

Université du Québec

Institut National de la Recherche Scientifique

Centre Eau Terre Environnement

UTILISATION DES BOUES D'ÉPURATION ET DU GLYCÉROL BRUT
COMME SUBSTRATS POUR TRICHOSPORON OLEAGINOSUS AFIN DE
PRODUIRE DES LIPIDES NÉCESSAIRES À LA PRODUCTION DU
BIODIESEL

Par :

Itounou Vital IDOSSOU

Mémoire présenté pour l'obtention du grade Maître ès sciences, M.Sc en
Sciences de l'eau et de l'environnement

INRS-ISHÉDD

Jury d'évaluation :

Examineur interne : Guy MERCIER (INRS-ETE)

Examineur externe : Manuel J. RODRIGUEZ (ESAD-UNIV. LAVAL)

Directeur de recherche : Rajeshwar Dayal TYAGI (INRS-ETE)

Co-directeur de recherche : Kamal EL HAJI (ISHÉDD)

Août 2016

© Droits réservés de Vital IDOSSOU (2016)

DÉDICACES

A

*Mon père **Emmanuel IDOSSOU** et ma mère **Karen NONVIGNON**.*

Pour les multiples peines que vous vous êtes données pour cette noble mission, celle de voir votre progéniture émerger. Puisse l'Éternel Dieu Tout Puissant vous accorder une longue vie.

REMERCIEMENTS

A l'Éternel Dieu Tout Puissant et pour tous ceux et celles qu'il a bien voulu mettre au croisé de mon chemin afin que le présent travail soit rendu possible, je voudrais dire merci.

- Je m'en voudrais de ne pas faire une mention spéciale à mon directeur de recherche, le Professeur Rajeshwar Dayal TYAGI, pour sa générosité, sa rigueur, son importante contribution scientifique et son indulgence tout au long de ma formation. Merci Professeur de m'avoir guidé tout au long de mon projet malgré vos multiples occupations.

Mes vifs remerciements et ma profonde gratitude s'adressent :

- **A** mon co-directeur, M. Kamal EL HAJI, directeur de l'Institut Supérieur des Hautes Études en Développement Durable (ISHÉDD), qui, par le biais de son institut, m'a donné la chance de compléter ma formation à l'INRS. Merci monsieur Kamal pour votre contribution capitale à ce mémoire. Vos multiples conseils de « papa à son fils » me sont allés droit au cœur.
- **A** l'associé de recherche Xiaolei Zhang qui n'a ménagé aucun effort pour mon encadrement au laboratoire. Elle fut mon repère dans le domaine du biodiesel et son aide m'a été plus que précieuse. « Xiéxié Xiaolei ».
- **A** tout le personnel de l'ISHÉDD pour les encouragements lors de mon séjour au Maroc.
- **A** tout le personnel de l'INRS principalement Linda Aubert pour m'avoir soutenu d'une manière ou d'une autre.
- **A** mes collègues de laboratoire, Saurabh, Lalit, Raja, Sravan, Jiaxin, Adama, Nouha, Douha, Oumar, pour leurs différentes aides apportées.

De même, ma profonde et affectueuse gratitude va à l'égard de :

- Mes amis : Domingo, Mérite, Marcia, Nicodeme, Chellouli, Yannick, Yassine, Simon, Bienvenu, Tranquille, Gino, Charaf, Charles, Déo, Isbath, Sofia, Sanae, Assia, etc., pour leurs divers encouragements ;
- Monsieur LIMA Justin, ancien diplomate à l'ambassade du Bénin au Maroc, pour son aide précieuse lors de mon séjour à Rabat ;
- Marie-Claude ROCHER et Jean-Pierre CARON pour leurs soutiens inestimables ;
- Gaspard DOSSOU mon oncle pour le grand soutien qu'il continue de m'apporter ;
- Mes amis du groupe JERENAIS pour l'amitié et les prières ;
- Mes frères et sœurs : Briand, Cheryle et Valérie, pour leurs divers soutiens et prières ;
- Enfin, que toutes les personnes de mon entourage, les parents, amis, principalement Édith KPODEKON qui m'apporte un soutien et un amour indéfectibles et tous ceux qui m'ont soutenu et aidé de diverses manières soient rassurés de ma sincère reconnaissance.

RÉSUMÉ

Le biodiesel s'affirme comme une alternative à l'utilisation des carburants fossiles surtout parce qu'il est renouvelable, biodégradable, non toxique et non dommageable à l'environnement. Parallèlement, la gestion des déchets (dont ceux provenant des industries de production de biodiesel) à Québec s'avère être une préoccupation majeure.

Notre étude s'est donc focalisée sur la production de lipides pour leur conversion en biodiesel en utilisant un substrat à moindre coût tel que les boues d'épuration secondaires qui ont été collectées à la station d'épuration de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ). Pour ce faire, différents types de boues (les boues lavées, non-lavées et centrifugées) ont été utilisées avec des concentrations en matières en suspension variant de 30 à 40 g/l pour la production de lipides par *Trichosporon Oleaginosus*. Aussi, dépendamment des cas, du glycérol brut purifié a été ajouté afin d'accroître cette production.

Les résultats obtenus, à l'issue de ce travail ont montré que lorsque les boues sont lavées, elles permettent une meilleure accumulation de lipides. Également, l'impact de la variation des matières en suspension fut investigué et a montré qu'à une concentration de 35 g/l plus 40 g/l de glycérol avec ces mêmes boues lavées, une concentration de 20,4 g/l de lipides est obtenue. De plus, la mesure des paramètres tels que l'OUR, l'OTR et le K_{La} a confirmé la performance du bioréacteur lorsqu'il est opéré sous ces conditions.

Mots clés : Biodiesel, production de lipides, boues d'épuration secondaires, boues lavées, *Trichosporon Oleaginosus*, glycérol, OUR, OTR, K_{La} .

ABSTRACT

Biodiesel is emerging as a favourable alternative to the fossil fuel extinctions since it is renewable, biodegradable, non-toxic and eco-friendly environment. Meanwhile, wastes management in Québec is proving to be a major concern. Then, our study is focused on lipid production for biodiesel conversion by using a lower cost substrate such as secondary wastewater sludge collected from the wastewater treatment plant of the Urban Community Québec (CUQ). Thus, to achieve this, different types of sludge such as washed sludge, unwashed and centrifuged are used with suspended solids ranging from 30 to 40 g/L for lipid production by *Trichosporon Oleaginosus*. In addition, depending on the case, purified crude glycerol was added in order to increase the production.

The results obtained at the end of this work have showed that when the sludge is washed, it allows a better lipid accumulation. Moreover, the impact of changes in suspended solids was investigated and showed that at a suspended solids concentration of 35g/L plus 40g/L of crude glycerol with those washed sludge, a concentration of 20.4g/L of lipid was obtained. Furthermore, the measurement of parameters such as OUR, OTR, KLa, has confirmed bioreactor performance when operated under these conditions.

Keywords: Biodiesel, lipid production, secondary wastewater sludge, washed sludge, *Trichosporon Oleaginosus*, glycerol, OUR, OTR, KLa,

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES	ii
REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xiii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Problématique liée à la gestion des boues d'épuration.....	1
1.2. Gestion du glycérol brut	2
2. REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1. Les microorganismes oléagineux pour la production du biodiesel.....	3
2.1.1. Historique et caractéristique	3
2.1.2. Production de lipides par <i>Trichosporon Oleaginosus</i>	4
2.2. Problématique de recherche	12
3. OBJECTIFS ET ORIGINALITÉ DE LA RECHERCHE	13
3.1. Objectifs	13
3.2. Originalité.....	14
4. MATÉRIELS ET MÉTHODES	14
4.1. Source microbienne.....	14
4.2. Échantillonnage et préparation des boues d'épuration secondaires (milieu de croissance)	14
4.3. Prétraitement des boues d'épuration secondaires.....	15
4.3.1. Boues non lavées	15
4.3.2. Boues lavées.....	16
4.3.3. Boues centrifugées	16
4.3.4. Prétraitement thermo-alkalin	16
4.4. Condition et préparation de l'inoculum.....	17
4.4.1. Milieu de pré-culture (étape - 1)	17

4.4.2.	Milieu de boue (étape-2).....	18
4.5.	Technique de de fermentation.....	18
4.5.1.	Description des bioréacteurs	18
4.5.2.	Technique de fermentation	19
4.5.3.	Calcul du KLa, de l'OTR et de l'OUR	21
4.5.4.	Estimation de la concentration des boues en matières en suspension	22
4.5.5.	Estimation de la concentration en cellules totales (énumération des cellules totales).....	23
4.5.6.	Détermination de la teneur et de la concentration en lipides dans les boues 25	
4.5.7.	Processus de transestérification des lipides	26
5.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	27
5.1.	Les boues lavées, non lavées, centrifugées avec différentes concentrations en matières en suspension et leurs impacts sur l'accumulation de lipides par <i>Trichosporon Oleaginosus</i>	27
5.1.1.	Expériences sans ajout de glycérol.....	27
5.1.2.	Effet de l'ajout de solution de glycérol brut sur l'accumulation de lipides par <i>Trichosporon Oleaginosus</i>	34
5.2.	Étude de la performance des différentes fermentations.....	40
5.2.1.	Les taux de croissance, de production de lipides et de consommation de glycérol.	40
5.2.2.	Influence des concentrations de l'OUR, l'OTR et du KLa sur la performance des fermentations.	44
6.	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	50
7.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CUQ : Communauté Urbaine de Québec

MES : Matières En Suspension

KL_a : Coefficient de transfert volumétrique

OUR : Taux de consommation d'oxygène

OTR : Taux de transfert d'oxygène

STEPS : Station d'épuration

UFC : Unité Formatrice de Colonie

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie de microorganismes oléagineux/Trichosporon O.....	3
Figure 2 : Courbe de croissance microbienne en mode discontinu (PRESCOTT <i>et al.</i> , 1995)	6
Figure 3 : Schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire en régime stationnaire (Arnold <i>et al.</i> , 1958).	8
Figure 4 : Milieu de pré-culture (photo prise par IDOSSOU Vital, le 24-05-2015)	17
Figure 5 : Bioréacteurs de 15L et leurs équipements (photo prise par Vital IDOSSOU, le 31-03-2015)	19
Figure 6 : Schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire d'après (Arnold <i>et al.</i> , 1958).....	22
Figure 7 : Principe de dilution pour l'estimation de la concentration des cellules totales	24
Figure 8 : Estimation des colonies formées sur les plaques (photo prise par Vital IDOSSOU, le 2015-11-04)	24
Figure 9 : Profil des MES pour les différents types de boues.....	28
Figure 10 : Évolution des cellules totales au cours des fermentations avec des boues lavées à 35 et 40 g/l	30
Figure 11 : Effet de la concentration en solides en suspension et du type de boues (lavées ou non lavées) sur la teneur en lipides dans la biomasse.....	33

Figure 12 : Effet de la concentration en solides en suspension et du type de traitement des boues (lavées ou non-lavées) sur la concentration en lipides ..	34
Figure 13 : Étude comparative de la variation des solides en suspension au niveau des boues lavées 35g/l plus 40g/l glycérol, boues lavées 40g/l plus 50g/l glycérol et les boues centrifugées 35g/l plus 40g/l de glycérol.....	36
Figure 14 : Effet de la concentration en matières en suspension et du type de boues sur la teneur en de lipides	37
Figure 15 : Effet de la concentration en solides en suspension et du type de boues sur la concentration en lipides	37
Figure 16 : Variation de la concentration en glycérol au niveau des boues lavées 35g/l plus 40g/l de glycérol en fonction du temps	38
Figure 17 : Variation de la concentration en glycérol au niveau de MES des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol en fonction du temps	38
Figure 18 : Variation de la concentration en glycérol au niveau des boues centrifugées de 35g/l de MES avec 40g/l de glycérol en fonction du temps	39
Figure 19 : Variation des taux de croissance des microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol.....	40
Figure 20 : Variation des taux de croissance spécifique des microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol. (dp/dt= taux de production des lipides).	41
Figure 21 : Variation des taux de production de lipides par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol.	42

Figure 22 : Variation des taux de production spécifiques de lipides par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol.	43
Figure 23 : Variation des taux de concentration de glycérol au niveau des boues lavées et centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol.	43
Figure 24 : Variation des taux de consommation spécifique de glycérol au niveau des boues lavées et centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol	44
Figure 25 : Profil de l'OUR par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées 35g/l plus 40 g/l de glycérol.....	45
Figure 26 : Profil de l'OUR spécifique par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées 35g/l plus 40 g/l de glycérol.....	46
Figure 27 : Profil de l'OTR par les microorganismes des boues lavées 35g/l plus 40g/l de glycérol et des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol.	47
Figure 28 : Profil de l'OTR par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées 35 g/l plus 40 g/l de glycérol.....	48
Figure 29 : Profil du KLa avec des boues lavées et des boues centrifugées 35 g/l plus 40 g/l de glycérol.....	48
Figure 30 : Profil de KLa avec des boues lavées à 35g/l plus 40g/l de glycérol et des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol.	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Paramètres affectant le transfert d'oxygène dans un réacteur de type cuve agitée	9
Tableau 2 : Composition typique des boues d'épuration secondaire	15
Tableau 3 : Variation des matières en suspension pendant le lavage et la stérilisation	29
Tableau 4 : Valeurs obtenues des boues lavées et non-lavées avec différentes concentrations initiales en MES	29
Tableau 5 : Caractéristiques des différents types de boues sans ajout de glycérol après 48h de fermentation	31
Tableau 6 : Composition de la solution de glycérol utilisée	35

1. INTRODUCTION

Dans le monde, le volume des eaux usées généré par des sources domestiques, industrielles ou commerciales a augmenté de façon significative ; ceci est dû à l'accroissement démographique, à l'urbanisation et au développement économique. Ces eaux usées sont traitées dans les stations d'épuration (STEPs) et génèrent d'importantes quantités de boues avec un taux variant entre 70 et 90g par habitant par jour (Fytily *et al.*, 2008). Au Canada, les STEPs produisent environ 670 mille Mg de boues sèches par an et cette production ne cesse d'augmenter au fil des années (Pilli *et al.*, 2011, Renzetti, 2005).

1.1. Problématique liée à la gestion des boues d'épuration

L'incinération et l'enfouissement sont les méthodes courantes utilisées pour la gestion de ces boues depuis bon nombre d'années. Mais à cause des impacts négatifs de ces méthodes sur la qualité de l'environnement, des réglementations strictes sont mises en place et par conséquent le besoin de trouver des approches éco-respectueuses de l'environnement pour la gestion de ces biosolides se fait sentir.

Paradoxalement, des études ont prouvé que, les boues d'épuration renferment un potentiel leur permettant d'être bioconverties en produits à valeur ajoutée. (Zhang *et al.*, 2014a) , (Su *et al.*, 2012) et (Zhuang *et al.*, 2011) ont d'ailleurs montré que ces boues contiennent d'abondants nutriments pour la croissance de microorganismes, faisant des boues de véritables sources comme matières brutes pour la production de biopesticides, de biogaz, de bioplastiques, de biodiesel, etc. Ces technologies menant à l'obtention de produits à valeurs ajoutés sont considérées comme de nouvelles approches durables pour la gestion des boues d'épuration (Brar *et al.*, 2005, Pham *et al.*, 2009, Verma *et al.*, 2007). En ce qui concerne la production de biodiesel, plusieurs études ont

révélés que les boues d'épuration peuvent être utilisées comme substrats ou co-substrats pour la croissance des microorganismes oléagineux. Et d'autant plus que les boues d'épuration sont pas coûteuses à obtenir, ceci permet de réduire le coût de production de biodiesel et parallèlement contribue à résoudre le problème de gestion auquel le monde fait face.

1.2. Gestion du glycérol brut

Communément connu sous le nom de glycérine, le glycérol est le principal sous-produit de l'usine de fabrication du biodiesel qui est généré en grande quantité (Ayoub *et al.*, 2012, Da Silva *et al.*, 2009, Vasudevan *et al.*, 2008). Des études ont estimé que pour chaque 100kg de biodiesel produit, 10kg de glycérol sont générés (Chatzifragkou *et al.*, 2012, Yazdani *et al.*, 2007). Ce glycérol brut peut être utilisé comme une composante pour les industries pharmaceutiques et alimentaires. Mais les impuretés qu'il renferme tels que le savon, les métaux lourds, le sel, etc., limitent sa valorisation pour la production de composés biologiques à moins qu'il ne soit stérilisé avant utilisation ; ce qui augmentera les coûts de consommation d'énergie. Cette situation pose alors un véritable problème de gestion pour les grandes industries de fabrication du biodiesel.

