Institut National de la Recherche Scientifique

INRS- Eau, Terre et Environnement

VALORISATION DE MATIÈRES RÉSIDUELLES POUR LA PRODUCTION DE BIOFERTILISANTS À BASE DE RHIZOBIUM : OPTIMISATION DU PROCÉDÉ DE FERMENTATION AVEC *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Par

Guillaume Dufresne

Mémoire présenté

Pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur externe	M. Esteban Chornet Département de génie chimique Université de Sherbrooke
Examinateur interne	Mme Darakhshan Ahmad INRS-IAF
Directeur de recherche	M. Rajeshwar D. Tyagi INRS-ETE
Codirectrice de recherche	Mme Danielle Prévost Agriculture et Agro-Alimentaire Canada

©droits réservés de Guillaume Dufresne, 2004

REMERCIEMENTS

Je désire remercier mon directeur de recherche, le Dr R.D. Tyagi, pour m'avoir appris les rouages de la recherche. Il a su me faire découvrir plusieurs aspects du monde scientifique qui seront des atouts importants pour la suite de ma carrière.

J'exprime ma sincère gratitude à ma codirectrice, Dr Danielle Prévost, pour son aide et son expertise en microbiologie du sol. Ses conseils ont été d'une importance capitale pour l'accomplissement de ma maîtrise.

J'aimerais également remercier tout le personnel du laboratoire de l'INRS-ETE ainsi qu'à celui d'Agriculture et Agro-Alimentaire Canada pour leur contribution aux analyses. Merci pour votre patience et votre compréhension.

Je suis infiniment redevable à Simon Barnabé pour son aide et son support. Il a su me transmettre sa passion pour la science et il demeurera à jamais pour moi un modèle à suivre.

Mes sincères remerciements à mes parents et à mon frère pour leur soutien et encouragement. Je remercie également tous mes collèges de maîtrise ainsi que mes amis pour leur support moral tout au long de mes travaux.

La réalisation de mes travaux aurait été impossible sans la présence, le support et la compréhension d'Annie. Merci pour ton aide et ton amour qui m'ont aidé à passer au travers.

Finalement, j'aimerais dédier ce mémoire à mes deux grand-mères, Florence Bertrand et Marguerite Bernier. Vous avez été présentes pour ce long cheminement.

RÉSUMÉ

La production de protéines végétales est de plus en plus sollicitée à travers le monde. Le secteur agricole doit donc utiliser des engrais azotés synthétiques afin de fournir les quantités d'azote nécessaires à la croissance des végétaux. Cependant, l'accessibilité à ces engrais pour les pays en voie de développement est limitée étant donné leur coût élevé de production. Il faut également prendre en considération les problèmes environnementaux causés par leur utilisation accrue et grandissante dans les pays plus développés. Il est possible d'atténuer ces problèmes en utilisant les caractéristiques symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia. Cette symbiose permet à ces végétaux de former leurs protéines à partir de l'azote gazeux atmosphérique résultant ainsi en une utilisation réduite d'engrais azotés. L'utilisation de milieux de culture synthétiques lors de la production à grande échelle d'inocula de rhizobia est limitée encore une fois par leur prix dispendieux. Or, les procédés d'assainissement des eaux usées municipales et industrielles génèrent des boues d'épuration qui sont riches en éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore, sels minéraux…etc.). Ces boues peuvent ainsi servir comme milieu de culture alternatif afin de produire un inoculum de rhizobium commercial. Cette valorisation des boues d'épuration peut également minimiser les problèmes d'élimination de ces déchets de traitement.

Les expériences réalisées dans cette étude ont démontré qu'il est possible d'améliorer la croissance de *Sinorhizobium meliloti* dans les boues d'épuration des eaux usées industrielles et municipales. Des fermentations en erlenmeyers et en bioréacteurs ont indiqué qu'un mélange de boues d'épuration secondaire et de résidus de levure brassicole augmentaient le nombre maximal de bactéries par rapport au milieu défini Yeast Mannitol Broth (YMB) avec des concentrations passant de $3{,}26 \times 10^9$ à $8{,}7 \times 10^9$ Unité Formatrice de Colonies par millilitre (UFC/ml). Les tests d'inoculation de la luzerne (alfalfa) avec des souches de rhizobia produites dans ces mélanges de biosolides ont également démontré que l'inoculum *S. meliloti* conservait et même améliorait (dans certains cas) leur capacité d'effectuer la nodulation. En effet, des indices nodulaires de 16,8 dans un mélange de biosolide ont été obtenus plutôt que 12,9 dans un milieu YMB. Il semble donc y avoir possibilité d'établir une nouvelle technologie permettant de produire un inoculum commercial de rhizobium à partir de biosolides et ce, en limitant les contraintes financières et environnementales.

Guillaume Dufresne
Étudiant

R.D. Tyagi
Directeur de Recherche

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **III**

RÉSUMÉ ..... **V**

TABLE DES MATIÈRES ..... **VII**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XI**

LISTE DES FIGURES ..... **XV**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ..... **XIX**

INTRODUCTION **1**

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE **3**

1.1 PROBLÉMATIQUE 3

1.1.1 Gestion des biosolides *3*

1.1.2 Valorisation des biosolides *4*

1.2 LES FERTILISANTS AZOTÉS SYNTHÉTIQUES ET LES BIOFERTILISANTS 7

1.3 LES RHIZOBIA 8

1.3.1 Taxonomie des rhizobia *9*

1.3.2 La nodulation *10*

1.3.2.1 Formation du nodule 10

1.3.2.2 Génétique de la nodulation 12

1.3.2.3 Fonction du nodule 13

1.3.3 La culture des rhizobia *14*

1.3.3.1 Les conditions de croissance 14

1.3.3.2 Les exigences nutritives 15

1.3.4 Les inoculants à base de rhizobium *16*

1.3.4.1 La qualité d'un inoculant 17

1.3.4.2 La formulation d'un inoculant 18

1.3.4.3 La production d'un inoculant 19

1.4 TRAVAUX ANTÉRIEURS 20

1.4.1 Les boues d'épuration comme milieux de culture *20*

1.4.2 Les pré-traitements et influence des matières en suspension *21*

1.4.3 Effet des conditions d'entreposage *21*

1.4.4 Efficacité des inoculants produits dans des boues *22*

1.4.5 Contrôle du pH et ajouts de nutriments *22*

1.5 LEVURES RÉSIDUELLES DES BRASSERIES 23

1.6 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL 24

1.7 OBJECTIFS DE RECHERCHE 25

CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES **27**

2.1 BOUES D'ÉPURATION (BS) ET RÉSIDUS DE LEVURE (RL) 27

2.2 SOUCHE BACTÉRIENNE ET MILIEUX DE CULTURE 28
2.3 FERMENTATION 28
2.3.1 Préparation de l'inoculum *28*
2.3.2 Les pré-traitements alcalins *29*
2.3.3 Expériences en erlenmeyers *29*
2.3.4 Expériences en bioréacteurs (15 et 150 L) *29*
2.4 DÉNOMBREMENT DES CELLULES 30
2.5 DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE TRANSFERT VOLUMÉTRIQUE 31
2.6 TESTS DE NODULATION 32
CHAPITRE 3: RÉSULTATS 35
3.1 CARACTÉRISATION DES BIOSOLIDES 35
3.1.1 Les boues d'épuration secondaires *35*
3.1.2 Les résidus de levure *36*
3.2 FERMENTATIONS DE BOUE EN ERLENMEYERS 37
3.2.1 Influence de l'âge de l'inoculum *38*
3.2.2 Influence de l'utilisation d'une pré-culture dans la boue *39*
3.2.3 Influence du volume de l'inoculum *41*
3.2.4 Influence des matières en suspension *43*
3.2.5 Influence des traitements alcalins *45*
3.2.6 Fermentations dans les résidus de levure *47*
3.2.7 Influence de l'ajout de résidus de levure au boue *50*
3.2.8 Sommaire des résultats en erlenmeyers *56*
3.3 FERMENTATIONS EN BIORÉACTEUR 59
3.3.1 Contrôles (15 L) *59*
3.3.2 Ajout de résidus de levure (15 L) *62*
3.3.3 Ajout de résidus de levure (150 L) *65*
3.3.4 Sommaire des résultats en bioréacteurs *67*
CHAPITRE 4: DISCUSSION 69
4.1 FERMENTATIONS DES BIOSOLIDES EN ERLENMEYERS PAR *S. MELILOTI* 69
4.1.1 Comportement de S. meliloti A2 dans les boues secondaires (BS) *69*
4.1.1.1 Influence des métaux lourds 70
4.1.1.2 Influence de l'âge de la culture de départ 71
4.1.1.3 Influence de l'utilisation d'une pré-culture 71
4.1.1.4 Influence du volume de l'inoculum 72
4.1.1.5 Influence des matières en suspension 73
4.1.1.6 Influence des traitements alcalins 74
4.1.2 Comportement de S. meliloti A2 dans les résidus de levure *75*
4.1.3 Effet d'un mélange de résidus de levure et de boues d'épuration *77*
4.2 FERMENTATIONS DES BIOSOLIDES EN BIORÉACTEURS PAR *S. MELILOTI* 79

4.2.1 Les contrôles (15 litres) *79*

4.2.2 Les mélanges de biosolides (Bioréacteurs de 15 et 150 litres) *80*

CONCLUSIONS **83**

RÉFÉRENCES **85**

ANNEXES **91**

ANNEXE-1 MILIEUX ET SOLUTIONS **93**

ANNEXE-2 RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES EN ERLENMEYERS **94**

ANNEXE-3 RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES EN BIORÉACTEURS **98**

ANNEXE-4 ÉVOLUTION DU K_LA, OUR ET OTR **119**

ANNEXE-5 EXEMPLE DE CALCUL DU K_LA **122**

ANNEXE-6 RÉSULTATS DES INDICES NODULAIRES **125**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Spécificité de différentes souches à leur plante hôte (Pelmont, 1993) 11

Tableau 2 : Détermination de l'indice nodulaire 33

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des boues secondaires de la CUQ et des résidus de levure (spent yeast) de chez Unibroue..... 36

Tableau 4 : Teneurs limites recommandées en métaux lourds dans les matières résiduelles fertilisantes destinées à l'épandage..... 37

Tableau 5 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (Unibroue18/10/2001) ou d'extrait de levure (Difco) dans des boues secondaires (CUQ 16/11/2001) et évaluation du temps de génération ainsi que du taux de croissance spécifique lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers. 51

Tableau 6 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (Unibroue18/10/2001) dans des boues secondaires (CUQ 16/11/2001) et évaluation du temps de génération ainsi que du taux de croissance spécifique lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers..... 53

Tableau 7 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (Unibroue18/10/2001) dans des boues secondaires (CUQ 16/11/2001) et évaluation du temps de génération ainsi que du taux de croissance spécifique lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers..... 55

Tableau 8 : Résultats des meilleures fermentations en erlenmeyers. 58

Tableau 9 : Évolution du coefficient de transfert volumétrique, de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un milieu synthétique (YMB) et dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) (BS) en bioréacteurs de 15 litres..... 62

Tableau 10 : Évolution du coefficient de transfert volumétrique, de la vitesse de transfert et de consommation d'oxygène en fonction de l'age du milieu de culture dans le fermenteur 15B. 65

Tableau 11 : Évolution du coefficient de transfert volumétrique, de la vitesse de transfert et de consommation d'oxygène en fonction du temps pour *S. meliloti* A2 dans un milieu mélangé boue secondaires et de résidus de levure dans un bioréacteur de 150 litres 67

Tableau 12 : Résultats des meilleures fermentations en bioréacteurs de 15 et 150 litres..... 68

Tableau 13: Comptes de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml du milieu YMB avec une culture de départ de 22 et une de 46 heures (Figure 4, chapitre 3)..... 94

Tableau 14 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec et sans l'utilisation d'une pré-culture (Figure 5, chapitre 3). 94

Tableau 15 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec des inocula de 0,3, 3, 6 et 12 % (Figure 6, chapitre 3). 95

Tableau 16 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) avec différentes concentrations de MES (Figure 7, chapitre 3)..... 95

Tableau 17 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitement alcalins lors de trois fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5% (Figure 8, chapitre 3). 95

Tableau 18 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitements alcalins à pH 12 lors de quatre fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5; 1,0; 1,5 et 2,0% (Figure 9, chapitre 3). 96

Tableau 19 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (Unibroue 18/10/2001) avec différentes concentrations de MES (figure 10, chapitre 3). 96

Tableau 20 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à divers pré-traitements alcalins lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (Unibroue 18/10/2001) à 1% de MES (figure 11, chapitre 3)..... 96

Tableau 21 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (18/10/2001) ou d'extrait de levure commercial (Difco) dans des boues secondaires de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de biosolides (Figure 12, chapitre 3)..... 97

Tableau 22 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (18/10/2001) dans des boues secondaires de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de biosolides (Figure 13, chapitre 3). 97

Tableau 23 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (18/10/2001) dans des boues secondaire de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de biosolides pour des MES totaux variant de 1,0% à 1,5% (Figure 14, chapitre 3)..... 97

Tableau 24 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant 10 litres de milieu synthétique YMB ou 10 litres de boues secondaire de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% de MES (Figure.15, chapitre 3) 98

Tableau 25 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15A) de 15 litres contenant 10 litres de milieu YMB. 98

Tableau 26 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15B) de 15 litres contenant 10 litres de boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% de MES. 102

Tableau 27 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant un total de 10 litres de biosolides (Figure 16, chapitre 3). 106

Tableau 28 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures d'un mélange de résidus de levure (RL) (21/02/2002) à 0,8% MES avec des boues d'épuration secondaire (BS) (25/04/2002) à 0,2% MES par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15A) de 15 litres contenant 10 litres de ce mélange de biosolide 106

Tableau 29 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures d'un mélange de résidus de levure (RL) (21/02/2002) à 0,5% MES avec des boues d'épuration secondaire (BS) (25/04/2002) à 0,5% MES par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15B) de 15 litres contenant 10 litres de ce mélange de biosolide 110

Tableau 30 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à un ajout de résidus de levure d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) lors d'une fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 150 litres contenant un total de 85 litres de biosolides (Fig. 17). 114

Tableau 31 : Données brutes pour le pH, l'oxygène dissout, la température et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur de 150 litres contenant 85 litres d'un mélange de résidus de levure (RL) à 0,5% MES et de boues d'épuration secondaire (BS) à 0,5% MES. 114

Tableau 32 : Estimation du coefficient de transfert d'oxygène (K_La) et de la vitesse de consommation d'oxygène (QO_2X). 124

Tableau 33 : Évaluation de l'indice nodulaire d'un inoculant liquide à base de *S. meliloti* A2 produit dans un milieu défini YMB et dans des boues d'épuration secondaire à 0,5% MES (BS) de la CUQ (25/04/2002) en bioréacteur de 15 litres lors d'inoculation de plantule de luzerne en sachet. 125

Tableau 34 : Évaluation de l'indice nodulaire d'un inoculant liquide à base de *S. meliloti* A2 produit dans deux mélanges différents de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) en bioréacteur de 15 litres lors d'inoculation de plantule de luzerne en sachet. 126

Tableau 35 : Évaluation de l'indice nodulaire d'un inoculant liquide à base de *S. meliloti* A2 produit dans un mélanges de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) en bioréacteur de 150 litres lors d'inoculation de plantule de luzerne en sachet 126

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le processus de nodulation (www.microbiologyonline.org.uk)..... i

Figure 2 : Disposition relative de certains gènes nod de deux espèces (Pelmont, 1993)..... 12

Figure 3 : Rôle de la nitrogénase lors de la fixation biologique de l'azote moléculaire dans un bactéroïde (Pelmont, 1993)..... 14

Figure 4 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml du milieu YMB avec un inoculum âgé de 22 et un autre âgé de 46 heures..... 39

Figure 5 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec et sans l'utilisation d'une pré-culture..... 41

Figure 6 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec des inocula de 0,3, 3, 6 et 12 %..... 43

Figure 7 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) avec différentes concentrations de MES..... 45

Figure 8 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitement alcalins lors de trois fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5%..... 46

Figure 9 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitements alcalins à pH 12 lors de quatre fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5; 1,0; 1,5 et 2,0%..... 47

Figure 10 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (RL) (Unibroue 18/10/2001) avec différentes concentrations de MES..... 49

Figure 11 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à divers pré-traitements alcalins lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (Unibroue 18/10/2001) à 1% de MES..... 50

Figure 12 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (RL) (18/10/2001) ou d'extrait de levure (EL) commercial (Difco) dans des boues secondaires (BS) de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de biosolides..... 52

Figure 13 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (RL) (18/10/2001) dans des boues secondaires (BS) de la CUQ (16/11/2001) à différentes teneurs de MES lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de biosolides. 54

Figure 14 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (RL) (18/10/2001) dans des boues secondaire (BS) de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de biosolides pour des MES totaux variant de 1,0% à 1,5%. 56

Figure 15 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant 10 litres de milieu synthétique YMB ou 10 litres de boues secondaire de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% de MES. 61

Figure 16 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant un total de 10 litres de biosolides. 64

Figure 17 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à un ajout de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires (BS) de la CUQ (25/04/2002) lors d'une fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissout dans un bioréacteur de 150 litres contenant un total de 85 litres de biosolides. 66

Figure 18 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un milieu défini (YMB) au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 15 litres (15A). 119

Figure 19 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans des boues d'épuration secondaire de la CUQ à 0,5% MES (25/04/202) au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 15 litres (15B). 120

Figure 20 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un mélanges de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% MES et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) à 0,5% MES au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 15 litres (15B). 120

Figure 21 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un mélanges de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% MES et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) à 0,5% MES au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 150 litres (150C). 121

Figure 22 : Évaluation de la vitesse de consommation d'oxygène (QO_2X) à partir de la pente de la courbe de l'évolution de l'oxygène dissout en fonction du temps. 123

Figure 23 : Estimation du coefficient de transfert d'oxygène (K_La) à partir de la pente de la courbe de l'évolution de l'oxygène dissout en fonction de ($dC/dt + QO_2X$)..... 124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BS	Boues d'épuration Secondaire
CUQ	Communauté Urbaine de Québec
EL	Extrait de levure commerciale
K_La	Coefficient de transfert d'oxygène volumétrique
MES	Matière En Suspension
MVES	Matière Volatile En Suspension
n.d.	Non déterminé
OTR	Oxygen Transfer Rate (Vitesse de transfert d'oxygène) (mmol/l/h)
OUR	Oxygen Utilisation Rate (Vitesse de consommation d'oxygène) (mmol/l/h)
RL	Résidus de Levure
ST	Solides Totaux
STV	Solides Totaux Volatils
μ_{max}	Taux de croissance maximum spécifique (heure^{-1})
t_g	Temps de génération (heure)
t_{max}	Temps où le nombre maximum de bactéries est atteint (heure)
X_{max}	Nombre maximal de bactéries (UFC/ml)
YMA	Yeast Mannitol Agar
YMB	Yeast Mannitol Broth

INTRODUCTION

Le développement d'une symbiose entre racines et microbes est une des stratégies les plus importantes, intrigantes et mutuellement payantes issues de l'évolution de certaines plantes et bactéries. Les microorganismes possédant un pouvoir symbiotique (exemple : du genre *Rhizobium/Bradyrhizobium*) sont reconnus pour leur capacité à noduler une grande variété de légumineuses et l'exploitation de l'immense pouvoir de ces bactéries en est encore au stade de l'enfance et ainsi, nécessite d'être encouragée.

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse culmine en la formation de nodules raciniens où l'azote atmosphérique y est fixé et assimilé par la plante offrant ainsi une alternative à l'utilisation de fertilisants azotés chimiques qui sont énergétiquement dispendieux. Malgré une utilisation accrue de fertilisants chimiques en agriculture, des estimés récents à l'échelle mondiale, suggèrent que la fixation biologique de l'azote fournit au moins quatre fois plus d'azote que les engrais chimiques dans le sol. Globalement, l'association symbiotique peut réduire 20 millions de tonnes d'azote atmosphérique en ammoniac par année. Ceci représente environ 70 à 80 pourcent de tout l'azote fixé biologiquement par année. C'est pourquoi l'inoculation des légumineuses avec des souches de rhizobia est fréquemment utilisée en agriculture.

L'inoculation des légumineuses avec des bactéries symbiotiques est une pratique qui est bien établie. Il s'agit de l'introduction dans le sol d'une souche de rhizobium spécifique, sélectionnée pour son efficacité symbiotique et son pouvoir compétitif pour la nodulation. L'inoculation assure donc la présence d'un grand nombre de rhizobia qui augmentera l'infection des racines, la nodulation et conséquemment la fixation de l'azote atmosphérique. Elle résulte en l'amélioration du bilan d'azote dans le sol et du rendement de croissance des légumineuses. Ces caractéristiques doivent être prises en considération lors de la culture de ces plantes.

Or, la production de légumineuses est une pratique largement employée en Amérique du Nord. Ces plantes utilisent l'azote atmosphérique pour leur croissance grâce à la symbiose, ce qui permet de diminuer l'utilisation d'engrais azotés qui sont coûteux et qui peuvent polluer l'environnement. La relation symbiotique luzerne-*Rhizobium* qui a une grande importance économique pour les pratiques agricoles, peut fixer plus de 200 kgN/ha/an sous de bonnes conditions. Ainsi, afin d'améliorer la production de légumineuses, il est nécessaire d'inoculer ces dernières avec *Rhizobium* et de développer de nouveaux milieux de culture économiques pouvant réduire les coûts

de production de ces inoculants. Des milieux de culture peu dispendieux, accessibles et efficaces permettraient leur utilisation partout à travers le monde et surtout dans les pays en voie de développement.

En effet, la production industrielle d'inoculants de légumineuses à base de *Rhizobium* est principalement menée en fonction des coûts de production et de la disponibilité d'une source acceptable de carbone. L'utilisation de boues d'usines d'épuration municipale et industrielle (biosolides) pour la production d'inoculants à base de *Rhizobium* représente une nouvelle alternative afin de minimiser les problèmes de disposition des boues. De plus, ces boues sont produites en grande quantité et elles sont peu dispendieuses à se procurer. Ainsi, il a été démontré à l'INRS-ETE (équipe d'assainissement) que ces biosolides étaient suffisamment riches en éléments nutritifs (C, N, P, sels minéraux etc) pour supporter la croissance de différentes souches de rhizobia (*S. meliloti, R. leguminosarum, B. japonicum, et B. elkanii*). La production de biofertlisants à partir de boues est donc un concept de bioconversion de biosolides en produit à haute valeur ajoutée.

À partir des travaux antérieurs réalisés par l'équipe de recherche du professeur Tyagi, la présente étude vise donc à optimiser le procédé de fermentation de *Sinorhizobium meliloti* souche A2 dans des biosolides afin de produire un biofertilisant. Dans un premier temps, des expériences en erlenmeyers sont effectuées afin de déterminer les meilleures conditions de fermentation qui seront par la suite reproduites en bioréacteurs. Différents paramètres tels l'utilisation d'une pré-culture, l'effet du volume de l'inoculum, l'effet des matières en suspension, l'effet d'hydrolyse alcaline et l'effet de mélange de boues d'épuration municipale avec des résidus de levure brassicole sont étudiés dans ce travail. Le but ultime des expériences réalisées est d'atteindre des concentrations cellulaires (UFC/ml) de *Rhizobium* comparables ou supérieures à celles obtenues dans des milieux de culture synthétiques commerciaux YMB (Yeast Mannitol Broth) tout en conservant la capacité de nodulation de l'inoculant (biofertilisant) produit.

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres. Dans le premier, une revue de littérature présente la problématique de la gestion des biosolides et celle de leur valorisation. Ensuite, la situation des fertilisants, des rhizobia ainsi qu'un portrait des travaux antérieurs est abordée dans les sections suivantes. Le chapitre conclut en présentant l'hypothèse de recherche et les objectifs spécifiques. Les chapitres 2 et 3 présentent respectivement le matériel et les méthodes employées au cours des expériences et les résultats obtenus. Le dernier chapitre discute de ces résultats. Finalement, une conclusion est présentée et des recommandations sont apportées pour d'éventuelles recherches portant sur ce sujet.

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Problématique

1.1.1 Gestion des biosolides

La gestion des eaux usées est une réalité à laquelle doit faire face toutes communautés structurées. La mise en œuvre du programme d'assainissement des eaux usées du Québec a considérablement contribué à accroître la quantité d'ouvrages d'assainissement municipaux. Bien que le traitement de ces eaux usées permette le rejet dans l'environnement d'une eau de qualité acceptable, il produit des déchets solides riches en matières organiques et inorganiques appelés boues d'épuration. Le terme « biosolides » est également employé lorsque l'on veut parler de boues d'épuration. Il regroupe tous les produits solides organiques issus de traitements privés ou communautaires des eaux usées qui respectent les critères applicables pour leur utilisation bénéfique. Il s'agit souvent d'un terme employé afin d'atténuer la crainte du grand public vis à vis l'utilisation des boues d'épuration comme produit recyclable, notamment comme matière fertilisante. Les biosolides peuvent être d'origine municipale (réseaux d'égouts), domestique (fosses septiques) ou industrielle (pâtes et papiers, brasseries, abattoirs, etc.).

L'augmentation du nombre d'usines d'épuration a donc engendré une hausse de la quantité de boues à traiter. Ce phénomène ne s'observe pas uniquement au Québec, mais partout ailleurs au Canada et dans le monde. Au Québec de 1981 à 1994, la production annuelle de boues municipales est passée de 82 000 à environ 200 000 tonnes de boues sèches. Lors de la même période, la population canadienne desservie par des usines d'épuration est passé de 48.1% à 92.6%. Cette tendance à la hausse est également observable aux États-Unis et en Europe. En effet, en 1998 aux Etats-Unis, la quantité de boues d'épuration produites a été évaluée à 6,9 millions de tbs/an pour un coût estimé à 7,6 $ M en 2005 (USEPA, 1999). En Europe, la production annuelle de boues sèches était estimée à 7,2 $ M en 1992 et l'Agence Européenne en Environnement prévoit une production de 11,2 tbs en 2005 (EEA, 1999). La démographie mondiale ne cessant de s'accroître et les usines d'épuration d'augmenter, tout porte à croire que cette tendance à la hausse va se poursuivre.

L'accroissement de la quantité de biosolides produits nécessite donc des moyens efficaces et économiques d'éliminer ces déchets. Actuellement, plusieurs méthodes sont utilisées telles

l'incinération, l'enfouissement et la valorisation. L'enfouissement sanitaire est un procédé parmi les plus répandus dans le monde, surtout en Europe. Par contre, l'utilisation de cette technique est plutôt à la baisse étant donné la diminution de sites d'enfouissements adéquats et la hausse de la taxe d'enfouissement (Webber, 1986; USEPA, 1984)). Il faut également prendre en considération que certaines boues d'épuration plus riches en métaux lourds représentent des risques de contamination pour les eaux souterraines (USEPA, 1984).

L'incinération, bien que moins populaire, est une méthode qui offre plusieurs avantages. Par exemple, elle tue les pathogènes qui peuvent être nuisibles pour la santé et réduit d'environ 20% la quantité de matières résiduelles à traiter (USEPA, 1984). Cependant, l'incinération génère des cendres riches en métaux lourds qui doivent être disposées de façon sécuritaire entraînant une augmentation des coûts globaux du procédé. L'entretien et l'opération des fours sont également très dispendieux puisqu'il nécessitent un personnel bien qualifié et une forte demande énergétique (USEPA, 1984).

Pour ce qui est de la valorisation des boues, elle offre plusieurs procédés intéressants. L'épandage agricole, grâce aux caractéristiques fertilisantes des boues, est de loin la méthode la plus préconisée actuellement. Les boues d'épuration sont reconnues pour être riches en potassium, phosphore et azote offrant ainsi des propriétés idéales pour l'amendement des sols (USEPA, 1993). La présence de métaux lourds, de bactéries pathogènes et d'odeurs représente les principaux obstacles pour cette méthode de valorisation. L'épandage sylvicole est également employé, mais beaucoup moins populaire à cause des difficultés d'accès aux forêts. Les boues d'épurations peuvent également être utilisées pour la réhabilitation de sols contaminés. C'est souvent le cas pour la restauration de sites miniers. Il existe d'autres procédés de valorisation beaucoup moins populaires comme la production de combustibles et la fabrication de matériaux de construction (Slim et Wakefield, 1991; Tay et Show, 1991; Tay et al., 1992). Il s'agit de technologies qui sont toujours à l'étude de nos jours. La valorisation des matières résiduelles offre donc plusieurs avantages et mérite toute notre attention afin que cette approche continue à prendre de l'expansion.

1.1.2 Valorisation des biosolides

Pourquoi valoriser les matières résiduelles ? Plusieurs raisons peuvent être attribuées à cette pratique de plus en plus populaire. Pour plusieurs municipalités, la valorisation représente un intérêt économique puisque dans certains cas elle offre une réduction des coûts de gestion des boues d'épuration. Les coûts de traitement et d'élimination peuvent représenter plus de la moitié du

budget d'une station d'épuration. De plus, la valorisation cadre parfaitement dans le contexte de développement durable. C'est-à-dire un développement qui satisfait les besoins de la génération actuelle sans priver les générations futures de la possibilité de satisfaire leurs propres besoins (rapport Brundland, 1988). Ce principe dont l'objectif est le maintien de l'intégrité environnementale, la satisfaction des besoins essentiels et l'efficacité économique est reconnu partout dans le monde. C'est pourquoi le développement de nouvelles technologies de valorisation sécuritaires, accessibles et peu dispendieuses est un défi majeur actuellement. Plusieurs études, comme celles réalisées par le *Groupe de recherche en assainissement de l'INRS-ETE* sur l'utilisation des boues d'épuration pour la croissance de *Sinorhizobium meliloti* (Ben Rebah et al., 2001), ont contribué à populariser la transformation des boues en produits à haute valeur ajoutée.

Les produits à haute valeur ajoutée peuvent prendre différentes formes. En effet, il est possible de produire des biofertilisants, des biopesticides, des enzymes commerciales, de la nourriture utilisée pour les animaux de la ferme, etc. Il s'agit donc d'un large spectre de produits qui touchent un marché mondial très varié. La recherche dans ce secteur est en continuel développement et beaucoup d'argent est investi afin de trouver de nouvelles technologies prometteuses.

Par contre, la valorisation des boues d'épurations est parfois limitée par les substances toxiques qu'elles peuvent contenir. Le type de valorisation que l'on veut adopter doit donc prendre en considération la nature et la concentration des contaminants présents dans les boues. Ces contaminants prennent plusieurs formes dont les plus importantes sont les métaux lourds et les agents pathogènes. Les odeurs nauséabondes provenant de la putréfaction des éléments organiques compliquent également la tâche de ceux qui prônent la valorisation.

Les métaux lourds proviennent en partie du ruissellement urbain recueilli par des systèmes d'égouts unitaires, du rejet dans les égouts de produits domestiques et de certains rejets industriels. Les principaux métaux que l'on retrouve sont l'aluminium, l'argent, l'arsenic, le baryum, le béryllium, le cadmium, le chrome, le cobalt, le cuivre, le mercure, le manganèse, le molybdène, le nickel, le plomb, le sélénium et le zinc. La présence de métaux lourds dans la partie comestible des plantes peut représenter un risque pour la santé humaine et animale. Ils pourraient nuire au système de reproduction humain et même être un promoteur de certains cancers (Babich *et al.*, 1985). De plus, certains métaux comme le cuivre, le nickel et le zinc sont phytotoxiques et leurs concentrations élevées dans le sol peuvent affecter le rendement des récoltes (Mench *et al.*, 1992). Pour ce qui est de l'épandage agricole, chaque pays a établi ses propres règles et recommandations quant aux teneurs en métaux lourds dans les boues et les sols. En Amérique du Nord et en Europe,

environ 50% des boues produites par des ouvrages d'assainissement contiennent des concentrations en métaux lourds supérieures aux normes prescrites pour l'épandage. (Blais, 1992; Blais *et al.*, 1993; US Environmental Protection Agency, 1990). Il existe des technologies pouvant réduire les concentrations en métaux toxiques dans les boues grâce à des procédés de lixiviation permettant ainsi de répondre aux normes d'épandage agricole (Tyagi et al., 1993).

Les agents pathogènes des biosolides représentent également un risque pour la santé humaine. Ils peuvent être regroupés en trois catégories, soit les bactéries, les virus et les parasites. Les bactéries sont responsables de certaines maladies telles le choléra, la salmonellose, la dysenterie bacillaire et la gastro-entérite. La poliomyéliose, la méningite, la pneumonie et l'hépatite sont plutôt reliées à des infections virales. Les parasites, pour leur part, causent des problèmes digestifs, de toux, de stress, de perte de poids, d'insomnie, d'anorexie et de douleurs abdominales et à la poitrine (US Environmental Protection Agency, 2002). Dans la plupart des cas, ces maladies sont transmises par contact direct avec les boues et la consommation d'aliments ayant été contaminés par contact avec les boues. Au Québec, pour que les boues puissent être valorisées en agriculture, elles doivent être stabilisées par digestion aérobie, anaérobie ou à la chaux. Cette stabilisation permet d'éliminer les pathogènes et de diminuer les odeurs. Les boues, provenant d'usines d'épuration, et qui sont âgées de plus de 20 jours peuvent également être épandues (Hébert, 1998).

L'émission d'odeurs est un des obstacles majeurs lorsque vient le temps de faire de la valorisation agricole. Les composés responsables des odeurs qui se dégagent des biosolides sont l'ammoniac, les amines, les composés soufrés, les thiols et les acides gras volatils. Ces composés malodorants proviennent de la décomposition chimique et microbiologique des éléments organiques contenus dans les biosolides. Les émissions odorantes sont souvent causées par des mauvaises pratiques telles des surcharges du digesteur, des faible temps de rétention, des digestions incomplètes, des mauvais brassages et des additions insuffisantes de chaux (US Environmental Protection Agency, 2002). Des entreposages non conformes de la part de certains agriculteurs n'aident en rien la situation. Généralement, les odeurs sont considérablement réduites suite aux divers traitements effectués sur les boues (Campbell, 2001).

Par la pression qu'il exerce, le public possède beaucoup de poids dans le processus décisionnel des différents paliers gouvernementaux et des institutions privées quant aux choix des procédés qu'ils adoptent pour leurs gestions des matières résiduelles. Ainsi, il est primordial que le public soit sensibilisé à ce sujet afin qu'il soit rassuré sur la sécurité de l'environnement et de la santé de la

population. Une meilleure compréhension des enjeux de la part de tous résultera en une meilleure gestion des boues dépuration.

1.2 Les fertilisants azotés synthétiques et les biofertilisants

L'azote gazeux abonde dans l'atmosphère. Par contre, il nous est impossible d'utiliser cet élément sous sa forme moléculaire. L'azote atmosphérique (N_2) doit en premier lieu être incorporé dans des composés assimilables par les animaux et les plantes. Il peut être fixé chimiquement ou biologiquement. Fritz Haber réalisa en 1913 un procédé de synthèse de l'ammoniac par combinaison directe de l'azote et d'hydrogène sous très forte pression et en présence d'un catalyseur. Ce n'est que plus tard, dans les années trente, que cette méthode fut adaptée à une production industrielle par le chimiste allemand Karl Bosch. Le procédé Haber-Bosch est de nos jours largement utilisé pour produire des engrais azotés mais à l'époque, pendant la première guerre mondiale (1914-1918), Haber utilisait plutôt ce procédé pour synthétiser de l'acide nitrique afin de produire des explosifs pour les allemands.

Toutefois, une grande quantité d'énergie fossile (pétrole, huiles, gaz naturel) est nécessaire afin de produire des fertilisants azotés chimiquement (procédé Haber-Bosch) augmentant par le fait même les coûts de production. (Burton, 1979). De plus l'utilisation excessive d'engrais azotés inorganiques peut provoquer de sérieux problèmes de pollution engendrés par le lessivage des nitrates dans les plans d'eau. Bien que de nos jours la situation est moins critique que dans les années soixante-dix alors que faisait rage la crise énergétique, la communauté scientifique a la responsabilité envers la société de trouver une façon efficiente d'utiliser la fixation biologique de l'N_2 comme substitut aux engrais azotés inorganiques.

Pourquoi favoriser la fixation biologique de l'azote (FBN)? On estime que la population mondiale va doubler d'ici 2050, il est donc raisonnable de s'attendre à ce que le besoin en azote fixé augmente de façon substantielle. Une meilleure utilisation de la FBN diminuera la dépendance actuelle de la société envers les fertilisants azotés synthétiques. La production, la distribution et l'application d'engrais synthétiques largement employés comme l'hydroxyde d'ammonium, demandent relativement une grande quantité d'énergie non-renouvable comme le gaz naturel et le diesel qui contribuent grandement à la pollution de l'air. De plus, une application abusive de fertilisants synthétiques a été reliée à des niveaux excessifs de nitrates (NO_3^-) dans les eaux souterraines pouvant causer de sérieux problèmes environnementaux. Il est également possible de diminuer les coûts de production et ainsi augmenter la marge de profits pour les producteurs en

utilisant davantage la FBN. Par exemple, une rotation de légumineuses comme le soya (plante fixatrice d'azote) avec le maïs permettra un rendement profitable pour la récolte de maïs avec des dépenses moindres pour l'achat de fertilisants synthétiques et à leur application. Finalement, une plus grande utilisation de la fixation biologique de l'azote va contribuer à maintenir l'équilibre du cycle global de l'azote. En effet, au cours des dernières années, ce cycle a été considérablement perturbé par l'accroissement de la fixation industrielle de l'azote. La fixation biologique de l'azote offre donc plusieurs avantages qu'il est important de prendre en considération avant de faire son choix quant au type de fertilisants à appliquer.

La fixation biologique de l'azote est en partie possible grâce à certaines bactéries capables de transformer l'azote moléculaire en ammonium via une enzyme importante, la nitrogénase. Les rhizobia ont la capacité d'infecter les racines des légumineuses, former des nodules et de travailler conjointement (symbiose) avec la plante hôte afin de fixer l'azote atmosphérique. Il a été estimé que les *rhizobia*, en association avec leurs plantes hôtes (légumineuses), pouvaient fixer au moins 90 millions de tonnes métriques d'azote par année (Hardy et Holsten, 1972). Ceci représente plus du double de la quantité d'azote contenue dans des fertilisants chimiques et plus de la moitié la quantité de cet élément fixé biologiquement à chaque année (Burton, 1979). Les inoculants de légumineuses à base de rhizobium sont utilisés depuis plusieurs années mais la recherche afin d'optimiser leur impact se poursuit toujours. La formulation et la production commerciale de ces inoculants demandent l'intégration de paramètres physiques, chimiques et biologiques afin d'atteindre de hautes populations d'organismes ainsi que leur survie à long terme (Stephens, 1999). La symbiose *Rhizobium*-légumineuse semble donc être très prometteuse pour fournir de la nourriture riche en protéines végétales dont la demande ne cesse d'augmenter.

1.3 Les rhizobia

Peu de groupes de bactéries ont été aussi minutieusement étudiées que les rhizobia. Les travaux qui ont mené à leur isolement et à leur utilisation sont parmi les plus importants progrès provenant de la bactériologie du sol. On attribue aux rhizobia deux propriétés distinctives. Premièrement, ils ont l'habilité d'envahir les racines des légumineuses et de stimuler la production de nodules et deuxièmement, ils ont l'habilité d'effectuer la symbiose avec leur plante hôte spécifique ayant comme résultat la fixation de l'azote atmosphérique. Ces deux propriétés confèrent aux rhizobia leur lettre de noblesse dans le monde de l'agriculture.

1.3.1 Taxonomie des rhizobia

Les rhizobia sont des bâtonnets du sol Gram-négatifs, aérobies, hétérotrophes et non-sporulantes appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Ils sont souvent arrangés seuls ou en paires et motiles surtout lorsque les cellules sont jeunes. Ils ont une taille variant de 0,5 à 0,9 µm de largeur par 1,2 à 3,0 µm de longueur (Burton, 1979). Dans cette famille, on retrouve les bactéries du genre *Rhizobium* (*R. tropici, R. leguminosarum, R. elti*), *Sinorhizobium* (*S. meliloti, S. fredii, S. teranga*), *Mesorhizobium* (*M. loti, M. ciceri, M. huakuii*), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum, B. elkanii*), *Azorhizobium* (*Az. Caullnodans*) (Young et Haukka, 1996). Cette classification est probablement appelée à changer puisque de nombreuses études sont effectuées sur une grande quantité de souches de rhizobia provenant d'une large variété de plantes légumineuses. En ce moment, il est estimé qu'environ seulement 8-9% des 14 000 espèces de plantes légumineuses connues ont été examinées pour leur caractéristique nodulaire, et moins de 0,5% ont été étudiées pour leur relation symbiotique avec des bactéries capables d'effectuer la nodulation (Saxena et Tilak, 1999; Ahmad et al, 1997).

Les rhizobia se distinguent selon leur vitesse de croissance dans un milieu synthétique à base de glucose et d'extrait de levure. En effet, on retrouve les rhizobia à croissante rapide (temps de génération inférieur à 6 heures) comme ceux du genre *Rhizobium* et *Sinorhizobium* possédant de deux à six flagelles péritriches ainsi que ceux à croissance lente (temps de génération supérieur à 6 heures) du genre *Bradyrhizobium* possédant un seul flagelle polaire ou subpolaire.

Les rhizobia à croissance rapide possèdent plusieurs plasmides variables en nombre et en taille. Le temps de génération varie entre 3,4 et 8,3 heures sur un milieu de culture à base de glucose et d'extrait de levure (Martinez de Drets et Arias, 1972). Ils forment des colonies de 2 à 4 mm de diamètre après 3 à 5 jours d'incubation sur des géloses à base de mannitol et d'extrait de levure (Yeast Mannitol Agar, YMA) (Jordan, 1982). Ils possèdent une grande variété de composés carbonés qu'ils peuvent utiliser comme substrat tels les hexoses, les pentoses, les di et trisaccharides et les acides organiques (Allen et Allen, 1950). Les rhizobia à croissance rapide ont une enzyme invertase qui leur permet de dégrader des disaccharides. De plus, ils possèdent une enzyme (NADP-6-phosphogluconate dehydrogénase) leur permettant d'utiliser la voie des pentoses phosphate afin de dégrader les hexoses (Martinez de Drets et Arias, 1972).

Les rhizobia à croissance lente, pour leur part, ne possèdent pas de grands plasmides. Ils ont un temps de génération variant de 14,3 à 33,3 heures sur un milieu de culture à base de glucose et

d'extrait de levure (Martinez de Drets et Arias, 1972). On observe des colonies qui ne dépassent pas 1 mm de diamètre après 5 à 7 jours d'incubation sur des géloses à base de mannitol et d'extrait de levure. (Jordan, 1982). Contrairement au rhizobia à croissance rapide, ils sont incapables d'utiliser une aussi grande variété de substrats carbonés, mais ils ont la capacité de dégrader des composés aromatiques (Pake et Orston, 1985). Ils ne possèdent ni l'enzyme de la voie des pentoses phosphate ni l'enzyme invertase qui leur permet de briser le saccharose. Par contre, les rhizobia à croissance lente peuvent dégrader les pentoses grâce à une autre enzyme (2-keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase) intervenant dans une voie qui produit du pyruvate et de l'acétaldéhyde à partir du L-arabinose (Martinez de Drets et Arias, 1972). Cette enzyme est absente chez ceux à croissance rapide (Pedrosa et Zancan, 1974).

Un dernier facteur qui distingue les rhizobia des autres familles bactériennes est leur capacité à induire la nodulation chez leur plante hôte. La symbiose « légumineuses-rhizobia » aboutit à la formation de nodules sur les racines des plantes hôtes. La nodulation est un procédé hautement étudié à travers le monde.

1.3.2 La nodulation

La nodulation est le processus par lequel s'exprime la symbiose entre des bactéries fixatrice d'azote et la plante hôte spécifique qui est ciblée. Le nodule, le résultat de cette association, est une excroissance située sur les racines et représente le siège des réactions où a lieu la fixation de l'azote atmosphérique et sa transformation en ammoniaque. Cette symbiose joue donc un rôle important en agriculture.

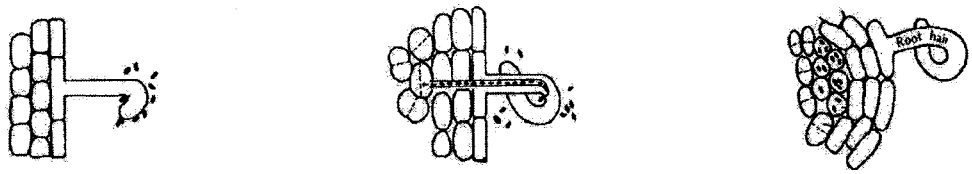
1.3.2.1 Formation du nodule

Les espèces de *Rhizobium* n'infectent et n'induisent des nodules que chez des hôtes spécifiques. Par exemple, la luzerne est la plante hôte de *S. meliloti* alors que le soja est la plante hôte de *B. japonicum*. Le tableau 1 montre quelques-unes des spécificités bactériennes envers leur plante hôte. Ce processus complexe implique des molécules qui reconnaissent la plante hôte, appelées lectines, et la fixation du *Rhizobium* sur des sites spécifiques des poils radiculaires. Le rôle exact de ces lectines (polysaccharides) fait l'objet d'études intenses à travers le monde (Prescott et al., 1995; Spaink, 2000).

Tableau 1 : Spécificité de différentes souches à leur plante hôte (Pelmont, 1993)

Bactéries	Plantes
Sinorhizobium meliloti	Luzerne
Rhizobium leguminosarum biovar *viciae*	Pois, vesce
Rhizobium leguminosarum biovar *trifolii*	Trèfle
Rhizobium leguminosarum biovar *phasaeoli*	Haricot
Bradyrhizobium japonicum	Soja
Rhizobium loti	Lotier
Azorhizobium caulinodans	*Sesbania* (tige)
Bradyrhizobium sp.	*Parasponia* (non légumineuse)

Ces lectines produites par la plante agiraient comme un agent agglomérant (Prescott et al., 1995; Subba Rao, 1993). De plus, *Rhizobium* libère dans le milieu environnant des lipopolysaccharides (LPS) qui possèdent une spécificité structurale et antigénique en fonction de la souche. Ces LPS pénètrent dans le poil absorbant et contribuent à diriger la formation du filament infectieux (Dazzo et al., 1991; Pelmont, 1993). Après fixation de la bactérie, le poil s'incurve en forme de crosse. La bactérie y pénètre et induit la plante à former un filament infectieux qui s'allonge dans le poil radiculaire vers la racine. *Rhizobium* voyage dans le filament infectieux et infecte ensuite les cellules adjacentes de la racine. Les cellules infectées subissent des divisions actives et un nodule apparaît. Les bactéries se multiplient dans les cellules infectées et se développent en formes ramifiées, gonflées que l'on nomme bactéroïde. Ces bactéroïdes sont capables par la suite de réduire l'azote atmosphérique en ammoniaque. La figure 1 illustre le procédé de nodulation.



Fixation et pénétration des bactéries — Formation du filament infectieux — Divisions cellulaires et Formation du bactéroïde

Figure 1 : Le processus de nodulation (www.microbiologyonline.org.uk)

Parallèlement, il y a production de leghémoglobine et de noduline dans le bactéroïde. La noduline cause l'élargissement du cortex cellulaire alors que la leghémoglobine, protéine homologue à l'hémoglobine chez les animaux, confère une couleur rose au nodule et joue un rôle important dans

la régulation de l'oxygène au niveau du bactéroïde (Denison et Okano, 2003; Prescott, 1995; Allen et Allen, 1950). C'est donc dans ce nodule que s'effectue la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.

1.3.2.2 Génétique de la nodulation

L'établissement de la symbiose est un système profondément interactif. Comme il a déjà été mentionné, chaque souche est en principe spécifique à une plante donnée. L'analyse de cette spécificité a été grandement facilitée par la génétique. La génétique de rhizobium est complexe en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et des nombreuses particularités d'une souche à l'autre. Ce sont les gènes de la « boîte *nod* » qui déclenchent la formation des nodules. La plupart de ces gènes se situent sur des plasmides et la présence d'au moins un grand plasmide est une caractéristique commune à toutes les souches de *Sinorhizobium meliloti* (Geurts et Bisseling, 2002; Rosenberg et al., 1981). La figure 2 illustre la disposition relative de certains gènes *nod* chez deux espèces. Les flèches indiquent le sens de la transcription des gènes.

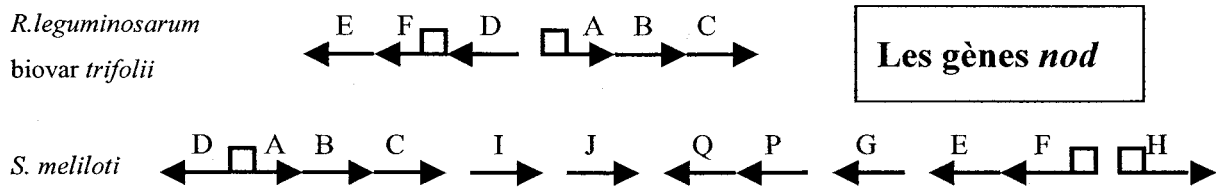


Figure 2 : Disposition relative de certains gènes nod de deux espèces (Pelmont, 1993).

Les rhizobia sont « attirés » vers la rhizosphère par chimiotactisme. La plante émet des substances propres à elle, les flavonoïdes. Si ces flavonoïdes sont reconnus par la bactérie, il se produira l'activation du gène *nodD*. Certaines bactéries ont un seul gène *nodD* alors que d'autres, tel *Sinorhizobium meliloti,* en ont plusieurs (*nodD1, nodD2, nodD3*) leurs permettant ainsi d'avoir une spécificité plus large et d'être moins exigeantes sur la nature de la plante (Pelmont, 1993). Les bactéries répondent par la synthèse de nouvelles protéines (des tétrasaccharides ou Nod factors) induites par l'activation des gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* qui sont transcrits d'une seule pièce puisqu'il sont dans un même opéron. Par la suite, la plante détecte (ou non) ces produits émis par les bactéries et fixe les tétrasaccharides avec des protéines agissant comme récepteurs, peut-être des lectines (Spaink, 2000; Snyder et Champness, 1997; Lerouge et al., 1990). Ainsi, la plante construit

un nodule et fabrique de nouveaux produits capables de stimuler la différenciation des bactéries et de faciliter la réduction de l'azote moléculaire. Il s'agit donc d'une conversation chimique qui anime les rapports entre la plante et rhizobium en passant par l'activation des gènes *nod* qui enclenche tout le processus de la nodulation. Les travaux de Lerouge et al. (1990) sur la génétique bactérienne de rhizobium ont contribué énormément à démystifier les multiples échanges chimiques au cours de la formation du nodule. La nodulation est caractéristique des rhizobia et les fonctions du nodule sont primordiales.

1.3.2.3 Fonction du nodule

Le nodule est une structure protectrice permettant la fixation de l'azote atmosphérique. C'est dans ce bactéroïde que la nitrogénase régit la réduction de l'azote moléculaire (N_2) en ammoniac (NH_3) afin de rendre par la suite l'azote assimilable pour la plante (Subba Rao, 1993). Cette enzyme est constituée de deux composantes : un avec du fer (Fe) et du molybdène (Mo) ayant un poids moléculaire de 200 000; et l'autre avec du fer sans molybdène ayant un poids moléculaire d'environ 65 000 (Quispel, 1974). La réaction catalytique de la nitrogénase demande une source d'ATP et de réducteurs. Les produits de la photosynthèse sont transmis des feuilles jusqu'aux nodules fournissant ainsi l'ATP et les réducteurs (ferrédoxine ou flavodoxine) nécessaires à la fixation de l'azote. La plupart des mesures indiquent que la réaction nécessite 12 molécules ATP par molécule d'azote fixée (Subba Rao, 1993). L'enzyme nitrogénase hydrolyse l'ATP en ADP et se couple avec un transporteur d'électron (ferrédoxine) afin de réduire l' N_2 en $2NH_3$. L'ion d'ammonium (NH_4^+) produit pendant la fixation de l'azote est assimilé grâce à la glutamine synthétase et au glutamate synthase, deux enzymes présentes chez la plupart des plantes supérieures (Quispel, 1974). La figure 3 montre une vue d'ensemble du procédé.

Puisque la fixation biologique de l'azote est principalement un procédé anaérobie, le nodule doit posséder un mécanisme qui exclut l'oxygène du bactéroïde. Cette tâche est accomplie grâce à la présence de leghémoglobine autour des bactéroïdes qui sont enfermés par une enveloppe membranaire. Ce pigment (leghémoglobine) limite l'approvisionnement en oxygène près des bactéroïdes permettant ainsi de protéger la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène, mais fournissant suffisamment de cet élément afin de permettre la génération d'ATP (Denison et Okano, 2003; Subba Rao, 1993). Le fonctionnement des nodules peut être influencé par des changements de température, l'intensité lumineuse, la présence d'azote dans le sol, le pH du sol, la présence d'éléments minéraux, la présence de sels et de microorganismes antagonistes dans le sol. Il est

primordial que les rhizobia conservent leur capacité nodulaire si on modifie leurs conditions de croissance dans leur environnement ou dans leur milieu de culture.

