertie chimique et peuvent être utilisés dans l'alimentaire.
Densité	Entre 0,938 et 0,968.
Température de fusion	Entre 127 et 138°C.
Stabilité dimensionnelle	Jusqu'à 55°C.

IV.B.2.4.2. Détermination de la granulométrie, porosité et densité des supports

IV.B.2.4.2.1. Traitement des supports

Afin d'éliminer toute substance contenue dans les supports utilisés susceptible de se solubiliser dans le milieu réactionnel, le traitement des supports s'avèrent nécessaire:

- la pouzzolane est traitée par rinçage à l'eau distillée, puis émergée dans l'alcool 96% pendant 24 heures. Ensuite elle est rincée à l'eau oxygénée afin d'éliminer toute trace restante. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, le support est séché à 105°C dans l'étuve pendant 10 heures, jusqu'à poids constant. Avant l'utilisation pour l'immobilisation cellulaire, la pouzzolane est autoclavée à 120°C pendant 30 minutes.
- les noyaux d'olives : le matériau est lavé avec de l'eau légèrement acidifiée puis laissé sécher à l'air libre. Une solution aqueuse de H₂SO₄ à 10% est mélangée en proportion 1:1 avec les noyaux d'olives pendant 24 heures. Une fois nettoyé et lavé avec de l'eau distillée, on laisse le matériau sécher à température ambiante pendant plus de 6 heures, puis à 110°C pendant 24 heures dans une étuve. On obtient un matériau sec, d'une couleur marron foncé.
- le polymère PE : le polyéthylène sous forme de granulés a été utilisé comme tel sans traitement préalable.

IV.B.2.4.2.2. Détermination de la porosité de garnissages utilisés des supports

La teneur en eau libre mesurée permet une estimation de la porosité de la pouzzolane. Cette eau libre occupe en effet une partie du réseau poreux. En considérant la masse de l'eau, ρ_{eau} égale à 1g.cm⁻³, la perte relative de masse par gramme de pouzzolane en g.g⁻¹, correspond à un volume de pores par grammes de pouzzolane en cm³.g⁻¹ [62].

IV.B.2.4.2.3. Densité et masse volumique

La masse volumique apparente d'un matériau est mesurée en effectuant le rapport masse sèche sur volume. Cette mesure prend en compte dans l'estimation du volume. Les vides ménagés par la porosité du matériau. La masse volumique s'exprime en Kg.m⁻³. L'augmentation de volume et de masse provoquée par l'introduction du matériau dans une éprouvette d'eau permet d'estimer sa masse volumique réelle, c'est –à-dire le rapport entre masse de matériau et le volume qu'il occupée sans prise en compte du vides. La densité s'obtient en faisant le rapport entre la masse volumique réelle du matériau et celle de l'eau.

$$\rho_{\text{matériau}} = \frac{\Delta m_{\text{matériau}}}{\Delta v_{\text{matériau}}}$$

$\rho_{\text{matériau}}$: la masse volumique du matériau (Kg.m⁻³).

$$d = \frac{\rho_{\text{matériau}}}{\rho_{\text{eau}}}$$

d : Densité du matériau, le cas de pouzzolane la densité est égale à 1.02 [114].

IV.B.2.4.2.4. Aire spécifique

L'aire spécifique A_s d'un matériau correspond à la surface totale des particules par unité de volume. L'hypothèse de la sphéricité des particules est couramment admise pour estimer A_s . Le cas de pouzzolane, la surface spécifique est estimée à $>5900 \text{ cm}^2/\text{g}$ [114].

IV.B.2.5. Suivi de fermentation alcoolique

Deux souches ont été utilisées dans le présent travail: genre isolées à partir du lactosérum et une levure de boulangerie de référence pour une étude comparative entre la production d'éthanol par systèmes discontinu à cellules libres et un système continu à cellules immobilisées sur les trois supports avec deux milieux de culture (lactosérum et bouillon nutritif).

IV.B.2.5.1. Préparation des inocula

Les suspensions de levures étaient étalées en utilisant la technique de stries par épuisement sur des géloses de bouillon nutritif solidifiées. Après 3 jours d'incubation à 30°C , nous avons vérifié les colonies au microscope pour s'assurer qu'il s'agissait de levure et non d'une quelconque.

Quelques colonies des trois souches étaient repiquées dans les milieux de bouillon nutritif (plus oxytétracycline) et lactosérum autoclavé, incubé à 30°C , 3 à 5 jours. Des flacons de 150 ml contenant 100 ml de bouillon sont alors inoculés avec 1% de suspension cellulaire issue de pré-culture précédente, et incubés pendant 5 h à 30°C et 100 trs /mn.

IV.B.2.5.2. Milieux de culture

Dans un premier temps, le milieu choisi pour le pré culture et la culture des levures est le bouillon nutritif. En second lieu, nous avons utilisé un milieu à base de lactosérum acide provenant de la laiterie Sidi Saâda, Relizane. Ce dernier subit une déprotéinisation par autoclavage.

IV.B.2.5.3. Conduite des fermentations

La préparation de l'inoculum se fait par des prés cultures en fioles d'Erlenmeyer, la conduite des fermentations discontinues à cellules libres sont conduites dans un réacteur de 1L. Le volume utile est de 900 ml. Le pH est 5,5, la température est maintenue à 30°C , avec une anaérobiose. L'agitation est de 100tr/mn. Les cultures continues à cellules immobilisées ont été réalisées aux conditions citées ci-dessous.

IV.B.2.5.3.1. Fixation des cellules

Nous avons introduit dans des colonnes en plastique alimentaire stérilisables des quantités égales de 20 g de la pouzzolane, des noyaux d'olives et de polyéthylène. Le lit des supports est immergé par le lactosérum traité et de bouillon nutritif pour la fermentation alcoolique et par culture bactériennes pour la fermentation alcoolique durant 3 jours, jusqu'à la fixation des cellules puis le surnagent est récupéré.

IV.B.2.5.3.2. Dispositif de fermentation en culture discontinue à cellules libres

Les fermentations ont été réalisées dans des flacons autoclavés d'un (01) litre de volume pour les cultures en batch ou en discontinu à cellules libres, sachant que le volume total du milieu en cours de fermentation est de 1000 ml. Les fermenteurs sont incubés à 30°C. L'orifice des prélèvements est assuré par des tuyaux autolavables dont les extrémités sont fermées par des cloches Durham stériles. Pour renforcer les conditions d'asepsie, chaque tuyau est assemblé par une roulette arrêtant le contact avec l'extérieur, une seringue stérile est utilisée pour prélever les échantillons aux fins d'analyses. Pour assurer l'agitation, les fermenteurs ont été mis dans un bac en verre contenant de l'eau distillée dont l'ensemble a été placé sur un agitateur mécanique chauffant de marque Iama dont la température est vérifiée par un thermomètre (Figure IV- 7).

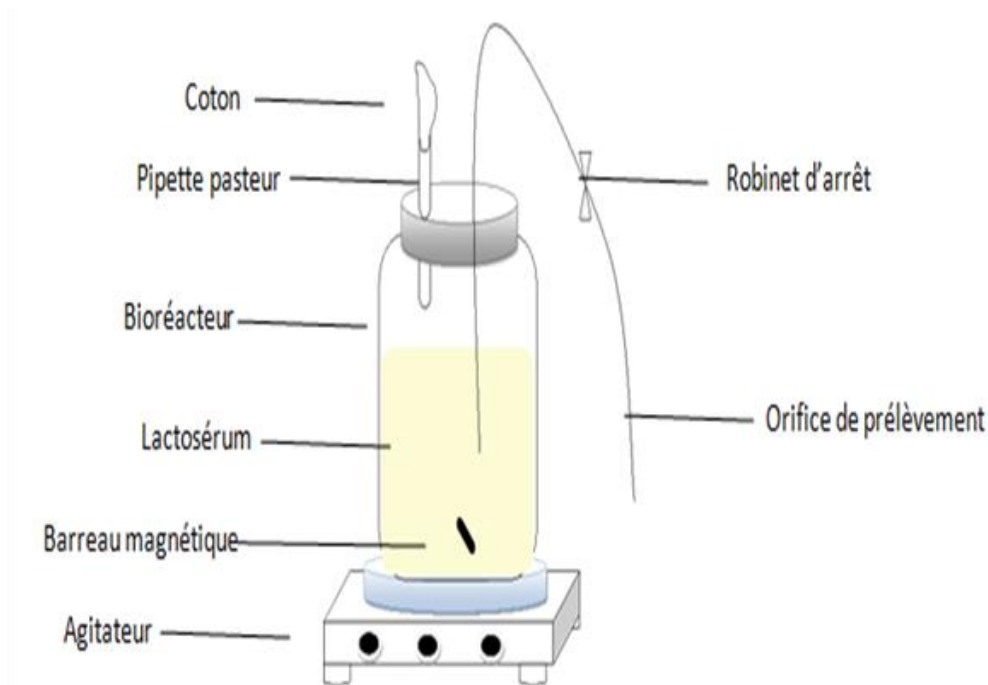


Figure IV. 7: Dispositif de fermentation en culture discontinue "batch" à cellules libres.

IV.B.2.5.3.3. Dispositif de fermentation en culture continue à cellules immobilisées

Dans notre protocole expérimental, nous avons mené en premières étape des fermentations en continue à cellules immobilisées dans un fermenteur composant d'une montagne expérimental tel qu'il est schématisé dans la Figure IV-8. Le dispositif est constitué de colonne fabriquée à base d'un polymère alimentaire de 15cm de hauteur, 5cm de diamètre et de volumes garnies par la pouzzolane ou les noyaux d'olives. Ces colonnes sont stérilisables par un autoclavage sous 120°C pendant 15minutes.

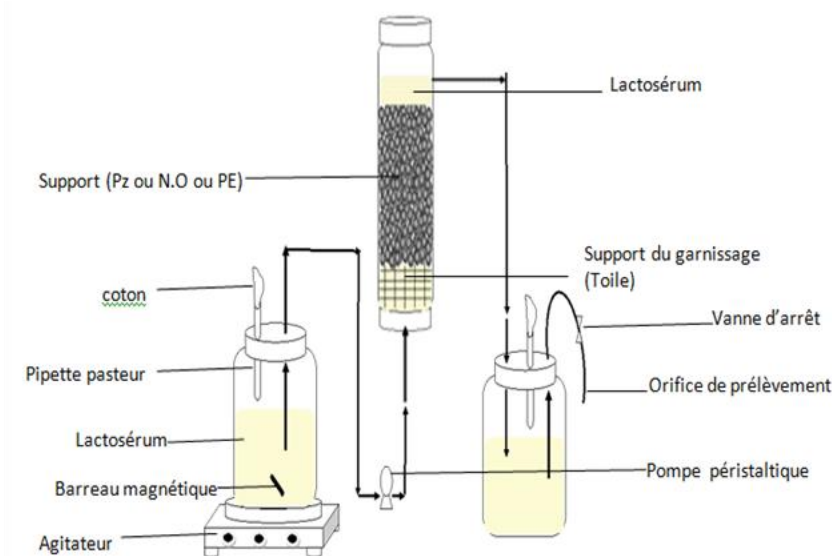


Figure IV. 8: Dispositif de fermentation en culture continue à cellules immobilisées à 30°C, 100 trs/min pendant 7 jours

Au fond de ces colonnes, est disposée une grille qui empêche le support d'obstruer l'orifice d'alimentation ascendante. L'envoi du milieu de culture est assuré par effet de pesanteur ayant un débit réglé.

La vitesse d'alimentation est augmentée quand la matière particulaire est accumulée dans la canalisation. Le temps de séjour a été calculé à partir du volume du bioréacteur et du débit d'alimentation selon l'équation suivante [140] :

$$t_s = \frac{V_t}{Q}$$

Où t_s = temps de séjour, V_t = volume total du réacteur incluant le décanteur. Q = débit de l'alimentation.

Par contre le temps de contact est calculé en fonction du volume du garnissage granulométrique comme suit :

$$t_c = \frac{V_{lit}}{Q}$$

Où : t_c : temps de contact ; V_{lit} : volume du garnissage ; Q : débit de l'alimentation.

Le taux de dilution hydraulique T (h^{-1}) est le rapport du débit d'alimentation Q ($l.h^{-1}$) sur le volume utile du réacteur (L). Le Tableau IV- 7 regroupe les différents paramètres calculés pour cette étude avec : $V_t=150ml$; $V_{lit}=100ml$.

Tableau IV- 7: Détermination des paramètres d'alimentation par milieu au cours de la fermentation continue

Souches	Levures			
	Support	Pouzzolane	Noyaux d'olives	Polyéthylène
Taux de dilution (h^{-1})	$0,7.10^{-4}$	$0,9.10^{-4}$	$0,6.10^{-4}$	
Temps de séjour (h)	2,23	1,95	2,72	
Temps de contact (h)	1,5	1,3	1,8	
Débit ($ml.h^{-1}$)	67	77	55	

IV.B.2.5.4. Stérilisation du matériel utilisé dans les essais de fermentation

Pour éviter toute contamination, un autoclavage a été effectué à une température de $120^{\circ}C$ pendant 15 à 20minutes, des colonnes munies de garnissage et fermenteur ainsi que leurs accessoires exceptions faites de certaines parties dont la stérilisation est effectuée par l'eau oxygénée pour des raisons pratiques.

IV.B.2.5.5. Evolution des paramètres durant la fermentation

IV.B.2.5.5.1. Evolution de la biomasse

L'étude de l'évolution de la biomasse en fonction du temps a été déterminée par le dénombrement qui s'effectue par la méthode de dilution sur OGA gélose, puis une incubation à $30^{\circ}C$ pendant 24 heures et par la mesure spectrophotométrie soit la densité qui s'effectue à une longueur d'onde de 600 nm. Dans le cas des dilutions, la turbidité est proportionnelle à la biomasse lorsqu'elle ne dépasse pas la limite 0,5-0,6 en unité d'absorbance [12].

IV.B.2.5.5.2. Evolution du pH

La mesure de l'acidité a été effectuée à l'aide d'un pH mètre de type Hanna.

IV.B.2.5.5.3. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont dosés par la méthode colorimétrique utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNSA). Le DNSA réagit avec les extrémités réductrices des sucres en développant une coloration rouge qui absorbe à $\lambda = 530$ nm. Un droit étalon est établi par utilisation de 10 points de concentrations en glucose allant de 0,1 à $1g.l^{-1}$ par palier de $0,1g/l$. La méthode de dosage est annexée (annexe3).

IV.B.2.5.5.3. Evolution de la production de l'alcool éthylique

Ce dosage a été effectué selon la méthode décrite en annexe 3.

Chapitre V

Résultats et discussions

Chapitre V : Résultats et discussions

V.A. Evaluation sommaire des dangers écologiques des effluents liquides

Les essais préliminaires de cette étude sont basés sur le calcul de la moyenne des paramètres indiqués sur le Tableau V- 1.

Tableau V- 1 : Valeurs préliminaires de quelques paramètres physico-chimiques

	pH	Cp/VS	DBO ₅	Cp/VS	DCO	Cp/VS	MES	Cp/VS	DCO/DBO ₅
Moyenne de trois essais	2,1	0,28	90	2,571	714	5,950	24,42	0,698	4,63

Pour le rapport $Cp/V_s > 1$ (Cp : valeur du paramètre ; V_s : Valeur seuil). Pour des concentrations supérieures aux valeurs seuils, la démarche indique la présence de substances dangereuses dans les effluents, lesquelles peuvent altérer l'organisation et la structure des organismes dans l'écosystème. Dans ces conditions, la démarche recommande l'estimation de l'index de biodégradabilité des rejets en utilisant le rapport DCO/DBO_5 , dans le cas où ce rapport est supérieur à 3, la démarche indique la présence massive de substances difficilement ou non dégradables et suggère une évaluation détaillée des dangers générés par la laiterie.

V.B. Rejets liquides industriels

V.B.1. Caractérisation organoleptique

Huit panélistes ont été sélectionnés pour mener à bien l'évaluation organoleptique sur la couleur, odeur, texture et le goût durant une période de 30 jours. Les résultats de cette analyse descriptive sont représentés dans le Tableau V- 2.

D'après ce tableau, l'appréciation des paramètres organoleptiques varient d'un échantillon à un autre et d'un jour à un autre, elle est basé sur les attributs les plus répétés dont les cas particuliers ont été sous évalués.

En général, tous les sujets différencient la couleur des échantillons selon leur trouble. En effet, le panel a statué que le trouble devient clair après le passage des rejets dans la STEP. Ceci pourrait être dû à la dilution de lactosérum par les autres rejets dont la composition est différente à celle du lactosérum notamment les caséines et les graisses.

Tableau V- 2: Caractéristiques organoleptiques

	Couleur	Odeur	Goût	Texture
P1 Lactosérum	Jaune au crème éclairci	Aigre	Aigrelet Piquant	Laiteuse
P2 Eau de lavage	Trouble laiteux	Légèrement aigre	Neutre Insipide	Colloïdale
P3 Entrée de la STEP	Claire et légèrement trouble	Saisissante	Légèrement acide	Moins visqueuse
P4 Sortie de la STEP	Trouble	Repoussante	Légèrement acide	Lisse
P5 Rejet final	Blanchâtre et trouble	Repoussante	Légèrement acide	Fluide non visqueux
P6 En amont de l'oued	Claire avec nuances gris	Désagréable	Moins alcalin Moins chloré	Fluide non visqueux
P7 Point de rencontre	Légèrement trouble	Repoussante	Neutre	Fluide non visqueux
P8 En aval de l'oued	Blanche éclairée	Désagréable	Neutre	Fluide non visqueux

L'odeur est un attribut caractéristique fréquemment rencontrés au niveau des rejets laitiers. Le panel a recensé des odeurs aigre, repoussante et désagréable qui sont dues aux fermentations effectuées par des microorganismes aérobies et anaérobies.

Concernant le goût des différents échantillons et d'après le tableau, le panel a ressenti une diminution du goût aigre allant du lactosérum au rejet final où il devient neutre au point de contact avec l'oued. Cette évolution est attribuée à la dilution et à la neutralisation par les produits d'entretien et de nettoyage.

La texture fluide est détectée dans tous les échantillons passant par la texture laiteuse au fluide non visqueux. En outre elle est attribuée à l'utilisation de la flore microbienne des nutriments du lactosérum (fermentations). Ceci pourrait expliquer les résultats relatifs aux critères organoleptiques étudiés.

Toute eau présente une couleur dite vraie résultant des différentes couleurs des particules qui s'y retrouvent. Toutes fois, du fait d'une concentration anormale de certains éléments dans l'eau suite à une pollution donnée, la couleur de l'eau change et est en ce moment dictée par la coloration de ces éléments polluants. Une telle couleur de l'eau est dite apparente. Elle évalue la quantité de matières solubilisées et de colloïdes tels que les composés chimiques solubles à coloration marquée, les métaux et d'autres déchets [12, 21].

Ces appréciations ne rejoignent pas les recommandations émises par l'organisation mondiale de la santé respectives pour les eaux usées qui doivent être incolores et inodores (OMS, 1989), elles peuvent accuser un cas de pollution biologique.

V.B.2. Caractérisation physicochimique

Pour caractériser les différents échantillons prélevés au niveau de la laiterie, l'évolution des paramètres physicochimiques a été suivie pendant 30 jours. Ainsi, les données sont recueillies dans les figures suivantes:

V.B.2.1. Température

Au regard des résultats escomptés, l'évolution de la température des effluents fait apparaître trois intervalles de températures (Figure V- 1).

- Supérieur à la norme (P2);
- Aux alentours de la norme (P1) ;
- Inférieur à la norme (P3, P4, P5, P6, P7 et P8)

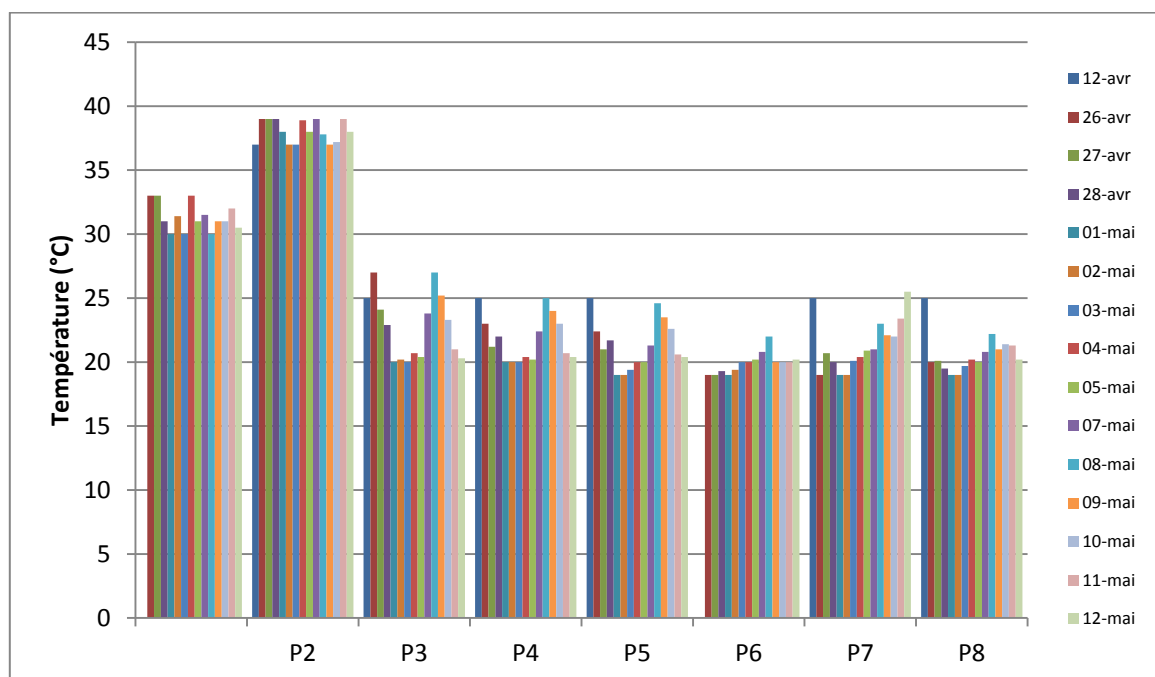


Figure V- 1: La variation spatiotemporelle de la température des échantillons.
Norme de rejet des eaux résiduaires traitées : 30°C (JORADP 1999, 2006)

Les températures des P3 au P8 (de 19 à 27°C) n'ont jamais dépassé la valeur limite préconisée (30°C) et qui sont liées à la température de l'air. Les effluents les plus chauds sont ceux du rejet de lavage P2 en moyenne, avec des extrêmes de 37 et 39°C. Ces derniers sont dus à l'apport de l'eau chaude (60-75°C) utilisée pour le rinçage des tanks de réception du

lait. Par contre les températures du lactosérum évaluées entre 30 et 33°C correspondent à celle de la pâte de la production laitière (fermentation).

Toutes les températures notées sont supérieures à 15°C ce qui intensifient les odeurs et les saveurs [12, 21] car la température joue un rôle fondamental dans toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans un milieu liquide. La vitesse de dégradation de la matière organique dans une eau usée est d'autant plus importante que la température est élevée [120]. Son importance se fait surtout sentir, dans la cinétique de l'épuration, par une accélération des processus d'épuration quand le milieu biologique s'y prête. Il est à noter que les normes de température des rejets des eaux résiduaires traitées est de 30°C (JORADP, 2006)

V.B.2.2. Le potentiel hydrogène (pH)

Le pH permet d'exprimer le caractère acide ($pH < 7$) ou basique ($pH > 7$). Sa valeur dépend des équilibres ioniques dans l'eau. Le pH a une grande influence sur la répartition des métaux lourds dans l'eau [120]. Des pH faibles (eaux acides) augmentent notamment le risque de présence de métaux sous une forme ionique plus toxique. Le pH influe sur de nombreuses réactions physico-chimiques et la distribution des microorganismes impliqués dans la dégradation des matières organiques.

Le suivi du pH au niveau des différents points de prélèvements est présenté sur la Figure V- 2 afin de déterminer son influence sur la qualité des effluents.

D'après la Figure V-2, les valeurs du pH varient entre 2 et 8,5. Trois groupes de variation de pH sont observés.

Au point P1, le pH varie entre 2 et 3,5, Il correspond aux rejets riches en métabolites synthétisés par les microorganismes notamment les acides organiques et CO₂ en fonction du temps, il s'agit du lactosérum acide.

Aux points de prélèvement P2, P3, P4 et P5, les moyennes des valeurs mesurées s'établissent à 4,74

Aux points P6, P7 et P8, le pH rejoint la norme ($> 6,5$ et $< 8,5$).

D'une façon générale et par rapport aux valeurs normatives, le rejet industriel à l'intérieur de la laiterie se distingue par des valeurs faibles et des valeurs trop fortes. Mais c'est surtout le rejet industriel qui apparaît hors norme.

Les valeurs particulièrement élevées parfois mesurées sur l'effluent industriel résultent certainement de rejets d'eaux, fortement basiques qui correspondent aux points P2 et P3 du 07/05/2011.

Lorsque le pH dépasse la norme limitée à 8,5, ceci dit que ce pH favorise la volatilisation de l'azote ammoniacal dans l'atmosphère. En effet, ce phénomène appelé « Stripping » permet d'éliminer par entrainement gazeux des quantités d'autant plus importantes d'azote ammoniacal que le pH est élevé [121].

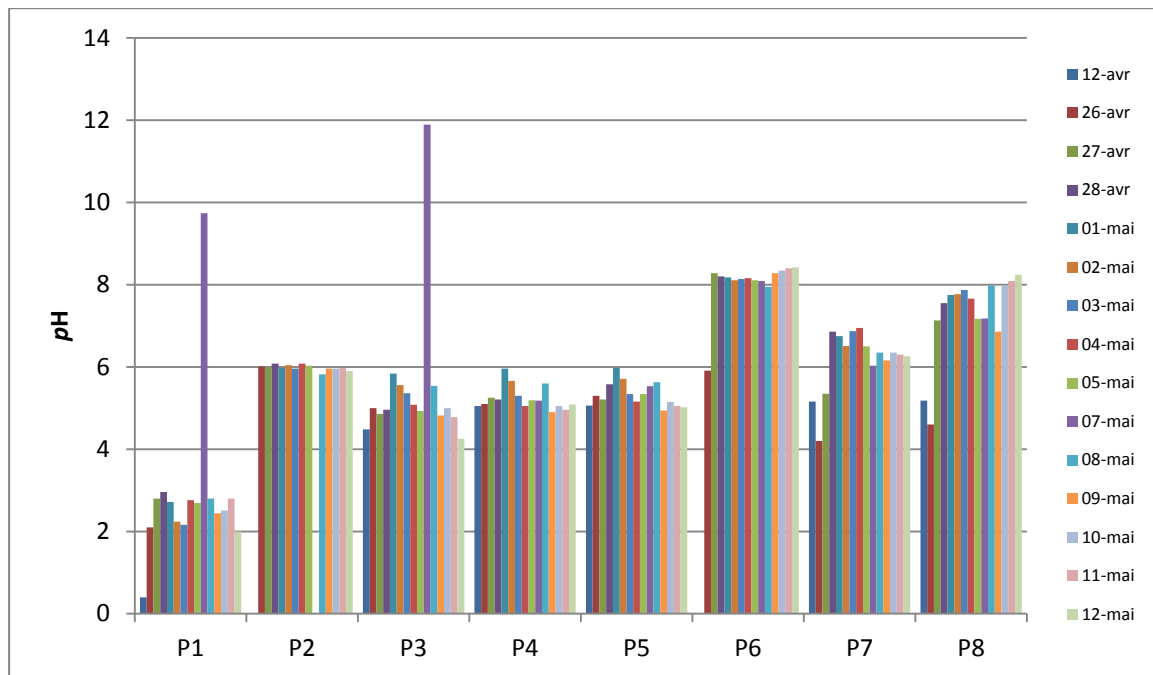


Figure V- 2: La variation spatiotemporelle du pH des échantillons.

Norme de rejet des eaux résiduaires traitées : $6,5 < pH < 8,5$ (JORADP 1999, 2006)

V.B.2.3. La salinité

La salinité des échantillons d'eau prélevés au niveau des trois points d'observation oscille généralement entre 0,3 et 3,4PUS (Figure V- 3). Ces valeurs sont inférieures à la salinité des eaux de la Méditerranée, qui avoisine 37‰.

Une salinité de 35,5 g/kg d'eau de mer peut s'écrire 35,5 ppm (partie par mille), 35,5‰, 35.5 PSU (Practical Salinity Unit) ou simplement 35,5PSU.

Les valeurs élevées de la salinité de lactosérum (P1) indiquent la présence des sels minéraux issus de la fabrication du camembert (varie de 2,5 à 3,2PSU).

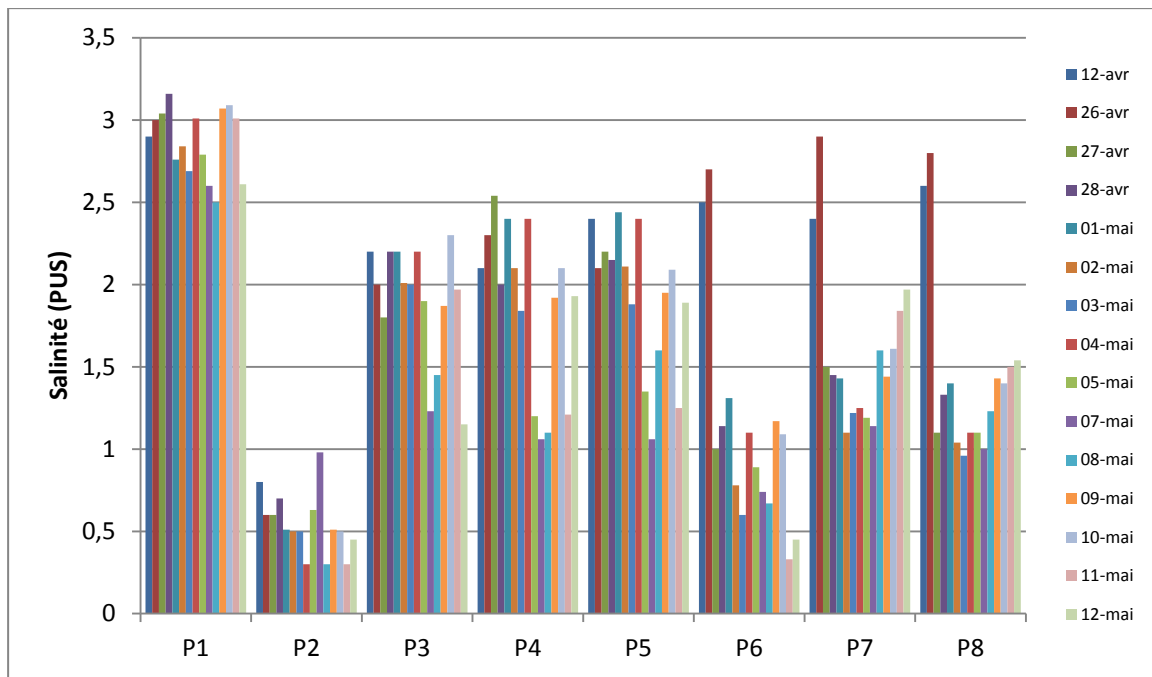


Figure V- 3: La variation spatiotemporelle de la salinité des échantillons.

V.B.2.4. La turbidité

La turbidité est inversement proportionnelle à la transparence de l'eau, elle est de loin le paramètre de pollution indiquant la présence de la matière organique ou minérale sous forme colloïdale en suspension dans les eaux usées. Elle varie suivant les matières en suspension (MES) présentes dans l'eau [20]. La turbidité se mesure sur le terrain à l'aide d'un turbidimètre. Le Tableau V- 3 présente les différentes classes de turbidité usuelles.