Parallèlement, des études ont montré que le glycérol brut peut être utilisé comme substrat pour la croissance de microorganismes oléagineux. En effet, des chercheurs ont caractérisé le glycérol brut et ont montré qu'il contient des macroéléments tels que le potassium, le calcium, le magnésium, le sodium, etc., qui représentent d'excellentes sources de carbone (Easterling *et al.*, 2009, Kitcha *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2012). Ainsi, l'utilisation effective du glycérol comme source de carbone supplémentaire contribue à la réduction du coût de production du biodiesel.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1. Les microorganismes oléagineux pour la production du biodiesel

2.1.1. Historique et caractéristique

La levure *Trichosporon Oleaginosus* ATCC20509 appartient au groupe des microorganismes oléagineux. Elle a premièrement été isolée et identifiée comme *Candida Curvata* (Moon *et al.*, 1978), puis les années suivantes elle a été successivement appelée par *Apiotrichum curvatum* (Von Arx *et al.*, 1979) et par *Cryptococcus Curvatus* (Aono, 1990). Récemment, une nouvelle espèce de *Trichosporon* ayant les mêmes caractéristiques de *C. Curvatus* fut identifiée sous le nom de *Trichosporon Oleaginosus* ATCC20509 (Gujjari *et al.*, 2011) (voir figure1).

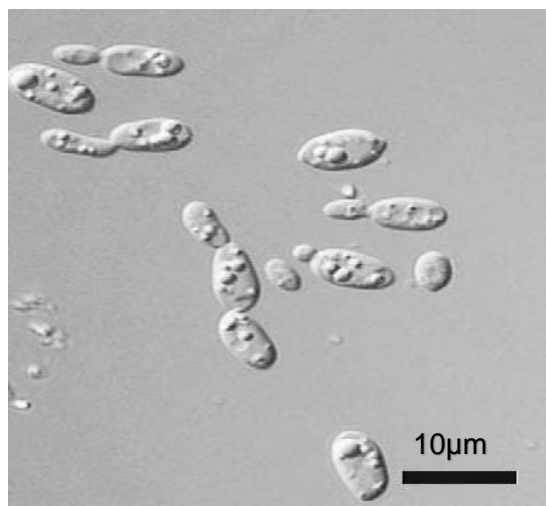


Figure 1 : Photographie de microorganismes oléagineux/Trichosporon O. (Gujjari *et al.*, 2011)

Les microorganismes oléagineux sont connus pour leur grande capacité à synthétiser et accumuler des huiles microbiennes encore appelées lipides ou huiles à cellules uniques (Ma, 2006) jusqu'à environ 70% de leur poids sec (Colin

Ratledge, 1991), (Colin Ratledge, 2005), (Colin Ratledge *et al.*, 2008). L'accumulation de lipides par *Trichosporon Oleaginosus* commence en général lorsque les nutriments, principalement l'azote est en déficit dans le milieu de fermentation avec un excès de source de carbone (EVANS *et al.*, 1984b). Ces lipides renferment environ 80 à 90 % de triacylglycérol avec une composition en acide gras comparable à celles des huiles issues des graines de plantes (Ykema *et al.*, 1988).

2.1.2. Production de lipides par *Trichosporon Oleaginosus*

La fermentation est le moyen par lequel les microorganismes croissent afin de synthétiser et d'accumuler des lipides. Il a été reporté depuis des décennies que les différentes étapes de croissance, les sources de carbone et leur concentration, le rapport C/N, la température, le taux d'aération et d'agitation, les sources d'azote, affectent la concentration et la composition des lipides accumulés lors de la fermentation (Woodbine, 1959). Alors ces différents paramètres sont ajustés dans les bioréacteurs afin d'assurer des conditions optimales à la croissance de ces microorganismes.

➤ Différents substrats et matériels bruts utilisés

L'avantage crucial des microorganismes oléagineux réside en leur capacité à se développer sur plusieurs types de substrats. Dans le processus de production de lipides pour leur conversion en biodiesel à une échelle industrielle, la source de carbone joue un rôle important et se doit d'être à moindre coût et disponible en quantités abondantes (Pan *et al.*, 1986, Rossi *et al.*, 2011). D'après les investigations, le glucose a été le plus employé en tant que source de carbone pour l'accumulation de lipides par les microorganismes oléagineux (Boulton *et al.*, 1984, Heredia *et al.*, 1988, Jacob, 1992, Li *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2008). Par contre, le coût élevé du glucose ne permet pas une bonne rentabilité du processus de production du biodiesel (Yan *et al.*, 2011).

Il a par ailleurs été rapporté que les sources de carbone provenant des biomasses lignocellulosiques telles que les résidus forestiers, les déchets municipaux et d'animaux, etc., représentent un potentiel important pour la production de lipides microbiens. Par ailleurs, (Meesters *et al.*, 1996) d'une part, puis (Angerbauer *et al.*, 2008) d'autre part ont tous affirmés que des substrats plus ou moins complexes tels que des boues d'épuration et du glycérol brut qui est produit en grande quantité par l'industrie du biodiesel sont également de prometteuses sources de carbones.

➤ **Modes de culture de *Trichosporon Oleaginosus***

Trichosporon Oleaginosus est reconnue pour sa capacité d'être cultivée sur différents modes de fermentation développés à cet effet. Il s'agit de la fermentation discontinue, de la fermentation discontinue avec alimentation, de la fermentation en continu puis de la fermentation avec recyclage partiel.

Une étude a révélé que le taux de production de lipides est plus rapide lorsque la fermentation est opérée en continu ou semi continu. Or, c'est la fermentation en mode discontinue sans régénération du milieu de culture mais avec ajout de nutriments au besoin qui est la plus couramment utilisée (Ykema *et al.*, 1988). Elle assure une production de lipides plus efficace et reproductible. C'est en effet le procédé le plus fiable à utiliser dans le domaine biotechnologique (Beopoulos *et al.*, 2009, Beopoulos *et al.*, 2011). La fermentation discontinue se déroule principalement en deux étapes : une première au cours de laquelle il n'y a pas de limitation en termes d'apports de nutriments, ce qui favorisera donc une croissance rapide des microorganismes. La seconde phase est marquée par une limitation en apport d'azotes, ce qui favorisera l'accumulation des lipides (Ykema *et al.*, 1988). La figure ci-dessous présente la courbe classique de croissance que suivent généralement les microorganismes dont les oléagineux (PRESCOTT *et al.*, 1995).

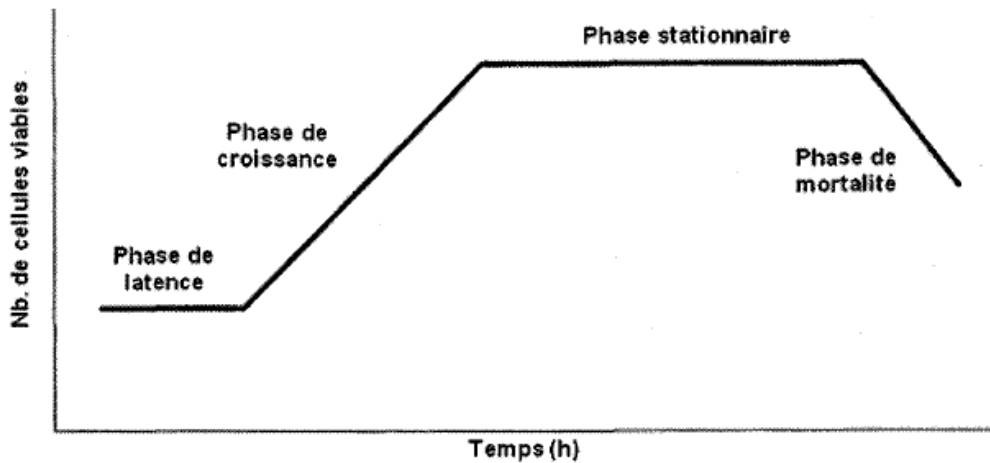


Figure 2 : Courbe de croissance microbienne en mode discontinu (PRESCOTT *et al.*, 1995)

L'ajout de l'inoculum marque le début de la fermentation par une phase dite « de latence » car il y a absence de croissance de la population bactérienne. Cependant, c'est une période d'intenses activités métaboliques où les microorganismes restent très actifs. Les facteurs influençant la période de latence sont divers. A titre d'exemple, la composition chimique du milieu de culture influence la longueur de la phase de latence. La durée de cette phase est aussi allongée lorsque l'inoculum est injecté dans un milieu de culture avec une autre source de carbone. L'âge de l'inoculum représente aussi un facteur clé car lorsque l'inoculum est dans une phase exponentielle de croissance, il permet un temps de latence plus court dans le milieu frais. Aussi, la concentration, la morphologie et la viabilité de l'inoculum sont des paramètres entrant en jeu dans la durée de la phase de latence. Dans le cas de la production de lipides avec comme substrats des boues d'épuration, un inoculum adapté, c'est à dire préparé à base de boues d'épuration est utilisé (Zhang *et al.*, 2014a). Après acclimatation, la population microbienne se divise suivant une fréquence assez croissante jusqu'à atteindre une vitesse maximale de croissance appelée

« μ_{\max} » ou taux de croissance spécifique. À ce stade donc, la croissance logarithmique débute et le nombre de cellules ou la biomasse cellulaire augmente à une vitesse croissante. Puis il est à noter que les cellules croissent en utilisant principalement les sources de carbone et d'azote facilement assimilables (Mathieu Drouin, 2013).

La phase stationnaire signifie que le taux de croissance spécifique des microorganismes commence à chuter jusqu'à ce que le substrat soit complètement épuisé. Les cellules restent métaboliquement actives et dans le cas des microorganismes oléagineux, lorsqu'il y a limitation de nutriments et présence de carbone en excès canalisé en synthèse lipidique, ils commencent à accumuler des lipides (Beopoulos *et al.*, 2011).

Après épuisement total du milieu de toutes sortes de nutriments et de sources de carbones, les microorganismes meurent à taux constant et peuvent parfois subir une lyse cellulaire.

➤ **Influence des paramètres de fermentation**

- **Taux d'aération, d'agitation et transfert d'oxygène**

La capacité d'aération est l'un des facteurs les plus importants à prendre en compte lors des fermentations aérobies (Woodbine, 1959). Ainsi, les fermentateurs doivent être disposés à transférer un maximum d'oxygène dans le milieu afin de ne pas limiter la croissance des microorganismes. Mais afin d'éviter une consommation d'énergie trop excessive, il est convenable d'opérer à un taux pas très élevé (un maximum de 500 tours/min pour la vitesse d'agitation).

Le transfert d'oxygène quant à lui, peut s'avérer limitant dans certains milieux de culture (Ndao, 2014). La figure 3 présente les différentes étapes du transfert d'oxygène

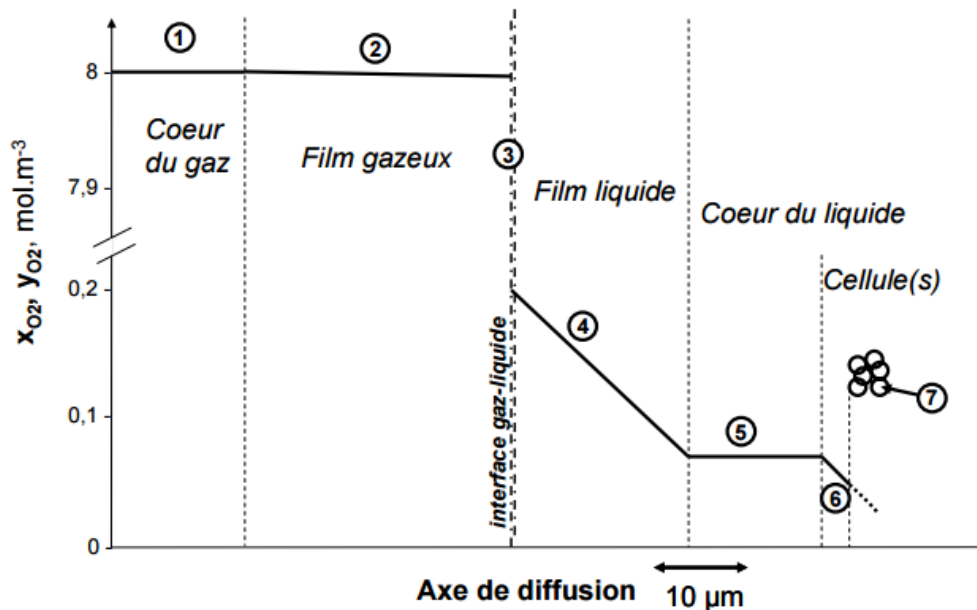


Figure 3 : Schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire en régime stationnaire (Arnold et al., 1958).

Z1 : au sein de la bulle de gaz

Z2 : dans le film gazeux

Z3 : mouvement à travers l'interface gaz-liquide

Z4 : résistance principale au transfert dans le film liquide

Z5 : dans le milieu liquide

Z6 : dans le film liquide autour des cellules

Z7 : dans l'enceinte cellulaire

Aussi, le transfert d'oxygène est fonction du coefficient volumétrique du transfert d'oxygène ($K_L a$). La détermination du $K_L a$ est essentielle dans le but d'établir l'efficacité de l'aération du fermenteur et aussi de pouvoir quantifier les effets des différentes variables opérant dans l'approvisionnement en oxygène. Et donc, plus la valeur du $K_L a$ est élevée, plus la capacité d'aération du système est importante. Le $K_L a$ est aussi utilisé pour la mesure d'autres paramètres tels que le coefficient de transfert d'oxygène (OTR) et le taux de consommation

d'oxygène (OUR). Les paramètres qui affectent le transfert d'oxygène dans un bioréacteur de type « cuve agitée » sont décrits dans le tableau 1.

Tableau 1 : Paramètres affectant le transfert d'oxygène dans un réacteur de type cuve agitée

Paramètres	Effet sur le transfert d'oxygène	Références
Viscosité	La viscosité est la principale différence significative entre les milieux de fermentation commercialisés. Il a été observé que le K_La variait au cours de la fermentation et qu'il dépendait de la viscosité apparente du milieu. L'augmentation de la viscosité fait diminuer les valeurs du K_La .	(Ozergin-Ulgen <i>et al.</i> , 1998) (Humphrey, 1998) (Özbek <i>et al.</i> , 2001)
Température	Une diminution de la solubilité des gaz est observée lors d'une augmentation de la température. Néanmoins le K_La s'accroît suite à une augmentation de la diffusion de l'oxygène dans le liquide. Le taux de transfert de l'oxygène augmente de 15% lorsque la température passe de 20 à 30°C.	(Doran, 1995)
Sels	Pour de fortes concentrations en sels, le K_La et la solubilité de l'oxygène diminuent et	(Käppeli <i>et al.</i> , 1981)

	contribuent à la baisse du transfert de l'oxygène	
Agitation et aération	Le K_La augmente avec la vitesse de rotation des turbines et le taux d'aération. L'influence de la vitesse de rotation sur le K_La est plus importante que celle de l'aération	(Abdel-Hameed, 2001)
Vélocité superficielle	Le K_La augmente significativement pour un accroissement de la vitesse superficielle du gaz. Les petites bulles d'air permettent d'avoir une surface interstitielle plus importante que les grosses bulles d'air. Un autre avantage des bulles est que leur vitesse d'ascension à la surface est plus lente. Elles restent donc plus longtemps dans le liquide accordant plus de temps à l'oxygène pour se dissoudre.	(Doran, 1995) (Juarez <i>et al.</i> , 2001)
Anti-mousse	L'anti-mousse affecte le comportement hydrodynamique des bulles ainsi que le taux de transfert de masse. Une baisse de la tension de surface augmente le diamètre moyen des bulles et fait donc baisser le K_La .	(Al-Masry, 1999)

- **Température et pH de fermentation**

Dans la littérature, le pH et la température représentent des facteurs cruciaux qui agissent, dépendamment du type de milieu de culture, sur la production de lipides par les microorganismes oléagineux (Ageitos *et al.*, 2011, Papanikolaou *et al.*, 2011b). En général, les microorganismes oléagineux sont tolérants à un pH acide et donc produisent plus de lipides avec des pH variant entre 3 et 6 (Kessell, 1968, Sitepu *et al.*, 2014, Turcotte *et al.*, 1989).

La température de fermentation influence l'accumulation de lipides par les microorganismes oléagineux (Hansson *et al.*, 1986, Papanikolaou *et al.*, 2011a, C Ratledge, 1994, Saxena *et al.*, 1998). La littérature révèle que de meilleurs croissances microbiennes sont obtenues sous des températures comprises entre 23 et 33°C ; par ailleurs, les fermentations sont plus favorables et plus économiques lorsqu'elles sont effectuées à une température de 28°C (Papanikolaou *et al.*, 2002).