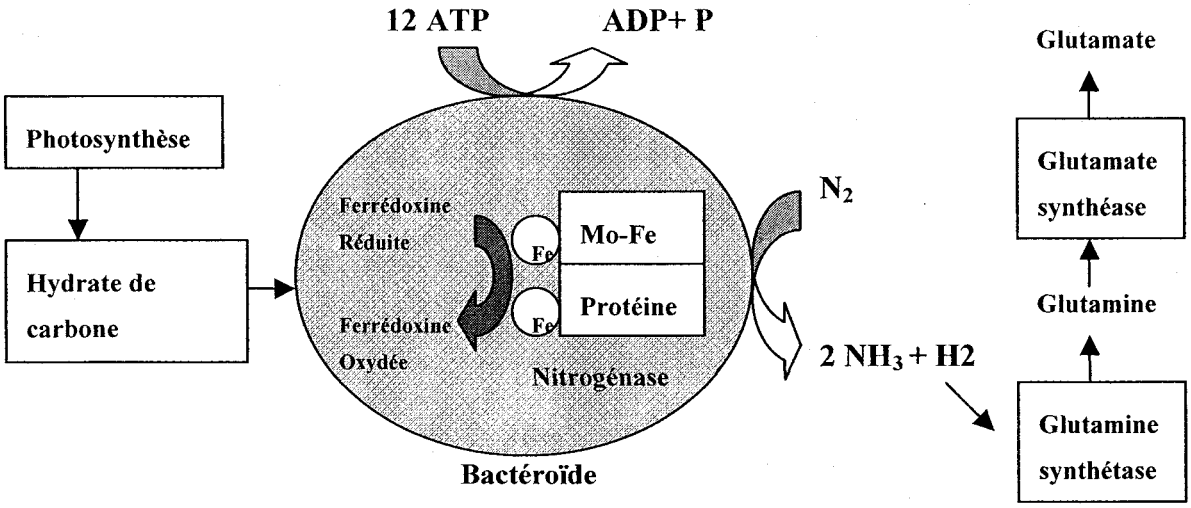


Figure 3 : Rôle de la nitrogénase lors de la fixation biologique de l'azote moléculaire dans un bactéroïde (Pelmont, 1993).

1.3.3 La culture des rhizobia

1.3.3.1 Les conditions de croissance

Les rhizobia, étant des bactéries aérobies obligatoires, nécessitent un fermenteur (idéalement) capable de fournir de l'air stérile dans le milieu de culture. Toutefois, l'aération des erlenmeyers agités est suffisante pour la culture des rhizobia (Ertola et al., 1969). Généralement, au moins 1 litre d'air par minute devrait être fourni pour chaque 20 litres de milieu de culture (Burton, 1979).

La température de croissance idéale de la plupart des rhizobia varie entre 25 et 30 °C. Bien que la température ne soit pas un facteur limitant de croissance, il est important de maintenir une température optimale afin que le temps de fermentation demeure le plus court possible. Une agitation soutenue est nécessaire afin que la chaleur soit bien répartie et que l'oxygène diffuse adéquatement dans tout le milieu de culture afin de ne pas asphyxier les bactéries (Burton, 1979). L'agitation permet également de bien mélanger tous les éléments nutritifs dans le milieu culture.

Les rhizobia croient confortablement dans un milieu où le pH est près de la neutralité. Selon Allen (1950), tous les rhizobia sont affectés par l'acidité et *S. meliloti* est le plus sensible (pH 5,0) alors

que *Bradyrhizobium japonicum* est le plus résistant (pH 3,2 à 4,0). Par contre, il a été démontré que les variations de pH (augmentation alcaline) lors d'une fermentation dans des boues d'épuration n'affectaient en rien le taux de croissance de *S meliloti* (Ben Rebah, 2001). De plus, certains rhizobia, à croissance rapide, cultivés en masse dans des fermenteurs ne produisent pas de changements appréciables du pH pour une fermentation de 96 heures et ce, même en milieu faiblement tamponné. Par exemple, *S. meliloti* peut faire varier le pH uniquement de 6,8 à 6,4 pour une fermentation de 144 heures (Burton, 1979).

Finalement, le volume de l'inoculum va également grandement influencer la culture des rhizobia. En effet, plus le volume de l'inoculum est important, plus le temps de latence sera court et la concentration de cellules maximum sera atteinte rapidement (Ben Rebah, 2001). Il n'y a pas d'unanimité dans la littérature quant aux volumes adéquats d'inoculum à utiliser. Ils varient selon les chercheurs, les souches et la nature des milieux de culture utilisés. Pour certains, on parle de volumes variant de 0,1 à 1,0 % alors que pour d'autres on parle plutôt de volumes variant de 1,0 à 3,0 % (Burton, 1979; Roughley, 1977; Bissonnette et al., 1986).

1.3.3.2 Les exigences nutritives

Comme il a été mentionné, les rhizobia utilisent différentes sources de carbone. Ils utilisent les monosaccharides, les disaccharides et en moins grande importance les trisaccharides, les alcools et les acides. Les pentoses, tels les arabinoses et les xylose sont les sources de carbone que préfèrent les souches à croissance lente (Burton, 1979). La capacité des rhizobia à utiliser des hydrates de carbone dépend en partie de la nature du milieu de culture, du potentiel d'oxydo-réduction, de la taille de l'inoculum et de la méthode de culture. Le sucrose, le mannitol et le glycérol sont les sources de carbone les plus communément utilisées dans la composition des milieux de culture dans le secteur industriel.

Les facteurs de croissance sont des composés organiques que l'on peut ajouter au bouillon nutritif afin de combler les besoins en certains constituants cellulaires (ou leurs précurseurs) indispensables à la croissance lorsque qu'une bactérie en question ne possède pas les enzymes nécessaires afin de les synthétiser (Prescott, 1995). Les acides aminés et les vitamines font parties de ces facteurs de croissance qui doivent être ajoutés au milieu de culture des rhizobia. L'extrait de levure est utilisé afin de combler les besoins en vitamines, acides aminés et en azote inorganique. La demande en facteurs de croissance est simple et varie selon l'espèce et la souche qui est utilisée. Les rhizobia nécessitent une, toutes ou plusieurs des combinaisons de certaines vitamines telles la biotine,

thiamine, riboflavine et pantothenate de calcium (Allen and allen, 1950). Par exemple, *S. meliloti* nécessite uniquement de la biotine comme source de vitamine. Bien que certaines souches de rhizobia puissent utiliser le nitrate et l'ammonium comme source d'azote, une meilleure croissance est normalement observée lorsque des acides aminés de faibles poids moléculaires sont ajoutés (Burton, 1979).

Les rhizobia ont également besoin d'oligo-éléments (aussi appelés micronutriments) afin de combler leurs exigences nutritives tel le cobalt, le manganèse, le zinc et le fer (Wilson et Reisenauer, 1970). Les oligo-éléments font normalement partie des enzymes et des cofacteurs aidant ainsi la catalyse des réactions et le maintien de la structure des protéines (Prescott, 1995). Le cobalt aide à prévenir contre la toxicité reliée au nickel et au cuivre alors que le zinc et le manganèse, à de faibles concentrations, stimulent la croissance des rhizobia (Wilson et Reisenauer, 1970). Pour sa part, le fer fait partie de la ferrédoxine qui est une protéine qui agit comme plaque tournante dans le mécanisme de transfert d'électrons (Ben Rebah, 2001).

Les sels minéraux sont essentiels au bon développement des rhizobia. Encore une fois, c'est l'extrait de levure qui fournit les concentrations adéquates de calcium, de potassium et de magésium. Puisque que les rhizobia dans les nodules sont nourris par la plante hôte, il semble raisonnable de penser que leurs besoins en sels minéraux sont semblables (Burton, 1979). Bergensen (1961) a démontré que le calcium stimulait la croissance des rhizobia et qu'à de faibles concentrations (0,1 ppm), la période de latence était plus longue, la phase exponentielle était plus courte, le taux de croissance dans la phase exponentielle était plus faible ou bien on observait une diminution de la production de cellules. Le potassium, pour sa part, agit comme un régulateur enzymatique dans la synthèse des polypeptides bactériens (Mandeistan et McQuillen, 1973). Le magnésium est un élément essentiel pour la croissance car il joue également un rôle de régulateur enzymatique. Une déficience en cet élément produit une division anormale des cellules (Norris, 1959). Les conditions de croissance et les exigences nutritives sont bien établies dans la littérature et cette information a contribué à proposer des milieux de culture pour fabriquer des rhizobia à grande échelle.

1.3.4 Les inoculants à base de rhizobium

La fixation biologique de l'azote inorganique est un aspect important d'une production de nourriture soutenue et sécuritaire au niveau environnemental. L'inoculation de légumineuses est une vieille pratique agricole bien établie. Elle a contribué à augmenter la fixation de l'azote

moléculaire et le rendement des cultures dans des situations où la fixation de l'N_2 n'était pas optimale (Tilak, 2002; Catroux et al., 2001). Selon Statistique Canada, en 2000, 460 800 kg d'inoculant ont été utilisé pour la culture de la luzerne (pour une superficie ensemencée de 7,680,000 ha) et environ deux millions kg d'inoculant utilisés pour l'ensemble des cultures de légumineuses (pour une superficie ensemencée totale d'environ 11 175 000 ha). Selon Van Kessel et Hartley (2000), il y a quatre facteurs principaux qui influencent la quantité d'N_2 fixée, premièrement, l'efficacité de la relation symbiotique entre la plante hôte et rhizobium, la capacité de la plante hôte à accumuler l'azote, la quantité d'azote disponible dans le sol et finalement les contraintes environnementales reliées à la fixation d'N_2. L'inoculation de rhizobium des graines de légumineuses représente le plus grand succès de la microbiologie appliquée du sol alors que des millions d'hectares ont été inoculés depuis le début de cette pratique.

1.3.4.1 La qualité d'un inoculant

Plusieurs facteurs contribuent à produire un inoculant de très bonne qualité. Un des plus important consiste à avoir un nombre élevé de cellules de rhizobia vivantes, capables d'effectuer la nodulation et la fixation de l'N_2 avec sa plante hôte et ce, avec le moins de contaminations possibles (Lupwayi et al., 1999). Brockwell et Bottomley (1995), ont effectué une revue en matière des technologies d'inoculants. Ils mentionnent que la production mondiale d'inoculants de légumineuses est présentement statique ou en décroissance étant donné que la plupart des inoculants produits de nos jours sont de mauvaise qualité. Il devient donc important de se doter d'outils permettant d'évaluer la qualité du produit final. Lorsque les fermiers réalisent qu'une mauvaise qualité d'inoculant résulte en de mauvais rendement sur le terrain, leur confiance envers la technologie décline et autant le manufacturier que le consommateur en sortent perdants. C'est pourquoi il est préférable que la qualité d'un inoculant soit protégée par des réglementations ou législations gouvernementales (Burton, 1979). Ces réglementations doivent résulter en l'établissement d'une standardisation. Par contre, les réglementations varient d'un pays à l'autre. En effet, le Canada, la France et l'Uruguay ont des autorités de réglementations supportées par des législations. L'Australie, l'Afrique du Sud et la Nouvelle-Zélande possèdent un programme de contrôle de qualité qui fonctionne selon un mode de participation volontaire de la part du manufacturier alors que pour d'autres pays, comme les Etats-Unis et le Royaume-Uni, les standards de qualité sont laissés à la discrétion du manufacturier. La plupart des standards de qualité des inoculants établissent un minimum de cellules de rhizobia viables (de la bonne souche ou espèce) par unité de poids de l'inoculant (Lupwayi et al., 1999). Au moins $1x10^9$ rhizobia par gramme

d'inoculant sont demandés en France, Australie, Rwanda, Zimbabwe et Kenya. On demande $1x10^8$ cellules g^{-1} en Nouvelle-Zélande et 10^7 cellules g^{-1} en Thailande. Au Canada, les produits granulaires appliqués au sol comme inoculant doivent fournir au moins $1x10^{11}$ cellules par hectare (Olsen et al., 1994). Dans le cas d'inoculants liquides et poudreux, le nombre minimal d'organismes requis par semence dépend de la grosseur des graines : 10^3, 10^4et 10^5 cellules / graine, pour les petites (luzerne, trèfle), moyennes (sainfoin) et grosses (habricot, pois et soya) (ACIA, 1997)

L'inoculant idéal devrait tenir compte du besoin du fermier et du manufacturier. D'un côté, le fermier doit avoir un inoculant qui offre une efficacité maximale au champ. Il doit également être compatible avec les pratiques du fermier telles la désinfection des graines et l'utilisation de pesticides. Il doit être facile d'utilisation et atteindre les standards appropriés d'inoculation et donc contenir le nombre le plus élevé possible de rhizobium après stockage. De plus, rhizobium doit être capable d'effectuer la nodulation de la plante sous différentes conditions de terrain et finalement, l'inoculant doit fournir une bonne survie de la bactérie pendant le processus d'inoculation ainsi qu'une fois qu'elle est appliquée au sol. Le manufacturier, pour sa part, doit fournir un inoculant qui offre toutes les caractéristiques que le fermier demande. Il doit aussi être en mesure de produire un inoculant avec une durée de vie suffisamment longue pour qu'il puisse l'entreposer de 1 à 1 ½ ans afin de pouvoir vendre son produit sur deux saisons de récolte. Finalement, le manufacturier doit s'assurer que l'inoculant offre des résultats reproductibles et qu'il soit sécuritaire pour les humains, les animaux et les plantes (Catroux et al., 2001).

1.3.4.2 La formulation d'un inoculant

Une mauvaise formulation de l'inoculant représente un obstacle majeur pour la commercialisation du produit. Un microorganisme peut être efficace dans des conditions optimales en laboratoire, mais il est important que le produit fini offre des résultats équivalents sur le terrain. Une fois qu'une formulation d'inoculant fonctionne adéquatement in situ, le produit doit être raffiné afin de répondre aux besoins réels de l'utilisateur selon les techniques d'épandage et des périodes de culture (Stephens, 1999).

Les inoculants sont normalement commercialisés sous trois formes différentes : en poudre, en liquide ou sous une forme granulaire. Les produits granulaires peuvent être placés directement dans les sillons profondément sous les graines. La possibilité de contrôler l'emplacement et le taux d'application représente un avantage majeur pour ce type de produit (Stephens, 1999). La forme

poudreuse comprend les farines de tourbe produites à partir du Carex, contrairement à celles produites dans la sphaigne ou la mousse de tourbe, couramment utilisées pour la fabrication d'inoculant. Les inoculants liquides présentement disponibles offrent plusieurs variantes quant à la composition des bouillons. Chacune des formulations est le résultat des activités de recherches et développements des différents producteurs d'inoculants. Les produits liquides sont considérés comme étant plus faciles à manipuler et même dans certains cas ils sont meilleurs ou aussi efficaces que les produits dérivés de la tourbe (Sattar et al., 2002; Hynes et al., 1995). Par contre, leur durée de vie limitée ainsi que le besoin d'entreposer au frais les bouillons demandent de la manipulation et des coûts supplémentaires pour les pays en voie de développement et nuisent à leur utilisation pour les pays plus développés.

Des formulations alternatives continuent à être examinées. En effet, la lyophilisation des cultures bactériennes, la suspension cellulaire dans l'huile et des concentrés de cellules sont présentement à l'étude (Stephens et Rask, 1999). Récemment, on assiste aussi à la commercialisation de semences pré-inoculées évitant ainsi au producteur agricole d'effectuer la pratique de l'inoculation. Cependant, les principaux champs d'études s'orientent vers l'augmentation des populations de rhizobium par unité de poids (ou de volume) du produit. Beaucoup d'efforts sont également déployés afin d'améliorer l'efficacité des microorganismes ainsi que la durabilité des produits pour répondre aux réalités de la vente au détail (Stephens et Rask, 1999; Subba Rao, 1993). Tous ces facteurs doivent donc être pris en considération afin de produire des inoculants à une échelle industrielle.

1.3.4.3 La production d'un inoculant

La production commerciale des inoculants de légumineuses a commencé en 1895 aux Etats-Unis et au Royaume-Uni (Brockwell et Bottomley, 1995). De nos jours, ils sont produits dans plusieurs pays et sur tous les continents. Souvent, on les retrouve sous forme de poudre ou dans un support organique comme la tourbe. Trois grandes préoccupations lors de la production d'inoculants doivent être prises en considération : la qualité et le traitement accordé au support employé; la pureté de la souche bactérienne; et l'atteinte d'un nombre suffisamment élevé de cellules dans le bouillon et le produit fini (Stephens et Rask, 1999).

Le choix d'un matériel brut servant de support pour l'inoculant (carrier), est souvent basé sur sa disponibilité, sa régularité en terme de qualité et son coût. Le matériel choisi doit évidemment supporter la croissance de la bactérie désirée et maintenir la population bactérienne dans l'inoculant

sur une période de temps suffisamment longue. Pour atteindre ces objectifs, un support doit posséder une forte capacité de rétention d'eau, une homogénéité chimique et physique et finalement, il doit être non toxique pour la souche de l'inoculant ainsi que pour l'environnement (Smith, 1992).

Le choix de la souche est primordiale afin d'obtenir un inoculant de qualité. La souche bactérienne sélectionnée a besoin d'être compétitive avec les populations indigènes du sol afin d'être en mesure d'effectuer adéquatement la nodulation de leur plante hôte. Bien sûr, elle doit être exempte de toutes contaminations. Le développement d'un inoculant qui pourrait être utilisé pour une gamme de cultures provenant du même genre, et qui contient un cocktail de souches, contrairement aux inoculants ne possédant qu'une seule souche spécifique à une seule plante, fait l'objet d'études (Smith, 1992; Stephens et Rask, 1999).

Comme il a déjà été mentionné, la production de rhizobium nécessite plusieurs éléments nutritifs. Plusieurs milieux de culture sont proposés afin de combler ces besoins (Burton, 1979), mais le secteur biotechnologique est continuellement à la recherche de milieux alternatifs moins dispendieux. En effet, l'utilisation de sous-produits dérivés de l'industrie laitière (Bissonnette et al., 1986), des papetières (Butt, 1992), des distilleries (Bioardi et Ertola, 1985) et des brasseries (Gondwe et al., 1999) ont fait l'objet d'études. Les usines de traitement des eaux usées génèrent également des boues pouvant être utilisées comme milieu de culture alternatif offrant ainsi de bonnes conditions de croissance pour *Rhizobium* (Ben Rebah, 2001; Reddy et al., 1983). Ces sous produits ou déchets municipaux ont l'avantage d'être peu dispendieux, accessibles en tout temps et riches en éléments nutritifs.

1.4 Travaux antérieurs

1.4.1 Les boues d'épuration comme milieux de culture

Tel que proposé par Ben Rebah et al. (2001), l'utilisation de biosolides comme matière première pour la production d'inoculants à base de *Rhizobium* représente une nouvelle avenue. À cet égard, ses expériences en erlenmeyers ont démontré que les deux groupes de rhizobia, soit à croissance rapide (*S. meliloti* et *R. leguminosarum bv viciae*) et à croissance lente (*Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*), pouvaient croître dans diverses boues de traitements primaires, secondaires et mixtes. Ces biosolides provenaient de différentes usines de traitements des eaux

usées localisées dans la province de Québec (Communauté Urbaine de Québec, municipalité de Black Lake, municipalité de Valcartier et une usine de pâtes et papiers). Les résultats démontraient que la composition des boues variait avec le type et l'origine de la boue affectant par le fait même le temps de génération, le rendement en cellules et l'indice nodulaire. Le nombre de cellules de rhizobia dépassait généralement $1x10^9$ UFC/ml après 72 heures de fermentation.

1.4.2 Les pré-traitements et influence des matières en suspension

Ben Rebah et al. (2001) ont étudié l'effet de la concentration des matières solides en suspension (MES) et de pré-traitements sur la croissance de *Sinorhizobium meliloti* dans des boues primaires et secondaires de Black Lake. Les résultats obtenus ont démontré qu'un pré-traitement acide à pH 2 (obtenu avec du H_2SO_4) sous une concentration de 0,325% MES (boues primaires), augmentait le nombre maximal de bactéries passant de $11,10x10^9$ UFC/ml (boues non traitées à 1,3% MES) à $13,00x10^9$ UFC/ml (boues traitées 0,325% MES). De plus, le traitement alcalin de 100 mequiv.poids/L NaOH à 0,65% MES avait augmenté le rendement des cellules à $21,00x10^9$ UFC/ml représentant ainsi le meilleur compte bactérien obtenu dans cette expérience. En effet, les résultats étaient moins probants avec les boues secondaires car le meilleur compte cellulaire était de $9,8x10^9$ UFC/ml avec 0,4% MES et un pré-traitement à pH 2. Ben Rebah concluait qu'il n'y avait pas d'amélioration de la croissance avec l'augmentation des matières en suspension dans les boues secondaires sans pré-traitement. Finalement, il a été observé que *S.meliloti* produit dans des boues traitées conservait sa capacité à noduler la luzerne.

1.4.3 Effet des conditions d'entreposage

Les effets du milieu de croissance, du support, de la température et de la période de stockage sur la survie de *S. meliloti* ont été réalisés par Ben Rebah et al. (2001). Les boues secondaires de la CUQ et le milieu standard (YMB) avaient été utilisées pour la croissance des bactéries alors que les boues déshydratées de la station d'épuration de Jonquière, la tourbe et un mélange de tourbe et de boues servaient de support (carrier). Les résultats ont prouvé que la boue offrait une meilleure protection pour la survie des rhizobia durant la phase de congélation-décongélation à -20°C que le milieu standard. Cette étude suggérait également la possibilité d'utiliser la boue comme support (comme c'est présentement le cas avec la tourbe) parce qu'elle avait un potentiel similaire ou plus élevé que la tourbe à supporter la survie de *S. meliloti.* Par contre, le type de milieu de culture utilisé pour la croissance bactérienne (YMB ou boue) affectait les dénombrements cellulaires dans

les supports. En effet, il semblait préférable d'employer une culture de rhizobia ayant poussé dans des boues plutôt qu'une culture ayant poussé dans le milieu standard (YMB) pour inoculer la boue déshydratée servant de support. Pour tous les supports à l'exception de la tourbe inoculée avec une culture de rhizobia ayant poussé dans les boues, les résultats démontraient que les concentrations de cellules viables demeuraient supérieures à $1x10^8$ cellules/g de boues et/ou tourbe sèche pour une durée de 80 jours à une température de 4 et 25°C.

1.4.4 Efficacité des inoculants produits dans des boues

Ben Rebah et al. (2001) a également étudié l'efficacité d'inoculants (liquides et solides) de *S. meliloti* produits dans les boues d'épuration (utilisées comme milieu de culture et comme support) en les comparant aux inoculants produits dans le milieu standard (YMB). La luzerne a été inoculée avec des inoculants (solides et liquides) et cultivée dans des pots contenant deux types de sol (Kamouraska : sol argileux et Saint-André : sol sableux). Cette étude a démontré que les inoculants à base de boue (*S. meliloti* ayant poussé dans les boues) ont le même potentiel que ceux à base du milieu standard (YMB). De plus, les inoculants à base de boues pouvaient être utilisés sous forme liquide ou solide sans pour autant nuire à l'efficacité de la nodulation. Selon Ben Rebah, les boues pouvaient également être utilisées comme fertilisant organique avec de grands effets bénéfiques sur la concentration cellulaire, la nodulation, le poids sec et le contenu en azote de la luzerne.

1.4.5 Contrôle du pH et ajouts de nutriments

Ben Rebah et al. (2001) ont effectué des expériences en fermenteur où il avait observé que le pH n'était pas un facteur limitant. En effet, dans un fermenteur où le pH n'était pas contrôlé, l'augmentation du pH de 7 à 8,85 ne semblait influencer ni les taux de croissance ni les concentrations cellulaires. Cependant, Ben Rebah mentionnait que les facteurs limitants lors de l'utilisation des boues comme milieu de culture ne sont pas connus à cause de la complexité de sa composition.

De plus, les produits à haute valeur ajoutée peuvent également bénéficier de l'ajout de certains éléments nutritifs afin de combler certaines déficiences de la matière première brute. Bissonnette et al. (1986) a démontré que l'addition d'extrait de levure et de phosphate à raison de 1g/l et 0,5 g/l respectivement dans le petit-lait (cheese whey) augmentait considérablement le nombre de cellules ($1x10^{10}$) de rhizobia par rapport à la population bactérienne normalement observée en production

industrielle. De plus, Ben Rebah et al. (2001) ont observé que des boues secondaires supplémentées avec de l'extrait de levure (4 g/l) et du glycérol (7,5 g/l) influençaient positivement le nombre de cellules et le temps de génération de rhizobium. En effet, les concentrations cellulaires obtenues de $16{,}5 \times 10^9$ UFC/ml sont largement supérieures aux concentrations normalement atteintes lors de productions industrielles (5×10^9 UFC/ml) (Subba Rao, 1982).

En somme, la composition des biosolides étant très complexe et variable, l'ajout de facteurs de croissance peut s'avérer efficace afin d'améliorer la performance de la fermentation. Cependant, ces suppléments sont coûteux pour la production à grande échelle (ex. extrait de levure). L'idéal serait de faire un ajout qui ne nécessite aucun frais supplémentaire et qui fournit une grande quantité de facteurs de croissance. Les résidus de levure des brasseries (Brewery spent yeast ou Brewery byproducts) peuvent donc s'avérer une alternative intéressante.

1.5 Levures résiduelles des brasseries

L'industrie de la bière est en croissance au Canada. Selon Statistique et Industrie Canada (http://strategis.ic.gc.ca), le taux de croissance des expéditions a été de 2,5 % entre 1990 et 1998. Parmi toutes les industries des boissons canadiennes comprenant l'industrie du vin, les distilleries, et les boissons douces, ce sont les brasseries (Ale, Bière en bouteille, cannettes et sous pression, brassage, Lager, Porter, Stout, liqueurs à base de malt) en 1998 qui remportent la palme avec environ 3,5 milliards de dollars en expéditions.

Les levures sont largement utilisées comme nourriture ou ingrédients de nourriture. Ils représentent une excellente source de protéines, vitamines (le complexe B) et d'éléments minéraux essentiels. En effet, selon Pachebo (1997), le contenu protéique de la biomasse de levure (*Saccharomyces* sp.) atteint presque 49 % et contient une riche composition en acides aminés dont les plus importants sont l'acide glutamique et aspartique avec respectivement 13,15 et 11,98 g/100g de protéines. Traditionnellement, la levure a été utilisée dans différents procédés de fermentation (comme par exemple les brasseries), dans les boulangeries et comme ingrédients d'enrichissement sous forme d'extraits de levure et d'autolysat. Comme dans tous les procédés industriels, la production de bière génère des eaux usées. Il s'agit plus précisément de résidus de levure (spent yeast). On retrouve donc dans ces boues une grande concentration de levures possédant un fort potentiel nutritif qui peuvent être par la suite récupérées et employées pour de nouvelles applications.

De nombreuses études sont effectuées afin de trouver des applications profitables pour les résidus de levure. Les sources traditionnelles de vitamines et de protéines pour la formulation des diètes de volailles telles les vitamines pré-mixées, les repas à base de poissons, de viandes et d'os deviennent de plus en plus dispendieuses pour les pays en voie de développement (Gondwe et al., 1999). C'est pourquoi la valorisation des sous-produits des brasseries, comme les résidus de levure, sont grandement considérés comme source alternative de nourriture destinée aux animaux. En effet, une étude a démontré que les résidus de levure issus des brasseries pouvaient remplacer 20 % des protéines de soja nécessaire dans une diète préparée pour des poulets (Carias et Milan, 1996). Parmi les autres applications, Al-shahwani et Al-rawi (1989) ont tenté d'utiliser le matériel extracellulaire (polysaccharides) de bactéries naturellement présentes dans les eaux usées des brasseries, comme un aide coagulant avec l'alun dans le traitement des eaux. De plus, les résidus de levure ont également été utilisés comme supplément à des boues de papeterie afin de produire de la nourriture répondant aux exigences de croissance de vers de terre (*Lumbricus terrestris*). Ces vers de terre résidant dans le sol ont une valeur potentielle comme agent de restauration de sol contaminé (Butt, 1993). Selmer-Olsen et Sorhaug (1998) ont pour leur part effectué une étude comparative de la croissance de *Lactobacillus plantarum* dans du petit-lait supplémenté d'un autolysat de résidus de levure ou d'extrait de levure commercial. Ils ont déterminé que l'addition de résidus de levure autolysés dans le petit-lait, selon leur méthode, représentait une source stimulatrice pour la croissance *L. plantarum* et la production de métabolites à grande échelle. La valorisation des résidus de levure offre donc plusieurs possibilités et son potentiel nutritif est bien établi. Elles pourraient peut-être remplacer l'extrait de levure commercial.

1.6 Hypothèse de travail

Il a été démontré que les rhizobia pouvait utiliser différentes sources de carbone et d'azote dont celles provenant des boues d'épuration et ce, tout en conservant leur potentiel symbiotique. Il a également été démontré que les boues d'épuration constituent un substrat disponible et qui contient les éléments nutritifs nécessaires pour supporter la croissance de rhizobium. Le présent travail soulève donc l'hypothèse qu'il est possible de produire un inoculum commercial à base de rhizobium à partir de boues industrielles et municipales comme milieu de culture après avoir déterminé les conditions optimales de fermentation pour la souche à l'étude.

Des expériences en erlenmeyers sont effectuées afin de déterminer les meilleures conditions de croissance qui seront testées en bioréacteurs. Plusieurs paramètres sont ainsi analysés tels

l'influence de l'âge de l'inoculum, de l'utilisation d'une pré-culture, du volume de l'inoculum, des matières en suspension, des traitements alcalins et de l'ajout de résidus de levure dans les boues d'épuration municipales. Une des étapes de ce projet pour optimiser le procédé de fermentation consiste à évaluer la possibilité que les résidus de levure améliorent le nombre maximal de bactéries de *S. meliloti* ainsi que le taux maximal de croissance spécifique et ce, tout en conservant de bons indices nodulaires. Il est également possible que ces paramètres s'améliorent lors de fermentations effectuées en bioréacteur où les conditions de croissance telles l'aération, le pH, l'agitation et la température sont aisément contrôlées. En somme, il s'agit d'évaluer une stratégie d'optimisation de la fermentation d'un inoculum commercial à base de rhizobium produit dans des biosolides.

1.7 Objectifs de recherche

Le but de ce travail est l'optimisation du procédé de fermentation pour la production d'un inoculum commercial de rhizobium en évaluant la capacité d'utiliser des résidus de levure comme suppléments aux boues d'épuration et en déterminant les paramètres optimaux en bioréacteur. Des boues d'épuration municipales issues du traitement secondaire des eaux usées et industrielles (résidus de levure brassicole) seront donc à l'étude. Les meilleurs résultats évalués en erlenmeyers seront sélectionnés et repris en bioréacteur. Les objectifs spécifiques de ce travail sont les suivants :

- Analyser les caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration et des résidus de levure.
- Optimiser la capacité de *Sinorhizobium meliloti* à croître dans les biosolides.
- Étudier l'influence de l'âge de la culture de départ
- Étudier l'influence de l'utilisation d'une pré-culture
- Étudier l'influence du volume de l'inoculum
- Étudier l'influence des matières en suspension dans différents biosolides
- Étudier l'effet d'un pré-traitement des biosolides sur la production de *S. meliloti*
- Étudier l'effet de la croissance de *S. meliloti* dans des résidus de levure

- Étudier l'influence de l'ajout de résidus de levure aux boues secondaires comme supplément nutritif.
- Produire du rhizobium en bioréacteur de 15 et 150 litres dans les conditions optimales.
- Évaluer l'efficacité nodulaire de l'inoculum produit en bioréacteur sur des plantes cultivées en sachets.

CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Boues d'épuration (BS) et résidus de levure (RL)

Les boues d'épuration proviennent de l'usine de traitement des eaux usées de la communauté urbaine de Québec (CUQ, Québec). Il s'agit de boues secondaires recueillies à la suite du traitement de biofiltration. Après l'échantillonnage, les boues sont stérilisées à 121°C pendant 30 minutes et conservé à 4 °C jusqu'à leur utilisation. La période d'entreposage n'excède pas un mois.

Les caractéristiques physico-chimiques analysées sur les boues sont les solides totaux (ST), les solides totaux volatils (STV), les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVES) déterminées en laboratoire selon les protocoles standards pour l'analyses de l'eau (APHA, 1989). En suite, les boues sont digérées complètement et dosées au spectromètre à émission de plasma *Vista Ax CCO Simlutaneous ICP*-AES de Varian (É.U.) pour le dosage du phosphore total (P_t) et des métaux selon les méthodes accréditées par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1989).

Le carbone total et l'azote total (C_t et N_t) sont pour leur part mesurés sur l'analyseur d'azote-carbone-soufre *Leco CHNS-932* de Leco Corporation (É.U.) selon la méthode d'analyse des sédiments (applicable aux boues d'épuration) accréditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1986). L'azote organique (N_{org}) est obtenu en soustrayant la valeur de $N\text{-}NH_3$ de celle de l'azote total. Les concentrations en azote ammoniacal ($N\text{-}NH_3$) et en ortho-phosphates ($P\text{-}PO_4^{3-}$) sont mesurées avec un auto-analyseur *Lachat Quickchem FIA+ 8000 series* de Zellweger analytics (É.U.) selon les protocoles fournis par le manufacturier.

L'analyse du carbone organique total (COT) est obtenue à partir des échantillons bruts et à partir des échantillons centrifugés pour les valeurs de carbone organique dissous (COD). Dans les deux cas, le contenu en COT et COD est mesuré à l'aide d'un analyseur *TOC-5000A* de Shimadzu (Japon). La demande chimique en oxygène est pour sa part analysée à partir des échantillons bruts homogénéisés et dosées avec un *spectrophotometer* de Varian (É.U).

Quant aux résidus de levure, ils proviennent de la brasserie Unibroue à Chambly (Québec). Ces résidus sont recueillis directement dans le fond de la cuve de fermentation utilisée pour le processus de brassage de la bière. Les résidus sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30

minutes et entreposés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les mêmes analyses de caractérisation décrites plus haut sont effectuées sur les résidus de levure.

2.2 Souche bactérienne et milieux de culture

Le microorganisme employé est *Sinorhizobium meliloti* souche A2 provenant de la collection d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (Sainte-Foy, Québec). Les milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'enrichissement des bactéries sont stérilisés à 121°C pendant 15 minutes après que leur pH soit ajusté à 7. Les bactéries sont cultivées sur une gélose à base de mannitol et d'extrait de levure YMA (Yeast Mannitol Agar, Annexe-1) qui est incubée dans une étuve à une température de 29°C pendant 2 jours. La souche bactérienne est conservée sur ces géloses à 4°C. Les suspensions bactériennes sont observées au microscope photonique en contraste de phase (X1000).

2.3 Fermentation

2.3.1 Préparation de l'inoculum

Les inocula sont préparés dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de bouillon à base de mannitol et d'extrait de levure YMB (Yeast Mannitol Broth; Annexe-1) Ces bouillons sont stérilisés à l'autoclave *Labo Autoclave* (Sanyo) à une température de 121°C pendant 20 minutes. Après un refroidissement, ils sont ensemencés avec une colonie bactérienne cultivée sur une gélose YMA avec l'aide d'un fil à boucle. Après 15 à 20 heures (phase exponentielle) d'incubation à une température de 29°C et une agitation de 200 rpm dans un incubateur *Environ-Shaker* (Lab-Line), les boues d'épuration et/ou les résidus de levure sont inoculées (cas d'une inoculation en une étape; ex. : YMB → Boues). Dans le cas de l'utilisation d'une pré-culture (inoculation en deux étapes; ex. : YMB → Boues →Boues), un transfert supplémentaire est effectué dans un milieu identique à celui qui sera utilisé lors de la fermentation. Un inoculum de 3% (v/v) contenant environ 1 x 10^9 UFC/ml est utilisé pour la plupart des expériences effectuées en erlenmeyers et en bioréacteurs.

2.3.2 Les pré-traitements alcalins

Les expériences avec un pré-traitement alcalin consistent en une hydrolyse de 100 ml de biosolides dans lesquels de l'hydroxyde de sodium (NaOH 2N) a été ajouté. Selon les expériences, le pH est ajusté à 10 et à 12. L'hydrolyse se déroule sur une période de 24 heures à température ambiante sous agitation constante (200 rpm). Après le pré-traitement, le pH est ajusté à 7 avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4 2N) et le milieu de culture est stérilisé à 121°C pendant 30 minutes. Finalement, le milieu de culture est refroidi sous la hotte en condition stérile avant d'introduire l'inoculum et de débuter la fermentation.

2.3.3 Expériences en erlenmeyers

Lors des expériences en erlenmeyers de 500 ml, un volume de 100 ml de biosolides stériles (autoclave *Labo Autoclave* (Sanyo) à une température de 121°C pendant 30 minutes) est utilisé. Le pH des milieux de culture est mesuré à l'aide d'un pH mètre Orion 420A et ajusté avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4 2N) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH 2N) selon les expériences. Les fermentations sont effectuées dans un incubateur *Environ-Shaker* (Lab-Line) à température (29°C) et agitation (200 rpm) contrôlées. Les échantillonnages sont effectués à toutes les trois heures pendant la première journée de fermentation (phase de latence et exponentielle) et environ aux 12 heures pour le reste de la fermentation (fermentation de 48 heures). Des échantillons de 0,5 ml sont prélevés et transférés dans des tubes contenant une solution saline de 0,85% de NaCl pour effectuer les séries de dilution servant au dénombrement bactérien. Les échantillons sont conservés à -20°C dans une bouteille en plastique contenant des billes de verre (5 mm de diamètre) stériles pour les reprises des dénombrements cellulaires si nécessaire. Toutes les expériences sont effectuées en duplicata.

2.3.4 Expériences en bioréacteurs (15 et 150 L)

Des volumes de 10 et 85 litres de biosolides sont utilisés pour chaque expérience effectuée dans les bioréacteurs de 15 et 150 litres respectivement. Avant le début de la fermentation, une solution anti-mousse (polyéthylène glycol 10%) est ajoutée à une concentration de 0,2% (v/v) dans les biosolides et ceux-ci sont stérilisés à même le bioréacteur à 121°C pendant 30 minutes. La stérilisation se fait avec la vapeur de la chaudière 48KW (Caloritech Inc.). Les biosolides sont inoculés aseptiquement par une embouchure sur le dessus du bioréacteur. Il s'agit de fermentations

de 48 heures effectuées à 29°C, à pH7 et sous agitation constante de 200 à 500 rpm. L'agitation peut varier afin de conserver plus de 20% d'oxygène dissous dans le milieu de culture. Les débits d'air peuvent également varier de 2 à 6 LPM (litre par minute) pour conserver un taux acceptable d'oxygène dissous. Comme pour les fermentations en erlenmeyers, l'échantillonnage se fait aux 3 heures pour les 24 premières heures et aux 12 heures pour les 24 dernières heures. Des échantillons de 10 à 20 ml sont prélevés aseptiquement dans des tubes de verre stériles contenant des billes de verre (6 mm de diamètre) pour effectuer les dénombrements bactériens. Un volume de 0,5 ml est utilisé pour les séries de dilutions et la balance est conservée à -20°C dans une bouteille en plastique Nalgène stérile contenant des billes de verre pour la reprise de comptes cellulaires.

Les fermentations sont effectuées dans des bioréacteurs en acier inoxydable de 15 et 150 litres (Biogénie) où les paramètres tels la température, l'agitation, l'aération et le pH sont contrôlés à l'aide du logiciel FIX Version 5.5 sur un ordinateur Nec Pentium 100 Mhz. Le contrôle de la température se fait grâce à une boucle de circulation de l'eau chauffée par un élément. Le pH est contrôlé automatiquement ou manuellement avec des pompes Easy-Load® modèle 7518-60 (Masterflex®) avec lesquelles les solutions acides (H_2SO_4 1N) et/ou basiques (NaOH 1N) sont distribuées dans les bioréacteurs. L'aération est contrôlée via un débitmètre massique (Durkert) alors qu'un système d'agitation à vitesse variable muni d'un tachymètre permet le contrôle de l'agitation. Un brise-mousse mécanique permet de contrôler l'accumulation de mousse qui peut se former au cours de la fermentation. Une solution de polyéthylène glycol 10% est également ajoutée au milieu de culture avec l'aide d'une pompe Easy-Load® 7518-60 (Masterflex®) afin de minimiser la formation de mousse. Des analyseurs numériques (Rosemount® Analytical Inc., model 1854A) recueillent les données d'oxygène dissous et de pH à toutes les 6 secondes. Toutes les données de ces paramètres sont enregistrées automatiquement grâce au programme informatique FIX Version 5.5. Les expériences sont toutes effectuées en duplicata.

2.4 Dénombrement des cellules

Le dénombrement des bactéries est effectué avec la méthode de comptage en plaque sur gélose (plate count agar). Des dilutions successives (0,5 : 4,5) des échantillons recueillis lors des fermentations sont réalisées jusqu'à 10^{-7} dans une solution NaCl 0,85%. Un volume de 0,1 ml des trois dernières dilutions est étalé en triplicata avec un râteau de verre stérilisé à l'éthanol 70% sur un milieu gélosé à base d'extrait de levure et de mannitol avec Congo rouge (0,25%) (Yeast Mannitol Agar; YMA). Chaque échantillon et dilution sest mélangé sur un agitateur Maxi Mix II

avant leur utilisation. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 29°C pendant 2 jours dans une étuve Imperial II Incubateur (Lab-Line). Le dénombrement des unités formatrices de colonies (UFC) est effectué uniquement sur les Pétri contenant de 30 à 300 colonies et les comptes sont rapportés en cellules par ml. Lors des fermentations, le taux de croissance spécifique (μ) est calculé selon la formule suivante :

$$m = (\log N_{t2} - \log N_{t1}) / (t_2 - t_1) = \mu$$

$$\ln 2N_o - \ln N_o = \mu \times t_g$$

$$\mu = 0{,}693 / t_g$$

Le temps de génération (t_g) qui représente le temps nécessaire par une population microbienne pour doubler en nombre ($2N_o$) dans un milieu est déterminé avec la pente (m) de la phase de croissance exponentielle. La pente de la courbe est préalablement évaluée sur papier millimétrique.

2.5 Détermination du coefficient de transfert volumétrique

La mesure du coefficient de transfert volumétrique (K_La) exprime la capacité d'oxygénation du milieu contenu dans le bioréacteur. Les résultats doivent être interprétés avec précaution car le taux de transfert d'oxygène dans un réacteur dépend de plusieurs facteurs. Il faut tenir compte de la température, la viscosité du milieu, la vitesse d'agitation, du taux d'aération, la géométrie de l'agitateur et du fermenteur (Aiba et al., 1973). Il existe plusieurs méthodes pour déterminer expérimentalement le K_La dans les fermentations dites submergées (méthode au sulfite, méthode au glucose oxydase, méthode statique et dynamique). La méthode dynamique est sélectionnée dans le présent travail pour estimer ce coefficient. Il s'agit d'une méthode qui consiste à suivre l'évolution de la concentration en oxygène dissous dans le temps avec l'aide d'une sonde polarographique (Aiba et al., 1973) Tous les 3 heures, avant les échantillonnages, l'aération est momentanément arrêtée et la concentration en oxygène dissous est notée à toutes les 10 secondes. L'aération est interrompue pendant un intervalle de temps suffisamment court pour que le métabolisme microbien ne soit pas affecté. La diminution de la concentration en oxygène dissous est généralement linéaire et causée par la consommation d'oxygène. Ensuite, avant que la concentration en oxygène dissous atteigne la valeur critique (20% d'oxygène dissous), l'aération est reprise et c'est un retour aux concentrations normales. Le K_La peut ainsi être estimé en utilisant la formule suivante :

$$C_L = -1 / K_La \, [dC / dt + Q_{02}X] + C^*$$

Le K_La représente le coefficient de transfert d'oxygène (h^{-1}); C_L est la concentration initiale (avant de fermer l'aération) en oxygène dissous dans le milieu de culture (mmol/L); C^* représente la concentration saturante en oxygène dans le milieu de culture (mmol/L) et $Q_{02}X$ est la vitesse de consommation d'oxygène ($mmol.l^{-1}.h^{-1}$). Les estimations de $Q_{02}X$ et de K_La sont dépendantes de la section de la courbe utilisée lors de l'évaluation. Un exemple de calcul est illustré en annexe-6.

2.6 Tests de nodulation

Les tests de nodulation sont effectués dans des sachets de croissance contenant 30 ml d'une solution nutritive (solution de Hoagland, Annexe-1). Les graines de luzerne sont stérilisées en surface en les trempant successivement dans du méthanol 95% pendant 30 secondes et dans de l'eau Javel (NaOCl 5%) pendant 10 minutes. Après 5 rinçages consécutifs avec de l'eau distillée stérile, 12 graines sont immédiatement semées dans les sachets. On laisse ensuite les semences germer pendant deux jours à 20°C à l'obscurité. Les plantules sont par la suite sélectionnées pour en conserver cinq d'apparence uniforme par sachet. L'inoculation des plantules est effectuée avec 1 ml de la culture bactérienne par sachet. Les sachets sont alors incubés dans une chambre de croissance possédant une photopériode de 16 heures avec une température de 20°C le jour et 15°C la nuit pendant 28 jours. Un arrosage est effectué deux fois par semaine avec de l'eau distillée stérile. Lorsque la période d'incubation est terminée, il est ensuite possible de déterminer l'indice nodulaire. Il s'agit d'une valeur qualitative qui tient compte de la grosseur, de la couleur et du nombre de nodules. Des valeurs sont affectées pour ces trois variables selon le tableau 2.

Tableau 2 : Détermination de l'indice nodulaire

Nombre de nodules	**Valeur (A)**
Pas de nodules	0
Peu de nodules	2
Beaucoup de nodules	3
Grosseur des nodules	**Valeur (B)**
Gros	3
Moyen	2
Petit	1
Couleur des nodules	**Valeur (C)**
Rose	2
Blanc	1
Indice nodulaire = A x B x C ≤ 18	

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1 Caractérisation des biosolides

Cette première section des résultats vise à déterminer les caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration secondaires et des résidus de levure. Ces analyses permettent d'évaluer les différents éléments contenus dans les biosolides pouvant favoriser ou nuire à la croissance de *Sinorhizobium meliloti* A2. Au total, cinq caractérisations ont été effectuées sur 3 échantillonnages de boues secondaires et 2 échantillonnages de résidus de levure. Ces analyses sont également primordiales afin de déterminer si la teneur de certains métaux lourds dépasse la limite obligatoire pour l'épandage agricole.

3.1.1 Les boues d'épuration secondaires

Le tableau 3 montre que les boues d'épuration possèdent plusieurs éléments essentiels pour supporter la croissance bactérienne. En effet, des rapports C_t/N_t variant de 6,13 à 6,70 de boues sèches sont obtenus offrant ainsi un bon contenu de substances carbonées et azotées. Les boues présentent suffisamment de phosphore total afin de subvenir au besoins nutritionnels des micro-organismes. Il est par contre important de préciser que les valeurs de $P\text{-}PO_4^{3-}$ ont été analysées au-delà de 48 heures après l'échantillonnage. Le tableau 3 montre également que les boues sont riches en sels minéraux comme le calcium, le magnésium et le sodium qui s'avère tous important pour la croissance de *S. meliloti* A2. Des rapports de Ca/Mg variant de 4,57 à 6,97 de boues sèches sont obtenus. Plusieurs métaux, tels le zinc, le manganèse et le fer qui sont requis pour la croissance, se retrouvent en quantité appréciable dans les boues secondaires de la CUQ. Le tableau 4 présente pour sa part, les teneurs limites en métaux lourds pour les boues destinées à l'épandage. Il est intéressant de remarquer que pour les boues secondaires de la CUQ, aucuns métaux ne dépassent ni les limites établies par le Ministère de l'Environnement du Québec et ni celles établies par la communauté Économique Européenne (Tableau 4).

3.1.2 Les résidus de levure

Les résidus de levure provenant de la brasserie Unibroue présentent également une abondance de substances carbonées et azotées pouvant servir à la croissance de *S. meliloti* A2. Le tableau 3 montre des rapports C_t/N_t en moyenne semblables à ceux que l'on retrouve dans les boues secondaires. Par contre, en ce qui concerne les sels minéraux, il y a beaucoup moins de calcium et le magnésium est pratiquement deux fois moins et le sodium environ cinq fois moins concentrés dans les résidus de levure que dans les boues. Les rapports Ca/Mg sont de 0,48 et de 1,26 de résidus secs. Bien que, encore une fois, aucun métal lourd n'excède la limite requise pour l'épandage agricole, certains métaux, pourtant essentiels au bon développement de *S. meliloti* A2, se retrouvent en très faible concentration. C'est le cas pour le zinc dont les valeurs se retrouvent sous les limites de la méthode de détection. Le fer est environ cinq fois moins concentré et le manganèse est environ quatre fois moins concentré que dans les boues.

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des boues secondaires de la CUQ et des résidus de levure (spent yeast) de chez Unibroue.

Paramètres	Types de boues - dates d'échantillonnages				
	Boue secondaire (déc.) CUQ (25/04/2002)	Boue secondaire (déc.) CUQ (16/11/2001)	Boue secondaire CUQ (21/10/2001)	Résidus de levure Unibroue (21/02/2002)	Résidus de levure Unibroue (18/10/2001)
ST (g/l)*	31,6	19,6	6,6	130,7	172,2
STV (g/l)*	23,4	16,3	5,3	60,8	129,0
MES (g/l)*	30,8	15,4	4,3	87,5	118,6
MVES (g/l)*	22,0	12,9	3,5	29,5	87,6
Ct (mg/kg)*	391 200	395 700	391 900	448 900	457 500
Nt (mg/kg)*	60 000	64 600	58 500	59 100	82 200
Rapport Ct/Nt (mg/kg)*	6,5	6,1	6,7	7,6	5,6
N-organique (mgN/kg)*	52 684	49 901	26 464	57 062	77 422
$N\text{-}NH_4^+$ (mgN/kg)*	7 316	14 699	32 036	2 038	4 778
DCO (mg O_2 consommé/L)	4 073	1 160	1 595	22 186	22 420
COT (mg/L)	2 963	1 683	2 080	60 260	86 400
COD (mg/L)	1 974	940	908	46 810	60 280
Pt (mg/kg)*	13 203	12 950	16 593	7 803	6 451
$P\text{-}PO_4^{3-}$ (mgP/kg)*	1 592	4 837	6 895	6 511	1 152
Ca (mg/kg)*	30 631	20 457	27 494	1 335	2 526
Mg (mg/kg)*	4 398	4 475	4 052	2 792	2 011
Rapport Ca/Mg (mg/kg)*	7,0	4,6	6,8	0,48	1,26
Mn (mg/kg)*	275	235	267	62	60
K (mg/kg)*	6 732	6 055	5 928	8 935	6 825
Fe (mg/kg)*	26 070	19 625	21 392	4 579	4 301
Na (mg/kg)*	9 773	8 422	10 947	2 138	2 145
Cu (mg/kg)*	412	341	439	23,1	29,2
Zn (mg/kg)*	880	940	945	< 0,002	< 0,002
Pb (mg/kg)*	41,1	41,8	41,5	2,9	2,2
Mo (mg/kg)*	8,0	7,3	9,8	3,6	5,9
Al (mg/kg)*	20607	20863	20380	292	251
Cr (mg/kg)*	173,2	101,5	67,0	7,3	7,6
Cd (mg/kg)*	2,6	2,1	3,0	0,2	0,3
S (mg/kg)*	3849	3826	4356	1749	2340
Ni (mg/kg)*	20,3	19,1	15,0	5,4	4,7

*: Résultats présentés sur une base de boues sèches

Tableau 4 : Teneurs limites recommandées en métaux lourds dans les matières résiduelles fertilisantes destinées à l'épandage.

Métaux	Concentrations recommandées (mg/kg de boue sèche)	
	MENVQ[1]	C.E.E.[2]
Al	a	a
Cd	10-15	20-40
Cr	500-1000	a
Cu	600-1000	1000-1750
Fe	a	a
Mn	1500-3000	a
Ni	100-180	300-400
Pb	300-500	750-1200
Zn	1750-2500	2500-4000

[1] : Ministère de l'Environnement du Québec (1991).
[2] : Communauté Économique Européenne (McGrath et al., 1994)
a : Aucune limite

3.2 Fermentations de boue en erlenmeyers

L'optimisation d'un procédé de fermentation se réalise par la détermination des meilleurs paramètres permettant à une souche bactérienne une croissance optimale pour un milieu de culture donné. Plusieurs facteurs peuvent influencer la fermentation comme la nature et la composition du milieu de culture, les conditions de croissance (température, agitation, pH, l'aération etc.), la nature de la bactérie utilisée ainsi que l'âge et la qualité de l'inoculum et l'échelle de fermentation. C'est pourquoi des expériences en erlenmeyers de 100 ml sont nécessaires avant d'effectuer des fermentations à plus grande échelle. Toutes ces expériences ont été effectuées en duplicata.

Cette section présente donc les résultats de ces expériences en erlenmeyers réalisées avec des boues d'épuration secondaire (BS) et des résidus de levure (RL). Les conditions de croissance initiales ont été déterminées dans la littérature (Allen et Allen, 1950; Bergersen, 1961 et Burton, 1979) et par les chercheurs du groupe de recherche en assainissement de l'INRS-ete (Ben Rebah, 2001). Dans un premier temps, l'influence de l'âge de la culture de départ, de l'utilisation d'une pré-culture, du volume de l'inoculum ainsi que des matières en suspension sont étudiées. Ensuite, des expériences sont effectuées concernant l'effet de différents traitements alcalins sur les biosolides avant le début des fermentations. Finalement, des tests afin d'évaluer la possibilité d'utiliser les résidus de levure comme milieu de culture alternatif sont également réalisés.