Tableau V- 3: Classes de turbidité usuelles (NTU, nephelometric turbidity unit)

Valeur NTU	Apparence des eaux
NTU < 5	Eau claire
5 < NTU < 30	Eau légèrement trouble
NTU > 50	Eau trouble

Les valeurs élevées de la turbidité de lactosérum (P1) indiquent la présence de la matière en suspension et des particules colloïdales dans les rejets de production de la laiterie (varie de 896,69 à 1100 NTU).

Tous les rejets de la laiterie sont très turbides comme illustré par la Figure V- 4. Cette forte turbidité est due à la concentration élevée en matières en suspension (MES) dont le

lactosérum présente une valeur plus élevée comparativement avec les autres car il contient des particules colloïdales.

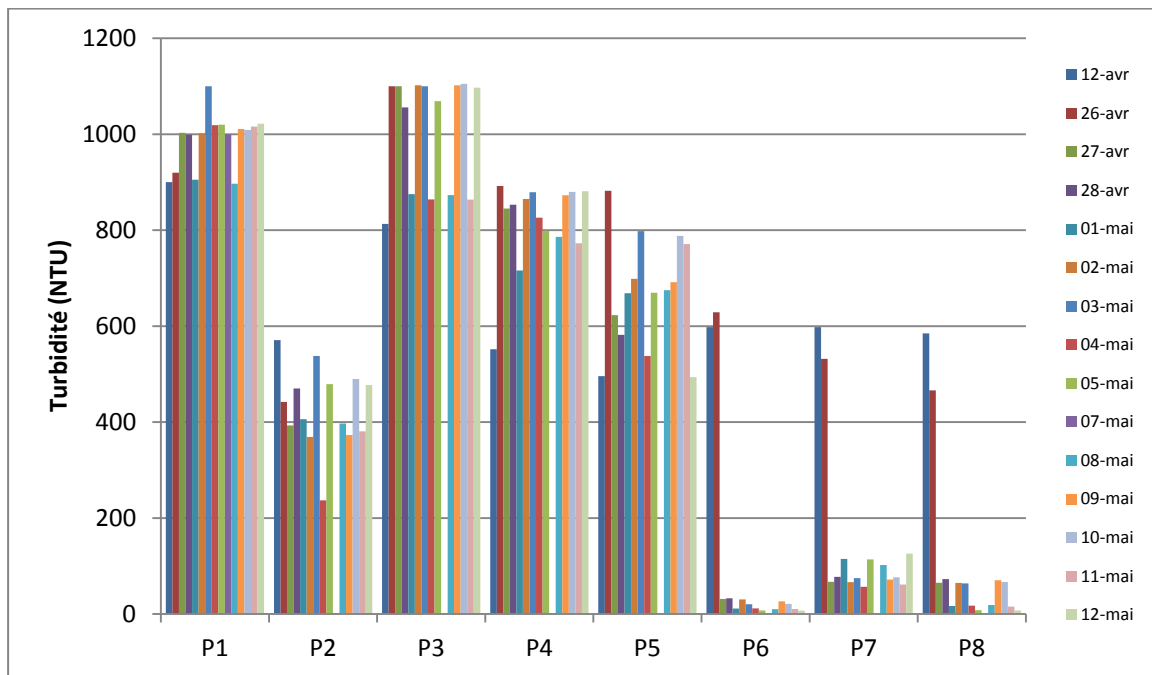


Figure V- 4: La variation spatiotemporelle de la turbidité des échantillons.

V. B.2.5. Oxygène dissous

C'est l'élément essentiel pour l'épuration biologique des eaux résiduaires puisqu'il représente une source importante pour la biodégradation de la pollution carbonée et azotée (nitrification, dénitrification).

Les concentrations de l'oxygène dissous varient de 0.14mg/l pour le rejet P3 à 3.70 mg/l pour le rejet P6. Les concentrations varient sensiblement d'un jour à un autre sur chaque point de prélèvement (Figure V- 5).

La diminution de la concentration en O₂ dissous au niveau du P1 est en relation avec le métabolisme bactérien, qui utilise cet élément pour dégrader la matière organique abondante au niveau de ce point. En revanche, l'accroissement du taux d'oxygène au point P6 est probablement dû aux apports d'eau suite aux fortes précipitations (printemps).

Les faibles teneurs en oxygène sont dues essentiellement à la consommation d'oxygène par les bactéries lors de la dégradation de la matière organique et dans les processus de minéralisation et d'oxydation. L'élévation de la température des eaux modifie le taux d'oxygène dissous. En effet, la solubilité des gaz dans l'eau diminue quand la température croît.

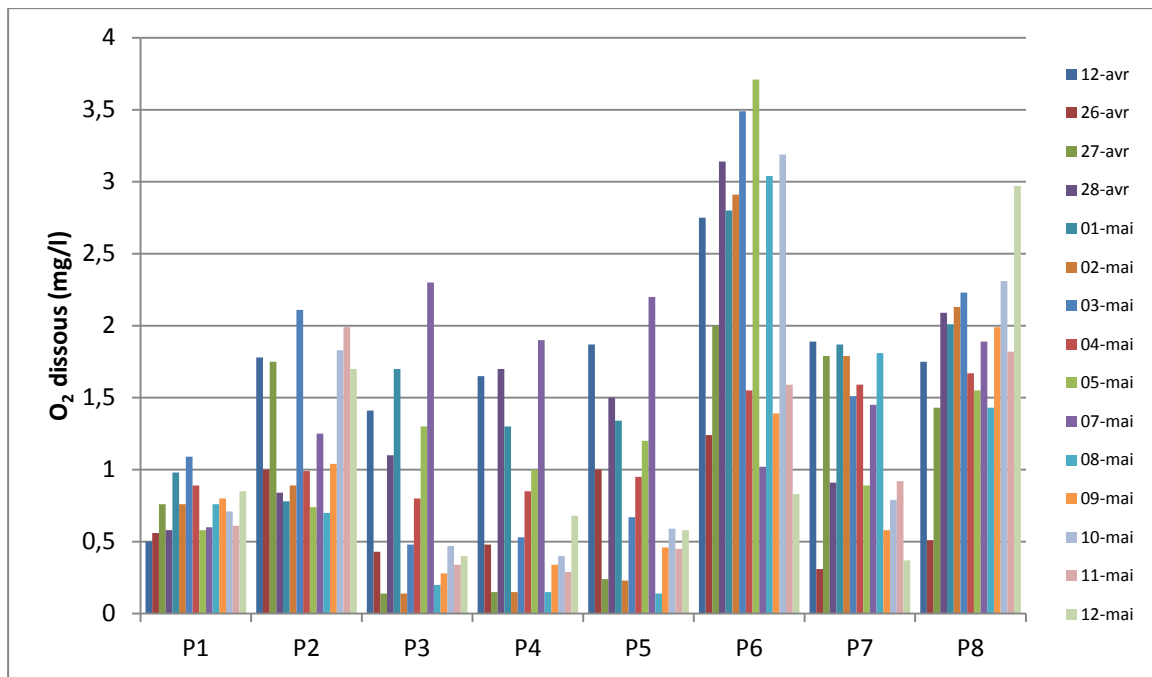


Figure V- 5: La variation spatiotemporelle de teneur en oxygène dissous dans les échantillons.

La biodégradation de cette importante charge en matières organiques s'accompagnant d'une consommation de l'oxygène dissous par les principaux agents dégradateurs que constituent les bactéries hétérotrophes [122] expliquerait les faibles teneurs en oxygène dissous observées.

V. B.2.6. Distribution de la matière organique

V. B.2.6.1. Demande biochimique en oxygène(DBO_5)

Selon les normes nationales, la DBO_5 [22] ne doit pas dépasser $35\text{mgO}_2/\text{l}$ dans les eaux de rejet. L'OMS préconise même, comme limite, $25\text{mgO}_2/\text{l}$ dans les zones littorales dites normales et $15\text{mgO}_2/\text{l}$ dans les zones littorales dites sensibles et les zones urbaines (OMS, 2004). Aux points échantillonnés, qui appartiennent toutes à la troisième catégorie, les DBO_5 mesurées dépassent la limite normative, en particulier dans le cas du lactosérum (Figure V-6).

La demande biochimique d'oxygène oscille, selon l'importance des pertes de lait et la qualité de petit-lait contenue dans l'effluent, entre 200 et 6000 mg/l DBO_5 . Les pertes de lait représentent de 0,2 à 2% environ de quantité de lait traitée. La demande biochimique d'oxygène du lait est d'environ de 110 000 à 115 000 mg/l DBO_5 [23].

Elle exprime la quantité de matières organiques biodégradables présente dans l'eau. Plus précisément, ce paramètre exprimé en $\text{mg O}_2/\text{l}$, mesure la quantité d'oxygène nécessaire à la dégradation des matières organiques grâce aux

phénomènes d'oxydation par voie aérobie. Pour mesurer la DBO₅, on prend comme référence la quantité d'oxygène consommée au bout de 5 jours.

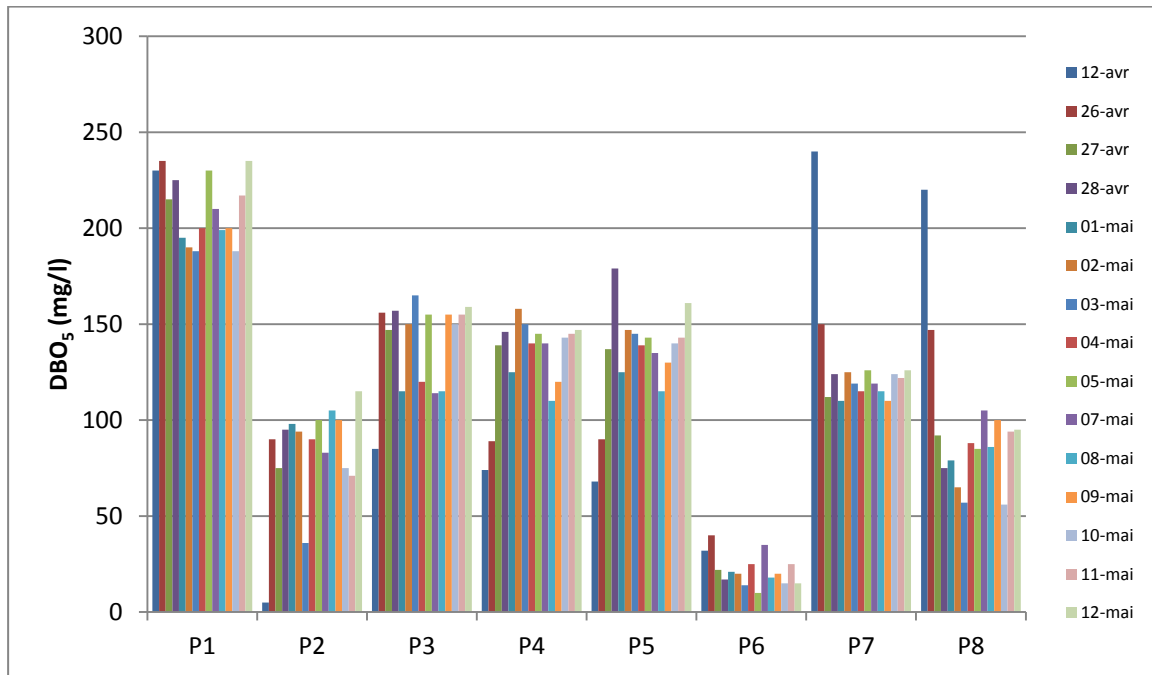


Figure V- 6: La variation spatiotemporelle de DBO₅ des échantillons.

V. B.2.6.2. Demande chimique en oxygène(DCO)

La DCO [24], exprimée en mg d'oxygène par litre représente la teneur totale de l'eau en matières oxydables. Ce paramètre correspond à la quantité d'oxygène qu'il faut fournir pour oxyder par voie chimique ces matières [123]. Ainsi, par la mesure de la DCO on peut évaluer la charge polluante d'une eau usée en matières organiques avant et après un traitement physique, chimique ou biologique afin de contrôler l'efficacité du traitement épuratoire [124]. De plus, une forte teneur en DCO et MES provoque une diminution de la disponibilité en oxygène du milieu et donc une asphyxie du système. La moyenne trouvée pour la DCO des eaux usées dans diverses villes du monde s'élève environ à 30 g/l [123].

D'après la Figure V- 7 le profil de la DCO à la même allure que celui de la DBO₅ à l'exception où sa valeur atteindrait 2139 mg d'O₂/l en P1 est d'au moins quatre fois supérieure à celle mesurée de P8.

D'une manière globale, les valeurs de la DCO pour les trois points (P3, P4, P5) sont presque similaires, ou note les intervalles de (1070-1500); (1180-1500) et (1100-1500), respectivement.

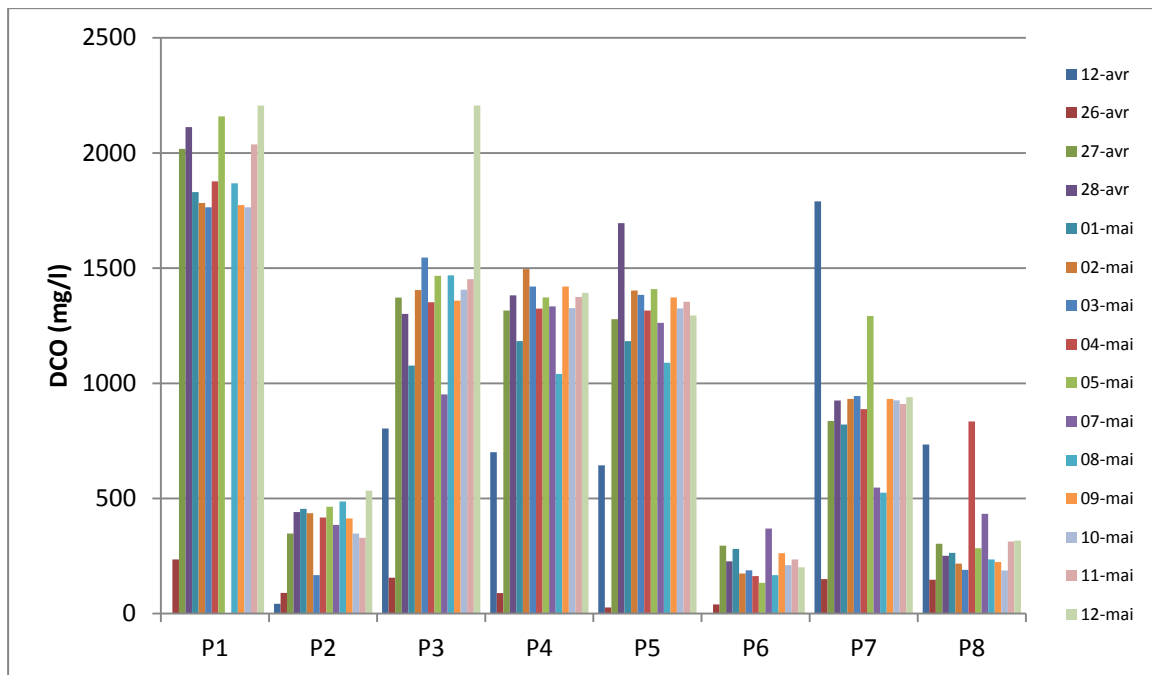


Figure V- 7: La variation spatiotemporelle de DCO des échantillons.

V.B.2.6.3. Rapport DCO/DBO5

Le rapport entre la DCO et la DBO5 (Figure V- 8) constitue une mesure indicative de la «dégradable» biochimique des composés présents dans l'eau [22, 24, 68]. D'après les résultats d'analyses, on constate que :

Les effluents rejetés vers le milieu récepteur ont une DBO5 très importante durant toute la période de notre prélèvement, ce qui correspond à la forte présence des matières organiques, cette matière organique est fermentescible par voie biologique en présence d'oxygène dissous, ceci est expliqué par la mesure de rapport DCO/DBO5.

Le rapport (DCO/DBO5) donne une première estimation de la biodégradabilité de la matière organique d'un effluent donné ; on convient généralement des limites suivantes :

- (DCO/DBO5) <2 l'effluent est facilement biodégradable;
- $2 < (DCO/DBO5) < 3$ l'effluent est biodégradable avec des souches sélectionnées ;
- (DCO/DBO5) >3 l'effluent n'est pas biodégradable

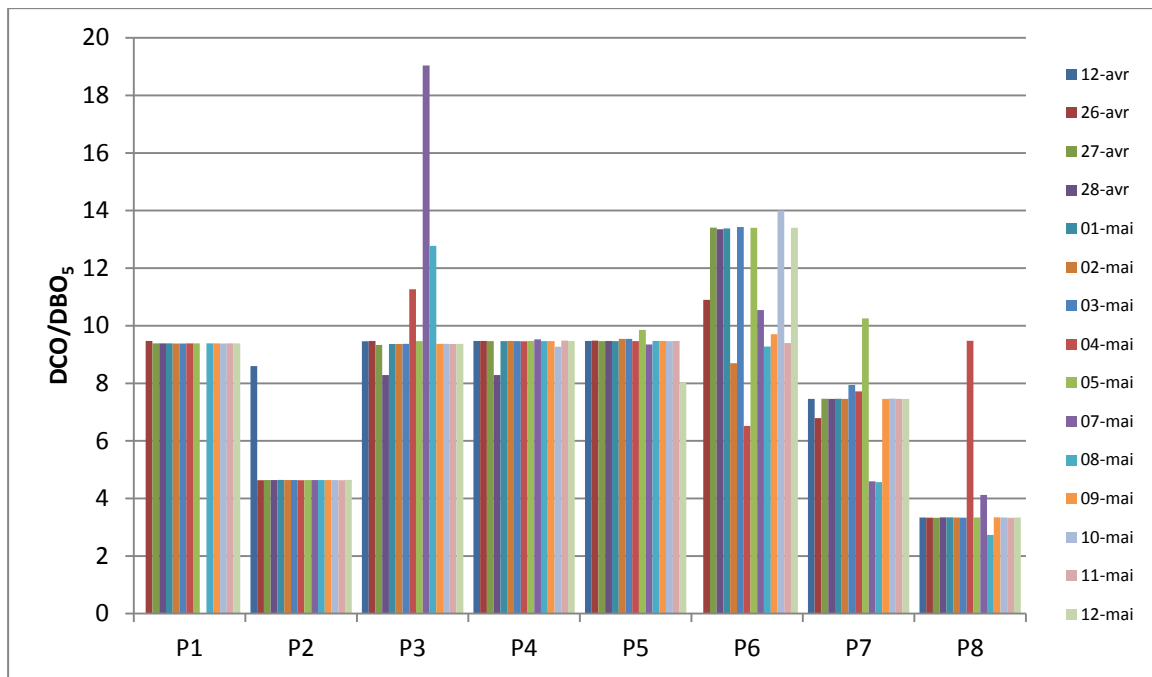


Figure V- 8: La variation spatiotemporelle de DCO/DBO₅ des échantillons.

V. B.2.6.4. Matière organique (MO)

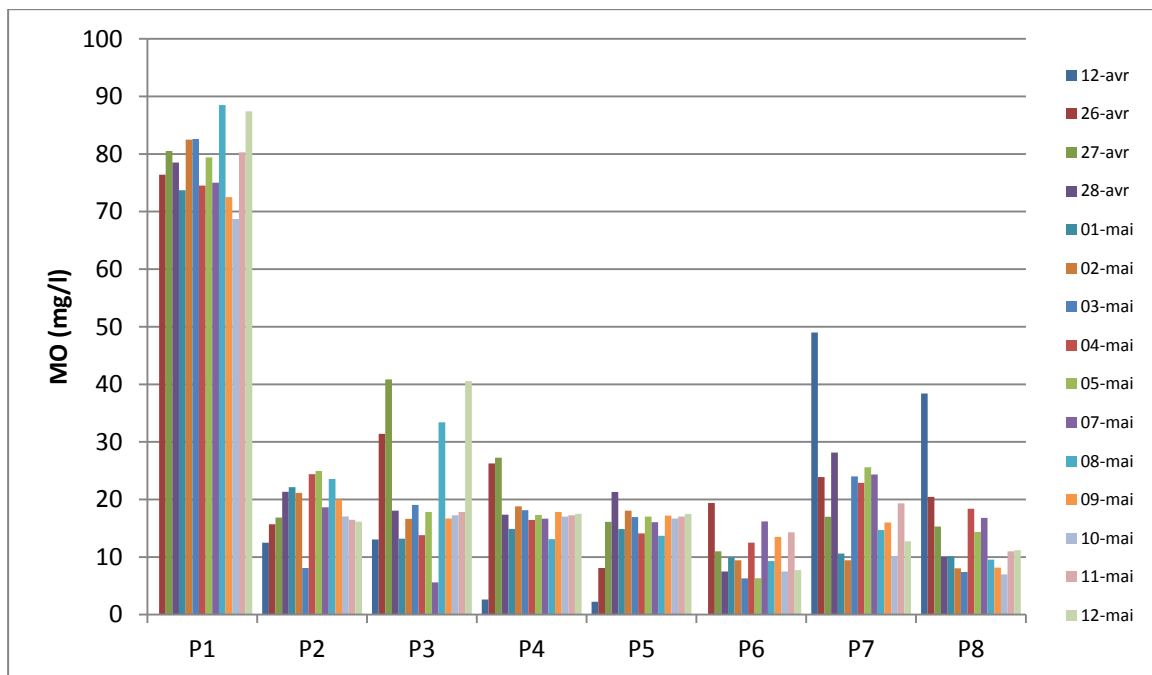


Figure V- 9: La variation spatiotemporelle de Matière Organique (MO) des échantillons.

La matière organique provient des résultats du métabolisme des organismes vivants. Une eau chargée en matière organique dégradable par des micro-organismes est sous saturée en oxygène. En effet, la forte présence de matière organique, permet aux micro-organismes de se développer tout en consommant de l’oxygène [30].

Selon l'histogramme de la Figure V- 9, la quantité de la matière organique dans le lactosérum est quatre fois supérieure de celles des autres rejets.

La matière organique réduit la quantité d'oxygène dissous dans le milieu aquatique, ceci peut conduire à l'asphyxie des organismes qui y vivent.

V. B.2.6.5. Matière en suspension(MES)

Les normes nationales (Décret exécutif 06-141 du 19 avril 2006 / JORADP / 23-04-2006) et internationales (OMS/PNUE, 1995) fixent comme valeur limite pour les MES, dans les effluents liquides (ménagers, industriels et agricoles), une concentration de 35mg/l. Les concentrations mesurées dans les points de prélèvement dépassent souvent la norme (moyenne de 1025mg/l, avec des valeurs comprises entre 1167mg/l et 1593mg/l, en P1 et entre 960mg/l et 374mg/l en P2 et pour atteindre 2000mg/l au niveau de la STEP et au rejet final et enfin au niveau de l'oued varie entre 21mg/l et 1234mg/l) (Figure V- 10). La concentration moyenne trouvée pour l'effluent est inférieure à la norme.

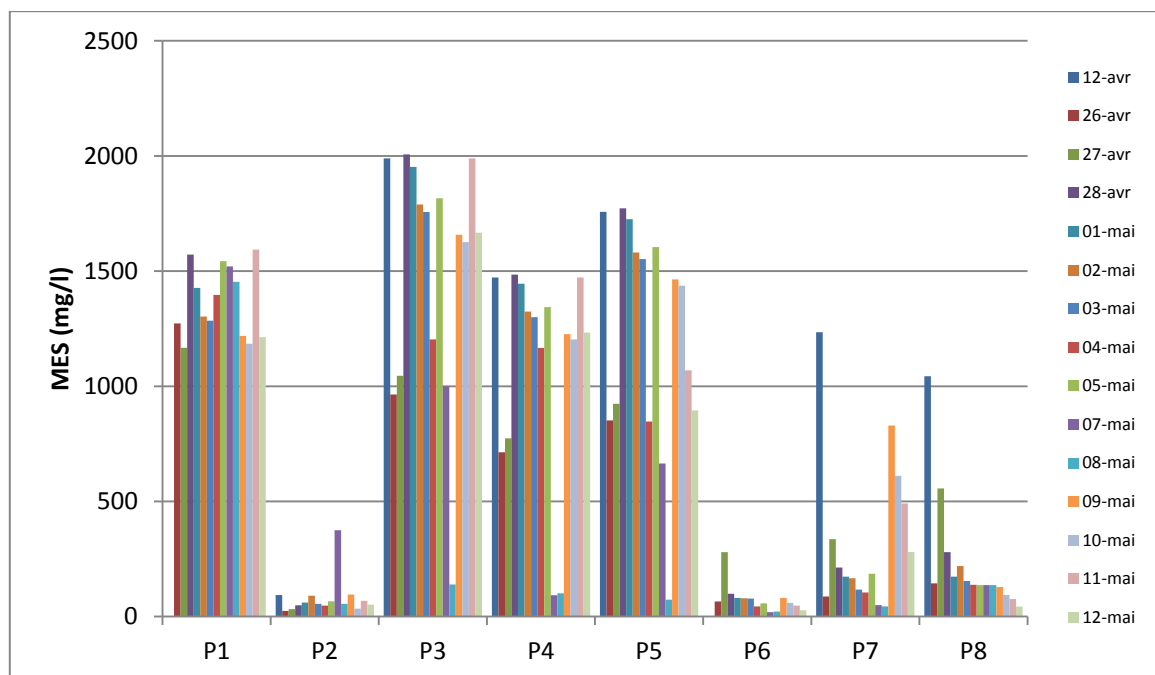


Figure V- 10: La variation spatiotemporelle de matière en suspension(MES) des échantillons.

La comparaison de nos résultats avec ceux d'autres travaux menés antérieurement [12] met en évidence une diminution considérable des concentrations des MES. L'évolution observée est la conséquence des efforts effectués récemment par les industries agroalimentaires en matière d'épuration des eaux de rejet.

Ce sont des matières insolubles, fines, minérales ou organiques, biodégradables ou non. Leur présence en excès peut provoquer une augmentation de la turbidité du milieu et donc une réduction de la production de la photosynthétique.

Les MES représentent l'ensemble des matières solides, organiques ou minérales contenues dans une eau usée et pouvant être retenues par filtration ou centrifugation. Elles permettent une bonne évaluation du degré de pollution d'une eau. Elles donnent également à l'eau une apparence trouble et, souvent un mauvais goût et une mauvaise odeur [12, 21]. Les MES empêchent la pénétration de la lumière, diminuent l'oxygène dissous et représentent une surface d'attache pour les bactéries. On les subdivise en deux catégories:

Les matières décantables qui sont les MVS (matières volatiles sèches) représentant la partie organique des MES. Elles comprennent les particules de biomasse vivante ou morte, qui se déposent pendant un temps fixé conventionnellement à 2h. Les matières colloïdales qui représentent la différence entre MES et matières décantables [12].

V. B.2.6.6. Résidus sec

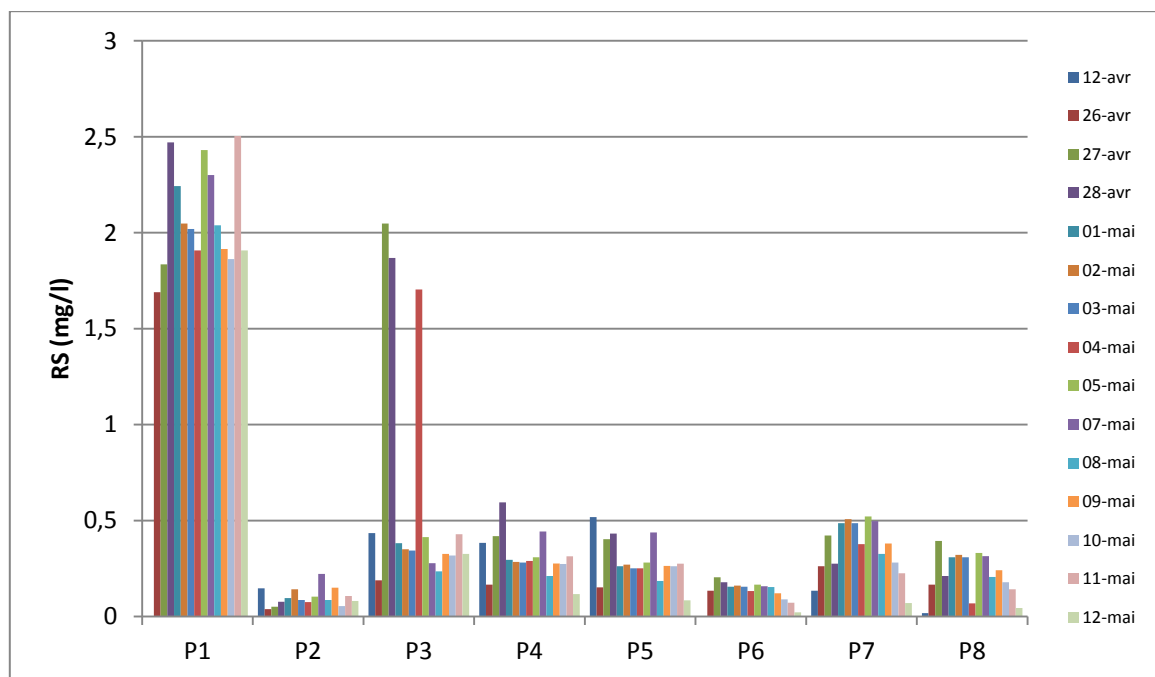


Figure V- 11: La variation spatiotemporelle des résidus secs (RS) des échantillons.

La variation spatiotemporelle des résidus secs des échantillons est montrée sur la Figure V-11.

La détermination du résidu sec sur l'eau non filtrée permet d'évaluer la teneur en matières dissoutes et en suspension [12].

Leur quantité est plus importante en P1 comparativement aux autres échantillons qui est principalement due à la composition du lactosérum.

V. B.2.7. Distribution des sels nutritifs

V. B.2.7.1. Azote

Ammonium (NH_4^+)

Les résultats obtenus affichent une valeur d'ammonium entre 2,31 et 3,24 mg/l pour le lactosérum. Par ailleurs, des valeurs élevées ($\approx 5,52$ mg/l) sont enregistrées dans les eaux de lavage de nettoyage et de rinçage. Par contre une valeur très basse a été notée dans les eaux de l'oued en amont et qui varient entre 0,01 et 0,08 mg/l. Cette teneur augmente en aval de l'oued selon la Figure V- 12.

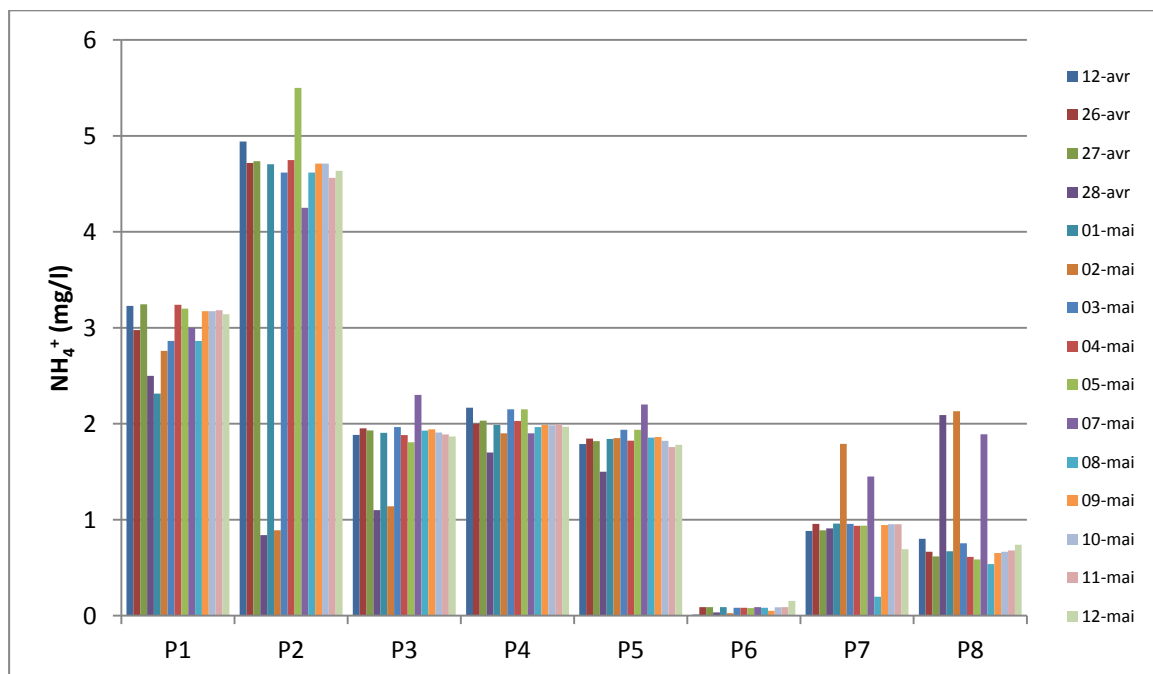


Figure V- 12: La variation spatiotemporelle de l'ammonium (NH_4^+) des échantillons.