- **Formation de mousse**

Généralement la mousse est générée en présence d'oxygène injecté à forte concentration durant les fermentations en bioréacteurs. Elle constitue un problème majeur et est d'autant plus importante lorsque le milieu de culture n'est rien d'autre que les boues d'épurations. Les boues d'épurations contiennent en effet des protéines et divers nutriments qui entraînent la formation de mousse. De plus d'après (Barnabé, 2004), ce problème peut être accentué lorsqu'un prétraitement par hydrolyse alcaline est effectué sur les boues avant la fermentation. Aussi, (Yezza, 2005) va plus loin en affirmant que la mousse est difficile à contrôler en présence d'une large quantité de boues avec des concentrations en matières en suspension (MES) supérieures à 25g/L ; ce qui

pourrait mener à un problème de contamination si la mousse sort du fermenteur (Çalik *et al.*, 2005).

Pour éviter ou contrôler la formation de mousse, généralement de l'anti-mousse chimique est utilisé contrairement à l'anti-mousse mécanique qui requiert non seulement une importante quantité d'énergie mais qui s'avère pas être très efficace lorsque les boues d'épuration sont utilisées comme milieu de culture. Mais d'après (Mathieu Drouin, 2013, Huang *et al.*, 2001), l'ajout excessif d'anti-mousse chimique inhibe un bon transfert d'oxygène dans le milieu, affectant ainsi une prolifération bactérienne.

2.2. Problématique de recherche

Le biodiesel apparait comme une énergie qui peut servir soit de substitution, soit d'additif au diesel car il est compatible avec les moteurs à diesel et se caractérise par : renouvelable, biodégradable, et durable. En ce qui concerne les matières premières nécessaires à sa production, les huiles végétales occupent la plus grande proportion (environ 78,5%). Mais étant donné que ces huiles (huiles de maïs, de tournesol, etc) sont principalement utilisées dans le domaine alimentaire, il se pose un problème de priorité. Une augmentation des prix de ces huiles est observée, ce qui rend le biodiesel non compétitif vis-à-vis du diesel conventionnel. Donc la recherche d'une huile à moindre coût s'impose. Des études ont montré que les microorganismes oléagineux ont une croissance rapide et peuvent renfermer des teneurs en lipides allant jusqu'à 70% de p/p. Mais ces microorganismes se cultivent sur des substrats qui restent coûteux (glucose, etc.) ; ce qui maintient la production du biodiesel dans une position non compétitive sur le marché des carburants.

Ultérieurement, la recherche de substrats à moindre coût a abouti à l'utilisation des boues d'épuration et du glycérol brut qui sont respectivement des déchets des stations d'épuration et de l'usine de production de biodiesel. Ces substrats obtenus gratuitement ou à un coût relativement très bas, sont d'après la

littérature des milieux favorables à une croissance rapide des microorganismes oléagineux et donc à l'augmentation de l'accumulation lipidique. Mais les boues d'épuration étant formées par des molécules complexes, des problèmes surviennent quant à leur utilisation ; en fait, elles renferment des métaux lourds, de fortes concentrations en sels, des hydrocarbures aromatiques cycliques, des perturbateurs endocriniens, etc., qui limitent leur biodégradabilité. Cette composition des boues d'épuration affecte négativement la production de lipides par les microorganismes. C'est alors dans ce contexte qui consiste à faciliter l'accès aux nutriments (carbone, azote, etc.) biodisponibles dans les boues d'épuration aux microorganismes que s'inscrit notre projet de recherche.

3. OBJECTIFS ET ORIGINALITÉ DE LA RECHERCHE

3.1. Objectifs

L'objectif principal de cette étude de recherche réside dans l'amélioration de la production de lipides par *Trichosporon Oleaginosus* (*T.O*) en utilisant comme substrats des boues d'épuration secondaires et du glycérol brut. Il existe aussi des objectifs spécifiques que nous pouvons énumérer comme suit :

- d'appliquer différents traitements sur les boues afin d'accroître leur biodisponibilité en éléments nutritifs utilisables par les microorganismes pour une meilleure accumulation de lipides ;
- d'étudier l'effet de l'ajout de solution de glycérol brut sur la production de lipides par les microorganismes ;
- d'étudier l'influence du taux de consommation d'oxygène (OUR), du taux de transfert d'oxygène (OTR) et du coefficient volumétrique du transfert d'oxygène (K_{La}) sur la production de lipides.

3.2. Originalité

Cette étude permettra pour la première fois d'une part de comparer des boues lavées et non lavées pour la production de lipides. D'autre part, l'utilisation du glycérol brut comme source de carbone supplémentaire à ces boues lavées est une innovation.

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1. Source microbienne

Trichosporon Oleaginosus ATCC 20509 est la levure qui a servi dans ce travail de recherche. Elle est cultivée sur des plaques de gélose tryptique soja pendant 24h à 30 ± 1 °C et conservée plus tard à une température de 4 °C. *T. Oleaginosus* ATCC 20509 est ensuite repiquée et striée sur des plaques de gélose d'extrait de malt (7,5g d'extrait de malt et 7,5g d'agar) et est conservée à 4°C.

4.2. Échantillonnage et préparation des boues d'épuration secondaires (milieu de croissance)

La station d'épuration EST (STEP - EST) de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ) est le lieu de collecte des boues secondaires ayant servies dans ce projet. Les boues sont donc recueillies par une vanne provenant des bassins de décantation des eaux de lavage des biofiltres (traitement secondaire ayant servi à épurer les eaux usées).

A la suite de l'étape d'échantillonnage, les boues sont conservées dans la chambre froide à 4°C pendant 24h afin d'éviter qu'elles se dégradent. La concentration en matières en suspension (MES) obtenue après décantation des boues par gravité varie de 15 à 23 g/L, ce qui est relativement faible. Pour

atteindre les concentrations désirées, les boues sont centrifugées à une vitesse de 3000g pendant 5 minutes et la concentration en MES obtenue varie de 90 à 120 g/l. Elles sont ensuite diluées dépendamment du type de boues (lavées, non lavées, centrifugées) et de la concentration en MES voulue (30, 35 et 40 g/l). Le tableau 2 présente les caractéristiques générales des boues, juste après décantation

Tableau 2 : Composition typique des boues d'épuration secondaire

Paramètres	Boues secondaires
Solides Totaux (ST) (g/l)	25,36±0,95
Matières en Suspension (MES) (g/l)	20,7±0,39
Solides en Suspension Volatils (SSV) (g/l)	15,5±1,02
Carbone Total (CT) (mg/l C)	421±15,19
Azote Total (AT) (mg/l A)	49,91±2,38
Phosphore Total (PT) (mg/l P)	28,76±0,83
pH	6.42±0,01

4.3. Prétraitement des boues d'épuration secondaires

4.3.1. Boues non lavées

Après centrifugation à 3000g pendant 5 minutes, la concentration en MES des boues est assez élevée. Alors les boues centrifugées sont mixées (diluées) avec celles obtenues juste après décantation par gravité pour atteindre la concentration de matières en suspension (MES) désirée.

4.3.2. Boues lavées

Juste après l'étape de décantation par gravité, les boues (séparées du surnageant) sont centrifugées à 3000g pendant 5 minutes. Le surnageant contenu dans les tubes à centrifugation est jeté tandis que le culot de boues est lavé avec de l'eau du robinet, puis centrifugé à nouveau. Ce processus est réalisé deux fois afin de s'assurer que le maximum de salinité et de métaux lourds adsorbant est enlevé des parois extracellulaires des boues. A la fin, les boues sont diluées avec de l'eau de robinet afin d'obtenir les concentrations de MES désirées.

4.3.3. Boues centrifugées

Les boues obtenues après décantation gravitationnelle sont centrifugées à 3000g pendant 5 minutes puis vu leur concentration élevée, elles sont mixées (diluées) avec l'eau du robinet afin d'obtenir les concentrations de MES désirées.

4.3.4. Prétraitement thermo-alcalin

Avant chaque fermentation, les boues, soient non lavées, lavées ou centrifugées selon les expériences, sont toutes soumises à un prétraitement thermo-alcalin qui consiste à l'ajustement du pH et au passage des boues à l'autoclave. Ainsi, le pH des boues, initialement de $5,7 \pm 0,01$ est ajusté à 12 grâce à de l'hydroxyde de sodium (4M NaOH) puis stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Ce prétraitement est réalisé afin de s'assurer que toutes les bactéries contenues dans les boues sont mortes tout en rendant les boues solubles (68% de boues solubles après stérilisation). Ce processus permettra également aux nutriments contenus dans ces boues d'être facilement assimilables par la souche bactérienne qui sera ingérée ultérieurement.

4.4. Condition et préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum (10% du volume de boues à fermenter) se fait en deux étapes : le milieu de pré-culture et le milieu de boue.

4.4.1. Milieu de pré-culture (étape - 1)

Une boucle de *T. Oleaginosus* préalablement subculturée sur les plaques de gélose d'extrait de malt est utilisée pour inoculer un erlenmeyer d'un litre contenant 250ml d'un milieu YPD (10 g/L d'extrait de levure, 20 g/L peptone et 20 g/L glucose) stérilisé à 121°C pendant 15 minutes. Après inoculation dans des conditions propices (sous hotte afin d'éviter des contaminations), l'erlenmeyer est agité à 170 tours/minutes et à 28°C pendant environ 24h. La figure ci-dessous est une photographie du milieu de pré-culture.



Figure 4 : Milieu de pré-culture (photo prise par IDOSSOU Vital, le 24-05-2015)

4.4.2. Milieu de boue (étape-2)

25 g du milieu YPD a été ajouté à un volume de 900 ml de boues (non lavées, lavées ou centrifugées) contenu dans un erlenmeyer de 4L et ayant la concentration en matières en suspension désirée (30, 35 ou 40 g/L). L'ajout du milieu de croissance YPD est fait afin de favoriser la croissance de notre souche bactérienne *T. Oleaginosus*. Après avoir été mélangées avec le YPD, les boues sont stérilisées à 121°C pendant 15 minutes puis laissées pour refroidir à température ambiante. Ensuite, le milieu de boues est inoculé avec le milieu de pré-culture (ratio de 10% v/v) qui correspond dans notre cas à 1L puis porté à l'incubation dans l'agitateur à 170 tours/min et à 28°C pendant environ 24h. Après incubation, ce milieu de boues a été utilisé comme inoculum pour la fermentation.

4.5. Technique de de fermentation

4.5.1. Description des bioréacteurs

Deux bioréacteurs de 15 L de volume dont 10 L comme volume de travail ont servi à réaliser toutes les fermentations. Ces bioréacteurs sont gérés par un logiciel (iFIX 3.5 Intellution, USA.) installé dans un ordinateur de bureau. Dans l'espace de travail de ce logiciel, des paramètres comme l'antimousse, le taux d'aération, l'agitation, le pH, la température, l'oxygène dissous reliés directement à ces bioréacteurs sont contrôlés automatiquement ou manuellement via un Programmable Logic Control (PLC) system, en fonction des besoins. Les bioréacteurs disposent d'une sonde de pH, d'une sonde d'oxygène dissous, d'une valve pour l'entrée de l'air, etc. La figure ci-dessous montre le dispositif expérimental des fermentations.

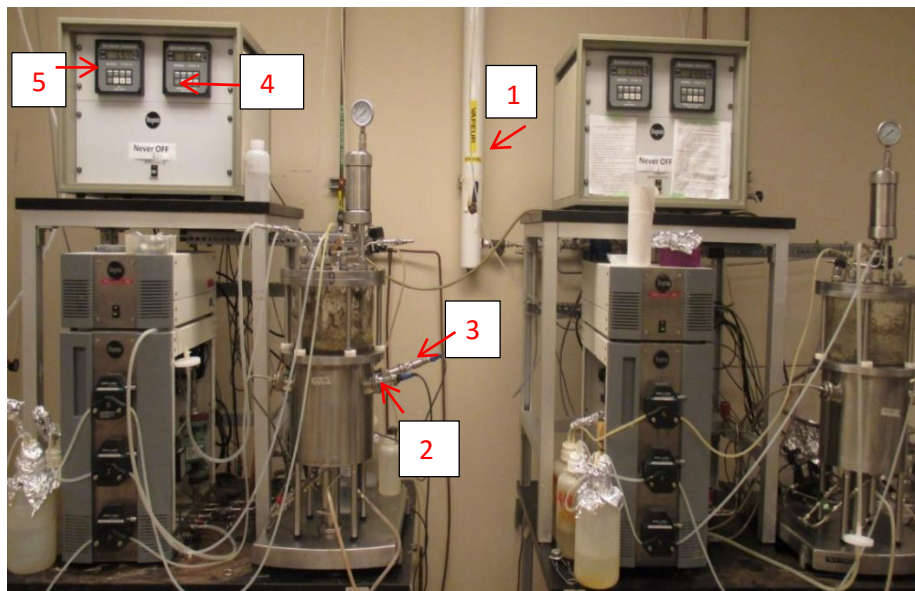


Figure 5 : Bioréacteurs de 15L et leurs équipements (photo prise par Vital IDOSSOU, le 31-03-2015)

Légende :

- | | | |
|------------------------|--------------------|---------------|
| 1 : Condensateur d'eau | 4- Afficheur d'OD | 3- Sonde d'OD |
| 2- Sonde de pH | 5- Afficheur de pH | |

4.5.2. Technique de fermentation

Toutes les séries de fermentations ont été réalisées dans des bioréacteurs de 15L (Biogénie®) équipés d'accessoires de mesures ainsi qu'un système de Contrôle Logique Programmable (PLC) pour assurer l'analyse, le contrôle et le suivi de paramètres comme l'Oxygène Dissous (OD), le pH, l'anti-mousse, l'agitation, le taux d'aération et la température. Le logiciel (iFix 3.5 Intellution, USA) permet le contrôle automatique et l'intégration de tous les paramètres susmentionnés à partir du PLC.

Le volume utile de travail dans chaque bioréacteur étant de 10 L. Mais environ 9L de boues à fermenter ou parfois 8,5 L (dans les cas où il y a ajout de glycérol) sont ajoutés en premier pour la stérilisation. Avant de commencer chaque stérilisation, les sondes de pH (Mettler Toledo, USA) sont calibrées en utilisant une solution tampon de pH=4 puis de pH=7 (VWR, CANADA). La sonde de OD

est calibrée à 0 puis à 100% (saturation d'air) en utilisant respectivement du Na_2SO_3 (sulfite de sodium) et de l'eau oxygénée. Après remplissage des bioréacteurs par les boues, du propylène glycol (PPG, Sigma- Canada) avec 0,1% v/v (0,1ml dans 99,9ml de boues) a été ajouté comme antimousse afin de réduire la formation de mousses lors de la stérilisation. Le processus de stérilisation s'opère alors à 121°C pendant 20 minutes. Après que le bioréacteur soit refroidi à 28°C (température de fermentation), la sonde d'OD est à nouveau calibrée à 100%. Le pH des boues étant de 12 avant stérilisation, il est ramené à 6,5 (pH de fermentation) avec la solution d'acide sulfurique. Dépendamment du type d'expérience à réaliser, du glycérol brut (stérilisé à 121°C pendant 15 minutes) est ajouté comme source supplémentaire de carbone dans le bioréacteur sous des conditions aseptiques afin d'éviter toute contamination bactérienne. Pour avoir une solution homogène, les boues sont mixées (dans le cas d'ajout de glycérol) en mettant l'agitation à 300 tours/minutes (300 rpm). Après mixage et toujours sous conditions stériles, le milieu de boues qui constitue l'inoculum (volume d'un litre) préalablement préparé est ajouté dans le bioréacteur ; ce qui marque ainsi le début du temps de fermentation.

Au début de la fermentation, les valeurs minimales du taux d'aération et d'agitation sont respectivement de 1L/minute et 300 tours/minutes ; ceci permet de garder la valeur de l'OD supérieure à 60%. Au cours de la fermentation, ces deux paramètres sont régularisés manuellement sur l'ordinateur. Ils sont augmentés au besoin avec un maximum de 9L/minute pour le taux d'aération et un maximum de 500 rpm pour l'agitation afin de garder la valeur de l'OD toujours au-dessus de 30%. La température de la fermentation (28°C) est maintenue constante grâce à l'eau recirculée automatiquement dans les gaines des bioréacteurs. Les valeurs de pH qui fluctuent sont ramenées automatiquement au pH de fermentation $6,5 \pm 0,1$ en ajoutant du 4M NaOH ou du 4M H_2SO_4 par un système de pompes relié directement à l'ordinateur.