3.2.1 Influence de l'âge de l'inoculum

Dans cette expérience, des colonies de *S. meliloti* A2 sont prélevées sur des géloses solides (YMA) avec un fil à boucle et des cultures de départ Yeast Mannitol Broth (YMB) sont ensemencées. Ensuite, des nouveaux bouillons YMB sont inoculés à partir d'inocula âgées de 22 et 46 heures. Ces bouillons fermentent ensuite pour une période de 48 heures. Cette expérience vise donc à déterminer l'intervalle de temps de la phase exponentielle de *S. meliloti* A2 dans le milieu YMB à partir d'inocula âgés de 22 et 46 heures préalablement préparé encore une fois dans le milieu YMB. Des inocula à 3% (v/v) ont été utilisés pour cette expérience.

La figure 4 montre une légère phase de latence entre 0 et 7 heures pour le milieu contenant l'inoculum âgé de 46 heures pour ensuite donner place à la phase exponentielle entre 7 et 17 heures de fermentation. Pour ce qui est du milieu contenant l'inoculum âgé de 22 heures, *S. meliloti* entre en phase exponentielle pratiquement immédiatement après l'inoculation et se termine après environ 21 heures. La concentration en cellules après 48 heures de fermentation varie très peu entre le milieu contenant l'inoculum de 22 heures ($3{,}33 \times 10^9$) et celui contenant l'inoculum de 46 heures ($2{,}97 \times 10^9$). La phase exponentielle pour le milieu ensemencé avec un inoculum de 22 heures commence plus tôt et est également plus longue mais les deux fermentations atteignent leurs concentrations maximales en cellules après 30 heures ($3{,}26 \times 10^9$). Dans les expériences suivantes, des inocula âgés entre 15 et 20 heures sont utilisés.

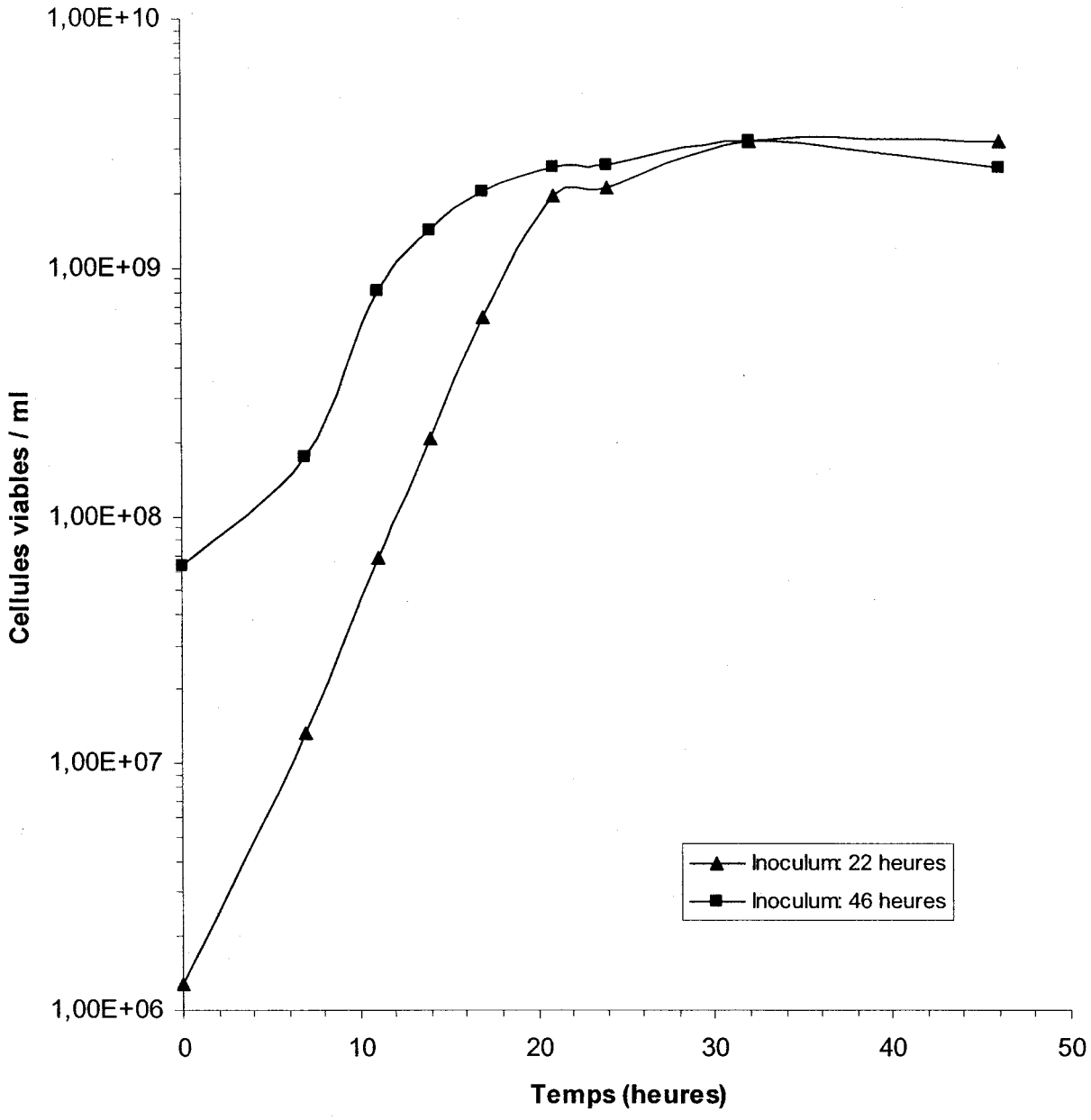


Figure 4 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml du milieu YMB avec un inoculum âgé de 22 et un autre âgé de 46 heures.

3.2.2 Influence de l'utilisation d'une pré-culture dans la boue

Cette expérience vise à déterminer si l'usage d'une pré-culture permet à *S. meliloti* de s'adapter plus rapidement aux boues d'épuration secondaire de la CUQ (0,66% MES) et ainsi améliorer ses caractéristiques de croissance. *S. meliloti* A2 est cultivé dans une culture de départ en milieu YMB

afin d'inoculer des boues secondaires. Dans une première expérience l'évolution de la fermentation est suivie immédiatement après que l'inoculum préparé dans YMB soit transféré dans la boue (inoculation en une étape). Dans l'autre expérience, la culture de départ est subséquemment transférée dans la boue qui est à son tour utilisée comme inoculum final (pré-culture). Par la suite, un deuxième transfert est effectué dans des boues ayant les mêmes caractéristiques (inoculation en deux étapes). La figure 5 montre que *S. meliloti* réagit favorablement à l'utilisation d'une pré-culture avec un taux de croissance spécifique de 0,32 h^{-1} (temps de génération de 2,2 heures) comparativement à 0,20 h^{-1} (temps de génération de 3,5 heures) pour la fermentation de *S. meliloti* sans l'utilisation de pré-culture. Par contre, après 48 heures, la concentration maximale de cellules est presque 1,5 fois plus élevée dans la fermentation sans pré-culture ($2,11 \times 10^9$ avec pré-culture et $3,15 \times 10^9$ sans pré-culture). De plus, dans les deux cas, aucune phase de latence n'est observée et après environ 30 heures de fermentation les deux cultures se rejoignent et atteignent la même concentration cellulaire.

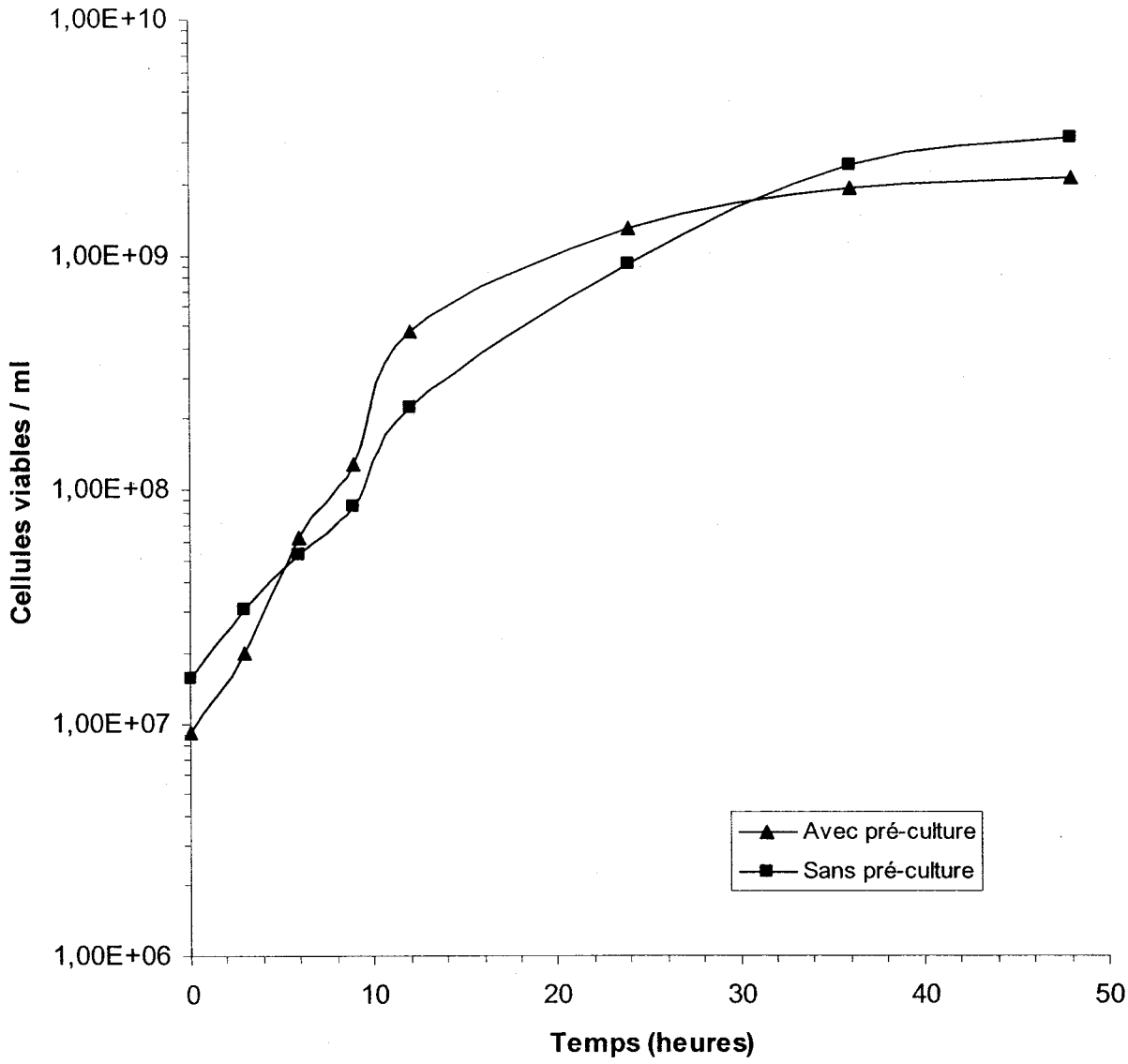


Figure 5 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec et sans l'utilisation d'une pré-culture.

3.2.3 Influence du volume de l'inoculum

Cette expérience vérifie l'effet de différentes concentrations d'inocula sur la croissance de *S. meliloti*. Des volumes de 0.3, 3, 6 et 12 ml ont été utilisés pour ensemencer des boues secondaires de la CUQ (0,66% MES) lors de fermentations de 48 heures (figure 6). Aucune pré-culture n'a été utilisée au cours de cette expérience (inoculation en une étape). L'inoculum à 0,3 % n'offre pas une croissance soutenue de *S. meliloti* puisque aucune phase exponentielle n'est observable pour ce

volume d'inoculation. Le nombre maximum de cellules viables de dépasse pas $8,15 \times 10^8$ cellules/ml après 48 heures.

Les fermentations contenant les inocula à 3 et 6 pour cent montrent, pour leur part, une courbe de croissance bactérienne presque semblable à l'exception d'une légère phase de latence à 3 % entre 0 et 4 h. La phase exponentielle pour la culture avec l'inoculum à 3 % se situe entre 5 et 18 h et entre 0 et 18 h pour celle avec l'inoculum à 6 %. Également, le nombre maximum de cellules viables après 48 h est légèrement supérieur avec l'inoculum à 3 % ($3,40 \times 10^9$) par rapport à celui à 6 % ($3,26 \times 10^9$). Les taux de croissances spécifiques n'ont pu être calculé à cause de l'insuffisance de points dans la partie de la courbe représentant la phase exponentielle.

Finalement, l'inoculum à 12 % montre une croissance de *S. meliloti* assez distincte dans les boues. Le nombre de cellules viables atteint rapidement l'ordre des 10^9 cellules/ml (après seulement 12 heures de fermentation). Par contre, la courbe montre ensuite une diminution prématurée du nombre de cellules viables/ml allant jusqu'à $9,8 \times 10^8$ après 24 h de fermentation. Par la suite, le nombre de cellules recommence à augmenter et atteint $2,30 \times 10^9$ cellules viables/ml après 48 heures. Pour les expériences qui suivent, des inocula à 3% (v/v) sont utilisés.

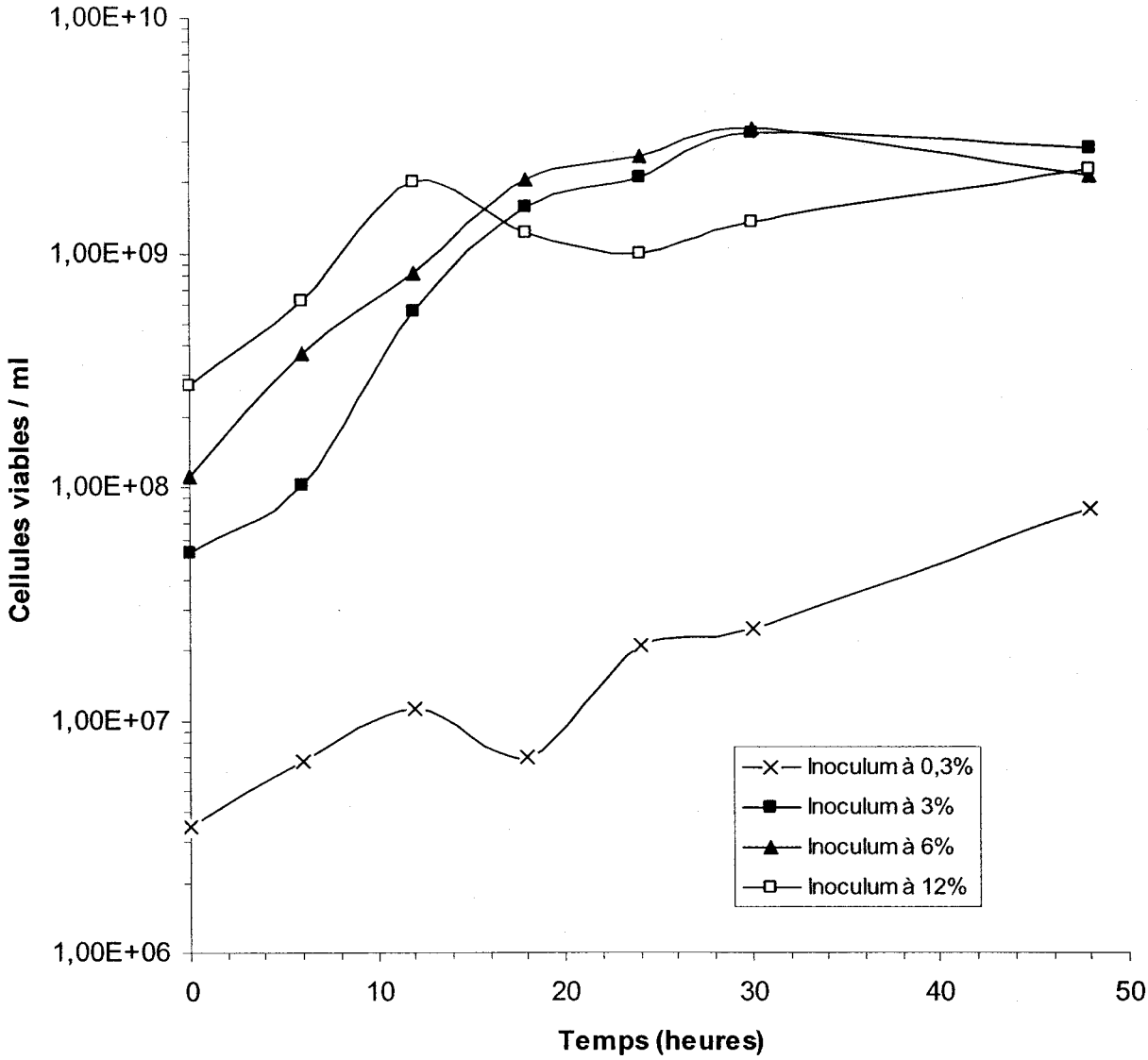


Figure 6 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec des inocula de 0,3, 3, 6 et 12 %.

3.2.4 Influence des matières en suspension

Cette expérience cherche à déterminer la meilleure concentration de matière en suspension pour la croissance de *S.meliloti* dans les boues secondaires de la CUQ. Les inocula de départ ont été préparés dans le milieu YMB (inoculation en une étape). Des concentrations de 0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 pour cent de MES ont été utilisées au cours de cette expérience. La figure 7 montre que les boues à 0,5 % offre le meilleur environnement de croissance avec un nombre maximum de cellules viables

/ ml de $5,55 \times 10^9$ après 48h et un taux de croissance spécifique de 0,30 h^{-1} (temps de génération de 2,3 heures). De plus, aucune phase de latence n'est observable. La fermentation à 1,0% de MES offre également des résultats positifs avec une concentration cellulaire de $4,15 \times 10^9$ après 48h. Par contre, le temps de génération (t_g) est presque deux fois plus long que dans le cas précédent avec une valeur de 4 heures et un taux de croissance spécifique de 0,17 h^{-1}. Encore une fois, aucune phase de latence n'est décelable dans les premières heures de la fermentation et la phase exponentielle se termine après environ 24 heures. Par la suite, les milieux de culture à 1,5 et 2,0 % de MES présentent de longues phases de latence s'étalant de 0 à 24 h et de 0 à 35 h respectivement. Une concentration cellulaire de $1,46 \times 10^9$ (à 1,5%) et de $5,75 \times 10^8$ cellules viables / ml (à 2,0%) après 48h.

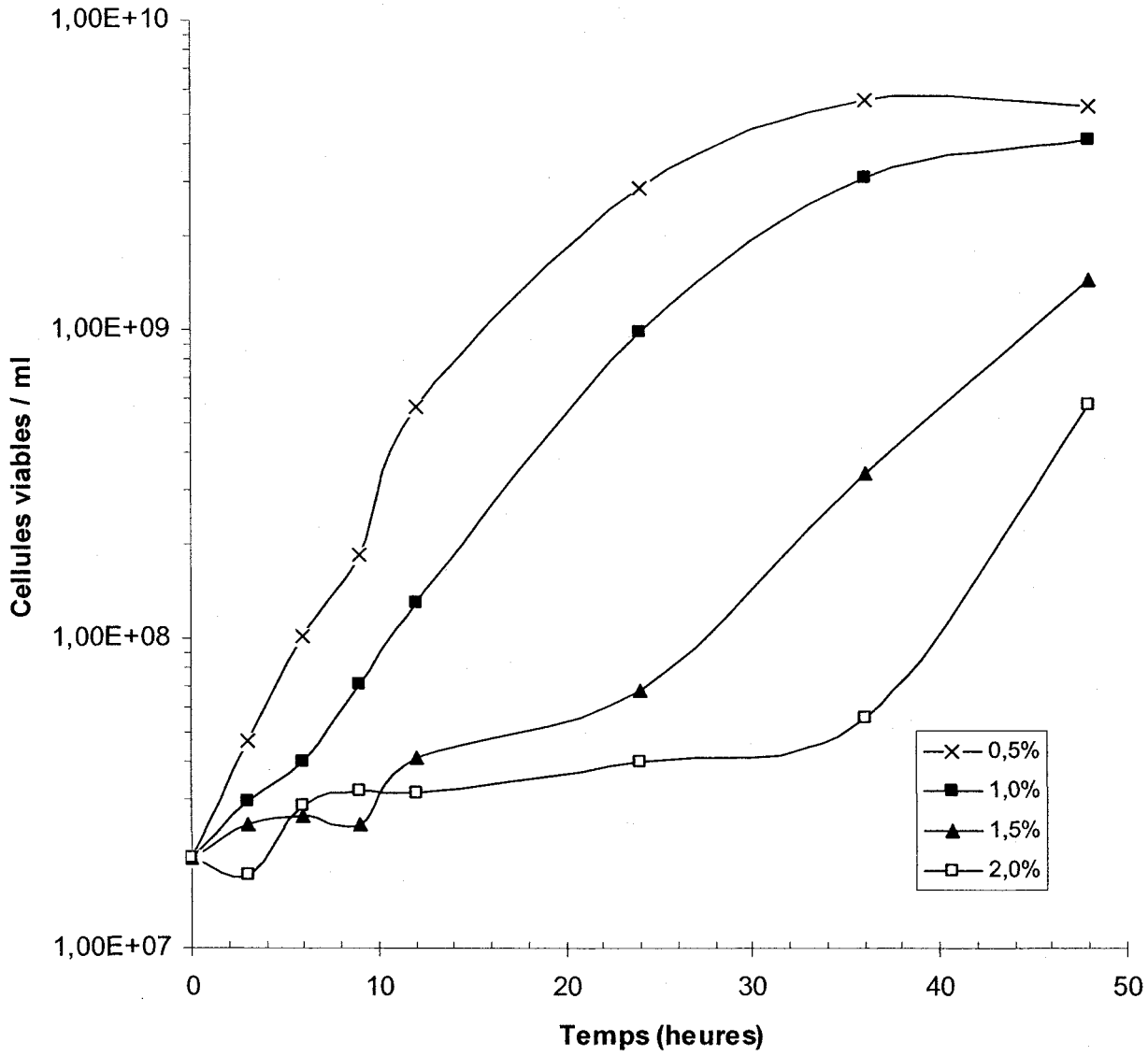


Figure 7 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) avec différentes concentrations de MES.

3.2.5 Influence des traitements alcalins

Les deux prochaines séries d'expériences visent à évaluer l'effet d'hydrolyse alcaline des boues secondaires de la CUQ par l'addition d'une solution basique de NaOH. Le pH des boues est ajusté à 10 et 12 pour une période de 24 heures sous agitation constante de 200 rpm et maintenu à une température de 29°C. Ensuite, les boues sont réajustées à pH 7, stérilisées, refroidies et inoculées pour le début de la fermentation. Les inocula sont préparés dans le milieu YMB (inoculation en une étape).

La figure 8 montre clairement que le traitement à pH 12 est bénéfique pour la croissance de *S. meliloti* dans les boues (0,5% MES). Après 48 heures de fermentation, une concentration cellulaire maximale de $5{,}05 \times 10^9$ UFC/ml (unité formatrice de colonies) est observée pour le milieu ayant subi un pré-traitement à pH 12 et de $1{,}08 \times 10^9$ et $1{,}18 \times 10^9$ UFC/ml pour les milieux avec pré-traitement à pH10 et sans pré-traitement (le témoin) respectivement. Il est intéressant de remarquer que pour les deux fermentations avec pré-traitement, une phase de latence est observée entre 0 et 4 heures (pré-traitement pH 12) et de 0 à 8 heures (pré-traitement pH 10) contrairement à la fermentation témoin (sans pré-traitement) qui, pour sa part, ne montre pas une phase de latence aussi prononcée.

Cette deuxième série d'expériences tente de vérifier si la concentration de matières en suspension influence la performance du pré-traitement alcalin. Des fermentations dans différentes concentrations de MES ont été effectuées avec le meilleur pré-traitement alcalin (pH12) déterminé dans l'expérience précédente. La figure 9 montre que les boues ayant des concentrations de 0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 % en MES ont obtenu une production bactérienne maximale de $2{,}6 \times 10^9$, $3{,}5 \times 10^8$, $3{,}05 \times 10^8$ et $1{,}45 \times 10^8$ cellules viables/ml respectivement après 48 heures. Il est intéressant de remarquer la présence d'une longue phase de croissance exponentielle sur les courbes de la figure 8 et 9 pour les fermentations ayant des conditions de croissance semblables (MES : 0,5% et pré-traitement pH 12) variant de 0 à 30 heures. Toutefois, toujours en comparant les deux mêmes courbes, aucune phase de latence n'est observable sur la courbe de la figure 9 par rapport à celle de la figure 8.

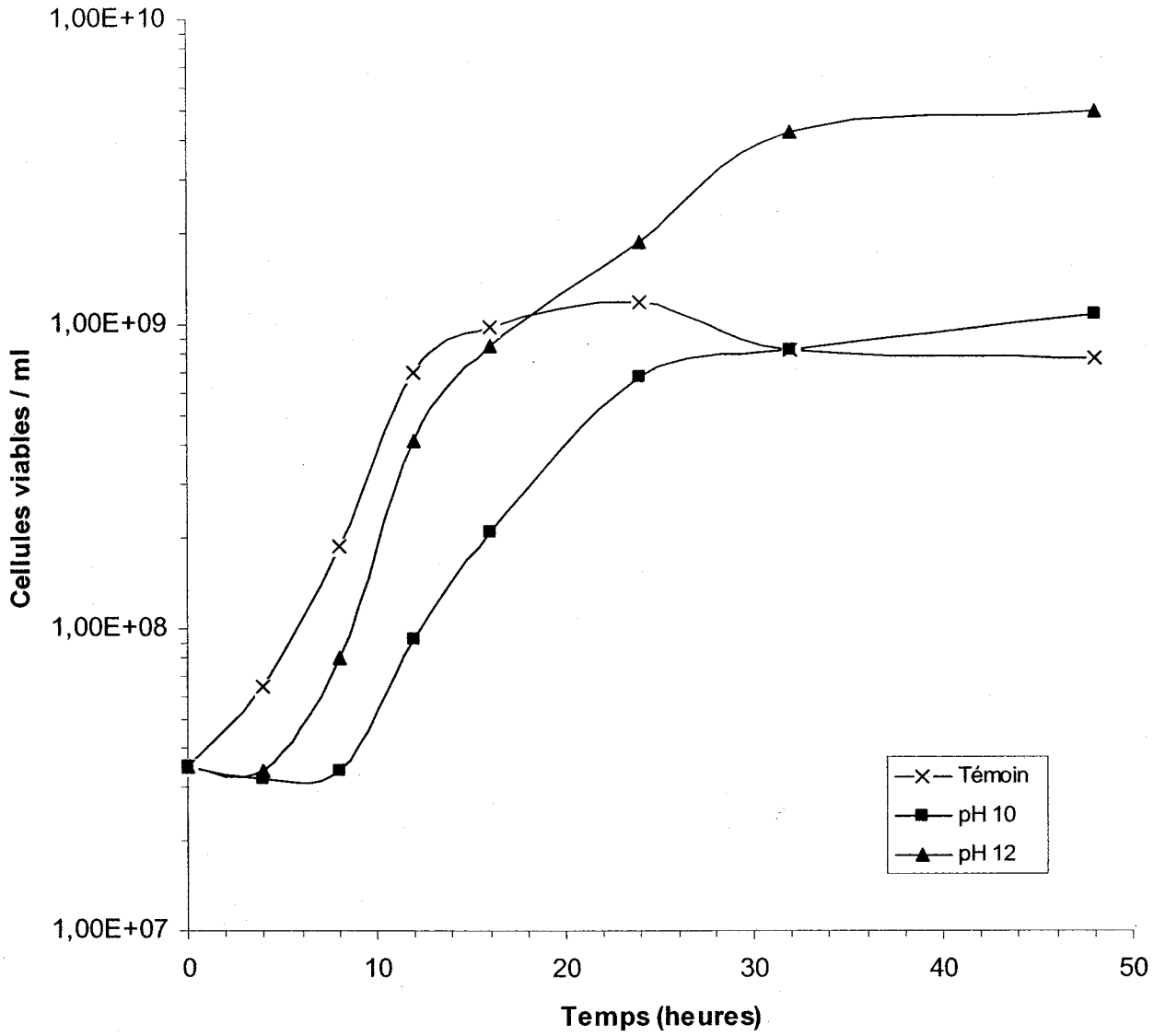


Figure 8 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitement alcalins lors de trois fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5%.

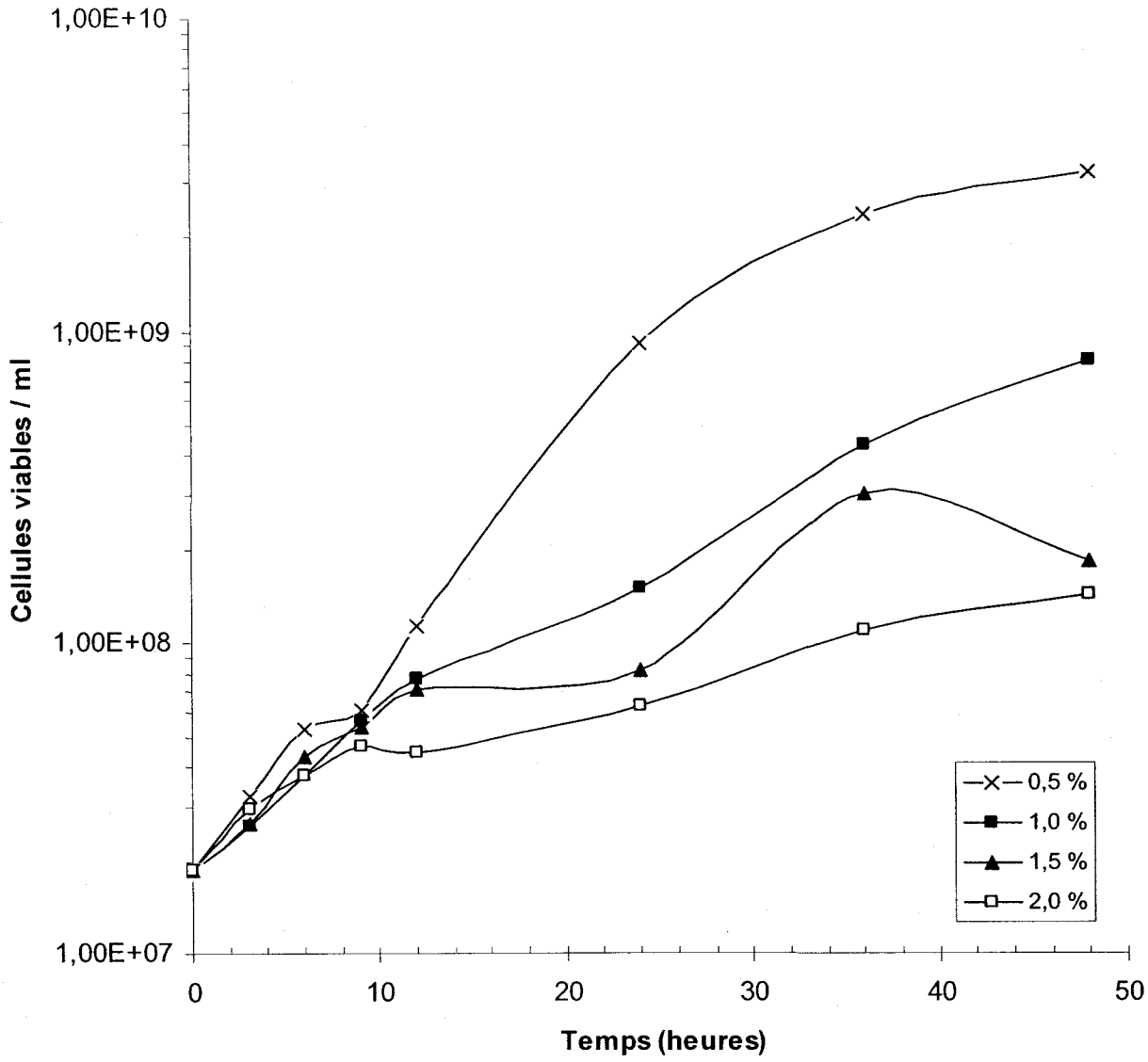


Figure 9 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitements alcalins à pH 12 lors de quatre fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (BS) de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5; 1,0; 1,5 et 2,0%.

3.2.6 Fermentations dans les résidus de levure

Cette série d'expériences a été effectuée afin de vérifier la possibilité d'utiliser des résidus de levure comme milieu de culture alternatif. La croissance de *S. meliloti* a donc été évaluée dans différentes concentrations (% de MES) de résidus levure. Aucune pré-culture n'a été utilisée dans ces expériences (inoculation en une étape) et les inocula étaient produits dans le milieu YMB.

La figure 10 montre que les concentrations de 1, 2, 5 et 10% de MES ont obtenu respectivement $1{,}43 \times 10^9$, $1{,}44 \times 10^9$, $1{,}14 \times 10^9$ et $6{,}50 \times 10^7$ cellules viables/ml après 48 heures de fermentation. Les courbes de croissance à 1 et 2% montrent une légère phase de latence (entre 0 et 5 heures) par rapport à celle de la courbe à 5% qui est plus prononcée (entre 0 et 7 heures). Après 24 heures de fermentation, les milieux à 1 et 2% avaient déjà atteint les 10^9 UFC/ml alors que ce n'était pas le cas dans le milieu à 5%. Aucune croissance n'est observable pour le milieu à10% de MES.

Dans la deuxième expérience qui est représentée par la figure 11, l'influence de pré-traitements alcalins à pH10 et 12 sur les résidus de levure à 1% de MES (meilleures conditions selon figure 10) ont été analysés. Les traitements d'hydrolyse ont été réalisés selon la méthode décrite précédemment (voir matériels et méthodes). Les inocula ont été préparés dans le milieu défini YMB.

Le milieu ayant subi un pré-traitement à pH 12 présente le meilleur dénombrement cellulaire avec une valeur de $8{,}25 \times 10^9$ cellules viables / ml alors que le témoin auquel aucun pré-traitement n'a été appliqué présente un dénombrement presque deux fois moins élevé avec une valeur de $4{,}95 \times 10^9$ cellules viables / ml après 48 heures de fermentation. Le milieu traité à pH 10 n'offre aucune différence significative par rapport à celui à pH 12 avec une valeur de $7{,}35 \times 10^9$ cellules viables / ml. Les trois courbes de croissance présentent des phases de latence entre 0 et 4 heures. La fermentation avec pré-traitement à pH12 présente une phase exponentielle qui s'étend entre 4 et 16 heures pour ensuite donner place à une courte phase stationnaire entre 16 et 24 heures et finalement, la croissance bactérienne semble reprendre par la suite jusqu'à la fin de la fermentation. Le milieu avec pré-traitement à pH10, pour sa part, montre une croissance exponentielle plus longue s'étalant de 4 à 24 heures. Par la suite, la croissance semble légèrement diminuer jusqu'à la fin de la fermentation sans jamais passer par une phase stationnaire. Le témoin (sans pré-traitement, pH7) montre une phase exponentielle de 4 à 16 heures et, encore une fois, aucune phase stationnaire n'est observée même après 48 heures de fermentation.

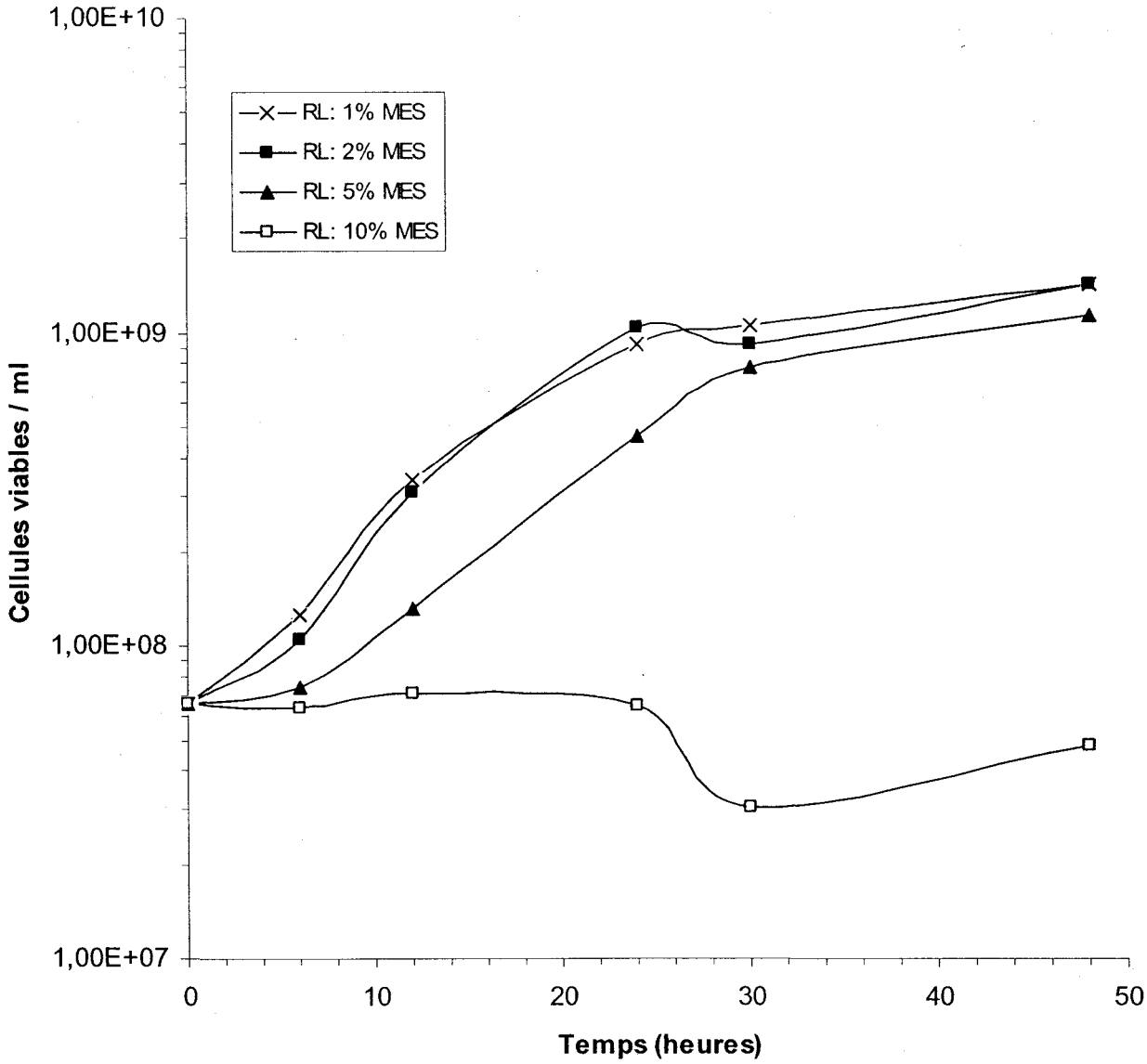


Figure 10 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (RL) (Unibroue 18/10/2001) avec différentes concentrations de MES.

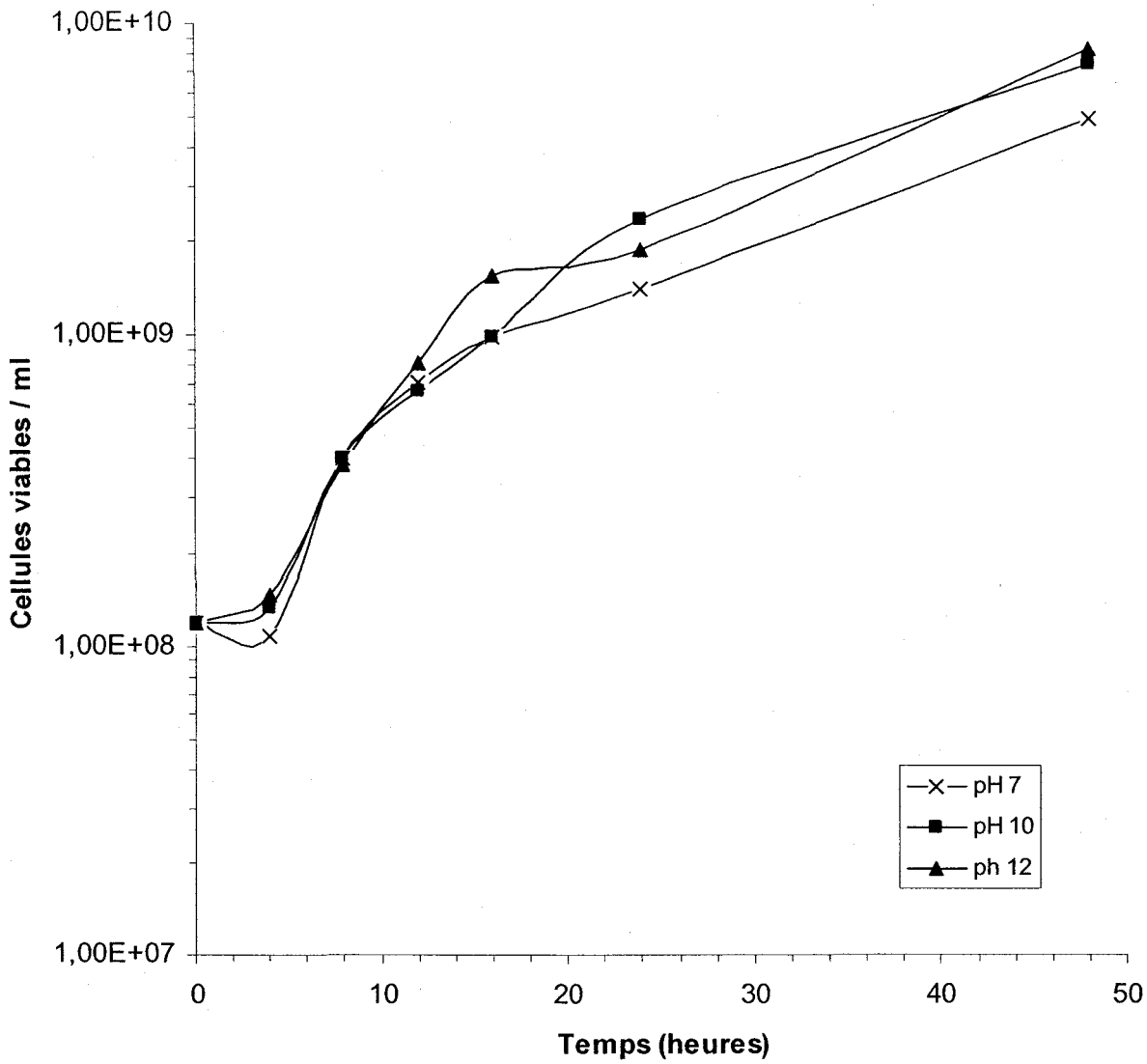


Figure 11 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à divers pré-traitements alcalins lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (Unibroue 18/10/2001) à 1% de MES.

3.2.7 Influence de l'ajout de résidus de levure au boue

Dans les trois prochaines séries d'expériences, la croissance de *S.meliloti* a été étudiée dans différents mélanges de boues d'épuration secondaires de la CUQ et de résidus de levure. Ces mélanges sont effectués en fonction de leur concentration en MES. Une fois le mélange complété, le pH du milieu est ajusté à 7 et une stérilisation est effectuée (121°C pendant 30 minutes). Les inocula utilisés sont produits dans le milieu YMB (inoculation en une étape). Les expériences

visent à démontrer la possibilité d'utiliser des résidus de levure comme supplément (ingrédient alternatif à l'extrait de levure commercial) aux boues secondaires d'épuration afin d'en améliorer les propriétés nutritives.

Le tableau 5 et la figure 12 montrent clairement que les ajouts de résidus de levure 0,46% et 0,91% offrent les meilleurs rendements de croissance avec des concentrations cellulaires maximales de $6,33 \times 10^9$ et $7,10 \times 10^9$ UFC/ml respectivement après 72 heures de fermentation. Ces valeurs sont plus du double que celle observée avec le témoin ($2,66 \times 10^9$ UFC/ml). Pour ce qui est des boues supplémentées d'extrait de levure commercial, les résultats sont moins probants avec une concentration cellulaire de $1,86 \times 10^9$ UFC/ml. Le tableau 5 montre également que pour les quatre fermentations effectuées, les temps de générations ainsi que les taux de croissances spécifiques sont sensiblement les mêmes. De plus, dans tous les cas, aucune phase de latence n'est observée et après environ 30 heures de fermentation toutes les phases de croissances exponentielles se terminent pour donner place aux phases stationnaires.

Tableau 5 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (Unibroue18/10/2001) ou d'extrait de levure (Difco) dans des boues secondaires (CUQ 16/11/2001) et évaluation du temps de génération ainsi que du taux de croissance spécifique lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers.

Milieux de culture				t_g	μ_{max}	X_{max}	t_{max}
MES total (%)	**BS MES (%)**	**RL MES (%)**	**EL (g)**	**(heures)**	**(heures^{-1})**	**UFC/ml (x10^9)**	**(heure)**
0,43	0,43	-	-	3,70	0,19	2,66	72
n.d.	0,43	-	4,00	3,40	0,20	1,86	26
0,89	0,43	0,46	-	3,10	0,22	6,33	72
1,34	0,43	0,91	-	3,20	0,22	7,10	72

BS : Boues d'épuration secondaire (CUQ)
RL : Résidus de levure (Unibroue)
EL : Extrait de levure commercial (Difco)
MES : Matières en suspension
t_g : Temps de génération (heures)
μ_{max} : Taux de croissance spécifique maximum (heures^{-1})
X_{max} : Nombre maximal de bactéries (UFC/ml)
t_{max} : Temps où le nombre maximal est atteint
n.d. : Non déterminé

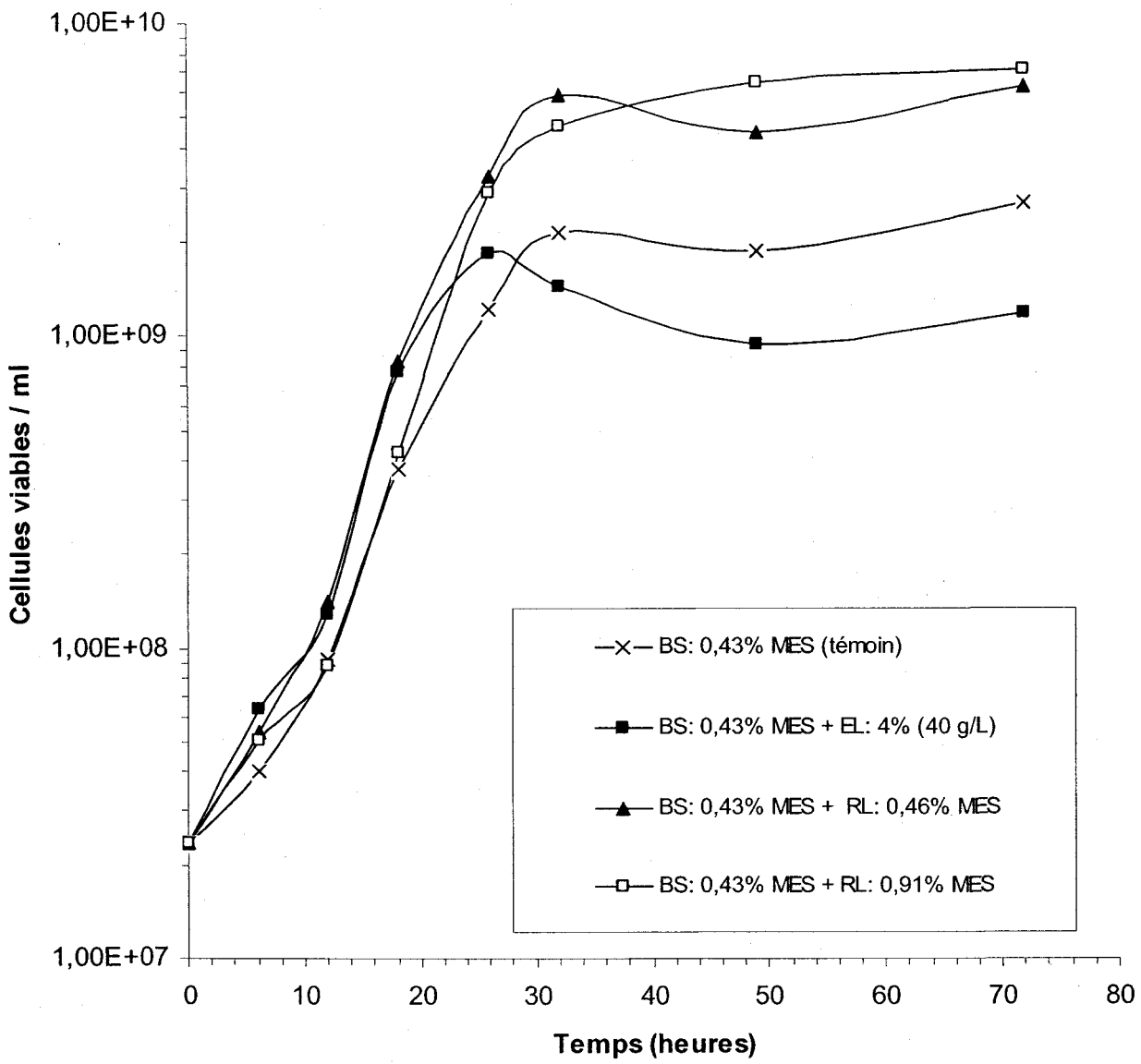


Figure 12 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (RL) (18/10/2001) ou d'extrait de levure (EL) commercial (Difco) dans des boues secondaires (BS) de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de biosolides.

Le tableau 6 et la figure 13 montrent des ajouts de résidus de levure variant de 0,1% à 0,5% pour des fermentations contenant des MES totaux de 0,5% à l'exception de la fermentation contenant un ajout de 0,5% qui a des MES totaux de 1,0%. C'est cette dernière fermentation qui présente la meilleure concentration cellulaire après 48 heures de fermentation ($8{,}7 \times 10^9$ UFC/ml). Par contre, il est intéressant de noter qu'il s'agit de la fermentation qui présente le moins bon taux de croissance spécifique (0,23 heure^{-1}) et le moins bon temps de génération (3,0 heures). Encore une fois, aucune

phase de latence n'est observée pour les quatre fermentations présentées dans la figure 13. Après seulement 20 heures de fermentation, les phases exponentielles de croissance sont dans tous les cas terminées. Le milieu de culture contenant le mélange 0,1% de boue secondaire et 0,4% de résidus de levure montre le meilleur temps de génération (1,9 heures) ainsi que le meilleur taux de croissance spécifique (0,36 heures^{-1}) tout en conservant une excellente concentration cellulaire de 6,25x10^{9}cellules viables / ml.

Tableau 6 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (Unibroue18/10/2001) dans des boues secondaires (CUQ 16/11/2001) et évaluation du temps de génération ainsi que du taux de croissance spécifique lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers.

Milieux de culture			t_g	μ_{max}	X_{max}	t_{max}
MES total (%)	**BS MES (%)**	**RL MES (%)**	**(heures)**	**(heures^{-1})**	**UFC/ml (x10^{9})**	**(heure)**
0,50	0,40	0,10	2,40	0,29	5,65	33
0,50	0,30	0,20	2,30	0,30	4,90	33
0,50	0,10	0,40	1,90	0,36	6,25	33
1,00	0,50	0,50	3,00	0,23	8,70	33

BS : Boues d'épuration secondaire (CUQ)
RL : Résidus de levure (Unibroue)
MES : Matières en suspension
t_g : Temps de génération (heures)
μ_{max} : Taux de croissance spécifique maximum (heures^{-1})
X_{max} : Nombre maximal de bactéries (UFC/ml)
t_{max} : Temps où le nombre maximal est atteint

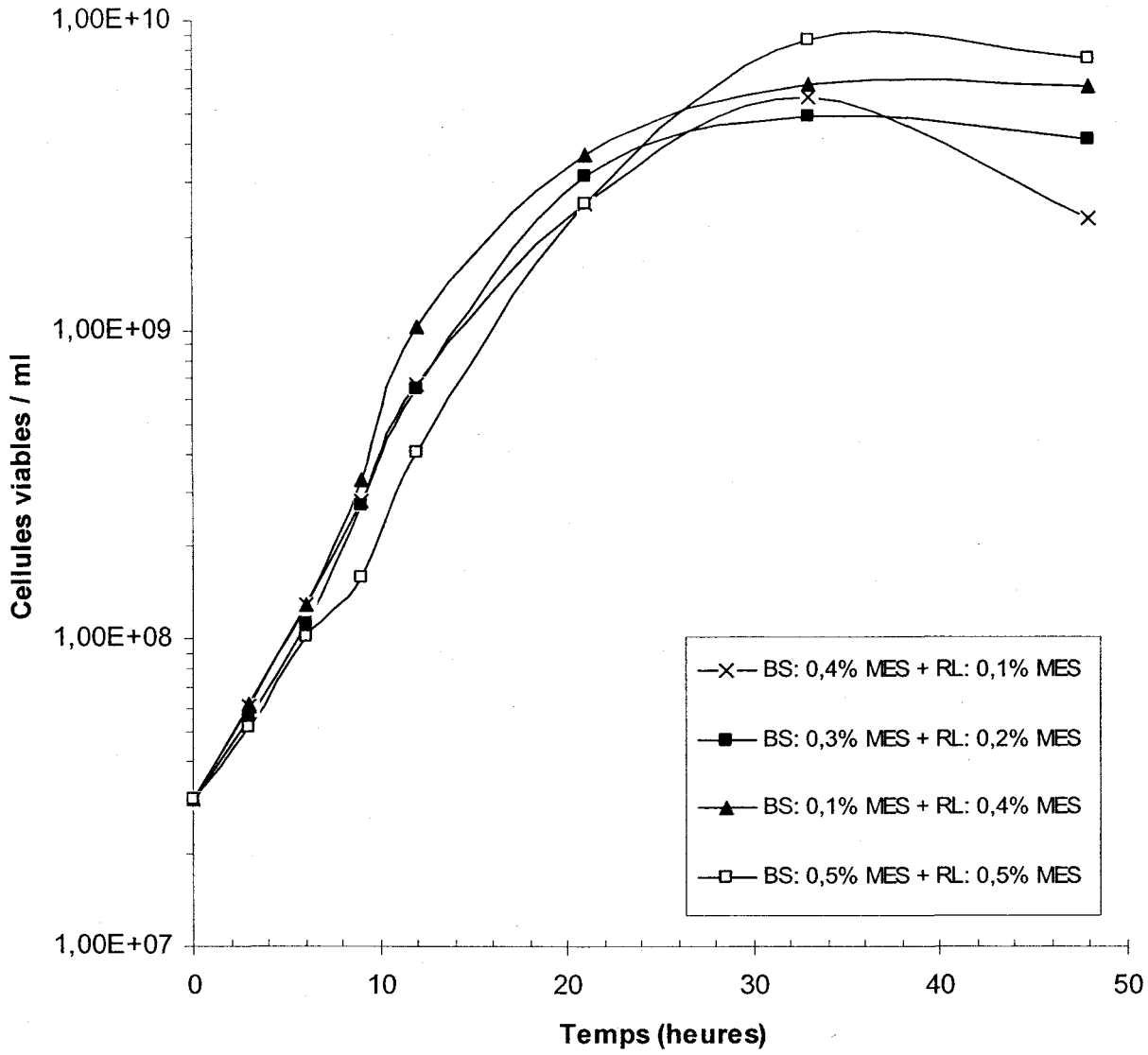


Figure 13 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (RL) (18/10/2001) dans des boues secondaires (BS) de la CUQ (16/11/2001) à différentes teneurs de MES lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de biosolides.