Ces observations laissent conclure que la teneur élevée d'ammonium dans le rejet final à l'extérieur de l'usine est due à la présence des bactéries anaérobique qui détruisent la matière et transforment l'azote organique en azote ammoniacal. L'ammoniac est une forme légèrement transformée de l'ammonium [125]. Ainsi que les rejets des eaux de lavage du beurre caractériser leur teneur en sels nutritifs. La forte teneur en ammonium dues aussi à la faible oxydation des NH_4^+ par nitrification et la nature des eaux résiduaires industrielles.

L'ammoniaque est toxique à la vie aquatique (particulièrement les poissons) même à la concentration très basse [126].

Nitrites (NO_2^-)

Les résultats obtenus illustrés par la Figure V- 13 indiquent que la faible valeur des nitrites est obtenue en amont de l'oued (0,006 - 0,04mg/l). Pour le lactosérum, les nitrites varient entre 0,18 et 0,70mg/l. En aval de l'oued, la teneur est estimée entre 0,1 et 0,27 mg/l. Ceci montre que cet intervalle de valeur reste étroitement dépendant de la teneur du lactosérum.

Ces concentrations sont dues à l'oxydation incomplète de l'ammoniaque, à cause du manque d'oxygène dans le milieu (milieu anaérobie).

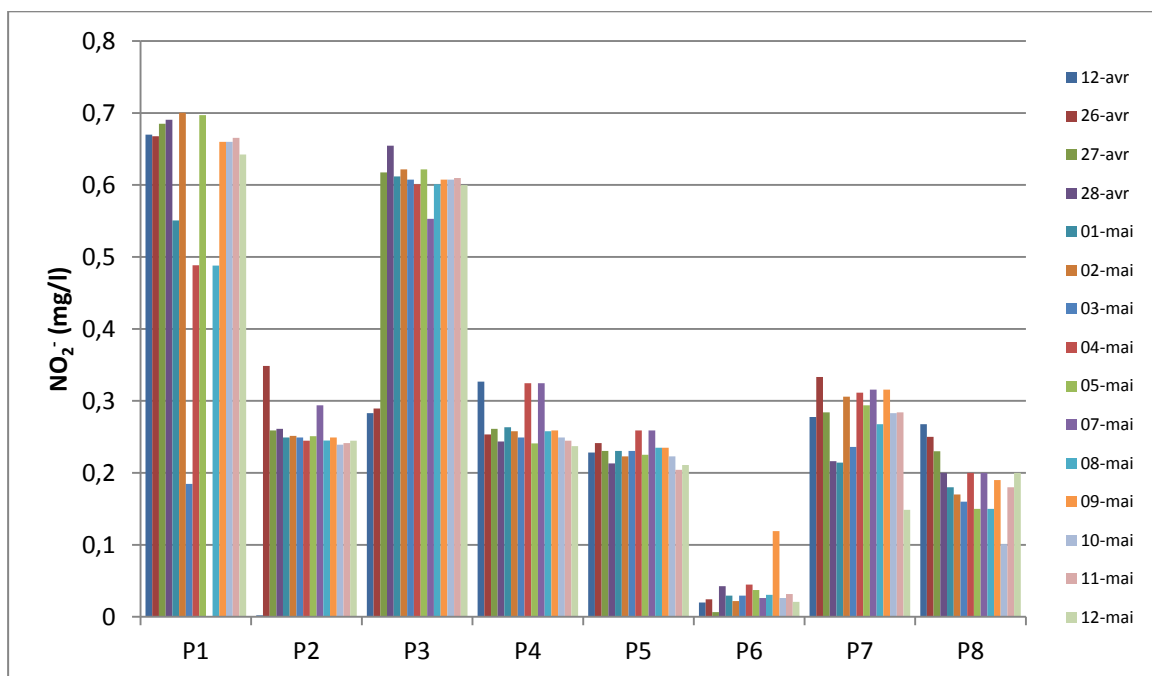


Figure V- 13: La variation spatiotemporelle de Nitrite (NO_2^-) des échantillons.

Nitrates (NO_3^-)

La Figure V- 14 ci-dessous représente évolution des nitrates dans les différents points de prélèvements des rejets en fonction du temps. Selon les résultats enregistrés, on constate qu'à la sortie de la STEP, la concentration en nitrates varie entre 8,73 et 19,78mg/l. Leur concentration dans le lactosérum varie entre 5,86 et 8,22 mg/l.

La comparaison des concentrations enregistrées au niveau de la STEP avec la norme de qualité des eaux destinées à l'irrigation montre que, ces concentrations sont très inférieures à 50mg/l, ce qui permet de déduire que ces effluents sont acceptables pour l'irrigation des cultures. Les nitrates ont la forme la plus oxygénée de l'azote, c'est une forme très soluble [125].

Les nitrates ont des origines agricoles (épandage d'engrais ou élevage du bétail) après lessivage des terres agricoles. Ils proviennent aussi de la minéralisation de l'azote organique et l'oxydation de l'ammonium. Les concentrations enregistrées sont inférieures à 25 mg/l permettant de classer ces eaux dans la classe bonne.

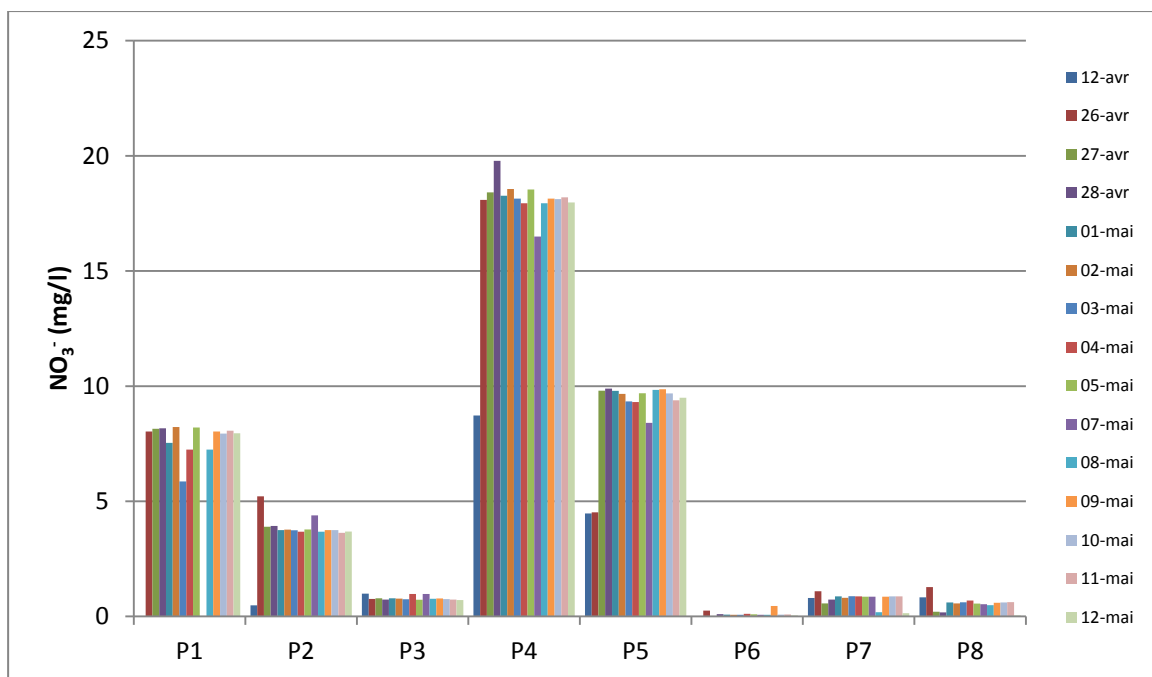


Figure V- 14: La variation spatiotemporelle de Nitrate (NO₃⁻) des échantillons

V. B.2.7.2. Phosphates

Phosphore total (PT)

D'après la Figure V- 15, les valeurs de phosphore total de lactosérum varient entre 10,23 et 11,75mg/l. Le rejet de lavage est caractérisé par une teneur moyenne en phosphore total avec une valeur minimale 4,97mg/l, et une valeur maximale 6,86mg/l. Aux points P3, P4 et P5, la teneur en PT varie entre 10,44 et 11,26 mg/l.

Le phosphore est transformé en phosphore organique par les organismes vivants, il est faiblement soluble et peu volatil.

La teneur élevée de PT dans le rejet final à l'extérieur de l'usine est due principalement à la composition du lait, à l'utilisation des détergents dans différentes

opérations de nettoyages et aussi au traitement des eaux des forages, pour les rendre conforme à la norme (PT en ‰=0).

La concentration du PT des eaux de l'oued en aval diminue du fait de leur dilution.

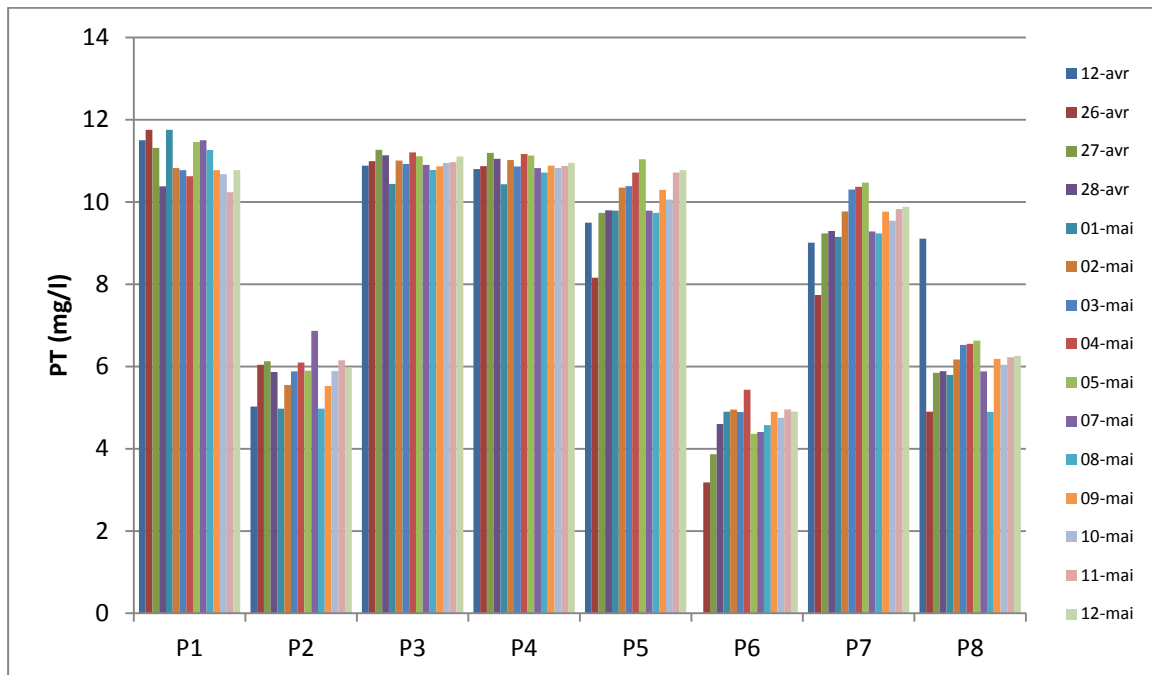


Figure V- 15: La variation spatiotemporelle de Phosphore total (PT) des échantillons.

Ortho phosphate (PO_4^{3-})

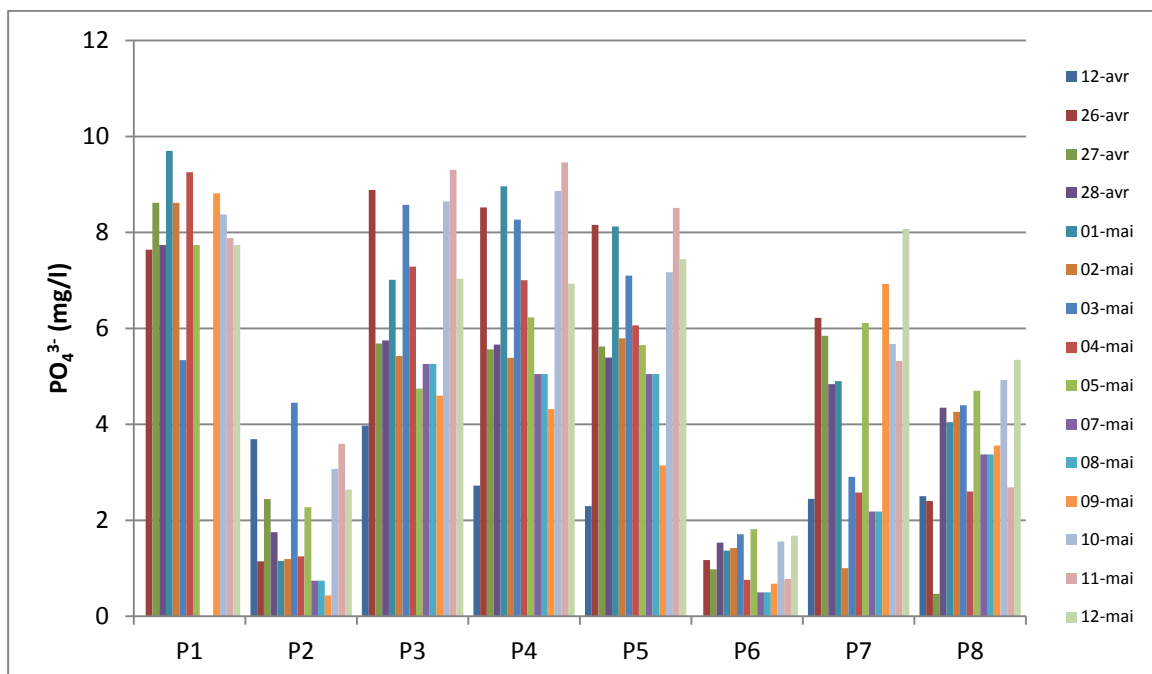


Figure V- 16: La variation spatiotemporelle d'Ortho-phosphates (PO_4^{3-}) des échantillons.

Les concentrations des ortho-phosphates dans les différents points des prélèvements, sont représentées dans la Figure V- 16

La forte concentration des rejets en orthophosphates observés a été notée pour P3, P4 et P5. Ceci s'expliquerait par l'apport de PO_4^{3-} par le lactosérum (P1). Les ions orthophosphates ont la forme minérale du phosphore qui est un élément nutritif biogène favorable à la croissance des algues et macrophytes [127]. Sa faible concentration au point de prélèvement P6 serait la conséquence de l'autoépuration de l'oued.

Les orthophosphates contenant au niveau des eaux résiduaires de la laiterie sont des orthophosphates assimilés par les microorganismes durant leur phase de croissance.

V. B.2.8. Eléments majeurs

Calcium (Ca^{2+})

La teneur de rejet de l'usine en élément de Calcium est due principalement à la composition du lait (Calcium : 1,2g/l), à la quantité des pertes de lait et due aussi à la dureté d'eau des forages de la région (caractéristique de la région en bibliographie), utiliser par l'usine pour la fabrication (TH =53,0). Cette eau est traitée par osmose inverse pour rendre conforme à la norme de fabrication (dureté totale comprise entre 0 et 15), l'eau après traitement contient une quantité considérable de Calcium.

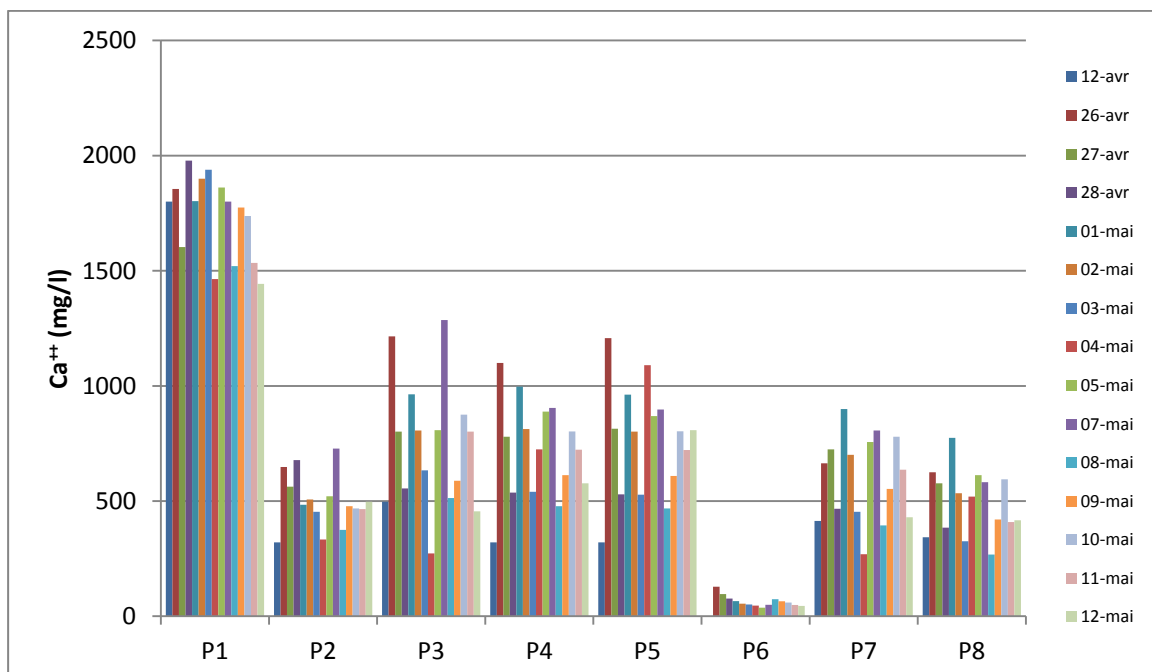


Figure V- 17: La variation spatiotemporelle du Calcium (Ca^{2+}) des échantillons.

D'après la Figure V- 17 la concentration de Ca^{2+} au niveau de lactosérum varie entre 1442,88mg/l et 1978,35mg/l, qui sont quatre fois plus concentré.

Magnésium (Mg^{2+})

La Figure V- 18 montre la variation spatiotemporelle en Magnésium (Mg^{2+}) des échantillons

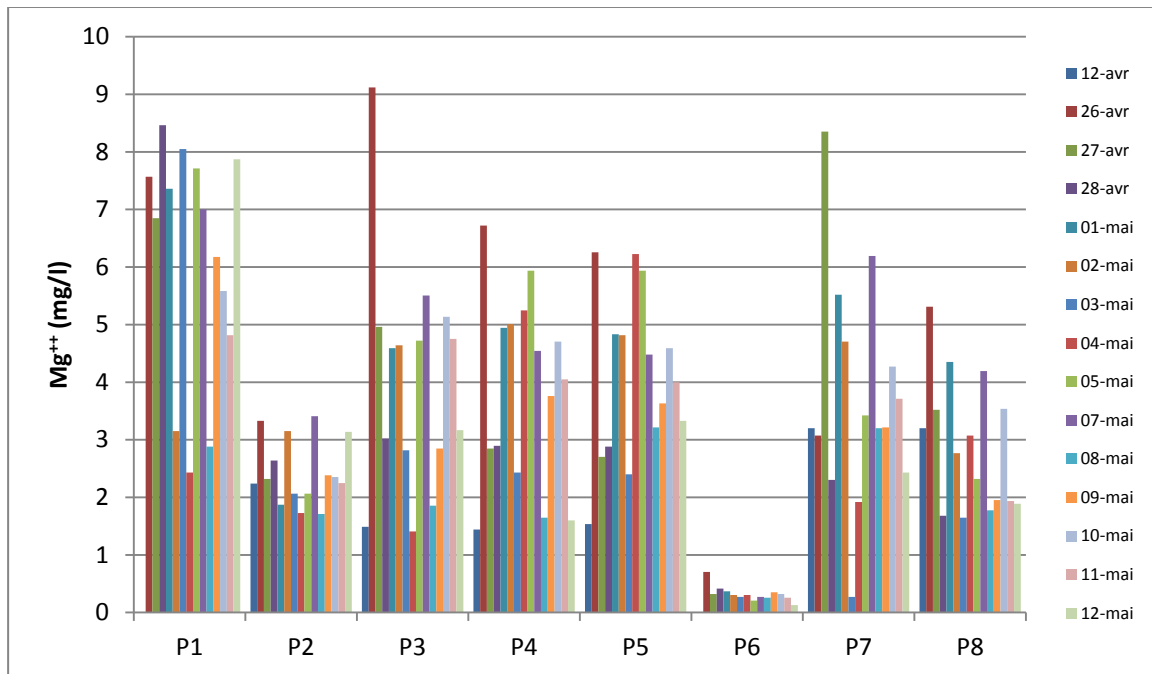


Figure V- 18: La variation spatiotemporelle du Magnésium (Mg^{++}) des échantillons

La concentration en Mg^{2+} au niveau de lactosérum varie entre 2,43mg/l et 8,46mg/l.

Aux points P3, P4 et P5, la concentration en Mg^{2+} varie entre 1,41mg/l, et 9,12mg/l.

La teneur de rejet de l'usine en élément magnésium est due à la même raisons de la teneur de Calcium dans ces rejets. (Traitement des eaux de production)

La concentration en magnésium des eaux de l'oued en amont varie entre 0,128mg/l et 0,704mg/l (les eaux de surfaces).

Leur teneur est élevée au P7, après le point de rejet de la laiterie et augmente à des valeurs variant entre 1,92mg/l et 8,352mg/l.

Cette concentration diminue à l'aval de l'oued de fait de la dilution des eaux de l'oued.

Chlorures (Cl^-)

La teneur des Chlorures au point P1, due à la composition du lait, à la perte de lait, et due aussi à l'utilisation de chlorure de sodium pour le nettoyage, qui influe sur la qualité des eaux résiduelles.

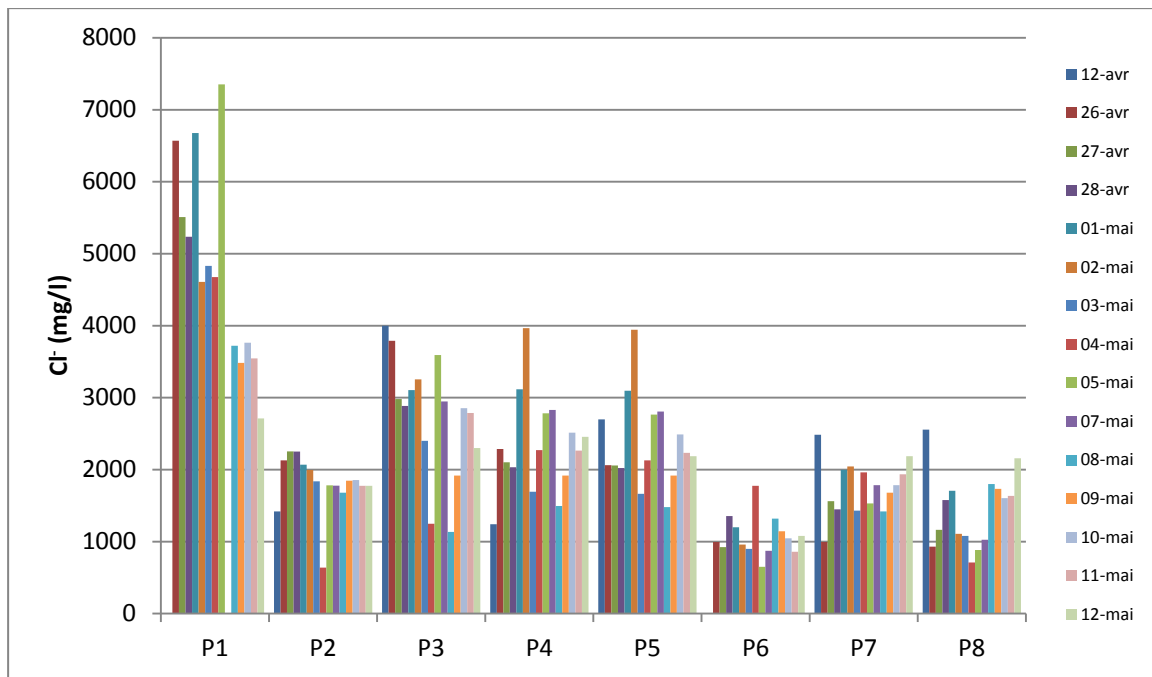


Figure V- 19: La variation spatiotemporelle des Chlorures (Cl⁻) des échantillons.

D'après la Figure V- 19, la teneur des chlorures en P1 varie entre 2712,20 mg/l et 7352,05 mg/l. 639mg/l et 2250,7 mg/l.

Aux points P3, P4 et P5 leur concentration varie entre 1136mg/l et 4000mg/l.

En plus de l'utilisation des produits des opérations de nettoyages, la teneur de rejet de l'usine en élément de chlorure est due à la teneur des eaux de forage en cet élément (Cl⁻=504,10), aussi à leur traitement pour leur rendre conforme à la norme de fabrication (Chlorures en‰ moins de 155 mg), l'eau restée après le traitement contient une quantité considérable des Chlorures.

Leur teneur est élevée en point P7, après le point de rejet de la laiterie et augmente à des valeurs variant entre 994mg/l et 2556mg/l.

Cette concentration diminue en point P8 de fait de la dilution des eaux de l'oued.

Sodium (Na⁺)

D'après la Figure V- 20, la teneur des Sodium en point P1 varie entre 92,7mg/l et 125,2mg/l.

Leur quantité au niveau de point P2 est due à la composition du lait, à la perte de lait et due aussi à l'utilisation de chlorure de sodium pour le nettoyage, qui influe sur la qualité des eaux résiduelles. Leur quantité au niveau de point P2 varie entre 20,3mg/l et 39,2mg/l.

La teneur de rejet de l'usine en élément de sodium est due à la même raisons de la teneur de chlorure dans ces rejets.

Leur teneur est élevée en point P7, après le point de rejet de la laiterie et augmente à des valeurs variant entre 40,01mg/l et 72mg/l.

Cette concentration diminue au point P8 de fait de la dilution des eaux de l'oued.

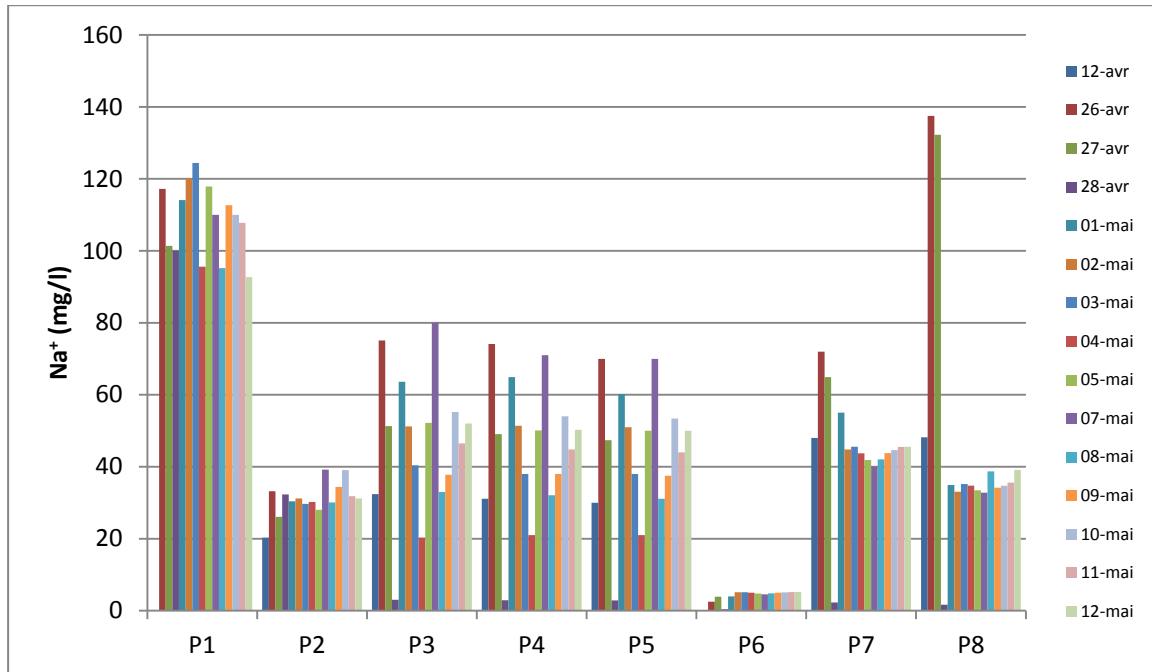


Figure V- 20: La variation spatiotemporelle du Sodium (Na^+) des échantillons Potassium (K^+)

D'après la Figure V- 21, la concentration de potassium dans le point P1 varie entre 50,1 mg/l et 64mg/l.

Au niveau du point P2, la concentration de K^+ varie entre 3,6mg/l et 18,3mg/l. Cela est dû à la composition de lait, à la perte de lait et due aussi à l'utilisation des produits stérilisants et de nettoyage.

Aux points P3, P4 et P5 ; la concentration de K^+ varie entre 14,2mg/l, et 50,1mg/l.

La teneur de rejet de l'usine en élément potassium est due aux mêmes raisons que la teneur de chlorure et de sodium dans ces rejets.

Leur teneur est élevée en point P7, après le point de rejet de la laiterie et augmente à des valeurs varie entre 6,86mg/l et 30mg/l.

Cette concentration de potassium diminue en point P8 de fait de la dilution des eaux de l'oued.

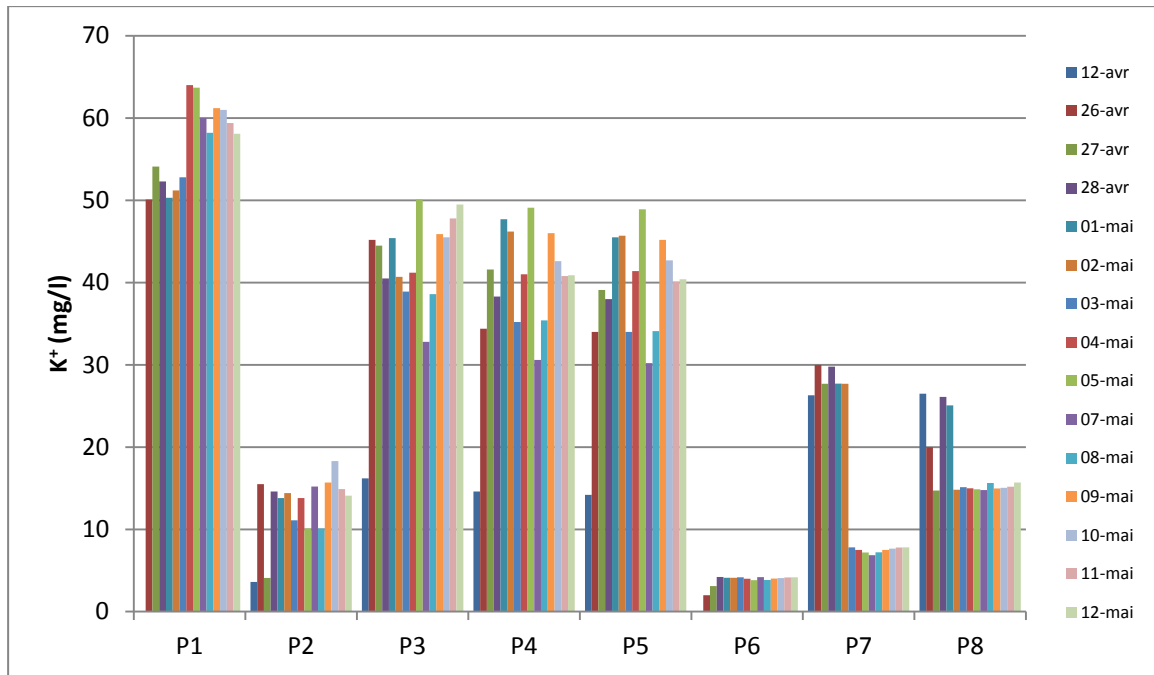


Figure V- 21: La variation spatiotemporelle de Potassium (K^+) des échantillons.