La prise d'échantillon se fait toutes les huit heures en duplicata dans des flacons de 50 ml et un seul échantillon dans les flacons de 10 ml. Ceux de 50ml servent à déterminer la concentration en MES, en glycérol (s'il y a lieu), la teneur en

lipides et ceux de 10 ml servent à déterminer principalement la concentration en cellules totales. Le processus de fermentation est arrêté généralement à 53h afin de donner une marge car d'après (Zhang *et al.*, 2014b) la concentration maximale de lipides est accumulée après 48h de fermentation. Ensuite, environ 5 L du bouillon de fermentation est également prélevé et mis dans la chambre froide à 4°C pour de futures analyses.

4.5.3. Calcul du K_{La} , de l'OTR et de l'OUR

La détermination du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K_{La}) pour chaque expérience en fermentation est essentielle dans le but d'établir l'efficacité de l'aération et des variables opérant sur la provision d'oxygène. Le K_{La} a été calculé par une méthode dynamique de dégagement gazeux (gassing-out) (Bello *et al.*, 1985). Cette méthode consiste donc à fermer la valve d'aération et à relever à chaque 10 secondes la valeur de l'OD en chute. Lorsque la valeur de l'OD atteint 30%, la valve est ouverte puis les valeurs sont notées également chaque 10 secondes jusqu'à stabilisation. La prise de K_{La} se fait pour la plupart du temps avant chaque échantillonnage.

Les équations suivantes permettent de calculer le K_{La} , l'OTR et l'OUR :

$$dC_L / dt = K_{La}(C^* - C_L) = OTR + OUR \quad ; \quad OTR = K_{La}(C^* - C_L) \quad ; \quad OUR = xQO_2$$

X : Concentration en MES ;

OTR : Taux de Transfert d'Oxygène (mmol/l/h) ;

OUR : Taux de Consommation d'Oxygène (mmol/l/h) ;

$xQO_2 = OUR$ et est donnée par la pente de la droite d'équation entre le temps et les valeurs de l'OD (off) ;

K_{La} : Coefficient Volumétrique de Transfert d'Oxygène (mmol/l/h).

C^* : Constante de solubilité de l'oxygène dans le milieu (mmol O_2/L)

C_L : Concentration de l'oxygène dissous dans le milieu (mmol O_2/L)

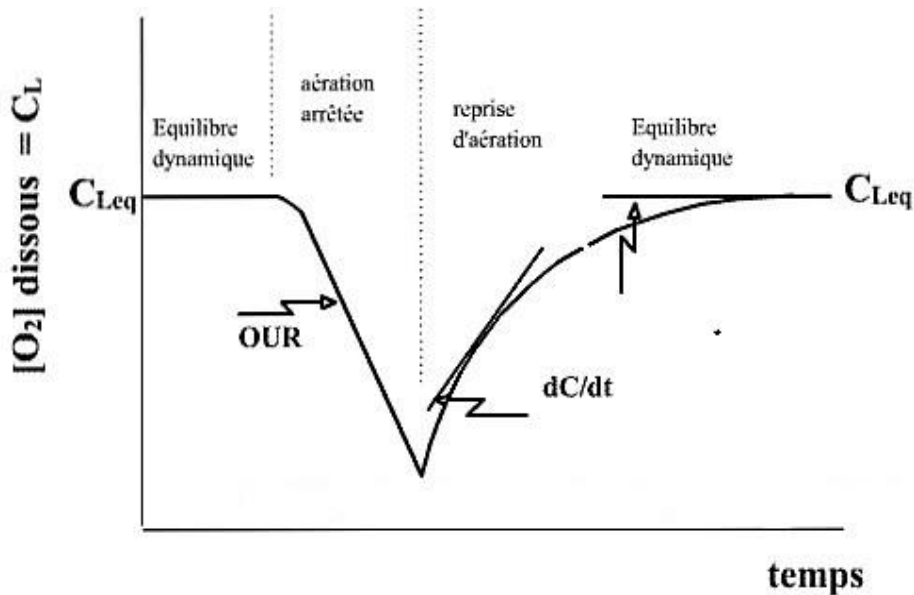


Figure 6 : Schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire d'après (Arnold et al., 1958).

4.5.4. Estimation de la concentration des boues en matières en suspension

La détermination de la concentration en MES a été réalisée en plusieurs étapes. La première se fait en ajoutant 20ml d'eau distillée à 10ml de chaque échantillon de boues qui est ensuite centrifugé à 8000 g pendant 10 minutes et débarrassé du surnageant (faire attention à ne pas jeter les solides). La seconde consiste à ajouter 30 ml d'eau distillée au culot obtenu après centrifugation, qui est ensuite lavé, centrifugé et débarrassé de son surnageant. Cette étape se fait en deux fois. Le culot final est alors mis dans une coupole pré-pesée en aluminium et est porté au four à 105° C pendant 24h.

Le calcul des MES se fait par la différence de poids entre la coupole à vide et après séchage qui est ensuite divisée par le volume initial de boues (voir équation ci-dessous) selon (APhA, 1985).

$$\text{MES (g/l)} = \frac{\text{Poids final (g)} - \text{Poids à vide (g)}}{\text{Volume initial (l)}} \times 1000$$

4.5.5. Estimation de la concentration en cellules totales (énumération des cellules totales)

Elle est faite en comptant les Unités Formant des Colonies (CFU) sur des plaques de gélose d'extrait de malt et d'agar. Pour chaque échantillon, des séries de dilution sont faites (10^{-1} – 10^{-7}) dans sept différents tubes en verre, chaque tube contenant 4,5ml de NaCl (0,85%) est préalablement stérilisé. Ainsi, 0,5ml d'échantillon de boues fermentées est prélevé et injecté dans le premier tube de la série contenant 4,5ml de NaCl. Après mixage grâce au vortex, 0,5ml du mélange est prélevé et injecté dans le second tube jusqu'au septième tube (voir figure 7).

Après la série de dilution, un volume de 0,1ml est prélevé des tubes 5, 6, 7 et ensuite versé respectivement sur des plaques. Le temps d'incubation de ces plaques est d'environ 24h à 28°C. Pour le comptage, comme le montre la figure 8 uniquement les boîtes de pétri avec un nombre total de colonie entre 30 et 300 sont considérées comme valides. Les résultats sont exprimés en CFU/ml suivant la relation suivante :

$$\text{Concentration des cellules} = 10^n \times (M/0,1)$$

n = numéro du tube ;

M = nombre de cellules du tube sur la plaque.

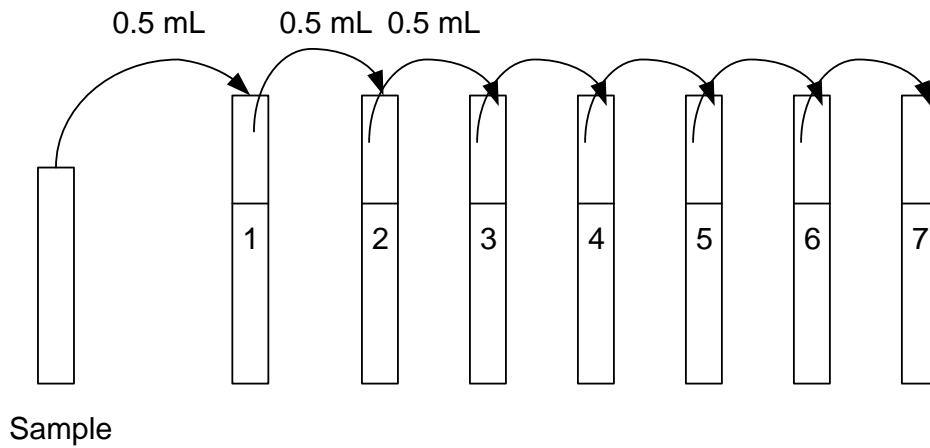


Figure 7 : Principe de dilution pour l'estimation de la concentration des cellules totales

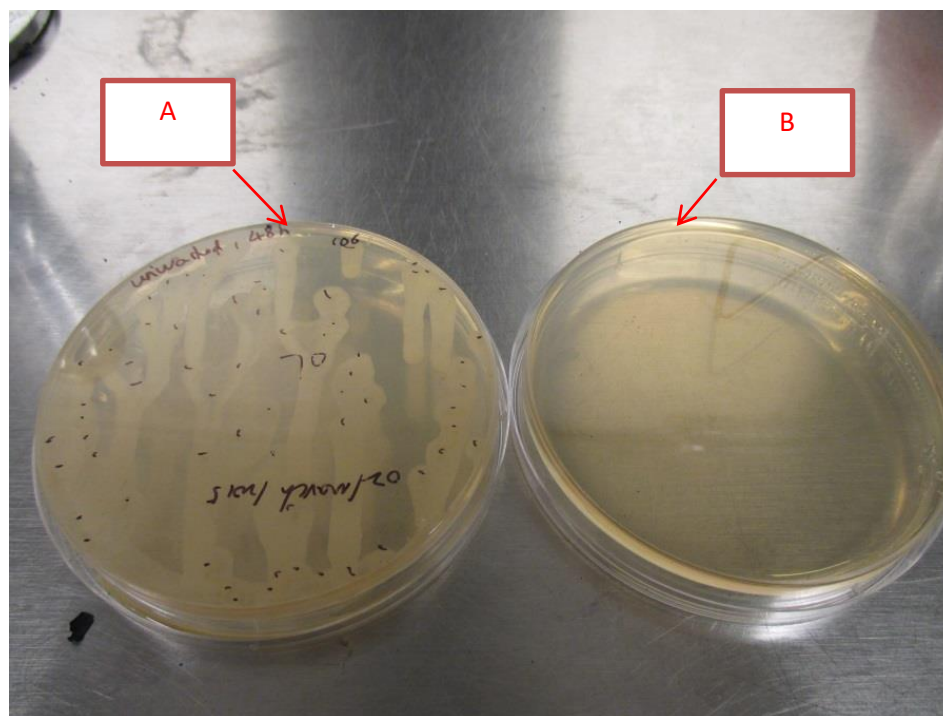


Figure 8 : Estimation des colonies formées sur les plaques (photo prise par Vital IDOSSOU, le 2015-11-04)

Légende :

A : Comptage de colonies formées sur la plaque

B : Plaque vide

4.5.6. Détermination de la teneur et de la concentration en lipides dans les boues

La détermination de la teneur en lipides est un long processus qui est principalement constitué de deux extractions, lesquelles se déroulant à partir du culot obtenu après centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes et lavage (en deux fois) de 30 ml d'échantillon de boues avec de l'eau distillée. Dans un premier temps, 30 ml de chloroforme/méthanol (2:1 v/v) est ajouté à chaque culot puis transféré dans un tube de 50 ml contenant 6 ml de perles de Zirconia. Ensuite, tous les tubes sont agités grâce à un agitateur pendant environ 12 heures. À la fin, les tubes sont centrifugés et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Dans un second temps, le même culot est suspendu à nouveau dans du chloroforme/méthanol (1:1 v/v). Les tubes sont ensuite agités pendant environ 3 h. Les solutions obtenues lors des deux extractions (2:1 v/v et 1:1 v/v) sont filtrées ensemble dans un tube auquel une infime quantité d'eau est ajoutée. Par la suite, les tubes contenant les solutions filtrées, sont centrifugés et trois couches sont facilement observables. Les deux premières couches qui ne sont rien d'autre que de l'eau et des solides respectivement, sont prélevées et jetées grâce à une pipette. La solution restante est alors transférée dans un tube en verre pré-pesé et portée au four à 60°C pour évaporation jusqu'à l'obtention d'un culot avec un poids constant.

La teneur en lipides est calculée de la manière suivante :

$$\text{Teneur en lipides} = (P_b - P_a) / (\text{MES} \times V)$$

P_b : Poids du tube après évaporation (g).

MES : Concentration en matières en suspension (g/l).

P_a : Poids initial du tube (g).

V : volume de boues (L).

La détermination de la concentration en lipides (g/l) se fait de la manière suivante :

$$\frac{\text{Teneur en lipides (\%)} \times \text{MES (g/l)}}{100}$$

4.5.7. Processus de transestérification des lipides

Après obtention de lipides, la transestérification a permis la conversion en biodiesel. Ainsi la procédure adoptée dans ce travail est la même que celle décrite dans (Zhang *et al.*, 2014a). Dans un premier temps, les lipides issus de l'extraction sont en premier dissous dans de l'hexane (20 ml d'hexane par gramme de lipide) puis, 40 ml d'un mélange méthanol/acide sulfurique à 1% est ajouté. Le mélange est soumis par la suite à 50°C pendant 12h, puis après la réaction, une solution de chlorure de sodium NaCl à 5% p/p est ajoutée (100 ml/g de lipides). Le biodiesel (FAMES) est ainsi extrait en lavant la solution avec de l'hexane (100 ml/g de lipides) en deux fois. La partie supérieure après lavage est recueillie dans des flacons dédiés à cet effet.

Le biodiesel contenu dans l'hexane a donc été analysé par chromatographie en phase gazeuse liée à la spectroscopie de masse (GC-MS) (Perkin Elmer, Clarus 500). Tous les échantillons ont été faits en duplicatas.

5. RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.1. Les boues lavées, non lavées, centrifugées avec différentes concentrations en matières en suspension et leurs impacts sur l'accumulation de lipides par *Trichosporon Oleaginosus*.

5.1.1. Expériences sans ajout de glycérol

Plusieurs expériences ont été menées lors de cette étude. Les premières furent celles avec des boues non lavées et lavées sans ajout de glycérol afin d'identifier celles qui favorisent une meilleure accumulation lipidique. Ce qui nous permettrait d'être en mesure de les optimiser.

➤ **Variation des concentrations en matières en suspension (MES) des boues au cours de la fermentation.**

En général, il est bon de savoir que les MES sont l'ensemble des cellules de microorganismes et des matières en suspension dans les boues. Puis au cours de la fermentation, il y a une première phase où les MES des boues croissent mais ensuite commencent à chuter ; ceci serait dû à la disponibilité des nutriments qui s'épuisent à un moment donné. Alors les microorganismes s'attaquent aux différentes sources de carbones, ce qui nécessite qu'ils fournissent beaucoup d'énergie, d'où la chute des MES (Zhang *et al.*, 2014a). La figure 9 montre les variations des MES dans les différents types de boues au cours des fermentations.

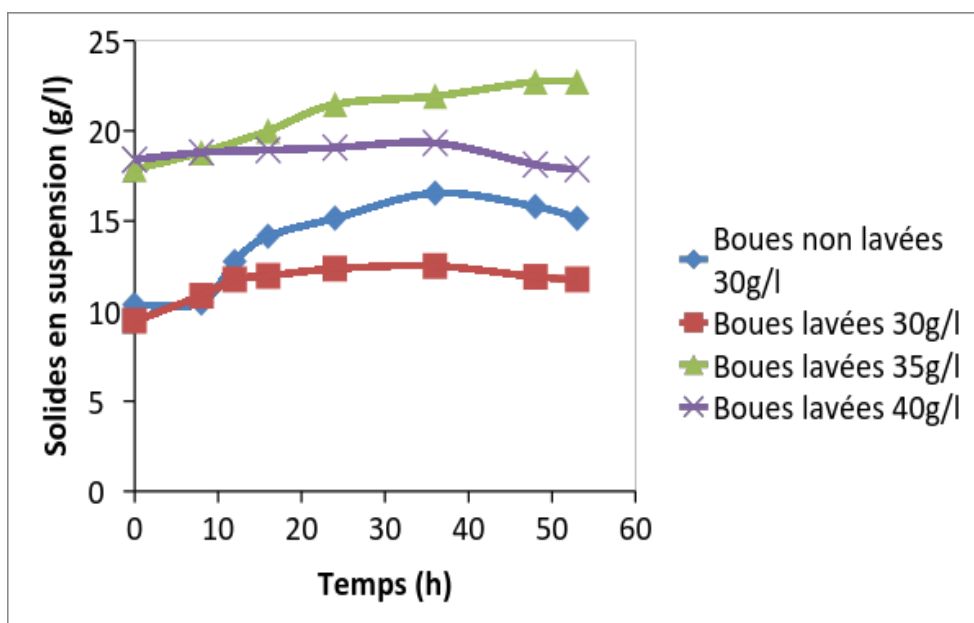


Figure 9 : Profil des MES pour les différents types de boues

Après stérilisation, c'est-à-dire à 0h les MES des boues non lavées et lavées à 30g/l sont passées respectivement à 10,35g/l et à 9,35g/l. Il y a donc eu plus de matières solubilisées dans le cas des boues lavées. Ainsi le fait que les boues furent lavées donc débarrassées d'éventuels débris et composés lourds a permis à ce qu'il y ait plus de solubilisation. Pareillement, à 48h de fermentation les MES des boues non-lavées sont élevées en comparaison avec les boues lavées à 30g/l (16,55g/l > 12,55g/l). Ceci s'explique aisément par la présence d'autres résidus (métaux lourds, autres déchets, etc.) dans les boues, augmentant ainsi leur poids. Alors que ces résidus sont enlevés lorsque les boues sont lavées. De plus, dans les boues lavées, les quelques micronutriments collés sur la biomasse ou présents dans la phase liquide sont aussi lavés ; ceci implique donc qu'ils ne sont plus disponibles pour la croissance de *Trichosporon Oleaginosus*. C'est pourquoi la croissance et la biomasse sont relativement faibles en comparaison avec les boues non lavées.