Cette dernière expérience présente quatre fermentations avec des matières en suspensions totales de 1,0% à l'exception de celle contenant l'ajout de 0,5% de résidus de levure qui a des MES totales de 1,5%. Le tableau 7 et la figure 14 montrent que le meilleur rendement de croissance est atteint avec le milieu contenant 0,8% de résidus de levure et 0,2% de boues secondaires ($7{,}5 \times 10^9$ UFC/ml). Ce milieu présente également le meilleur temps de génération (2,7 heures) et taux de croissance spécifique (0,26 heure^{-1}). Par contre, les deux autres mélanges ainsi que le témoin offrent des temps

de génération et des taux de croissance spécifique beaucoup moins intéressants avec des valeurs variant de 4,4 à 6,8 heures pour t_g et de 0,10 à 0, 16 heure^{-1} pour μ_{max}. Les quatre fermentations présentent une courte phase de latence de 0 à 3 heures. Par contre, après 48 heures de fermentation les trois milieux de culture supplémentés de résidus de levure offrent des concentrations cellulaires largement supérieures au témoin qui ne contient que des boues d'épuration.

Tableau 7 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (Unibroue18/10/2001) dans des boues secondaires (CUQ 16/11/2001) et évaluation du temps de génération ainsi que du taux de croissance spécifique lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers.

Milieux de culture			t_g	μ_{max}	X_{max}	t_{max}
MES total (%)	**MES BS (%)**	**MES RL (%)**	**(heures)**	**(heures^{-1})**	**UFC/ml (x10^9)**	**(heure)**
1,00	1,00	-	6,80	0,10	1,77	48,00
1,00	0,80	0,20	4,50	0,15	4,80	48,00
1,00	0,20	0,80	2,70	0,26	7,50	48,00
1,50	1,00	0,50	4,40	0,16	6,60	48,00

BS : Boues d'épuration secondaire (CUQ)
RL : Résidus de levure (Unibroue)
MES : Matières en suspension
t_g : Temps de génération (heures)
μ_{max} : Taux de croissance spécifique maximum (heures^{-1})
X_{max} : Nombre maximal de bactéries (UFC/ml)
t_{max} : Temps où le nombre maximal est atteint

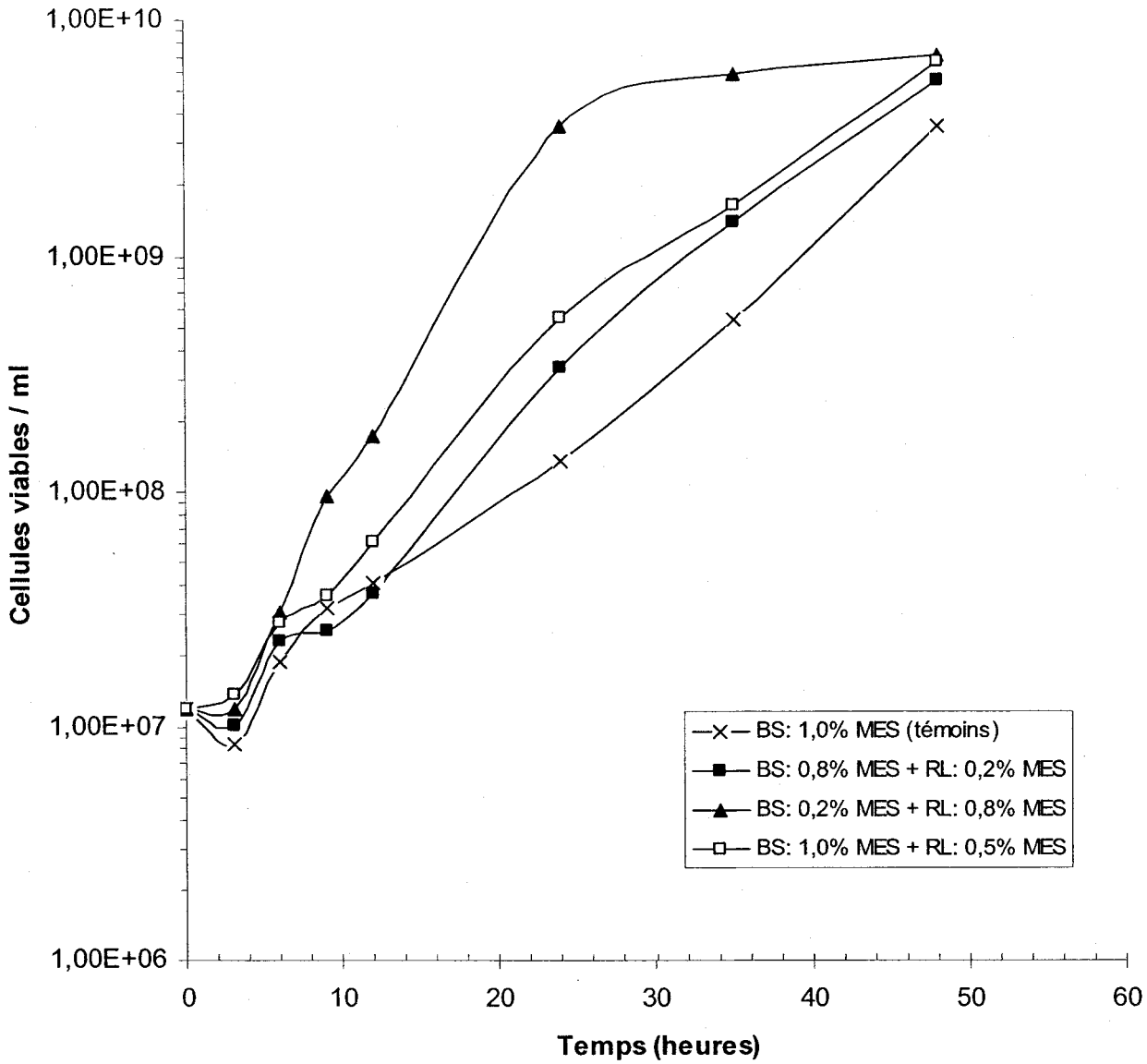


Figure 14 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (RL) (18/10/2001) dans des boues secondaire (BS) de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de biosolides pour des MES totaux variant de 1,0% à 1,5%.

3.2.8 Sommaire des résultats en erlenmeyers

Le tableau 8 présente une vue d'ensemble de toutes les expériences effectuées en erlenmeyers. Les fermentations dans les boues secondaires ont permis de démontrer que les conditions optimales de croissance constituaient en un milieu à 0,5% de MES avec un inoculum de 3%. Bien que la fermentation utilisant un inoculum de 6% donne un nombre maximal de cellules légèrement

supérieur à celle utilisant un inoculum de 3% ($3,40x10^9$ et $3,26x10^9$ respectivement), cette différence n'est pas suffisamment importante pour justifier l'utilisation d'un inoculum deux fois plus volumineux. L'utilisation d'une pré-culture et/ou d'un pré-traitement alcalin améliorent légèrement les comptes bactériens maximaux (UFC/ml). Les pré-traitements alcalins à pH12 semblent favoriser le développement de *S. meliloti* dans les boues d'épuration mais une variabilité subsiste dans la concentration maximale de cellule d'une expérience à l'autre pour les mêmes conditions laissant comprendre que ces résultats doivent être interprétés avec précaution. Cependant, les fermentations dans les boues secondaires présentent des concentrations de cellules viables / ml comparables ou supérieures à celles effectuées dans le milieu de culture commercial (YMB).

De plus, *S. meliloti* A2 peut croître dans les résidus de levure seuls et semble également réagir favorablement aux traitements alcalins bien que certaines nuances devront être apportées dans la discussion. Toutefois, les résultats sont beaucoup plus probants lorsque les résidus de levure sont utilisés comme additifs nutritionnels plutôt qu'en milieu de culture unique. En effet, le tableau 8 montre clairement que l'ajout de résidus de levure aux boues d'épuration améliore le rendement de croissance avec des concentrations cellulaires après 48 heures de fermentation allant jusqu'à $8,7x10^9$ UFC/ml. Dans tous les cas où un mélange est effectué, la concentration cellulaire s'avère supérieure au témoin, qui contient seulement des boues d'épuration, ainsi qu'au milieu synthétique à base d'extrait de levure commercial et de mannitol.

En somme, ces fermentations en erlenmeyer permettent de déterminer les conditions de croissance qui sont prises en considérations pour les expériences en bioréacteurs (15 et 150 litres). Les mélanges à 0,5% de résidus de levure (RL) et 0,5% de boues d'épuration secondaire (BS) ainsi que le mélange à 0,8% et 0,2% sont étudiés dans les bioréacteurs de 15 litres. Des fermentations sont préalablement réalisées avec le milieu YMB et uniquement des boues d'épuration secondaire afin de servir de contrôle pour l'ensemble des expériences réalisées dans les bioréacteur.

Tableau 8 : Résultats des meilleures fermentations en erlenmeyers.

Milieux de culture MES BS (%)	MES RL (%)	EL (g)	% Inoculum (V/V)	Pré-culture (oui/non)	Pré-traitement (pH)	μ_{max} (heure^{-1})	t_{max} (heure)	X_{max} UFC/ml ($1x10^9$)
Milieu défini YMB		1,00	3,00	oui	non	n.d.	30,00	3,26
0,50	-	-	3,00	oui	non	0,32	48,00	2,11
0,50	-	-	3,00	non	non	0,20	48,00	3,15
0,50	-	-	0,30	non	non	n.d.	48,00	0,81
0,50	-	-	3,00	non	non	n.d.	30,00	3,26
0,50	-	-	6,00	non	non	n.d.	30,00	3,40
0,50	-	-	12,00	non	non	n.d.	48,00	2,30
0,50	-	-	3,00	non	non	0,30	36,00	5,55
1,00	-	-	3,00	non	non	0,17	48,00	4,15
1,50	-	-	3,00	non	non	n.d.	48,00	1,46
2,00	-	-	3,00	non	non	n.d.	48,00	0,57
0,50	-	-	3,00	non	pH 7	n.d.	24,00	1,08
0,50	-	-	3,00	non	pH 10	n.d.	48,00	1,18
0,50	-	-	3,00	non	pH 12	n.d.	48,00	5,05
0,50	-	-	3,00	non	pH 12	n.d.	48,00	2,60
1,00	-	-	3,00	non	pH 12	n.d.	48,00	0,35
1,50	-	-	3,00	non	pH 12	n.d.	36,00	0,31
2,00	-	-	3,00	non	pH 12	n.d.	48,00	0,15
-	1,00	-	3,00	non	non	n.d.	48,00	1,43
-	2,00	-	3,00	non	non	n.d.	48,00	1,44
-	5,00	-	3,00	non	non	n.d.	48,00	1,14
-	10,00	-	3,00	non	non	n.d.	12,00	0,06
-	1,00	-	3,00	non	pH 7	n.d.	48,00	4,95
-	1,00	-	3,00	non	pH 10	n.d.	48,00	7,35
-	1,00	-	3,00	non	pH 12	n.d.	48,00	8,25
0,43	-	-	3,00	non	non	0,19	72,00	2,66
0,43	-	4,00	3,00	non	non	0,20	26,00	1,86
0,43	0,46	-	3,00	non	non	0,22	72,00	6,33
0,43	0,91	-	3,00	non	non	0,22	72,00	7,10
0,40	0,10	-	3,00	non	non	0,29	33,00	5,65
0,30	0,20	-	3,00	non	non	0,30	33,00	4,90
0,10	0,40	-	3,00	non	non	0,36	33,00	6,25
0,50	0,50	-	3,00	non	non	0,23	33,00	8,70
1,00	-	-	3,00	non	non	0,10	48,00	1,77
0,80	0,20	-	3,00	non	non	0,15	48,00	4,80
0,20	0,80	-	3,00	non	non	0,26	48,00	7,50
1,00	0,50	-	3,00	non	non	0,16	48,00	6,60

BS : Boues d'épuration secondaire (CUQ)
RL : Résidus de levure (Unibroue)
EL : Extrait de levure commercial (Difco)
MES : Matières en suspension
μ_{max} : Taux de croissance spécifique maximum (heures^{-1})
X_{max} : Nombre maximal de bactéries (UFC/ml)
t_{max} : Temps où le nombre maximal est atteint

3.3 Fermentations en bioréacteur

Les meilleures conditions de croissance déterminées en erlenmeyers sont reproduites pour les fermentations en bioréacteur de 15 litres. Ces expériences sont à leur tour utilisées afin d'établir les paramètres de croissance pour l'expérience effectuée en bioréacteur de 150 litres. Au total, cinq expériences ont été réalisées : une dans le milieu YMB, une dans les boues secondaires et trois dans des mélanges de boues secondaires et de résidus de levure (dont une a été effectuée dans le fermenteur de 150 litre). Pour une seule expérience, un problème avec la sonde d'oxygène d'un bioréacteur de 15 litre n'a pas permis un suivi exact de l'oxygène dissous pendant la fermentation.

3.3.1 Contrôles (15 L)

Cette expérience sert de contrôle pour l'ensemble des expériences en bioréacteur de 15 litres. La fermentation dans le bioréacteur 15A a été effectuée dans un milieu synthétique YMB et celle dans le bioréacteur 15B a été effectuée dans des boues secondaires de la CUQ à 0,5% de MES. Des inocula à 3% (V/V) et produits dans le milieu YMB sont utilisés (inoculation en une étape).

La figure 15 montre que la croissance de *S. meliloti* A2 atteint une concentration maximale de $3{,}4 \times 10^9$ cellules viables / ml, un temps de génération de 2,1 heures et un taux de croissance de 0,33 heure^{-1} dans le milieu YMB. Pour ce qui est de la fermentation dans les boues secondaires, une concentration de $2{,}1 \times 10^9$ cellules viables / ml, un temps de génération de 2,0 heures et un taux de croissance spécifique de 0,35 heures^{-1} sont obtenues. Ces valeurs sont donc sensiblement les mêmes pour les deux fermentations et elles concordent avec les résultats obtenus en erlenmeyers (voir tableau 7). Bien que le nombre de cellules maximal après 48 heures de fermentation dans les boues secondaires est inférieur à celui obtenu en erlenmeyers ($5{,}55 \times 10^9$ cellules viables / ml dans la meilleure expérience), il faut remarquer que le nombre initial de cellules était de l'ordre de 10^6 cellules viables / ml plutôt que 10^7 cellules viables / ml. Une phase de latence est observée entre 0 et 3 heures pour la fermentation dans les boues tandis que celle dans le milieu YMB commence immédiatement sa phase exponentielle après l'inoculation. Toutefois, dans les deux cas, la phase exponentielle se termine après environ 20 heures de fermentation et le nombre maximal de cellules viables / ml est atteint après environ 30 heures de fermentation.

Le tableau 9 présente pour sa part l'évolution de l'oxygène dissout (DO) dans les bioréacteurs 15A et 15B. On remarque que les concentrations de DO dans le milieu YMB et les BS sont relativement stables tout au long des fermentations. La vitesse de consommation de l'oxygène (OUR) dans le

milieu YMB augmente très peu au cours de la phase exponentielle variant de 0,12 à 0,23 mmol/l/h. Pour ce qui de la fermentation dans les BS, l'OUR augmente considérablement entre la sixième et la neuvième heure passant de 0,170 à 1,698 mmol/l/h. Cette vitesse de consommation de l'oxygène élevée se maintient tout au long de la phase exponentielle et chute par la suite vers la 18ème heure de fermentation. La capacité d'oxygénation (K_La) dans le milieu YMB semble augmenter graduellement au fur et à mesure que la concentration cellulaire augmente dans le milieu passant de 129 h^{-1} à 236 h^{-1} entre la 3ème et la 21ème heure de fermentation. Dans les boues, on remarque la même tendance mais l'augmentation du K_La commence plus tard dans le processus de fermentation (entre la 15ème et la 21ème heure). Pour ce qui de la vitesse de transfert d'oxygène (OTR), les valeurs sont plus importantes au cours de la phase exponentielle et ce, pour les deux milieux utilisés.

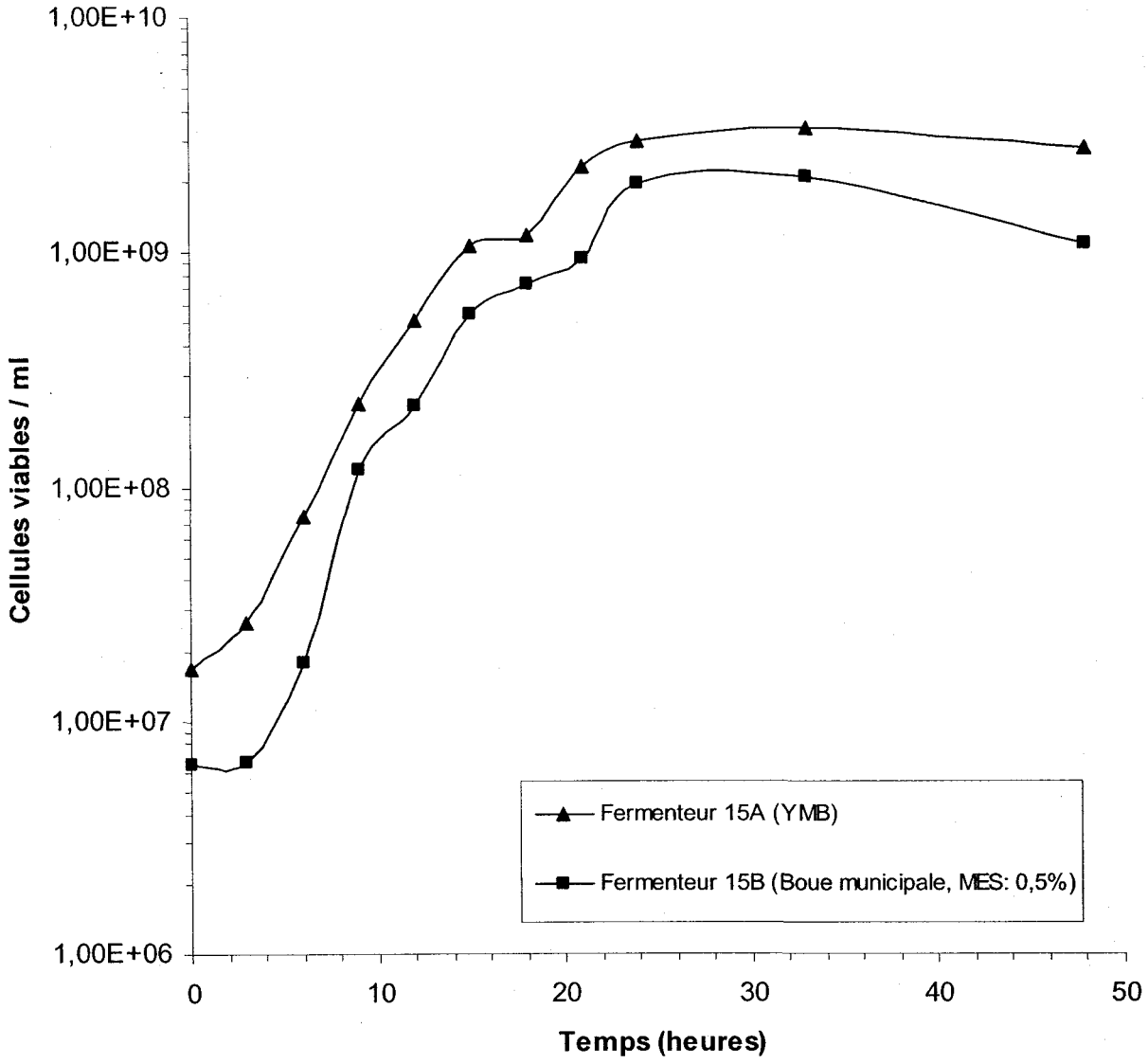


Figure 15 : Croissance de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant 10 litres de milieu synthétique YMB ou 10 litres de boues secondaire de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% de MES.

Tableau 9 : Évolution du coefficient de transfert volumétrique, de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un milieu synthétique (YMB) et dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) (BS) en bioréacteurs de 15 litres.

Temps (h)	K_La (h^{-1})	OTR (mmol/l/h)	OUR (mmol/l/h)	DO (%)	Débit (Litre/min.)	Agitation (RPM)
Fermenteur 15A (YMB)						
3	129,2	0,84	0,12	85,04	2,95	303,91
6	151,0	3,98	0,13	69,89	3,47	449,74
9	149,6	2,65	0,16	81,02	3,46	451,20
12	126,0	1,91	0,22	81,92	3,46	445,95
15	214,3	2,94	0,17	81,92	3,46	452,66
18	186,2	2,23	0,23	79,29	3,46	454,12
21	236,3	2,55	0,14	84,09	3,45	451,79
33	173,8	1,17	0,42	86,19	3,47	443,33
48	205,7	1,13	0,20	83,99	3,45	458,79
Fermenteur 15B (BS)						
3	102,9	0,479	0,111	96,84	2,97	301,58
6	65,5	0,034	0,170	98,12	2,97	303,33
9	53,3	0,658	1,698	99,77	2,97	302,74
12	54,2	1,479	1,437	99,27	2,97	299,83
15	51,4	1,220	1,165	99,14	2,96	300,99
18	84,3	0,062	0,697	99,17	2,96	304,49
21	136,2	0,124	0,493	99,24	2,96	300,12
33	222,3	0,186	1,344	78,87	n.d.	n.d.
48	102,9	0,997	0,069	75,54	n.d.	n.d.

K_La : Coefficient de transfert d'oxygène volumétrique
OTR : Vitesse de transfert d'oxygène (mmol/L/h) (OXYGEN TRANSFER RATE)
OUR : Vitesse de consommation d'oxygène (mmol/L/h) (OXYGEN UPTAKE RATE)
DO : Oxygène dissout
n.d. : Non déterminé

3.3.2 Ajout de résidus de levure (15 L)

Les expériences en erlenmeyers impliquant des ajouts de résidus de levure aux BS de la CUQ ont donné des résultats intéressants et les meilleurs mélanges ont été appliqués dans les bioréacteurs. Un mélange incluant 0,8% de RL et 0,2% de BS ainsi qu'un autre incluant 0,5% de RL et 0,5% de BS ont donc été réalisés. Des inocula à 3% (V/V) et produits dans le milieu YMB sont utilisés (inoculation en une étape).

La figure 16 montre une forte concentration en cellules viables pour le mélange à 0,5% MES de résidus de levure et 0,5% MES de BS avec une valeur de $6{,}30 \times 10^9$ UFC / ml après 30 heures de fermentation. Ce même mélange donne un temps de génération de 2,6 heures et un taux de croissance spécifique de 0,27 $heure^{-1}$. La phase stationnaire ne semble pas prendre place avant la

trentième heure du bio-procédé. Ces résultats sont largement meilleurs que ceux obtenus avec le mélange 0,8% de résidus de levure et 0,2% de boues secondaires qui ne présente qu'une concentration cellulaire maximale de $2,44 \times 10^9$ UFC / ml. Par contre, ce mélange donne un meilleur temps de génération (2 heures) et taux de croissance spécifique (0,32 heures^{-1}).

Étant donné des problèmes avec la sonde d'oxygène dissout dans le bioréacteur 15A, les valeurs de K_La, de vitesse de transfert et de consommation d'oxygène n'ont pu être évaluées. Les concentrations d'oxygène dissout présentées dans le tableau 10, montrent des valeurs beaucoup plus faibles que celles observées dans le milieu YMB et les BS (tableau 9). L'évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La) n'augmente que très légèrement au cours de la phase exponentielle entre la 9ème et la 24ème heure (45 h^{-1} à 67 h^{-1}). Par contre, les valeurs sont encore une fois plus faibles que celles observées avec le milieu YMB et les BS (tableau 9). Pour ce qui est des valeurs de vitesse de consommation d'oxygène (OUR) ainsi que de vitesse de transfert d'oxygène (OTR) sont plus importantes, dans les deux cas, au cours de la phase exponentielle de croissance.

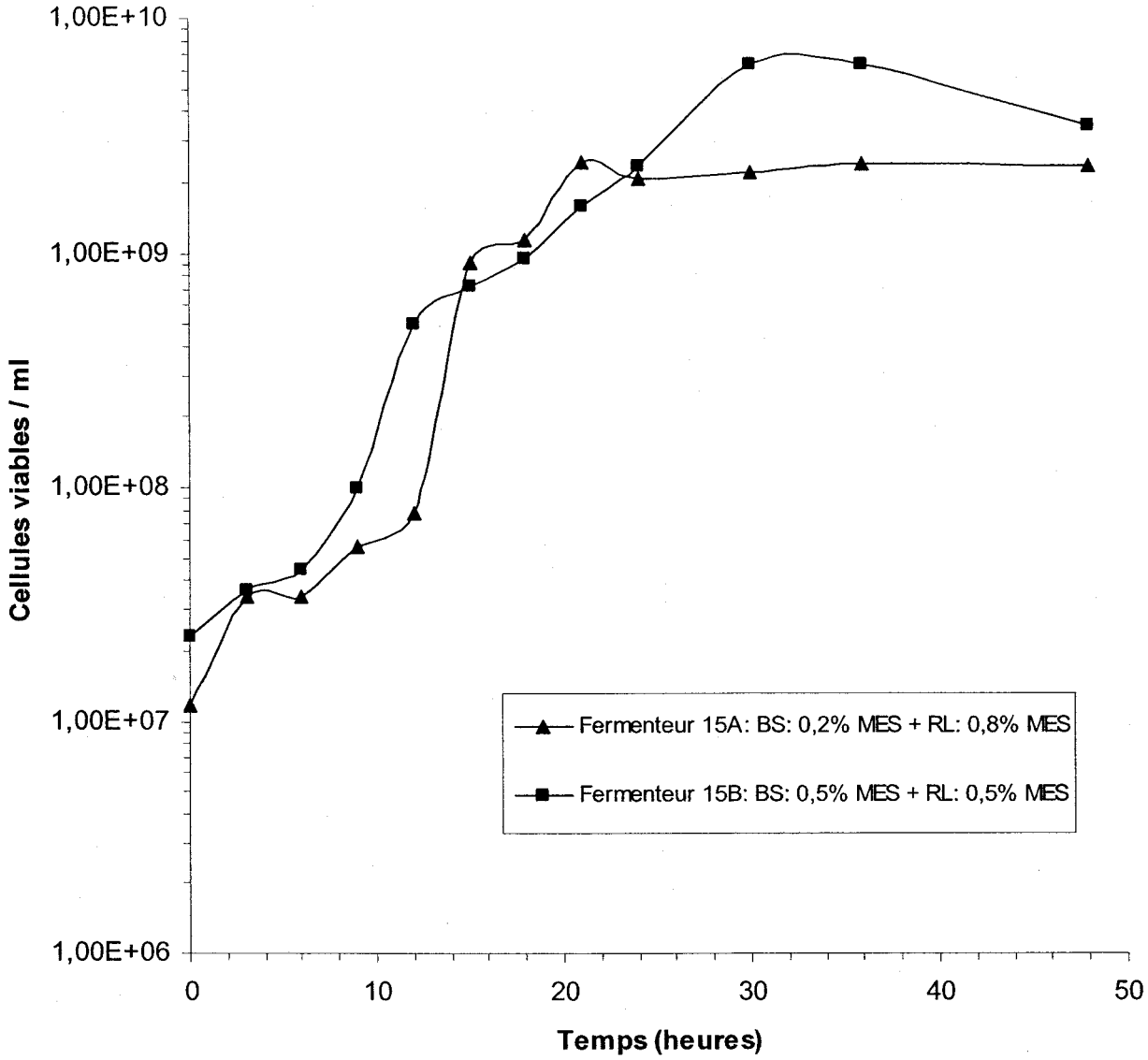


Figure 16 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant un total de 10 litres de biosolides.

Tableau 10 : Évolution du coefficient de transfert volumétrique, de la vitesse de transfert et de consommation d'oxygène en fonction de l'age du milieu de culture dans le fermenteur 15B.

Temps (h)	K_La (h^{-1})	OTR (mmol/l/h)	OUR (mmol/l/h)	DO (%)	Débit (Litre/min.)	Agitation (RPM)
3	nd	nd	nd	70,32	2,99	298,95
6	90,0	0,005	0,085	66,57	2,96	298,08
9	45,0	0,492	0,468	62,49	2,97	296,91
12	48,9	0,716	0,595	56,69	2,97	297,79
15	52,1	1,494	1,157	47,79	2,96	302,16
18	69,4	1,231	1,140	52,17	3,96	355,24
21	60,5	1,159	0,867	52,87	3,97	349,12
24	67,3	0,484	0,493	57,52	3,97	354,66
30	57,7	2,117	1,718	47,04	3,96	352,04
36	72,0	0,710	0,697	52,14	3,96	345,62
48	68,6	0,443	0,502	50,52	3,47	353,79

KLa : Coefficient de transfert d'oxygène volumétrique
OTR : Vitesse de transfert d'oxygène (mmol/L/h) (OXYGEN TRANSFER RATE)
OUR : Vitesse de consommation d'oxygène (mmol/L/h) (OXYGEN UPTAKE RATE)
n.d. : Non déterminé

3.3.3 Ajout de résidus de levure (150 L)

Une dernière expérience a été effectuée dans un bioréacteur dix fois plus volumineux (150 litres) avec les conditions de la meilleure fermentation effectuée dans un bioréacteur de 15 litres. Compte tenu des bons résultats obtenus avec le mélange 0,5% (MES) de résidus de levure et 0,5% (MES) de boues secondaires de la CUQ dans l'expérience précédente, cette fermentation a été analysée de nouveau dans le fermenteur de 150 litres. Des inocula à 3% (V/V) et produits dans le milieu YMB sont utilisés (inoculation en une étape).

La figure 17 montre une concentration cellulaire de $6{,}90 \times 10^9$ UFC / ml après 48 heures de fermentation, un temps de génération de 2,5 heures et un taux de croissance spécifique de 0,28 $heure^{-1}$. Aucune phase de latence n'est observable au début de la fermentation. Il est intéressant de noter encore une fois que la phase stationnaire arrive très tard dans la fermentation (vers la trente-sixième heure). Le tableau 11 montre l'évolution du coefficient de transfert volumétrique. Les valeurs sont plus importantes au cours de la phase exponentielle de croissance. Par contre, on remarque une diminution du K_La lors de la 15ème et 18ème heure. De façon générale, les valeurs de K_La sont plus élevées dans cette expérience que celles déterminées dans le fermenteur de 15 litres (pour les mêmes paramètres de croissance). La vitesse de consommation d'oxygène est plus grande entre la dix-huitième et la trentième heure. La vitesse de transfert d'oxygène présente, pour sa part, des valeurs très faibles par rapport aux autres fermentations effectuées en bioréacteur. En effet, les

valeurs de OTR ne commencent à augmenter que très légèrement vers la fin de la phase exponentielle de croissance. Finalement, il est intéressant de remarquer que le pourcentage d'oxygène dissout diminue au cours de la phase exponentielle passant d'environ 78% (3ème heure) à environ 59% (21ème heure).

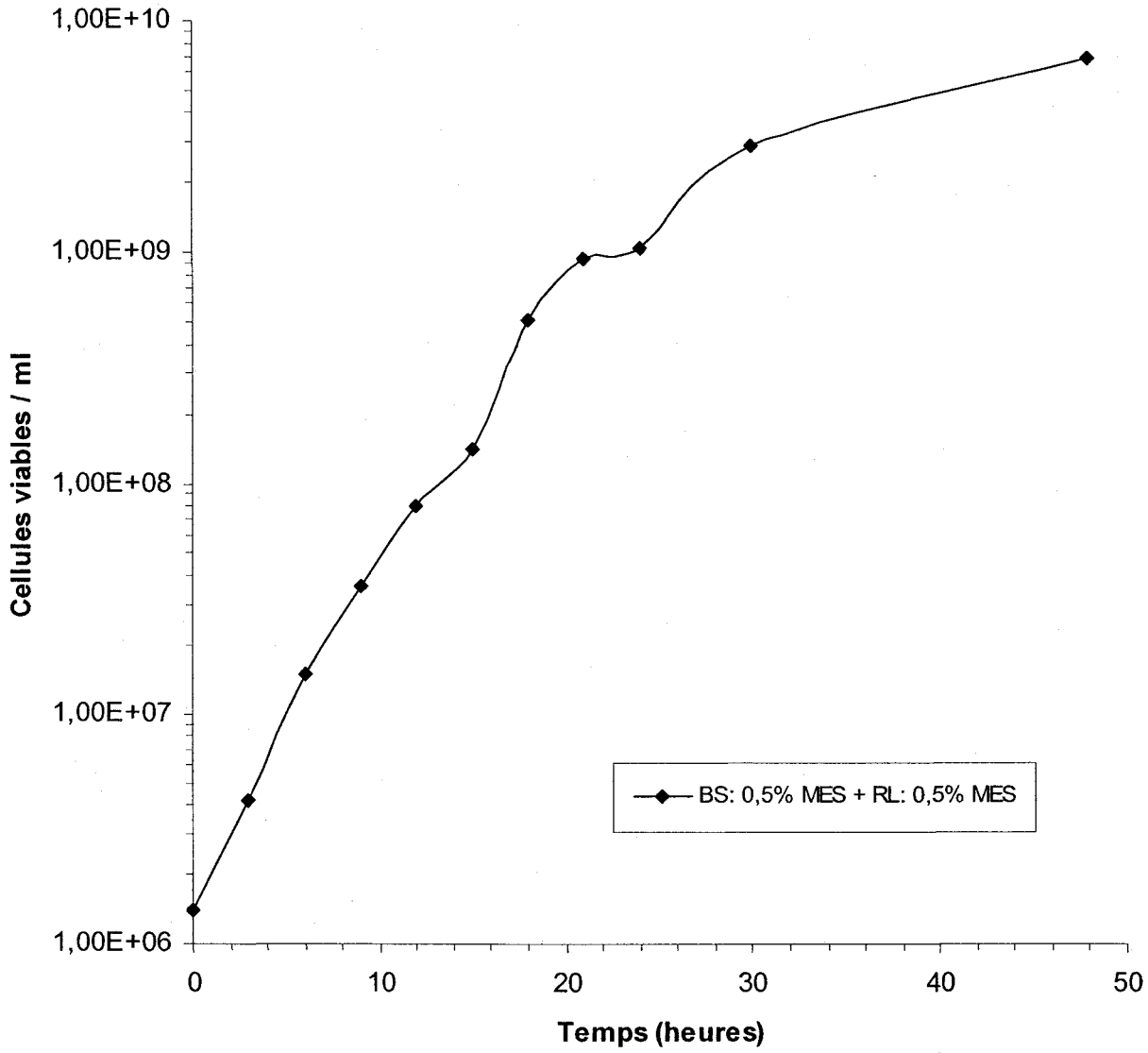


Figure 17 : Croissance de *S. meliloti* A2 suite à un ajout de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires (BS) de la CUQ (25/04/2002) lors d'une fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissout dans un bioréacteur de 150 litres contenant un total de 85 litres de biosolides.

Tableau 11 : Évolution du coefficient de transfert volumétrique, de la vitesse de transfert et de consommation d'oxygène en fonction du temps pour *S. meliloti* A2 dans un milieu mélangé boue secondaires et de résidus de levure dans un bioréacteur de 150 litres

Temps (h)	K_La (h^{-1})	OTR (mmol/l/h)	OUR (mmol/l/h)	DO (%)	Agitation (RPM)
3	160,0	0,003	0,170	78,89	89,95
6	195,2	0,002	0,136	75,12	89,77
9	240,0	0,001	0,085	73,12	90,82
12	229,5	0,002	0,128	71,74	89,77
15	180,3	0,002	0,145	69,64	90,03
18	102,1	0,099	0,918	55,82	90,56
21	203,8	0,196	1,293	55,69	92,40
24	176,3	0,069	0,765	59,27	75,86
30	190,1	0,017	0,383	64,39	75,60
36	162,6	0,009	0,281	62,24	75,25
48	142,0	0,010	0,298	61,69	74,37

K_La : Coefficient de transfert d'oxygène volumétrique
OTR : Vitesse de transfert d'oxygène (mmol/L/h) (OXYGEN TRANSFER RATE)
OUR : Vitesse de consommation d'oxygène (mmol/L/h) (OXYGEN UPTAKE RATE)

3.3.4 Sommaire des résultats en bioréacteurs

Le tableau 12 montre que le mélange à 0,5% de résidus de levure et 0,5% de boues secondaires offre les meilleurs résultats avec une concentration en cellules viables de $6,3x10^9$ UFC / ml pour un volume de fermentation de 10 litres et de $6,9x10^9$ UFC / ml pour un volume de 85 litres. Ces valeurs sont pratiquement le double de la concentration obtenue dans le milieu synthétique YMB et environ le triple de la concentration obtenue dans le milieu contenant que des boues secondaires. Ce même mélange représentait également les conditions optimales en erlenmeyers avec une concentration cellulaire de $8,7x10^9$ UFC / ml après 48 heures de fermentation. Bien que la concentration cellulaire soit plus importante en erlenmeyers (toujours pour le même mélange), les fermentations dans les bioréacteurs (15 et 150 litres) ont permis d'améliorer les temps de génération et les taux maximaux de croissance spécifique tout en maintenant une bonne concentration en cellules viables. En effet, une valeur de 3 heures pour t_g et de 0,23 $heure^{-1}$ pour μ_{max} avait été obtenue en erlenmeyers. En somme, les résidus de levure représentent un apport bénéfique pour le rendement de croissance de *S. meliloti* A2.

De plus, les résidus de levure ne semblent pas influencer positivement que le rendement de croissance de *S. meliloti*, mais également son potentiel de nodulation de la luzerne. En effet, le tableau 12 présente les valeurs des indices nodulaires et encore une fois, le mélange 1 pour 1 offre les meilleurs indices nodulaires avec des valeurs de 16,2 et 16,8 pour les fermentations en

bioréacteurs de 15 et 150 litres respectivement. Ces valeurs sont plus importantes que celles retrouvées dans le milieu YMB et dans les boues secondaires. Pour ce qui est du mélange à 0,2% de boues secondaires et 0,8% de résidus de levure, les résultats ne sont pas aussi probants mais ils sont tout de même comparables aux résultats obtenus dans le milieu synthétique. Le moins bon indice nodulaire a été obtenu dans le milieu contenant uniquement des boues d'épuration secondaire.

Tableau 12 : Résultats des meilleures fermentations en bioréacteurs de 15 et 150 litres.

Milieux de culture			Volume de fermentation	t_g	μ_{max}	X_{max} UFC/ml	t_{max}	Indice nodulaire
MES total (%)	MES BS (%)	MES RL (%)	(litres)	(heures)	(heure^{-1})	(1x10^9)	(heure)	(≤18)
Milieu synthétique YMB			10,00	2,10	0,33	3,40	33,00	12,90
0,50	0,50	-	10,00	2,00	0,35	2,10	33,00	11,40
1,00	0,20	0,80	10,00	2,00	0,35	2,44	21,00	12,60
1,00	0,50	0,50	10,00	2,60	0,27	6,30	30,00	16,20
1,00	0,50	0,50	85,00	2,50	0,28	6,90	48,00	16,80

BS : Boues d'épuration secondaire (CUQ)
RL : Résidus de levure (Unibroue)
MES : Matières en suspension
t_g : Temps de génération (heures)
μ_{max} : Taux de croissance spécifique maximum (heures^{-1})
X_{max} : Nombre maximal de bactéries (UFC/ml)
t_{max} : Temps où le nombre maximal est atteint

CHAPITRE 4: DISCUSSION

4.1 Fermentations des biosolides en erlenmeyers par *S. meliloti*

À partir des meilleures conditions de croissance déterminées dans la littérature et selon les expériences effectuées au cours des dernières années par le *Groupe de recherche en assainissement de l'INRS-ete* (Ben Rebah et al., 2001), il est possible de produire un biofertilisant à base de rhizobium en fermentant des biosolides. Qu'il s'agisse de boues d'épuration municipale secondaire (BS) ou de résidus de levure (RL) issus du procédé de fermentation de la bière, ces biosolides peuvent supporter la croissance de *S. meliloti* A2 et atteindre, voire même dépasser dans certain cas, la concentration cellulaire obtenue dans le milieu de culture synthétique YMB. À la lumière des résultats obtenus dans la présente étude, les prochaines sections discutent du comportement *S. meliloti* A2 dans ces divers milieux de culture alternatif.

4.1.1 Comportement de *S. meliloti* A2 dans les boues secondaires (BS)

S. meliloti A2 croît généralement très bien dans les boues d'épuration secondaires (BS), et ceci s'explique avant tout par leur caractéristique physico-chimique (Tableau 3, Chapitre 2). En effet, les analyses effectuées sur les boues ont démontré que celles-ci contenaient tous les éléments nutritifs nécessaires pour supporter la croissance de la souche utilisée. Cette richesse des boues en azote, carbone, phosphore et sels minéraux permet donc de les utiliser comme substrat et ainsi, obtenir un produit à haute valeur ajoutée.

Les concentrations de carbone et d'azote total dans les BS sont assez constantes pour les trois échantillonnages effectués (Tableau 3). Il est reconnu qu'à un rapport C/N élevé, les bactéries utilisent l'azote disponible et ensuite cessent de croître et par le fait même d'utiliser le carbone du milieu. Ainsi, selon Ben Rebah et al. (2001), plus le ratio C/N est faible plus le temps de génération (t_g) tend à diminuer. Dans cette étude, des rapports variant de 6,13 à 6,70 mg/kg de boue sèche sont obtenus.

Le calcium et le magnésium sont également des composés importants. Le Ca agit sur la croissance et favorise l'enlèvement d'inhibitions provoquées par certains acides aminés et le Mg joue un rôle de régulateur enzymatique (Burton, 1979; Vincent, 1962). Puisque les rhizobia ont des besoins en

Ca et Mg, le rapport Ca/Mg va également influencer leur croissance. En effet, selon Steinborn et Roughley (1975), *S. meliloti*, tout comme les autres espèces de *Rhizobium*, serait influencé par le rapport Ca/Mg plutôt que par la quantité de Ca et Mg considérée séparément. *S. meliloti*, pour sa part, obtient de meilleurs taux de croissance lorsque le rapport est de 1/1 (Vincent, 1962). Le tableau 3 montre des rapports variant de 4,57 à 6,97 dans les BS utilisées pour cette étude. Par contre, selon l'étude effectué par Ben Rebah et al. (2001), aucune corrélation n'a pu être établie entre les rapports Ca/Mg et les temps de génération avec différentes boues d'épuration. Cette observation peut s'expliquer par la forme sous laquelle ces composés (Ca et Mg) se présente dans les boues et ainsi, pourrait influencer leur biodisponibilité. D'autres composés présents dans les boues d'épuration vont également influencer la croissance bactérienne tels les métaux lourds.

4.1.1.1 Influence des métaux lourds

La présence de métaux lourds dans les boues doit également être prise en considération. En effet, un sol contaminé en métaux lourds comme le Cu, le Zn et surtout le Cd, influencerait négativement la fixation de l'azote atmosphérique selon les travaux de Angle et al. (1993) effectué avec des isolats de *Rhizobium* (*R. leguminosarum biovar trifolii*). Plusieurs analyses toxicologiques effectuées en laboratoire et sur le terrain démontrent que la taille des populations de *Rhizobium* serait réduite par la présence des métaux (McGrath et al., 1995; Chaudri et al., 1993). Cependant, selon McBride (1995), la matière organique contenue dans les boues d'épuration joue un rôle important sur la biodisponibilité de ces métaux lourds. Ainsi, les métaux ne sont libérés dans la solution du sol (sous forme d'ions actifs et toxiques) qu'après minéralisation de la matière organique. C'est pourquoi les métaux n'induiraient pas de diminution de la biomasse selon Kelly et Tate (1998). Donc, la sensibilité de *Rhizobium* aux métaux lourds dans le sol va dépendre de la nature, de la concentration et de la forme sous laquelle ils se présentent (Matsuda et al., 2002).

Cependant, il est important de mentionner que certains métaux tels le zinc, le manganèse et le fer sont requis pour la croissance bactérienne. Ainsi, le Zn stimule la croissance de *Rhizobium* et le fer joue un rôle important dans le transport des électrons et agit comme cofacteur (Sessitsch et al., 2002; Quispel, 1974). De plus, selon Brelles-Marino et Boiardi (1997), une déficience en manganèse (Mn^{2+}) affecte grandement le taux de croissance de *Rhizobium etli*. Finalement, dans la présente étude, aucun métal n'excède les teneurs limites requises pour l'application de matières résiduelles fertilisantes (MRF) au champ. Ceci explique en partie pourquoi la croissance *S.meliloti* A2 n'est pas inhibée dans la fermentation des boues d'épuration utilisées au cours de cette étude.

Les résultats obtenus lors des caractérisations physico-chimiques des BS de la CUQ montrent des concentrations en métaux lourds près des valeurs obtenues dans les travaux de Ben Rebah (2001).

4.1.1.2 Influence de l'âge de la culture de départ

Il est généralement conseillé en microbiologie d'inoculer un milieu de fermentation avec une culture bactérienne qui est en pleine croissance exponentielle, c'est-à-dire que les micro-organismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible étant donné leur potentiel génétique, la nature du milieu et les conditions de culture. De plus, la population microbienne est presque chimiquement et physiologiquement uniforme durant cette phase ce qui explique sont utilisation pour diverses études (Prescott et al., 1995).

Les résultats présentés dans la figure 4 (chapitre 3) indiquent donc qu'il est important de prélever un inoculum entre 7 et 17 heures (phase exponentielle). Dans le cas où la culture de départ est moins âgée (22 heures), l'intervalle de la phase exponentielle est plus grande (entre 0 et 21 heures) et permet ainsi une plus grande flexibilité afin de prélever un inoculum destiné à ensemencer le milieu à fermenter.

4.1.1.3 Influence de l'utilisation d'une pré-culture

L'utilisation d'une pré-culture est couramment utilisée dans divers procédés de fermentation (Prescott, 1995). Cette pratique permet aux bactéries de croître dans le même milieu de culture où elles seront inoculées pour la fermentation finale. Ainsi, les taux de croissance spécifique et les temps de génération sont meilleurs puisque les bactéries s'adaptent au milieu de culture. Étant donné que les travaux de Ben Rebah et al. (2001) de notre équipe de recherche n'incluaient pas l'utilisation d'une pré-culture lors des fermentations, il devenait primordial d'étudier la portée d'une telle pratique.

Les résultats présentés dans la figure 5 (chapitre 3) montrent qu'une pré-culture améliore légèrement le rendement de croissance de *S. meliloti* A2 dans les boues secondaires de la CUQ. En effet, le taux de croissance spécifique (μ_{max}) passe de 0,20 h^{-1} à 0,32 h^{-1} et le temps de génération (t_g) passe de 3,5 heures à 2,2 heures. Par contre, après 48 heures de fermentation, le nombre maximal de cellules obtenu dans le milieu inoculé à partir d'une pré-culture est plus faible que dans le cas contraire ($2{,}11 \times 10^9$ avec pré-culture et $3{,}15 \times 10^9$ sans pré-culture). De plus, aucune phase de latence n'est observée dans les deux cas, laissant ainsi supposer que les bactéries ne subissent pas

un grand stress lors de leur transfert du milieu synthétique (YMB) aux BS. Cela peut s'expliquer par le fait que *S. meliloti* est une bactérie que l'on retrouve naturellement dans le sol et ainsi, elle est habituée à subsister dans un environnement complexe où les conditions physico-chimiques sont variantes et la compétition microbienne pour les éléments nutritifs est omniprésente. De plus, comme il a déjà été mentionné dans la revue de littérature, les rhizobia ont des exigences nutritives relativement simples pouvant utiliser une grande variété de sources de carbone. Finalement, *S.meliloti* A2 est fermenté dans une boue où la concentration de matières en suspension est faibles (0,5% MES) facilitant ainsi le transfert de l'oxygène à travers le milieu de culture jusqu'aux parois bactériennes. On peut donc se questionner sur la pertinence d'utiliser une pré-culture lors d'un procédé de production d'un biofertilisant puisque l'important est, avant tout, d'obtenir une concentration cellulaire suffisamment élevée afin de répondre aux critères de qualité d'un inoculant commercial.

4.1.1.4 Influence du volume de l'inoculum

L'inoculum utilisé au début est très important afin d'obtenir une forte biomasse à la fin de la fermentation (Pelmont, 1993). La littérature mentionne que le volume idéal d'un inoculum pour la culture des rhizobia se situe entre 0,1 et 3% du volume total de la fermentation (V/V). Ben Rebah et al. (2001) a obtenu de bonnes concentrations cellulaires dans diverses boues d'épuration avec un inoculum de 3%. Par contre, aucun autre volume d'inoculation n'a été étudié dans ses travaux. C'est pourquoi dans la présente étude, des expériences ont été prévues avec différents volumes d'inoculation.

La figure 6 (chapitre 3) présente quatre courbes de fermentation inoculées avec des volumes de 0.3, 3, 6 et 12 pour cent. Dans le cas où le volume de l'inoculum est faible (0,3%), la croissance bactérienne est fortement affectée résultant en une concentration cellulaire n'atteignant même pas 10^8 UFC/ml après 48 heures de fermentation. Il est possible qu'en prolongeant la fermentation au-delà de 48 heures, une phase exponentielle aurait pu être observable puisqu'une faible concentration cellulaire initiale affecte clairement le taux de croissance. Toutefois, la figure 6 démontre également qu'un important volume d'inoculation (12%) n'est pas nécessairement garant d'une fermentation plus fructueuse. En effet, un inoculum de 12% montre une légère phase de décroissance cellulaire entre la douzième et la vingt-quatrième heure de fermentation. Ceci s'explique probablement par : (1) une limitation prématurée en éléments nutritifs; (2) une substance essentielle est sévèrement réduite; (3) une plus importante accumulation de déchets toxiques issus de l'activité microbienne. Dans le cas où le milieu serait mal aéré, une limitation en oxygène est

également possible puisque ce dernier n'est pas très soluble et peut être utilisé tellement rapidement que seule la surface de la culture possède une concentration suffisante en O_2 pour croître. Finalement, pour les inocula de 3 et 6 %, les résultats obtenus ne démontrent pas de grandes différences significatives entre les deux courbes de croissance. Bien que les taux de croissance spécifique n'aient pu être calculés (manque de points dans la phase exponentielle), on remarque que dans les deux cas, la concentration maximale de cellules viables est atteinte après seulement 30 heures de fermentation. L'utilisation d'un inoculum deux fois plus volumineux n'est donc pas justifiée car ceci représente des coûts supplémentaires pour une production à grande échelle. Bref, il est préférable d'obtenir une concentration cellulaire au début de la fermentation près de $1x10^7$ UFC/ml à partir d'un inoculum contenant environ $1x10^9$ UFC/ml. Il serait ainsi plus facile de minimiser les variances entre les différents taux de croissance pour une fermentation présentant les mêmes conditions expérimentales. Les différentes concentrations de matières en suspension vont également influencer le rendement de la fermentation.

4.1.1.5 Influence des matières en suspension

L'effet des matières en suspension (MES) sur la croissance de *S. meliloti* A2 a été évalué au cours de cette recherche. Différentes expériences ont donc été réalisées en faisant varier la concentration des matières comme l'indique la figure 7 (chapitre 2). Les résultats ont clairement démontré que le taux de croissance spécifique (μ_{max}) ainsi que le compte maximal des cellules viables étaient directement proportionnels à la concentration de MES contenue dans les boues. Le meilleur résultat a été obtenu dans une boue contenant 0,5 % de MES pour un taux maximal de croissance spécifique de 0,30 $heure^{-1}$ et un nombre maximal de cellules viables / ml de $5,55x10^9$ après seulement 36 heures. Lorsque la concentration de la boue passe de 0,5 % à 1,0 % de MES, le temps de génération grimpe à 4 heures et le taux de croissance spécifique tombe à 0,17 $heure^{-1}$. Par contre, le nombre maximal de bactérie demeure acceptable avec une valeur de $4,15x10^9$ UFC/ml après 48 heures de fermentation. La performance des fermentations chute drastiquement lorsque la concentration des boues est augmentée à 1,5 et 2,0 % de MES avec des concentrations cellulaires maximales de $1,46x10^9$ et $5,75x10^8$ UFC/ml respectivement et ce, après 48 heures.