Sulfates

La Figure V- 22 montre la variation spatiotemporelle en Sulfates (SO_4^{2-}) des échantillons ;

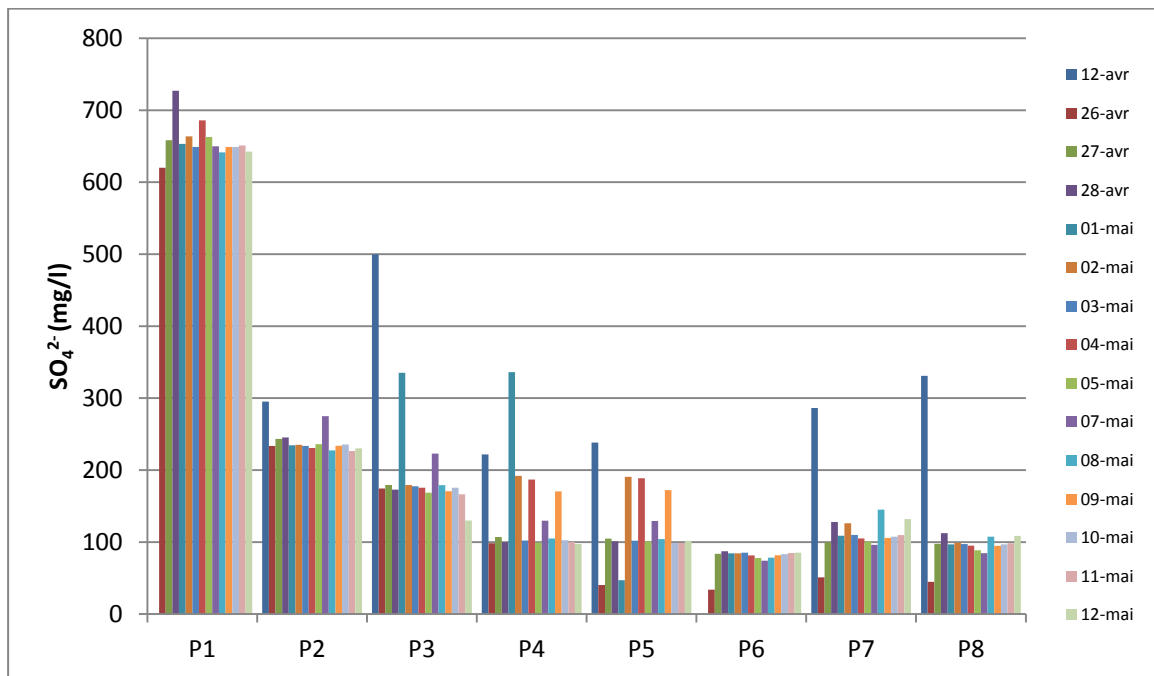


Figure V- 22: La variation spatiotemporelle de Sulfates (SO_4^{2-}) des échantillons

Les sulfates dans le lactosérum varient entre 620,03mg/l et 727,17mg/l.

La teneur en sulfates des rejets de l'usine est due à la teneur des eaux de forage en cet élément ($\text{SO}_4^{2-}=260\text{mg/l}$) et le traitement pour les rendre conforme à la norme de production ($\text{SO}_4^{2-}=250\text{mg/l}$).

V. B.2.9. Les graisses et les huiles

La Figure V- 23 montre la variation spatiotemporelle des graisses et des huiles des échantillons ;

La teneur des graisses et des huiles en point P1, due à la composition de lait, à la perte de lait, ainsi que les rejets des eaux de lavage du beurre caractérisée par leur teneur en graisses et huiles, leur teneur en point P1 varie entre 3.67 et 4.2 mg/l.

Au point P4, la quantité des graisses et des huiles a diminué à cause de l'activité de la STEP et leur rôle dans l'élimination d'une grande quantité des huiles et graisses contenant dans les rejets de la laiterie. Donc leur quantité dans le point P4 de l'usine et dans P5 varie entre 1,67mg/l et 2,89mg/l.

Leur teneur est élevée au point P7, après le point de rejet de la laiterie et augmente à des valeurs variant entre 1,15mg/l et 2,09 mg/l.

Cette concentration diminue en point P8 de fait de la dilution des eaux de l'oued.

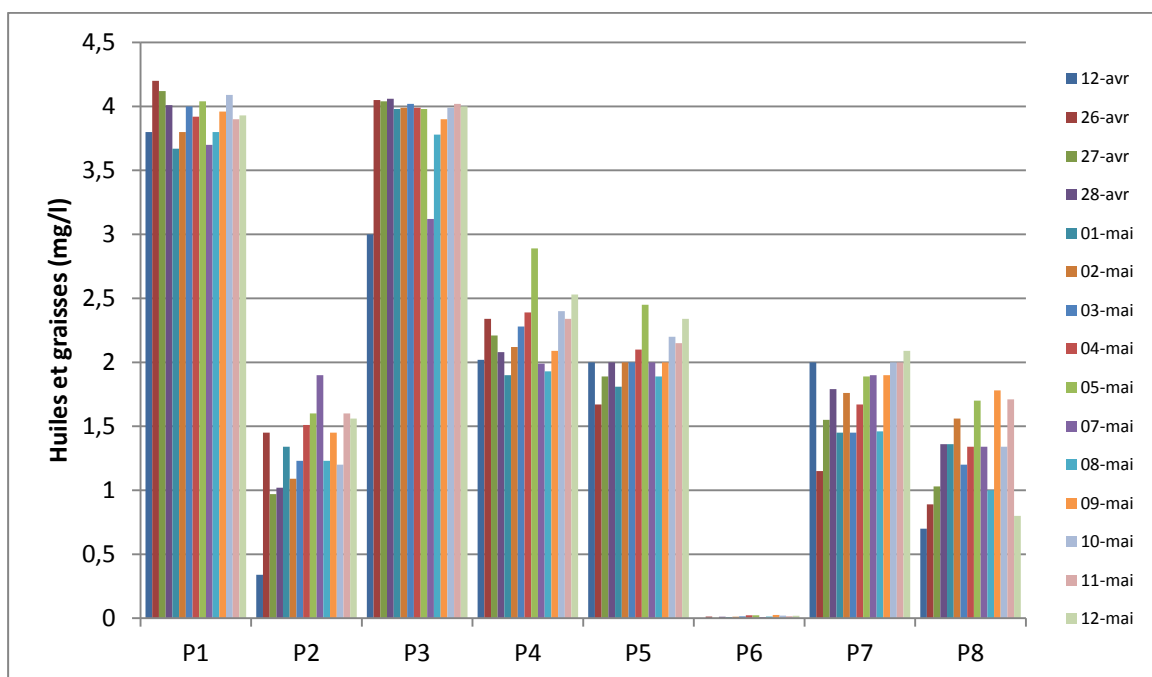


Figure V- 23: La variation spatiotemporelle des graisses et huiles des échantillons

V. B.3. Paramètres microbiologiques

Pour déterminer la présence des germes dans les eaux résiduaires de l'usine, nous avons utilisé la méthode de dénombrement en milieu liquide en utilisant la table de Mac Gradie [12, 21]. Les résultats obtenus par cette méthode montrent que :

- Les rejets de la laiterie contiennent dans tous les points de prélèvement de grandes quantités de germes pathogènes (Coliformes Totaux, fécaux, Streptocoques fécaux) indiquant ainsi une pollution bactériologique dans les rejets liquides de la laiterie et les eaux de l'oued, sauf le point P6, qui contient une petite quantité de ces germes et parfois même une absence.
- Une présence totale des coliformes totaux (plus de 240 UFC/100ml) et des coliformes fécaux avec des valeurs variables d'un point à l'autre.
- Une présence des streptocoques fécaux au niveau de ces points de prélèvement.

La Figure V- 24 montre la variation spatio-temporelle des coliformes totaux dans les échantillons :

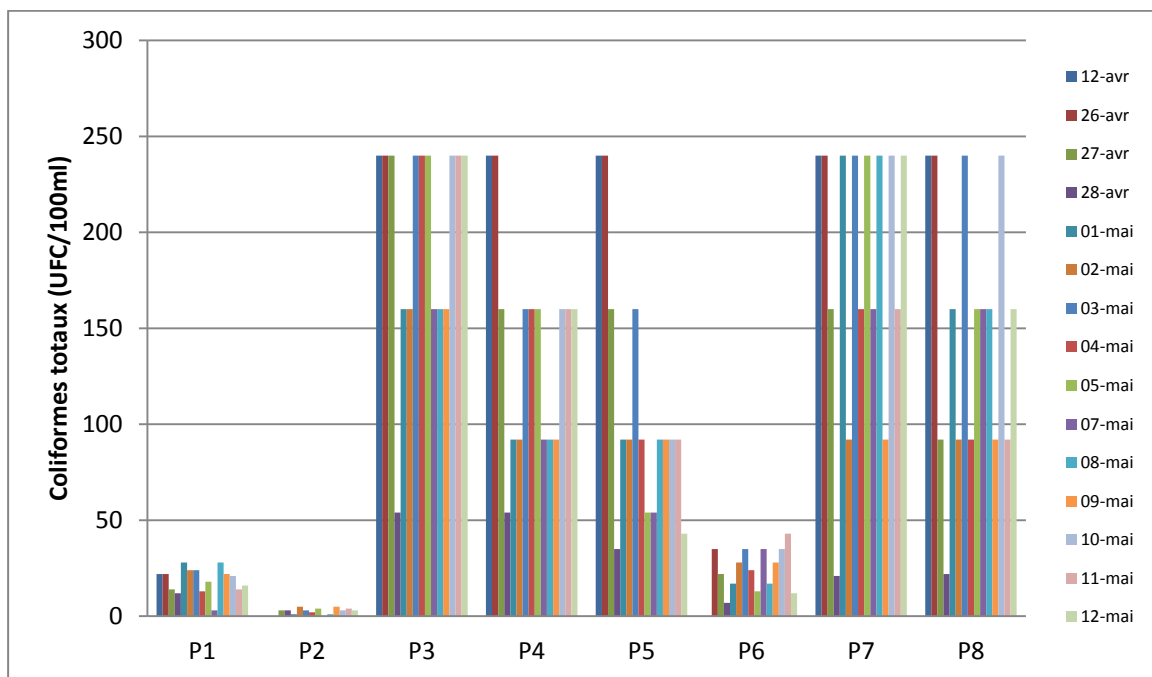


Figure V- 24: variation spatio-temporelle des coliformes totaux

La Figure V- 25 montre la variation spatio-temporelle des coliformes fécaux dans les échantillons ;

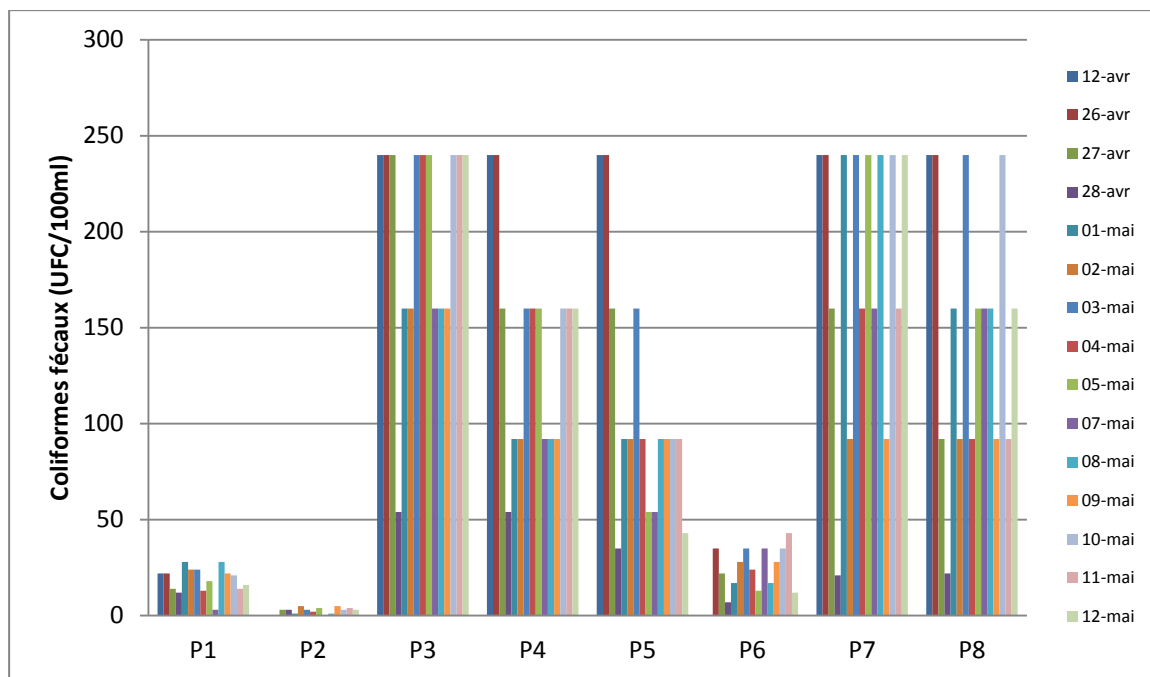


Figure V- 25: variation spatio-temporelle des coliformes fécaux

Et la Figure V- 26 montre la variation spatio-temporelle des streptocoques fécaux dans les échantillons ;

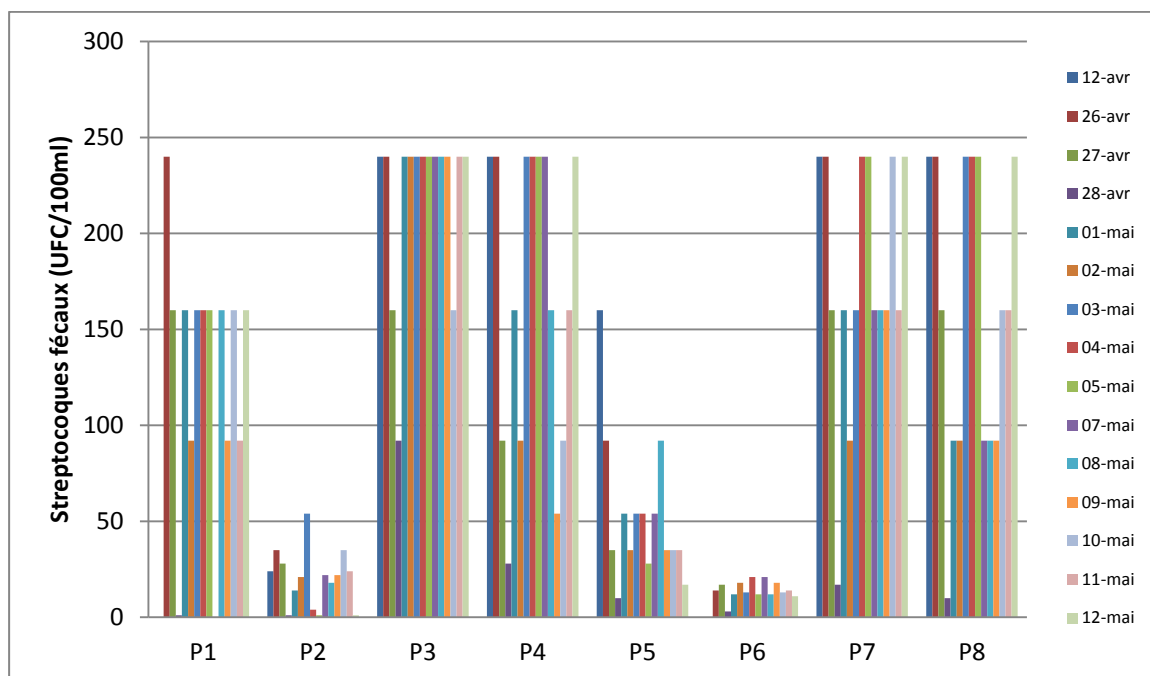


Figure V- 26: variation spatio-temporelle des streptocoques fécaux

V. B.4. Discussion générale

D'une manière générale, les rejets industriels doivent respecter les normes définies par réglementation et tout dépassement même limité peut être dangereux et a un impact sur le milieu récepteur et leur environnement.

Les dénombrements des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans les rejets de Sidi Saâda s'échelonnent respectivement entre 1-240UFC/100ml pour les premiers et entre 4- 240 et plus UFC/100ml pour les seconds. Le nombre maximal de ces microorganismes a été obtenue aux points P3, P4, P7et P8 pour les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux (Figure V- 25 et Figure V- 26).

Les résultats obtenus aux différents points de prélèvement attestent que les rejets hébergent de fortes densités de bactéries fécales indicatrices d'une contamination d'origine fécale de ses eaux.

Considérant les rapports des moyennes de CF/SF, l'origine probable des souillures fécales a été établie d'après les critères de l'Agence américaine de Protection de l'Environnement [128]. Ainsi, l'origine fort probable de la pollution selon ces critères est humaine si ce rapport est supérieur à 4, animale si le rapport est inférieur à 0,7 ; mixte si le rapport est compris entre 1 et 2.

Les fluctuations spatiales de la densité des germes fécaux semblent fortement liées aux facteurs locaux tels que la densité des populations animale et humaine. Nos investigations ne révèlent que très peu de sources ponctuelles de contamination fécale le long du cours d'eau [129].

Les paramètres biologiques souvent recherchés lors de la caractérisation des eaux usées sont les bio-indicateurs de la pollution fécale [129] parmi lesquels nous avons les indicateurs bactériens qui sont les coliformes fécaux (CF) et les streptocoques fécaux (SF). Il a été montré que les caractéristiques du milieu récepteur peuvent affecter la survie de ces indicateurs [16]. Le niveau moyen de contamination des effluents urbains par les bactéries sont présentés dans le Tableau V- 4.

Tableau V- 4: Niveau moyen de contamination des effluents urbains par les bactéries.

Niveau moyen de Contamination Germes	Valeur moyen (/100ml)
Coliformes totaux	180 x 10
Coliformes fécaux	40 x 10
Streptocoques fécaux	4 x 10

La matière organique caractérisée par la demande biochimique en oxygène, constitue une nourriture de choix pour les microorganismes. Les fortes teneurs en DBO₅ provoquent leur prolifération

Concernant la matière en suspension et les résidus secs, leur concentration est très élevée dans les effluents rejetés et dépassent les normes de rejet, ce qui contribue à faire augmenter la turbidité de l'eau et empêche la propagation de la lumière, et influe donc sur la végétation avoisinante et aussi sur la qualité des eaux. Ces eaux sont utilisées par la population locale notamment pour l'irrigation des terres et l'élevage. En plus de la présence des certains éléments majeurs tel que le magnésium, le calcium, le potassium, le sodium, les chlorures, et les sulfates.

Les valeurs de la salinité des rejets sont considérables et donc la conductivité élevée, ces deux paramètres influent sur les eaux de milieu récepteur, sur le sol et donc sur la végétation, et les pâturages et l'agriculture de la région.

Les concentrations en sels nutritifs dans les effluents de la laiterie de Sidi Saâda varient assez largement. Les formes de l'azote présent à des concentrations considérables dans les rejets sont l'ammonium et les nitrites à cause du manque d'oxygène dans le milieu ce qui favorise l'oxydation incomplète de l'ammonium en nitrite et la dénitrification de nitrate. Le manque d'oxygène dans le milieu (consomme par les bactéries et inhiber par les graisses et les huiles) rend la réaction d'oxydation un peu lente ce qui rend le milieu riche en ammonium que les nitrates, en plus de l'inefficacité de la STEP dans l'élimination de l'ammonium des rejets.

Concernant les analyses de la teneur de phosphore indiquent que les effluents de l'usine et le rejet final contiennent des teneurs moyennes des ortho-phosphates et des teneurs de phosphore respecte la norme malgré l'absence de traitement du phosphore).La teneur de phosphore issu de l'utilisation des détergents

Les valeurs de température, pH, et les huiles et les graisses, respectent les normes de rejet, mais ils ont certains effets néfastes sur l'environnement par la diminution d'oxygène dissous, et l'accélération de l'activité des germes pathogènes.

La station d'épuration de la laiterie de Sidi Saâda ne fonctionne pas de façon réglementaire à cause de l'accumulation des boues au fond des bassins des aérations ou inhibant le fonctionnement de seul aérateur activé (les deux autres sont en pêne), en plus du problème de moussage, de grande quantité des huiles et graisses, de la turbidité et la grande quantité de MES et de RS, qui empêche la pénétration d'oxygène et donc il n'y a pas eu une élimination

d'ammonium, une réduction de DBO₅, DCO, MO et donc ne contient dans le milieu que les germes anaérobies toxiques et des odeurs désagréables et infectieuses.

Ces problèmes dues aux grandes quantités de lactosérum rejeter et l'inefficacité du traitement biologique à boue active, ce problème nécessite un traitement spécifique de lactosérum.

V.C. Fermentation du lactosérum

Cette partie est consacrée à valoriser le lactosérum via production de l'éthanol. Afin de dépolluer l'air et les rejets de la laiterie de Sidi Sâada, le genre *Saccharomyces* sp. permet parallèlement de transformer les sucres du lactosérum en éthanol. De ce fait, le rejet de cette production deviendra riche en protéine de levure qui pourrait être utilisé comme fourrage. Cette partie se résume en l'isolement des levures à forte production de l'éthanol à partir du lactosérum et les utiliser en fermentation alcoolique à cellules libres et à cellules immobilisées sur trois supports tels que la pouzzolane, les noyaux d'olive et le polyéthylène.

V.C.1 Préparation du milieu de fermentation

Pour la détermination de la composition biochimique, nous avons jugé intéressant de déterminer seulement les composés du lactosérum brut et autoclavé (Figure V- 27) qui pourraient avoir un rôle dans la fermentation ultérieure.

Les résultats des analyses concernant le lactosérum sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau V- 5: Analyse physicochimique du lactosérum acide.

Constituant	Lactosérum brut	Lactosérum autoclavé
-Teneur en eau (%)	94	89
- pH	6	5,5
- Matière sèche soluble g/l	81	79
- Sucres totaux g/l	80	76
- Protéines g/l	10	7
- Matière grasse g/l	1,00	0,00
- Cendre g/l	7,98	7
- Azote totale g/l	1,60	1,12
- Chlorures g/l	1,80	1,75

Le lactosérum objet de l'analyse a un pH=5,5 et une concentration de sucres totaux à 76 g/l, correspondant au lactose, galactose et glucose.

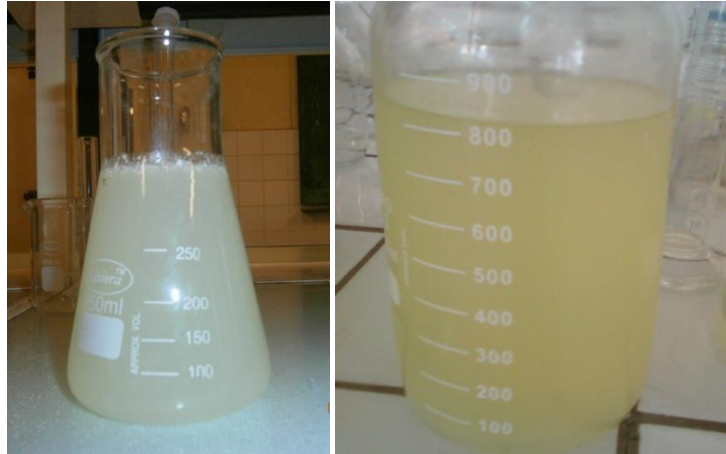


Figure V- 27 : Lactosérum brut et du lactosérum autoclavé (de gauche à droite).

Nous avons constaté que la composition biochimique moyenne du lactosérum brut et autoclavé n'est pas très différente de celle mentionnée dans la littérature [51, 52] dans le cas du lactosérum de fromage à pâte pressé. Toutefois, les valeurs sont légèrement inférieures ce qui s'expliquerait par une différence de la composition initiale de lait utilisé.

Comme montre le Tableau V- 5, le lactose est le constituant le plus important du lactosérum (76g/l), il représente 70 à 72% de l'extrait sec [57, 130].

Après autoclavage, nous avons remarqué :

- une diminution de la concentration du lactose de 4g/l, cette perte en lactose peut être due à l'hydrolyse thermique (120°C) ;
- une diminution du taux de protéines de 10 à 7g/l. La déprotéinisation par chauffage du lactosérum est partielle car le lactosérum possède des protéines fragiles telles que les albumines (75%), les globulines ou immunoglobulines (10 à 12%), les protéoses-peptones (10%) et les protéines mineures (5%). Elles ont un pH_i (point isoélectrique) qui varie entre 4,6 à 5,2 [59]. A un pH de 4,6, ils précipitent certaines fractions protéiques tandis que les autres restent solubles dans le sérum.

V.C.2 Isolement et identification du genre *Saccharomyces* sp.

La culture des échantillons du lactosérum sur deux milieux (Sabouraud et OGA bouillon nutritif additionné à un antibiotique tel que l'oxytétracycline) a permis l'isolement de huit souches levuriennes (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 et S8). Les résultats sont récapitulés dans le Tableau V- 6.

Tableau V- 6 : Isolement des levures à partir des différents échantillons de lactosérum

	Date de prélèvement	Dilution	Milieu d'isolement	Souche levurienne
E1	03/02/2013	Solution mère	Sabouraud, bouillon nutritif	S1, S2, S3
E2	04/02/2013	Solution mère	Sabouraud, bouillon nutritif	S4, S5, S6
E3	06/02/2013	Solution mère	Sabouraud, bouillon nutritif	S7, S8

Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* commerciale S0 à caractère industriel a été utilisée afin de comparer sa production en éthanol avec celle des autres souches sauvages isolées.

L'identification des levures est basée sur les caractères cultureux : la forme, la couleur des colonies et l'aspect de la culture sur milieu liquide et solide, les caractères morphologiques et cellulaires (le mode de reproduction végétative, aptitude à la filamentation) et les caractéristiques sexuelles et les caractères biochimiques (la fermentation et l'assimilation de différents substrats) [75].

- Caractères cultureux : En deux à quatre jours parfois davantage à 30°C, nous avons noté des colonies blanchâtres, crémeuses, épaisses, luisantes qui suggèrent la présence des levures, notamment du genre *Candida* sp. (S2, S6) dont les colonies sont dénombrées, habituellement de façon semi-quantitative (de « rares » à « très nombreuses »).

L'observation macroscopique des colonies du S0 montre la présence d'un seul type de colonies présentant les caractéristiques suivantes : couleur blanchâtre et aspect bombé et crémeux. Sur gélose Sabouraud, ces caractères sont représentatifs des levures. De plus, une odeur de levures de boulanger confirme l'analyse.

Pour les colonies (S1, S3, S4, S5, S7 et S8), l'observation macroscopique montre une couleur jaune blanchâtre et de forme arrondie ou ovale, volumineuses ou unicellulaires, confirmant la présence du genre *saccharomyces* sp.

Les levures sont utiles en industrie laitière car elles peuvent servir comme agents d'aromatisation. Elles sont aérobies facultatives et se développent en surface formant les boutons de nature mycélienne [131]. Par contre, d'autres levures telles que *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis* peuvent avoir des effets néfastes dans les aliments. Les levures supportent des pH de 3 à 8 avec un optimum de 4,5 à 6,4. Ce qui explique leur présence dans le lait cru comme dans le lait Caillé [75].

Elles entraînent des altérations rendant le produit final indésirable: aspect trouble, odeurs ou goûts anormaux, gonflement des produits ou de leur emballage.

La Figure V- 28 montre l'observation macroscopique des 8 types des souches isolées à partir du lactosérum avec S0 est la souche référence:

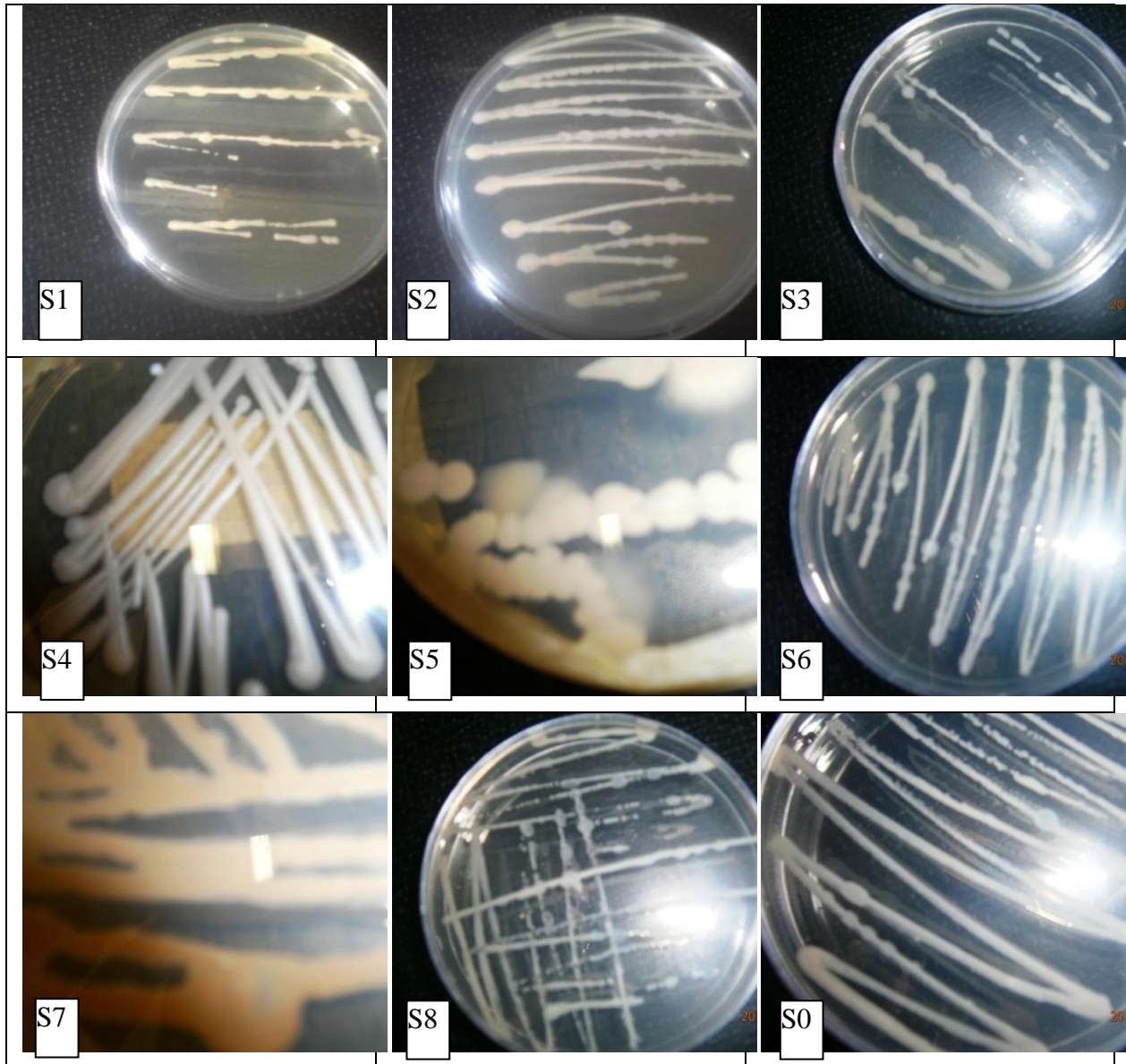


Figure V- 28: Observation macroscopique des 8 types de colonies de levures isolées à partir du lactosérum et levure commerciale après 5 jours d'incubation à 30°C.