Tableau 3 : Variation des matières en suspension pendant le lavage et la stérilisation

Concentration des boues en MES avant lavage et stérilisation (g/L)	Concentration en MES après lavage et stérilisation (g/L)	Concentration en MES après lavage et stérilisation (g/L)
30	30	9,45
35	35	17,87
40	40	18,40

Tableau 4 : Valeurs obtenues des boues lavées et non-lavées avec différentes concentrations initiales en MES

Concentration MES initial à (g/L)	Boues lavées ou non-lavées	Concentration des MES après inoculation (t=0) (g/L)	Concentration des MES après fermentation (g/L)	CFU finale (CFU/mL)	Lipide, t=0 (g/L)	Lipide fin de fermentation (g/L)
30	lavées	9,45	11,75	1,03E+09	0,94	3,27
30	Non-lavées	10,35	15,15	2,5E+09	1,02	4,16
35	lavées	17,87	22,73	6,00E+09	1,59	6,23
40	lavées	18,40	17,87	1,17E+09	1,5	4,54

➤ **Croissance des microorganismes à différentes concentrations en MES des boues lavées et non lavées**

Lorsque les MES initiales des boues passent de 35 à 40g/l, il est à remarquer que les matières en suspension sont plus élevées (maximum de 22,73g/l) dans le cas des boues à 35 g/l. En effet, il a été rapporté que “ les nutriments disponibles augmentent avec la concentration initiale des solides en suspension dans les boues”. Donc, la concentration des nutriments est dans l’ordre $30 < 35 < 40$ g/l ; mais aussi lorsque la concentration en nutriments dépasse une certaine valeur, cela devient une inhibition pour le milieu de boues ; c’est-à-dire l’activité bactérienne pourrait être inhibée avec la quantité élevée d’azote contenue dans les boues. De plus, mis à part leurs importants nutriments tels que le carbone et l’azote, les boues d’épuration contiennent également des substances toxiques telles que les métaux lourds, les perturbateurs endocriniens, etc., qui peuvent inhiber la croissance des microorganismes (Zhang *et al.*, 2014a).

La figure 10 ci-dessous montre l’évolution des cellules totales dans les boues lavées à 35 et 40 g/l.

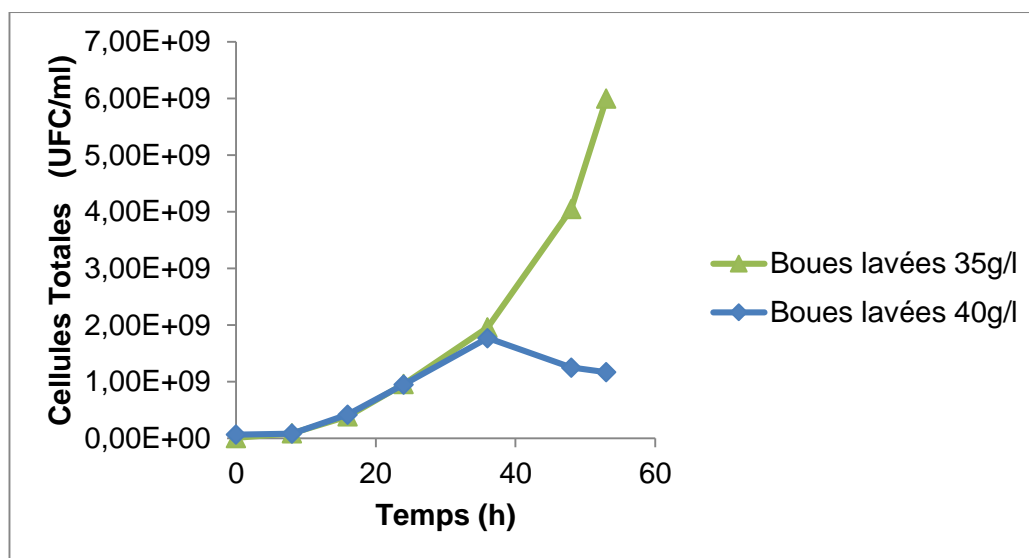


Figure 10 : Évolution des cellules totales au cours des fermentations avec des boues lavées à 35 et 40 g/l

Les résultats de la figure 10 montrent une croissance bactérienne beaucoup plus importante au niveau des boues lavées à 35g/l. À 48h de fermentation, le nombre de cellules totales est de 4.05E+09 CFU/ml ; par contre il n'est que de 1.25E+09 CFU/ml dans le cas des boues lavées à 40 g/l. Ce qui vient confirmer les explications ci-dessus mentionnées. Ainsi donc, d'après les résultats obtenus, nous pensons que les boues lavées à 35 g/l permettent une meilleure croissance bactérienne.

➤ **Production de lipides par les microorganismes des boues lavées et non-lavées**

Le tableau 5 ci-dessous présente les concentrations en lipides obtenues après 48h de fermentation pour les différents types de boues ainsi que les différentes concentrations sans ajout de solution de glycérol.

Tableau 5 : Caractéristiques des différents types de boues sans ajout de glycérol après 48h de fermentation

Types de boues	Temps (h) de fermentation	MES (g/l)	Teneur en lipides (% de p/p)	(max concentration de lipides g/L)
Boues non-lavées 30g/l	48	15,8	28,90	4,56

Boues lavées 30g/l	48	11,9	30,22	5,7
Boues lavées 35g/l	48	22,73	28,34	6,44
Boues lavées 40g/l	48	18,13	26,76	4,85

En comparant les boues lavées et non lavées à 30 g/l, ce tableau 5 révèle en terme d'accumulation de lipides que la teneur la plus élevée est présente dans les boues lavées (30,22% p/p) après 48h de fermentation. Il est donc probable ici que les métaux lourds, les sels, ou les composés toxiques inhibent la production de lipides dans le cas des boues non lavées (28% de p/p). Aussi, le passage des MES de 30 à 35g/l a permis d'accroître parallèlement la concentration en lipides (de 3,6 à 6,44 g/l, respectivement). L'augmentation des MES a favorisé une plus grande quantité disponible en nutriments. Les figures ci-dessous présentent les teneurs en lipides et les concentrations en lipides respectivement pour chaque type de boue avec les concentrations en MES correspondantes en fonction du temps.

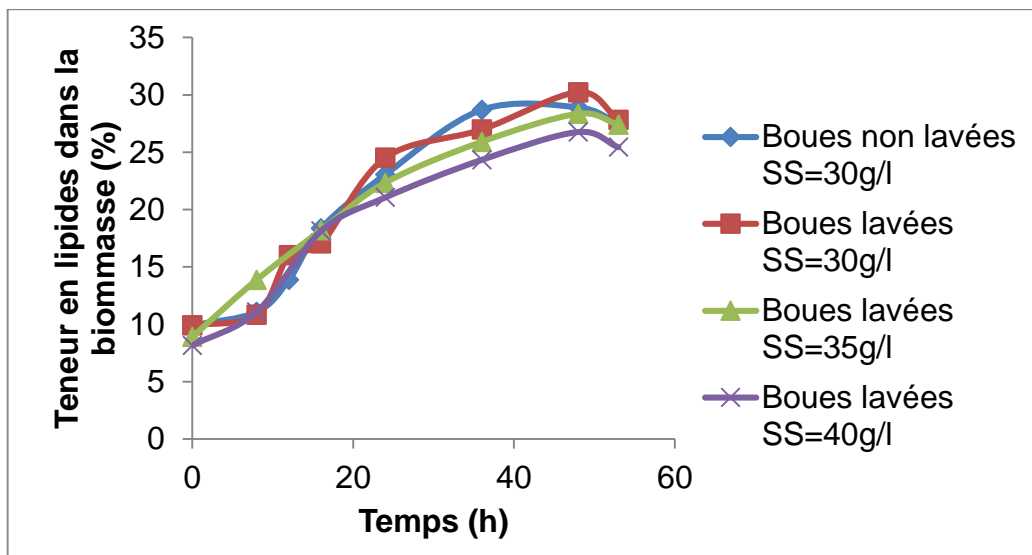


Figure 11 : Effet de la concentration en solides en suspension et du type de boues (lavées ou non lavées) sur la teneur en lipides dans la biomasse

Généralement, de 0 à 48h de fermentation, l'accumulation de lipides augmente graduellement mais commence à baisser ensuite après 48h. En fait, ce serait probablement dû à l'épuisement des nutriments disponibles y compris les sources de carbone. Ainsi, les microorganismes afin de se maintenir et continuer leurs activités, commencent à consommer leurs propres matières grasses, d'où l'observation d'une réduction de l'accumulation en lipides vers la fin des fermentations (Zhang *et al.*, 2015).

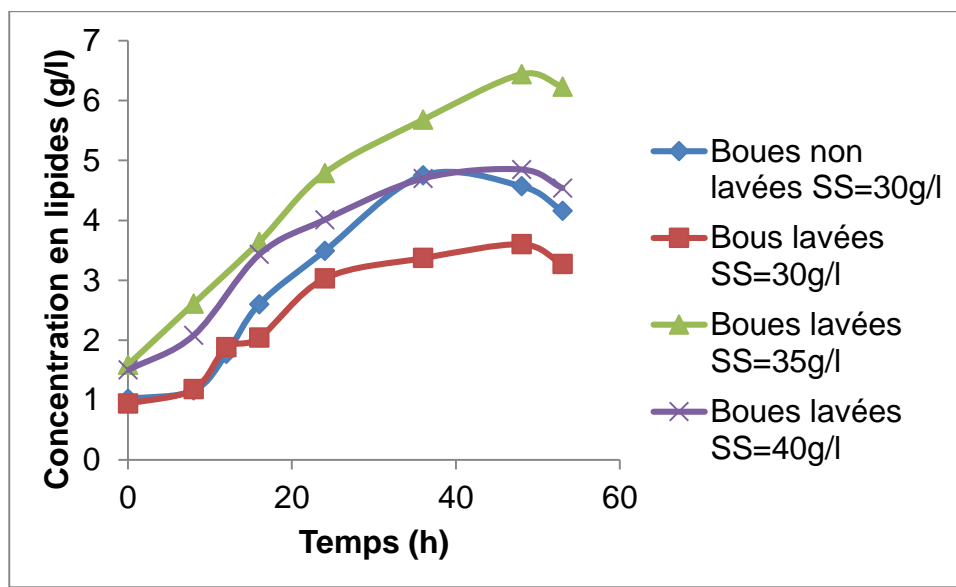


Figure 12 : Effet de la concentration en solides en suspension et du type de traitement des boues (lavées ou non-lavées) sur la concentration en lipides

5.1.2. Effet de l'ajout de solution de glycérol brut sur l'accumulation de lipides par *Trichosporon Oleaginosus*.

➤ Choix du glycérol brut pour la fortification des boues d'épuration.

Comme mentionné dans la revue de littérature, la solution de glycérol est un sous-produit de l'industrie de fabrication du biodiesel et est produit en quantité abondante (pour 100kg de biodiesel produit, 10kg de glycérol brut sont formés). Aussi, il a été également rapporté qu'elle peut être une source de carbone pour des processus de biotransformation, palliant ainsi aux problèmes de gestion qu'elle génère. Mais à cause des impuretés qu'elle renferme (savon, méthanol, eau, sels inorganiques, métaux lourds, etc.) qui pourraient inhiber la croissance des microorganismes et donc la production de lipides, elle est la plupart du temps utilisée comme co-substrat, c'est-à-dire en complément à une source de carbone plus fiable.

C'est, dans le but d'améliorer la production de lipides par *Trichosporon Oleaginosus*, que nous avons eu recours, lors de cette étude, à l'ajout de la

solution de glycérol brut. Cette solution a été utilisée comme source de carbone additionnelle afin de fortifier le milieu de boues utilisé dans la fermentation.

Le tableau 6 ci-dessous présente la caractérisation de la solution de glycérol utilisée dans ce projet.

Tableau 6 : Composition de la solution de glycérol utilisée

Constituants	Teneur en % (p/p)	Concentration
Glycérol	78,3	783g/l
Méthanol	1,28	12,8ml/l
Savon	2,4	24g/l
Eau	2,48	24,8ml/l
Catalyseur	0,12	1,2g/l

➤ **Effet de l'ajout de la solution de glycérol brut sur la variation de MES et de l'accumulation en lipides**

D'après les études précédentes, les boues lavées à 35 g/l ont été choisies comme étant les plus aptes à produire d'importantes quantités de lipides. De ce fait, du glycérol comme source additionnelle de carbone a été ajouté avec une concentration de 40 g/l. Afin de pouvoir faire des comparaisons, des expériences parallèles ont été menées. Ainsi, des boues lavées à 40g/l de MES plus 50g/l de glycérol (B1) et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol (B2) ont été utilisées. Les résultats ont montré que les boues B1 génèrent les concentrations en lipides les plus élevées (20,4g/l). Les figures 13 et 14 montrent respectivement l'évolution des MES, la variation de la concentration en glycérol

et l'accumulation de lipides au cours des fermentations avec les différents types de boues précédemment mentionnés.

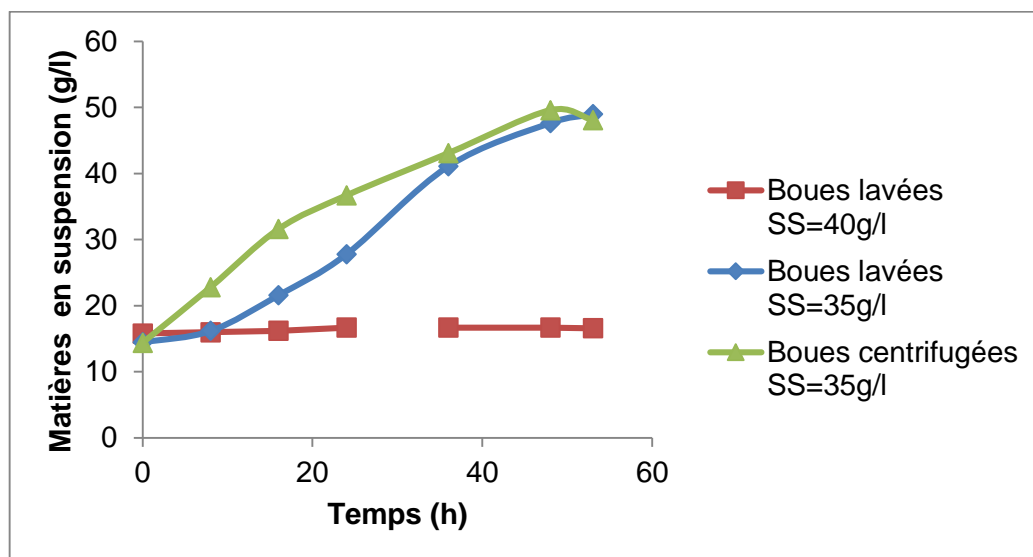


Figure 13 : Étude comparative de la variation des solides en suspension au niveau des boues lavées 35g/l plus 40g/l glycérol, boues lavées 40g/l plus 50g/l glycérol et les boues centrifugées 35g/l plus 40g/l de glycérol

La figure 13 nous révèle que tout au long de la fermentation, les concentrations en MES dans les boues lavées à 40g/l avec 50g/l de glycérol sont relativement faibles et que l'excès de nutriments (MES élevées et concentration en glycérol élevée) dans le milieu peut inhiber la croissance bactérienne. De plus, pour une meilleure accumulation lipidique, il faudrait arriver à une phase au cours de la fermentation où l'azote soit en déficit dans le milieu (Evans *et al.*, 1984a).

En ce qui concerne les boues centrifugées, elles présentent des concentrations en MES les plus élevées à 48h de fermentation (49,6g/l). Cela s'explique par le fait qu'il y a probablement présence d'autres composés dans les boues qui augmentent le poids étant donné qu'elles n'ont pas été lavées mais juste débarrassées du surnageant. Il est à remarquer que la concentration en MES n'est pas équivalente à l'accumulation lipidique. Les figures 14 et 15 ci-dessous

nous donne un meilleur aperçu car bien que les boues lavées présentent de plus faibles concentrations en MES, elles permettent cependant une meilleure accumulation lipidique (20,4g/l).