Ben Rebah et al. (2001) a effectué des expériences semblables dans des boues d'épuration primaires et secondaires de la municipalité de Black Lake (Québec, Canada). Après avoir étudié l'effet des MES avec des concentrations variant de 0,325 à 3,2 % dans des boues primaires, le nombre le plus élevé de cellules ($11,1x10^9$ UFC/ml) avait été obtenu avec 1,3% de matières en

suspension. Ils en déduisaient que les solides en suspension affectaient la croissance de *S. meliloti* puisque le temps de génération (t_g) diminuait avec des concentration de MES plus faibles (t_g : 9,32 heures à 3,2 % de MES et t_g : 4,15 heures à 0,325 % de MES). Cette tendance également observable dans les boues secondaires de la CUQ s'explique par le fait qu'il est possible que les boues contiennent certaines substances inhibitrices de la croissance de *S. meliloti* (certains métaux lourds) et ainsi, la dilution de la boue entraîne une réduction de l'effet inhibiteur. De plus, il est probable qu'une boue plus diluée permet aux microorganismes une plus grande accessibilité aux éléments nutritifs assimilables. Ces explications semblent concorder avec les longues phases de latence observées sur les courbes à 1,5 et 2,0 % MES de la figure 7. Finalement, un milieu plus dense rend également son aération plus difficile et ainsi, la croissance bactérienne est affectée par un mauvais transfert des particules d'oxygènes jusqu'au parois cellulaires.

4.1.1.6 Influence des traitements alcalins

Les boues d'épuration sont riches en composés organiques complexes. Or, il a été démontré dans les travaux de Ben Rebah et al. (2001) que des traitements acides et alcalins pouvaient améliorer la disponibilité de substrats assimilables par les bactéries. En effet, leurs conclusions ont démontré qu'en général, les deux types de traitement augmentaient le compte cellulaire et diminuaient le temps de génération de *S. meliloti* dans les boues primaires et secondaires de la municipalité de Black Lake. De tous les traitements effectués dans leurs recherches, le compte cellulaire le plus élevé (21×10^9 ufc/ml) a été obtenu avec une boue à 0,65% de matières en suspension sous un traitement alcalin. Il semblait donc important dans la présente étude d'évaluer l'effet de pré-traitements alcalins avec les boues d'épuration secondaire de la Communauté Urbaine de Québec.

La figure 8 (chapitre 3) montre clairement que le pré-traitement à pH 12 augmente le compte cellulaire maximal ($5{,}05 \times 10^9$ UFC/ml) par rapport au témoin à pH 7 ($1{,}18 \times^9$ UFC/ml) et au traitement à pH 10 ($1{,}08 \times 10^9$ UFC/ml). Cette amélioration des comptes bactériens s'explique par une transformation des composés organiques complexes en des substances carbonées assimilables grâce à l'hydrolyse alcaline. Il est également intéressant de noter sur la courbe de croissance avec un pré-traitement alcalin à pH 12 la présence de deux phases distinctes de croissance. Visuellement, la première phase de croissance (entre 4 et 14 heures de fermentation) présente un taux de croissance plus élevé que la deuxième phase (entre 14 et 30 heures de fermentation). Cette observation peut s'expliquer par le fait que les bactéries vont consommer les substrats plus facilement assimilables au début de la fermentation pour ensuite utiliser ceux qui le sont moins. Les taux de croissance spécifique n'ont pu être évalués dans cette expérience à cause du manque de

points dans les phases de croissance. Plusieurs facteurs vont influencer l'efficacité du pré-traitement qui est sélectionné comme la concentration de MES, la nature et l'origine de la boue, la présence de fibres ou de celluloses, les composés organiques, les diverses formes d'azotes et la taille des particules (Ben Rebah et al., 2001; Karr et Keinath, 1978).

La figure 9 (chapitre 3), pour sa part, montre que pour différentes concentrations de MES dans une boue ayant subi le même pré-traitement alcalin (pH 12), la croissance de *S. meliloti* est affectée. En effet, plus la concentration de MES augmente, plus le compte cellulaire maximal diminue, passant de $2{,}6 \times 10^9$ UFC/ml (MES : 0,5%) à $1{,}45 \times 10^8$ UFC/ml (MES : 2,0%) après 48 heures de fermentation. Il est probable que cette amélioration soit due à une meilleure solubilisation de la matière organique lorsque le milieu de fermentation est dilué. Cette observation concorde avec les résultats observés par Ben Rebah et al. (2001). Des études supplémentaires seraient nécessaires afin d'étudier l'effet de pré-traitements acides dans les boues secondaires et primaires de la CUQ.

4.1.2 Comportement de *S. meliloti* A2 dans les résidus de levure

Les résultats présentés dans les figures 10 et 11 (chapitre 3) sont sans précédents. En effet, la fermentation des résidus de levure (RL) par *S. meliloti* A2 n'a jamais été réalisée dans le passé si on réfère à la littérature qui n'en fait pas mention. Or, les résultats obtenus dans cette étude démontrent que la bactérie utilisée est en mesure de croître dans ce biosolide.

La figure 10 montre que les résidus de levure peuvent supporter la croissance de *S. meliloti* A2 pour des concentrations en MES de 1,0%, 2,0% et 5,0% avec des comptes cellulaires maximaux de $1{,}43 \times 10^9$, $1{,}44 \times 10^9$ et $1{,}14 \times 10^9$ UFC/ml respectivement après 48 heures de fermentation. Cependant, aucune croissance bactérienne n'a été observée avec des résidus de levure ayant une concentration de 10 % de MES. Il est important de mentionner que les comptes cellulaires présentés sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec d'autres sous-produits de l'industrie des boissons alcooliques (malt-sprouts) et de résidus de fabrication du fromage comme le lactosérum (le petit lait ; cheese whey) qui présentent une valeur de 5×10^9 UFC/ml (Bioardi et Ertola, 1985; Bissonnette et al., 1986). Puisque *S. meliloti* semble préférer des milieux de culture moins concentrés, tout comme il a été démontré dans les expériences avec les boues d'épuration, il est possible qu'une fermentation utilisant des résidus de concentrations inférieures à 1% de MES résulterait en des comptes de cellules viables par ml supérieurs à ceux obtenus dans cette expérience.

De plus, certaines caractéristiques physico-chimiques (tableau 3; chapitre 3) peuvent également expliquer pourquoi *S. meliloti* a plus de difficulté à croître dans les résidus de levure. En effet, bien que les résidus de levure possèdent suffisamment de substances carbonées et azotées permettant de supporter la croissance de *S. meliloti*, le ratio Ca/Mg est deux fois moins élevé que dans les boues d'épuration secondaire. Comme il a été mentionné plus haut, le calcium joue un rôle important pour la croissance bactérienne et le magnésium agit comme régulateur enzymatique. De plus, certains métaux comme le zinc qui est sous la limite de détection de la méthode et le fer qui est environ cinq fois moins concentré que dans les boues d'épuration sont tous les deux essentiels au bon fonctionnement du métabolisme de *S. meliloti* A2. En bref, tous les facteurs doivent être réunis afin d'obtenir des comptes cellulaires optimisés.

Il est important de mentionner que les résidus de levure n'ont subi aucun traitement autre que l'autoclave effectué pour la stérilisation (30 minutes à 121°C). Il est donc possible que les parois des levures ne se soient pas brisées afin de libérer dans le milieu tous les éléments pouvant être bénéfiques à la croissance bactérienne. En effet, les résidus de levure sont riches en protéines, vitamines et acides aminés de toutes sortes (Carias et Millan, 1996). Ainsi, l'autolyse des résidus de levure est souvent réalisée avec des enzymes tels des protéases et des ß-glucanases afin d'obtenir un extrait de levure. L'extrait de levure est donc la partie soluble de suspensions de cellules de levure ayant subi une autolyse contrôlée (Conway et al., 2001; Selmer-Olsen et Sorhaug, 1998). Bien que le processus d'autolyse des levures est généralement lent (72 heures), il serait opportun d'en étudier la portée lors de l'utilisation de résidus de levure comme milieu de culture alternatif.

Finalement, la figure 11 (chapitre 3) présente les fermentations de *S. meliloti* A2 dans des résidus de levure à 1% de MES ayant subis des pré-traitements alcalins à pH 10 et pH12. Comme il a été observé dans les boues d'épuration, un pré-traitement alcalin à pH 12 améliore le compte cellulaire maximal après 48 heures de fermentation avec une valeur de $8{,}25 \times 10^9$ UFC/ml par rapport au témoin ($4{,}95 \times 10^9$ UFC/ml). Le traitement à pH 10 a également donné un bon résultat avec un compte cellulaire de $7{,}35 \times 10^9$ UFC/ml Il est intéressant de noter que le résultat de X_{max} ($1{,}43 \times 10^9$UFC/ml) à 1% de MES présenté dans la figure 10 était beaucoup plus faible que celui obtenu dans cette expérience pour les mêmes conditions de croissance. Cette différence peut s'expliquer par l'âge de l'inoculum. En effet, il est important de noter que la concentration cellulaire au temps 0 (lors de l'inoculation) est supérieure à 1×10^8 UFC/ml. Ceci peut expliquer en partie pourquoi le compte cellulaire a grandement augmenté par rapport aux concentrations obtenues dans l'expérience précédente où aucun pré-traitement n'avait été appliqué. Ainsi,

l'inoculum étant trop concentré, les résultats sont par le fait même biaisés. Il devient donc difficile d'établir un lien entre l'augmentation de la concentration cellulaire et les pré-traitements qui ont été utilisés.

Toutefois, il a été clairement établi que les résidus de levure peuvent supporter la croissance de *S. meliloti* A2 et qu'un pré-traitement alcalin à pH 12 améliore le compte cellulaire par rapport à un milieu n'ayant subi aucun pré-traitement. Ils pourraient être employés comme additifs aux boues d'épuration afin d'améliorer la valeur nutritive de l'ensemble du milieu de culture alternatif. Ainsi, son utilisation mérite des études plus approfondies.

4.1.3 Effet d'un mélange de résidus de levure et de boues d'épuration

Il a été amplement question, dans la revue de littérature, de l'utilisation de sous-produits issus de différents procédés et traitements industriels comme milieu de culture alternatif. Or, les résidus de levure sont des sous-produits qui ont certes déjà été utilisés pour différents usages, mais jamais comme additif aux boues d'épuration afin d'en améliorer les caractéristiques nutritives. Les prochaines lignes discutent des résultats obtenus à cet égard.

Les mélanges des résidus de levure et des boues d'épuration secondaire se sont avérés bénéfiques sur la croissance de *S. meliloti* A2 lors des fermentations effectuées en erlenmeyers. De façon générale, les comptes cellulaires maximaux augmentaient avec l'ajout de résidus de levure (figures 12, 13 et 14). Le tableau 5 montre que des ajouts de 0,46% et 0,91% MES de RL augmentent les concentrations cellulaires maximales à $6,33 \times 10^9$ UFC/ml et à $7,10 \times 10^9$ UFC/ml respectivement par rapport à une valeur de $2,66 \times 10^9$ UFC/ml pour le milieu de culture contenant uniquement les boues d'épuration. Par contre, les temps de dédoublement cellulaire (3,1 heures à 3,7 heures) ainsi que les taux de croissance spécifique maximum (0,22 heure^{-1} à 0,19heure^{-1}) ont très peu varié. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un milieu de culture supplémenté avec des RL, ne rend pas les éléments nutritifs plus disponibles pour les microorganismes. La forme sous laquelle les éléments se présentent doit en effet être prise en considération. Toutefois, bien que les temps de génération varient peu, les valeurs indiquent qu'elles diminuent lorsque les concentrations de résidus de levure augmentent (tableaux 5, 6 et 7).

Un autre aspect intéressant que présente le tableau 5 et la figure 12 est le mauvais rendement de croissance (nombre maximal de bactérie) de *S. meliloti* dans les BS supplémentées avec de l'extrait de levure commercial (EL). En effet, pour cette série d'expériences, la plus faible concentration

cellulaire maximale a été atteinte avec ce mélange (1,86 x10^9 UFC/ml) alors que les travaux de Ben Rebah (2001) suggéraient le contraire (8,85x10^9 UFC/ml avec un ajout de 0,4% d'EL). Un ajout trop important d'EL est à l'origine de cette contradiction dans le présent travail. Puisqu'une concentration de 4% d'EL a été utilisée (au lieu de 0,4% tel que proposé par Ben Rebah, 2001), la croissance cellulaire fût grandement affectée. Un excès d'extrait de levure peut en effet être nuisible pour *S. meliloti* car il en résulterait des changements cellulaires morphologiques ainsi qu'une diminution du potentiel de nodulation (Stephens, 1999). Il est donc possible que certaines protéines transmembranaires responsables du transport de nutriments dans les cellules aient été altérées affectant ainsi le nombre maximal de cellule.

Ensuite, deux autres séries d'expériences ont été réalisées avec différents mélanges de BS et de RL et sont présentées dans les figures 13 et 14 (chapitre 3). Les résultats indiquent encore une fois que l'ajout de RL améliore le nombre maximal de bactéries. Lorsque les MES totaux du milieu de culture est de 0,5%, le meilleur mélange est celui de 0,1% de BS et de 0,4% de RL (6,25x10^9 UFC/ml) alors que si nous sommes en présence de MES totaux de 1,0%, le mélange idéal est de 0,5% de BS et de 0,5% de RL (8,7 x10^9 UFC/ml) (tableaux 6 et 8). On observe également dans le tableau 8 que les taux de croissance spécifique maximum (μ_{max}) chutent lorsque les MES totaux passent de 0,5% à 1,0%. Une concentration plus élevée de matières en suspension semble donc nuire à la croissance de *S. meliloti*. Cette même tendance avait été observée lorsque les boues secondaires étaient utilisées seules comme milieu de culture (figure 9, chapitre 3). Il est également possible de croire que des pré-traitements alcalins auraient pu améliorer les comptes cellulaires maximaux puisque des études antérieures réalisées par Ben Rebah et al. (2001) dans les boues de Black Lake le démontraient. Par contre, étant donné la variance des résultats obtenus lors des pré-traitements alcalins réalisés sur les boues de la CUQ dans la présente étude (tableau 8), cette option a été mise de côté. Toutefois, des recherches supplémentaires seraient nécessaires afin d'en étudier les effets sur des mélanges de boues d'épuration et de résidus de levure. De plus, comme il a été mentionné plus haut, une autolyse des résidus de levure réalisée préalablement au mélange avec les boues d'épuration, aurait pu améliorer davantage les comptes bactériens maximaux obtenus lors des fermentations. En effet, une autolyse effectuée sous des conditions contrôlées permet de briser la paroi de chitine qui protège l'intégrité de la levure (polysaccharide résistant), tout en minimisant la détérioration du contenu cellulaire riche en protéines. Ce sont ces protéines, vitamines, acides aminés et débris des parois cellulaires riches en azote et résidus de N-acétylglucosamine qui représentent la partie nutritive des levures (Prescott et al., 1995). Il est important de mentionner que

les valeurs nutritives des protéines contenues dans les levures, dépendent de la composition en acides aminés et de leur biodisponibilité (Pacheco et al., 1997).

En somme, les résidus de levure combinés aux boues d'épuration améliorent les concentrations cellulaires maximales et ce, sans pré-traitement alcalin ni procédé d'autolyse de levure. Ainsi, le mélange de 0,5% de RL et de 0,5% de BS et celui de 0,2% de BS et de 0,8% de RL sont testés en bioréacteurs. Par contre, l'effet de la stérilisation des RL sur les parois cellulaires serait intéressant à analyser.

4.2 Fermentations des biosolides en bioréacteurs par *S. meliloti*

À la lumière des résultats obtenus en erlenmeyers dans la présente étude, les meilleures conditions de croissance ont été étudiées lors de fermentations en bioréacteurs. Dans un premier temps, il est question dans les prochaines sections des expériences contrôles effectuées dans des fermenteurs de 15 litres qui serviront de balises. Par la suite, une discussion sur les fermentations comprenant des mélanges de BS et de RL en fermenteurs de 15 et 150 litres est abordée. Finalement, pour chaque fermentation qui a été effectuée, la question du potentiel nodulaire de *S. meliloti* A2 est également discutée.

4.2.1 Les contrôles (15 litres)

Les expériences effectuées en bioréacteurs de 15 litres présentées dans la figure 15 (chapitre 3) ont permis de déterminer en premier lieu que les expériences en erlenmeyers étaient reproductibles en fermenteurs. En effet, les comptes bactériens obtenus dans le milieu synthétique YMB en erlenmeyers et en bioréacteurs sont comparables ($3{,}26 \times 10^9$ UFC/ml et $3{,}40 \times 10^9$ UFC/ml respectivement). En suite, le meilleur compte cellulaire obtenu en erlenmeyers dans les BS à 0,5% de MES, était de $5{,}5 \times 10^9$ UFC/ml alors qu'en bioréacteurs une valeur de $2{,}10 \times 10^9$ UFC/ml était obtenue. Ce dernier résultat est difficilement explicable puisque les conditions de croissances telles l'aération et le pH sont contrôlées et maintenues tout au long des fermentations réalisées en bioréacteurs alors que ce n'est pas le cas en erlenmeyers. La nature même des boues utilisées lors des fermentations est la cause la plus probable pouvant expliquer cette différence du compte de cellules viables. En effet, bien qu'il s'agisse dans les deux cas de boues d'épuration secondaire issues de la Communauté Urbaine de Québec à 0,5% de MES, elles ont été échantillonnées à des moments différents. Ainsi, la nature physico-chimique des boues peut varier et par le fait même,

influencer les résultats. D'ailleurs, les boues utilisées lors de l'expérience en erlenmeyers contenaient plus d'ammonium et de phosphate (tableau 3, chapitre 3) que celles utilisées pour l'expérience en fermenteurs. Le temps d'entreposage de la boue avant son utilisation peut également jouer un rôle car il est toujours préférable d'utiliser une boue le plus rapidement possible après l'échantillonnage et ce, même si elle est stérilisée et conservée à 4°C. La phase de latence observée dans les boues s'explique probablement par le fait que l'inoculum a été produit dans un milieu YMB. Une inoculation en deux étapes utilisant une pré-culture pourrait réduire cette phase de latence. Finalement, les indices nodulaires obtenus dans le milieu YMB et dans le BS (12,9 et 11,4 respectivement) sont légèrement supérieurs à ceux de Ben Rebah et al. (2001) dans le milieu défini et dans des boues de la CUQ à 1,9% de MES (respectivement 12 et 9).

4.2.2 Les mélanges de biosolides (Bioréacteurs de 15 et 150 litres)

La figure 16 et le tableau 12 (chapitre 3) indiquent que le mélange 0,2% de BS et 0,8% de RL donne un compte cellulaire ($2,4x10^9$ UFC/ml) moins probant que celui obtenu dans l'expérience réalisée en erlenmeyers ($7,5x10^9$ UFC/ml). De plus, son indice nodulaire (12,6) est plus faible que celui du milieu YMB (12,9). Le mélange 0,5% de BS et 0,5% de RL offre le meilleur compte bactérien ($6,3x10^9$ UFC/ml) en bioréacteurs de 15 litres, mais la même expérience réalisée en erlenmeyers donnait une valeur de $8,7x10^9$ UFC/ml. Par contre, l'indice nodulaire augmente à 16,2. De plus, les tests de nodulation effectués en sachets sur la luzerne montraient des nodules plus gros et surtout plus roses avec les BS supplémentées de RL (0,5% de BS et 0,5% de RL) qu'avec l'inoculant produit uniquement dans les BS. Un nodule rose représente un bon indice de l'activité enzymatique présent dans le nodule. En effet, la présence de leghémoglobine (pigment rouge), assurant un environnement anaérobie pour l'activité de la nitrogénase, est probablement plus importante dans ces nodules. Il n'est pas clair comment et à quel niveau les RL améliorent le processus de nodulation mais il est probable qu'il s'agisse d'un apport de vitamines. Les plants de luzerne qui étaient inoculés avec un biofertilisant produit dans un mélange de BS et de RL présentaient souvent des tiges plus longues et un feuillage plus verdâtre que ceux inoculés avec des biofertilisants fabriqués dans le milieu YMB ou dans les BS uniquement.

Finalement, la figure 17 (chapitre 3) illustre la fermentation de *S. meliloti* dans le même mélange que décrit plus haut, mais dans le bioréacteur de 150 litres. Les résultats sont presque semblable comme l'indique le tableau 12 (chapitre 3) mais encore une fois, le compte cellulaire ($6,9x10^9$ UFC/ml) ne dépasse pas celui qui est atteint en erlenmeyers. Ben Rebah et al. (2001) avait atteint

un nombre maximal de cellules de 8.85×10^9 UFC/ml après 32 heures dans une boue secondaire de la CUQ supplémentée avec 4 g/l d'extrait de levure commerciale. Bissonnette et al. (1986), pour leurs parts, avaient réalisé des comptes cellulaires maximaux de $9{,}9 \times 10^9$ UFC/ml après 48 heures dans un sous-produit de l'industrie du fromage (petit lait; cheese whey) supplémenté de 1,0 g/l d'extrait de levure et de 0,5 g/l de phosphate.

On remarque donc que les comptes cellulaires en fermenteurs sont légèrement inférieurs à ceux obtenus en erlenmeyers. Or, le résultat inverse aurait plutôt été envisageable puisque les conditions de croissance sont toutes contrôlées pendant les fermentations en bioréacteurs. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, lors des fermentations en fermenteurs, un agent anti-mousse est ajouté au milieu afin de contrer la formation de mousses pouvant nuire au bon fonctionnement du procédé. Il est possible que cet agent favorise le contact des bactéries avec les plus gros floques de boues en suspension rendant ainsi la récupération des cellules plus difficile lors de l'échantillonnage. De plus, puisque le pH est contrôlé et maintenu automatiquement tout au long de la fermentation, il est possible que l'ajout constant d'acide ou de base entraîne une trop grande dilution du milieu de culture et ainsi influence défavorablement le dénombrement cellulaire. À cet égard, Ben Rebah et al. (2001) avait démontré que la concentration cellulaire demeurait inchangée lors de fermentations où le pH était contrôlé dans un bioréacteur et non contrôlé dans l'autre. *S. meliloti* A2 semble donc être peu influencé par les variations de pH au cours d'une fermentation. Il pourrait donc devenir intéressant de laisser de côté le contrôle du pH et ainsi, améliorer les coûts du procédé lors d'une production à grande échelle. Par ailleurs, étant donné que les fermentations en bioréacteurs utilisent des volumes plus importants qu'en erlenmeyers, l'aération du milieu devient primordiale. Une augmentation du débit de l'aération et/ou de l'agitation du milieu faciliteraient le transfert des particules d'oxygènes dans le milieu. De plus, Barnabé (2000) mentionnait qu'il était possible que les bulles d'air injectées dans le milieu par le système d'aération soient plus ou moins brisées lors de leur contact avec les échancrures (baffles) sur les bords du bioréacteur. Ainsi, lorsque la fermentation a lieu dans un milieu complexe (le cas des boues) les particules d'oxygène auraient plus de difficulté à se rendre jusqu'aux parois cellulaires.

Les tableaux 9, 10 et 11 (chapitre 3) indique que *S. meliloti* consomme (OUR) plus d'oxygène lors des phases exponentielles. L'évolution du pourcentage de l'oxygène dissout confirme cette observation puisque qu'il diminue graduellement au cours de la même phase de croissance. De plus, on remarque généralement que le K_La a tendance à augmenter au cours de la phase exponentielle permettant ainsi de conclure que l'activité bactérienne y est plus intense. En effet,

pendant cette importante période de dédoublements cellulaires, les métabolismes microbiens fonctionnent à plein régime afin de combler les besoins en oxygène et en nutriments. Cependant, *S. meliloti* ne semble pas nécessiter beaucoup d'oxygène car les valeurs de vitesse de consommation et de transfert d'oxygène sont de façon générale assez faible et les pourcentages d'oxygène dissout varient peu au cours des fermentations. Des études supplémentaires sur la consommation d'oxygène de *S.meliloti* A2 seraient donc nécessaires.

En bref, les comptes bactériens maximaux, les taux maximaux de croissance spécifique et les indices nodulaires obtenus lors de ces expériences demeurent plus que satisfaisants afin de répondre aux exigences d'un inoculant commercial. En effet, les dénombrements cellulaires maximaux dépassent les $1x10^9$ UFC/ml nécessaire pour la production d'un inoculant commercial. Finalement, *S. meliloti* A2 conserve sa capacité à effectuer la nodulation avec la luzerne.

CONCLUSIONS

L'optimisation du procédé de fermentation de biosolides avec *Sinorhizobium meliloti* A2 fut réalisée dans le présent travail. Les expériences effectuées en erlenmeyers ont permis de démontrer que l'utilisation d'une pré-culture n'influence pas considérablement la fermentation mais que le volume de l'inoculum utilisé doit être pris en considération afin de conserver des bons taux de croissance spécifique et des comptes cellulaires élevés. Comme il avait été démontré antérieurement avec des boues d'épuration d'une autre origine, l'abaissement des matières en suspension ainsi que l'application d'une hydrolyse alcaline à pH 12 améliorent les dénombrements maximaux de cellules viables. En ce qui a trait aux résidus de levure, ils peuvent supporter la croissance de *S. meliloti* A2 et représentent ainsi des sous-produits issus de l'industrie de la bière pouvant être utilisés comme milieu de culture alternatif. L'addition de résidus de levure aux boues d'épuration secondaire augmente les concentrations maximales de cellules viables par millilitre et diminue le temps de génération. Les fermentations effectuées en bioréacteurs avec les meilleurs mélanges de biosolides démontrent que *S. meliloti* A2 conserve d'excellentes caractéristiques de croissance ainsi que sa capacité à noduler la luzerne.

Ainsi, la bioconversion des boues d'épurations secondaire et des résidus de levure en biofertilisant est possible grâce à la fermentation de ces biosolides par *S. meliloti* A2. Toutefois, d'autres avenues doivent être étudiées afin de poursuivre l'optimisation du procédé de fermentation. Il serait intéressant de réaliser un traitement d'autolyse sur les résidus de levure avant leur utilisation comme additif aux boues d'épurations afin d'extraire le plus d'éléments nutritifs possibles. De plus, d'autres souches de rhizobia pourraient être étudiées dans différents mélanges de boues d'épuration et de résidus de levure, plus particulièrement les souches à croissance lente comme *Bradyrhizobium japonicum* qui nodule le soya et représente un grand intérêt économique. Des expériences supplémentaires en bioréacteurs de 150 litres seraient également nécessaires afin de continuer la mise à l'échelle du procédé de fermentation. Finalement, il est primordial que des biofertilisants produits dans ces biosolides soient appliqués au champ afin d'en étudier les caractéristiques fertilisantes lors de conditions environnementales réelles. En somme, bien que la quantité de boues d'épuration municipale et de levures résiduelles brassicoles requis pour la production du biofertilisant soit peu élevée, cette nouvelle application constitue une alternative additionnelle et souhaitable pour le recyclage de ces biosolides.

RÉFÉRENCES

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. 1997. Rapport Canadien sur les épreuves des inoculants pour légumineuses et des semences pré-inoculées. Canada : Direction d'inspection des aliments. Division des produits végétaux. pp. 1-24

Ahmad D. et al. 1997. Isolation and charactérisation of symbiotic N_2-fixing *Rhizobium meliloti* from soils contaminated with aromatic and chloroaromatic hydrocarbons : PAHs and PCBs. *Biodet. Biodeg.* 39: 33-34.

Aiba S., A.E. Humphrey et N.F. Millis. 1973. Biochemical Engineering. New York : Second edition, Academic Press.

Allen E.K. et O.N. Allen. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* 14: 273-333.

Al-Shahwani M.F. et E.H. Al-Rawi. 1989. Bacterial Extracellular Material from Brewery wastewater for Raw Water Treatment. *Biological Wastes.* 28: 271-276.

American Public Health Association (APHA). 1989. Standard methods for examination of water and wastewater. 17th edition , Washington, États-Unis

Angle S. J., Chaudri A. M., McGrath S. P., Chaney R. L. et Giller K. E. 1993. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. *Soil. Biol. Biochem.* 25:575-580.

Babich H., M. A. Devanas et G. Stotzky. 1985. The mediation of mutagenicity and clastogenicity of heavy metals by physicochemical factors. *Environ. Res.* 37: 253-286.

Barnabé S. 2000. Utilisation des boues d'épuration comme substrat pour la production de biopesticides: induction abiotique de la sporulation chez *Bacillus thuringiensis*. Mémoire de maîtrise. Institut Nationale de Recherche Scientifique (INRS-eau). Université du Québec. 141 p.

Ben Rebah F. 2001. Utilisation des boues d'épuration comme milieu de culture pour la production d'inoculants à base de *Rhizobium.* Thèse de doctorat. Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-Ete). Université de Québec, 177 p.

Bergensen R.I. 1961. The growth of Rhizobium in synthetic media. *Australian J. of Biological Sciences.* 14: 349-360.

Bioardi J.L. et R.J. Ertola. 1985. *Rhizobium* biomass production in batch and continous culture with a malt-sprouts medium, MIRCEN *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1: 163-172.

Bissonnette N. R. Lanande et L.M. Bordeleau. 1986. Large-scale production of *Rhizobium meliloti* on whey. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 838-841.

Blais J.F. 1992. Biolixiviation des métaux lourds des boues d'épuration municipales. Aspects microbiologiques. Thèse de doctorat, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada.

Blais J.F. N. Meunier et J.L. Sasseville. 1993. Les procédés de décontaminsation des boues d'épuration municipales. Projet de R&D; PMC-1 (partie B), Rapport final, J.F. Blais, N. Meunier et J.L. Sasseville (éditeurs), novembre, INRS-Eau, Université du Québec, 7 volumes.

Brelles Marino G.M. et J.L. Boiardi. 1997. Deficiency Affects Growth Energetics of *Rhizobium etli. Microbiological Research.* 152: 367-371.

Brockwell J. et P.J. Bottomley. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* 27: 683-697.

Brundtland, 1988. Commission Mondial sur l'environnement et le Développement. 1988. Notre avenir à tous (Rapport Brundtland). Ed. du Fleuve, 432 p.

Burton J.C. 1979. Microbial technology*: Rhizobium* species, *Academie Press, Inc.* pp. 29-58

Butt K.R. 1993. Utilisation of solid paper-mill sludge and spent brewery yeast as a geed for soil-dwelling earthworms. *Bioresource Technology.* 44: 105-107.

Campbell H.W. 2001. Sludge management- Futures issues and trends. *Wat. Sci. Technol.* 41: 1-8.

Carias D et N. Millan. 1996. Brewey waste as a substitute for soy protein in soy-brewer's yeast mixtures to feed broiler chickens. *Archivos latinoamericanos de nutricion.* 46: 67-70.

Catroux G., A. Hartmann et C. Revelin. 2001. Trend in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil.* 233: 21-30.

Chaudri A.M., S.P. McGrath et K.E. Giller 1993. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosatum biovar trifolii* in soils previously treated with metalcontaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* 25: 301-309.

Conway J., H. Gaudreau et C.P. Champagne 2001. The effect of the addition of proteases and glucanases during yeast autolysis on the production and properties of yeast extracts. *Can. J. Microbiol.* 47: 18-24.

Dazzo F.B. et al. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.* 173: 5371-84.

Denison R.F. et Y. Okano. 2003. Leghaemoglobin oxygenation gradients in alfalfa and yellow sweetclover nodules. *Journal of Experimental Botany.* 54: 1085-1091.

EEA. European Environmental Agency. 1999. Environment in the European Union at the turn of the century. Copenhagen, Danemark, pp. 204-226.

Ertola R.J., L. A. Mazza, A. P. Balatti, C. M. Cuevas et R. Daguerre. 1969. Effect of Composition of Medium and Oxygen Supply Rates on Growth of *Rhizobium meliloti. Soil Sci.* 108: 373-380.

Geurts R. and T. Bisseling. 2002. *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant Cell.* 14: S239-S249.

Gondwe T.N.P., J.P. Mtimuni et A.C.L. Safaloaoh. 1999. Evaluation of brewery by-products replacing vitamin premix in broiler finisher diets. *Indian Journal of Animal Sciences*. 69: 347-349.

Hardy R.W.F. et R.D. Holsten. 1972. The Aquatic Environment: Microbial Transformations and Water Quality Management Implications. Environmental Protection Agency, Washington D.C.

Hébert M. 1998. Réglementation et critères environnementaux relatifs à la valorisation des matières résiduelles fertilisantes et au compostage. Service de l'assainissement agricole et des activités de compostage. Ministère de l'Environnement et de la faune, Québec. 14 pp.

Hybes R.K. et al. 1995. Liquid rhizobial inoculants for lentil and field pea. *J Prod. Agric*. 8: 547-552.

Jordan D.C. 1982. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Edit par N.R. Kneg J.G. Holts ; Williams & Wilkins. 1: 235-244.

Karr P.R. et T.M. Keinath 1978. Influence of particle size on sludge dewaterability. *J. Water Pollut. Control Fed*. 50: 1911-1930.

Kelley J.J. et R.L. Tate 1998. Effects of heaby metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. *J. of Environ. Qual*. 27: 609-617.

Lerouge P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé et J. Denarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature. 344: 781-784.

Le site canadien des entreprises et des consommateurs 2002. Industrie Canada, http://strategis.ic.gc.ca.

Lupwayi N.Z. et al. 2000. Inoculant quality and its evaluation. *Field Corps Res*. 65: 259-270.

Mandeistam. J. et K. McQuillen. 1973. Biochemistry of Bacterial Growth. Oxford-London-Edinburg-Melbourne: 2e edition. Blackwell Scientific Publications.

Martinez de Drets G. et A. Arias. 1972. Enzymaitc basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and Slow growing groups. *J. Bacteriol*. 109: 467-470.

Matsuda A, F. M. Souza Moreira et J. O. Siqueira. 2002. Tolerance of rhizobia genera from different origins to zinc, copper and cadmium. *Pesq. Agrpec.Bras*. 37: 343-355.

MCBride M.B. 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: Are USEPA regulations protective. *J. of Environ. Qual*. 24: 5-18.

McGrath S.P., A.M. Chaudri et K.E. Giller 1995. Long-term effects of land application of sewage sludge: Soils, microorganisms and plants. *J. of Ind. Microbiol*. 14: 94-104.

Mench M., C. Juste et P. Solda. 1992. Effets de l'utilisation de boues urbaines en essai de longue durée : accumulation des métaux par les végétaux supérieurs. *Bull. Soc. Bot. Fr*. 139: 141-156.

MENVIQ 1989. Méthode de digestion des boues d'épuration 89. 12/213-met. 1.3. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec.

MENVIQ 1986. Sédiments-Determination de l'azote et du carbone total. Analyse élémentaire (CHN) 86. 09/305. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec.

Norris D.O. 1959. The role of Calcium and Magnesium in the nutrition of *Rhizobium. Aust. J. Agric. Res.* 10: 651-698.

Olsen P.E. et al. 1994. Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: the need for an increase in standards. *Plant Soil.* 161: 127-134.

Pacheco M.T.B, G. M. Caballero-Cordoba et V. C. Sgarbieri. 1997. Composition and Nutritive Value of Yeast Biomass and Yeast Protein Concentrates. *J. Natr. Sci. Vitaminol.* 43: 601-612.

Parke D.L. et L.N. Orston. 1985. Nutritional diversty of *Rhizobiaceae* revealed by auxonography. *J.Gen. Microbiol.* 130: 1743-1750.

Pedrosa F.P. et G.T. Zancan. 1974. L-arabinose metabolism in *Rhizobium japonicum.* J. *Bacteriology.* 119: 336-338.

Pelmont J. 1993. Bactéries et environnement : adaptations physiologiques. Grenoble : Presses Universitaires de Grenoble. 899 pp.

Prescott, Harley et Klein. 1995. Microbiologie, Bruxelle: De Boeck-Wesmael S.A.2e edition. 1114 pp.

Quispel A. 1974. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam: North-holland Publishing Company, Oxford Am. Elsevier Pubi. Corp. Inc. N.Y.

Reddy G.B., C.N. Cheng and S.J. Dunn. 1983. Survival of *rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. *Soil Biol. Biochem.* 15: 343-345.

Rosenberg C. et al. 1981 *Molec. Gen. Genet.* 184: 326-333.

Roughley R.J. 1976. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge University Press, P.S. Nutman. Ed., pp. 125-126.

Sattar M.A., M.Z. Islam, M.B. Hossain et M.A. Mazid. 2002. Comparison of liquid and peat based inocula in soybean grown at four locations of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany.* 31: 107-111.

Saxena A.K. et K.V.B.R. Tilak. 1999. Agromicrobes, Potentials and prospects of *Rhizobium,* New Delhi: M.N. Jha Today and Tomorrow's Printer and Publishers, 23: 51-78.

Selmer-Olsen E. et T. Sorhaug. 1998. Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantaryn* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. *Milchwissenschaft.* 53: 367-370.

Sessitch A et al. 2002. Advances in *Rhizobium* research. *Critical Review in Plant Sciences.* 21: 323-378.

Site internet de Microbiology On-line 2002. www.microbiologyonline.org.uk

Slim J.A. et R.W. Wakefield 1991. The utilisation of sewage sludge in the manufacutre of clay bricks. *Wat South Afr.* 17: 197-202.

Smith R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* 38: 485-492.

Snyder L. et Champness W. 1997. Molecular Genetics of Bacteria. Washington, D.C: ASM Press. 504 pp.

Spaink H.P. 2000. Root Nodulation and Infection Factors Produced By *Rhizobial* Bacteria. *Annu. Rev. Micrbiol.* 54: 257-288.

Steinborn J. et R.J. Roughley 1975. Toxicity of sodium and chloride ions to *Rhizobium spp.* In broth and peat culture. *J.A.ppl. Bact.* 39: 133-138.

Stephens J.H.G. et H.M. Rask. 1999. Innoculant production and formulation. *Field Crops Research.* 65: 249-258.

Subba Rao N.S. 1993. Biofertilizers in agriculture and forestry. New Hampshire: Science Publishers, Inc. 3e edition. 242 pp.

Tay J.H. et K.Y. Show. 1992. Reuse of wastewater sludge in manufacturing nonconcentional construction materals-an innovative approach to ultimate sludge disposal. *Wat. Sci. Technol.* 26: 1165-1174.

Tay J.H., W.K. Yip et K.Y. Show. 1991 Clay-blended sludge as lightweight aggregate concrete material. *J. Environ. Eng.* (DIV. ASCE) 117: 834-844.

Tilak K.V.R.B. 2002. *Biofertilizers*: Thier role in integrated nutrient management full source. New Delhi: Bioinoculants for Sustainable Agriculture and Forestry Proceedings. Scientific Publishers, pp. 1-7.

Tyagi R.D., J. F. Blais, N. Meunier et D. Kluepfel. 1993. Biolixiviation de métaux lourds et stabilisation des boues d'épuration : essais en bioréacteur opéré en mode cuvée. *Canadian J. of Civil Eng.* 20: 57-64.

U.S. Environmental Protection Agency. 1984. Environmental regulations and thechnology. Use and disposal of municipal wastewater sludge. EPA-625/10-84-003. Washington D.C.78 pp.

U.S. Environmental Protection Agency. 1990. National sewage sludge survey; availability of information and data, and anticipated impacts on proposed regulations, proposed rule. U.S. Fed. Register 55: 47209-47283.

U.S. Environmental Protection Agency. 1993. Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 257, 403 et 503, Final Rule. Cincinati, Ohio, U.S.A.

U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Biosolids generations, sues and disposal in United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division. Office of Solid Waste. Washington, 81 pp.

U.S. Envrionmental Protection Agency. 2002. Guide to field stoage of biosolids and other organic by-products used in agriculture and for soil resource management. Office of Wastewather Management. Washington, 150 pp.

Van Kessel C. et C. Hartley. *2000.* Agricultural management of grain legumes: has it led to an incresase in nitrogen fixation? *Field Corps Research.* 65: 165-181.

Vincent J.M. 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of *Rhizobium. J.Gen. Microbiol.* 28: 653 pp.

Vincent J.M. 1970. Improved synthetic medium for growth of *Rhizobium. J. Appl. Bact.* 33: 708 pp.

Webber M.D. 1986. Épandage des boues d'épuration sur les terres agricoles- une évaluation. Direction Générale de la Recherche. Agriculture Canada, 42 pp.

Wilson D.O. et H.M. Reisenauer. 1970. Effects of manganeses and zinc ions on the growth of *Rhizobium. J.Bact.* 102: 729-732.

Young J.P.W. et K. E. Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of *rhizobia.* New Phytol.133: 87-94.

ANNEXES

ANNEXE-1
MILIEUX ET SOLUTIONS

Composition du milieu Yeast Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Composants	Quantités
K_2SO_4	0,5 g
$MgSO_4$ $7H_2O_2$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de Levure	1 g
Mannitol	10 g
H_2O distillée	1000 ml

Le milieu est ajusté à pH 7 et stérilisé pendant 15 min. à 121°C

Composition du milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) avec le Congo rouge (YMA)

Composants	Quantités
K_2SO_4	0,5 g
$MgSO_4$ $7H_2O_2$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de Levure	1 g
Mannitol	10 g
Agar	15 g
Congo rouge*	10 ml
H_2O distillée	1000 ml

Le milieu est ajusté à pH 7 et stérilisé pendant 15 min. à 121°C
*Solution mère (0,25 g / 100 ml d'éthanol 50%)

Composition de la Solution de Hoagland et Arnon (1938)

Composants	Quantités
H_3BO_3	2,86 mg
$MnCl_2$ $4H_20$	1,81 mg
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0,22 mg
$CuSO_4$ $5H_2O$	0,008 mg
H_2MoO_4 H_2O (85% MoO_3)	0,09 mg
$CoCl_2$ $6H_2O$	0,004 mg
H_2O_2	1000 ml

pH 7

ANNEXE-2
RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES EN ERLENMEYERS

Tableau 13: Comptes de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml du milieu YMB avec une culture de départ de 22 et une de 46 heures (Figure 4, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml (Cul. dép. 22 heures)	UFC/ml (Cul. Dép. 46 heures)
0	1,27E+06	6,30E+07
7	1,33E+07	1,74E+08
11	6,86E+07	8,13E+08
14	2,07E+08	1,43E+09
17	6,40E+08	2,04E+09
21	1,96E+09	2,53E+09
24	2,10E+09	2,60E+09
32	3,26E+09	3,26E+09
46	3,26E+09	2,56E+09

Tableau 14 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec et sans l'utilisation d'une pré-culture (Figure 5, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml 0,5% BS (avec pré-culture)	UFC/ml 0,5% BS (sans pré-culture)
0	9,05E+06	1,56E+07
3	1,98E+07	3,11E+07
6	6,22E+07	5,26E+07
9	1,28E+08	8,40E+07
12	4,66E+08	2,24E+08
24	1,30E+09	9,98E+08
36	1,92E+09	2,42E+09
48	2,11E+09	3,15E+09

Tableau 15 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) à 0,66% de MES avec des inocula de 0,3, 3, 6 et 12 % (Figure 6, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml 0,3% (v/v)	UFC/ml 3% (v/v)	UFC/ml 6% (v/v)	UFC/ml 12% (v/v)
0	3,50E+06	5,22E+07	1,12E+08	2,70E+08
6	6,60E+06	1,02E+08	3,74E+08	6,20E+08
12	1,12E+07	5,65E+08	8,13E+08	2,03E+09
18	6,88E+06	1,56E+09	2,04E+09	1,22E+09
24	2,10E+07	2,10E+09	2,60E+09	9,80E+08
30	2,50E+07	3,26E+09	3,40E+09	1,34E+09
48	8,15E+07	2,81E+09	2,16E+09	2,30E+09

Tableau 16 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) avec différentes concentrations de MES (Figure 7, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml 0,5% BS	UFC/ml 1,0% BS	UFC/ml 1,5% BS	UFC/ml 2,0% BS
0	1,96E+07	1,96E+07	1,96E+07	1,96E+07
3	4,70E+07	2,95E+07	2,50E+07	1,72E+07
6	1,02E+08	4,00E+07	2,65E+07	2,90E+07
9	1,86E+08	7,05E+07	2,50E+07	3,20E+07
12	5,65E+08	1,31E+08	4,10E+07	3,15E+07
24	2,90E+09	9,85E+08	6,75E+07	4,00E+07
36	5,55E+09	3,10E+09	3,40E+08	5,50E+07
48	5,25E+09	4,15E+09	1,46E+09	5,75E+08

Tableau 17 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitement alcalins lors de trois fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5% (Figure 8, chapitre 3).

Temps (heures)	Témoin (0,5% BS)	pH 10 (0,5% BS)	pH 12 (0,5% BS)
0	3,51E+07	3,51E+07	3,51E+07
4	6,45E+07	3,20E+07	3,40E+07
8	1,87E+08	3,38E+07	8,03E+07
12	7,00E+08	9,30E+07	4,15E+08
16	9,88E+08	2,09E+08	8,52E+08
24	1,18E+09	6,80E+08	1,88E+09
32	8,30E+08	8,33E+08	4,28E+09
48	7,80E+08	1,08E+09	5,05E+09

Tableau 18 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à des pré-traitements alcalins à pH 12 lors de quatre fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de boues secondaires de la CUQ (21/10/2001) avec des MES de 0,5; 1,0; 1,5 et 2,0% (Figure 9, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml (0,5% BS)	UFC/ml (1,0% BS)	UFC/ml (1,5% BS)	UFC/ml (2,0% BS)
0	1,86E+07	1,86E+07	1,86E+07	1,86E+07
3	3,20E+07	2,60E+07	2,65E+07	2,95E+07
6	5,30E+07	3,75E+07	4,30E+07	3,75E+07
9	6,10E+07	5,65E+07	5,40E+07	4,70E+07
12	1,14E+08	7,75E+07	7,15E+07	4,45E+07
24	9,25E+08	1,50E+08	8,20E+07	6,25E+07
36	2,40E+09	4,35E+08	3,05E+08	1,10E+08
48	3,25E+09	8,10E+08	1,85E+08	1,45E+08

Tableau 19 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (Unibroue 18/10/2001) avec différentes concentrations de MES (figure 10, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml (1% RL)	UFC/ml (2% RL)	UFC/ml (5% RL)	UFC/ml (10% RL)
0	6,60E+07	6,60E+07	6,60E+07	6,60E+07
6	1,26E+08	1,06E+08	7,40E+07	6,35E+07
12	3,40E+08	3,10E+08	1,32E+08	7,10E+07
24	9,20E+08	1,04E+09	4,70E+08	6,50E+07
30	1,06E+09	9,15E+08	7,80E+08	3,05E+07
48	1,43E+09	1,44E+09	1,14E+09	4,80E+07

Tableau 20 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à divers pré-traitements alcalins lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de résidus de levure (Unibroue 18/10/2001) à 1% de MES (figure 11, chapitre 3).

Temps (heures)	pH 7 (1,0% RL)	pH 10 (1,0% RL)	ph 12 (1,0% RL)
0	1,18E+08	1,18E+08	1,18E+08
4	1,07E+08	1,32E+08	1,46E+08
8	4,05E+08	4,00E+08	3,85E+08
12	7,10E+08	6,65E+08	8,20E+08
16	9,95E+08	9,95E+08	1,56E+09
24	1,42E+09	2,34E+09	1,88E+09
48	4,95E+09	7,35E+09	8,25E+09

Tableau 21 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (18/10/2001) ou d'extrait de levure commercial (Difco) dans des boues secondaires de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de biosolides (Figure 12, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml (0,43% BS)	UFC/ml (0,43% BS + 4 g EL)	UFC/ml (0,43% BS + 0,46% RL)	UFC/ml (0.43% BS + 0,91% RL)
0	2,37E+07	2,37E+07	2,37E+07	2,37E+07
6	4,05E+07	6,35E+07	5,40E+07	5,05E+07
12	9,20E+07	1,30E+08	1,41E+08	8,85E+07
18	3,76E+08	7,73E+08	8,30E+08	4,26E+08
26	1,22E+09	1,86E+09	3,25E+09	2,90E+09
32	2,15E+09	1,45E+09	5,90E+09	4,70E+09
49	1,89E+09	9,50E+08	4,50E+09	6,50E+09
72	2,66E+09	1,19E+09	6,33E+09	7,10E+09

Tableau 22 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (18/10/2001) dans des boues secondaires de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de biosolides (Figure 13, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml (0,1% RL + 0,4% BS)	UFC/ml (0,2% RL + 0,3% BS)	UFC/ml (0,4% RL + 0,1% BS)	UFC/ml (0,5% RL + 0,5% BS)
0	3,03E+07	3,03E+07	3,03E+07	3,03E+07
3	6,10E+07	5,50E+07	6,20E+07	5,20E+07
6	1,29E+08	1,12E+08	1,29E+08	1,02E+08
9	2,79E+08	2,73E+08	3,30E+08	1,59E+08
12	6,75E+08	6,50E+08	1,02E+09	4,05E+08
21	2,55E+09	3,16E+09	3,69E+09	2,57E+09
33	5,65E+09	4,90E+09	6,25E+09	8,70E+09
48	2,30E+09	4,10E+09	6,10E+09	7,55E+09

Tableau 23 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure (18/10/2001) dans des boues secondaire de la CUQ (16/11/2001) lors de plusieurs fermentations de 48 heures à 29°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyer contenant 100 ml de biosolides pour des MES totaux variant de 1,0% à 1,5% (Figure 14, chapitre 3).

Temps (heures)	UFC/ml (1% BS)	UFC/ml (0,2% RL + 0,8% BS)	UFC/ml (0,8% RL + 0,2% BS)	UFC/ml (0,5% RL + 1% BS)
0	1,20E+07	1,20E+07	1,20E+07	1,20E+07
3	8,50E+06	1,01E+07	1,20E+07	1,36E+07
6	1,90E+07	2,30E+07	3,10E+07	2,80E+07
9	3,20E+07	2,55E+07	9,65E+07	3,60E+07
12	4,10E+07	3,70E+07	1,73E+08	6,15E+07
24	1,35E+08	3,40E+08	3,55E+09	5,55E+08
35	5,35E+08	1,40E+09	5,90E+09	1,63E+09
48	3,55E+09	5,55E+09	7,10E+09	6,70E+09

ANNEXE-3
RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES EN BIORÉACTEURS

Tableau 24 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant 10 litres de milieu synthétique YMB ou 10 litres de boues secondaire de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% de MES (Figure.15, chapitre 3)

Temps (heures)	15A UFC/ml YMB	15B UFC/ml 0,5% BS
0	1,68E+07	6,50E+06
3	2,64E+07	6,70E+06
6	7,60E+07	1,79E+07
9	2,30E+08	1,20E+08
12	5,15E+08	2,24E+08
15	1,07E+09	5,50E+08
18	1,18E+09	7,30E+08
21	2,30E+09	9,41E+08
24	3,00E+09	1,95E+09
33	3,40E+09	2,10E+09
48	2,82E+09	1,10E+09

Tableau 25 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15A) de 15 litres contenant 10 litres de milieu YMB.