➤ Caractères morphologiques et cellulaires :

L'examen direct « à frais » se pratique directement sur le produit biologique, sans fixation ni coloration spécifique. La facilité par l'utilisation d'éclaircissants sont examinés les appositions sur lame. Cet examen montre des levures bourgeonnante,

bourgeonnante +/- avec mycélium. Ces observations montrent la présence de *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., et *Candida* sp (présence de mycélium).

Examen direct après coloration

Les principales colorations utilisées après fixation par 50% alcool - 50% éther sont des «colorations après oxydation». La coloration de Gram a été utilisée pour mettre en évidence les blastospores et filaments des levures. Les figures suivantes (de la Figure V- 29 à la Figure V- 32) représentent l'observation microscopique

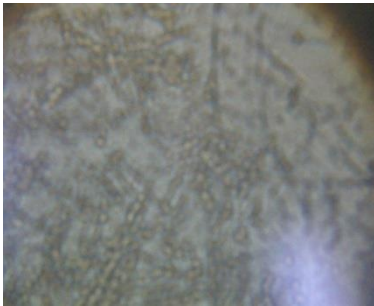


Figure V- 29: levure commerciale à l'état frais (Observation microscopique grossissement x 100).

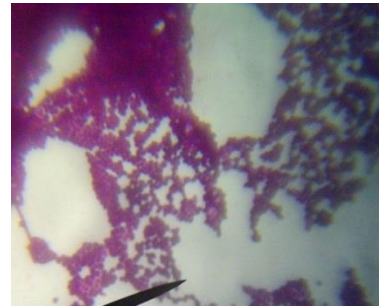


Figure V- 30: Coloration de Gram de la levure commerciale (Observation microscopique grossissement x 100).

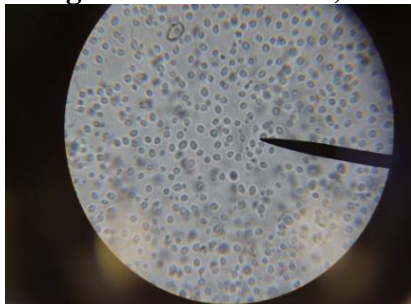


Figure V- 31: Saccharomyces sp à l'état frais (Observation microscopique grossissement x 100).

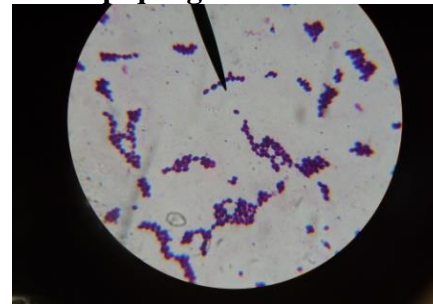


Figure V- 32: Coloration de Gram de Saccharomyces sp. (Observation microscopique grossissement x 100).

L'observation du levain commercial montre la présence de cellules de forme ovoïde avec des bourgeonnements. Ces deux éléments montrent respectivement qu'il s'agit de levures et qu'elles sont dans une dynamique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

- Caractères biotechnologiques :
- Capacité de production de l'éthanol et de la biomasse

Les Tableau V -7 et Tableau V -8 montrent les résultats des tests de production de l'éthanol et de la biomasse respectivement.

Tableau V- 7: production de l'éthanol.

Souche	Production de l'éthanol	
	Lactosérum	OGA bouillon nutritif+oxytetracycline
S0	++	++
S1	-	-
S2	++	++
S3	+	-
S4	-	+
S5	-	-
S6	++	++
S7	+	-
S8	-	+

Tableau V- 8: production de la biomasse.

Souche	Production de la biomasse (10^6 UFC)	
	Lactosérum	OGA bouillon nutritif+oxytetracycline
S0	176	180
S1	150	143
S2	174	178
S3	120	111
S4	112	115
S5	80	98
S6	172	176
S7	88	76
S8	66	70

D'après les résultats énumérés dans le Tableau V- 7 et Tableau V -8, les souches S2 et S6 seront sélectionnées pour réaliser les expériences de fermentation.

➤ Vérification des paramètres cinétiques de croissance

Le contrôle des paramètres cinétiques de la souche de levure constitue une étape importante pour l'industriel. En effet, pour lui assurer des rendements meilleurs, le levain doit présenter un temps de génération approprié (le temps de génération est le temps nécessaire pour doubler le nombre de levures lors de leur croissance). Nous avons réalisé une étude complète de la croissance du levain en fermenteur.

Les fermenteurs de laboratoire sont des enceintes, généralement en verre permettant la croissance de micro-organismes, en contrôlant différents paramètres (agitation, température, pH, oxygénation).

V.C.3 Fermentation en batch à cellules libres

V.C.3.1 Etude de la croissance des deux souches

La croissance de tout micro-organisme est estimée par la détermination de trois paramètres essentiels : le taux de croissance, le temps de génération et la durée de la phase de latence. La phase de latence représente le temps nécessaire pour que les conditions physiologiques optimales de la souche soient réalisées. La phase de croissance est l'une des données qui nous renseigne sur l'activité métabolique de la souche. Ce taux est déterminé graphiquement à partir de la phase exponentielle, qui est la phase la plus importante où s'évalue la performance des souches [84, 85, 87, 131, 132].

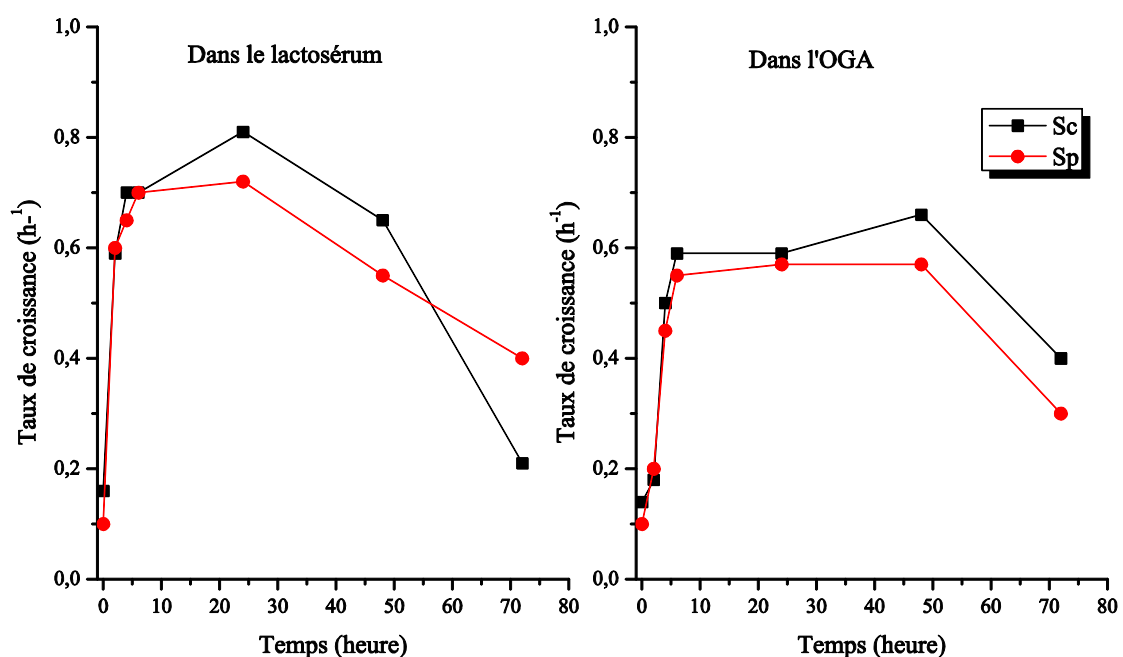


Figure V- 33: Evolution de la croissance des cellules en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique à cellules libres à 30°C, sous une agitation de 100tr/min.

Dans les conditions suivantes :

- Taux d'ensemencement : 1% soit (176×10^6 UFC/ml) ;
- Volume total du bioréacteur : 1 litre ;
- Volume réactionnel : 900 ml ;
- Température de la fermentation : 30°C ;
- Milieu réactionnel : lactosérum autoclavé ;
- Milieu de référence : Milieu OGA bouillon nutritif;
- Agitation : 100 tours/minute ;
- pH non contrôlé.

Durant 72 h à 30°C sous une agitation de 100 tours/min, les courbes de croissance des deux souches ne présentent pas une phase de latence.

Dans le milieu de référence (OGA bouillon nutritif), pour le genre de *Saccharomyces cerevisiae* contient quatre phases distinctes et qui sont :

- 1^{ère} Phase exponentielle qui dure 6 h ;
- Phase stationnaire qui dure 18 h ;
- 2^{ème} Phase exponentielle qui dure 24 h ;
- Phase de déclin qui dure 24 h.

Par contre celle de *Saccharomyces* sp. contient trois phases et qui sont :

- Phase exponentielle qui dure 24 h ;
- Phase stationnaire qui dure 24 h ;
- Phase de déclin qui dure 24 h.

Dans le lactosérum, la cinétique du genre de *Saccharomyces cerevisiae* présente quatre phases qui sont:

- 1^{ère} Phase exponentielle qui dure 4 h ;
- Phase stationnaire qui dure 2 h ;
- 2^{ème} phase stationnaire qui dure 18 h ;
- Phase de déclin qui dure 48 h.

D'autre part, celle de *Saccharomyces* sp. contient trois phases distinctes et qui sont :

- Phase exponentielle qui dure 6 h ;
- Phase stationnaire qui dure 18 h ;
- Phase de déclin qui dure 48 h.

Le taux de croissance maximal a été estimé à 0,8 h⁻¹ pour *Saccharomyces cerevisiae* et 0,7 h⁻¹ pour *Saccharomyces* sp. dans le lactosérum, par contre dans le milieu de référence (OGA bouillon nutritif), il est évalué à 0,66 h⁻¹ pour *Saccharomyces cerevisiae* et 0,57 h⁻¹ pour *Saccharomyces* sp.

Ces résultats affirment que le lactosérum constitue un milieu de fermentation pour la levure isolée choisie et pour *Saccharomyces cerevisiae* vu leur capacité d'adaptation rapide dans les deux milieux.

Lors de la fermentation alcoolique en mode batch à cellules libres, les vitesses spécifiques maximales atteintes par les souches du genre *Saccharomyces* sont élevées comparées aux données de la bibliographie qui mentionnent une vitesse spécifique maximale (μ_{\max}) de 0,45 h⁻¹ pour les levures de type *Saccharomyces cerevisiae* [131, 132].

V.C.3.2. Evolution du pH

Au cours de la fermentation alcoolique en batch, nous avons noté une variation du pH dans les deux milieux utilisés et qui est montrée dans la Figure V- 34.

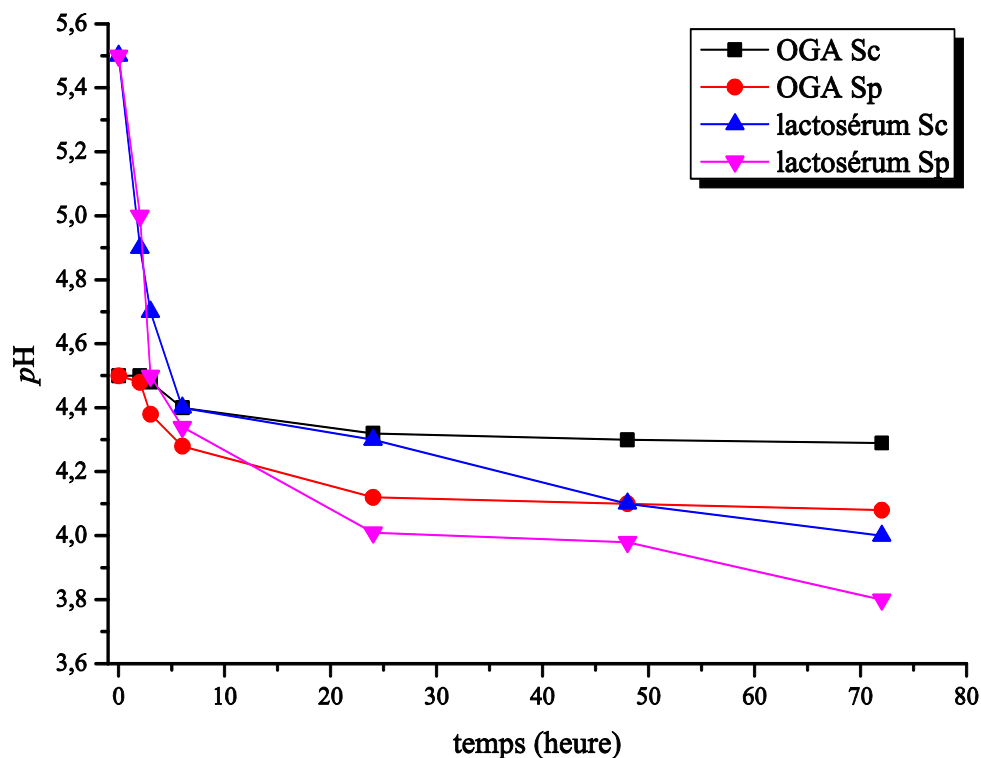


Figure V- 34: Evolution du pH en fonction du temps dans les deux milieux de culture au cours de la fermentation alcoolique à cellules libres à 30°C, sous une agitation de 100 trs/min.

Les courbes présentent l'évolution du pH durant 72h dans les milieux de fermentation.

Nous avons noté ce qui suit :

Pour *Saccharomyces cerevisiae*, le pH a diminué de 4,4 à 4,29 dans l'OGA bouillon nutritif, et de 5,5 à 4 dans le lactosérum.

Pour *Saccharomyces sp.*, le pH a diminué de 4,5 à 4,08 et de 5,5 à 3,8 respectivement dans l'OGA bouillon nutritif et le lactosérum.

Ces diminutions correspondent à la production parallèle d'autres composés secondaires par les levures tels que les acides (Acétique, citrique, lactique, succinique) [76, 77, 84, 133-135].

V.C.3.3. Evolution de la consommation des sucres et production d'éthanol

La production d'éthanol est évaluée progressivement au cours de la fermentation alcoolique, elle atteint 29g/l. Au fur et à mesure qu'il y a production de l'éthanol, le taux de sucres diminue jusqu'à atteindre la valeur de 18g/l. D'après la littérature, l'alcool éthylique peut être produit au laboratoire par fermentation du lactosérum utilisant différents microorganismes avec un rendement supérieur à 75% [4, 57, 89, 136-148]. Comparativement

avec le rendement de production de l'éthanol par rapport à la transformation des sucres par le genre *Saccharomyces sp.* et qui est de 50% (Tableau V- 9 et Figure V -35). Dans des conditions strictement anaérobies, 1Kg de sucre assure une production de 0,46 Kg d'éthanol pur [84, 85, 87].

Tableau V- 9: Le rendement d'extraction des sucres et de leur métabolisation en éthanol

Taux initial des sucres dans le lactosérum (g/l)	Taux résiduel des sucres dans la solution de lactosérum (g/l)	Consommation de sucres (g/l)	Taux d'alcool optimal atteint (g/l)	Rendement
76	18	58	29	50%

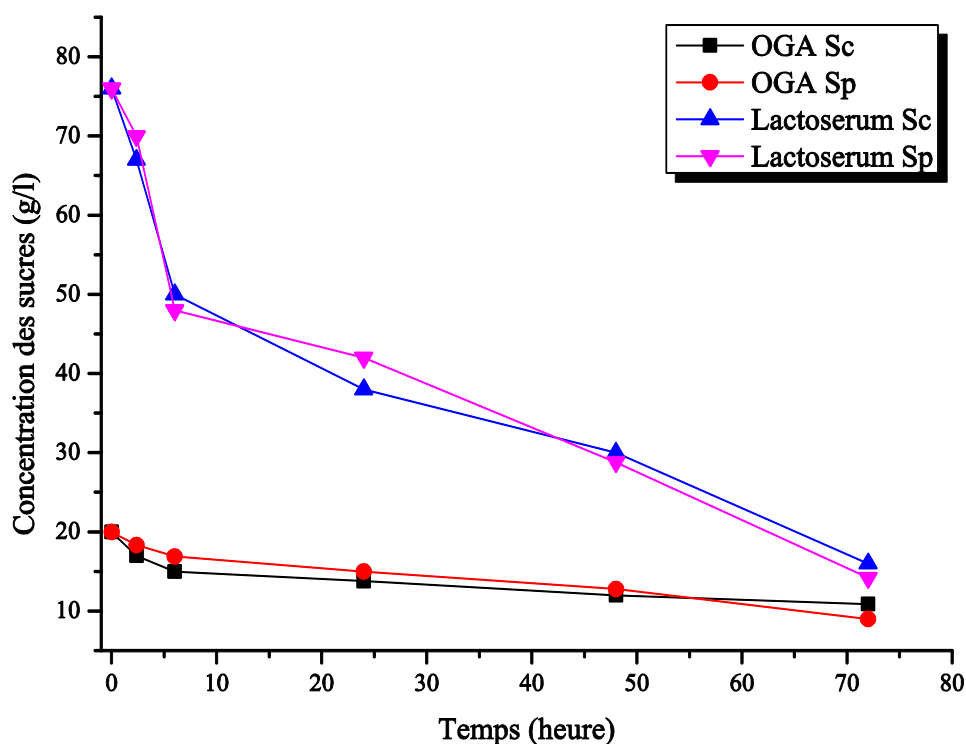


Figure V- 35: Consommation des sucres en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique à cellules libres, sous une agitation de 100 trs /min.

Ces courbes (Figure V- 35 et Figure V- 36) montrent que la consommation des sucres par la souche considérée est presque la même dans les deux milieux. La diminution des sucres est lente, les sucres totaux sont presque totalement consommés au bout de 3 jours, ce qui explique probablement que les souches utilisent les sucres en premier temps de la fermentation assimilables (sucre rapide) puis elles dégradent du lactose en sucres simples pour leurs métabolismes. Les substrats glucidiques autres que le glucose, fructose et le saccharose ne peuvent pas être directement fermentés par *saccharomyces cerevisiae* et

certaines levures et doivent au préalable subir une hydrolyse enzymatique ou acide pour libérer les hexoses assimilables [41, 131, 132, 145].

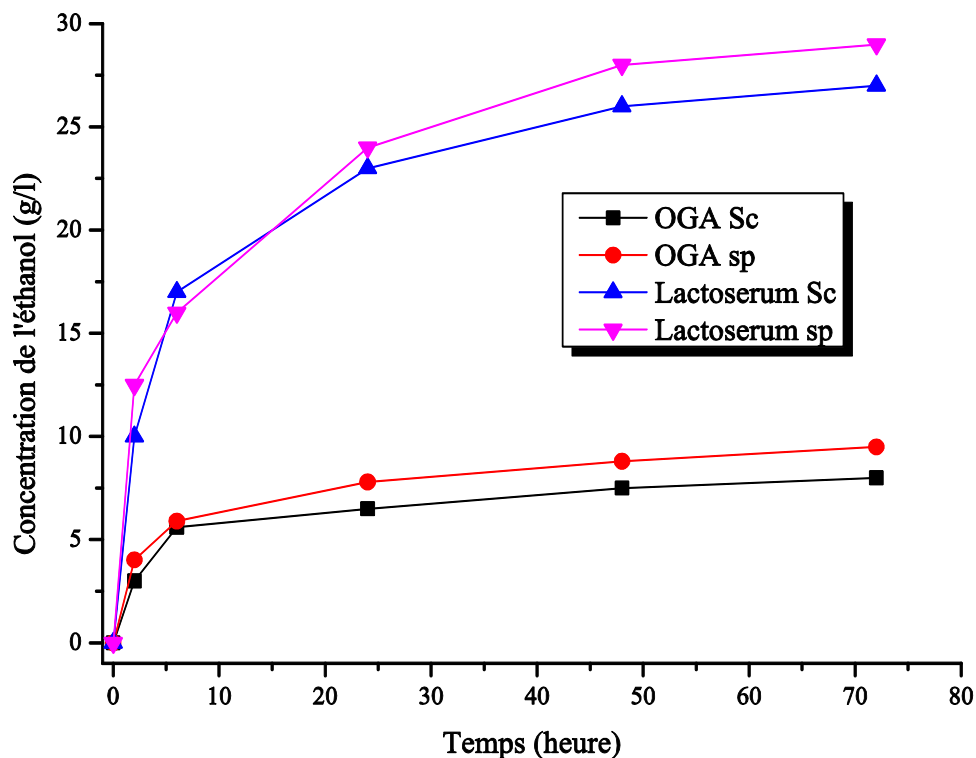


Figure V- 36: Evolution de la production de l'éthanol en fonction du temps au cours de la fermentation à cellules libres, sous une agitation de 100tr/min

Ce suivi consiste à mesurer le taux de sucre dans le milieu de fermentation, car celle-ci est équivalente à la teneur en éthanol présente. Nous considérons qu'une fermentation est achevée lorsque les sucres sont épuisés. Nous avons observé que les deux souches ont un taux de productivité presque le même dans le lactosérum et OGA bouillon nutritif.


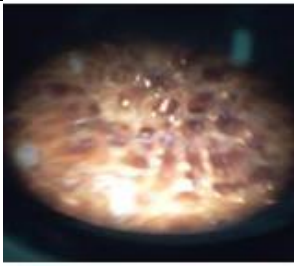

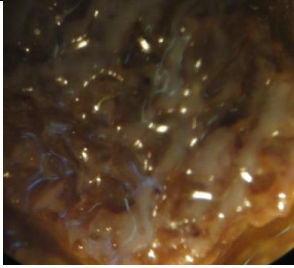



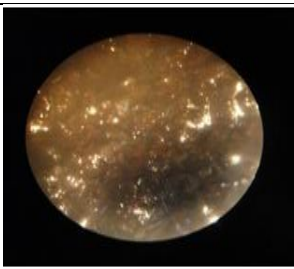
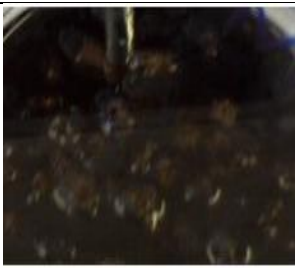
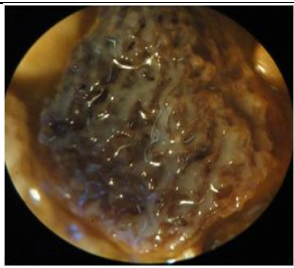
La production de l'éthanol est donc une alternative attrayante puisqu'il peut être produit à partir de sources renouvelables et disponible en grande quantités : sucres et amidon d'origine agricole, cellulose des déchets industriels et urbains [149-151].

Les résultats obtenus montrent que la teneur en sucres diminue au fur et à mesure que la production d'éthanol augmente. Par ailleurs, la production d'alcool évolue progressivement au cours de la fermentation.

V.C.4. La fermentation en batch à cellules immobilisées

V.C.4.1. Formation du biofilm

Tableau V- 10: Formation du biofilm sur les noyaux d'olives, pouzzolane et polyéthylène après immobilisation pendant 72 h.

Milieu	Support	Avant immobilisation	Après immobilisation
OGA BOUILLON NUTRITIF	N.O		
	Pz		
	PE		
Lactosérum	N.O		
	Pz		



Pour une immobilisation efficace des cultures utilisées, nous avons inoculé des boîtes de pétri en verre contenant un poids initial de 20 g pour chacun des supports (pouzzolane, noyaux d'olives et de polyéthylène) par des pré-cultures de *Saccharomyces sp.* dont l'âge de l'inoculum est de 24 h à 30°C.

Tableau V- 11: Formation du biofilm en milieu lactosérum

Culture	Support	Poids initial (g)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Biomasse fraîche (g)	Biomasse sèche (g)
Levures Sc	N.O	20	34,836	33,466	14,836	13,466
	Pz	20	31,081	27,381	21,081	17,381
	PE	20	24,655	22,897	4,652	2,897

En fonction des différences de poids frais et sec, nous avons noté une augmentation de la biomasse fraîche et même sèche.

Le Tableau V- 13 montre la porosité et la masse volumique ainsi que la densité des différents supports utilisés pour l'immobilisation cellulaire.

Tableau V- 12: Formation du biofilm au milieu OGA bouillon nutritif

Culture	Support	Poids initial (g)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Biomasse fraîche (g)	Biomasse sèche (g)
Levures Sc	N.O	20	27,549	26,977	7,549	6,977
	Pz	20	39,646	23,621	29,646	13,646
	PE	20	24	20,965	4	0,965

Tableau V- 13: la porosité et densité des supports

Support	Porosité	Masse volumique (Kg .m ⁻³)	Densité
Pouzzolane	2.02	1.02x10 ⁻³	0.8-1.13
Noyaux d'olives	0,8	0,8x10 ⁻³	1.2
Polyéthylène	0,04	0,04x10 ⁻³	0,002

D'après ces tableaux, l'immobilisation sur supports montre une fixation importante de la souche *Saccharomyces sp* sur la pouzzolane par rapport aux autres supports avec le lactosérum. Par contre avec le milieu OGA bouillon nutritif, le biofilm formé est apparu moins clair après une période de plus de 72h.

V.C.4.2. Suivi de la fermentation

Les différentes évolutions ont été déterminées selon les conditions suivantes :

Type de support : pouzzolane de granulométrie 06 mm, de porosité de 2,02 ; de densité 1,13 et de masse volumique 1,02 g/l, les noyaux d'olives de granulométrie 06 mm de porosité de 1,1; de densité 1,2 et de masse volumique 1,1. Le polyéthylène, porosité de 0,04 et de masse volumique 2, de densité 0,002.

- Poids du garnissage : 50g
- Taux d'ensemencement : 10%
- Volume total du bioréacteur : 1 L
- Volume réactionnel : 900 ml
- Température de la fermentation : 30°C
- Milieu réactionnel : le lactosérum.
- Milieu de référence : Milieu OGA bouillon nutritif
- Agitation : 100 tours / minute
- pH non contrôlé

V.C.4.2.1. Evolution du pH

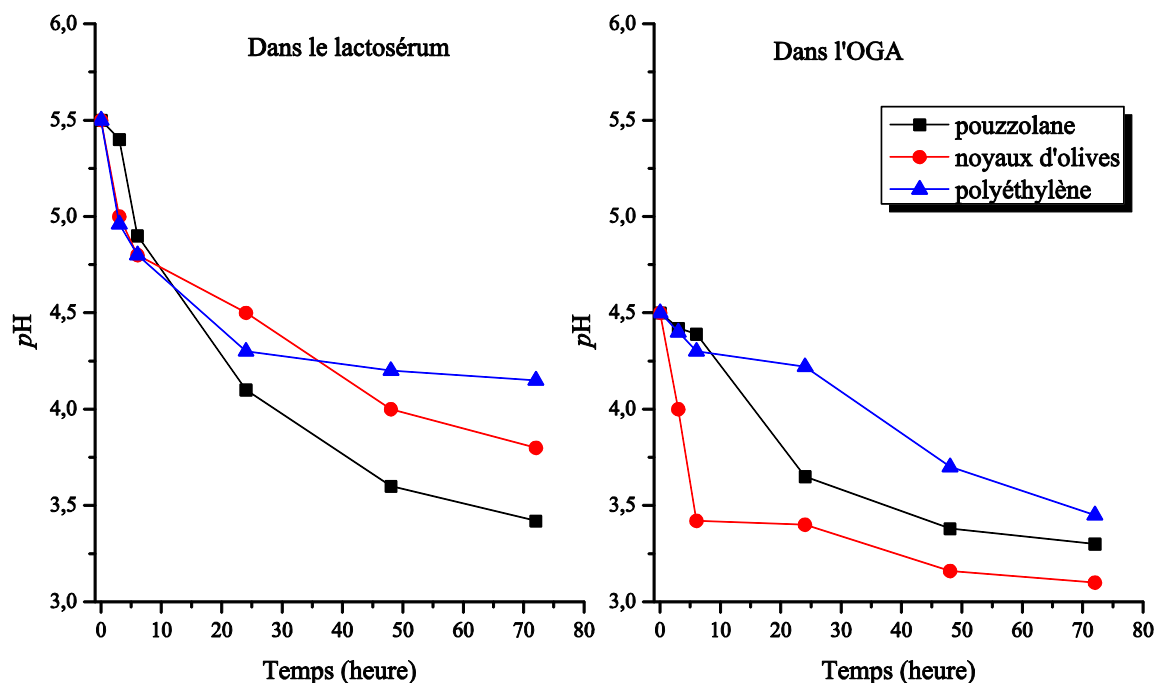


Figure V- 37: Evolution du pH en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (*sp*) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène à 30°C.

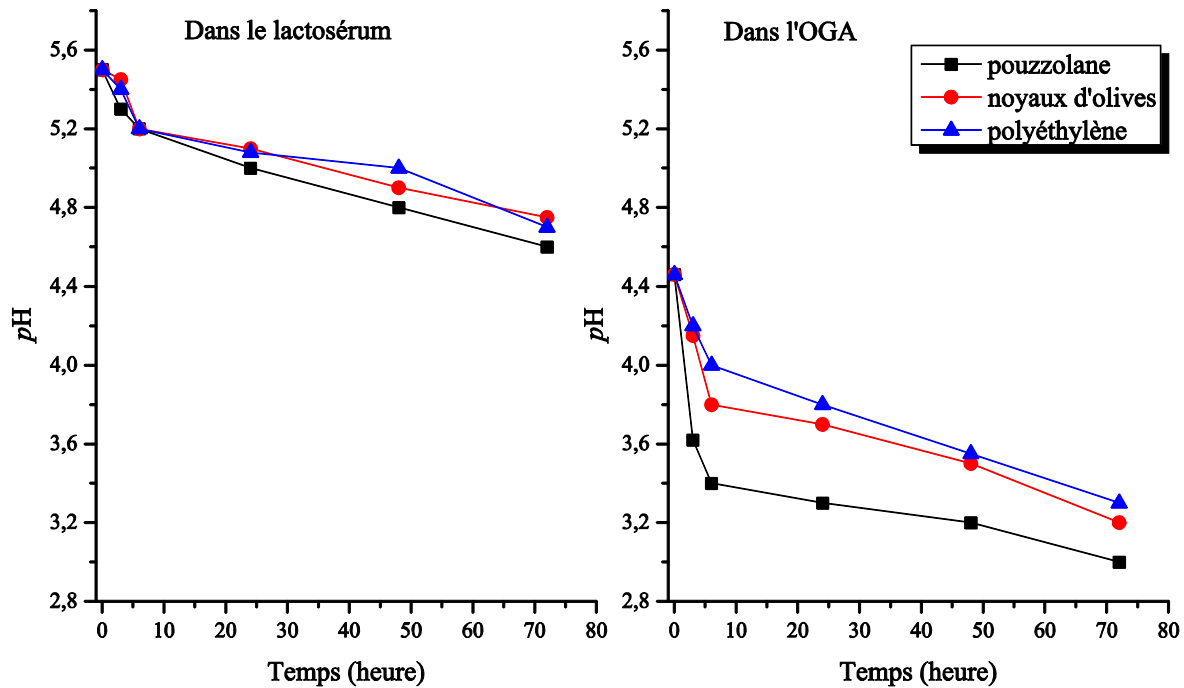


Figure V- 38: Evolution du pH en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (Sc) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène à 30°C.

Ces courbes montrent une faible diminution du pH dans l'OGA bouillon nutritif, avec les deux souches, quel que soit le support. Avec une diminution accrue du pH dans le cas où la pouzzolane ou les noyaux d'olives sont utilisés comme support. La diminution du pH est due à la production parallèle par les levures d'autres composés secondaires dont des acides (acétique, citrique, lactique, succinique...) [76, 77, 84, 133-135].