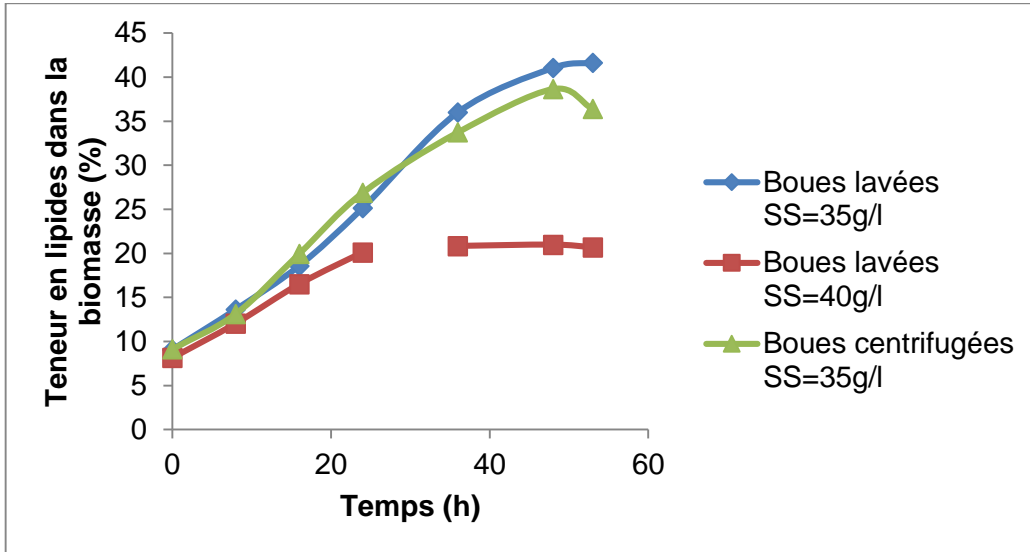


Figure 14 : Effet de la concentration en matières en suspension et du type de boues sur la teneur en de lipides

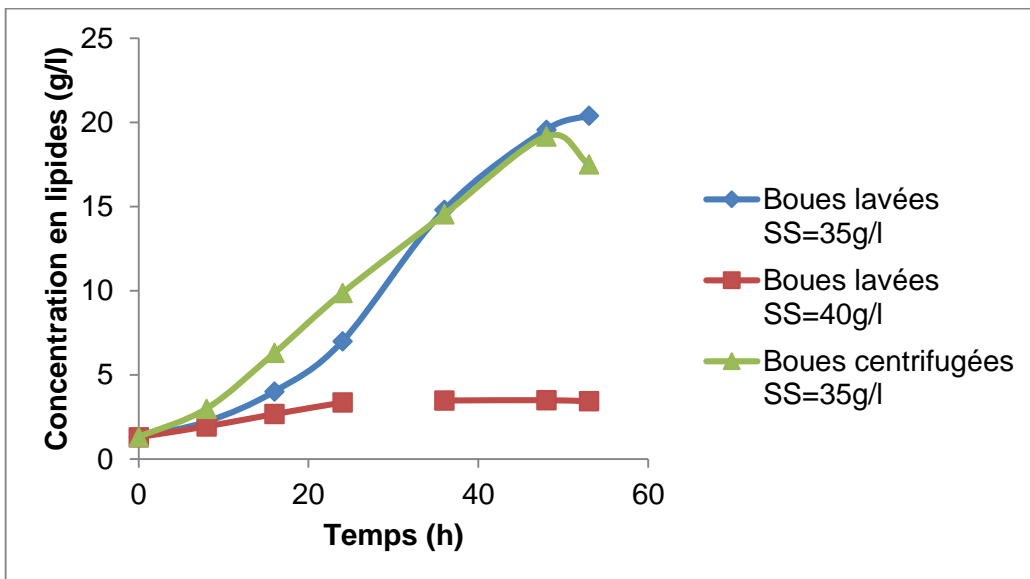


Figure 15 : Effet de la concentration en solides en suspension et du type de boues sur la concentration en lipides

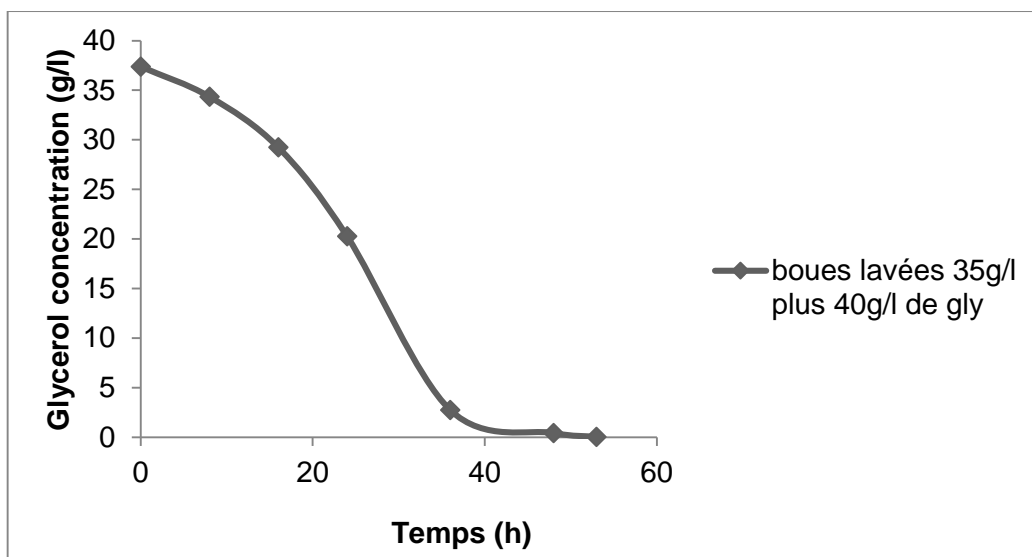


Figure 16 : Variation de la concentration en glycérol au niveau des boues lavées 35g/l plus 40g/l de glycérol en fonction du temps

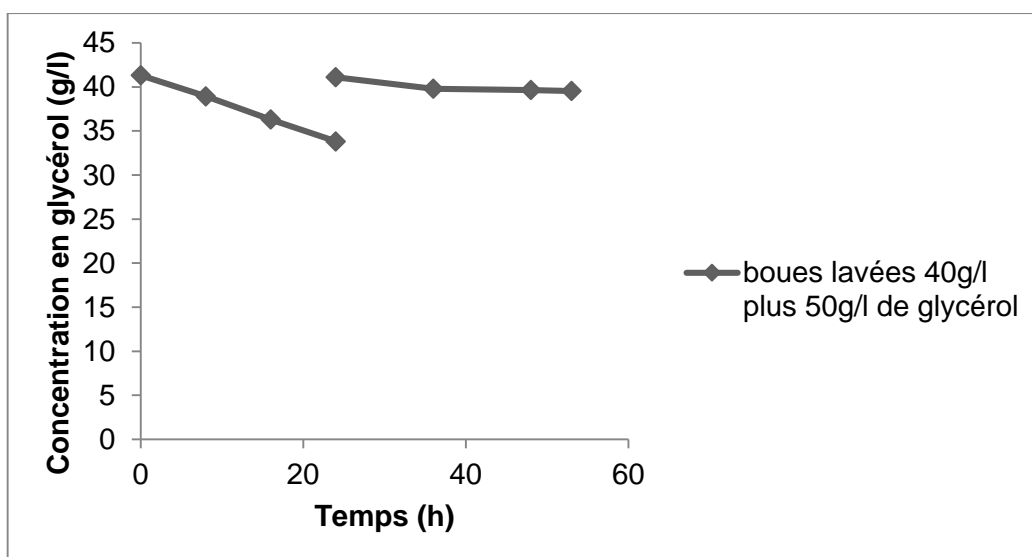


Figure 17 : Variation de la concentration en glycérol au niveau de MES des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol en fonction du temps

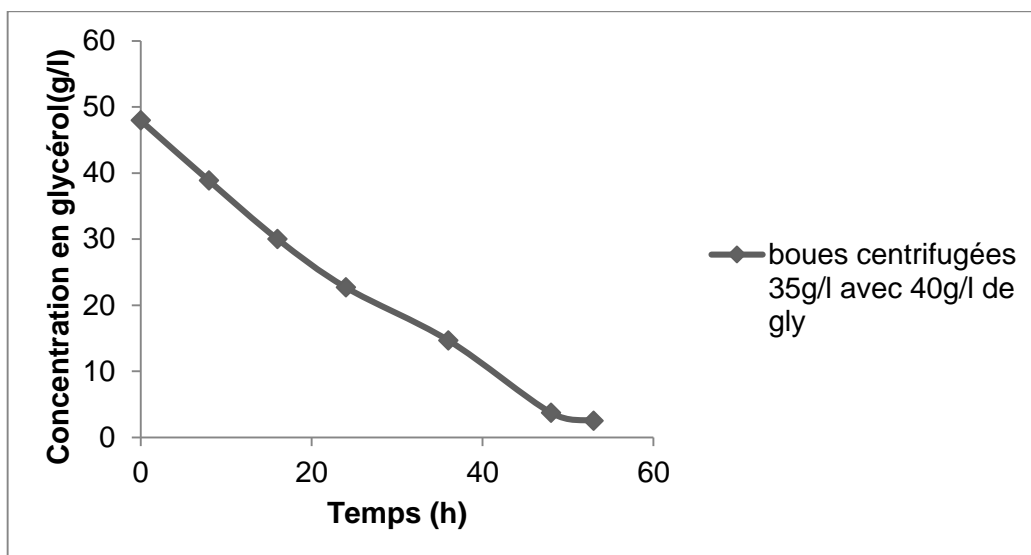


Figure 18 : Variation de la concentration en glycérol au niveau des boues centrifugées de 35g/l de MES avec 40g/l de glycérol en fonction du temps

Les allures des courbes des boues lavées et centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol nous montrent la faible concentration résiduelle en glycérol à la fin des fermentations. Ceci peut amener à dire que les microorganismes ont réellement utilisé la source de carbone supplémentaire pour le maintien de leur activité, d'où les importantes concentrations de MES observées ainsi que celles de lipides.

Par contre au niveau des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol, une importante concentration en glycérol non-utilisée est à noter (Figure 17). En fait, au début de la fermentation, seulement 40g/l de glycérol sont ajoutés dans le système puis après 24h, 10g/l complémentaire sont ajoutés. Ainsi, les microorganismes n'auraient pas probablement consommé tout le carbone contenu dans la solution de glycérol avant que la fermentation soit stoppée. D'où une concentration résiduelle importante.

5.2. Étude de la performance des différentes fermentations

Les paramètres présentés ci-dessous ont permis d'évaluer l'efficacité des différentes fermentations en bioréacteurs notamment celles réalisées avec du glycérol. Les résultats des expériences sans ajout de glycérol sont attachés en annexe.

5.2.1. Les taux de croissance, de production de lipides et de consommation de glycérol.

Les méthodes de calcul de ces différents paramètres sont décrites en annexe. La figure 19 suivante présente la variation du taux de croissance dans les boues lavées à 35g/l, puis les boues centrifugées à 35g/l avec ajout de glycérol.

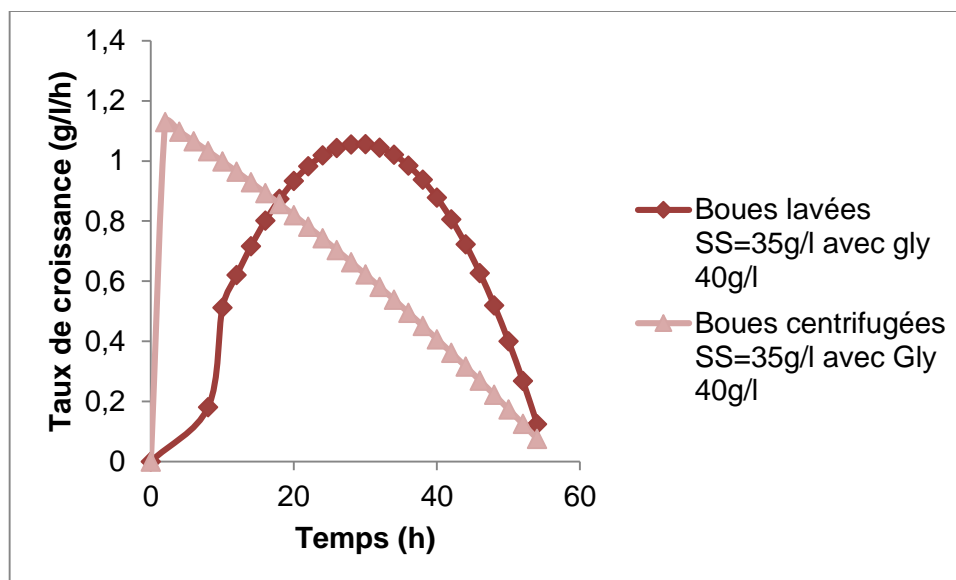


Figure 19 : Variation des taux de croissance des microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol

Au niveau des boues centrifugées le temps de latence est pratiquement inexistant ; ce qui n'est pas le cas au niveau des boues lavées. Cela pourrait

s'expliquer par le fait que l'inoculum dans les boues centrifugées était dans une meilleure phase exponentielle.

Par contre, la chute rapide de croissance des microorganismes dans les boues centrifugées pourrait s'expliquer par le fait que l'activité bactérienne a été inhibée par de possibles éléments toxiques issus probablement des boues non lavées. Dans le cas des boues lavées qui présentent une meilleure courbe de croissance c'est-à-dire la présence de toutes les étapes de croissance, il est à noter que de 0h à 30h, la croissance est rapide puis diminue graduellement à partir de 36h. Ceci est dû au fait que dès les premières heures, les nutriments dissous sont rapidement consommés par les microorganismes puis ensuite le milieu s'épuise. Alors les microorganismes commencent à s'attaquer au carbone de leur propre corps afin de continuer leur activité mais perdent beaucoup d'énergie ; d'où la chute de la croissance dans le milieu. La figure 20 ci-dessous présente également les taux de croissance spécifique dans les deux cas.

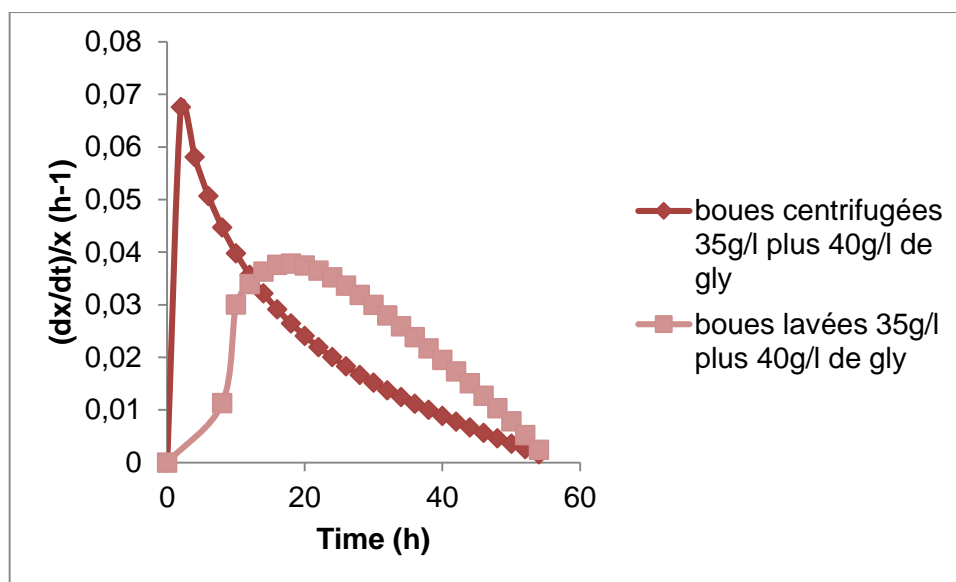


Figure 20 : Variation des taux de croissance spécifiques des microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol. (dp/dt = taux de production des lipides).

D'après les figures 21 et 22 ci-dessous en ce qui concerne la production de lipides et la production spécifique de lipides, la même explication est valable car en début de fermentation, il y a une rapide accumulation de lipides et vers la fin une diminution due à l'épuisement des nutriments principalement le carbone. Cependant, par rapport aux boues lavées, à (0h), comme dit précédemment, il y a une latence dans la croissance bactérienne mais pourtant il y a présence de lipides. L'explication de ce fait est que les boues d'épuration contiennent naturellement de faibles concentrations en lipides (Girault *et al.*, 2012).