Temps (heure)	pH	Temp réact (°C)	DO (%)	Débit (LPM)	Agit (rpm)
0,0	7,13	31,49	95,57	2,95	301,29
0,1	7,13	31,18	94,24	2,95	298,08
0,2	7,13	30,87	93,37	2,95	302,45
0,3	7,13	31,08	92,62	2,95	300,70
0,4	7,13	30,11	90,74	2,95	301,87
0,5	7,13	29,19	89,62	2,95	297,49
0,6	7,13	29,29	90,04	2,95	301,58
0,7	7,13	29,54	90,49	2,95	298,37
0,8	7,11	29,65	90,64	2,95	297,49
0,9	7,12	29,90	90,74	2,95	298,37
1,0	7,11	29,80	90,77	2,95	300,12
1,1	7,11	29,95	90,69	2,95	301,29
1,2	7,11	30,16	90,57	2,95	303,33
1,2	7,11	29,80	90,42	2,95	301,29
1,3	7,10	30,46	90,12	2,96	302,16
1,4	7,11	30,11	89,94	2,96	301,29
1,5	7,10	30,46	89,79	2,96	302,45
1,6	7,10	30,72	89,62	2,96	302,16
1,7	7,10	30,11	89,27	2,96	299,24
1,8	7,09	30,46	88,99	2,96	301,58
1,9	7,09	30,26	88,92	2,96	302,74
2,0	7,09	30,31	88,74	2,96	301,87
2,1	7,09	30,21	88,24	2,96	296,62
2,2	7,08	30,72	87,84	2,96	302,45
2,3	7,08	30,36	87,24	2,96	302,16
2,4	7,08	30,41	86,89	2,96	303,91
2,5	7,06	30,11	86,29	2,96	301,58
2,6	7,05	30,57	85,49	2,96	300,70
2,7	7,05	30,00	84,79	2,96	299,83
2,8	7,04	30,06	83,72	2,96	300,41
2,9	7,04	29,49	82,69	2,96	303,33
3,0	7,04	29,44	85,04	2,95	303,91
3,1	7,03	29,39	82,79	2,95	301,58
3,2	7,02	30,06	81,12	2,95	296,62
3,3	7,02	29,70	79,79	2,95	301,58
3,4	6,99	29,75	78,29	2,95	302,16
3,5	6,97	29,39	76,37	2,95	293,99
3,6	6,97	28,06	72,82	2,95	300,99
3,6	6,95	27,14	71,42	2,95	298,95
3,7	6,95	26,27	70,69	2,95	299,54
3,8	6,94	25,61	69,89	2,95	298,08
3,9	6,91	26,27	70,52	2,95	303,62
4,0	6,90	28,16	70,69	2,95	301,29
4,1	6,89	29,29	68,54	2,95	301,58
4,2	6,87	30,41	64,54	2,97	299,24
4,3	6,83	30,57	59,92	2,97	301,29
4,4	6,81	30,92	55,62	2,97	301,87
4,5	6,77	30,72	49,57	2,97	299,24
4,6	6,74	31,23	43,57	2,97	300,41
4,7	6,70	31,18	73,92	2,97	399,58
4,8	6,66	31,38	78,04	2,97	401,62
4,9	6,77	31,23	77,62	2,97	400,45

5,0	6,82	31,95	75,49	2,97	397,24
5,1	6,75	32,00	72,49	2,97	401,91
5,2	6,80	31,44	70,69	2,97	399,29
5,3	6,78	31,49	71,72	2,97	405,70
5,4	6,77	31,38	70,42	2,97	399,58
5,5	6,76	31,44	66,02	2,97	396,37
5,6	6,83	31,33	62,02	2,97	398,99
5,7	6,82	30,87	59,19	2,97	400,16
5,8	6,91	30,67	55,89	2,97	396,95
5,9	6,90	29,75	58,44	3,47	454,99
6,0	6,88	30,11	63,07	0,05	446,54
6,0	6,88	30,26	69,89	3,47	449,74
6,1	6,87	30,67	64,64	3,47	453,83
6,2	6,86	30,46	62,92	3,47	455,58
6,3	6,87	30,82	62,42	3,47	455,87
6,4	6,87	30,82	62,29	0,05	450,62
6,5	6,93	31,03	61,12	0,05	453,83
6,6	6,89	31,74	58,74	0,05	444,20
6,7	6,89	30,87	70,09	3,48	452,08
6,8	6,90	30,92	64,57	3,48	445,66
6,9	6,91	31,54	63,84	3,48	454,70
7,0	6,93	31,03	63,32	3,48	452,08
7,1	6,93	31,38	63,74	3,48	440,70
7,2	6,95	31,49	65,72	3,48	443,91
7,3	6,98	32,15	67,89	3,48	438,66
7,4	7,01	32,46	69,37	3,48	451,49
7,5	7,03	32,05	70,17	3,48	448,29
7,6	7,04	32,10	71,04	3,48	448,87
7,7	7,05	32,71	71,82	3,48	447,99
7,8	7,08	31,95	72,09	3,48	440,99
7,9	7,10	31,54	72,92	3,48	454,70
8,0	7,10	31,84	73,74	3,48	452,08
8,1	7,11	31,28	75,02	3,48	457,04
8,2	7,12	30,77	76,37	3,48	448,29
8,3	7,15	30,82	77,19	3,48	452,08
8,4	7,16	31,03	77,89	3,48	456,16
8,4	7,17	30,57	78,52	3,48	446,24
8,5	7,19	30,77	78,59	3,48	442,74
8,6	7,20	30,57	79,27	3,48	438,95
8,7	7,21	30,26	78,24	0,05	449,45
8,8	7,19	30,98	77,44	13,44	447,41
8,9	7,21	30,77	83,14	3,46	449,16
9,0	7,22	30,52	81,02	3,46	451,20
9,1	7,22	31,18	80,77	3,46	443,91
9,2	7,23	30,67	80,62	3,46	453,24
9,3	7,23	30,62	80,69	3,46	451,79

9,4	7,26	30,77	80,74	3,46	447,99
9,5	7,27	30,26	80,77	3,46	450,91
9,6	7,27	30,62	80,77	3,46	443,91
9,7	7,26	30,41	80,72	3,46	455,87
9,8	7,27	30,77	80,79	3,46	457,62
9,9	7,14	30,67	80,94	3,46	447,41
10,0	7,15	30,36	81,19	3,46	442,74
10,1	7,17	30,31	81,47	3,46	458,49
10,2	7,19	30,16	81,39	3,46	451,20
10,3	7,19	30,16	81,44	3,46	455,29
10,4	7,21	30,16	81,19	3,46	450,33
10,5	7,21	29,95	81,12	3,46	443,62
10,6	7,21	30,11	80,87	3,46	458,49
10,7	7,22	29,90	80,87	3,46	447,99
10,8	7,22	30,11	81,02	3,46	442,45
10,8	7,22	29,80	81,14	3,46	446,24
10,9	7,24	29,80	81,12	3,46	445,08
11,0	7,23	29,95	81,02	3,46	458,49
11,1	7,22	29,90	81,04	3,46	447,12
11,2	7,22	30,06	80,94	3,46	444,79
11,3	7,22	30,16	81,04	3,46	449,74
11,4	7,22	30,16	80,69	3,46	452,66
11,5	7,22	29,70	81,02	3,46	446,83
11,6	7,22	29,75	80,94	3,46	453,24
11,7	7,21	29,70	79,72	0,05	449,45
11,8	7,20	30,21	79,12	0,05	457,62
11,9	7,19	30,31	83,74	3,46	455,58
12,0	7,19	30,46	81,92	3,46	445,95
12,1	7,19	31,54	81,64	3,46	453,24
12,2	7,19	30,82	81,02	3,46	456,45
12,3	7,16	30,92	81,14	3,46	451,20
12,4	7,16	30,52	81,12	3,46	446,83
12,5	7,16	30,11	81,27	3,46	450,04
12,6	7,15	30,57	81,22	3,46	440,70
12,7	7,15	30,62	80,94	3,46	442,74
12,8	7,15	30,06	81,47	3,46	457,91
12,9	7,15	30,52	81,49	3,46	454,70
13,0	7,14	29,70	81,47	3,46	449,74
13,1	7,14	29,95	81,39	3,46	455,58
13,2	7,14	29,85	81,27	3,46	455,29
13,2	7,14	29,95	81,17	3,46	452,37
13,3	7,14	29,75	81,39	3,46	436,33
13,4	7,13	29,75	81,37	3,46	441,29
13,5	7,11	29,95	81,37	3,46	449,45
13,6	7,13	29,70	81,39	3,46	458,20
13,7	7,11	29,85	81,44	3,46	453,24

13,8	7,13	29,54	81,39	3,46	444,20
13,9	7,11	29,54	81,22	3,46	456,45
14,0	7,11	30,11	81,22	3,46	450,91
14,1	7,11	29,54	81,02	3,46	450,33
14,2	7,11	30,06	81,04	3,46	453,24
14,3	7,11	29,75	80,84	3,46	445,08
14,4	7,11	29,65	80,89	3,46	451,49
14,5	7,10	30,06	80,94	3,46	446,54
14,6	7,09	29,75	80,24	3,46	453,24
14,7	7,09	29,70	79,74	0,05	443,62
14,8	7,06	29,95	78,52	0,05	441,87
14,9	7,04	30,00	77,62	3,23	452,37
15,0	7,03	30,52	81,92	3,46	452,66
15,1	7,04	30,67	81,29	3,46	441,58
15,2	7,04	30,57	80,94	3,46	450,62
15,3	7,03	30,52	80,84	3,46	444,20
15,4	7,02	30,62	80,62	3,46	453,54
15,5	7,02	30,41	80,72	3,46	456,74
15,6	7,02	30,26	80,52	3,46	448,87
15,6	7,02	29,80	80,52	3,46	442,74
15,7	7,02	30,11	80,62	3,46	450,33
15,8	7,01	30,06	80,52	3,46	451,20
15,9	7,01	30,00	80,17	3,46	452,37
16,0	7,01	29,60	79,89	3,46	450,04
16,1	6,99	29,29	80,32	3,46	450,04
16,2	6,99	28,57	80,24	3,46	451,20
16,3	6,99	28,68	80,22	3,46	454,99
16,4	6,98	28,88	79,99	3,46	447,12
16,5	6,98	28,73	80,17	3,46	445,37
16,6	6,97	28,78	79,99	3,46	452,37
16,7	6,96	29,34	79,97	3,46	449,74
16,8	6,96	28,57	79,89	3,46	452,95
16,9	6,96	29,39	79,89	3,46	454,41
17,0	6,94	29,03	79,37	3,46	454,99
17,1	6,94	28,62	79,89	3,46	453,54
17,2	6,94	28,98	79,49	3,46	454,70
17,3	6,91	28,62	79,37	3,46	451,79
17,4	6,90	28,78	79,29	3,46	449,16
17,5	6,90	29,19	79,09	3,46	445,66
17,6	6,90	29,24	79,47	3,46	442,16
17,7	6,89	28,68	77,92	0,05	450,04
17,8	6,87	28,83	76,99	0,05	443,62
17,9	6,83	29,70	74,74	6,15	452,66
18,0	6,82	29,80	79,89	3,46	452,95
18,0	6,82	29,90	79,29	3,46	454,12
18,1	6,82	29,60	79,32	3,46	458,79

18,2	6,81	29,75	79,37	3,46	459,66
18,3	6,81	29,80	79,04	3,46	445,66
18,4	6,80	29,44	78,84	3,46	451,49
18,5	6,80	29,60	78,82	3,46	457,91
18,6	6,78	29,65	78,99	3,46	453,83
18,7	6,77	29,14	78,94	3,46	454,41
18,8	6,76	28,68	78,94	3,46	446,54
18,9	6,77	29,60	80,42	3,46	446,54
19,0	6,80	28,93	82,54	3,46	455,29
19,1	6,82	29,03	82,87	3,46	447,12
19,2	6,83	29,39	82,72	3,46	445,37
19,3	6,86	28,98	82,79	3,46	445,08
19,4	6,87	29,19	82,77	3,46	454,12
19,5	6,87	28,88	82,87	3,46	443,62
19,6	6,89	28,62	82,97	3,46	442,16
19,7	6,90	28,52	82,79	3,46	460,54
19,8	6,90	28,62	82,72	3,46	455,58
19,9	6,89	28,78	82,77	3,46	455,58
20,0	6,91	28,52	82,87	3,46	447,12
20,1	6,92	29,19	82,87	3,46	440,70
20,2	6,92	28,42	82,97	3,46	456,16
20,3	6,91	28,83	83,04	3,46	445,08
20,4	6,93	28,83	82,44	3,46	444,79
20,4	6,93	28,78	82,24	3,46	452,95
20,5	6,93	28,98	81,74	0,05	455,87
20,6	6,93	29,08	84,69	3,45	451,79
20,7	6,91	29,03	83,47	3,45	447,70
20,8	6,93	29,75	83,52	3,45	450,91
20,9	6,94	29,65	83,72	3,45	452,95
21,0	6,94	29,29	84,09	3,45	451,79
21,1	6,94	29,39	83,92	3,45	445,37
21,2	6,95	29,60	83,89	3,45	452,37
21,3	6,95	28,83	83,99	3,45	454,70
21,4	6,97	28,98	83,99	3,45	443,33
21,5	6,96	29,54	83,74	3,45	450,91
21,6	6,96	29,29	83,47	3,45	448,87
21,7	6,97	29,44	83,92	3,45	452,08
21,8	6,97	28,78	83,74	3,45	456,45
21,9	6,98	29,03	83,82	3,47	454,99
22,0	6,98	29,14	83,64	3,47	441,87
22,1	6,98	28,93	83,82	3,47	454,41
22,2	6,98	29,49	83,72	3,47	450,04
22,3	6,98	28,83	83,74	3,47	445,66
22,4	6,98	28,83	83,74	3,47	454,99
22,5	6,98	29,19	83,64	3,47	451,49
22,6	6,98	28,98	83,62	3,47	454,41

22,7	6,98	29,19	83,74	3,47	447,41
22,8	6,98	28,83	83,64	3,47	452,95
22,8	6,98	29,08	83,44	3,47	457,04
22,9	6,98	29,03	83,44	3,47	447,99
23,0	6,98	29,03	83,57	3,47	455,58
23,1	7,00	28,62	83,74	3,47	456,74
23,2	6,99	29,34	83,84	3,47	450,04
23,3	6,99	29,70	83,99	3,47	452,08
23,4	6,99	29,44	84,07	3,47	445,08
23,5	6,99	29,70	83,99	3,47	454,41
23,6	6,99	29,49	83,99	3,47	451,20
23,7	6,99	29,24	83,99	3,47	454,99
23,8	6,99	29,85	84,19	3,47	448,29
23,9	6,99	29,34	84,22	3,47	450,62
24,0	6,99	29,85	84,52	3,47	443,91
24,1	6,99	30,52	84,99	3,47	450,91
24,2	6,99	29,80	85,79	3,47	450,04
24,3	6,99	29,65	86,09	3,47	441,58
24,4	6,98	30,26	85,89	3,47	448,87
24,5	6,99	30,46	85,84	3,47	451,79
24,6	6,99	30,21	85,79	3,47	458,49
24,7	6,99	30,36	85,82	3,47	435,45
24,8	6,99	29,65	85,77	3,47	450,33
24,9	6,99	30,16	85,64	3,47	456,74
25,0	6,99	30,21	85,37	3,47	445,95
25,1	6,99	30,36	85,47	3,47	454,70
25,2	6,99	30,41	85,47	3,47	453,54
25,2	7,01	29,80	85,14	3,47	451,20
25,3	6,99	30,21	85,17	3,47	445,66
25,4	7,01	29,80	85,22	3,47	455,58
25,5	6,99	30,26	85,22	3,47	450,33
25,6	6,99	30,06	85,12	3,47	455,29
25,7	6,99	30,62	85,29	3,47	452,37
25,8	7,01	29,54	85,39	3,47	449,16
25,9	6,99	29,75	85,27	3,47	455,29
26,0	6,99	30,11	85,32	3,47	447,99
26,1	7,00	30,06	85,49	3,47	455,29
26,2	7,01	29,85	85,57	3,47	445,08
26,3	7,01	30,11	85,47	3,47	448,29
26,4	7,01	30,21	85,37	3,47	452,66
26,5	7,00	30,46	85,39	3,47	445,95
26,6	7,00	30,06	85,37	3,47	447,12
26,7	7,00	29,95	85,47	3,47	450,04
26,8	7,00	29,70	85,37	3,47	446,24
26,9	6,99	29,75	85,57	3,47	442,74
27,0	7,01	29,75	85,59	3,47	440,41

27,1	7,00	30,57	85,59	3,47	453,24
27,2	7,00	30,31	85,57	3,47	452,66
27,3	6,99	29,60	85,77	3,47	447,12
27,4	6,99	29,80	85,57	3,47	447,99
27,5	7,00	30,06	85,57	3,47	447,70
27,6	7,00	30,31	85,59	3,47	445,08
27,6	6,99	29,90	85,57	3,47	457,33
27,7	6,99	29,60	85,67	3,47	441,29
27,8	6,99	29,80	85,74	3,47	453,83
27,9	6,99	29,60	85,79	3,47	452,08
28,0	6,99	30,00	85,67	3,47	455,87
28,1	6,99	30,11	85,77	3,47	451,79
28,2	6,99	30,06	85,77	3,47	450,62
28,3	6,99	30,16	85,79	3,47	447,41
28,4	6,98	29,60	85,87	3,47	452,95
28,5	6,98	29,75	85,77	3,47	444,49
28,6	6,98	29,54	85,64	3,47	447,12
28,7	6,98	29,80	85,77	3,47	444,79
28,8	6,98	29,80	85,77	3,47	451,49
28,9	6,98	29,90	85,77	3,47	451,79
29,0	6,98	29,80	85,74	3,47	451,79
29,1	6,98	30,16	85,67	3,47	455,58
29,2	6,98	30,21	85,67	3,47	454,12
29,3	6,98	29,95	85,77	3,47	451,20
29,4	6,98	29,60	85,64	3,47	456,74
29,5	6,98	29,70	85,64	3,47	453,83
29,6	6,98	30,21	85,57	3,47	450,04
29,7	6,98	29,90	85,57	3,47	454,12
29,8	6,98	30,16	85,47	3,47	442,16
29,9	6,98	29,85	85,59	3,47	454,99
30,0	6,98	29,70	85,64	3,47	447,99
30,0	6,97	29,95	85,67	3,47	451,20
30,1	6,97	29,95	85,67	3,47	456,74
30,2	6,99	29,90	85,57	3,47	453,54
30,3	6,96	29,90	85,67	3,47	455,58
30,4	6,97	29,95	85,57	3,47	447,99
30,5	6,97	30,36	85,67	3,47	453,83
30,6	6,97	30,41	85,74	3,47	450,91
30,7	6,96	29,85	85,64	3,47	451,79
30,8	6,98	30,06	85,77	3,47	458,79
30,9	6,97	29,65	85,79	3,47	444,79
31,0	6,97	30,21	85,67	3,47	456,16
31,1	6,97	30,21	85,77	3,47	456,16
31,2	6,95	29,95	85,77	3,47	452,95
31,3	6,97	30,00	85,67	3,47	450,62
31,4	6,97	29,75	85,67	3,47	454,70

31,5	6,96	30,11	85,74	3,47	458,20
31,6	6,96	30,21	85,74	3,47	450,04
31,7	6,97	30,21	85,77	3,47	456,16
31,8	6,97	29,75	85,92	3,47	453,83
31,9	6,97	30,52	85,94	3,47	453,83
32,0	6,97	30,21	85,87	3,47	455,29
32,1	6,97	30,21	85,87	3,47	452,95
32,2	6,97	29,75	85,84	3,47	441,58
32,3	6,96	30,31	85,79	3,47	441,58
32,4	6,96	30,21	85,32	3,47	451,49
32,4	6,96	30,67	85,67	0,05	457,62
32,5	6,95	30,00	86,69	3,47	447,99
32,6	6,95	30,41	86,67	3,47	452,37
32,7	6,95	31,03	86,92	3,47	450,33
32,8	6,95	30,87	86,82	3,47	446,24
32,9	6,94	30,72	86,57	3,47	450,91
33,0	6,95	30,31	86,19	3,47	443,33
33,1	6,95	30,57	86,47	3,47	454,12
33,2	6,95	30,06	86,44	3,47	453,83
33,3	6,95	30,21	86,39	3,47	444,20
33,4	6,94	30,52	86,39	3,47	441,29
33,5	6,94	30,21	86,39	3,47	452,08
33,6	6,95	29,75	86,39	3,47	447,41
33,7	6,96	29,70	86,47	3,47	440,99
33,8	6,96	29,95	86,44	3,47	444,79
33,9	6,95	30,36	86,37	3,47	445,66
34,0	6,94	29,85	86,29	3,47	445,37
34,1	6,94	29,75	86,29	3,47	448,29
34,2	6,95	29,90	86,29	3,47	452,66
34,3	6,96	30,46	86,19	3,47	455,58
34,4	6,94	30,00	86,19	3,47	452,08
34,5	6,94	29,65	86,22	3,47	440,99
34,6	6,94	29,90	86,19	3,47	454,99
34,7	6,96	29,90	86,07	3,47	449,16
34,8	6,94	29,95	86,07	3,47	446,54
34,8	6,94	29,95	86,07	3,47	452,95
34,9	6,95	29,80	86,09	3,47	444,20
35,0	6,95	30,00	85,99	3,47	450,62
35,1	6,96	29,95	86,02	3,47	460,54
35,2	6,93	29,85	85,94	3,47	443,62
35,3	6,93	30,31	85,82	3,47	448,29
35,4	6,94	30,36	85,82	3,47	452,37
35,5	6,94	29,95	85,84	3,47	450,04
35,6	6,94	29,60	85,77	3,47	452,95
35,7	6,94	29,60	85,77	3,47	445,37
35,8	6,93	30,57	85,79	3,47	453,54

35,9	6,93	29,95	85,79	3,47	455,58
36,0	6,93	29,85	85,74	3,47	448,87
36,1	6,93	29,60	85,67	3,47	443,04
36,2	6,93	29,54	85,67	3,47	454,99
36,3	6,93	29,49	85,67	3,47	454,99
36,4	6,93	29,44	85,59	3,47	445,08
36,5	6,93	29,95	85,59	3,47	450,91
36,6	6,93	29,44	85,49	3,47	453,24
36,7	6,93	29,65	85,47	3,47	453,54
36,8	6,93	30,00	85,49	3,47	445,08
36,9	6,93	30,11	85,39	3,47	452,66
37,0	6,91	30,16	85,29	3,47	452,08
37,1	6,93	29,54	85,32	3,47	453,24
37,2	6,93	29,95	85,29	3,47	454,41
37,2	6,93	29,49	85,42	3,47	446,83
37,3	6,93	29,70	85,42	3,47	444,20
37,4	6,91	29,85	85,22	3,47	454,99
37,5	6,91	29,65	85,32	3,47	444,20
37,6	6,91	29,95	85,19	3,47	445,37
37,7	6,93	30,98	85,07	3,47	452,08
37,8	6,91	30,82	85,14	3,47	450,91
37,9	6,90	30,77	85,02	3,47	445,95
38,0	6,91	30,67	84,99	3,47	456,16
38,1	6,91	30,72	84,79	3,47	449,45
38,2	6,91	31,08	84,74	3,47	449,16
38,3	6,91	30,46	84,74	3,47	448,29
38,4	6,90	30,46	84,62	3,47	453,83
38,5	6,91	30,46	84,62	3,47	452,66
38,6	6,90	30,67	84,54	3,47	453,54
38,7	6,90	30,77	84,52	3,47	441,29
38,8	6,90	30,72	84,52	3,47	445,08
38,9	6,90	30,98	84,52	3,47	441,87
39,0	6,90	30,82	84,54	3,47	455,58
39,1	6,90	30,77	84,44	3,47	443,62
39,2	6,90	30,98	84,39	3,47	444,79
39,3	6,90	30,82	84,39	3,47	445,08
39,4	6,91	30,82	84,24	3,47	450,91
39,5	6,91	30,62	84,09	3,47	450,91
39,6	6,89	31,08	84,19	3,47	454,12
39,6	6,89	30,57	84,12	3,45	449,16
39,7	6,89	30,98	84,07	3,45	447,99
39,8	6,89	30,62	84,02	3,45	448,87
39,9	6,89	30,77	83,99	3,45	452,37
40,0	6,89	30,87	83,99	3,45	451,79
40,1	6,91	30,77	83,97	3,45	454,12
40,2	6,89	31,03	83,94	3,45	455,58

40,3	6,89	30,92	83,99	3,45	442,16
40,4	6,88	31,03	83,99	3,45	445,95
40,5	6,90	30,57	83,94	3,45	454,41
40,6	6,89	30,72	83,82	3,45	454,41
40,7	6,89	30,92	83,92	3,45	450,04
40,8	6,89	30,77	83,84	3,45	452,37
40,9	6,88	30,57	83,74	3,45	447,12
41,0	6,88	30,72	83,67	3,45	440,99
41,1	6,88	30,67	83,84	3,45	457,04
41,2	6,88	30,57	83,74	3,45	455,29
41,3	6,88	30,72	83,72	3,45	454,70
41,4	6,87	30,77	83,64	3,45	453,24
41,5	6,88	31,23	83,64	3,45	447,70
41,6	6,87	30,72	83,64	3,45	442,45
41,7	6,87	30,41	83,67	3,45	445,08
41,8	6,87	30,67	83,47	3,45	442,16
41,9	6,88	30,67	83,44	3,45	451,49
42,0	6,87	30,82	83,57	3,45	440,12
42,0	6,87	30,67	83,49	3,45	451,49
42,1	6,87	30,62	83,44	3,45	452,08
42,2	6,87	30,77	83,44	3,45	444,49
42,3	6,87	31,03	83,39	3,45	446,24
42,4	6,87	30,72	83,39	3,45	446,83
42,5	6,87	30,98	83,32	3,45	454,41
42,6	6,85	30,46	83,32	3,45	456,74
42,7	6,87	30,67	83,34	3,45	446,24
42,8	6,85	30,67	83,32	3,45	451,49
42,9	6,87	30,62	83,22	3,45	451,49
43,0	6,87	30,57	83,22	3,45	445,66
43,1	6,85	30,92	83,22	3,45	453,83
43,2	6,87	30,46	83,14	3,45	447,70
43,3	6,86	30,46	83,12	3,45	446,83
43,4	6,86	30,31	83,07	3,45	457,33
43,5	6,86	30,82	83,04	3,45	451,79
43,6	6,86	30,72	82,99	3,45	453,83
43,7	6,86	30,57	82,94	3,45	454,12
43,8	6,86	30,46	83,04	3,45	454,99
43,9	6,86	30,52	82,97	3,45	450,33
44,0	6,84	30,62	82,99	3,45	453,54
44,1	6,84	30,67	82,87	3,45	447,70
44,2	6,84	30,77	82,87	3,45	451,79
44,3	6,84	30,46	82,84	3,45	449,45
44,4	6,83	30,87	82,87	3,45	451,49
44,4	6,84	30,87	82,84	3,45	453,54
44,5	6,84	30,92	82,84	3,45	443,33
44,6	6,83	30,77	82,87	3,45	453,54

44,7	6,84	30,98	82,94	3,45	453,24
44,8	6,83	30,98	82,94	3,45	447,12
44,9	6,83	30,67	82,94	3,45	443,91
45,0	6,84	30,82	82,87	3,45	445,08
45,1	6,83	31,03	82,84	3,45	444,79
45,2	6,84	30,62	82,87	3,45	450,04
45,3	6,83	30,46	82,87	3,45	452,08
45,4	6,82	30,52	82,84	3,45	446,54
45,5	6,82	30,92	82,97	3,45	444,49
45,6	6,83	30,62	82,97	3,45	456,45
45,7	6,82	30,98	82,97	3,45	455,87

45,8	6,82	30,72	82,97	3,45	453,83
45,9	6,82	30,52	82,79	3,45	449,45
46,0	6,82	30,62	82,87	3,45	443,33
46,1	6,82	30,82	82,77	3,45	447,41
46,2	6,82	30,46	82,79	3,45	443,33
46,3	6,81	30,62	82,69	3,45	454,12
46,4	6,82	30,52	82,67	3,45	450,33
46,5	6,81	30,92	82,77	3,45	449,74
46,6	6,81	30,98	82,77	3,45	444,79
46,7	6,81	30,92	82,79	3,45	455,29
46,8	6,81	30,52	82,79	3,45	441,87

46,8	6,81	30,82	82,69	3,45	448,29
46,9	6,81	30,57	82,72	3,45	452,66
47,0	6,81	30,87	82,72	3,45	452,66
47,1	6,80	30,67	82,69	3,45	451,49
47,2	6,81	30,46	82,44	3,45	449,74
47,3	6,80	30,72	82,07	3,45	448,29
47,4	6,81	30,36	82,62	3,45	456,45
47,5	6,78	30,82	81,27	0,05	443,04
47,6	6,78	31,18	83,44	3,45	442,16
47,7	6,78	31,49	83,79	3,45	442,45
47,8	6,78	31,79	83,99	3,45	458,79

Tableau 26 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15B) de 15 litres contenant 10 litres de boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% de MES.

Temps (heure)	pH	Temp réact (°C)	DO (%)	Débit (LPM)	Agit (rpm)
0,0	7,08	29,23	95,09	2,97	305,66
0,1	7,13	29,44	95,74	2,97	289,62
0,2	7,19	29,59	96,42	2,97	295,74
0,3	7,22	29,85	96,69	2,97	301,58
0,4	7,25	29,75	96,52	2,97	300,70
0,5	7,27	29,65	96,64	2,97	300,99
0,6	7,31	29,49	96,59	2,97	304,20
0,7	7,15	29,34	96,24	2,97	298,95
0,8	7,20	29,39	96,27	2,97	299,24
0,9	7,22	29,34	96,32	2,97	302,16
1,0	7,25	29,49	96,44	2,97	306,24
1,1	7,28	29,49	96,39	2,97	297,49
1,2	7,29	29,13	96,42	2,97	303,04
1,2	7,05	29,08	96,07	2,97	298,66
1,3	7,11	29,18	95,99	2,97	298,37
1,4	7,16	28,97	96,07	2,97	303,62
1,5	7,19	29,39	96,27	2,97	298,08
1,6	7,23	29,18	96,34	2,97	300,70
1,7	7,27	29,23	96,44	2,97	297,49
1,8	7,28	29,13	96,42	2,97	303,91
1,9	7,30	28,87	96,57	2,97	301,29
2,0	7,03	29,28	96,17	2,97	301,87
2,1	7,10	29,02	96,37	2,97	301,58
2,2	7,15	29,18	96,42	2,97	299,54
2,3	7,19	29,34	96,67	2,97	301,29
2,4	7,22	29,28	96,69	2,97	326,66
2,5	7,23	29,44	96,94	2,97	303,33

2,6	7,26	29,28	97,12	2,97	300,70
2,7	7,29	29,18	97,02	2,97	303,04
2,8	7,29	29,13	97,02	2,97	300,12
2,9	7,31	29,28	97,12	2,97	303,91
3,0	7,00	29,34	96,84	2,97	301,58
3,1	7,08	28,97	97,02	2,97	301,87
3,2	7,14	29,23	97,22	2,97	306,83
3,3	7,16	29,34	97,29	2,97	303,62
3,4	7,20	29,13	97,44	2,97	302,16
3,5	7,22	29,34	97,54	2,97	302,16
3,6	7,23	29,34	97,64	2,97	299,54
3,6	7,25	29,28	97,72	2,97	302,16
3,7	7,26	29,23	97,77	2,97	302,16
3,8	7,27	29,34	97,74	2,97	301,58
3,9	7,29	29,44	97,74	2,97	303,91
4,0	7,30	29,39	97,72	2,97	300,99
4,1	7,20	29,23	97,74	2,97	299,24
4,2	7,22	29,54	97,64	2,97	303,91
4,3	7,23	29,28	97,72	2,97	302,45
4,4	7,25	28,97	97,72	2,97	295,45
4,5	7,25	29,44	97,72	2,97	303,62
4,6	7,27	29,44	97,82	2,97	304,49
4,7	7,29	29,34	97,82	2,97	301,58
4,8	7,30	29,34	97,89	2,97	302,16
4,9	7,02	29,39	97,82	2,97	298,37
5,0	7,05	29,49	97,64	2,97	301,58
5,1	7,11	29,18	97,77	2,97	302,74
5,2	7,14	29,34	97,77	2,97	296,33
5,3	7,17	29,02	97,82	2,97	299,24

5,4	7,19	29,08	97,82	2,97	302,74
5,5	7,21	29,28	97,92	2,97	300,12
5,6	7,23	29,23	98,02	2,97	304,49
5,7	7,22	29,44	98,02	2,97	301,87
5,8	7,25	29,28	98,02	2,97	300,99
5,9	7,27	29,49	98,12	2,97	295,74
6,0	7,27	29,02	98,12	2,97	301,29
6,0	7,29	29,34	98,12	2,97	303,33
6,1	7,29	29,13	98,29	2,97	302,45
6,2	7,30	29,34	98,27	2,97	302,74
6,3	7,19	29,18	98,27	2,97	302,16
6,4	7,14	29,49	98,22	2,97	298,66
6,5	7,17	29,02	98,24	2,97	303,33
6,6	7,20	29,39	98,22	2,97	302,74
6,7	7,22	29,34	98,27	2,97	300,12
6,8	7,24	29,18	98,37	2,97	299,24
6,9	7,25	29,54	98,39	2,97	302,74
7,0	7,26	29,44	98,47	2,97	300,70
7,1	7,26	29,39	98,42	2,97	303,04
7,2	7,28	29,23	98,47	2,97	304,20
7,3	7,29	29,28	98,54	2,97	298,08
7,4	7,30	29,13	98,54	2,97	298,37
7,5	7,04	29,23	98,24	2,97	301,87
7,6	7,07	29,28	98,27	2,97	302,45
7,7	7,12	29,39	98,44	2,97	303,04
7,8	7,15	29,28	98,49	2,97	299,83
7,9	7,17	29,23	98,54	2,97	301,29
8,0	7,19	29,39	98,64	2,97	301,58
8,1	7,21	29,08	98,64	2,97	299,24

8,2	7,22	29,49	98,72	2,97	303,04
8,3	7,22	29,39	98,82	2,97	303,33
8,4	7,25	29,34	98,82	2,97	303,62
8,4	7,23	29,85	92,84	0,03	302,74
8,5	7,22	29,18	98,02	2,97	300,41
8,6	7,24	29,70	99,44	2,97	302,45
8,7	7,25	29,70	99,77	2,97	304,20
8,8	7,26	30,06	99,79	2,97	303,33
8,9	7,26	29,85	99,77	2,97	303,62
9,0	7,27	29,80	99,77	2,97	302,74
9,1	7,28	29,90	99,77	2,97	303,62
9,2	7,30	29,80	99,77	2,97	303,91
9,3	7,30	29,59	99,79	2,97	300,99
9,4	7,31	30,01	99,67	2,97	298,95
9,5	7,01	29,65	99,24	2,97	298,08
9,6	7,05	29,59	99,32	2,97	299,83
9,7	7,09	29,54	99,32	2,97	305,37
9,8	7,11	29,90	99,32	2,97	302,74
9,9	7,13	29,70	99,42	2,97	303,04
10,0	7,15	29,34	99,32	2,97	301,29
10,1	7,16	29,39	99,32	2,97	298,95
10,2	7,18	29,34	99,34	2,97	304,20
10,3	7,20	29,54	99,34	2,97	299,54
10,4	7,20	29,44	99,32	2,97	298,08
10,5	7,22	29,23	99,32	2,97	301,87
10,6	7,23	29,28	99,32	2,97	300,12
10,7	7,23	29,34	99,32	2,97	299,54
10,8	7,23	29,23	99,32	2,97	303,62
10,8	7,25	29,49	99,32	2,97	297,79
10,9	7,26	29,18	99,27	2,97	304,20
11,0	7,27	29,34	99,24	2,97	297,79
11,1	7,27	29,13	99,27	2,97	297,49
11,2	7,28	29,54	99,24	2,97	299,24
11,3	7,28	29,18	99,27	2,97	302,74
11,4	7,28	29,49	99,32	2,97	301,87
11,5	7,28	29,13	99,24	2,97	297,49
11,6	7,28	29,34	99,27	2,97	303,04
11,7	7,29	29,02	99,24	2,97	299,83
11,8	7,29	29,49	99,27	2,97	300,12
11,9	7,30	29,34	99,27	2,97	298,66
12,0	7,31	29,23	99,27	2,97	299,83
12,1	7,14	29,28	99,07	2,97	300,99
12,2	7,14	29,18	99,07	2,97	298,66
12,3	7,16	29,08	99,19	2,97	298,08
12,4	7,18	29,28	99,14	2,97	303,04
12,5	7,18	29,18	99,14	2,97	300,99

12,6	7,21	29,28	99,17	2,97	303,91
12,7	7,22	29,02	99,19	2,97	299,24
12,8	7,22	29,44	99,17	2,97	301,29
12,9	7,22	29,18	99,17	2,97	300,70
13,0	7,25	29,02	99,17	2,97	303,04
13,1	7,25	29,23	99,17	2,97	301,58
13,2	7,26	29,08	99,07	2,97	297,20
13,2	7,25	29,23	99,17	2,97	303,62
13,3	7,26	29,28	99,19	2,97	300,99
13,4	7,26	29,18	99,17	2,97	300,99
13,5	7,28	29,08	99,14	2,97	300,12
13,6	7,28	29,39	99,17	2,97	301,58
13,7	7,28	29,28	99,27	2,97	305,66
13,8	7,28	29,34	99,27	2,97	303,91
13,9	7,30	29,28	99,17	2,97	301,29
14,0	7,29	29,08	99,14	2,97	300,41
14,1	7,29	29,18	99,17	2,97	303,04
14,2	7,29	29,23	99,17	2,97	300,70
14,3	7,30	29,13	99,17	2,97	297,49
14,4	7,30	29,13	99,14	2,97	299,24
14,5	7,30	29,34	99,14	2,97	304,79
14,6	7,26	29,23	99,14	2,96	299,54
14,7	7,27	29,28	99,17	2,96	302,16
14,8	7,26	29,23	99,14	2,96	300,12
14,9	7,28	29,02	99,17	2,96	301,87
15,0	7,28	29,18	99,14	2,96	300,99
15,1	7,28	29,39	99,17	2,96	303,04
15,2	7,29	29,28	99,17	2,96	303,91
15,3	7,30	29,28	99,17	2,96	302,16
15,4	7,30	29,23	99,19	2,96	304,20
15,5	7,30	29,39	99,17	2,96	300,41
15,6	7,30	29,23	99,17	2,96	302,45
15,6	6,98	29,70	98,84	2,96	301,29
15,7	7,03	29,23	98,92	2,96	301,29
15,8	7,05	29,28	99,02	2,96	299,83
15,9	7,08	29,39	98,99	2,96	301,87
16,0	7,10	29,23	99,02	2,96	299,83
16,1	7,10	29,23	99,07	2,96	302,74
16,2	7,12	29,18	99,07	2,96	302,45
16,3	7,13	29,28	99,07	2,96	301,29
16,4	7,15	29,18	99,17	2,96	300,70
16,5	7,16	29,02	99,17	2,96	303,62
16,6	7,16	29,23	99,07	2,96	303,04
16,7	7,19	29,08	99,07	2,96	301,29
16,8	7,17	29,13	99,07	2,96	300,99
16,9	7,20	29,18	99,17	2,96	297,49

17,0	7,20	29,28	99,17	2,96	300,12
17,1	7,20	29,18	99,17	2,96	303,04
17,2	7,21	29,28	99,17	2,96	298,66
17,3	7,22	29,39	99,17	2,96	302,74
17,4	7,21	29,34	99,17	2,96	303,91
17,5	7,22	29,18	99,17	2,96	301,29
17,6	7,24	29,13	99,17	2,96	299,83
17,7	7,22	29,18	99,14	2,96	301,87
17,8	7,22	29,75	99,17	2,96	298,66
17,9	7,23	29,23	99,19	2,96	304,20
18,0	7,23	29,13	99,14	2,96	300,12
18,0	7,24	29,34	99,17	2,96	304,49
18,1	7,23	29,13	99,14	2,96	298,66
18,2	7,25	29,34	99,14	2,96	302,16
18,3	7,25	29,28	99,27	2,96	303,62
18,4	7,25	29,13	99,27	2,96	303,04
18,5	7,25	29,02	99,27	2,96	301,87
18,6	7,25	29,18	99,27	2,96	303,04
18,7	7,26	29,59	99,27	2,96	299,83
18,8	7,26	29,18	99,27	2,96	298,95
18,9	7,27	29,08	99,27	2,96	301,29
19,0	7,26	29,18	99,17	2,96	302,74
19,1	7,26	29,34	99,27	2,96	300,99
19,2	7,26	29,23	99,17	2,96	303,33
19,3	7,27	29,13	99,17	2,96	300,70
19,4	7,28	29,18	99,24	2,96	304,79
19,5	7,28	29,34	99,24	2,96	303,33
19,6	7,27	29,08	99,27	2,96	300,99
19,7	7,27	29,18	99,24	2,96	298,95
19,8	7,27	29,18	99,27	2,96	300,99
19,9	7,27	29,18	99,24	2,96	304,79
20,0	7,27	29,23	99,17	2,96	300,41
20,1	7,29	29,02	99,14	2,96	299,83
20,2	7,27	29,08	99,29	2,96	303,33
20,3	7,29	29,02	99,17	2,96	301,87
20,4	7,29	29,18	99,14	2,96	303,62
20,4	7,29	29,18	99,14	2,96	300,99
20,5	7,30	29,13	99,27	2,96	301,58
20,6	7,28	29,28	99,24	2,96	300,70
20,7	7,28	29,08	99,24	2,96	302,74
20,8	7,30	29,18	99,27	2,96	304,20
20,9	7,30	29,34	99,32	2,96	305,08
21,0	7,30	29,34	99,24	2,96	300,12
21,1	7,21	29,44	99,27	2,96	301,29
21,2	7,22	29,23	99,14	2,96	301,58
21,3	7,21	29,23	99,24	2,96	297,79

21,4	7,22	29,75	99,27	2,96	300,12
21,5	7,24	29,39	99,24	2,96	299,83
21,6	7,24	29,44	99,24	2,96	300,99
21,7	7,24	29,28	99,24	2,96	302,74
21,8	7,26	29,18	99,24	2,96	302,16
21,9	7,26	29,34	99,24	2,96	299,83
22,0	7,25	29,18	99,24	2,96	304,49
22,1	7,25	29,08	99,27	2,96	303,62
22,2	7,25	29,08	99,24	2,96	303,62
22,3	7,27	29,23	99,24	2,96	296,62
22,4	7,27	29,13	99,24	2,96	298,66
22,5	7,26	29,02	99,24	2,96	300,12
22,6	7,28	29,13	99,24	2,96	304,49
22,7	7,28	29,23	99,24	2,96	302,74
22,8	7,28	29,28	99,27	2,96	300,70
22,8	7,28	29,18	99,24	2,96	303,62
22,9	7,28	28,97	99,24	2,96	298,95
23,0	7,28	29,02	99,27	2,96	302,45
23,1	7,28	29,34	99,14	2,96	301,58
23,2	7,30	29,13	99,12	2,96	299,54
23,3	7,29	29,28	98,34	0,03	304,79
23,4	7,29	29,23	94,39	0,03	302,74
23,5	7,28	29,18	98,62	2,95	300,99
23,6	7,27	29,96	99,07	2,95	304,20
23,7	7,27	29,65	99,74	2,95	300,70
23,8	7,27	30,11	99,74	2,95	301,87
23,9	7,27	30,11	99,72	2,95	302,16
24,0	7,29	29,90	99,74	2,96	301,29
24,1	7,27	29,85	98,37	0,28	302,16
24,2	7,39	31,51	97,89	0,28	300,12
24,3	8,20	30,42	97,82	0,29	305,66
24,4	6,47	53,69	99,74	0,27	289,62
24,5	6,71	54,21	99,74	0,28	295,74
24,6	7,78	50,02	99,77	0,28	301,58
24,7	6,89	62,38	99,74	0,28	300,70
24,8	6,93	61,61	99,77	0,28	300,99
24,9	7,08	61,61	99,72	0,28	304,20
25,0	7,57	58,76	99,79	0,28	298,95
25,1	5,38	52,35	93,02	0,28	299,24
25,2	4,84	61,04	90,39	0,28	302,16
25,2	4,68	59,28	90,64	0,28	306,24
25,3	4,60	52,35	90,97	0,28	297,49
25,4	4,53	63,52	91,07	0,28	303,04
25,5	4,47	60,26	91,07	0,28	298,66
25,6	4,46	60,47	90,82	0,28	298,37
25,7	4,44	60,26	90,82	0,27	303,62

25,8	4,40	49,76	90,64	0,28	298,08
25,9	4,39	43,14	89,92	0,28	300,70
26,0	4,37	41,28	89,77	0,27	297,49
26,1	4,35	41,95	89,32	0,28	303,91
26,2	4,40	20,44	89,09	0,27	301,29
26,3	4,44	20,91	87,97	0,27	301,87
26,4	4,42	21,78	87,49	0,27	301,58
26,5	4,40	22,20	86,94	0,28	299,54
26,6	4,36	21,94	86,72	0,28	301,29
26,7	4,33	21,99	86,34	0,28	326,66
26,8	4,30	22,04	85,79	0,28	303,33
26,9	4,33	22,20	85,37	0,27	300,70
27,0	4,37	22,15	84,87	0,27	303,04
27,1	4,40	22,20	84,42	0,28	300,12
27,2	4,44	22,66	83,97	0,28	303,91
27,3	4,45	21,68	83,62	0,27	301,58
27,4	4,42	22,51	83,34	0,28	301,87
27,5	4,40	22,51	83,22	0,28	306,83
27,6	4,40	22,51	83,12	0,27	303,62
27,6	4,40	22,61	82,94	0,27	302,16
27,7	4,41	22,46	82,74	0,27	302,16
27,8	4,41	22,77	82,54	0,27	299,54
27,9	4,44	22,97	82,47	0,27	302,16
28,0	4,42	22,72	82,37	0,27	302,16
28,1	4,43	22,87	82,19	0,27	301,58
28,2	4,43	23,23	82,12	0,27	303,91
28,3	4,44	23,03	81,92	0,27	300,99
28,4	4,45	23,13	81,84	0,27	299,24
28,5	4,42	22,77	81,77	0,27	303,91
28,6	4,42	23,13	81,59	0,27	302,45
28,7	4,42	22,92	81,49	0,27	295,45
28,8	4,41	22,92	81,32	0,27	303,62
28,9	4,42	22,72	81,27	0,27	304,49
29,0	4,42	22,82	81,17	0,27	301,58
29,1	4,42	23,34	81,14	0,27	302,16
29,2	4,42	22,82	81,04	0,27	298,37
29,3	4,42	23,08	80,97	0,27	301,58
29,4	4,40	23,54	80,92	0,27	302,74
29,5	4,44	23,23	80,82	0,27	296,33
29,6	4,45	23,39	80,69	0,27	299,24
29,7	4,42	23,34	80,62	0,27	302,74
29,8	4,42	23,08	80,42	0,27	300,12
29,9	4,40	23,44	80,37	0,27	304,49
30,0	4,40	23,54	80,37	0,27	301,87
30,0	4,38	23,23	80,27	0,27	300,99
30,1	4,38	23,39	80,27	0,27	295,74

30,2	4,38	23,54	80,19	0,27	301,29
30,3	4,37	23,39	80,14	0,27	303,33
30,4	4,38	23,34	80,04	0,27	302,45
30,5	4,37	23,34	79,92	0,27	302,74
30,6	4,38	23,44	79,82	0,27	302,16
30,7	4,41	23,34	79,77	0,27	298,66
30,8	4,40	23,34	79,67	0,27	303,33
30,9	4,39	23,44	79,47	0,27	302,74
31,0	4,39	23,34	79,42	0,27	300,12
31,1	4,38	23,18	79,24	0,27	299,24
31,2	4,39	23,54	79,14	0,27	302,74
31,3	4,38	23,23	79,17	0,27	300,70
31,4	4,39	23,08	79,22	0,27	303,04
31,5	4,40	23,28	79,24	0,27	304,20
31,6	4,39	23,59	79,19	0,27	298,08
31,7	4,40	23,23	79,27	0,27	298,37
31,8	4,39	23,39	79,29	0,27	301,87
31,9	4,39	23,13	79,22	0,27	302,45
32,0	4,38	23,39	79,22	0,27	303,04
32,1	4,38	23,03	79,27	0,27	299,83
32,2	4,38	23,54	79,24	0,27	301,29
32,3	4,36	23,13	79,24	0,27	301,58
32,4	4,37	23,13	79,24	0,27	299,24
32,4	4,36	23,44	79,22	0,27	303,04
32,5	4,38	23,65	79,24	0,27	303,33
32,6	4,38	23,54	79,17	0,27	303,62
32,7	4,38	23,28	79,07	0,27	302,74
32,8	4,38	23,13	79,07	0,27	300,41
32,9	4,38	23,18	78,99	0,27	302,45
33,0	4,39	23,34	78,87	0,27	304,20
33,1	4,37	23,59	78,77	0,27	303,33
33,2	4,38	23,34	78,72	0,27	303,62
33,3	4,39	23,44	78,59	0,27	302,74
33,4	4,39	23,44	78,52	0,27	303,62
33,5	4,39	22,92	78,39	0,27	303,91
33,6	4,37	23,18	78,34	0,27	300,99
33,7	4,37	23,23	78,24	0,27	298,95
33,8	4,37	23,39	78,19	0,27	298,08
33,9	4,39	23,18	77,99	0,27	299,83
34,0	4,39	23,08	77,92	0,27	305,37
34,1	4,38	23,34	77,92	0,27	302,74
34,2	4,38	22,97	77,94	0,27	303,04
34,3	4,38	22,97	77,82	0,27	301,29
34,4	4,38	23,44	77,82	0,27	298,95
34,5	4,38	23,03	77,79	0,27	304,20
34,6	4,38	23,13	77,82	0,27	299,54

34,7	4,36	23,49	77,82	0,27	298,08
34,8	4,36	22,97	77,79	0,27	301,87
34,8	4,37	23,39	77,79	0,27	300,12
34,9	4,37	23,34	77,74	0,27	299,54
35,0	4,36	23,28	77,79	0,27	303,62
35,1	4,36	22,92	77,79	0,27	297,79
35,2	4,36	23,49	77,82	0,27	304,20
35,3	4,36	22,61	77,82	0,27	297,79
35,4	4,35	22,40	77,74	0,27	297,49
35,5	4,35	22,51	77,77	0,27	299,24
35,6	4,35	22,56	77,64	0,27	302,74
35,7	4,35	22,46	77,64	0,27	301,87
35,8	4,34	22,61	77,54	0,27	297,49
35,9	4,35	22,35	77,57	0,27	303,04
36,0	4,35	22,61	77,47	0,27	299,83
36,1	4,35	22,61	77,42	0,27	300,12
36,2	4,35	22,51	77,29	0,27	298,66
36,3	4,33	22,66	77,19	0,27	299,83
36,4	4,34	22,72	77,19	0,27	300,99
36,5	4,34	22,51	77,27	0,27	298,66
36,6	4,34	22,40	77,39	0,27	298,08
36,7	4,34	22,40	77,42	0,27	303,04
36,8	4,34	22,25	77,42	0,27	300,99
36,9	4,33	22,51	77,39	0,27	303,91
37,0	4,34	22,56	77,37	0,27	299,24
37,1	4,34	22,61	77,39	0,27	301,29
37,2	4,34	22,51	77,32	0,27	300,70
37,2	4,34	22,35	77,24	0,27	303,04
37,3	4,34	22,25	77,22	0,25	301,58
37,4	4,34	22,56	77,22	0,25	297,20
37,5	4,34	22,30	77,14	0,25	303,62
37,6	4,34	22,56	77,17	0,27	300,99
37,7	4,35	22,92	77,04	0,27	300,99
37,8	4,33	22,56	76,97	0,27	300,12
37,9	4,33	22,72	76,97	0,27	301,58
38,0	4,33	22,61	76,84	0,27	305,66
38,1	4,33	22,82	76,84	0,27	303,91
38,2	4,33	22,92	76,74	0,27	301,29
38,3	4,36	22,51	76,77	0,27	300,41
38,4	4,34	22,46	76,69	0,25	303,04
38,5	4,34	22,77	76,69	0,27	300,70
38,6	4,34	22,82	76,69	0,27	297,49
38,7	4,34	22,61	76,57	0,25	299,24
38,8	4,34	22,51	76,54	0,25	304,79
38,9	4,34	22,46	76,54	0,25	299,54
39,0	4,34	22,82	76,49	0,25	302,16

39,1	4,34	22,66	76,42	0,25	300,12
39,2	4,34	22,51	76,42	0,27	301,87
39,3	4,34	22,40	76,34	0,27	300,99
39,4	4,34	22,56	76,32	0,25	303,04
39,5	4,34	22,56	76,22	0,25	303,91
39,6	4,33	22,72	76,22	0,25	302,16
39,6	4,32	22,77	76,14	0,25	304,20
39,7	4,35	22,72	76,17	0,25	300,41
39,8	4,34	22,61	76,04	0,27	302,45
39,9	4,33	22,51	76,09	0,27	301,29
40,0	4,34	22,92	76,04	0,27	301,29
40,1	4,34	22,82	76,04	0,25	299,83
40,2	4,34	22,56	75,97	0,25	301,87
40,3	4,35	22,82	76,02	0,25	299,83
40,4	4,34	22,77	75,97	0,25	302,74
40,5	4,34	22,87	75,92	0,25	302,45
40,6	4,34	22,51	75,89	0,25	301,29
40,7	4,34	22,72	75,92	0,27	300,70
40,8	4,34	22,56	75,82	0,27	303,62
40,9	4,34	22,97	75,82	0,25	303,04
41,0	4,33	22,87	75,82	0,25	301,29
41,1	4,34	22,97	75,79	0,25	300,99
41,2	4,34	22,72	75,72	0,25	297,49
41,3	4,33	22,40	75,69	0,25	300,12
41,4	4,34	22,72	75,62	0,25	303,04
41,5	4,32	22,51	75,62	0,25	298,66
41,6	4,34	22,82	75,54	0,25	302,74
41,7	4,33	23,03	75,57	0,25	303,91
41,8	4,34	22,72	75,54	0,25	301,29
41,9	4,34	22,56	75,54	0,25	299,83
42,0	4,33	22,77	75,47	0,25	301,87
42,0	4,34	22,56	75,49	0,25	298,66
42,1	4,33	23,03	75,42	0,25	304,20
42,2	4,32	22,77	75,44	0,25	300,12
42,3	4,33	22,97	75,47	0,25	304,49
42,4	4,33	22,66	75,42	0,25	298,66
42,5	4,33	22,77	75,39	0,25	302,16
42,6	4,33	22,77	75,39	0,25	303,62
42,7	4,33	22,72	75,37	0,25	303,04
42,8	4,33	22,77	75,32	0,25	301,87
42,9	4,32	22,61	75,34	0,25	303,04
43,0	4,33	22,46	75,34	0,25	299,83
43,1	4,32	22,66	75,14	0,25	298,95
43,2	4,30	22,87	75,19	0,27	301,29
43,3	4,30	22,46	75,12	0,27	302,74
43,4	4,30	22,40	75,12	0,27	300,99

43,5	4,31	22,56	75,12	0,27	303,33
43,6	4,33	22,61	75,12	0,25	300,70
43,7	4,33	22,92	75,09	0,25	304,79
43,8	4,33	22,87	75,09	0,25	303,33
43,9	4,33	22,61	75,12	0,25	300,99
44,0	4,33	22,56	75,12	0,25	298,95
44,1	4,34	22,46	75,12	0,25	300,99
44,2	4,34	22,82	75,07	0,25	304,79
44,3	4,34	22,40	75,02	0,27	300,41
44,4	4,34	22,51	74,99	0,27	299,83
44,4	4,36	22,56	75,02	0,27	303,33
44,5	4,34	22,92	74,99	0,27	301,87
44,6	4,35	22,77	74,99	0,27	303,62
44,7	4,35	22,72	74,92	0,27	300,99
44,8	4,37	22,66	74,94	0,27	301,58
44,9	4,36	22,87	74,77	0,27	300,70
45,0	4,36	22,82	74,77	0,25	302,74
45,1	4,36	22,51	74,79	0,25	304,20
45,2	4,37	22,92	74,79	0,25	305,08
45,3	4,37	22,35	74,82	0,25	300,12
45,4	4,37	22,66	74,77	0,25	301,29
45,5	4,35	22,87	74,79	0,25	301,58
45,6	4,36	22,87	74,79	0,25	297,79
45,7	4,36	22,61	74,82	0,25	300,12
45,8	4,36	22,92	74,77	0,25	299,83
45,9	4,36	22,61	74,89	0,25	300,99
46,0	4,36	22,72	74,89	0,27	302,74
46,1	4,36	22,92	74,99	0,27	302,16
46,2	4,36	22,77	74,94	0,27	299,83
46,3	4,37	22,51	75,02	0,25	304,49
46,4	4,37	22,82	75,09	0,25	303,62
46,5	4,37	22,56	75,09	0,25	303,62
46,6	4,37	22,82	75,12	0,25	296,62
46,7	4,37	22,40	75,17	0,25	298,66
46,8	4,36	22,51	75,17	0,25	300,12
46,8	4,37	22,56	75,17	0,25	304,49
46,9	4,37	22,51	75,29	0,27	302,74
47,0	4,37	22,56	75,29	0,27	300,70
47,1	4,37	22,61	75,29	0,25	303,62
47,2	4,38	22,51	75,37	0,25	298,95
47,3	4,38	22,87	75,37	0,25	302,45
47,4	4,38	23,13	75,42	0,25	301,58
47,5	4,36	22,61	75,42	0,25	299,54
47,6	4,39	22,82	75,42	0,25	304,79
47,7	4,36	22,87	75,57	0,25	302,74
47,8	4,38	22,72	75,54	0,25	300,99

Tableau 27 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à différents ajouts de résidus de levure d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) lors de deux fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans des bioréacteurs de 15 litres contenant un total de 10 litres de biosolides (Figure 16, chapitre 3).