Dans le lactosérum il y a une diminution du pH entre 5,5 et 3,4 qui indique une production d'acide par les souches isolées et *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons remarqué aussi que la souche *Saccharomyces* sp. a une production importante d'acide par rapport à la levure commerciale où le pH est 3,4 au bout de 72h avec la pouzzolane et de 3,8 avec les noyaux d'olives.

V.C.4.2.2. Evolution du taux des sucres au cours de la fermentation en continue

La Figure V- 39 et Figure V- 40 représentent l'évolution du taux des sucres au cours de la fermentation en continue:

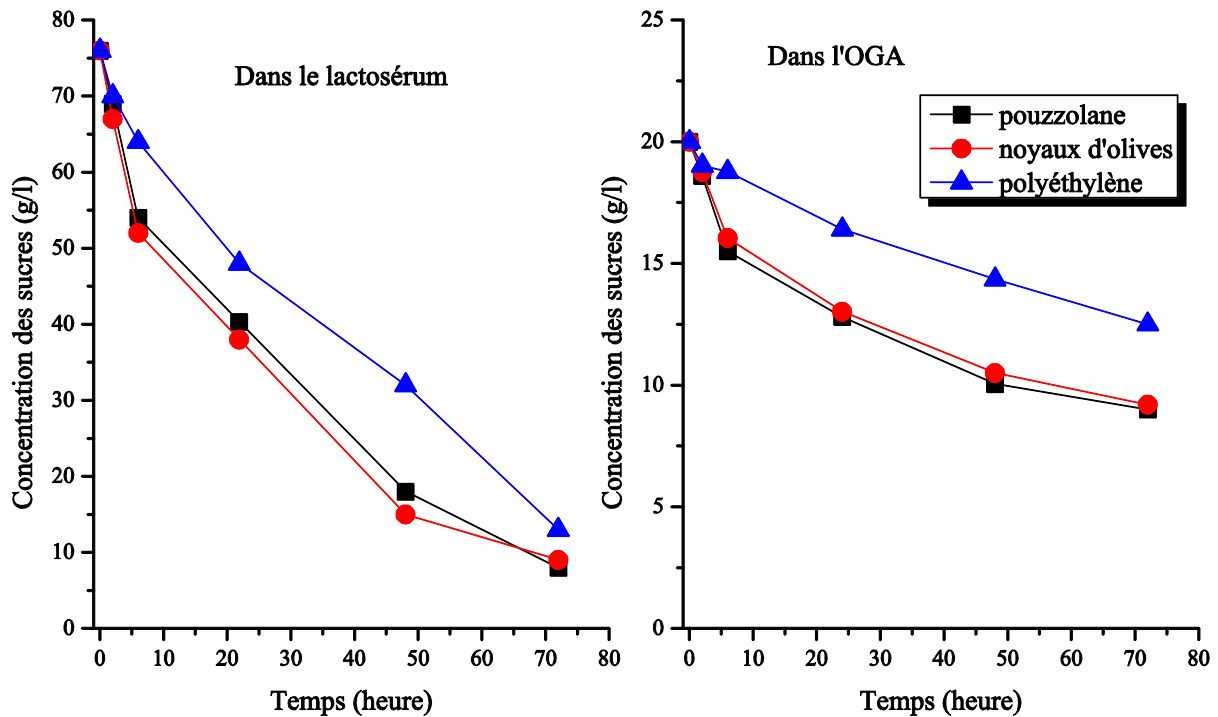


Figure V- 39: Evolution du taux de sucres consommé en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (sp) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène PE à 30°C.

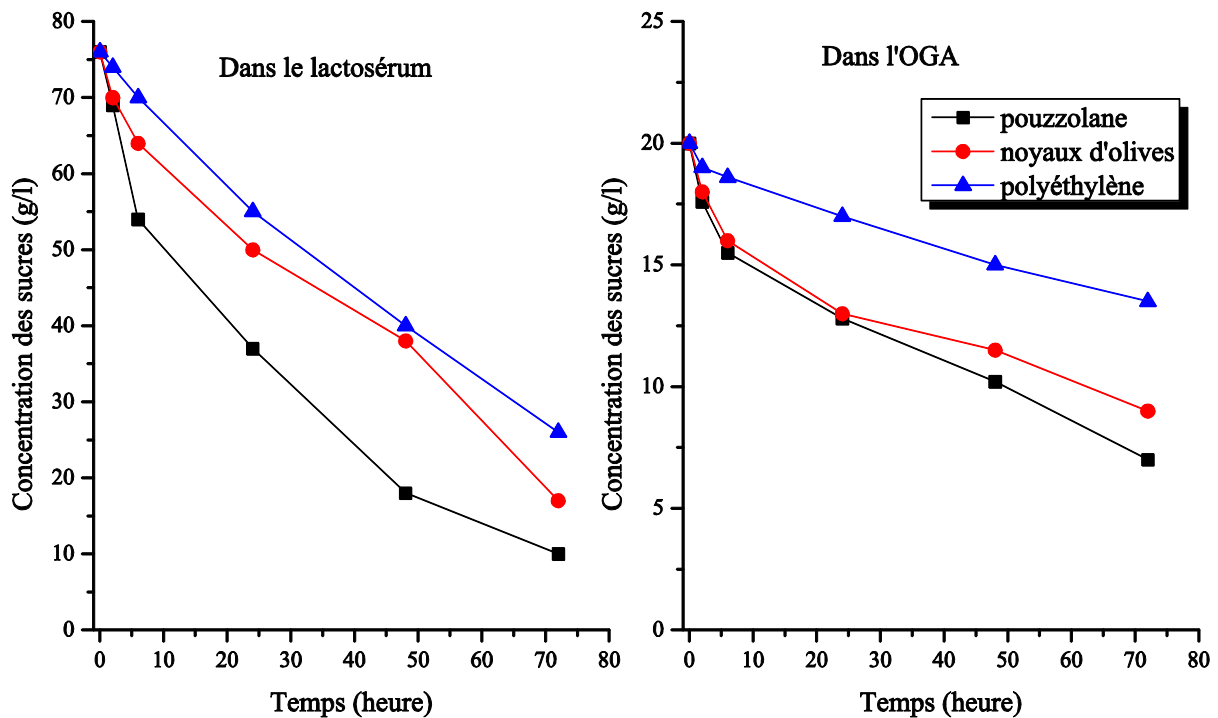


Figure V- 40: Evolution du taux de sucres consommé en fonction du temps au cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (Sc) sur pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène PE à 30°C.

Ces courbes montrent que la consommation des sucres par la souche considérée est presque la même dans les deux milieux. La diminution des sucres est lente, ce qui explique probablement que les souches utilisent les sucres en premier temps de la fermentation assimilables (sucre rapide) puis elles dégradent du lactose en sucres simples pour leurs métabolismes. Les substrats glucidiques autres que le glucose, fructose et le saccharose ne peuvent pas être directement fermentés par *Saccharomyces cerevisiae* et certaines levures et doivent au préalable subir une hydrolyse enzymatique ou acide pour libérer les hexoses assimilables.

Aussi, certaines levures passent par une phase de latence puis reprennent leur métabolisme avec une alimentation en continu du substrat. Ces résultats concordent avec les résultats tirés de la littérature [57, 122, 132].

V.C.4.2.3. Evolution de la concentration en éthanol

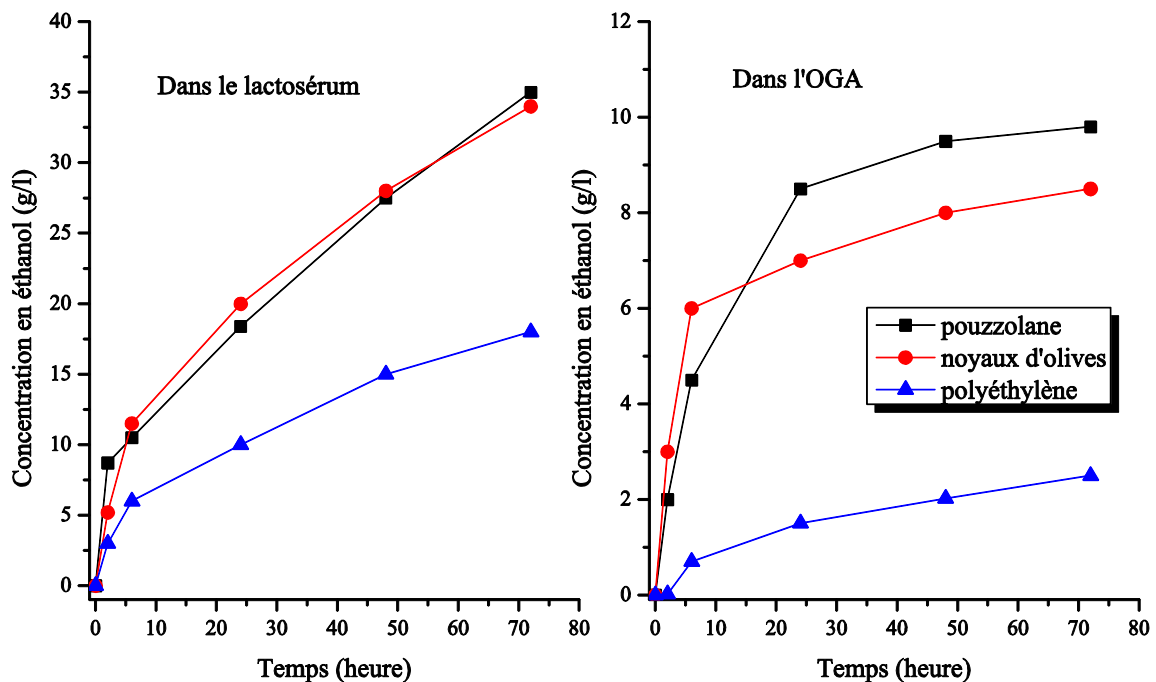


Figure V- 41 : Evolution de la production de l'éthanol en fonction du temps cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (sp) sur pouzzolane, noyaux d'olive et polyéthylène PE à 30°C.

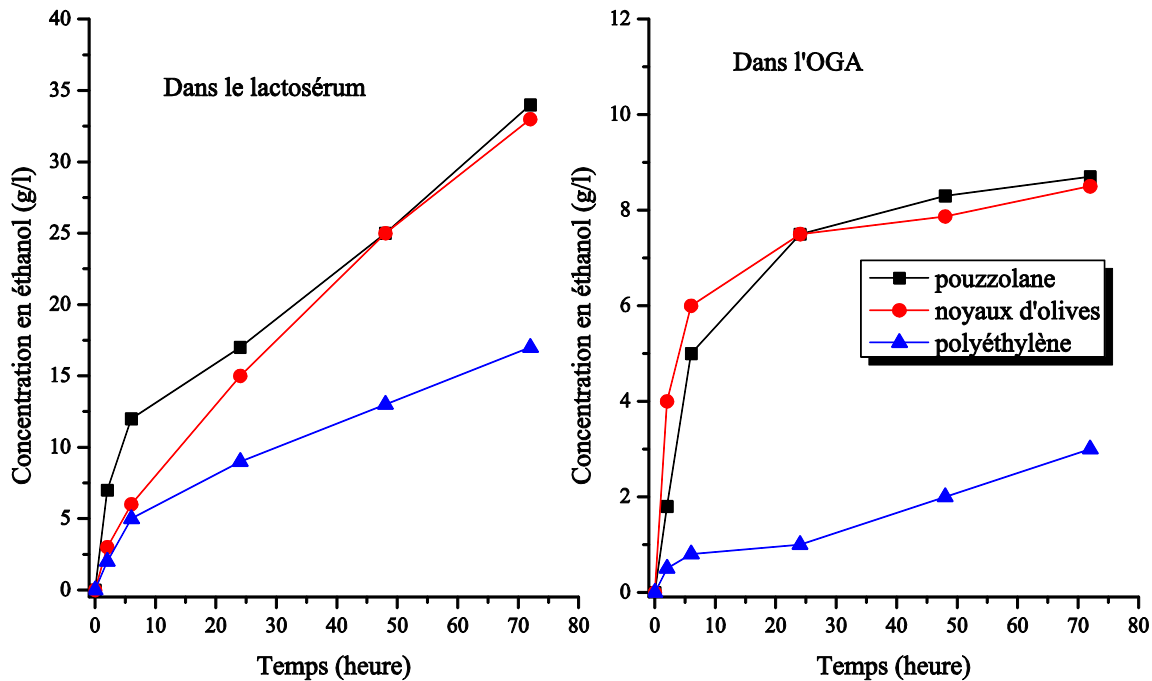


Figure V- 42: Evolution de la production de l'éthanol en fonction du temps cours de la fermentation alcoolique en continue à cellules immobilisées (Sc) sur pouzzolane, noyaux d'olive et polyéthylène PE à 30°C.

La Figure V- 41 et Figure V- 42 montrent l'évolution de la production d'éthanol par la souche *Saccharomyces cerevisiae* dans les deux milieux (le lactosérum et l'OGA bouillon nutritif) en mode continu à cellules fixées.

Nous avons remarqué une production d'éthanol presque égale sur la pouzzolane et les noyaux d'olives. Cette production est importante comparativement avec celle escomptée avec le support PE. Par contre la souche produisant une teneur importante en éthanol a été notée avec *Saccharomyces sp.* avec 35g/l. avec l'épuisement des sucres dans le lactosérum.

Pour rappel, dans des conditions strictement anaérobies, 1kg de sucre assure une production de 0,46kg d'éthanol pur [84, 85, 87].

V.C.5. Etude comparative

Afin de prévoir le meilleur rendement, la meilleure productivité de l'éthanol avec les deux systèmes, il s'avère utile de faire une comparaison entre la fermentation alcoolique (en batch à cellules libres et en continu à cellules immobilisées sur les trois supports différents) par les levures isolées à partir du lactosérum (*Saccharomyces sp.*) et la levure commerciale (*Saccharomyces cerevisiae*) dans les deux milieux (l'OGA bouillon nutritif et le lactosérum), selon le tableau suivant :

Tableau V- 14: Bilan de la métabolisation d'éthanol au cours de la fermentation en batch à cellules libres et en continu à cellules immobilisées sur 3 supports avec 900ml de volume réactionnel durant 72h.

Fermentation Alcoolique		Cellules Libres		Cellules Immobilisées pour un poids de 50g pour chaque support.					
		Lactosérum	Bouillon nutritif	Lactosérum			Bouillon nutritif		
				Pz	N.O	PE	Pz	N.O	PE
Production d'éthanol g/l	Sc	27	8	34	33	17	8,7	8,5	3
	sp	29	9,5	35	34	18	9,8	8,5	2,5
Rendement % (éthanol/sucre)	Sc	45	88	50	49,3	26	67	77,2	46
	sp	47	86	51	50,7	28	89	78,7	30,6
Productivité g/l/h	Sc	0,37	0,11	0,47	0,46	0,24	0,12	0,12	0,04
	sp	0,40	0,13	0,48	0,47	0,25	0,14	0,12	0,03

D'après le Tableau V- 14, nous remarquons que :

- les levures Sp immobilisées sur 50g de pouzzolane en culture pure à pH non contrôlé ont donné des meilleures productions en éthanol de 35g/l dans le lactosérum contient 76g/l de sucres.
- les levures Sp immobilisées sur 50g des noyaux d'olives en culture pure à pH non contrôlé ont donné une production en éthanol de 34g/l dans le lactosérum contient 76g/l de sucres.
- les levures Sp immobilisées sur 50g de polyéthylène en culture pure à pH non contrôlé ont donné un rendement en éthanol de 18g/l dans le lactosérum contient 76g/l de sucres.

Conclusion

Conclusion générale

Il ressort de cette étude que l'impact évalué des rejets de la laiterie Sidi Saâda a des incidences directes sur les composantes de l'environnement (Oued et atmosphère) et constitue une menace sur la qualité des produits fabriqués par la laiterie notamment les contaminations microbiennes vu le dysfonctionnement de la STEP.

Malgré le cadre législatif et institutionnel qui est mis en place afin d'atténuer et d'éliminer les impacts soulevés, les besoins d'élaboration des projets de valorisation des coproduits en biocarburants s'avèrent nécessaire pour réduire la pollution atmosphérique, de l'eau et du sol émanant des industries agroalimentaires source importante en matière organique.

De nombreuses recherches ont été menées pour développer des procédés de production biologiques d'éthanol en utilisant des souches telles que *Saccharomyces cerevisiae* et en travaillant sur leur métabolisme pour améliorer les rendements de production. Les résultats de la valorisation du lactosérum et la production de la molécule d'intérêt (éthanol) par la méthode d'immobilisation des levures sur supports pouzzolane, noyaux d'olives et polyéthylène ont été encourageants avec un procédé simple, rapide, efficace, performant et peu coûteux. Il n'y a aucun effet négatif sur la physiologie des cellules (rendement et bioconversion élevés).

Les résultats démontrent les grandes qualités de la pouzzolane comparativement avec les deux autres supports pour l'immobilisation des microorganismes et particulièrement pour levures Sp.

Cette appréciation a été avancée pour les conditions opératoires choisies comme suit :

En discontinu ou batch à cellules libres :

- Taux d'ensemencement : 10% ;
- Volume total du bioréacteur : 1 litre ;
- Volume réactionnel : 900 ml ;
- Température de la fermentation : 30°C ;
- Milieu réactionnel : le lactosérum autoclavé ;
- Milieu de référence : Milieu OGA bouillon nutritif ;
- Agitation : 100 tours / minute ;
- pH non contrôlé.

En continu à cellules immobilisées :

- Type de support : pouzzolane de granulométrie 06 mm, de porosité de 2,02 ; de densité de 1,13 et de masse volumique de 1,02 g/l, les noyaux d'olives de

granulométrie 06 mm de porosité de 1,1 ; de densité 1,2 et de masse volumique 1,1. Le polyéthylène, porosité de 0,04 et de masse volumique 2, de densité 0,002 ;

- Poids de garnissage : 50g ;
- Taux d'ensemencement : 10% ;
- Volume total du bioréacteur : 1 L ;
- Volume réactionnel : 900 ml ;
- Température de la fermentation : 30°C ;
- Milieu réactionnel : le lactosérum ;
- Milieu de référence : Milieu OGA bouillon nutritif ;
- Agitation : 100 tours / minute ;
- pH non contrôlé .

En culture pure, les bioréacteurs de la levure sp. immobilisée ont permis d'obtenir pour 900ml des deux milieux ce qui suit :

Pour le milieu de référence OGA bouillon nutritif :

le rendement maximal a été de 89% et productivité de 0,14g/l/h sur la pouzzolane, 78,7% et productivité de 0,12g/l/h sur les noyaux d'olives, 30,6% et productivité de 0,03g/l/h sur le support PE, comparativement avec le mode batch à cellules libres dont le rendement et la productivité étant respectivement 86% et 0,13g/l/h.

Pour le lactosérum :

le rendement maximal a été de 51% et productivité de 0,48g/l/h sur la pouzzolane, 50,7% et productivité de 0,47g/l/h sur les noyaux d'olives, 28% et productivité de 0,25g/l/h sur le support PE, comparativement avec le mode batch à cellules libres dont le rendement et la productivité étant respectivement 47% et 0,40g/l/h.

Nous pouvons en déduire que le meilleur rendement et la meilleure productivité ont été trouvés en utilisant la pouzzolane à cellules immobilisées dans le milieu de référence.

Notre étude a atteint l'objectif principal qui était la production d'éthanol par utilisation des cellules immobilisée sur des supports solides en vue de valoriser le lactosérum par une fermentation (en batch à cellules libres et en continu à cellules immobilisées). Cette valorisation a un aspect économique et environnemental.

Les filières biocarburant à usage local sont certes prometteuses en termes de création de revenus en zones rurales et peuvent générer un développement local (électrification, services sociaux, et transformation).

En égard à ce qui précède, nous recommandons ce qui suit :

- Que le Ministère en charge de l'Environnement et conservation de la nature et celui de la justice puissent travailler en synergie pour mieux l'encadrer du point réglementaire.
- Les impacts qui menacent l'écosystème devront être traités avec beaucoup de considération. Pour ce faire, les recours aux techniques et procédés qui respectent les principes et normes environnementaux doivent s'appliquer sans faille.
- Parfaire la connaissance et l'amélioration de ces systèmes de microorganismes immobilisés en culture mixte sur des supports solides en vue de les valoriser.
- Etablir la corrélation entre l'adsorption des cellules au support et les énergies de surface ou le potentiel zêta des cellules et du support.
- Rationaliser cette technique et de mieux contrôler sa réalisation.
- Corriger le milieu lactosérum en apport des nutriments pour une meilleure bioconversion en tenant compte comme référence OGA bouillon nutritif.
- Améliorer les performances de la bioconversion de lactosérum en éthanol sous contrôle de pH .
- Opérer ou réaliser des expériences à long terme pour tester la durée de vie du bioréacteur et ainsi constituer un paramètre déterminant pour le choix d'un procédé pour la fermentation en continu à l'échelle industrielle.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

1. McMichael, A.J., Global environmental change and human population health: A conceptual and scientific challenge for epidemiology. *International Journal of Epidemiology*, **1993**. 22(1): p. 1-8.
2. Su, M., Fath, B.D., and Yang, Z., Urban ecosystem health assessment: A review. *Science of The Total Environment*, **2010**. 408(12): p. 2425-2434.
3. Leiva-Candia, D.E., Pinzi, S., Redel-Macías, M.D., Koutinas, A., Webb, C., and Dorado, M.P., The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*, **2014**. 123: p. 33-42.
4. Gabardo, S., Rech, R., Rosa, C.A., and Ayub, M.A.Z., Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *kluveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renewable Energy*, **2014**. 69(0): p. 89-96.
5. Tarazona, J.V., Pollution, water, in *Encyclopedia of toxicology (third edition)*, P. Wexler, Editor **2014**, Academic Press: Oxford. p. 1024-1027.
6. Sharma, R.K., Gulati, S., and Puri, A., 3 - green chemistry solutions to water pollution, in *Water reclamation and sustainability*, S. Ahuja, Editor **2014**, Elsevier: Boston. p. 57-75.
7. Earnhart, D., Water pollution from industrial sources, in *Encyclopedia of energy, natural resource, and environmental economics*, J.F. Shogren, Editor **2013**, Elsevier: Waltham. p. 114-120.
8. Braden, J.B. and Shortle, J.S., Agricultural sources of water pollution, in *Encyclopedia of energy, natural resource, and environmental economics*, J.F. Shogren, Editor **2013**, Elsevier: Waltham. p. 81-85.
9. Ahuja, S., 1 - monitoring water quality, pollution assessment, and remediation to assure sustainability, in *Monitoring water quality*, S. Ahuja, Editor **2013**, Elsevier: Amsterdam. p. 1-18.
10. Zeliger, H.I., 8 - water pollution, in *Human toxicology of chemical mixtures (second edition)*, H.I. Zeliger, Editor **2011**, William Andrew Publishing: Oxford. p. 65-95.
11. Xagorarakis, I. and Kuo, D., Water pollution: Emerging contaminants associated with drinking water, in *International encyclopedia of public health*, H.K. Heggenhougen, Editor **2008**, Academic Press: Oxford. p. 539-550.
12. Rodier, J.L., B; Merlet, N, L'analyse de l'eau. 9 ed**2009**, Paris: Dunod. 1579.
13. OMS, Sécurité sanitaire de l'eau dans les bâtiments, **2011**, Organisation mondiale de la Santé: Genève.
14. Agus, E., Zhang, L., and Sedlak, D.L., A framework for identifying characteristic odor compounds in municipal wastewater effluent. *Water Research*, **2012**. 46(18): p. 5970-5980.
15. Marchesan, M. and Morran, J., Tastes associated with products in contact with drinking water, in *Water Science and Technology***2004**. p. 227-231.

16. Bari, M.L. and Yeasmin, S., Water quality assessment | modern microbiological techniques, in *Encyclopedia of food microbiology (second edition)*, C.A. Batt and M.L. Tortorello, Editors. **2014**, Academic Press: Oxford. p. 755-765.
17. Thompson, M.Y., Brandes, D., and Kney, A.D., Using electronic conductivity and hardness data for rapid assessment of stream water quality. *Journal of Environmental Management*, **2012**. 104: p. 152-157.
18. Lessels, J.S. and Bishop, T.F.A., Estimating water quality using linear mixed models with stream discharge and turbidity. *Journal of Hydrology*, **2013**. 498: p. 13-22.
19. Xu, J., Zhang, X., and Ma, Y.G., Treatment of low-temperature and low-turbidity water using modified active silica acid, in *Advanced Materials Research* **2012**. p. 831-835.
20. Sadeddin, K., Naser, A., and Firas, A., Removal of turbidity and suspended solids by electro-coagulation to improve feed water quality of reverse osmosis plant. *Desalination*, **2011**. 268(1-3): p. 204-207.
21. Koller, E., Traitement des pollutions industrielles. 2 ed **2009**, Paris: Dunod. 576.
22. Kumar, R. and Kumar, A., Water analysis | biochemical oxygen demand, in *Encyclopedia of analytical science (second edition)*, P. Worsfold, A. Townshend, and C. Poole, Editors. **2005**, Elsevier: Oxford. p. 315-324.
23. Jouanneau, S., Recoules, L., Durand, M.J., Boukabache, A., Picot, V., Primault, Y., Lakel, A., Sengelin, M., Barillon, B., and Thouand, G., Methods for assessing biochemical oxygen demand (bod): A review. *Water Research*, **2013**. 49(1): p. 62-82.
24. Hu, Z. and Grasso, D., Water analysis | chemical oxygen demand, in *Encyclopedia of analytical science (second edition)*, P. Worsfold, A. Townshend, and C. Poole, Editors. **2005**, Elsevier: Oxford. p. 325-330.
25. Cubas, F.J., Novak, J.T., Godrej, A.N., and Grizzard, T.J., Effects of nitrate input from a water reclamation facility on the occoquan reservoir water quality. *Water Environment Research*, **2014**. 86(2): p. 123-133.
26. Hutchins, M.G., What impact might mitigation of diffuse nitrate pollution have on river water quality in a rural catchment? *Journal of Environmental Management*, **2012**. 109: p. 19-26.
27. Riviere, M., Ribreux, S., and Philipps, F., Introduction of the plan to claim back the quality of water from nitrates. The lessons drawn from the experience of the lens-liévin urban community. *Techniques - Sciences - Methodes*, **2004**(12): p. 81-86.
28. Wei, K.L., Chen, M., Wang, F., and Fang, Q., A rapid in situ monitoring system for the determination of total phosphorus in waters, in *Advanced Materials Research* **2013**. p. 1526-1531.
29. Obropta, C.C. and Rusciano, G.M., Addressing total phosphorus impairments with water quality trading. *Journal of the American Water Resources Association*, **2006**. 42(5): p. 1297-1306.
30. Parinet, B., Boukari, S.O.B., and Adima, A., Evaluation of river water quality by multidimensional analysis using parameters characteristic of dissolved organic matter. *Revue des Sciences de l'Eau*, **2005**. 18(2): p. 133-163.

31. van der Jagt, H., Water analysis | overview, in *Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering* **2013**, Elsevier.
32. Mahadev, J., Nagarathna, and Hosmani, S.P., Studies on water quality with significance of calcium carbonate saturation index in two water bodies of mysore. *Indian Journal of Environmental Protection*, **2004**. 24(9): p. 678-683.
33. Terzi, E. and Verep, B., Effects of water hardness and temperature on the acute toxicity of mercuric chloride on rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Industrial Health*, **2012**. 28(6): p. 499-504.
34. Świetlik, J., Raczyk-Stanisławiak, U., Piszora, P., and Nawrocki, J., Reasons for the lack of chemical stability of treated water rich in magnesium. *Water Research*, **2011**. 45(19): p. 6585-6592.
35. Kolahchi, Z. and Jalali, M., Effect of water quality on the leaching of potassium from sandy soil. *Journal of Arid Environments*, **2007**. 68(4): p. 624-639.
36. Wenning, R.J. and Martello, L., Chapter 8 - pops in marine and freshwater environments, in *Environmental forensics for persistent organic pollutants*, G. O'Sullivan and C. Sandau, Editors. **2014**, Elsevier: Amsterdam. p. 357-390.
37. Jiménez-Rodríguez, A.M., Durán-Barrantes, M.M., Borja, R., Sánchez, E., Colmenarejo, M.F., and Raposo, F., Heavy metals removal from acid mine drainage water using biogenic hydrogen sulphide and effluent from anaerobic treatment: Effect of ph. *Journal of Hazardous Materials*, **2009**. 165(1-3): p. 759-765.
38. Signor, R.S., Roser, D.J., Ashbolt, N.J., and Ball, J.E., Quantifying the impact of runoff events on microbiological contaminant concentrations entering surface drinking source waters. *Journal of water and health.*, **2005**. 3(4): p. 453-468.
39. Papapostolou, H., Servetas, Y., Bosnea, L.A., Kanellaki, M., and Koutinas, A.A., Novel technology development through thermal drying of encapsulated *kluveromyces marxianus* in micro- and nano-tubular cellulose in lactose fermentation and its evaluation for food production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2012**. 168(8): p. 2148-2159.
40. Slaćanac, V., Božanić, R., Hardi, J., Rezessyné szabó, J., lučan, M., and Krstanović, V., Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, **2010**. 63(2): p. 171-189.
41. Domingues, L., Guimarães, P.M.R., and Oliveira, C., Metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioengineered Bugs*, **2010**. 1(3): p. 164-171.
42. Javadi, A. and Saeid, S., The fecal coliform to fecal streptococci ratio of traditional ice cream in tabriz (east-azerbaijan), iran. *Journal of Applied Sciences Research*, **2011**. 7(6): p. 787-790.
43. Chilliard, Y., Glasser, F., Enjalbert, F., Ferlay, A., and Schmidely, P., Recent data on the effects of feeding factors on cow milk fatty acid composition. *Sciences des Aliments*, **2008**. 28(1-2): p. 156-167.
44. van Arendonk, J.A.M., van Valenberg, H.J.F., and Bovenhuis, H., 8 - exploiting genetic variation in milk-fat composition of milk from dairy cows, in *Improving the*

- safety and quality of milk*, M.W. Griffiths, Editor **2010**, Woodhead Publishing. p. 197-222.
45. Kelly, A.L. and Bach Larsen, L., 1 - milk biochemistry, in *Improving the safety and quality of milk*, M.W. Griffiths, Editor **2010**, Woodhead Publishing. p. 3-26.
 46. Harstad, O.M. and Steinshamn, H., 9 - cows' diet and milk composition, in *Improving the safety and quality of milk*, M.W. Griffiths, Editor **2010**, Woodhead Publishing. p. 223-245.
 47. Schuck, P., Milk and milk products | microbiology of dried milk products, in *Encyclopedia of food microbiology (second edition)*, C.A. Batt and M.L. Tortorello, Editors. **2014**, Academic Press: Oxford. p. 738-743.
 48. Motarjemi, Y., Moy, G.G., Jooste, P.J., and Anelich, L.E., Chapter 5 - milk and dairy products, in *Food safety management*, Y. Motarjemi and H. Lelieveld, Editors. **2014**, Academic Press: San Diego. p. 83-117.
 49. Fox, P.F., Cheese | overview, in *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)*, J.W. Fuquay, Editor **2011**, Academic Press: San Diego. p. 533-543.
 50. Rivas, J., Prazeres, A.R., Carvalho, F., and Beltrán, F., Treatment of cheese whey wastewater: Combined coagulation - flocculation and aerobic biodegradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(13): p. 7871-7877.
 51. Brito, P.S.D., Review of cheese whey recovery technologies, in *Recycling: Technological systems, management practices and environmental impact***2013**. p. 119-144.
 52. Castelli, H. and du Vale, L., Handbook on cheese: Production, chemistry and sensory properties. Handbook on cheese: Production, chemistry and sensory properties**2013**. 1-613.
 53. Kosseva, M.R., Chapter 3 - sources, characterization, and composition of food industry wastes, in *Food industry wastes*, M.R. Kosseva and C. Webb, Editors. **2013**, Academic Press: San Diego. p. 37-60.
 54. Gernigon, G., Schuck, P., Jeantet, R., and Burling, H., Whey processing | demineralization, in *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)*, J.W. Fuquay, Editor **2011**, Academic Press: San Diego. p. 738-743.
 55. Gorini, D., Choubert, J.M., Le Pimpec, P., and Heduit, A., Concentrations and fate of sugars, proteins and lipids during domestic and agro-industrial aerobic treatment. *Water Science and Technology*, **2011**. 63(8): p. 1669-1677.
 56. Kosseva, M.R., Chapter 8 - use of immobilized biocatalyst for valorization of whey lactose, in *Food industry wastes*, M.R. Kosseva and C. Webb, Editors. **2013**, Academic Press: San Diego. p. 137-156.
 57. Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., and Domingues, L., Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, **2010**. 28(3): p. 375-384.
 58. Das, R., Dutta, S., and Bhattacharjee, C., Separation of whey protein and recovery of lactose from whey by ultrafiltration. *Journal of the Institution of Engineers (India): Chemical Engineering Division*, **2009**. 90(SEPT): p. 37-42.