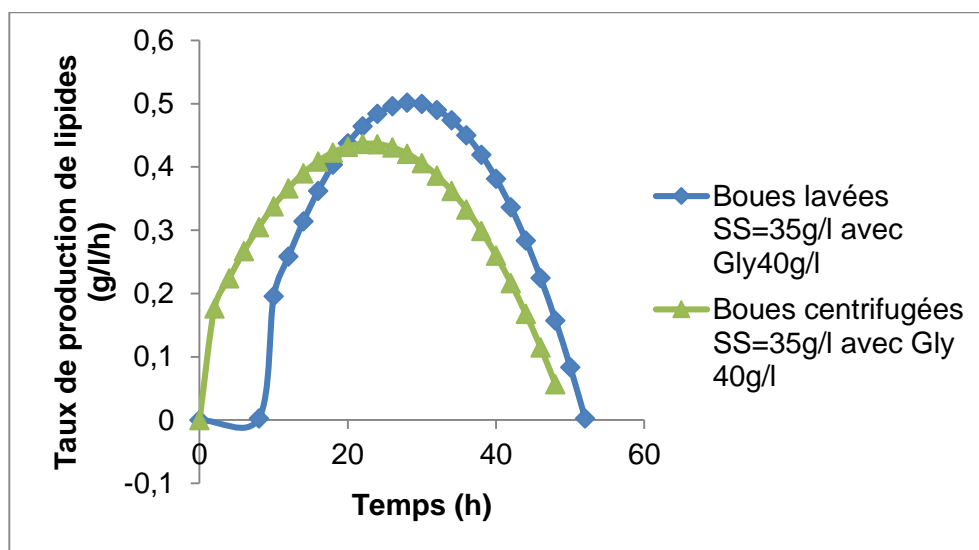


Figure 21 : Variation des taux de production de lipides par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol.

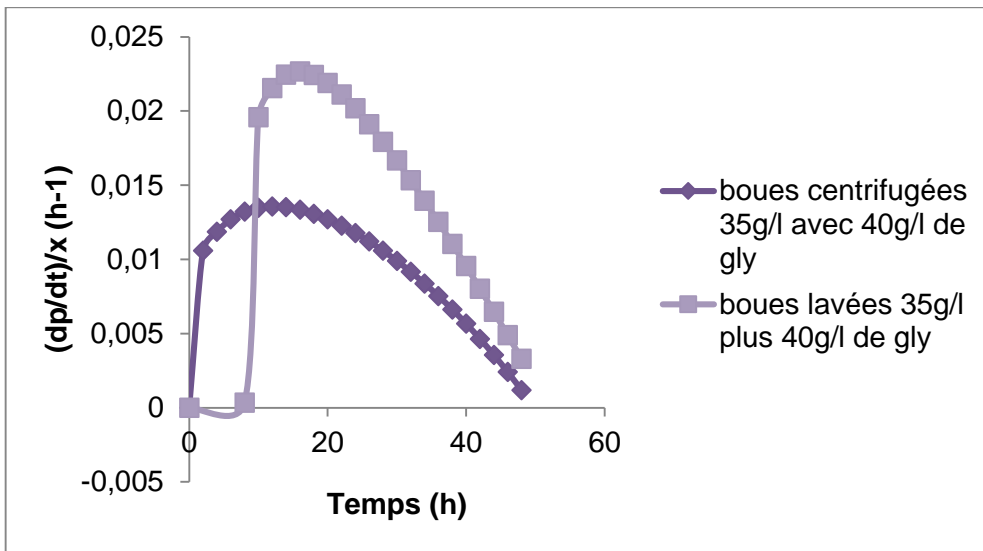


Figure 22 : Variation des taux de production spécifiques de lipides par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol.

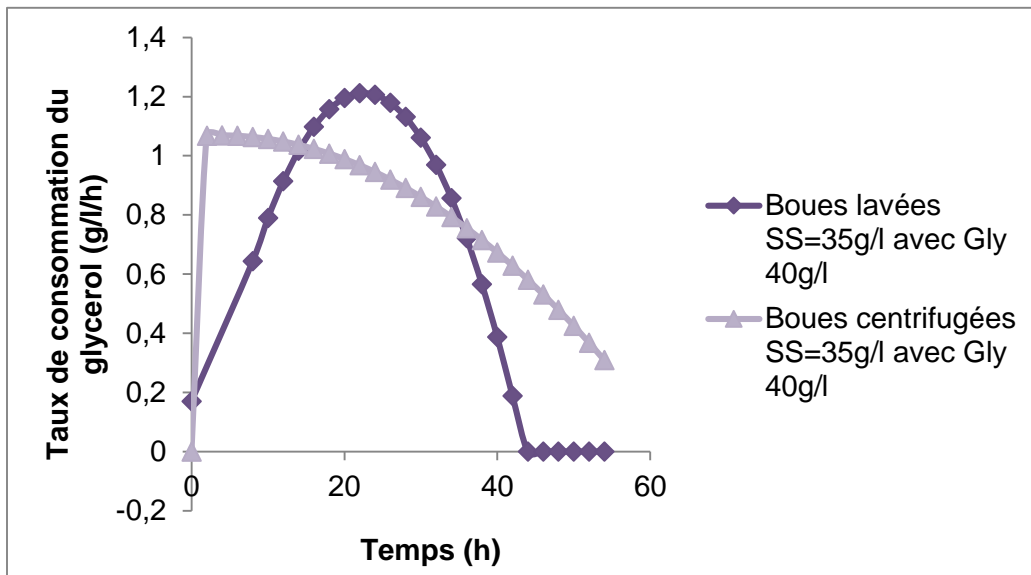


Figure 23 : Variation des taux de consommation de glycérol au niveau des boues lavées et centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol.

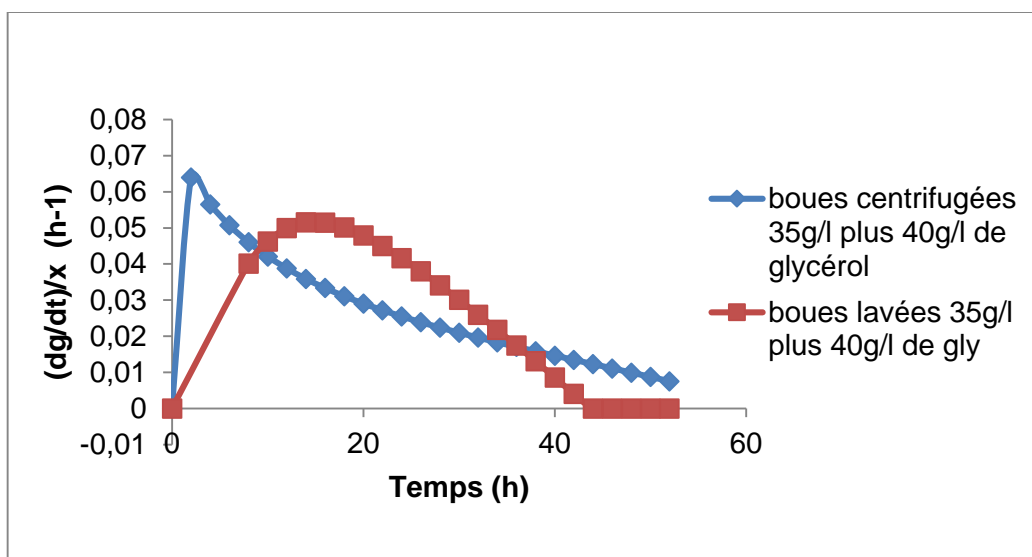


Figure 24 : Variation des taux de consommation spécifique de glycérol au niveau des boues lavées et centrifugées à 35g/l plus 40g/l de glycérol

Les courbes de taux de consommation et de consommation spécifique de glycérol (voir figures 23 et 24) sont proportionnelles aux courbes de croissance. En effet, lorsque les nutriments commencent à être en déficit au cours de la fermentation, les microorganismes afin de poursuivre leur croissance et de produire des lipides, s'attaquent aux sources de carbone existantes. Ainsi, plus le glycérol se consomme, plus la biomasse du milieu augmente et il y a davantage de production de lipides. Dans le même cas lorsque le glycérol s'épuise dans le milieu, les solides en suspension diminuent avec la production de lipides.

5.2.2. Influence des concentrations de l'OUR, l'OTR et du KLa sur la performance des fermentations.

Les résultats présentés dans cette partie sont ceux des expériences effectuées avec la solution de glycérol. Pour les expériences sans ajout de solution de glycérol, ils sont attachés en annexe.

Les figures 25 à 30 présentées ci-après concernent le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K_{La}), le taux de transfert d'oxygène (OTR) et le taux de consommation d'oxygène (OUR). Elles représentent, d'une part, des comparaisons entre les boues lavées à 35 g/l plus 40 g/l de glycérol avec les boues centrifugées 35 g/l plus 40 g/l de glycérol et d'autre part une comparaison entre les boues lavées 35g/l plus 40g/l de glycérol avec des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol, en ce qui concerne.

Dans le but de maintenir l'OD à une valeur supérieure ou égale à 30%, de nombreuses variations sont opérées soit en augmentant ou en diminuant les taux d'agitation et d'aération lors des différentes fermentations ; d'où l'observation de différentes allures pour les courbes présentées.

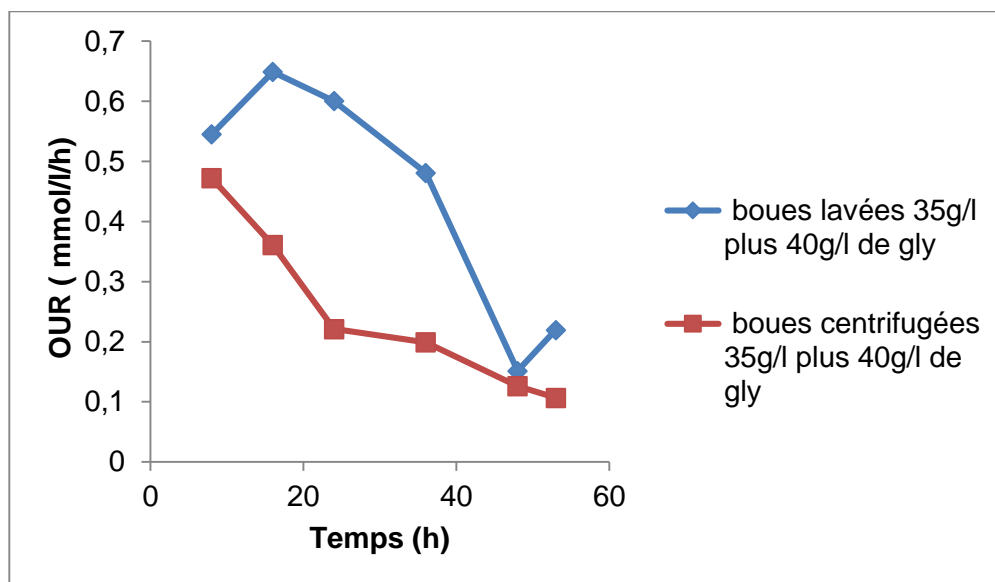


Figure 25 : Profil de l'OUR par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées 35g/l plus 40 g/l de glycérol

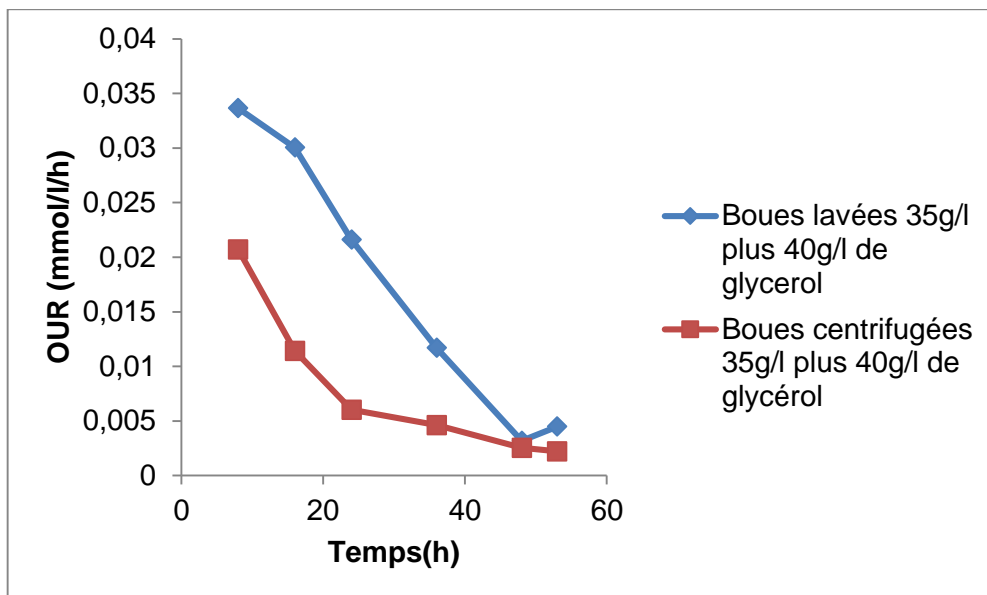


Figure 26 : Profil de l'OUR spécifique par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées 35g/l plus 40 g/l de glycérol.

En ce qui concerne l'OUR des boues lavées et centrifugées 35g/l, il est à noter qu'elle est plus élevée dans le cas des boues lavées. Ainsi, les microorganismes des boues lavées ont consommé beaucoup d'oxygène pour leur croissance. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il n'y avait pas d'inhibition possible dans le milieu. Le résultat montre ainsi que la croissance bactérienne et l'accumulation lipidique sont plus importantes au niveau des boues lavées.

Les allures des courbes de l'OTR entre les boues lavées et centrifugées à 35g/l sont pratiquement similaires. Les baisses conséquentes observées sont dues au moment où la prise de K_La est faite. Par contre au niveau des boues lavées à 35g/l et 40g/l (principalement durant les phases de croissance), le transfert d'oxygène est plus efficace. Ceci est normal car déjà que les propriétés physiques des boues d'épuration sont des facteurs qui limitent les taux d'aération et d'agitation (M Drouin *et al.*, 2008), le transfert d'oxygène est limité par les MES de boues d'épuration supérieures à 35g/l. En fait, d'après (Mathieu Drouin, 2013)

plus la concentration des boues est élevée plus elles contiennent de protéines, lesquelles au cours des activités bactériennes favorisent de grandes quantités de mousse. Les mousses formées inhibent donc la prolifération des bulles d'air dans le fermenteur, par conséquent le transfert d'oxygène devient faible.

De même, le K_{La} qui mesure la capacité d'oxygénation du milieu est plus important dans les boues lavées 35g/l (figure 27). Ce qui peut nous amener à déduire le bioréacteur est plus performant dans notre cas lorsqu'il est opéré avec des boues d'épuration lavées ayant une concentration en SS de 35g/l.

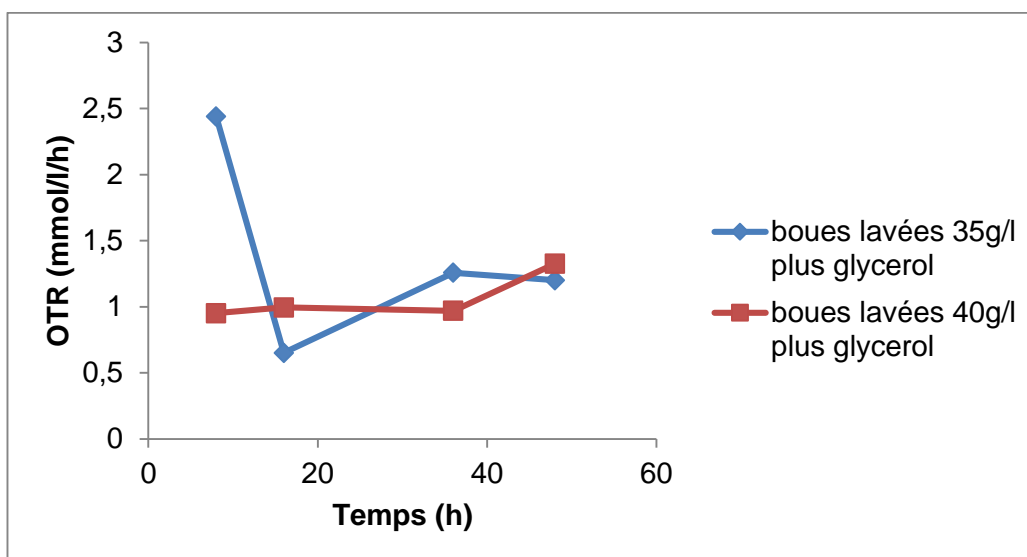


Figure 27 : Profil de l'OTR par les microorganismes des boues lavées 35g/l plus 40g/l de glycérol et des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol.