Temps (hres)	15A UFC/ml (0,8% RL + 0,2% BS)	15B UFC/ml (0,5% RL + 0,5% BS)
0	1,17E+07	2,29E+07
3	3,45E+07	3,60E+07
6	3,40E+07	4,50E+07
9	5,60E+07	1,01E+08
12	7,80E+07	5,05E+08
15	9,20E+08	7,20E+08
18	1,15E+09	9,40E+08
21	2,44E+09	1,58E+09
24	2,10E+09	2,34E+09
30	2,22E+09	6,30E+09
36	2,41E+09	6,30E+09
48	2,37E+09	3,46E+09

Tableau 28 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures d'un mélange de résidus de levure (RL) (21/02/2002) à 0,8% MES avec des boues d'épuration secondaire (BS) (25/04/2002) à 0,2% MES par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15A) de 15 litres contenant 10 litres de ce mélange de biosolide.

Temps (heure)	pH	Temp réact (°C)	DO (%)	Débit (LPM)	Agit (rpm)
0,0	4,36	28,32	97,64	4,99	294,87
0,1	4,38	27,40	73,42	4,99	298,95
0,2	4,36	26,73	73,64	4,99	299,83
0,3	6,78	27,81	99,84	4,98	300,99
0,4	6,76	29,19	99,84	4,98	299,83
0,5	6,80	29,90	99,82	2,99	300,12
0,6	6,80	30,36	99,84	2,99	302,45
0,7	6,78	30,11	99,82	2,99	300,12
0,8	6,77	30,62	99,82	2,99	301,58
0,9	6,77	30,77	90,24	2,99	299,24
1,0	6,76	30,67	68,67	2,99	300,70
1,1	6,76	30,62	48,52	2,99	300,41
1,2	6,76	30,72	30,07	2,99	298,66
1,2	6,76	30,52	14,39	2,99	298,66
1,3	6,75	30,46	0,55	2,99	304,20
1,4	6,83	30,72	0,00	2,99	301,58
1,5	6,82	30,72	0,00	2,99	296,91
1,6	6,82	31,38	0,00	2,99	307,70
1,7	6,82	31,54	0,00	2,99	300,41
1,8	6,82	31,33	0,00	2,99	301,58
1,9	6,81	31,18	0,00	2,99	303,62
2,0	6,81	31,38	0,00	2,99	300,12
2,1	6,80	31,49	0,00	2,99	307,70
2,2	6,80	31,13	0,00	2,99	302,16
2,3	6,81	31,08	0,00	2,99	296,33
2,4	6,81	31,08	0,00	2,99	299,24
2,5	6,80	30,98	0,00	2,97	292,54
2,6	6,80	30,87	0,00	2,97	300,70
2,7	6,80	30,67	0,00	2,97	301,29
2,8	6,80	30,82	0,00	2,97	299,83
2,9	6,78	30,77	0,00	2,97	304,20
3,0	6,78	30,72	0,00	2,97	298,95
3,1	6,80	30,82	0,00	2,97	299,24
3,2	6,78	30,77	0,00	2,97	298,37
3,3	6,77	31,13	0,00	2,97	298,37
3,4	6,77	31,08	0,00	2,97	296,91
3,5	6,76	31,23	0,00	2,97	302,45
3,6	6,75	31,23	0,00	2,97	297,49
3,6	6,75	31,23	0,00	2,97	298,95
3,7	6,74	31,03	0,00	2,97	300,41
3,8	6,76	30,82	0,00	2,97	299,54
3,9	6,76	30,92	0,00	2,97	299,83
4,0	6,75	30,36	0,00	2,97	301,87
4,1	6,77	30,31	0,00	2,97	302,16
4,2	6,75	29,90	0,00	2,97	300,41
4,3	6,76	30,00	0,00	2,97	299,83
4,4	6,81	29,65	0,00	2,97	300,99
4,5	6,80	29,60	0,00	2,97	299,54
4,6	6,78	29,29	0,00	2,97	298,95
4,7	6,77	29,08	0,00	2,97	295,45
4,8	6,75	29,29	0,00	2,97	300,41
4,9	6,81	28,98	0,10	2,97	300,41
5,0	6,80	29,24	0,27	2,97	303,04
5,1	6,77	28,83	0,00	2,97	296,91
5,2	6,75	28,88	0,00	2,97	302,74
5,3	6,81	28,88	0,00	2,97	300,70
5,4	6,80	28,57	0,00	2,97	303,33
5,5	6,78	28,73	0,00	2,97	300,12
5,6	6,77	29,14	0,00	2,97	302,74
5,7	6,75	28,47	0,00	2,97	303,91
5,8	6,82	28,57	0,00	2,97	296,62
5,9	6,80	28,73	0,00	2,97	299,83
6,0	6,78	28,52	0,00	2,97	301,29

6,0	6,78	28,68	0,00	2,97	300,12
6,1	6,76	28,98	0,00	2,97	297,20
6,2	6,82	28,32	0,20	2,97	298,08
6,3	6,80	29,08	0,00	2,97	300,41
6,4	6,80	29,03	0,00	2,97	303,62
6,5	6,79	29,44	0,00	2,97	301,87
6,6	6,76	29,44	0,00	2,97	305,08
6,7	6,75	29,44	0,00	2,97	303,91
6,8	6,80	29,19	0,00	2,97	300,41
6,9	6,77	29,44	0,00	2,97	301,58
7,0	6,76	29,80	0,00	2,97	300,70
7,1	6,76	29,54	0,00	2,97	301,87
7,2	6,82	29,34	0,00	2,97	299,54
7,3	6,81	29,29	0,00	2,97	299,83
7,4	6,80	29,65	0,00	2,97	305,66
7,5	6,78	29,34	0,00	2,97	303,33
7,6	6,76	29,34	0,00	2,97	299,83
7,7	6,75	29,29	0,00	2,97	301,58
7,8	6,77	29,49	0,00	2,97	300,41
7,9	6,76	29,65	0,00	2,97	302,16
8,0	6,81	29,19	0,00	2,97	300,12
8,1	6,80	29,34	0,00	2,97	300,41
8,2	6,78	30,31	0,00	2,96	301,58
8,3	6,77	31,38	0,00	2,97	297,79
8,4	6,76	29,60	0,00	2,97	299,54
8,4	6,82	29,95	0,00	2,97	299,24
8,5	6,81	29,49	0,00	2,96	299,54
8,6	6,80	31,18	0,00	2,96	300,70
8,7	6,78	29,39	0,00	2,96	301,29
8,8	6,76	29,44	0,00	2,96	297,79
8,9	6,76	29,54	0,00	2,96	301,58
9,0	6,76	29,29	0,00	2,96	299,83
9,1	6,75	29,34	0,00	2,97	301,58
9,2	6,81	29,24	0,00	2,97	300,70
9,3	6,80	29,34	0,00	2,97	299,54
9,4	6,78	29,44	0,00	2,97	299,83
9,5	6,77	29,44	0,00	2,97	300,12
9,6	6,75	29,44	0,00	2,97	294,87
9,7	6,78	29,54	0,00	2,97	298,66
9,8	6,76	29,34	0,00	2,97	303,62
9,9	6,75	29,65	0,00	2,97	300,99
10,0	6,81	29,49	0,00	2,97	301,58
10,1	6,80	29,70	0,00	2,97	300,99
10,2	6,79	29,39	0,00	2,97	299,83
10,3	6,76	29,60	0,00	2,97	301,58
10,4	6,75	29,54	0,00	2,97	296,04

10,5	6,81	29,44	0,35	2,97	297,20
10,6	6,80	29,44	0,00	2,97	297,20
10,7	6,78	29,44	0,00	2,97	300,12
10,8	6,77	29,49	0,00	2,97	302,16
10,8	6,79	29,65	0,00	2,97	305,66
10,9	6,77	29,39	0,00	2,97	295,45
11,0	6,76	29,54	0,00	2,96	299,83
11,1	6,77	29,54	0,00	2,96	301,29
11,2	6,76	29,54	0,00	2,96	300,12
11,3	6,75	29,54	0,00	2,96	301,87
11,4	6,75	29,65	0,00	2,96	301,87
11,5	6,75	29,49	0,00	2,96	303,33
11,6	6,75	29,44	0,00	2,96	298,66
11,7	6,77	29,65	0,00	2,96	301,58
11,8	6,79	29,85	0,00	2,96	301,87
11,9	6,77	29,54	0,00	2,96	302,16
12,0	6,77	29,49	0,00	2,96	300,99
12,1	6,76	29,95	0,00	2,96	300,70
12,2	6,77	29,65	0,00	2,96	303,04
12,3	6,76	29,75	0,00	2,96	303,33
12,4	6,76	29,80	0,00	2,96	299,83
12,5	6,76	29,60	0,12	2,96	300,12
12,6	6,76	29,60	0,00	2,96	301,58
12,7	6,75	29,49	0,00	2,96	303,62
12,8	6,79	29,54	0,00	2,96	300,41
12,9	6,77	29,60	0,00	2,96	301,58
13,0	6,77	29,85	0,00	2,96	298,66
13,1	6,77	29,54	0,00	2,96	300,41
13,2	6,78	29,60	0,00	2,96	301,87
13,2	6,78	29,85	0,00	2,96	299,83
13,3	6,76	29,34	0,00	2,96	303,04
13,4	6,76	29,29	0,00	2,96	303,33
13,5	6,77	28,47	0,00	2,96	299,54
13,6	6,76	28,21	0,00	2,96	300,99
13,7	6,75	28,52	0,00	2,96	300,41
13,8	6,76	29,90	0,00	2,96	301,29
13,9	6,75	30,26	0,00	2,96	303,04
14,0	6,76	30,41	0,00	2,96	301,29
14,1	6,81	30,21	0,00	2,96	301,58
14,2	6,79	30,16	0,00	2,96	298,37
14,3	6,79	30,11	0,00	2,96	297,20
14,4	6,79	30,06	0,00	2,96	305,08
14,5	6,79	30,06	0,00	2,96	299,54
14,6	6,77	30,00	0,00	2,96	302,74
14,7	6,78	29,90	0,00	2,96	298,95
14,8	6,78	29,95	0,00	2,96	302,74

14,9	6,78	29,75	0,00	2,96	300,12
15,0	6,78	29,85	0,00	2,96	299,83
15,1	6,77	29,65	0,00	2,96	300,70
15,2	6,77	28,98	0,00	2,96	300,70
15,3	6,77	29,08	0,00	2,96	299,83
15,4	6,77	29,24	0,00	2,97	301,29
15,5	6,76	29,14	0,00	2,97	299,83
15,6	6,76	29,14	0,00	3,47	355,24
15,6	6,75	29,24	99,84	3,47	354,66
15,7	6,81	29,03	99,84	3,47	351,16
15,8	6,80	29,44	99,82	3,47	353,49
15,9	6,78	29,75	99,82	3,47	354,08
16,0	6,76	30,06	99,82	3,47	349,70
16,1	6,76	30,16	99,82	3,47	349,70
16,2	6,82	30,00	75,87	3,47	353,20
16,3	6,80	30,31	44,39	3,47	346,20
16,4	6,77	30,06	0,00	3,47	353,79
16,5	6,80	30,00	0,00	3,47	350,29
16,6	6,75	29,85	0,00	3,47	353,20
16,7	6,76	30,11	0,00	3,47	352,04
16,8	6,80	29,70	0,00	3,47	345,33
16,9	6,77	30,16	0,00	3,47	352,33
17,0	6,79	29,65	0,00	3,47	350,58
17,1	6,81	29,90	0,00	3,47	348,83
17,2	6,76	29,95	0,00	3,97	347,37
17,3	6,77	29,95	8,77	3,97	352,91
17,4	6,78	29,65	0,00	3,97	351,45
17,5	6,77	29,90	0,00	3,97	352,04
17,6	6,76	29,95	0,00	3,97	348,24
17,7	6,76	29,85	0,00	3,97	352,91
17,8	6,77	30,11	0,00	3,97	348,24
17,9	6,75	30,46	0,00	3,97	355,24
18,0	6,76	30,67	0,00	3,97	345,91
18,0	6,77	30,57	0,00	3,97	353,49
18,1	6,75	30,67	0,00	3,97	347,37
18,2	6,75	30,41	0,00	3,97	349,41
18,3	6,78	30,36	0,00	3,97	353,49
18,4	6,76	30,26	0,00	3,97	341,83
18,5	6,76	30,41	0,00	3,97	354,66
18,6	6,78	30,46	0,00	3,97	347,66
18,7	6,75	30,52	0,00	3,97	352,33
18,8	6,75	30,16	0,00	3,97	347,37
18,9	6,76	30,41	0,00	3,97	346,49
19,0	6,77	30,11	0,00	3,97	348,83
19,1	6,75	30,06	0,00	3,97	347,66
19,2	6,76	30,11	0,00	3,97	350,87

19,3	6,75	30,06	0,00	3,97	352,62
19,4	6,75	29,85	0,00	3,97	351,74
19,5	6,76	29,95	0,00	3,97	347,08
19,6	6,78	29,29	0,00	3,97	352,33
19,7	6,81	29,08	0,00	3,97	345,33
19,8	6,85	29,19	0,00	3,97	353,49
19,9	6,87	29,19	0,00	3,97	348,54
20,0	6,90	29,08	0,00	3,97	356,70
20,1	6,94	29,14	0,00	3,97	354,08
20,2	6,98	29,19	0,00	3,97	345,33
20,3	7,02	29,29	0,00	3,97	352,62
20,4	7,04	29,19	0,00	3,97	351,45
20,4	7,06	29,44	0,00	3,97	401,04
20,5	7,10	29,08	0,00	3,97	398,41
20,6	7,13	29,24	0,00	3,97	400,45
20,7	7,16	29,24	0,00	3,97	400,45
20,8	7,19	29,95	0,00	3,97	403,37
20,9	7,22	29,85	0,00	3,97	400,45
21,0	7,23	29,80	0,00	3,97	401,04
21,1	7,24	29,85	0,00	3,97	399,87
21,2	7,22	30,00	0,00	3,97	399,87
21,3	7,19	29,70	0,00	3,97	403,08
21,4	7,22	29,80	0,00	3,97	405,99
21,5	7,21	29,54	0,00	3,97	400,45
21,6	7,20	30,41	0,00	3,97	405,99
21,7	7,21	30,62	0,00	3,97	404,83
21,8	7,20	30,62	0,00	3,97	401,91
21,9	7,20	30,31	0,00	3,97	401,91
22,0	7,20	30,46	0,00	3,97	396,66
22,1	7,22	29,39	8,44	3,97	405,41
22,2	7,20	29,49	34,04	3,97	401,62
22,3	7,19	29,44	60,17	3,97	397,83
22,4	7,22	29,44	88,24	3,97	398,70
22,5	7,22	29,75	96,62	3,97	399,29
22,6	7,23	29,60	99,84	3,97	402,79
22,7	7,23	29,14	99,84	3,97	402,79
22,8	7,21	29,19	99,84	3,97	399,87
22,8	7,23	29,03	99,84	3,97	399,87
22,9	7,22	29,03	99,84	3,97	403,08
23,0	7,20	29,39	99,84	3,97	397,54
23,1	7,24	29,24	99,84	3,97	398,70
23,2	7,17	29,19	99,84	3,97	404,83
23,3	7,23	29,34	99,82	3,97	401,62
23,4	7,19	29,34	99,82	3,97	402,49
23,5	7,24	29,08	99,84	3,97	400,45
23,6	7,21	28,98	99,82	3,97	399,87

23,7	7,21	28,83	99,84	3,97	401,91
23,8	7,17	28,83	99,84	3,97	400,45
23,9	7,20	29,19	99,82	3,97	401,62
24,0	7,23	29,08	99,84	3,97	402,20
24,1	7,20	29,03	99,82	3,97	401,62
24,2	7,22	29,19	99,84	3,97	402,79
24,3	7,21	29,39	99,82	3,97	401,04
24,4	7,19	29,60	99,84	3,97	400,45
24,5	7,22	29,44	99,84	3,97	402,79
24,6	7,16	29,34	99,82	3,97	404,54
24,7	7,20	29,39	99,84	3,97	401,04
24,8	7,22	29,54	99,82	3,97	402,20
24,9	7,21	29,24	99,82	3,97	402,49
25,0	7,24	29,54	99,84	3,97	398,41
25,1	7,21	29,44	99,82	3,97	402,79
25,2	7,17	29,54	99,84	3,97	398,41
25,2	7,22	29,49	99,84	3,97	400,74
25,3	7,22	29,54	99,84	3,97	402,20
25,4	7,23	29,29	99,84	3,97	406,87
25,5	7,23	29,14	99,82	3,97	401,04
25,6	7,23	29,39	99,82	3,97	405,70
25,7	7,20	29,49	99,84	3,97	403,08
25,8	7,21	29,14	99,84	3,97	400,74
25,9	7,23	29,44	99,84	3,97	400,16
26,0	7,16	29,29	99,84	3,97	400,16
26,1	7,20	29,19	99,84	3,97	401,33
26,2	7,21	29,14	99,84	3,97	398,41
26,3	7,22	29,24	99,84	3,97	400,16
26,4	7,22	28,93	99,82	3,97	396,66
26,5	7,24	28,83	99,84	3,97	400,45
26,6	7,24	28,98	99,84	3,97	400,74
26,7	7,24	29,34	99,82	3,97	401,33
26,8	7,24	28,88	99,82	3,97	399,58
26,9	7,16	29,39	99,84	3,97	402,49
27,0	7,19	28,88	99,84	3,97	401,91
27,1	7,20	29,03	99,82	3,97	400,74
27,2	7,21	29,14	99,84	3,97	399,58
27,3	7,21	28,73	99,84	3,97	399,58
27,4	7,21	28,57	99,84	3,97	400,74
27,5	7,22	28,83	99,84	3,97	405,12
27,6	7,23	29,19	99,82	3,97	402,49
27,6	7,24	29,03	99,84	3,97	402,20
27,7	7,24	28,98	99,82	3,97	404,24
27,8	7,19	29,24	99,82	3,97	398,99
27,9	7,20	29,14	99,84	3,97	398,41
28,0	7,21	28,98	99,84	3,97	400,74

28,1	7,22	29,29	99,84	3,97	400,45
28,2	7,24	29,95	99,84	3,97	401,33
28,3	7,20	29,90	99,84	3,97	397,83
28,4	7,22	29,90	99,84	3,97	399,29
28,5	7,24	29,85	99,84	3,97	400,45
28,6	7,15	29,90	99,84	3,97	401,04
28,7	7,19	29,90	99,84	3,97	404,24
28,8	7,21	30,06	99,84	3,97	398,70
28,9	7,22	29,75	99,84	3,97	400,74
29,0	7,24	29,95	99,84	3,97	396,08
29,1	7,17	29,70	99,84	3,97	404,24
29,2	7,20	29,65	99,84	3,97	401,91
29,3	7,22	29,70	99,84	3,97	401,04
29,4	7,24	29,70	99,82	3,97	401,91
29,5	7,22	29,60	99,84	3,97	395,49
29,6	7,24	29,34	99,84	3,97	400,45
29,7	7,22	28,88	99,84	3,97	400,16
29,8	7,22	28,57	99,84	3,97	397,54
29,9	7,20	28,83	99,84	3,97	403,08
30,0	7,21	29,24	99,84	3,97	405,99
30,0	7,18	29,24	99,84	3,97	404,54
30,1	7,20	29,08	99,84	3,97	396,66
30,2	7,23	29,34	99,84	3,97	398,70
30,3	7,19	29,03	99,84	3,97	405,41
30,4	7,22	28,98	99,84	3,97	403,08
30,5	7,13	28,88	99,84	3,97	400,74
30,6	7,19	28,42	99,84	3,97	404,24
30,7	7,22	28,37	99,84	3,97	400,45
30,8	7,23	29,03	99,84	3,97	398,99
30,9	7,17	28,98	99,84	3,97	398,70
31,0	7,20	28,93	99,84	3,97	398,99
31,1	7,23	28,83	99,84	3,97	401,62
31,2	7,20	28,83	99,84	3,97	399,29
31,3	7,23	28,62	99,84	3,97	397,54
31,4	7,16	28,73	99,84	3,97	402,20
31,5	7,20	28,78	99,84	3,97	394,62
31,6	7,23	28,98	99,84	3,97	402,49
31,7	7,19	29,08	99,82	3,97	404,54
31,8	7,22	29,03	99,82	3,97	401,91
31,9	7,18	28,78	99,84	3,97	399,58
32,0	7,16	28,73	99,84	3,97	397,24
32,1	7,20	28,88	99,84	3,97	401,04
32,2	7,22	28,73	99,84	3,97	400,16
32,3	7,16	28,73	99,84	3,97	400,74
32,4	7,19	28,73	99,84	3,97	398,41
32,4	7,24	28,62	99,84	3,97	400,45

32,5	7,20	28,88	99,84	3,97	402,49
32,6	7,23	28,83	99,84	3,97	399,87
32,7	7,16	28,78	99,84	3,97	399,87
32,8	7,19	28,88	99,84	3,97	399,87
32,9	7,21	29,44	99,84	3,97	399,87
33,0	7,21	28,98	99,84	3,97	402,20
33,1	7,24	28,78	99,84	3,97	399,87
33,2	7,19	28,98	99,84	3,97	401,33
33,3	7,22	28,83	99,84	3,97	401,33
33,4	7,20	28,83	99,82	3,97	398,99
33,5	7,23	28,62	99,84	3,97	402,79
33,6	7,16	28,83	99,84	3,97	400,74
33,7	7,19	28,62	99,84	3,97	402,49
33,8	7,21	28,88	99,84	3,97	399,58
33,9	7,20	28,62	99,84	3,97	399,87
34,0	7,22	28,73	99,84	3,97	403,95
34,1	7,15	28,62	99,82	3,96	397,54
34,2	7,20	28,62	99,84	3,97	400,74
34,3	7,21	28,83	99,84	3,97	400,74
34,4	7,13	28,88	99,84	3,97	397,83
34,5	7,16	29,14	99,84	3,97	400,16
34,6	7,18	28,68	99,84	3,97	402,79
34,7	7,21	28,88	99,84	3,97	399,87
34,8	7,22	28,88	99,84	3,97	397,54
34,8	7,15	28,88	99,82	3,97	402,20
34,9	7,19	28,83	99,84	3,97	401,33
35,0	7,21	29,24	99,84	3,97	397,24
35,1	7,22	28,88	99,84	3,97	401,91
35,2	7,12	28,57	99,84	3,97	400,74
35,3	7,16	28,68	99,84	3,97	399,29
35,4	7,16	28,73	99,82	3,97	399,87
35,5	7,19	28,57	99,84	3,97	402,49
35,6	7,21	28,57	99,84	3,96	402,79
35,7	7,22	28,78	99,84	3,96	402,79
35,8	7,14	29,19	99,84	3,96	401,33
35,9	7,17	28,78	99,84	3,97	401,33
36,0	7,20	29,19	99,84	3,97	402,20
36,1	7,21	28,93	99,84	3,97	398,12
36,2	7,23	28,98	99,84	3,97	399,58
36,3	7,21	28,62	99,84	3,97	401,04
36,4	7,21	28,62	99,84	3,97	396,37
36,5	7,23	28,88	99,84	3,97	405,70
36,6	7,17	28,57	99,84	3,97	396,95
36,7	7,20	29,29	99,84	3,97	402,49
36,8	7,22	28,68	99,84	3,97	398,99
36,9	7,22	28,88	99,84	3,97	402,79

37,0	7,16	29,03	99,82	3,97	399,29
37,1	7,19	28,52	99,82	3,97	405,41
37,2	7,20	28,47	99,84	3,97	398,41
37,2	7,21	28,83	99,84	3,97	400,45
37,3	7,23	28,88	99,84	3,97	400,74
37,4	7,20	28,73	99,84	3,97	405,99
37,5	7,21	28,83	99,84	3,97	397,83
37,6	7,21	28,52	99,84	3,97	398,41
37,7	7,23	28,62	99,84	3,97	398,70
37,8	7,16	28,52	99,82	3,97	401,91
37,9	7,19	28,73	99,84	3,97	402,49
38,0	7,20	28,57	99,84	3,97	401,33
38,1	7,21	28,78	99,84	3,97	398,70
38,2	7,22	28,62	99,82	3,97	403,95
38,3	7,13	28,62	99,84	3,97	401,91
38,4	7,16	28,73	99,84	3,97	402,20
38,5	7,16	28,42	99,84	3,97	397,24
38,6	7,19	28,78	99,84	3,97	405,41
38,7	7,18	28,78	99,84	3,97	398,12
38,8	7,20	28,73	99,84	3,97	406,29
38,9	7,21	28,68	99,84	3,97	397,83
39,0	7,21	28,37	99,82	3,97	402,20
39,1	7,24	28,83	99,84	3,97	402,20
39,2	7,20	28,88	99,84	3,97	398,99
39,3	7,21	28,88	99,84	3,97	408,04
39,4	7,22	28,73	99,84	3,97	401,91
39,5	7,13	28,68	99,82	3,97	403,37
39,6	7,14	28,52	99,84	3,97	401,33
39,6	7,16	28,83	99,84	3,97	400,16
39,7	7,16	28,47	99,84	3,97	348,24
39,8	7,19	28,83	99,84	3,97	354,66
39,9	7,19	28,88	99,84	3,97	348,24
40,0	7,17	28,93	99,82	3,97	346,20
40,1	7,19	28,78	99,84	3,97	350,87
40,2	7,19	28,73	99,84	3,97	354,08
40,3	7,19	29,19	99,84	3,97	347,95
40,4	7,19	29,14	99,84	3,97	349,99
40,5	7,20	29,03	99,84	3,97	354,66
40,6	7,20	28,98	99,82	3,97	348,54
40,7	7,20	29,08	99,84	3,97	346,79
40,8	7,20	28,83	99,82	3,97	352,04
40,9	7,20	29,14	99,82	3,97	349,70
41,0	7,20	28,73	99,82	3,97	347,37
41,1	7,21	29,03	99,84	3,97	348,54
41,2	7,21	28,98	99,84	3,97	347,95
41,3	7,21	29,03	99,84	3,97	350,87

41,4	7,22	28,98	99,82	3,97	346,20
41,5	7,22	28,83	99,84	3,95	348,83
41,6	7,22	29,03	99,84	3,97	345,33
41,7	7,23	29,03	99,84	3,97	351,16
41,8	7,23	29,14	99,84	3,97	347,08
41,9	7,18	28,98	99,84	3,97	349,41
42,0	7,20	28,88	99,84	3,97	354,66
42,0	7,21	29,08	99,82	3,97	350,58
42,1	7,22	29,08	99,82	3,97	355,24
42,2	7,22	29,44	99,84	3,97	352,91
42,3	7,22	29,34	99,82	3,97	345,91
42,4	7,24	28,93	99,82	3,97	354,95
42,5	7,15	29,14	99,84	3,97	347,37
42,6	7,17	29,08	99,82	3,97	349,41
42,7	7,17	29,29	99,84	3,97	349,41
42,8	7,20	29,19	99,84	3,97	347,08
42,9	7,21	29,34	99,84	3,97	354,95
43,0	7,22	29,65	99,84	3,97	346,79
43,1	7,22	29,03	99,84	3,97	349,12
43,2	7,23	28,93	99,84	3,97	342,70
43,3	7,23	29,29	99,84	3,97	350,58
43,4	7,14	29,24	99,82	3,97	355,54
43,5	7,16	29,14	99,84	3,97	353,20
43,6	7,16	28,98	99,84	3,97	355,54
43,7	7,19	28,93	99,84	3,97	347,37
43,8	7,20	29,14	99,82	3,97	348,83
43,9	7,20	29,03	99,84	3,97	353,79
44,0	7,20	28,88	99,84	3,97	355,54
44,1	7,21	29,19	99,82	3,97	345,33
44,2	7,21	29,14	99,84	3,97	352,91
44,3	7,22	28,93	99,84	3,97	348,83
44,4	7,22	28,88	99,82	3,97	347,66
44,4	7,18	29,14	99,84	3,97	351,16
44,5	7,18	29,03	99,82	3,97	350,58
44,6	7,20	29,08	99,84	3,97	352,04
44,7	7,21	29,03	99,84	3,97	350,87
44,8	7,22	29,24	99,84	3,97	347,08
44,9	7,22	29,08	99,84	3,97	349,99
45,0	7,22	29,08	99,84	3,97	352,62
45,1	7,22	29,24	99,82	3,97	353,79
45,2	7,23	29,03	99,84	3,97	342,99
45,3	7,23	29,34	99,84	3,97	355,24
45,4	7,19	28,98	99,82	3,97	350,58
45,5	7,19	29,03	99,84	3,97	341,83
45,6	7,20	29,44	99,84	3,97	353,20
45,7	7,20	29,03	99,82	3,97	356,12

45,8	7,21	29,44	99,84	3,97	351,45
45,9	7,22	29,03	99,84	3,97	353,49
46,0	7,21	29,24	99,82	3,97	355,24
46,1	7,22	29,39	99,84	3,97	348,83
46,2	7,22	29,24	99,82	3,97	347,66
46,3	7,24	29,03	99,84	3,97	348,54
46,4	7,19	29,14	99,84	3,97	354,37
46,5	7,18	29,24	99,84	3,97	353,20

46,6	7,20	29,34	99,84	3,97	352,91
46,7	7,20	29,39	99,84	3,97	349,41
46,8	7,21	29,80	99,84	3,97	349,70
46,8	7,22	29,75	99,84	3,97	348,83
46,9	7,22	31,33	99,84	0,05	350,58
47,0	7,19	31,28	0,00	0,05	346,79
47,1	7,16	31,23	0,00	0,05	349,99
47,2	7,18	31,18	99,84	0,05	353,20

47,3	6,92	56,18	99,84	0,05	352,33
47,4	7,00	59,40	99,82	0,05	351,74
47,5	7,02	58,78	99,82	0,05	354,08
47,6	7,61	55,66	99,82	0,05	352,04
47,7	7,24	60,32	99,84	0,05	349,99
47,8	7,27	59,50	99,84	0,05	347,66

Tableau 29 : Données brutes pour le pH, la température, l'oxygène dissout, le débit et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures d'un mélange de résidus de levure (RL) (21/02/2002) à 0,5% MES avec des boues d'épuration secondaire (BS) (25/04/2002) à 0,5% MES par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur (15B) de 15 litres contenant 10 litres de ce mélange de biosolide.

Temps (heure)	pH	Temp réact (°C)	DO (%)	Débit (LPM)	Agit (rpm)
0,0	4,72	31,25	93,67	4,98	302,74
0,1	4,72	29,96	88,37	4,98	299,24
0,2	4,74	29,28	81,39	4,98	303,33
0,3	6,76	28,82	80,24	4,98	304,49
0,4	6,73	28,61	79,19	4,98	305,95
0,5	6,71	28,51	78,84	4,98	302,16
0,6	6,70	29,23	78,34	4,98	303,91
0,7	6,70	28,97	78,04	4,98	289,62
0,8	6,72	28,77	77,44	4,98	301,87
0,9	6,71	29,18	77,17	4,98	300,99
1,0	6,71	28,82	76,04	2,99	295,74
1,1	6,71	29,08	75,52	2,99	301,58
1,2	6,71	29,44	75,09	2,99	317,33
1,2	6,71	29,23	74,79	2,99	307,12
1,3	6,71	29,08	74,34	2,99	302,74
1,4	6,71	29,13	74,07	2,99	304,79
1,5	6,71	29,08	73,77	2,99	301,29
1,6	6,71	28,97	73,52	2,99	302,45
1,7	6,71	29,08	73,24	2,99	300,70
1,8	6,69	29,18	73,02	2,99	300,12
1,9	6,71	29,34	72,79	2,99	300,70
2,0	6,71	28,97	72,52	2,99	299,54
2,1	6,71	29,13	72,27	2,99	304,20
2,2	6,71	29,23	72,14	2,99	303,33
2,3	6,71	29,02	71,74	2,99	300,99
2,4	6,71	29,23	71,54	2,99	303,62
2,5	6,71	29,02	71,32	2,99	301,87
2,6	6,71	29,18	71,09	2,99	300,99
2,7	6,72	29,13	70,99	2,99	302,16
2,8	6,71	29,08	70,64	2,99	301,87

2,9	6,72	29,18	70,67	2,99	300,99
3,0	6,74	29,02	70,32	2,99	298,95
3,1	6,74	29,02	70,14	2,99	303,91
3,2	6,72	28,97	69,89	2,99	300,12
3,3	6,72	29,08	69,77	2,99	300,12
3,4	6,73	29,13	69,69	2,99	296,91
3,5	6,74	29,13	69,44	2,97	303,91
3,6	6,73	29,13	68,99	0,03	300,12
3,6	6,75	29,18	69,37	2,98	300,99
3,7	6,73	29,13	68,99	2,98	305,08
3,8	6,74	29,28	68,87	2,98	303,04
3,9	6,75	29,59	69,34	2,98	305,66
4,0	6,75	30,01	69,77	2,98	302,45
4,1	6,75	29,90	69,54	2,98	299,54
4,2	6,74	29,96	69,37	2,98	300,12
4,3	6,76	30,06	69,14	2,98	299,54
4,4	6,76	30,11	69,17	2,98	298,95
4,5	6,76	30,11	69,02	2,98	297,20
4,6	6,77	30,01	68,82	2,98	301,58
4,7	6,76	29,96	68,64	2,98	300,70
4,8	6,77	30,11	68,47	2,98	301,58
4,9	6,77	29,90	68,37	2,98	299,54
5,0	6,77	29,96	68,12	2,98	305,37
5,1	6,78	30,16	68,12	2,98	306,24
5,2	6,78	30,06	67,77	2,98	296,62
5,3	6,78	29,90	67,69	2,98	304,20
5,4	6,78	30,21	67,69	2,98	298,95
5,5	6,80	30,11	67,44	2,98	301,87
5,6	6,81	30,27	67,34	2,98	302,74
5,7	6,81	30,06	67,17	2,98	301,87
5,8	6,81	30,01	66,99	2,98	299,24
5,9	6,82	30,27	66,89	2,96	298,66

6,0	6,82	29,90	66,82	2,96	294,58
6,0	6,82	30,21	66,57	2,96	298,08
6,1	6,82	30,11	66,57	2,96	302,45
6,2	6,83	30,11	66,44	2,96	302,45
6,3	6,83	30,06	66,44	2,96	299,54
6,4	6,83	30,16	64,79	0,03	298,66
6,5	6,84	30,01	66,22	2,97	298,66
6,6	6,84	30,11	65,92	2,97	298,66
6,7	6,86	29,80	65,79	2,97	300,99
6,8	6,85	29,96	65,67	2,97	298,37
6,9	6,85	30,06	65,57	2,97	303,04
7,0	6,85	29,96	65,32	2,97	300,41
7,1	6,85	30,01	65,27	2,97	301,87
7,2	6,85	30,01	65,12	2,97	301,58
7,3	6,85	29,96	65,07	2,97	303,04
7,4	6,85	30,01	64,99	2,97	299,83
7,5	6,85	30,01	64,92	2,97	298,66
7,6	6,88	30,06	64,79	2,97	300,41
7,7	6,88	30,27	64,62	2,97	302,16
7,8	6,88	29,85	64,57	2,97	298,66
7,9	6,88	30,11	64,37	2,97	298,66
8,0	6,88	30,16	64,19	2,97	301,87
8,1	6,89	29,80	64,07	2,97	302,45
8,2	6,91	30,16	63,97	2,97	303,33
8,3	6,89	30,21	63,82	2,97	299,83
8,4	6,89	29,96	63,67	2,97	299,24
8,4	6,91	29,80	63,49	2,97	296,62
8,5	6,91	29,96	63,22	2,97	297,79
8,6	6,91	30,06	63,17	2,97	304,49
8,7	6,92	30,16	62,94	2,97	303,33
8,8	6,91	29,85	62,74	2,97	304,49
8,9	6,91	30,06	62,69	2,97	299,54

9,0	6,91	30,37	62,49	2,97	296,91
9,1	6,92	30,06	62,37	2,97	300,41
9,2	6,91	30,11	62,24	2,97	297,79
9,3	6,92	30,21	62,27	2,97	303,62
9,4	6,92	29,90	61,89	2,97	301,58
9,5	6,91	29,96	59,72	2,97	304,79
9,6	6,91	30,01	61,62	2,97	301,87
9,7	6,91	29,90	61,34	2,97	301,87
9,8	6,91	29,96	61,17	2,97	297,49
9,9	6,91	30,32	61,12	2,97	298,08
10,0	6,92	29,90	60,92	2,97	301,58
10,1	6,92	30,01	60,77	2,97	303,33
10,2	6,91	30,16	60,59	2,97	302,74
10,3	6,91	30,01	60,34	2,97	304,49
10,4	6,93	29,96	60,07	2,97	304,20
10,5	6,92	30,27	59,89	2,97	303,04
10,6	6,93	30,01	59,62	2,97	300,70
10,7	6,93	30,16	59,62	2,97	302,45
10,8	6,93	30,11	59,34	2,97	301,58
10,8	6,93	30,11	59,17	2,97	300,70
10,9	6,93	30,11	58,82	2,97	301,58
11,0	6,93	30,01	58,74	2,97	304,49
11,1	6,93	30,01	58,57	2,97	301,58
11,2	6,94	30,01	58,32	2,97	298,37
11,3	6,94	30,06	58,22	2,97	302,74
11,4	6,92	30,21	57,94	2,97	298,66
11,5	6,94	30,21	57,77	2,97	305,08
11,6	6,94	30,27	57,52	2,97	297,20
11,7	6,94	29,90	57,14	2,97	299,83
11,8	6,95	30,01	57,17	2,97	303,04
11,9	6,94	29,85	56,89	2,97	298,66
12,0	6,94	30,27	56,69	2,97	297,79
12,1	6,93	30,21	56,52	2,97	301,29
12,2	6,94	30,01	56,27	2,96	297,49
12,3	6,94	30,16	56,17	2,96	300,41
12,4	6,94	29,96	55,54	2,96	300,99
12,5	6,92	30,06	41,22	2,88	301,29
12,6	6,93	30,27	56,09	2,96	301,58
12,7	6,93	30,27	55,72	2,96	301,58
12,8	6,93	30,01	55,37	2,96	301,29
12,9	6,94	29,96	54,67	2,96	293,99
13,0	6,94	29,54	54,44	2,96	296,33
13,1	6,94	29,13	54,02	2,96	295,74
13,2	6,94	28,97	53,72	2,96	301,87
13,2	6,95	29,49	53,69	2,96	296,04
13,3	6,96	29,28	53,39	2,96	300,12

13,4	6,95	29,08	53,02	2,96	303,91
13,5	6,94	29,28	52,89	2,96	304,79
13,6	6,95	28,97	52,49	2,96	300,70
13,7	6,95	28,87	52,14	2,96	303,62
13,8	6,94	29,23	51,94	2,96	304,49
13,9	6,94	29,02	51,67	2,96	298,08
14,0	6,94	28,97	51,24	2,96	304,79
14,1	6,94	28,97	50,99	2,96	300,70
14,2	6,94	29,02	50,77	2,96	302,16
14,3	6,93	29,23	50,59	2,96	301,58
14,4	6,94	29,13	50,02	2,96	300,99
14,5	6,92	29,18	49,84	2,96	303,04
14,6	6,92	29,13	48,72	2,96	302,45
14,7	6,92	29,02	48,84	2,96	299,54
14,8	6,91	29,44	48,87	2,96	305,66
14,9	6,91	29,13	48,37	2,96	298,95
15,0	6,91	29,18	47,79	2,96	302,16
15,1	6,91	29,08	47,59	2,96	300,12
15,2	6,91	29,34	47,29	2,96	304,49
15,3	6,91	28,87	46,77	2,96	301,29
15,4	6,91	29,13	46,39	2,96	300,41
15,5	6,91	29,39	46,92	3,47	298,37
15,6	6,92	29,59	47,52	3,96	301,87
15,6	6,92	29,49	47,17	3,96	303,33
15,7	6,95	29,54	53,84	3,96	352,33
15,8	6,92	29,23	50,09	3,96	352,04
15,9	6,95	29,34	53,27	3,96	355,24
16,0	6,96	29,13	53,19	3,96	355,54
16,1	6,96	29,08	52,97	3,97	351,45
16,2	6,97	29,08	52,54	3,97	344,74
16,3	6,97	28,87	52,27	3,97	350,29
16,4	6,97	29,34	51,84	3,96	356,99
16,5	6,97	29,02	52,04	3,97	352,33
16,6	7,02	29,34	52,84	3,97	368,37
16,7	7,05	28,97	52,64	3,97	343,87
16,8	7,06	29,23	52,64	3,97	359,04
16,9	7,06	28,97	52,72	3,97	346,49
17,0	7,09	29,08	52,64	3,97	345,04
17,1	7,09	29,18	52,82	3,97	372,74
17,2	7,10	29,08	52,67	3,97	354,95
17,3	7,10	29,18	52,64	3,97	340,37
17,4	7,12	29,18	52,64	3,96	345,62
17,5	7,13	29,44	52,47	3,96	345,91
17,6	7,13	29,18	52,37	3,96	346,79
17,7	7,16	29,28	52,39	3,96	354,66
17,8	7,15	29,28	52,19	3,96	358,16

17,9	7,16	29,08	52,29	3,96	352,62
18,0	7,16	28,97	52,17	3,96	355,24
18,0	7,19	28,66	52,32	3,96	348,24
18,1	7,19	29,18	52,29	3,94	356,70
18,2	7,20	29,23	52,39	3,96	352,04
18,3	7,16	29,13	51,94	3,96	349,12
18,4	7,16	29,34	52,57	3,96	346,20
18,5	7,19	29,08	52,44	3,96	350,87
18,6	7,20	29,02	52,64	3,96	356,41
18,7	7,22	28,87	52,47	3,96	356,70
18,8	7,22	29,18	52,19	3,96	349,70
18,9	7,24	28,71	52,07	3,96	350,87
19,0	7,23	29,23	51,57	3,96	342,99
19,1	7,25	29,44	51,47	3,97	351,45
19,2	7,25	29,13	51,49	3,97	353,49
19,3	7,28	29,18	52,24	3,97	356,70
19,4	7,28	29,18	52,24	3,97	357,58
19,5	7,29	29,18	52,14	3,97	354,37
19,6	7,31	28,87	52,29	3,97	357,29
19,7	7,21	29,18	52,19	3,97	348,24
19,8	7,27	29,28	52,04	3,97	349,70
19,9	7,30	28,87	51,82	3,97	346,20
20,0	7,17	29,49	51,74	3,97	355,83
20,1	7,23	29,13	51,72	3,97	345,04
20,2	7,27	28,97	51,49	3,97	349,41
20,3	7,31	29,13	51,32	3,97	345,91
20,4	7,18	29,23	51,42	3,97	357,58
20,4	7,23	29,18	51,49	3,96	355,83
20,5	7,29	29,02	50,99	3,96	354,95
20,6	7,31	29,08	51,12	3,97	348,83
20,7	7,23	29,23	51,34	3,97	348,24
20,8	7,30	29,08	51,59	3,96	345,33
20,9	7,16	29,02	52,14	3,96	350,58
21,0	7,25	29,23	52,87	3,97	349,12
21,1	7,13	28,66	53,84	3,97	346,49
21,2	7,25	29,59	54,87	0,03	355,54
21,3	7,23	29,34	52,22	3,97	345,33
21,4	7,25	29,54	56,09	3,97	352,62
21,5	7,16	29,13	56,09	3,97	348,54
21,6	7,27	29,13	56,09	3,97	347,37
21,7	7,25	28,97	56,14	3,97	347,66
21,8	7,12	29,08	56,09	3,97	338,04
21,9	7,25	28,87	56,17	3,97	357,87
22,0	7,32	29,39	56,42	3,97	347,66
22,1	7,23	29,08	56,37	3,97	350,87
22,2	7,29	29,08	56,52	3,97	346,20

22,3	7,15	28,87	56,64	3,97	354,66
22,4	7,23	29,08	56,79	3,97	356,99
22,5	7,31	29,13	56,79	3,97	345,62
22,6	7,17	29,08	56,79	3,97	355,24
22,7	7,25	29,34	56,89	3,97	350,87
22,8	7,31	29,13	57,02	3,97	345,33
22,8	7,17	29,13	57,02	3,97	357,87
22,9	7,23	29,23	57,14	3,97	352,04
23,0	7,28	29,18	57,19	3,97	350,58
23,1	7,28	29,08	57,39	3,97	350,29
23,2	7,17	29,44	57,49	3,97	350,58
23,3	7,21	29,18	57,49	3,97	354,08
23,4	7,28	28,87	57,49	3,97	348,54
23,5	7,31	28,87	57,64	3,97	343,29
23,6	7,17	28,87	57,64	3,97	354,37
23,7	7,22	29,34	57,54	3,97	352,04
23,8	7,26	29,18	57,54	3,97	342,99
23,9	7,28	29,08	57,57	3,97	346,49
24,0	7,32	28,87	57,52	3,97	354,66
24,1	7,22	29,13	57,57	3,97	353,20
24,2	7,25	29,02	57,54	3,97	342,41
24,3	7,29	29,08	57,54	3,97	352,91
24,4	7,31	29,28	57,49	3,97	344,45
24,5	7,12	29,13	57,39	3,97	346,49
24,6	7,14	29,23	54,02	3,97	350,87
24,7	7,16	28,97	57,24	3,97	359,04
24,8	7,20	29,23	57,02	3,97	354,66
24,9	7,22	29,13	56,94	3,97	343,58
25,0	7,25	28,97	56,87	3,97	351,45
25,1	7,25	29,02	56,79	3,97	351,74
25,2	7,26	29,08	56,69	3,97	345,04
25,2	7,27	29,08	56,59	3,97	348,24
25,3	7,27	29,02	56,32	3,97	352,62
25,4	7,27	29,18	56,27	3,97	345,91
25,5	7,25	29,02	56,09	3,97	340,08
25,6	7,25	29,08	55,92	3,97	349,41
25,7	7,25	29,23	55,79	3,97	351,45
25,8	7,26	28,87	55,64	3,97	357,87
25,9	7,26	28,87	55,77	3,97	363,70
26,0	7,26	29,02	55,37	3,97	345,04
26,1	7,26	29,08	55,19	3,97	351,74
26,2	7,25	29,13	54,77	3,97	350,58
26,3	7,25	29,23	54,59	3,97	354,66
26,4	7,22	29,28	54,32	3,97	346,49
26,5	7,23	29,28	53,74	3,97	373,91
26,6	7,21	28,77	53,64	3,97	347,37

26,7	7,19	29,28	53,27	3,97	359,62
26,8	7,19	29,02	52,84	3,97	358,16
26,9	7,18	29,34	52,32	3,97	355,83
27,0	7,16	28,97	51,94	3,97	354,37
27,1	7,16	29,23	51,49	3,97	344,45
27,2	7,15	29,28	50,99	3,97	347,37
27,3	7,15	29,18	50,54	3,97	345,33
27,4	7,13	29,13	50,04	3,97	351,45
27,5	7,12	29,13	49,84	3,97	348,83
27,6	7,13	29,13	49,32	3,97	347,66
27,6	7,12	29,18	48,84	3,97	359,04
27,7	7,12	29,13	48,34	3,97	347,95
27,8	7,12	29,18	48,09	3,97	354,37
27,9	7,12	29,23	47,52	3,97	351,45
28,0	7,11	29,23	47,19	3,97	340,08
28,1	7,11	29,13	46,74	3,97	355,24
28,2	7,11	29,18	46,32	3,97	356,99
28,3	7,11	28,82	46,09	3,97	353,49
28,4	7,11	29,18	45,69	3,97	355,54
28,5	7,11	28,87	45,57	3,97	347,95
28,6	7,12	29,08	45,57	3,97	352,62
28,7	7,11	29,28	45,54	3,97	353,79
28,8	7,12	29,13	45,37	3,97	342,99
28,9	7,12	29,13	45,79	3,97	353,20
29,0	7,12	29,28	45,79	3,97	345,62
29,1	7,13	28,97	45,79	3,97	347,37
29,2	7,13	29,18	45,59	3,97	349,12
29,3	7,13	29,23	45,79	3,97	355,24
29,4	7,15	29,13	45,74	3,97	356,70
29,5	7,13	29,13	46,39	3,97	353,49
29,6	7,15	28,87	46,32	3,97	352,62
29,7	7,15	29,34	46,32	3,97	356,41
29,8	7,15	29,02	46,39	3,97	351,45
29,9	7,17	29,13	46,74	3,97	358,16
30,0	7,16	28,82	46,84	3,97	356,12
30,0	7,17	28,97	47,04	3,96	352,04
30,1	7,18	29,23	47,09	3,96	341,83
30,2	7,19	29,23	47,44	3,96	347,66
30,3	7,19	29,08	47,64	3,96	345,62
30,4	7,20	29,39	47,82	3,97	351,16
30,5	7,15	29,54	46,87	3,94	349,41
30,6	7,19	29,49	48,64	3,97	351,16
30,7	7,22	29,18	49,12	3,97	355,54
30,8	7,25	29,44	49,64	3,97	347,08
30,9	7,27	29,28	49,92	3,97	355,24
31,0	7,28	29,18	50,24	3,97	346,49

31,1	7,31	29,23	50,39	3,97	349,12
31,2	7,25	29,23	50,42	3,97	356,12
31,3	7,28	29,23	50,64	3,97	352,33
31,4	7,16	29,18	50,64	3,97	352,91
31,5	7,23	28,97	50,54	3,97	352,33
31,6	7,28	29,34	50,82	3,97	340,37
31,7	7,31	29,44	51,02	3,97	349,41
31,8	7,20	29,18	50,82	3,97	351,45
31,9	7,25	28,87	51,04	3,97	354,08
32,0	7,28	29,13	51,32	3,97	356,70
32,1	7,31	29,13	51,09	3,97	350,87
32,2	7,28	28,97	51,19	3,97	358,45
32,3	7,20	29,23	51,14	3,96	350,29
32,4	7,25	29,02	51,17	3,97	350,87
32,4	7,29	29,08	51,32	3,96	346,20
32,5	7,31	29,18	51,34	3,96	349,99
32,6	7,17	29,18	51,17	3,97	355,83
32,7	7,22	29,28	51,24	3,96	352,91
32,8	7,25	29,23	51,24	3,96	359,04
32,9	7,27	28,66	51,44	3,96	345,91
33,0	7,30	29,08	51,52	3,96	348,54
33,1	7,20	28,71	51,44	3,96	347,08
33,2	7,23	29,08	51,52	3,96	350,58
33,3	7,28	29,28	51,47	3,96	353,20
33,4	7,28	29,02	51,69	3,96	356,70
33,5	7,31	29,18	51,62	3,96	346,79
33,6	7,22	29,18	51,49	3,96	354,37
33,7	7,26	29,08	51,69	3,96	355,24
33,8	7,29	29,02	51,44	3,96	355,54
33,9	7,29	29,08	51,49	3,96	354,08
34,0	7,15	29,13	51,59	3,96	345,33
34,1	7,19	29,13	51,67	3,96	349,99
34,2	7,24	29,13	51,72	3,96	344,74
34,3	7,26	28,97	51,82	3,96	353,49
34,4	7,26	29,02	51,87	3,96	339,20
34,5	7,28	29,13	52,02	3,96	347,08
34,6	7,28	29,08	51,84	3,96	358,16
34,7	7,29	29,28	51,99	3,96	344,45
34,8	7,30	29,13	51,94	3,96	347,95
34,8	7,29	29,08	51,94	3,96	346,49
34,9	7,29	29,28	52,02	3,96	347,95
35,0	7,29	29,13	52,04	3,96	353,49
35,1	7,29	29,65	52,04	3,96	360,79
35,2	7,29	29,23	51,94	3,96	347,37
35,3	7,29	29,49	52,07	3,96	359,04
35,4	7,27	29,08	52,07	3,96	353,79