59. Boland, M., 3 - whey proteins, in *Handbook of food proteins*, G.O. Phillips and P.A. Williams, Editors. **2011**, Woodhead Publishing. p. 30-55.
60. Urschel, K.L. and Lawrence, L.M., 6 - amino acids and protein, in *Equine applied and clinical nutrition*, R.J. Geor, P.A. Harris, and M. Coenen, Editors. **2013**, W.B. Saunders. p. 113-135.
61. Michaelidou, A. and Steijns, J., Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides. *International Dairy Journal*, **2006**. 16(11): p. 1421-1426.
62. Meziane, M., Production de substances anti-microbiennes par immobilisation de souches de bactéries lactiques sur pouzzolane, in *Thèse de Magister, Dpt Biologie* **2008**, UHBC.
63. Mondragón-Parada, M.E., Nájera-Martínez, M., Juárez-Ramírez, C., Galíndez-Mayer, J., Ruiz-Ordaz, N., and Cristiani-Urbina, E., Lactic acid bacteria production from whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2006**. 134(3): p. 223-232.
64. Carvalho, F., Prazeres, A.R., and Rivas, J., Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, **2013**. 445-446: p. 385-396.
65. Söğüt, O.Ö., Kipçak, E., and Akgün, M., Treatment of whey wastewater by supercritical water oxidation. *Water Science and Technology*, **2011**. 63(5): p. 908-916.
66. Frigon, J.C., Breton, J., Bruneau, T., Moletta, R., and Guiot, S.R., The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. *Bioresource Technology*, **2009**. 100(18): p. 4156-4163.
67. Güven, G., Perendeci, A., and Tanyolaç, A., Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, **2008**. 157(1): p. 69-78.
68. Udeigwe, T.K. and Wang, J.J., Biochemical oxygen demand relationships in typical agricultural effluents. *Water, Air, and Soil Pollution*, **2010**. 213(1-4): p. 237-249.
69. Mora, R.H., MacHarg, T., Gundarlahalli, J., Holbrook, H., Macbeth, T.W., and Schiff, P. Evaluation of whey powder for enhanced bioremediation of tce in a high-sulfate, fractured-bedrock aquifer. in *Battelle Press - 9th International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium 2007*. **2007**.
70. Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Desobry, S., and Banon, S., Dairy powder rehydration: Influence of protein state, incorporation mode, and agglomeration. *Journal of Dairy Science*, **2007**. 90(2): p. 570-581.
71. Vega, C. and Roos, Y.H., Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like emulsions - compositional considerations. *Journal of Dairy Science*, **2006**. 89(2): p. 383-401.
72. Candow, D.G., Burke, N.C., Smith-Palmer, T., and Burke, D.G., Effect of whey and soy protein supplementation combined with resistance training in young adults. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, **2006**. 16(3): p. 233-244.
73. Liu, C., Hu, B., Chen, S., and Glass, R.W., Utilization of condensed distillers solubles as nutrient supplement for production of nisin and lactic acid from whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2007**. 137-140(1-12): p. 875-884.

74. Beresford, T.P., Lactic acid bacteria | citrate fermentation by lactic acid bacteria, in *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)*, J.W. Fuquay, Editor **2011**, Academic Press: San Diego. p. 166-172.
75. Büchl, N.R. and Seiler, H., Yeasts and molds | yeasts in milk and dairy products, in *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)*, J.W. Fuquay, Editor **2011**, Academic Press: San Diego. p. 744-753.
76. Kumar, M.N., Gialleli, A.I., Masson, J.B., Kandyli, P., Bekatorou, A., Koutinas, A.A., and Kanellaki, M., Lactic acid fermentation by cells immobilised on various porous cellulosic materials and their alginate/poly-lactic acid composites. *Bioresource Technology*, **2014**.
77. Ramchandran, L., Sanciolo, P., Vasiljevic, T., Broome, M., Powell, I., and Duke, M., Improving cell yield and lactic acid production of lactococcus lactis ssp. Cremoris by a novel submerged membrane fermentation process. *Journal of Membrane Science*, **2012**. 403-404: p. 179-187.
78. Agarwal, L., Dutt, K., Meghwanshi, G.K., and Saxena, R.K., Anaerobic fermentative production of lactic acid using cheese whey and corn steep liquor. *Biotechnology Letters*, **2008**. 30(4): p. 631-635.
79. Schepers, A.W., Thibault, J., and Lacroix, C., Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized lactobacillus helveticus in a two-stage process: Model and experiments. *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**. 38(3-4): p. 324-337.
80. Kim, H.O.K., Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S., and Ryu, H.W., Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of lactobacillus sp. Rky2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2006**. 131(1-3): p. 694-704.
81. Koutinas, A.A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A., and Bosnea, L.A., Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*, **2009**. 100(15): p. 3734-3739.
82. Magueijo, V., Minhalma, M., Queiroz, D., Geraldes, V., Macedo, A., and de Pinho, M.N., Reduction of wastewaters and valorisation of by-products from "serpa" cheese manufacture using nanofiltration, in *Water Science and Technology* **2005**. p. 393-399.
83. Bouraqadi, A.I., Extraction par solvant: Étude et modélisation du système tributylphosphate-acides monocarboxyliques **2006**.
84. Nout, M.J.R., Food technologies: Fermentation, in *Encyclopedia of food safety*, Y. Motarjemi, Editor **2014**, Academic Press: Waltham. p. 168-177.
85. Walker, G.M., Fermentation (industrial) | media for industrial fermentations, in *Encyclopedia of food microbiology (second edition)*, C.A. Batt and M.L. Tortorello, Editors. **2014**, Academic Press: Oxford. p. 769-777.
86. Erickson, L.E., Bioreactors, in *Encyclopedia of microbiology (third edition)*, M. Schaechter, Editor **2009**, Academic Press: Oxford. p. 206-211.
87. Harada, Y., Sakata, K., Sato, S., and Takayama, S., Chapter 1 - fermentation pilot plant, in *Fermentation and biochemical engineering handbook (third edition)*, H.C. Vogel and C.M. Todaro, Editors. **2014**, William Andrew Publishing: Boston. p. 3-15.

88. Chisti, Y. and Moo-Young, M., Bioreactors, in *Encyclopedia of physical science and technology (third edition)*, R.A. Meyers, Editor **2003**, Academic Press: New York. p. 247-271.
89. Gabardo, S., Rech, R., and Ayub, M.A.Z., Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: Fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2012**. 87(8): p. 1194-1201.
90. Liu, S., Chapter 4 - batch reactor, in *Bioprocess engineering*, S. Liu, Editor **2013**, Elsevier: Amsterdam. p. 141-176.
91. Wold, S., Kettaneh-Wold, N., MacGregor, J.F., and Dunn, K.G., 2.10 - batch process modeling and mspc, in *Comprehensive chemometrics*, S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak, Editors. **2009**, Elsevier: Oxford. p. 163-197.
92. Liu, S., Chapter 13 - fed-batch cultivation, in *Bioprocess engineering*, S. Liu, Editor **2013**, Elsevier: Amsterdam. p. 663-694.
93. Srivastava, A.K. and Gupta, S., 2.38 - fed-batch fermentation – design strategies, in *Comprehensive biotechnology (second edition)*, M. Moo-Young, Editor **2011**, Academic Press: Burlington. p. 515-526.
94. Towler, G. and Sinnott, R., Chapter 15 - design of reactors and mixers, in *Chemical engineering design (second edition)*, G. Towler and R. Sinnott, Editors. **2013**, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 631-751.
95. Doran, P.M., Chapter 14 - reactor engineering, in *Bioprocess engineering principles (second edition)*, P.M. Doran, Editor **2013**, Academic Press: London. p. 761-852.
96. Dochain, D., 10 - advanced methods for the control of food processes: The case of bioconversion in a fed-batch reactor, in *Robotics and automation in the food industry*, D.G. Caldwell, Editor **2013**, Woodhead Publishing. p. 226-264.
97. Hewitt, C.J. and Nienow, A.W., The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes, in *Advances in applied microbiology*, S.S. Allen I. Laskin and M.G. Geoffrey, Editors. **2007**, Academic Press. p. 105-135.
98. Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire**2008**: Lavoisier.
99. Hygis, N., Hygiène hospitalière**1998**: PUL.
100. Florence, A.C.R., Da Silva, R.C., Do Espírito Santo, A.P., Gioielli, L.A., Tamime, A.Y., and De Oliveira, M.N., Increased cla content in organic milk fermented by bifidobacteria or yoghurt cultures. *Dairy Science and Technology*, **2009**. 89(6): p. 541-553.
101. Liaqat, I., An overview of biofilm formation, properties and control, in *New developments in cell research***2012**, Nova Science Publishers, Inc. p. 45-59.
102. Karel, S.F., Libicki, S.B., and Robertson, C.R., The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, **1985**. 40(8): p. 1321-1354.
103. Willaert, R., De Backer, L., and V. Baron, G., Modelling the immobilisation of cells in a packed bed of porous carriers, in *Progress in Biotechnology***1996**. p. 154-161.
104. Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., and Koutinas, A.A., Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, **2004**. 21(4): p. 377-397.

105. Verbelen, P.J., De Schutter, D.P., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., and Delvaux, F.R., Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, **2006**. 28(19): p. 1515-1525.
106. Nedovi, V. and Willaert, R., Applications of cell immobilisation biotechnology**2006**: Springer.
107. Alloue, W.A.M., Destain, J., El Medjoub, T., Ghalfi, H., Kabran, P., and Thonart, P., Comparison of yarrowia lipolytica lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2008**. 150(1): p. 51-63.
108. Accolas, J.P., Arnoux, M., Bourgeois, C.M., and Larpent, J.P., Microbiologie alimentaire: Tome 2, aliments fermentés et fermentations alimentaires**1996**: Tec & Doc Lavoisier.
109. Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A., Microbiologie**2003**: De Boeck.
110. Redon, E., Loubiere, P., and Cocaïgn-Bousquet, M., Transcriptome analysis of the progressive adaptation of lactococcus lactis to carbon starvation. *Journal of Bacteriology*, **2005**. 187(10): p. 3589-3592.
111. Anselmetti, D., Single cell analysis: Technologies and applications**2009**: Wiley.
112. de Roissart, H. and Luquet, F., Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques**1994**: Lorica.
113. Djafer, A., Kouadri Moustefai, S., Iddou, A., and Si Ali, B., Study of bimaicid dye removal from aqueous solution: A comparative study between adsorption on pozzolana, bentonite, and biosorption on immobilized anaerobic sulfate-reducer cells. *Desalination and Water Treatment*, **2013**.
114. Sánchez de Rojas Gómez, M.I. and Frías Rojas, M., 4 - natural pozzolans in eco-efficient concrete, in *Eco-efficient concrete*, F. Pacheco-Torgal, et al., Editors. **2013**, Woodhead Publishing. p. 83-104.
115. Woodson, R.D., Chapter 2 - concrete materials, in *Concrete portable handbook*, R.D. Woodson, Editor **2012**, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 5-18.
116. Rodríguez, O., Kacimi, L., López-Delgado, A., Frías, M., and Guerrero, A., Characterization of algerian reservoir sludges for use as active additions in cement: New pozzolans for eco-cement manufacture. *Construction and Building Materials*, **2013**. 40(0): p. 275-279.
117. Alslaibi, T.M., Abustan, I., Ahmad, M.A., and Foul, A.A., Microwave irradiated and thermally heated olive stone activated carbon for nickel adsorption from synthetic wastewater: A comparative study. *AIChE Journal*, **2014**. 60(1): p. 237-250.
118. Alaya, M.N., Hourieh, M.A., Youssef, A.M., and El-Sejarah, F., Adsorption properties of activated carbons prepared from olive stones by chemical and physical activation. *Adsorption Science and Technology*, **2000**. 18(1): p. 27-42.
119. Kissin, Y.V., Polyethylene, in *Polyethylene*, Y.V. Kissin, Editor **2013**, Hanser. p. I-XI.
120. Casu, S., Crispino, N.A., Farina, R., Mattioli, D., Ferraris, M., and Spagni, A., Wastewater treatment in a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, **2012**. 47(2): p. 204-209.

121. Pigeon, P.E., Sheldon Knapp, P.E., Eric Blumenstein, P.E., and Pettinger, D., A slice of wastewater treatment success. *Water and Wastes Digest*, **2011**. 51(9).
122. García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A.E., and Bárzana, E., Single cell protein | yeasts and bacteria, in *Encyclopedia of food microbiology (second edition)*, C.A. Batt and M.L. Tortorello, Editors. **2014**, Academic Press: Oxford. p. 431-438.
123. Pasztor, I., Thury, P., and Pulai, J., Chemical oxygen demand fractions of municipal wastewater for modeling of wastewater treatment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **2009**. 6(1): p. 51-56.
124. Vijayabhanu, R. and Radha, V. Statistical normalization techniques for the prediction of cod level for an anaerobic wastewater treatment plant. in *ACM International Conference Proceeding Series*. **2012**.
125. Jenkins, D., The analysis of nitrogen forms in waters and wastewaters, in *Proceedings of the conference on nitrogen as a water pollutant*, S.H. Jenkins, Editor **2013**, Pergamon. p. 31-53.
126. Jørgensen, S.E., New method for removal of nitrogen from waste water, in *Proceedings of the conference on nitrogen as a water pollutant*, S.H. Jenkins, Editor **2013**, Pergamon. p. 721-729.
127. Bolzonella, D., Pavan, P., Battistoni, P., and Cecchi, F., Anaerobic co-digestion of sludge with other organic wastes and phosphorus reclamation in wastewater treatment plants for biological nutrients removal, in *Water Science and Technology* **2006**. p. 177-186.
128. Environmental protection agency, us, in *Encyclopedia of toxicology (third edition)*, P. Wexler, Editor **2014**, Academic Press: Oxford. p. 387-388.
129. Eden, R., Enterobacteriaceae, coliforms and e. Coli | classical and modern methods for detection and enumeration, in *Encyclopedia of food microbiology (second edition)*, C.A. Batt and M.L. Tortorello, Editors. **2014**, Academic Press: Oxford. p. 667-673.
130. Soupioni, M., Whey lactose fermentation by kefir immobilized on agro-industrial wastes, in *Lactose: Structure, food industry applications and role in disorders* **2013**. p. 91-108.
131. Stewart, G.G., Saccharomyces | saccharomyces cerevisiae, in *Encyclopedia of food microbiology (second edition)*, C.A. Batt and M.L. Tortorello, Editors. **2014**, Academic Press: Oxford. p. 309-315.
132. Shimoi, H., Saccharomyces | saccharomyces cerevisiae (sake yeast), in *Encyclopedia of food microbiology (second edition)*, C.A. Batt and M.L. Tortorello, Editors. **2014**, Academic Press: Oxford. p. 316-321.
133. Koutinas, M., Menelaou, M., and Nicolaou, E.N., Development of a hybrid fermentation-enzymatic bioprocess for the production of ethyl lactate from dairy waste. *Bioresource Technology*, **2014**.
134. Silva, F.C., Serafim, L.S., Nadais, H., Arroja, L., and Capela, I., Acidogenic fermentation towards valorisation of organic waste streams into volatile fatty acids. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **2013**. 27(4): p. 467-476.

135. Rodríguez-Pazo, N., Vázquez-Araújo, L., Pérez-Rodríguez, N., Cortés-Diéguez, S., and Domínguez, J.M., Cell-free supernatants obtained from fermentation of cheese whey hydrolyzates and phenylpyruvic acid by *Lactobacillus plantarum* as a source of antimicrobial compounds, bacteriocins, and natural aromas. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2013**. 171(4): p. 1042-1060.
136. Fischer, J., Dos Santos Lopes, V., Galvão, C.M.A., Teodoro, J.C., Filho, U.C., and Cardoso, V.L., Utilization of cheese whey and cellulosic biomass for production of ethanol by selected fungi strain from Brazilian savannas. *Chemical Engineering Transactions*, **2013**. 32: p. 1075-1080.
137. Oleskiewicz-Popiel, P., Kádár, Z., Heiske, S., Klein-Marcuschamer, D., Simmons, B.A., Blanch, H.W., and Schmidt, J.E., Co-production of ethanol, biogas, protein fodder and natural fertilizer in organic farming - evaluation of a concept for a farm-scale biorefinery. *Bioresource Technology*, **2012**. 104: p. 440-446.
138. Nakamura, K., Shinomiya, N., Orikasa, Y., and Oda, Y., Efficient production of ethanol from saccharified crops mixed with cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* kd-15. *Food Science and Technology Research*, **2012**. 18(2): p. 235-242.
139. Guo, X., Wang, R., Chen, Y., and Xiao, D., Intergeneric yeast fusants with efficient ethanol production from cheese whey powder solution: Construction of a *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* ay-5 hybrid. *Engineering in Life Sciences*, **2012**. 12(6): p. 656-661.
140. Saraceno, A., Sansonetti, S., Calabrò, V., Iorio, G., and Curcio, S., A comparison between different modeling techniques for the production of bio-ethanol from dairy industry wastes. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **2011**. 25(4): p. 461-469.
141. Staniszewski, M., Kujawski, W., and Lewandowska, M., Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – kinetic model predictions considering glucose repression. *Journal of Food Engineering*, **2009**. 91(2): p. 240-249.
142. Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., and Iorio, G., Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, **2009**. 33(12): p. 1687-1692.
143. Ozmihci, S. and Kargi, F., Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: Effects of feed sugar concentration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2009**. 84(1): p. 106-111.
144. Ozmihci, S. and Kargi, F., Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. *Biochemical Engineering Journal*, **2008**. 42(2): p. 180-185.
145. Staniszewski, M., Kujawski, W., and Lewandowska, M., Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – kinetic model predictions. *Journal of Food Engineering*, **2007**. 82(4): p. 618-625.

146. Ozmihci, S. and Kargi, F., Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: Effects of hydraulic residence time. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **2007**. 30(2): p. 79-86.
147. Ozmihci, S. and Kargi, F., Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (cwp) solution as function of substrate and yeast concentrations. *Bioresource Technology*, **2007**. 98(16): p. 2978-2984.
148. Zafar, S. and Owais, M., Ethanol production from crude whey by *kluveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, **2006**. 27(3): p. 295-298.
149. Zhang, X.B. and Zhu, M.J., Biochemical conversion of ethanol from lignocellulose: Pretreatment, enzymes, co-fermentation, and separation, in *Biomass processing, conversion and biorefinery***2013**. p. 347-383.
150. Van Groenestijn, J.W., Abubackar, H.N., Veiga, M.C., and Kennes, C., Bioethanol, in *Air pollution prevention and control: Bioreactors and bioenergy***2013**. p. 431-463.
151. Harvey, A.P. and Lee, J.G.M., Intensification of biofuel production, in *Earth and planetary sciences***2012**. p. 205-215.

Annexes

Annexe 1 : Analyse physico-chimique

1/ Mesures in situ

1-1/ Mesure de la température, Salinité, PH, CE, Oxygène dissous

Ces paramètres sont mesurés à l'aide d'un multi paramètre modèle WTW 340i.4

Mode opératoire

- Mètre l'échantillon à analyser dans un bécher.
- Rince l'électrode avec de l'eau distillée.
- Prolonger de l'électrode d'un multi paramètre dans un bécher.
- Lire ensuite les valeurs des : température (C°), Salinité (PSU), PH, CE ($\mu\text{s}/\text{cm}$), Oxygène dissous (mg/l).



Multi paramètre modèle WTW 340i.4

1-2/ Dosage de l'ammonium

Principe de la méthode

Dans un premier temps, l'ammonium forme monochloramine avec l'hypochlorite en milieu légèrement basique. Cette dernière réagit avec le phénol en présence d'un excès l'hypochlorite pour former le bleu d'indophénol absorbant à 630 nm. La réaction est accélérée par le nitroprussiate.

Les réactifs

- ✚ **Réactifs** : Solution de phénol nitroprussiate.
- ✚ **Réactifs** : Solution alcaline d'hypochlorite

Mode opératoire

- Prendre 100 ± 5 ml d'échantillon directement dans le flacon à réaction.
- Ajouter 3,0 ml du réactif 1.
- Boucher et agiter pour bien homogénéiser.
- Ajouter sans attendre 3,0 ml du réactif 2.
- Boucher et agiter à nouveau.

- Placer immédiatement à l'abri de la lumière pendant 6 à 8 h (ou mieux pendant une nuit) à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance à 630 nm en prenant de l'eau distillée comme référence.
- Les résultats sont exprimés en mg/l à partir de la courbe d'étalonnage.

2/ Mesures en laboratoire

2-1/ Mesure de la turbidité

Réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matière non dissouts ; donc la turbidité est mesurée à l'aide d'un turbidimètre modèle WTW 430IR.

Principe de la méthode

Pour tout échantillon d'eau, la mesure de la lumière diffusée et de la lumière transmise permet la détection de matières non dissoutes, absorbons mais diffusant mal, qui passeraient inaperçues par la seule mesure de la lumière diffusée.

Cuvette d'évaluation de la transparence constituée d'une cuvette de verre incolore de 50 mm, de diamètre.

✚ Mode opératoire

- Mètre l'échantillon à analysé dans un flacon du turbidimètre de 25 ml.
- Nettoyer avec le papier hygiénique, homogénéisé bien et placer dans le turbidimètre.
- Presse entré pour lire la valeur en NTU.



Turbidimètre modèle WTW 430 IR.

2-2 / Mesure du résidu sec

Principe de la méthode

La méthode consiste est à évaporée une certaine quantité d'eau à analysée dans une capsule tarée. Le résidu desséché est ensuite pesé. La capsule est séchée et pesée avant et après la filtration.

Mode opératoire

- Pesée la capsule. Soit P1.
- Evaporation progressivement au bain de sable dans une capsule tarée 100 ml d'eau.
- Une fois toute l'eau évaporée ,porte la capsule à l'étuve à 180 C° pendant 4 heure et laisser refroidir 1/4 d'heure au dessiccateur.
- Peser immédiatement et rapidement. Soit P2.

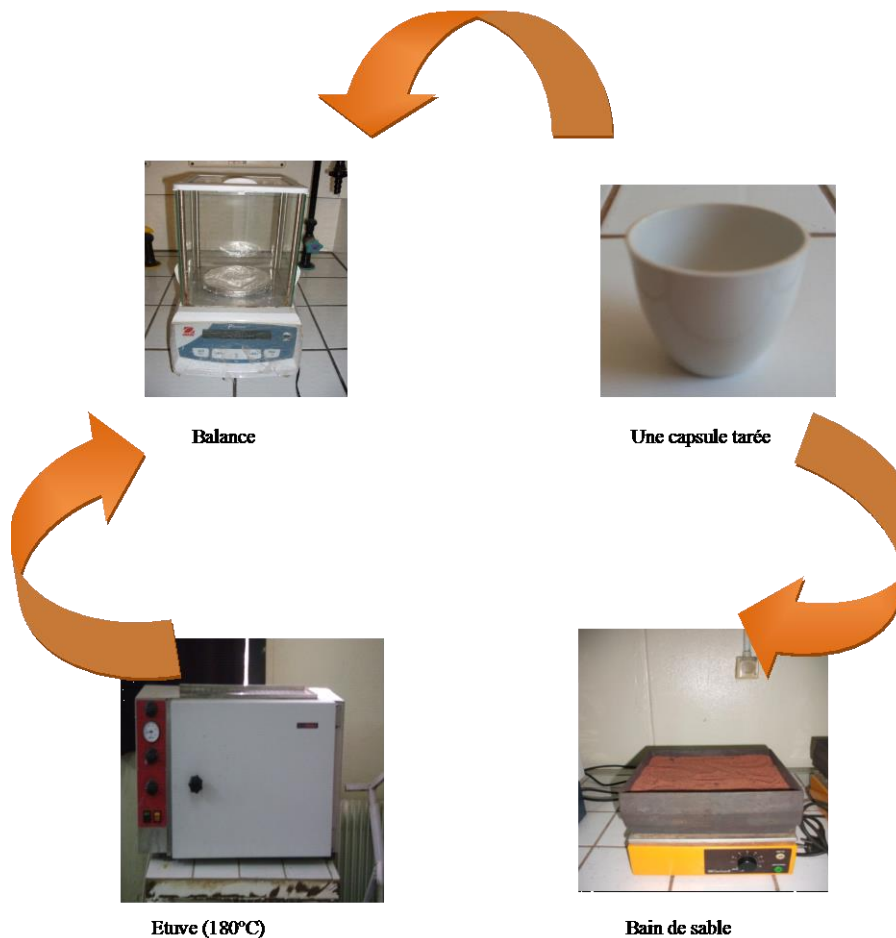
Calcule expression des résultats :

- ❖ P1 : Poids de la capsule avant filtration (*mg*).
- ❖ P2 : Poids de la capsule après filtration (*mg*).
- ❖ V : Volume filtré (*l*).

La concentration des résidus secs est donnée par l'expression :

$$[\mathbf{R\ sec}] \text{ mg/l} = \frac{\mathbf{P1-P2}}{\mathbf{v}} \cdot \mathbf{100}$$

Double pesée



Les appareils de mesure des résidus secs (RS)

2-3 / Mesure de la matière en suspension (MES)

Principe de la méthode

La méthode consiste à filtrer l'eau de l'échantillon sur membrane filtrante afin de retenir toute les particules de taille supérieur à 0,5-1 μm . le papier filtre est séchée et pesée avant et après filtration.

Mode opératoire

- Pesée les papiers filtres. Soit P1 cette mesure.
- Placer un filtre et le centre dans le dispositif de filtration.
- Homogénéisé l'échantillon, une violente agitation est nécessaire si les échantillons ont été conservés un certaine temps.
- Verser l'échantillon sur le filtre et appliquer le vide, sans créer une dépression supérieure à 2-3 bars. Puis filtrer progressivement tout le volume mesuré.
- Supprimer l'aspiration dès que le filtre est à sec.
- Mettre les boites contenant les filtres, sans le couvercle, à l'étuve à 70 C° pendant 2h ou à 105 C° pendant 1. L'étuve doit exemple de poussières.
- Laisser refroidir au dessiccateur et ne sortir les filtres que juste avant la pesée.
- Peser les papiers filtres une deuxième fois, soit P2 cette mesure.

Calcule expression des résultats

- ❖ P1 : Poids du filtre avant filtration (mg).
- ❖ P2 : Poids du filtre après filtration (mg).
- ❖ V : Volume filtré (l).

La concentration des matières en suspensions (MES) est donnée par l'expression :

$$[\text{MES}] \text{ mg/l} = \frac{\text{P1}-\text{P2}}{\text{v}} \cdot 1000 \text{ C}^\circ$$

V : Volume d'eau traitée en millilitres.

La teneur en milligrammes de matières totales en suspension par litre d'eau est donnée par l'expression :

$$(\text{M2} - \text{M1}) \frac{1000}{\text{v}}$$

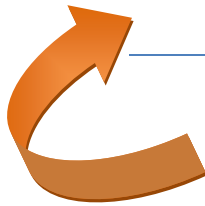
Double pesée



Balance



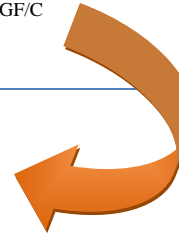
Papier Filtre GF/C



Etuve (70°C)



Pompe à vide



Les appareils de mesure de la matière en suspension (MES)

2-4 / Dosage de la matière organique

Principe de la méthode

Le dosage de la matière organique (M.O) des eaux s'effectue en déterminant la quantité d'oxygène utilisée pour la réduction du permanganate de potassium par les matières organiques d'origine animal ou végétale contenues dans une eau.

Les réactifs

➤ Réactifs 1

⊕ Acide sulfurique dilué au 1/3 à 2,2 mol/l.

➤ Réactifs2

⊕ Solution de permanganate de potassium (KMnO_4 à 20 mmol/l).

⊕ Solution de permanganate de potassium (KMnO_4 à 2 mmol/l).

⊕ Solution de d'oxalate de sodium à 0,1N.

Mode opératoire

L'échantillon renferme des matières en suspension, il faut les éliminer par décantation ou filtration.

Mesure en milieu acide

- Prendre 100 ml d'eau à analyser dans un ballon conique de 500 ml de capacité.
- Ajouter 20 ml acide sulfurique dilué à (d) 2,2 M puis 10 ml de la solution permanganate de potassium à 2 mmol/l.
- Porter le mélange à l'ébullition douce sur une plaque chauffante pendant 10 minutes exactement (*le temps est compté à partir du moment où des bulles partant du fond du ballon viennent éclater à la surface du liquide*)
- Après 10 min ajouté 20 ml de NaC_2O_4 à 5 mmol/l.

N.B : la décoloration doit être complète. Il est nécessaire d'ajouter encore 5 ou 10 ml de la solution ferreuse.

- Titrer après décoloration à chaud, la solution avec la solution permanganate de potassium jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle (persistance pendant 1 minute), soit un volume « N ».

- Refaire avec un essai témoin en prenant 200 ml d'eau distillée, soit un volume « n » de permanganate de potassium.

Expression des résultats

L'oxygène cédé par le permanganate de potassium, exprimé en milligramme par litre, est donné par l'expression suivante :

$$(N-n) \times 100/200 = (N-n) / 2$$

2-5/ Mesure de la DBO₅

La demande biologique en oxygène (DBO₅) est mesurée à l'aide d'un DBO mètre model OXI TOP SI 12 WTW.

Mode opératoire

- Rincer le flacon avec l'échantillon. Remplir avec précaution.
- Mesurer exactement la quantité souhaitée d'échantillon.
- Mettre le barreau magnétique dans le flacon.
- Insérer le godet caoutchouc dans le goulot du flacon.
- Mettre deux pastilles de soude dans le godet caoutchouc à l'aide d'une pince.
(Attention les pastilles ne doivent jamais aller dans l'échantillon).
- Visser l'OXI TOP directement sur le flacon échantillon (de manière étanche).
- Lancer la mesure appuyée sur S et M simultanément (2 secondes) jusqu'à ce que l'afficheur indique 00.
- Maintenir le flacon de mesure avec l'OXI TOP à 20 C° pendant 5 jours (l'échantillon est agité en continu pendant 5 jours). Pour connaître la valeur courante appuyer sur la touche M.
- Lecture des valeurs mémorisée à la fin des 5 jours.

Rappel des valeurs mémorisées : Presser S jusqu'à la valeur mesurée s'affiche (1 seconde).

Passer au jour suivant en pressant à nouveau la touche S (5 seconde).