35,5	7,29	29,49	52,04	3,96	341,24
35,6	7,27	29,13	52,12	3,96	345,04
35,7	7,29	29,02	52,14	3,96	348,24
35,8	7,28	28,87	52,12	3,96	357,29
35,9	7,28	28,97	52,04	3,96	349,99
36,0	7,28	29,18	52,14	3,96	345,62
36,1	7,28	29,02	52,62	3,96	347,66
36,2	7,27	29,44	52,47	3,96	346,79
36,3	7,23	29,65	47,47	0,03	351,74
36,4	7,22	29,59	52,24	3,96	351,16
36,5	7,23	29,49	52,44	3,96	356,99
36,6	7,25	29,44	52,34	3,96	347,66
36,7	7,25	29,13	52,32	3,96	352,91
36,8	7,25	29,13	52,34	3,96	349,70
36,9	7,26	29,13	52,24	3,96	351,16
37,0	7,26	29,28	52,24	3,96	356,41
37,1	7,25	29,23	52,17	3,96	347,08
37,2	7,25	29,23	52,27	3,96	356,41
37,2	7,25	29,34	52,32	3,96	336,58
37,3	7,25	29,39	52,14	3,96	341,54
37,4	7,23	29,23	52,14	3,96	349,70
37,5	7,24	29,34	52,24	3,96	349,41
37,6	7,24	29,13	52,24	3,96	356,12
37,7	7,24	29,23	52,24	3,96	345,62
37,8	7,24	29,13	52,22	3,96	373,04
37,9	7,24	29,18	52,09	3,96	355,54
38,0	7,24	29,08	52,22	3,96	345,04
38,1	7,24	29,08	52,22	3,96	355,83
38,2	7,23	28,77	52,12	3,96	356,12
38,3	7,23	28,87	52,09	3,96	352,33
38,4	7,23	29,13	52,04	3,96	353,20
38,5	7,23	29,08	52,32	3,96	345,91
38,6	7,23	29,13	52,14	3,96	355,83
38,7	7,23	29,39	52,32	3,96	378,87
38,8	7,25	29,85	52,29	3,96	357,87
38,9	7,23	29,28	52,29	3,96	349,41
39,0	7,25	29,02	52,22	3,96	355,24
39,1	7,25	28,97	52,12	3,96	354,95
39,2	7,26	29,39	52,14	3,96	345,33
39,3	7,25	29,23	52,04	3,96	355,24
39,4	7,25	28,87	52,14	3,96	355,24
39,5	7,26	29,02	52,12	3,96	354,95
39,6	7,26	29,08	52,22	3,96	356,41
39,6	7,26	29,13	52,24	3,96	354,66
39,7	7,26	28,66	52,22	3,96	347,66

39,8	7,26	29,02	52,24	3,96	352,62
39,9	7,26	29,75	52,22	3,96	352,04
40,0	7,28	29,28	52,12	3,96	349,41
40,1	7,26	29,13	52,12	3,96	355,54
40,2	7,27	29,59	52,12	3,96	350,87
40,3	7,27	29,02	52,24	3,96	352,62
40,4	7,27	29,08	52,22	3,96	355,83
40,5	7,26	29,34	52,14	3,96	355,54
40,6	7,25	28,87	52,04	3,96	354,95
40,7	7,28	29,08	52,04	3,96	352,62
40,8	7,26	28,97	52,12	3,96	343,58
40,9	7,27	29,23	52,12	3,96	349,70
41,0	7,25	29,18	52,04	3,96	347,95
41,1	7,25	29,08	52,07	3,96	345,91
41,2	7,26	29,23	52,12	3,96	343,87
41,3	7,26	29,13	51,94	3,96	355,24
41,4	7,27	29,44	48,39	3,47	318,49
41,5	7,23	29,13	53,92	3,47	401,91
41,6	7,23	29,18	53,59	3,47	401,33
41,7	7,22	28,97	53,79	3,47	400,74
41,8	7,23	28,77	53,67	3,47	403,95
41,9	7,22	29,08	53,94	3,47	398,70
42,0	7,24	29,02	53,92	3,47	401,04
42,0	7,23	29,34	53,87	3,47	397,24
42,1	7,23	29,23	53,74	3,47	398,12
42,2	7,23	29,18	53,84	3,47	403,95
42,3	7,23	29,28	53,69	3,47	399,58
42,4	7,23	29,13	53,67	3,47	401,04
42,5	7,23	29,23	53,84	3,47	403,95
42,6	7,20	29,13	53,77	3,47	406,87
42,7	7,21	29,13	53,74	3,47	400,45
42,8	7,22	29,39	53,92	3,47	400,45
42,9	7,20	29,02	53,69	3,47	402,49
43,0	7,22	29,44	53,77	3,47	398,70
43,1	7,20	29,18	53,67	3,47	400,45
43,2	7,21	29,13	53,67	3,47	400,45
43,3	7,21	28,87	53,69	3,47	398,99
43,4	7,21	29,08	53,67	3,47	401,04
43,5	7,20	29,08	53,67	3,47	402,20
43,6	7,20	29,65	53,69	3,47	403,08
43,7	7,20	29,13	53,62	3,47	402,20
43,8	7,21	29,13	53,67	3,47	400,16
43,9	7,20	28,97	50,74	3,47	307,41
44,0	7,17	29,13	50,52	2,97	349,70
44,1	7,15	29,23	49,92	3,47	341,54

44,2	7,15	29,13	52,12	3,47	374,49
44,3	7,16	29,23	52,47	3,47	375,08
44,4	7,16	29,08	52,49	3,47	373,91
44,4	7,17	29,18	52,47	3,47	376,54
44,5	7,16	28,97	52,62	3,47	371,29
44,6	7,17	28,71	52,54	3,47	372,74
44,7	7,16	29,13	52,62	3,47	377,41
44,8	7,16	29,18	52,64	3,47	375,08
44,9	7,16	29,08	51,42	3,47	349,99
45,0	7,15	29,02	51,22	3,47	347,95
45,1	7,16	29,08	51,04	3,47	354,08
45,2	7,15	28,97	50,87	3,47	356,70
45,3	7,15	29,23	50,79	3,47	356,12
45,4	7,15	29,13	50,84	3,47	352,04
45,5	7,13	29,28	50,87	3,47	353,79
45,6	7,12	29,23	50,69	3,47	367,49
45,7	7,12	29,08	50,82	3,47	350,87
45,8	7,13	29,08	50,82	3,47	340,66
45,9	7,12	28,97	50,82	3,47	345,91
46,0	7,12	29,18	50,74	3,47	356,41
46,1	7,11	29,08	50,52	3,47	344,45
46,2	7,11	29,34	50,44	3,47	350,58
46,3	7,10	28,97	50,44	3,47	359,91
46,4	7,10	29,02	50,62	3,47	349,12
46,5	7,10	29,18	50,47	3,47	345,04
46,6	7,10	29,28	50,54	3,47	346,20
46,7	7,08	29,02	50,44	3,47	353,49
46,8	7,09	28,87	50,37	3,47	349,41
46,8	7,09	29,49	50,52	3,47	345,62
46,9	7,04	29,28	44,17	0,03	349,12
47,0	7,02	29,13	49,47	3,47	350,58
47,1	7,03	29,34	50,47	3,47	356,70
47,2	7,05	29,59	50,57	3,47	354,66
47,3	7,05	29,49	50,52	3,47	353,79
47,4	7,03	29,85	47,42	0,04	351,45
47,5	6,85	29,59	0,65	0,04	349,99
47,6	6,83	29,80	40,72	0,04	349,12
47,7	6,80	54,99	99,77	0,04	224,87
47,8	7,18	48,63	86,72	0,04	242,08

Tableau 30 : Dénombrement de *S. meliloti* A2 suite à un ajout de résidus de levure d'Unibroue (21/02/2002) dans des boues secondaires de la CUQ (25/04/2002) lors d'une fermentations de 48 heures à 29°C et 200-500 rpm d'agitation, 2-6 litres d'air par minute (LPM) et = 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 150 litres contenant un total de 85 litres de biosolides (Fig. 17).

Temps (heures)	UFC/ml (0,5% RL + 0,5% BS)
0	1,40E+06
3	4,15E+06
6	1,49E+07
9	3,60E+07
12	8,00E+07
15	1,42E+08
18	5,10E+08
21	9,40E+08
24	1,04E+09
30	2,90E+09
48	6,90E+09

Tableau 31 : Données brutes pour le pH, l'oxygène dissout, la température et l'agitation lors d'une fermentation de 48 heures par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur de 150 litres contenant 85 litres d'un mélange de résidus de levure (RL) à 0,5% MES et de boues d'épuration secondaire (BS) à 0,5% MES.

Temps (heure)	pH	DO (%)	Temp réact (°C)	Agit (rpm)
0,0	6,90	90,04	30,77	90,12
0,1	6,89	89,24	30,51	90,21
0,2	6,90	88,72	30,35	90,30
0,3	6,89	88,32	30,40	89,42
0,4	6,93	87,62	30,35	90,38
0,5	6,92	87,19	29,52	90,30
0,6	6,91	85,59	29,67	90,65
0,7	6,94	85,39	29,78	91,00
0,8	6,91	85,07	29,93	90,21
0,9	6,91	84,79	29,99	91,00
1,0	6,91	84,52	29,83	90,12
1,1	6,91	84,27	29,78	89,95
1,2	6,91	83,99	29,88	90,21
1,2	6,91	83,64	29,88	90,65
1,3	6,91	82,74	29,41	90,30
1,4	6,91	82,47	29,41	90,21
1,5	6,91	82,27	29,41	90,38
1,6	6,91	81,94	29,46	89,33
1,7	6,92	81,77	29,41	90,56
1,8	6,91	81,59	29,41	90,21
1,9	6,91	81,29	29,31	89,51
2,0	6,91	81,14	29,41	90,30
2,1	6,92	80,89	29,31	90,47
2,2	6,92	80,62	29,31	90,03
2,3	6,92	80,47	29,41	90,56
2,4	6,92	80,29	29,36	89,86
2,5	6,92	80,12	29,36	90,73
2,6	6,93	79,92	29,46	90,65
2,7	6,93	79,74	29,36	89,60
2,8	6,93	79,39	29,41	89,77
2,9	6,93	79,07	29,41	90,30
3,0	6,91	78,89	29,41	89,95
3,1	6,92	78,72	29,52	90,47
3,2	6,92	78,54	29,36	90,91
3,3	6,92	78,34	29,41	90,82
3,4	6,91	78,17	29,36	89,77
3,5	6,93	77,99	29,36	90,30
3,6	6,93	77,92	29,46	90,91
3,6	6,93	77,74	29,36	89,42
3,7	6,93	77,57	29,31	90,30
3,8	6,93	77,49	29,41	91,00
3,9	6,93	77,32	29,31	90,03
4,0	6,93	77,22	29,52	90,12
4,1	6,93	77,12	29,41	90,47
4,2	6,93	77,07	29,25	90,82
4,3	6,93	76,89	29,36	90,03
4,4	6,94	76,79	29,41	89,95
4,5	6,94	76,69	29,31	90,30
4,6	6,94	76,64	29,36	90,82
4,7	6,94	76,39	29,41	91,17
4,8	6,94	76,32	29,31	89,33
4,9	6,94	76,24	29,41	90,65
5,0	6,95	76,09	29,46	90,56
5,1	6,93	75,97	29,46	89,68
5,2	6,94	75,89	29,36	90,73
5,3	6,95	75,84	29,41	89,42
5,4	6,95	75,74	29,52	89,86
5,5	6,95	75,64	29,41	89,07
5,6	6,94	75,54	29,41	91,08
5,7	6,95	75,47	29,46	92,48
5,8	6,95	75,39	29,46	89,51
5,9	6,94	74,52	29,62	88,63
6,0	6,95	75,27	29,41	89,25
6,0	6,95	75,12	29,41	89,77
6,1	6,96	75,07	29,46	89,60
6,2	6,96	75,04	29,36	91,26
6,3	6,96	74,94	29,36	89,07
6,4	6,95	74,87	29,57	90,56
6,5	6,96	74,77	29,46	90,56

6,6	6,96	74,69	29,41	89,77
6,7	6,96	74,62	29,36	90,65
6,8	6,96	74,62	29,46	91,00
6,9	6,97	74,44	29,46	90,56
7,0	6,96	74,44	29,46	91,00
7,1	6,97	74,32	29,31	90,47
7,2	6,97	74,32	29,46	89,51
7,3	6,97	74,14	29,41	90,21
7,4	6,97	74,07	29,46	89,07
7,5	6,97	73,99	29,57	90,56
7,6	6,97	73,89	29,46	90,21
7,7	6,97	73,82	29,41	90,21
7,8	6,98	73,72	29,31	90,91
7,9	6,98	73,67	29,41	90,47
8,0	6,97	73,64	29,31	89,68
8,1	6,98	73,54	29,46	89,25
8,2	6,98	73,57	29,46	89,68
8,3	6,98	73,47	29,41	90,30
8,4	6,98	73,39	29,31	90,38
8,4	6,98	73,39	29,41	89,68
8,5	6,98	73,39	29,36	89,51
8,6	7,01	73,32	29,41	90,91
8,7	7,02	73,22	29,41	90,73
8,8	7,00	73,24	29,36	90,65
8,9	7,00	72,39	29,46	89,77
9,0	7,00	73,12	29,52	90,82
9,1	7,02	73,12	29,41	90,56
9,2	7,01	73,12	29,41	89,33
9,3	7,01	73,04	29,46	90,03
9,4	7,01	72,94	29,36	90,12
9,5	7,01	72,87	29,25	89,25
9,6	7,01	72,87	29,46	90,47
9,7	7,02	72,79	29,41	89,51
9,8	7,02	72,82	29,46	90,47
9,9	7,02	72,69	29,31	90,82
10,0	7,02	72,62	29,36	89,68
10,1	7,03	72,54	29,31	90,03
10,2	7,04	72,49	29,41	90,30
10,3	7,04	72,39	29,52	90,30
10,4	7,04	72,32	29,25	89,77
10,5	7,04	72,32	29,36	90,30
10,6	7,05	72,24	29,41	90,21
10,7	7,05	72,24	29,20	89,77
10,8	7,05	72,24	29,36	90,56
10,8	7,05	72,24	29,31	90,30
10,9	7,06	72,14	29,41	91,43

11,0	7,07	72,04	29,41	90,12
11,1	7,07	72,04	29,41	90,38
11,2	7,06	72,07	29,46	90,91
11,3	7,08	72,02	29,41	89,77
11,4	7,08	71,87	29,46	90,38
11,5	7,08	71,89	29,41	90,03
11,6	7,08	71,82	29,41	90,73
11,7	7,08	71,02	29,41	89,77
11,8	7,08	71,82	29,36	89,25
11,9	7,08	71,82	29,31	90,12
12,0	7,08	71,74	29,41	89,77
12,1	7,08	71,64	29,31	90,30
12,2	7,09	71,57	29,25	90,56
12,3	7,08	71,54	29,36	90,65
12,4	7,09	71,44	29,15	89,86
12,5	7,09	71,42	29,41	90,82
12,6	7,09	71,42	29,31	89,95
12,7	7,09	71,29	29,41	90,56
12,8	7,08	71,29	29,36	90,47
12,9	7,09	71,22	29,31	90,91
13,0	7,08	71,12	29,36	90,12
13,1	7,09	71,14	29,36	91,17
13,2	7,08	71,04	29,31	89,86
13,2	7,08	70,97	29,31	89,77
13,3	7,08	70,97	29,31	90,82
13,4	7,08	70,87	29,31	90,03
13,5	7,08	70,87	29,36	90,91
13,6	7,08	70,77	29,31	89,33
13,7	7,06	70,69	29,25	91,17
13,8	7,05	70,62	29,36	90,47
13,9	7,05	70,62	29,31	90,47
14,0	7,06	70,49	29,36	91,17
14,1	7,04	70,42	29,41	90,65
14,2	7,04	70,42	29,52	90,65
14,3	7,04	70,37	29,31	89,68
14,4	7,02	70,22	29,20	90,21
14,5	7,02	70,17	29,41	88,81
14,6	6,99	68,32	29,41	89,95
14,7	6,97	69,99	29,31	89,60
14,8	6,96	69,87	29,31	90,65
14,9	6,95	69,82	29,36	90,56
15,0	6,94	69,64	29,41	90,03
15,1	6,92	69,79	29,41	89,60
15,2	6,91	69,72	29,36	90,73
15,3	6,89	69,47	29,36	89,60
15,4	6,91	69,19	29,41	89,86

15,5	6,93	69,04	29,41	90,03
15,6	6,89	68,79	29,46	90,12
15,6	6,90	68,52	29,41	89,33
15,7	6,88	68,32	29,36	89,77
15,8	6,92	67,99	29,31	90,82
15,9	6,92	67,72	29,31	90,30
16,0	6,89	67,44	29,31	90,38
16,1	6,92	67,19	29,36	90,30
16,2	6,90	68,04	29,36	90,12
16,3	6,89	67,54	29,31	91,00
16,4	6,90	66,42	29,36	90,65
16,5	6,89	65,74	29,41	90,12
16,6	6,90	65,37	29,41	90,03
16,7	6,90	65,12	29,46	89,68
16,8	6,90	65,19	29,36	90,91
16,9	6,90	65,29	29,36	89,68
17,0	6,93	64,72	29,31	89,07
17,1	6,90	63,59	29,41	89,86
17,2	6,89	63,12	29,41	90,12
17,3	6,89	62,74	29,36	90,12
17,4	6,91	62,04	29,31	89,42
17,5	6,91	61,09	29,36	88,46
17,6	6,91	57,17	29,46	90,30
17,7	6,95	58,92	29,52	91,17
17,8	6,98	57,87	29,31	89,68
17,9	7,02	56,82	29,52	91,08
18,0	7,04	55,82	29,31	90,56
18,0	7,07	54,99	29,36	90,47
18,1	7,11	55,24	29,36	92,05
18,2	7,10	55,24	29,41	91,96
18,3	7,08	55,42	29,52	92,48
18,4	7,08	55,59	29,46	91,43
18,5	7,09	54,99	29,46	92,05
18,6	7,09	54,22	29,46	92,66
18,7	7,10	52,87	29,36	92,66
18,8	7,07	52,24	29,41	91,78
18,9	7,08	54,09	29,36	91,96
19,0	7,09	52,79	29,41	91,96
19,1	7,08	52,47	29,25	91,96
19,2	7,10	52,57	29,20	91,43
19,3	7,11	52,57	29,36	92,75
19,4	7,11	52,62	29,36	91,87
19,5	7,11	52,02	29,41	92,22
19,6	7,08	52,12	29,25	92,40
19,7	7,11	52,27	29,36	92,31
19,8	7,08	52,44	29,31	92,48

19,9	7,06	52,44	29,25	91,96
20,0	7,08	52,37	29,25	92,57
20,1	7,11	52,44	29,36	91,61
20,2	7,08	52,57	29,46	92,66
20,3	7,08	52,64	29,41	91,87
20,4	7,08	52,87	29,15	91,70
20,4	7,11	52,97	29,31	92,13
20,5	7,08	53,07	29,31	91,52
20,6	7,08	53,49	29,52	92,48
20,7	7,08	54,04	29,46	91,96
20,8	7,10	54,72	29,41	92,13
20,9	7,10	55,24	29,36	91,96
21,0	7,10	55,69	29,46	92,40
21,1	7,04	38,37	29,36	92,22
21,2	7,08	56,39	29,31	91,70
21,3	7,09	56,42	29,57	92,48
21,4	7,11	56,47	29,25	92,13
21,5	7,08	56,64	29,46	92,75
21,6	7,08	56,89	29,25	92,57
21,7	7,09	57,52	29,36	92,57
21,8	7,08	57,84	29,52	92,22
21,9	7,10	57,92	29,31	92,48
22,0	7,11	58,39	29,52	92,40
22,1	7,08	58,72	29,31	91,96
22,2	7,10	58,92	29,25	93,10
22,3	7,08	59,14	29,36	92,40
22,4	7,11	59,49	29,36	92,22
22,5	7,10	59,69	29,36	91,35
22,6	7,10	60,07	29,31	92,83
22,7	7,09	60,34	29,31	92,31
22,8	7,07	60,72	29,31	91,61
22,8	7,10	61,17	29,31	91,52
22,9	7,08	61,34	29,46	92,57
23,0	7,10	61,34	29,46	91,96
23,1	7,05	61,29	29,41	92,48
23,2	7,07	61,29	29,46	91,96
23,3	7,07	61,27	29,41	92,40
23,4	7,06	61,27	29,41	91,96
23,5	7,06	61,34	29,46	92,22
23,6	7,06	61,59	29,31	91,70
23,7	7,05	61,69	29,52	92,66
23,8	7,05	61,87	29,31	92,40
23,9	7,02	59,42	29,41	75,16
24,0	7,01	59,27	29,46	75,86
24,1	7,00	59,52	29,36	75,33
24,2	6,98	59,62	29,52	75,25

24,3	6,95	59,94	29,46	74,20
24,4	6,90	49,19	29,41	75,68
24,5	6,92	60,29	29,52	75,77
24,6	6,90	61,42	29,36	75,16
24,7	6,94	62,37	29,46	75,95
24,8	6,95	62,49	29,36	75,60
24,9	6,95	62,49	29,31	75,68
25,0	6,96	62,54	29,46	75,25
25,1	6,93	62,54	29,36	75,42
25,2	6,93	62,64	29,41	74,28
25,2	6,92	62,64	29,46	75,86
25,3	6,91	62,77	29,36	74,72
25,4	6,90	62,84	29,41	75,42
25,5	6,91	62,92	29,41	75,07
25,6	6,89	62,92	29,52	74,72
25,7	6,93	63,02	29,31	74,72
25,8	6,90	63,12	29,36	75,42
25,9	6,92	63,12	29,46	75,51
26,0	6,96	63,12	29,41	74,55
26,1	6,93	63,17	29,31	75,42
26,2	6,91	63,19	29,46	75,42
26,3	6,91	63,29	29,41	75,07
26,4	6,92	63,34	29,46	74,98
26,5	6,91	63,37	29,41	74,98
26,6	6,95	63,34	29,46	75,16
26,7	6,91	63,34	29,46	74,98
26,8	6,89	63,42	29,46	75,25
26,9	6,91	63,34	29,41	75,33
27,0	6,91	63,42	29,46	75,60
27,1	6,91	63,42	29,31	75,68
27,2	6,94	63,54	29,41	75,86
27,3	6,91	63,52	29,41	75,33
27,4	6,90	63,52	29,41	75,86
27,5	6,90	63,54	29,36	75,25
27,6	6,88	63,62	29,46	75,68
27,6	6,91	63,62	29,36	74,72
27,7	6,90	63,59	29,41	75,07
27,8	6,89	63,69	29,52	74,20
27,9	6,94	63,69	29,41	75,33
28,0	6,92	63,69	29,31	74,37
28,1	6,91	63,77	29,41	74,81
28,2	6,89	63,77	29,36	75,07
28,3	6,90	63,92	29,52	75,42
28,4	6,90	63,89	29,41	74,98
28,5	6,90	63,89	29,25	74,98
28,6	6,91	63,87	29,31	75,33

28,7	6,90	63,89	29,36	74,90
28,8	6,91	64,02	29,31	75,16
28,9	6,90	64,04	29,31	74,81
29,0	6,91	64,02	29,46	74,90
29,1	6,91	64,12	29,41	74,72
29,2	6,91	64,14	29,46	75,60
29,3	6,93	64,19	29,46	74,90
29,4	6,93	64,19	29,46	74,72
29,5	6,93	64,27	29,25	75,68
29,6	6,93	64,29	29,31	75,25
29,7	6,93	64,29	29,46	75,16
29,8	6,92	64,39	29,52	75,42
29,9	6,94	64,39	29,57	75,42
30,0	6,94	64,39	29,41	76,12
30,0	6,97	64,39	29,31	75,60
30,1	6,97	64,39	29,46	75,16
30,2	6,97	64,39	29,31	74,46
30,3	6,98	64,39	29,36	75,33
30,4	6,97	64,39	29,36	74,90
30,5	6,98	64,39	29,36	75,25
30,6	6,98	64,39	29,31	75,60
30,7	7,00	64,29	29,25	75,95
30,8	7,01	64,39	29,25	74,63
30,9	7,02	64,39	29,41	75,42
31,0	7,02	64,39	29,36	74,90
31,1	7,04	64,39	29,31	76,12
31,2	7,03	64,42	29,36	75,07
31,3	7,04	64,39	29,25	75,42
31,4	7,04	64,29	29,25	74,46
31,5	7,04	64,29	29,36	75,25
31,6	7,05	64,39	29,31	74,72
31,7	7,06	64,39	29,31	75,60
31,8	7,06	64,39	29,31	75,51
31,9	7,08	64,39	29,41	74,90
32,0	7,08	64,39	29,36	75,42
32,1	7,08	64,39	29,41	75,51
32,2	7,08	64,39	29,36	74,55
32,3	7,10	64,39	29,36	75,51
32,4	7,09	64,39	29,36	75,51
32,4	7,05	64,49	29,36	75,42
32,5	7,08	64,49	29,36	74,98
32,6	7,08	64,47	29,36	74,28
32,7	7,09	64,49	29,41	76,03
32,8	7,10	64,49	29,31	74,63
32,9	7,09	64,49	29,41	75,51
33,0	7,04	64,49	29,31	74,37

33,1	7,07	64,49	29,31	75,95
33,2	7,08	64,49	29,36	75,33
33,3	7,08	64,39	29,36	74,28
33,4	7,04	64,49	29,36	74,72
33,5	7,05	64,49	29,46	75,25
33,6	7,08	64,49	29,31	75,51
33,7	7,10	64,49	29,36	75,42
33,8	7,04	64,49	29,36	75,16
33,9	7,05	64,39	29,36	74,46
34,0	7,07	64,39	29,31	75,95
34,1	7,08	64,49	29,36	75,07
34,2	7,04	64,39	29,31	75,60
34,3	7,07	64,49	29,36	74,98
34,4	7,09	64,49	29,31	75,68
34,5	7,09	64,49	29,41	75,51
34,6	7,05	64,49	29,36	75,42
34,7	7,06	64,49	29,41	74,81
34,8	7,07	64,39	29,31	75,07
34,8	7,10	64,39	29,36	75,51
34,9	7,07	64,39	29,31	75,60
35,0	7,08	64,42	29,31	75,86
35,1	7,10	64,39	29,31	75,25
35,2	7,05	64,29	29,36	75,77
35,3	7,08	64,39	29,25	75,16
35,4	7,09	64,39	29,36	74,90
35,5	7,09	64,29	29,36	74,98
35,6	7,10	64,29	29,15	75,95
35,7	7,09	64,29	29,41	75,77
35,8	7,05	64,42	29,36	75,33
35,9	7,05	64,29	29,41	75,42
36,0	7,06	62,24	29,31	75,25
36,1	7,05	64,29	29,52	75,16
36,2	7,06	64,29	29,31	74,81
36,3	7,08	64,29	29,31	74,63
36,4	7,08	64,29	29,31	75,60
36,5	7,09	64,22	29,25	74,81
36,6	7,09	64,29	29,41	75,25
36,7	7,06	64,19	29,36	75,60
36,8	7,06	64,22	29,46	75,60
36,9	7,08	64,22	29,36	76,03
37,0	7,09	64,12	29,36	75,77
37,1	7,08	64,12	29,36	75,16
37,2	7,05	64,22	29,31	75,42
37,2	7,06	64,22	29,25	74,55
37,3	7,08	64,12	29,41	74,98
37,4	7,08	64,12	29,20	76,03

37,5	7,09	64,14	29,31	75,25
37,6	7,09	64,14	29,36	74,98
37,7	7,04	64,12	29,25	75,42
37,8	7,05	64,12	29,25	75,60
37,9	7,08	64,04	29,25	74,63
38,0	7,09	64,04	29,41	74,98
38,1	7,09	64,04	29,31	74,46
38,2	7,10	64,12	29,41	75,42
38,3	7,08	64,04	29,41	75,68
38,4	7,10	64,12	29,41	74,28
38,5	7,10	64,12	29,31	75,16
38,6	7,06	64,02	29,46	74,98
38,7	7,08	64,12	29,46	75,60
38,8	7,08	64,12	29,41	74,90
38,9	7,09	64,07	29,41	75,33
39,0	7,04	64,14	29,46	74,55
39,1	7,06	64,12	29,31	75,07
39,2	7,06	64,07	29,05	75,42
39,3	7,07	64,04	29,41	75,16
39,4	7,08	64,12	29,46	75,33
39,5	7,10	64,04	29,36	75,95
39,6	7,09	64,07	29,31	75,51
39,6	7,09	64,04	29,41	75,77
39,7	7,07	64,04	29,46	74,98
39,8	7,09	64,07	29,31	74,98
39,9	7,10	64,04	29,36	74,81
40,0	7,10	64,02	29,36	76,03
40,1	7,05	64,04	29,31	74,46
40,2	7,06	64,02	29,31	74,46
40,3	7,08	64,02	29,46	75,16
40,4	7,09	63,94	29,31	75,33
40,5	7,09	63,94	29,36	75,51
40,6	7,09	63,97	29,52	75,42
40,7	7,10	63,89	29,36	75,25
40,8	7,09	63,97	29,41	73,93
40,9	7,09	63,92	29,41	74,90
41,0	7,09	63,92	29,41	75,16
41,1	7,09	63,89	29,36	75,25
41,2	7,10	63,87	29,31	75,25
41,3	7,10	63,77	29,31	75,51
41,4	7,05	63,79	29,41	75,86
41,5	7,07	63,79	29,20	75,16
41,6	7,08	63,79	29,41	74,55
41,7	7,08	63,69	29,31	74,63
41,8	7,08	63,72	29,31	74,81
41,9	7,08	63,72	29,31	75,60

42,0	7,04	63,79	29,41	74,90
42,0	7,06	63,77	29,52	75,16
42,1	7,06	63,79	29,52	75,16
42,2	7,08	63,69	29,41	74,90
42,3	7,09	63,69	29,31	73,76
42,4	7,09	63,69	29,41	74,63
42,5	7,09	63,59	29,36	74,98
42,6	7,09	63,62	29,41	74,98
42,7	7,09	63,54	29,31	75,07
42,8	7,09	63,54	29,41	75,42
42,9	7,09	63,52	29,20	75,33
43,0	7,10	63,52	29,31	74,90
43,1	7,10	63,44	29,25	75,51
43,2	7,09	63,42	29,36	75,60
43,3	7,10	63,42	29,36	74,98
43,4	7,05	63,42	29,31	75,25
43,5	7,08	63,42	29,41	75,86
43,6	7,07	63,44	29,41	75,95
43,7	7,07	63,44	29,41	75,07
43,8	7,08	63,44	29,36	75,16
43,9	7,08	63,42	29,31	75,33
44,0	7,10	63,44	29,41	74,98
44,1	7,04	63,34	29,36	75,25
44,2	7,06	63,34	29,36	75,16
44,3	7,07	63,29	29,36	74,90
44,4	7,07	63,27	29,31	75,86
44,4	7,09	63,17	29,36	75,42
44,5	7,09	63,12	29,36	74,98
44,6	7,09	63,02	29,41	74,98
44,7	7,09	62,92	29,41	75,42
44,8	7,09	62,84	29,41	74,98
44,9	7,09	62,77	29,31	74,20
45,0	7,09	62,62	29,36	74,98
45,1	7,08	62,54	29,25	75,25
45,2	7,09	62,54	29,41	74,55
45,3	7,09	62,54	29,25	74,37
45,4	7,08	62,49	29,36	75,25
45,5	7,07	62,52	29,41	74,28
45,6	7,08	62,49	29,36	75,68
45,7	7,07	62,39	29,36	74,90
45,8	7,07	62,37	29,25	74,81
45,9	7,08	62,37	29,36	75,07
46,0	7,06	62,29	29,36	75,51
46,1	7,08	62,14	29,31	75,42
46,2	7,05	62,12	29,31	76,21
46,3	7,06	62,07	29,36	75,51

46,4	7,05	62,04	29,31	74,46
46,5	7,05	61,94	29,46	75,33
46,6	7,03	61,97	29,36	74,20
46,7	7,04	61,97	29,36	74,63
46,8	7,04	61,84	29,25	75,07
46,8	7,02	61,87	29,46	75,16
46,9	6,97	62,12	29,36	75,68
47,0	6,97	61,87	29,46	75,68
47,1	6,98	61,87	29,41	75,95
47,2	6,98	61,69	29,46	74,37
47,3	6,72	52,19	21,31	112,00
47,4	6,79	54,79	21,57	157,58
47,5	6,91	53,52	19,38	0,00
47,6	4,63	54,79	20,37	0,00
47,7	4,63	54,79	20,37	0,00
47,8	4,63	54,79	20,37	0,00

ANNEXE-4
ÉVOLUTION DU K_LA, OUR ET OTR

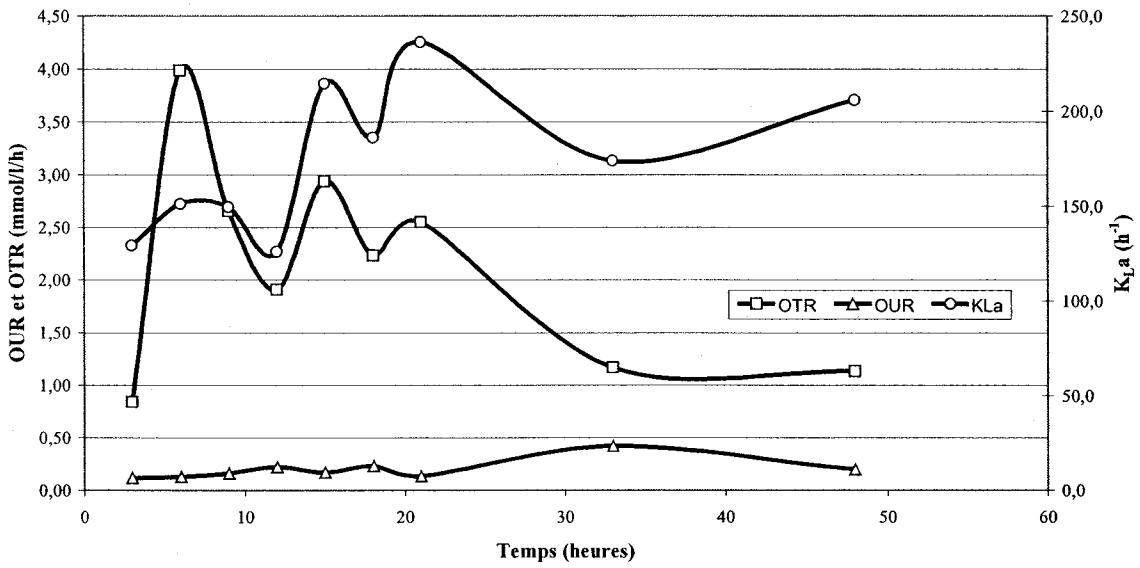


Figure 18 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un milieu défini (YMB) au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 15 litres (15A).

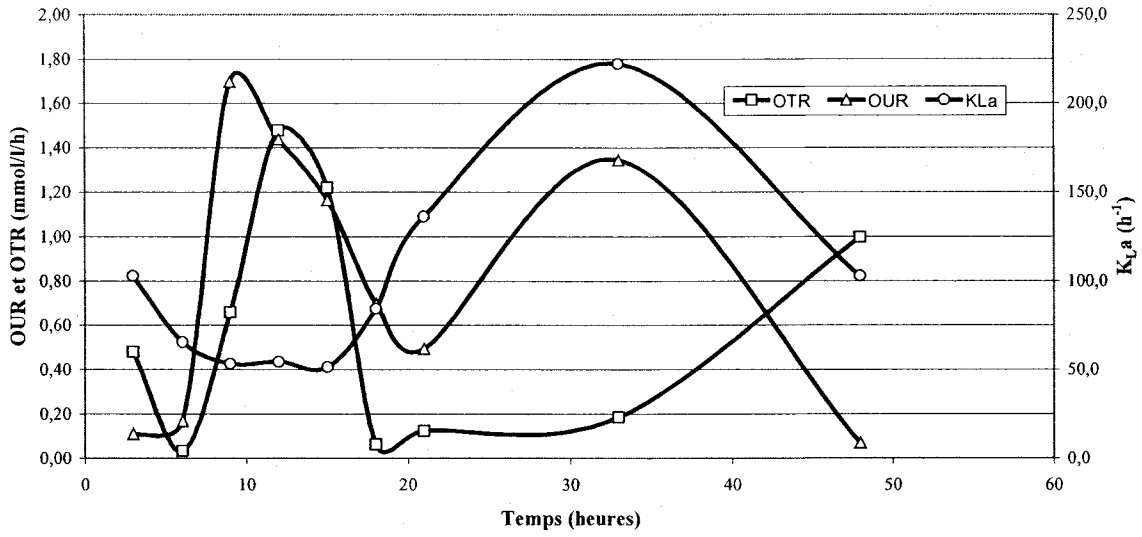


Figure 19 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans des boues d'épuration secondaire de la CUQ à 0,5% MES (25/04/202) au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 15 litres (15B).

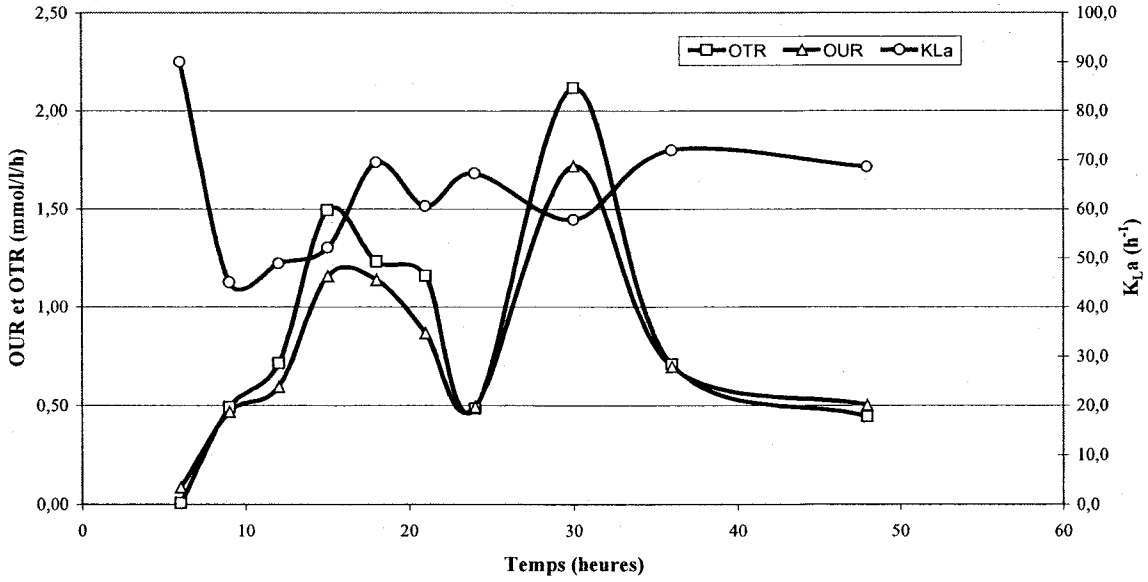


Figure 20 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un mélanges de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% MES et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) à 0,5% MES au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 15 litres (15B).

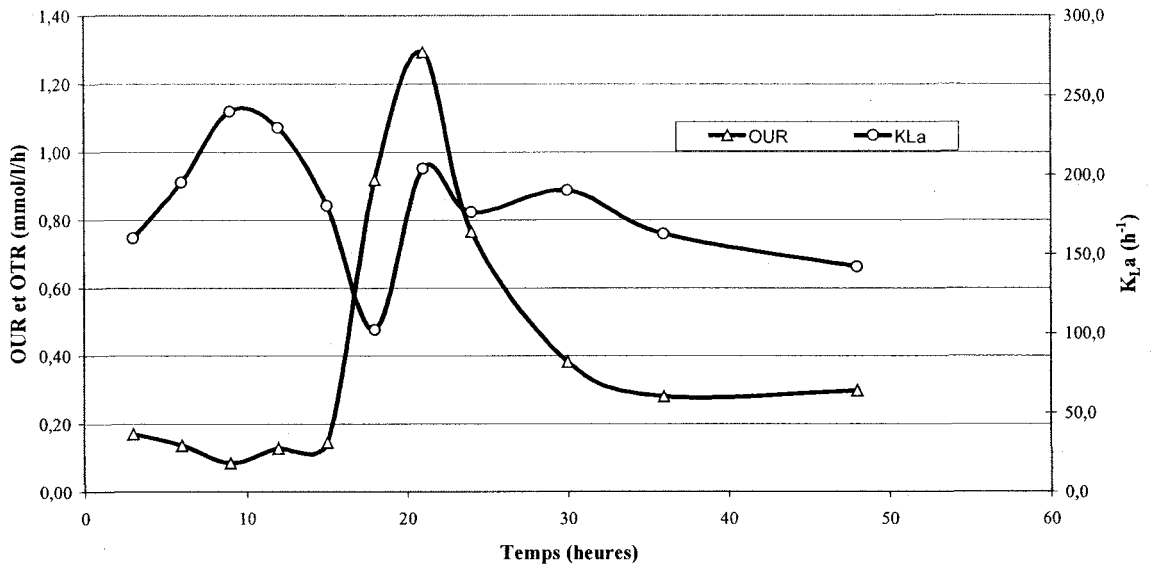


Figure 21 : Évolution du coefficient de transfert d'oxygène (K_La), de la vitesse de transfert et de la consommation d'oxygène (OTR et OUR) en fonction du temps pour une souche de *S. meliloti* A2 dans un mélanges de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) à 0,5% MES et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) à 0,5% MES au cours d'une fermentation de 48 heures dans bioréacteur de 150 litres (150C)

ANNEXE-5
EXEMPLE DE CALCUL DU K_LA

Un exemple de la méthode dynamique de calcul du k_La après 48 heures de fermentation d'un mélange de biosolide (BS : 0,5% MES + RL : 0,5% MES) par *S. meliloti* A2 dans un bioréacteur de 150 litres est présenté ci-dessous (voir tableau 11, chapitre 3).

Durant le procédé par charge (Batch), lors d'une culture bactérienne, les changements de la concentration en oxygène dissout pendant la fermentation peuvent être décrites par l'équation :

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

Le premier terme OTR représente la vitesse de transfert de l'oxygène :

$$OTR = K_L a\left(C^* - C_L\right)$$

et le second OUR, représente la vitesse de consommation d'oxygène. Dans les procédés biologiques, l'OTR est égale au QO_2X :

$$OUR = QO_2X$$

d'où l'équation :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a\left(C^* - C_L\right) - QO_2X$$

À l'équilibre $\frac{dC_L}{dt} = OUR = OTR = 0$ et donc la balance en oxygène donne

$$K_L a\left(C^* - C_L\right) = OUR = QO_2X$$

En arrêtant momentanément l'aération, et en diminuant l'agitation, le premier terme de l'équation peut être considéré comme négligeable. On considère que l'aération est interrompue pendant un intervalle de temps suffisamment court pour que le métabolisme bactérien ne soit pas affecté.

La diminution de la concentration en oxygène dissout est causée exclusivement par l'OUR. Cette réduction est généralement linéaire et on peut facilement déterminer QO_2X à partir de la pente du diagramme de l'évolution en oxygène dissout en fonction du temps (Figure 22) :

$$\frac{dC_L}{dt} = -QO_2X$$

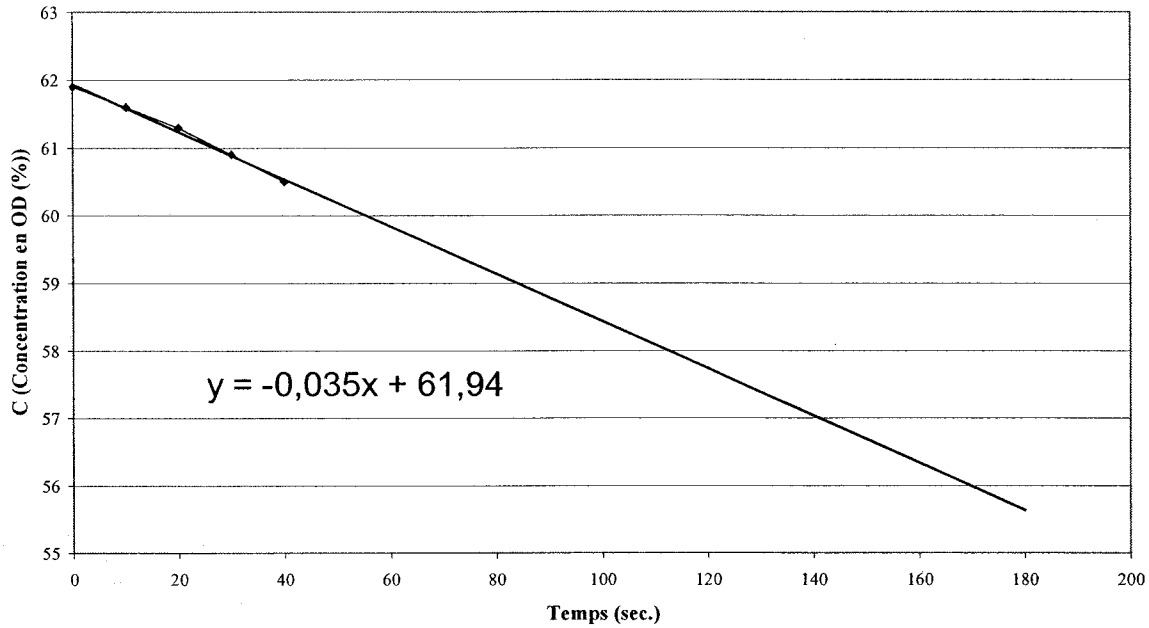


Figure 22 : Évaluation de la vitesse de consommation d'oxygène (QO_2X) à partir de la pente de la courbe de l'évolution de l'oxygène dissout en fonction du temps.

Avant que la concentration en oxygène dissout atteigne la valeur critique (20% d'oxygène dissout), l'aération est reprise et par la suite, on a un retour aux concentrations normales. Le k_La peut être estimé en reformulant l'équation ci-dessus en terme de concentration en oxygène dissout :

$$C_L = -\frac{1}{K_La}\left[\frac{dC}{dt} + QO_2X\right] + C^*$$

Le $\left(-\frac{1}{K_La}\right)$ est donné par la pente du diagramme de l'évolution du C_L en fonction de $\left[\frac{dC}{dt} + QO_2X\right]$ Les estimations de QO_2X et k_La sont dépendante de la section de la courbe utilisée lors de l'évaluation. (Tableau 32 et Figure 23).

Tableau 32 : Estimation du coefficient de transfert d'oxygène (K_La) et de la vitesse de consommation d'oxygène (QO_2X).

Aération fermée		Aération ouverte							
temps (sec)	DO	temps (sec)	DO	dC/dt	QO_2X	$dC/dt+QO_2X$	C	$1/K_La$	K_La (h^{-1})
0	61,9	0	58	0,19	0,035	0,225	58	25,35	141,99
10	61,6	10	59,9	0,15		0,185	59,9		
20	61,3	20	61,4	0,11		0,145	61,4		
30	60,9	30	62,5	0,02		0,055	62,5		
40	60,5	40	62,7						

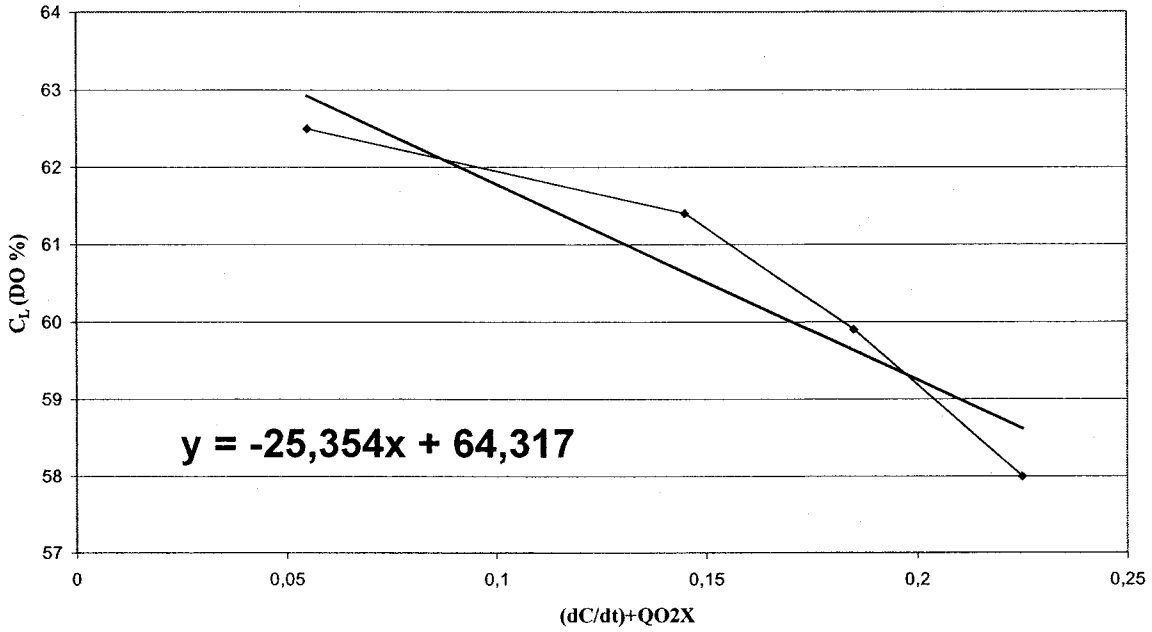


Figure 23 : Estimation du coefficient de transfert d'oxygène (K_La) à partir de la pente de la courbe de l'évolution de l'oxygène dissout en fonction de ($dC/dt + QO_2X$).

ANNEXE-6
RÉSULTATS DES INDICES NODULAIRES

Tableau 33 : Évaluation de l'indice nodulaire d'un inoculant liquide à base de *S. meliloti* A2 produit dans un milieu défini YMB et dans des boues d'épuration secondaire à 0,5% MES (BS) de la CUQ (25/04/2002) en bioréacteur de 15 litres lors d'inoculation de plantule de luzerne en sachet.

Milieu défini (YMB) 15A				
# du sachet	Grosseur	Couleur	Quantité	Indice Nod.
1	2	2	3	12
2	3	2	3	18
3	2	2	3	12
4	3	2	3	18
5	1	2	3	6
6	3	2	3	18
7	3	2	3	18
8	2	2	3	12
9	2	2	3	12
10	1	1	3	3
Moyenne				12,9
Boues secondaires CUQ (BS) 15B				
1	1	2	3	6
2	2	2	3	12
3	1	2	3	6
4	3	2	3	18
5	2	2	3	12
6	2	2	3	12
7	2	2	3	12
8	2	2	3	12
9	2	2	3	12
10	2	2	3	12
Moyenne				11,4

Tableau 34 : Évaluation de l'indice nodulaire d'un inoculant liquide à base de *S. meliloti* A2 produit dans deux mélanges différents de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) en bioréacteur de 15 litres lors d'inoculation de plantule de luzerne en sachet.

0,8% MES RL + 0,2% MES BS (15A)				
# du sachet	Grosseur	Couleur	Quantité	Indice Nod.
1	2	2	3	12
2	2	2	3	12
3	2	2	3	12
4	1	2	3	6
5	3	2	3	18
6	2	2	3	12
7	2	2	3	12
8	3	2	3	18
9	2	2	3	12
10	2	2	3	12
	Moyenne			12,6
0,5% MES RL + 0,5% MES BS (15B)				
1	2	2	3	12
2	3	2	3	18
3	2	2	3	12
4	3	2	3	18
5	3	2	3	18
6	3	2	3	18
7	3	2	3	18
8	3	2	3	18
9	2	2	3	12
10	3	2	3	18
	Moyenne			16,2

Tableau 35 : Évaluation de l'indice nodulaire d'un inoculant liquide à base de *S. meliloti* A2 produit dans un mélanges de boues d'épuration secondaire (BS) de la CUQ (25/04/2002) et de résidus de levure (RL) d'Unibroue (21/02/2002) en bioréacteur de 150 litres lors d'inoculation de plantule de luzerne en sachet

0,5% MES RL + 0,5% MES BS (150C)				
# du sachet	Grosseur	Couleur	Quantité	Indice Nod.
1	2	2	3	12
2	2	2	3	12
3	3	2	3	18
4	3	2	3	18
5	3	2	3	18
6	3	2	3	18
7	3	2	3	18
8	3	2	3	18
9	3	2	3	18
10	3	2	3	18
	Moyenne			16,8