DBO mètre type OXI TOP SI 12

2-6/ Mesure de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)

Principe de la méthode

Oxydation des matières organiques et minérales contenues dans un échantillon par un excès de bichromate de potassium, en milieu acide et à ébullition sous reflux pendant 2 heures, en présence de sulfate de mercure II (complexant des chlorures) et de sulfate d'argent (catalyseur), puis dosage de l'excès de bichromate par une solution de sulfate de fer II et d'ammonium (sel de Mohr)

Mode opératoire

La méthode ST-DCO utilise moins de réactifs que la méthode DCO traditionnelle. Elle s'avère donc moins polluante.

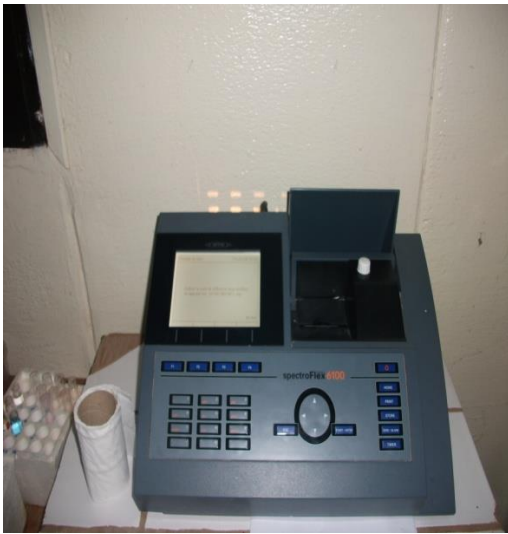
Pour préparer en laboratoire des tubes contenant le mélange réactionnel dans la gamme de mesure de 0 à 1000 mg/l, on introduira successivement avec précautions :

- + 0,05 ml \pm 0,01 ml d'une solution de dichromate de potassium à 0,1 mol/l.
- + 0,20 \pm 0,01 ml d'une solution de sulfate de mercure (II) à une concentration de 1,35 mol/l.
- + 2,50 \pm 0,01 ml d'une solution de sulfate d'argent à 12g/l dans de l'acide sulfurique concentré ($d=1,83$).
- + Après avoir agité avec précautions, les tubes seront fermés puis stockés. Ils pourront être conservés pendant environ 1 an à l'obscurité.
- + Ajoutez 2 ml de l'échantillon brute dans une chaque tube.

- ✚ Chauffer les tubes dans un réacteur pendant 2 heures à 148 °C Thèrmoréacteur modèle WTW.CR2200.
- ✚ Après laisser refroidir dans le réacteur jusqu'à la diminution de la température à 50 °C.
- ✚ La mesure de concentration s'effectuè à l'aide d'un spectrophotomètre modèle WTW.

Résultat

Les échantillons contenant de faible teneurs en matières organiques et donc ayant une DCO faible pourront être analysée plus précisément, toujours par colorimètre, mais en mesurant la couleur jaune du chrome (VI) résiduel (dichromate de potassium non consommé pour l'oxydation) et non plus la couleur verte du chrome (III) formé par réduction. Le Cr (VI) absorbe à 440 nm, alors que le Cr (III) est dosé à 600 nm.



Spectrophotomètre modèle WTW.



Thèrmoréacteur modèle WTW.CR2200.

2-7/ Dosage de l'azote total

Le principe de la méthode

Les ions nitrite forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide ($pH < 2$). Puis le diazoïque avec N-naphtyl-éthylène diamine pour former le colorant. Ce colorant rose est absorbé à la longueur d'onde de 543 nm.

Les réactifs

- Solution de minéralisation
- Solution tampon
- Solution de chlorure d'ammonium concentré
- Solution de chlorure d'ammonium dilué ($g.l^{-1}$)
 - ✚ Réactif 1 : Solution de sulfanilamide.
 - ✚ Réactif 2 : Solution de n-naphtyl-éthylène diamine.

Mode opératoire

- Dans un flacon, mettre 10 ml de l'échantillon (effectuer une dilution : 5 ml de l'échantillon brut + 5 ml d'eau distillée) ;
- Ajouter 15 ml de la solution de minéralisation ;
- Boucher les flacons et chauffer dans un bain de sable à 120 °C pendant 30 min.
- Laisser l'échantillon se refroidir;
- Après refroidissement, prélever 5 ml de l'échantillon et le mettre dans une fiole de 200 ml ;
- Ajouter 5 ml de la solution tampon ;
- Compléter le volume à 200 ml avec de l'eau distillée et homogénéiser;
- Prendre 50 ml et ajouter 1 ml de la solution de chlorure d'ammonium concentré ;
- Verser environ 15 ml de la solution de chlorure d'ammonium dilué dans la colonne et laisser écouler ;
- Verser alors l'échantillon dans la colonne ;
- Rincer une éprouvette graduée et recueillir 25 ml de l'effluent sortant de la colonne ;
- Ajouter aussitôt 0.5 ml de réactif 1 et homogénéiser ;
- Laisser reposer entre 2 et 8 min ;
- Ajouter 0.5 ml du réactif 2 et homogénéiser ;
- Attendre au moins 10 min mais pas plus de 2 heures ;
- Mesurer l'absorbance en cuves de 1cm à 543 nm par rapport à l'eau distillée .soit A cette mesure ;
- Les résultats sont exprimés en $mg.l^{-1}$ à partir de la courbe d'étalonnage.

2-8/ Dosage des nitrites

Principe de la méthode

Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide ($PH < 2$). Puis le diazoïque avec N-naphtyl-éthylènediamine pour former le colorant. Ce colorant rose absorbe à la longueur d'onde de 543 nm.

Les réactifs

- ✚ **Réactifs** : Solution de sulfanilamide.
- ✚ **Réactifs** : Solution de N-naphtyl-éthylènediamine (NED).

Mode opératoire

- Rincer une éprouvette de 50 ml avec l'eau à analyser et y introduire 50 ± 1 ml de l'échantillon.
- Ajouter 1,0 ml réactif 1 mélangé. Laisser reposer 2 à 8 min.
- Ajouter 1,0 ml réactif 2 mélangé à nouveau.
- Attendre au moins pas plus de 2 heures.
- Mesure l'absorbance en cuve de 10 cm de trajet optique à longueur d'onde de 543 nm en prenant de l'eau distillée comme référence : soit A cette valeur.
- Les résultats sont exprimés en mg/l à partir de la courbe d'étalonnage.

2-9/ Dosage des nitrates

Principe de la méthode

Les méthodes retenue quasi universellement est celle qui est fondée sur le dosage des ions NO_2^- obtenue par réduction quantitative (>95 %) des ions NO_3^- . On mesure donc en réalité la somme des concentrations des ions NO_2^- et NO_3^- . Par déduction de la concentration en nitrite déterminée sans réduction on obtient la concentration en nitrate.

Les réactifs

- ✚ **Réactifs** : Solution de sulfanilamide.
- ✚ **Réactifs** : Solution de N-naphtyl-éthylènediamine (NED).

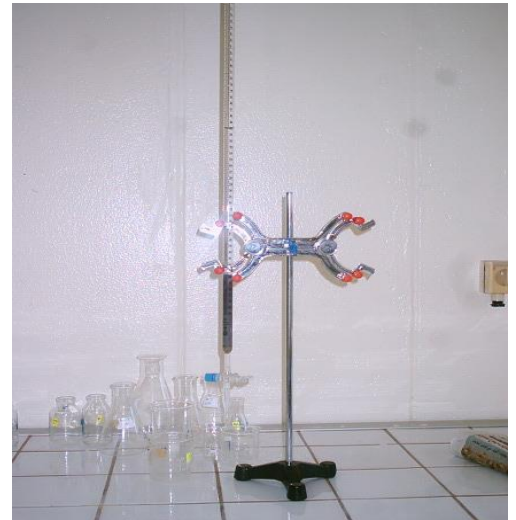
Solution concentrée de chlorure d'ammonium (250 g/l).

Mode opératoire

- Prendre 100 ± 2 ml d'échantillon, ajouter 2,0 ml de la solution concentrée de chlorure d'ammonium et mélanger correctement.
- Verser environ 5 ml cette solution dans la colonne et les laisser écouler : cette procédure diminue considérablement les risques d'interférences entre échantillon successifs.
- Verser alors le reste de l'échantillon.
- Rejeter les 30 premiers millilitres.
- Rincer une éprouvette graduée de 50 ml avec quelques millilitres de la solution

Sortant de la colonne et recueillir 50 ml de l'effluent.

- Ajouter aussitôt 1.0 ml de réactif 1 et mélanger.
- Laisser reposer 2 à 8 min.
- Ajouter 1. ml du réactif 2 .mélanger .
- Attendre au moins 10 min mais pas plus de 2 heures.
- Mesuré l'absorbance en cuves de 1cm à 543nm par rapport à l'eau distillée.



- Les résultats sont exprimés en mg/l à partir de la courbe d'étalonnage.

2-10/ Dosage des phosphore totale dissous (PTD)

Le principe de la méthode

Les ions phosphate réagissent avec le molybdate d'ammonium en présence d'antimoine (III) pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique : cette forme réduite de coloration bleu a un maximum d'absorption à 885 nm.

Les réactifs

- ✚ Solution de digestion
- ✚ Mélange des réactifs :
 - ❖ 10 ml de Solution de molybdate d'ammonium.
 - ❖ 25 ml d'acide sulfurique 2,5 mol/l.
 - ❖ 10 ml de Solution d'acide ascorbique.
 - ❖ 5 ml de Solution d'oxytartrate de potassium et d'antimoine

Mode opératoire

- Dans un flacon, mettre 10 ml de l'échantillon (effectuer une dilution : 5 ml de l'échantillon brut + 5 ml d'eau distillée) ;
- Ajouter 1.5 ml de la solution de digestion ;

- Boucher les flacons avec un papier aluminium déposer dans un bain sable à 120°C pendant 30 min.
- Laisser l'échantillon se refroidir;
- Ajouter 1 ml du mélange des réactifs et homogénéiser aussitôt ;
- Attendre 5 min et mesurer l'absorbance à 885 nm par rapport à l'eau distillée.
- Les résultats sont exprimés en mg/l à partir de la courbe d'étalonnage.

2-11/ Dosage du Ortho phosphates PO_4^{3-}

Le principe de la méthode

Les ions phosphate réagissent avec le molybdate d'ammonium en présence d'antimoine (III) pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique : cette forme réduite de coloration bleu a un maximum d'absorption à 885nm.

Les réactifs

- ❖ Solution de molybdate d'ammonium.
- ❖ Acide sulfurique 2,5 mol/l.
- ❖ Solution d'acide ascorbique.
- ❖ Solution d'oxotarate de potassium et d'antimoine.
- ❖ Mélange des réactifs :
 - ✓ 100 ml de solution de molybdate d'ammonium.
 - ✓ 250 ml acide sulfurique 2,5 mol/l.
 - ✓ 100 ml solution d'acide ascorbique.
 - ✓ 50 ml solution d'oxotarate de potassium et d'antimoine.

Mode opératoire

- Préparer le mélange réactif.
- Mesurer 100 ml d'échantillon.
- Ajouter 10 ml de mélange réactif et homogénéiser aussitôt.
- Attendre 5 mn et mesurer l'absorbance à 885 nm par rapport à l'eau distillée.
- Les résultats sont exprimés en mg/l à partir de la courbe d'étalonnage.

2-12/ Dosage du poly phosphore P_2O_5

Le principe de la méthode

Les ions phosphate réagissent avec le molybdate d'ammonium en présence d'antimoine (III) pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique : cette forme réduite de coloration bleu a un maximum d'absorption à 885 nm.

Les réactifs

- ✚ Solution d'acide sulfurique (20%)
- ✚ Solution NaOH (12%)

❖ Mélange des réactifs :

- 10 ml de Solution de molybdate d'ammonium.
- 25 ml d'acide sulfurique 2,5 mol/l.
- 10 ml de Solution d'acide ascorbique.
- 5 ml de Solution d'oxytartrate de potassium et d'antimoine

Mode opératoire

- Dans un flacon, mettre 10 ml de l'échantillon filtré ;
- Ajouter la solution d'acide sulfurique 20% ;
- Boucher avec le papier cellophane et placer dans le bain de sable pendant 30 min ;
- Laisser refroidir puis ajuster le pH avec la solution de NaOH à l'aide d'une burette et un multi paramètre jusqu'à la valeur du pH ~ 2 ;
- Mener le volume à 10 ml avec de l'eau distillé ;
- Ajouter 1 ml du mélange des réactifs et homogénéiser aussitôt ;
- Attendre 5 min et mesurer l'absorbance à 885 nm par rapport à l'eau distillée.
- Les résultats sont exprimés en mg/l à partir de la courbe d'étalonnage.

2-13/ Dosage de sodium et de potassium par photométrie de la flamme

La photométrie de la flamme est un des procédés les plus rapides et sensibles connus aujourd'hui pour le dosage des éléments alcalins et alcalino - terreux.

Les éléments à analyser (sodium, potassium lithium, calcium etc. ...) sont généralement sous forme de sels. L'analyse se fait en partant de leurs solutions.

Mode opératoire

Appareil Dr LANGE (JENWAY)

Il faut le suivre étape par étape :

- Allumer l'appareil à l'aide du bouton vert (Power).
- Ouvrir le robinet de la bouteille du gaz.
- Allumer la flamme à l'aide du bouton noir "IGNITION" sans lâcher le doigt jusqu'à l'affichage "FLM" en rouge sur l'écran.
- Pipeter de l'eau distillée remplie dans une cuvette.
- Optimiser la flamme si elle est jaune à l'aide du bouton " fuel " jusqu'à ce que la couleur devienne bleue violacée.
- Optimiser à zéro à l'aide du bouton "Blank".
- Laisser se stabiliser 5 à 10 minutes.
- Une fois qu'elle se stabilise à zéro, activer la cuvette d'eau distillée et la remplacer par une autre cuvette remplie par une solution étalon de Na⁺ ou du K⁺ à 10 mg/l.
- Optimiser à 10 mg/l à l'aide du bouton "FINE"
- Retirer la cuvette remplie par une solution étalon de "Na⁺" ou de "K⁺" à 10 mg/l et la remplacer par une cuvette remplie d'eau distillée et vérifier si l'écran affiche zéro (0.000).

- Retirer la cuvette remplie par l'eau distillée et la remplacer par une cuvette remplie par une solution étalon de "Na⁺" ou de "K⁺" à 10 mg/l et vérifier si l'écran affiche (10).
- Retirer la cuvette et la remplacer par une autre cuvette remplie d'eau distillée.
- A la fin, passer aux échantillons inconnus jusqu'à ce que la valeur affichée sur l'écran soit stable (3 essais pour chaque échantillon).
- A la fin du dosage et par mise de la sécurité, il faut toujours fermer la bouteille de gaz propane en premier lieu ensuite l'appareil et la pompe.

Préparation des étalons

- ✚ Solution fille de sodium (Na⁺) à 10 mg/l de la solution mère de Na Cl à 1000 mg/l dans 100 ml d'eau distillée.
- ✚ (2,54 mg de Na Cl 1000cc d'H₂O distillée : solution mère de Na⁺ à 1 g/l).
- ✚ Solution fille de potassium (K⁺) à 10 mg/l : 1 ml de la solution mère de Kcl à 1 g/l dans 100 ml d'eau distillée.
- ✚ (1.91 g de Kcl 1000 cc d'H₂O distillée : solution mère de K⁺ à 1 g/l).

Expression des résultats

Le résultat est donné directement en mg/l.

Remarque

Avant de doser le sodium (Na⁺) il faut toujours vérifier les valeurs de la " conductivité " car cette dernière a un rapport proportionnel à la dilution, c'est à dire plus que la conductivité est grande plus que la dilution du Na⁺ est grande et vice versa. Alors pour le cas de K⁺ on ne fait pas la dilution sauf que la conductivité est grande.

2-14/ Dosage des sulfates (SO₄²⁻)

Le principe de la méthode

Les sulfates sont précipités en milieu chlorhydrique à l'état de sulfate de baryum. Le précipité ainsi obtenu est stabilisé à l'aide d'une solution de Tween 20. Les suspensions homogènes sont mesurées au spectrophotomètre.

Les réactifs

- ❖ Solution d'aide chlorhydrique au 1/10.
- ❖ Solution de Tween 20 à 25.
- ❖ Solution sulfate de baryum stabilisé :
 - ✚ 10 g chlorure de baryum.
 - ✚ 20 ml Tween 20.
 - ✚ 100 ml l'eau distillé.

Mode opératoire

- Dans une fiole, introduire successivement.
- 50 ml de l'échantillon à analyser.

- Ajouter 1ml d'aide chlorhydrique à 1/10.
- Ajouter 5 ml de la solution sulfate de baryum stabilisé.
- Agiter et laisser reposer pendant 15 mn.
- Agiter à nouveau et passer au spectrophotomètre à la longueur d'onde 680 nm.

Remarque

- La mesure de l'absorbance s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre modèle WTW.



Spectrophotomètre modèle WTW.

2-15/ Dosage des chlorures (Cl⁻)

Titrage au nitrate d'argent avec du chromate comme indicateur (**méthode de Mohr**).

Principe de la méthode

Les chlorures sont dosés par le nitrate d'argent, en de présence chromate de potassium comme indicateur. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition d'une teinte jaune au rouge brique caractéristique du chromate d'argent.

Réactifs

- Nitrate d'argent 0,1 N
- Chromate de potassium 10 %
 - ❖ 5g Chromate de potassium(K₂CrO₄).
 - ❖ 100 ml Eau distillée.

Mode opératoire

A l'aide d'une pipette, introduire 100 ml de l'échantillon préparé dans une fiole conique de 250 ml.

Ajouter 1 ml d'indicateur chromate de potassium et titrer la solution par addition de goutte de solution nitrate d'argent jusqu'à ce que la solution prenne une couleur brun rougeâtre.

Expression des résultats

Pour une prise d'essai de 100 ml :

$Cl^- = V \times 10 \times 3,55$ donne la teneur en chlorure, exprime en milligrammes de Cl^- par litre d'eau.

2-16/ Dosage du Calcium (Ca^{2+}) Les réactifs

- ❖ EDTA Na^2 ($C_{10}H_{14}N_2O \cdot 8Na \cdot 2H_2O$).
- ❖ NaOH à 2 N.
- ❖ Murexide (puparate d'ammonium).

Mode opératoire

- Prélever 50 ml de solution à doser.
- Ajouter 3 ml de NaOH à 2 N (si l'échantillon est acidifié avec 2 ml de HNO_3 , ajouter 6 ml).
- Ajouter la murexide (quelques grains), on obtient une couleur rose bonbon.
- Titrer l'EDTA à N/50 jusqu'à passage à une couleur violet pourpre soit V cette mesure.

Expression des résultats

Pour une prise d'essais de 50 ml :

$$[Ca^{2+}] \text{ méq/l} = 0,02 \times V \times 1000 \times 5/50$$

V : Volume d'EDTA titré.

2-17/ Dosage de Mg^{2+}

Le principe de la méthode

Le manganèse est oxydé en permanganate à l'aide de persulfate d'ammonium en présence de nitrate d'argent. Le permanganate ainsi formé est dosé colorimétriquement.

- On a effectuée le dosage de ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$).
- Les concentrations de Mg^{2+} sont calculées par la formule suivante :

$$[Mg^{2+}] \text{ méq/l} = [Ca^{2+} + Mg^{2+}] - [Ca^{2+}]$$

2-18/ Dosage de $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ Les réactifs :

- ❖ EDTA Na^2 ($C_{10}H_{14}N_2O \cdot 8Na \cdot 2H_2O$).
- ❖ Tampon ammoniacal.
- ❖ Noir Eriochrome T (NET).

Mode opératoire

- Prélever 50 ml de solution à doser.
- Faire chauffer à 60 C° .
- Ajouter tampon ammoniacal.
- Ajouter Noir d'Eriochrome (quelques grains).
- Titrer l'EDTA à N/50 jusqu'à passage à une couleur bleu cobalt. Soit V cette mesure.

Expression des résultats

Pour une prise d'essais de 50 ml :

$$[\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}] \text{ m\acute{e}q/l} = 0,02 \times V \times 1000 \times 5/50.$$

2-19/ Dosage de l'azote Kjeldhal

D\text{e}termination de mati\text{e}re azot\text{e}e totale (MAT)

L'azote est dos\text{e} par la m\text{e}thode de KJELDHAL, apr\text{e}s min\text{e}ralisation, distillation et titration.

Mode op\text{e}ratoire

Min\text{e}ralisation

- ❖ Op\text{e}re sur une prise d'essai de 0,5 g de substance (selon l'importance de l'azote dans l'\text{e}chantillon).
- ❖ Introduire dans un matras de 250 ml (\text{e}viter que des particules adh\text{e}rant \text{a} la paroi).
- ❖ Ajouter environ 2 g de catalyseur (250 g de K_2SO_4 ; 250 g de CuSO_4 ; 5 g de Se) et 20 g d'acide sulfurique pur (densit\text{e} = 1,84).
- ❖ Porter le matras sur le support d'attaque et poursuivre le chauffage jusqu'\text{a} d\text{e}coloration du liquide en obtention de coloration verte stable.
- ❖ Laisser refroidir, puis ajouter peu \text{a} peu avec pr\text{e}caution l'eau distill\text{e}e jusqu'\text{a} 200 ml, en refroidissant sous un courant d'eau.
- ❖ Laisser refroidir, compl\text{e}tement.

Distillation

- ❖ Transvaser 20 ml du contenu du matras dans l'appareil distillatoire (BUCHI) avec quelques gouttes de ph\text{e}nolphtal\text{e}ine.
- ❖ Introduire, dans l'ermeneyer destin\text{e} \text{a} recueillir le distillat, 50 ml de l'acide borique (40g/l) avec quelques gouttes d'indicateur (1/4 de rouge de m\text{e}thyle \text{a} 0,2 % dans l'alcool \text{a} 95 ° + 3/4 de vert de bromocr\text{e}sol \text{a} 0,1 % dans l'alcool \text{a} 95 °).
- ❖ Verser 50 ml de lessive de soude (d= 1,33) dans le matras de l'appareil de distillation jusqu'\text{a} apparition d'une couleur rose, mettre l'appareil en marche (l'extr\text{e}mit\text{e} inf\text{e}rieure de la colonne r\text{e}frig\text{e}rante de l'appareil distillatoire doit \text{e}tre plong\text{e} dans la solution d'acide borique pour \text{e}viter les pertes.
- ❖ Laisser l'attaque se faire jusqu'\text{a} l'obtention d'un volume de distillat de 100 ml au moins.

Titrage

- ❖ Titrer par l'acide sulfurique (H_2SO_4 , N/20 ou N/50) jusqu'\text{a} le virage de couleur.
- ❖ 1 ml d' H_2SO_4 \text{a} 1N correspond 0,014 g d'N.

❖ 1 ml d'H₂SO₄ à N/20 correspond 0,0007 g d'N.

$$N(g) = X \cdot 0,0007 \cdot 100 / Y \cdot 200 \cdot Z$$

X : Descente de burette (ml).

Y : Poids de prise d'essai.

Z : Volume transvasé au BUCHI (ml)



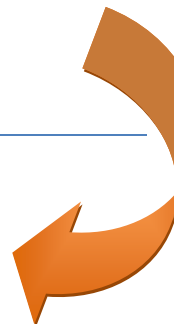
Minéralisation dans les matras



Distillateur



La burette



Les appareille de la mesure de la matière azotée totale (MAT)

2-20/ Dosage des graisses et des huiles

Principe

Les graisses sont extraites de l'échantillon acidifié à PH=5 par du trichloréthylène (CCl₄) et dosées gravimétriquement après évaporation du solvant.

Réactif

- ✚ Trichloréthylène chimiquement pur
- ✚ Acide chlorhydrique pur.

Mode opératoire

- ✓ Dans une ampoule à décanter, prélever 1 l d'eau et acidifier à PH = 5 pour hydrolyser

les savons et casser les émulsions éventuelles.

- ✓ Ajouter 100 ml CCl₄ dont 25 ml servira au rinçage du flacon ayant contenu l'échantillon.
- ✓ Agiter pendant 20 mn, puis laisser les couches se séparer.
- ✓ Soutirer la fraction aqueuse et faire couler la phase CCl₄ dans un Erlenmeyer.
- ✓ Ajouter 100 ml de CCl₄ dans la phase aqueuse et ajouter 20 ml, récupérer la phase aqueuse et mettre le CCl₄ avec le 1er mélange.
- ✓ Agiter pendant 20 mn.
- ✓ Séparer les deux phases en récupérant la phase organique dans un Erlenmeyer de

500ml.

- ✓ Recommencer l'extraction sur la phase aqueuse avec 100 ml de solvant en opérant comme ci dessus :
- + Réunir la nouvelle phase organique avec la précédente.
- + Effectuer la 3ème extraction avec 50 ml de solvant en agitant seulement pdt 10 mn.
- + Procéder à l'évaporation (le chauffage ne doit pas dépasser 70 °C)
- + Arrêter l'évaporation une fois le volume de 20 ml atteint.
- + Transvaser les 20 ml dans un petit erlenmeyer préalablement taré.
- + Rincer le grand erlenmeyer avec quelques ml de solvant.
- + Réchauffer de nouveau pendant quelques minutes.
- + Laisser refroidir au dessiccateur.
- + Peser erlenmeyer.
- + Expression des résultats
- + La différence de poids entre erlenmeyer taré et après ajout du solvant donné la teneur en matières grasses exprimée en mg/l.

Annexe 2 : Analyse microbiologique

Recherche et dénombrement des Coliformes, Coliformes thermo tolérants et *Escherichia coli* en milieu liquide.

Cette méthode de routine, consiste en la recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo tolérants et des *Escherichia coli* dans les eaux destinées à la consommation humaine, en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable (NPP).

➤ Mode opératoire

La recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo tolérants et des *Escherichia coli* dans les eaux, en milieu liquide par la technique du NPP, se fait en deux étapes consécutives :

- ✚ le test de présomption: réservé à la recherche des Coliformes,
- ✚ le test de confirmation : réservé à la recherche des Coliformes thermo tolérants et *Escherichia coli*.

➤ Test de présomption

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- ✚ 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- ✚ 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- ✚ 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham, comme l'indique le schéma n° 1.

Chassez l'air éventuellement présent dans les cloches de Durham et bien mélangé le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture

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

- ✚ Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10^e de la hauteur de la cloche),
- ✚ Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe.

Illustration

<i>Inoculum</i>	<i>Test de présomption</i>	Nombre Caractéristique
1 X 50 ml	+	1
5 X 10 ml	+	3
	+	
	+	
	-	
	-	
5 X 1 ml	+	2
	+	
	-	
	-	
	-	

Le nombre caractéristique est donc « **132** » ; ce qui correspond sur la table NPP au nombre 14. On considère alors qu'il y a 14 Coliformes par 100 ml d'eau à analyser.

➤ Test de confirmation

Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes thermo tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence *d'Escherichia coli*.

Les coliformes thermo tolérants ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais à 44°C.

Escherichia coli est un coliforme thermo tolérant qui entre autre :

- ✚ produit de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à 44°C, donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyl, ne produit pas de l'acétyl méthyl carbinol, n'utilise pas le citrate comme source unique de carbone.
- ✚ Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham, comme l'indique le schéma n°2.
- ✚ Chasser l'air éventuellement présent dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant **à la fois** :

- ✚ Un dégagement gazeux, et
- ✚ Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP en tenant compte du fait qu'*Escherichia Coli* est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

Illustration

En reprenant l'exemple précédent relatif au dénombrement des Coliformes, cela suppose que nous avons 6 tubes à repiquer à savoir :

- ❖ le flacon de BCPL D/C,
- ❖ 3 tubes sur 5 de BCPL D/C, et
- ❖ 2 tubes sur 5 de BCPL S/C

Inoculum	<i>Test de présomption</i>	Nombre Caractéristique	Test de confirmation		Nombre Caractéristique
			Gaz	Indole	
1 X 50 ml	+	1	+	+	1
5 X 10 ml	+	3	+	-	1
	+		+	+	
	+		-	+	
	-		-	-	
5 X 1 ml	+	2	-	+	1
	+		+	+	
	-		-	-	
	-		-	-	

Tableau Récapitulatif

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Coliformes fécaux est donc « **111** », ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 5.

Le résultat final sera donc de :

14 Coliformes totaux dans 100 ml d'eau à analyser
5 Coliformes fécaux dans 100 ml d'eau à analyser

Remarque

Etant donné que les Coliformes fécaux font partie des Coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

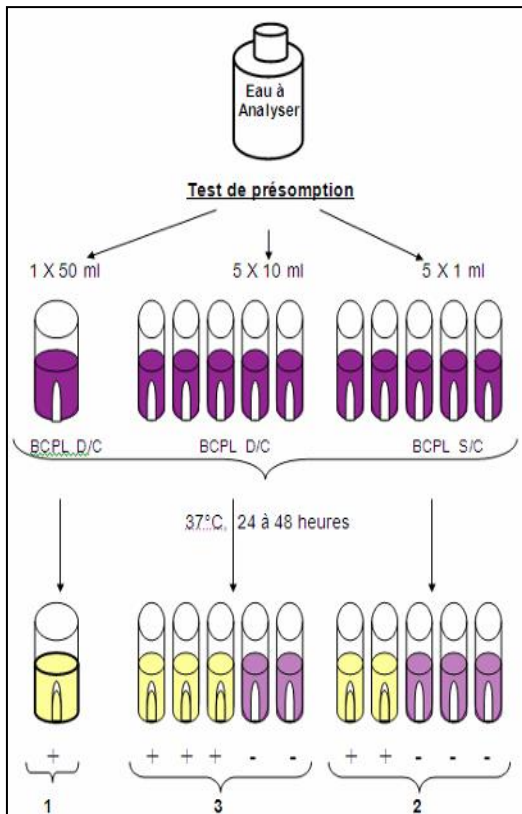


Schéma 01 : Test de présomption

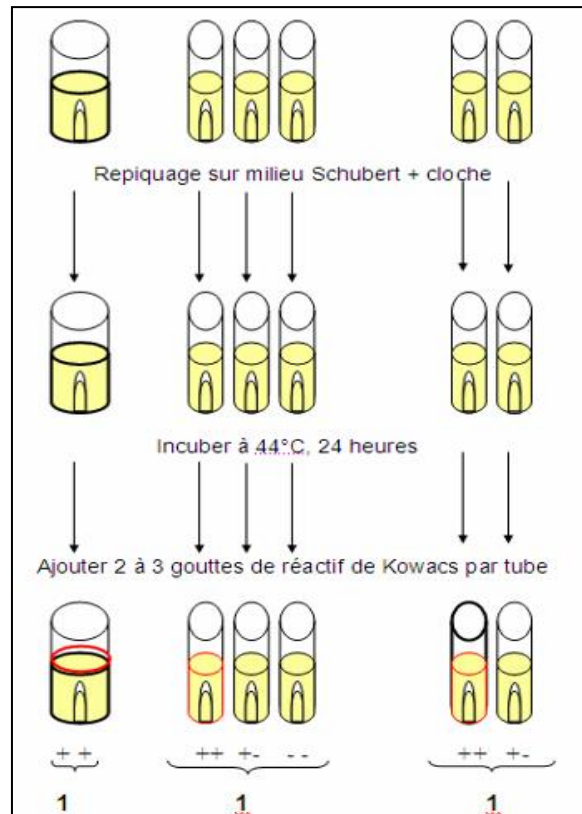


Schéma 02 : Test de confirmation

Tableau N° 02 : Critères microbiologiques d'analyses des aliments de l'association, française de normalisation (AFNOR)

Paramètres microbiologique	Unités	Valeurs maximales
Germe aérobies mésophiles (GAME)	germes/g ;	< 3 -10 ⁵
Coliformes totaux (CT)	germes/g ;	< 10 ³
Coliformes Fécaux (CF)	germes/g ;	< 10 ³
Germes anaérobies sulfite réducteurs (GASR)	germes/g ;	< 30
Salmonella Shigella	germes/g ;	absence dans 25 g ;
Levures et moisissures	germes/g ;	absence ;
Streptocoque Fécaux	germes/g ;	absence ;