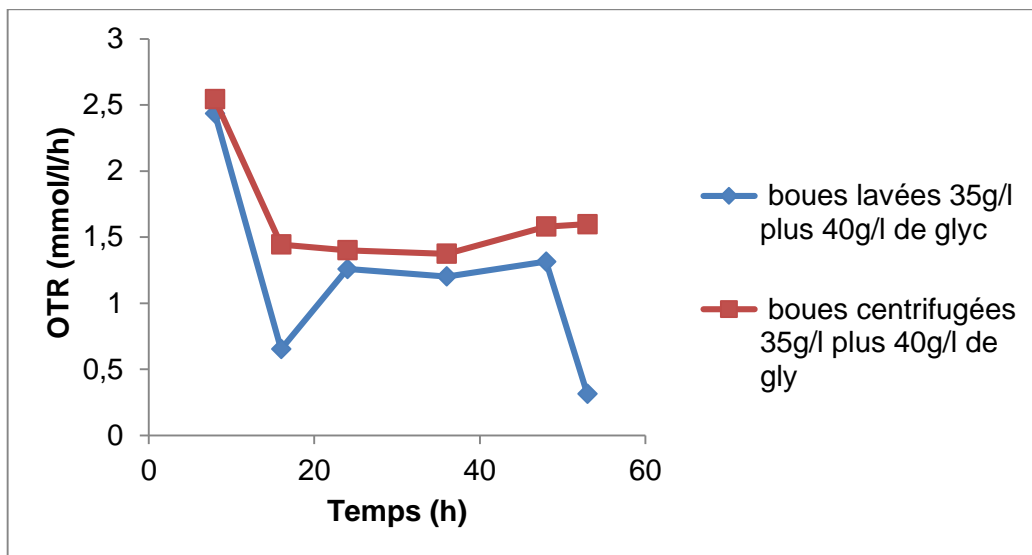


Figure 28 : Profil de l'OTR par les microorganismes des boues lavées et des boues centrifugées 35 g/l plus 40 g/l de glycérol.

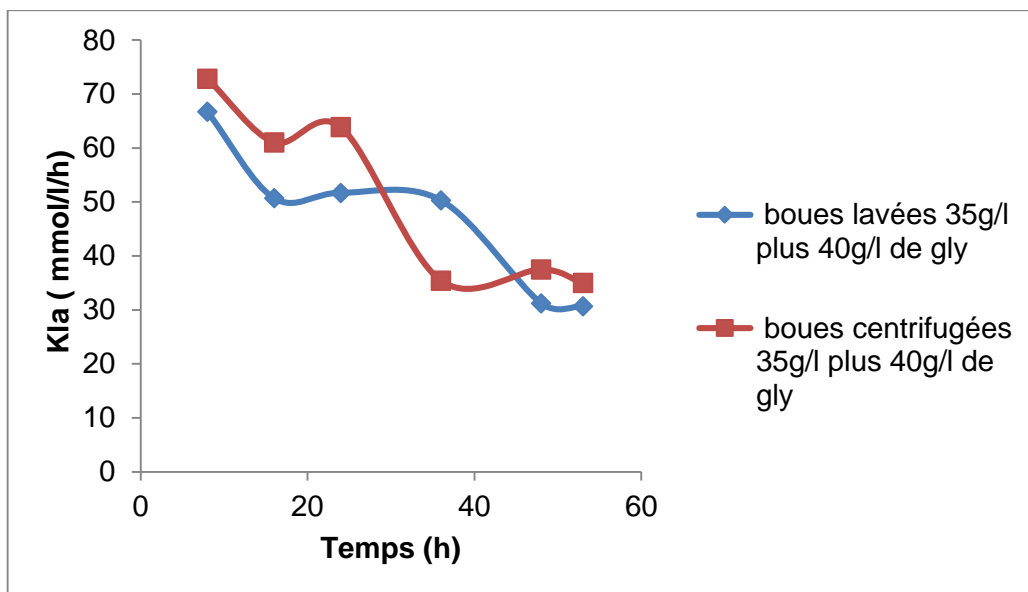


Figure 29 : Profil du KLa avec des boues lavées et des boues centrifugées 35 g/l plus 40 g/l de glycérol.

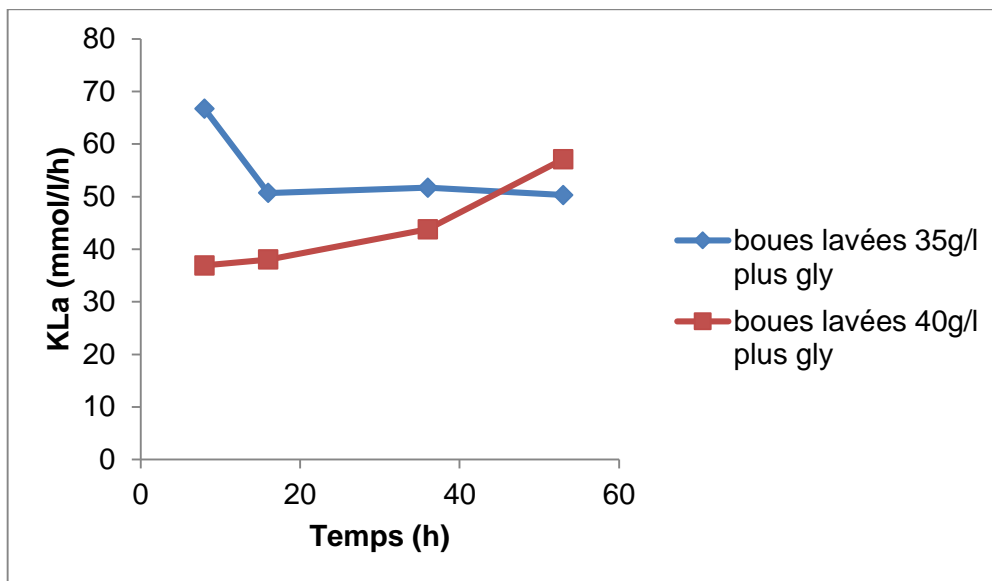


Figure 30 : Profil de KLa avec des boues lavées à 35g/l plus 40g/l de glycérol et des boues lavées 40g/l plus 50g/l de glycérol.

6. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Notre travail qui a consisté à mettre en place des procédés pouvant permettre d'accroître la production de lipides à partir de boues d'épuration et de glycérol brut représente quand même une avancée importante dans le processus de gestion de déchets.

Ainsi nos résultats nous ont permis de démontrer qu'au lieu d'appliquer des prétraitements aux boues qui consomment beaucoup d'énergie tels que l'ultrasonication (Zhang *et al.*, 2016), etc., un lavage approprié des boues est efficace. Ainsi il est à retenir de nos expériences que :

- **La production de lipides est plus conséquente avec des boues lavées à 35g/l plus 40g/l de glycérol par rapport aux autres types de boues et aux autres concentrations ;**
- **Avec l'ajout de solution de glycérol brut dans la fermentation, la production de lipides devient plus importante**
- **Le bioréacteur est plus performant lorsqu'il est opéré avec des boues lavées à 35g/l plus 40g/l.**

Nos résultats obtenus en bioréacteur de 15L étant assez importants, il serait judicieux de passer à la mise à l'échelle avec des bioréacteurs de 150L. Mais avant, les prochaines recherches sur la production de lipides à partir de *Trichosporon Oleaginosus* en utilisant des boues d'épuration et du glycérol brut comme substrats, doivent tenir compte des quelques recommandations suivantes :

- Faire des analyses de la composition des boues après lavage et avant fermentation afin de confirmer l'efficacité du procédé ;
- Lors des fermentations, prendre des échantillons à intervalle rapproché (par exemple chaque 2h) afin d'obtenir des courbes de croissance beaucoup plus significatives ;

- S'assurer d'avoir un inoculum en phase exponentiel avant de commencer la fermentation en bioréacteur afin d'éviter un temps de latence long.

7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Hameed A. (2001). Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(9):857-861.
- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P & Villa TG. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology* 90(4):1219-1227.
- Al-Masry WA. (1999). Effect of liquid volume in the gas-separator on the hydrodynamics of airlift reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74(10):931-936.
- Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M & Guebitz G. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource technology* 99(8):3051-3056.
- Aono R. (1990). Taxonomic distribution of alkali-tolerant yeasts. *Systematic and applied microbiology* 13(4):394-397.
- APhA A. (1985). WPCF (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association, Washington, DC*.
- Ayoub M & Abdullah AZ. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(5):2671-2686.
- Barnabé S. (2004). *Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire Bacillus thuringiensis HD-1*. (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Bello RA, Robinson CW & Moo-Young M. (1985). Gas holdup and overall volumetric oxygen transfer coefficient in airlift contactors. *Biotechnology and bioengineering* 27(3):369-381.

- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea J-L, Molina-Jouve C & Nicaud J-M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in lipid research* 48(6):375-387.
- Beopoulos A, Nicaud J-M & Gaillardin C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology* 90(4):1193-1206.
- Boulton CA & Ratledge C. (1984). *Cryptococcus terricolus*, an oleaginous yeast re-appraised. *Applied microbiology and biotechnology* 20(1):72-76.
- Brar S, Verma M, Tyagi R, Valéro J & Surampalli R. (2005). Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: viscosity impacts. *Water research* 39(13):3001-3011.
- Çalik P, Ileri N, Erdinç BI, Aydoğan N & Argun M. (2005). Novel antifoam for fermentation processes: fluorocarbon-hydrocarbon hybrid unsymmetrical bolaform surfactant. *Langmuir* 21(19):8613-8619.
- Chatzifragkou A & Papanikolaou S. (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology* 95(1):13-27.
- Da Silva GP, Mack M & Contiero J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances* 27(1):30-39.
- Doran PM. (1995). *Bioprocess engineering principles*. Academic press,
- Drouin M. (2013). *Étude de stratégies visant à stimuler la production de protéase alcalines par Bacillus licheniformis en utilisation des boues d'épuration municipales comme substrat*. (Université du Québec).
- Drouin M, Lai C, Tyagi R & Surampalli R. (2008). *Bacillus licheniformis* proteases as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process. *Water Science and Technology* 57(3):423-430.
- Easterling ER, French WT, Hernandez R & Licha M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid

- composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology* 100(1):356-361.
- Evans CT & Ratledge C. (1984a). Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microbiology* 130(7):1693-1704.
- EVANS CT & RATLEDGE C. (1984b). Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Journal of general microbiology* 130(7):1705-1710.
- Fytili D & Zabaniotou A. (2008). Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12(1):116-140.
- Girault R, Bridoux G, Nauleau F, Poullain C, Buffet J, Peu P, Sadowski A & Béline F. (2012). Anaerobic co-digestion of waste activated sludge and greasy sludge from flotation process: Batch versus CSTR experiments to investigate optimal design. *Bioresource technology* 105:1-8.
- Gujjari P, Suh S-O, Coumes K & Zhou JJ. (2011). Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposimilis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginosus* sp. nov. *Mycologia* 103(5):1110-1118.
- Hansson L & Dostálek M. (1986). Influence of cultivation conditions on lipid production by *Cryptococcus albidus*. *Applied microbiology and biotechnology* 24(1):12-18.
- Heredia L & Ratledge C. (1988). Simultaneous utilization of glucose and xylose by *Candida curvata* D in continuous culture. *Biotechnology letters* 10(1):25-30.
- Huang T-K, Wang P-M & Wu W-T. (2001). Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes. *Biochemical engineering journal* 7(1):35-39.
- Humphrey A. (1998). Shake flask to fermentor: what have we learned? *Biotechnology Progress* 14(1):3-7.
- Jacob Z. (1992). Linear growth and lipid synthesis in the oleaginous yeast *Rhodotorula gracilis*. *Folia microbiologica* 37(2):117-121.

- Juarez P & Orejas J. (2001). Oxygen transfer in a stirred reactor in laboratory scale. *Latin American Applied Research* 31:433-439.
- Käppeli O & Fiechter A. (1981). On the methodology of oxygen transfer coefficient measurements. *Biotechnology Letters* 3(10):541-546.
- Kessell R. (1968). Fatty acids of *Rhodotorula gracilis*: fat production in submerged culture and the particular effect of pH value. *Journal of Applied Bacteriology* 31(2):220-231.
- Kitcha S & Cheirsilp B. (2011). Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia* 9:274-282.
- Li Y, Zhao ZK & Bai F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and microbial technology* 41(3):312-317.
- Ma Y. (2006). Microbial oils and its research advance. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering* 4(4):7-11.
- Meesters P, Huijberts G & Eggink G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied microbiology and biotechnology* 45(5):575-579.
- Moon NJ, Hammond E & Glatz BA. (1978). Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. *Journal of Dairy Science* 61(11):1537-1547.
- Ndao A. (2014). *Mise à l'échelle de la production du biopesticide Bacillus thuringiensis var. kurstaki avec comme substrat des eaux usées d'amidon*. (Institut National de la Recherche Scientifique).
- Özbek B & Gayik S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry* 36(8):729-741.
- Ozergin-Ulgen K & Mavituna F. (1998). Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) culture in a batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 73(3):243-250.
- Pan JG & Rhee JS. (1986). Biomass yields and energetic yields of oleaginous yeasts in batch culture. *Biotechnology and bioengineering* 28(1):112-114.

- Papanikolaou S. & Aggelis G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8):1031-1051.
- Papanikolaou S. & Aggelis G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8):1052-1073.
- Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Marc I & Aggelis G. (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(3):308-312.
- Pham T, Brar SK, Tyagi R & Surampalli R. (2009). Ultrasonication of wastewater sludge—consequences on biodegradability and flowability. *Journal of hazardous materials* 163(2):891-898.
- Pilli S, Bhunia P, Yan S, LeBlanc R, Tyagi R & Surampalli R. (2011). Ultrasonic pretreatment of sludge: a review. *Ultrasonics sonochemistry* 18(1):1-18.
- PRESCOTT L, HARLEY J & KLEIN DA M (1995) De Bœck université. (Bruxelles).
- Ratledge C. (1991). Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica* 11(5):429-438.
- Ratledge C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*, Springer. p 235-291.
- Ratledge C. (2005). Single cell oils for the 21st century. *Single cell oils*:1-20.
- Ratledge C. & Cohen Z. (2008). Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils. *Lipid Technol* 20(7):155-160.
- Renzetti S. (2005). Canadian agricultural water use and management. *The Economics of Natural and Human Resources in Agriculture*. (Springer, Amsterdam).
- Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. & Leonardi A. (2011). Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi. *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies* 1:72-74.

- Saxena V, Sharma C, Bhagat S, Saini V & Adhikari D. (1998). Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(4):501-505.
- Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block DE, German JB & Boundy-Mills KL. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances* 32(7):1336-1360.
- Su Y, Mennerich A & Urban B. (2012). Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource technology* 105:67-73.
- Turcotte G. & Kosaric N. (1989). Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Bioprocesses and Engineering*, Springer. p 73-92.
- Vasudevan PT & Briggs M. (2008). Biodiesel production—current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35(5):421-430.
- Verma M, Brar SK, Riopel A, Tyagi R & Surampalli R. (2007). Pre-treatment of wastewater sludge—biodegradability and Rheology study. *Environmental technology* 28(3):273-284.
- Von Arx J & Weijman A. (1979). Conidiation and carbohydrate composition in some *Candida* and *Torulopsis* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 45(4):547-555.
- Woodbine M. (1959). Microbial fat: Microorganisms as potential fat producers. *Prog. Ind. Microbiol* 1:181-245.
- Yan D, Lu Y, Chen Y-F & Wu Q. (2011). Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresource technology* 102(11):6487-6493.
- Yang F, Hanna MA & Sun R. (2012). Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for biofuels* 5(1):1.
- Yazdani SS & Gonzalez R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current opinion in biotechnology* 18(3):213-219.

- Yezza A. (2005). *Conception d'une stratégie de production opérationnelle de biopesticide à base de Bacillus thuringiensis utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation*. (Université du Québec).
- Ykema A, Verbree EC, Kater MM & Smit H. (1988). Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Applied microbiology and biotechnology* 29(2-3):211-218.
- Zhang X, Yan S & Tyagi RD. (2015). Strategies of preserving lipids in microorganism after fermentation. *Bioresource technology* 192:718-725.
- Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Drogui P & Surampalli RY. (2016). Ultrasonication aided biodiesel production from one-step and two-step transesterification of sludge derived lipid. *Energy* 94:401-408.
- Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Surampalli R & Valéro JR. (2014a). Wastewater sludge as raw material for microbial oils production. *Applied Energy* 135:192-201.
- Zhang X, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY & Valéro JR. (2014b). Lipid production from *Trichosporon oleaginosus* cultivated with pre-treated secondary wastewater sludge. *Fuel* 134:274-282.
- Zhao X, Kong X, Hua Y, Feng B & Zhao ZK. (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(5):405-412.
- Zhuang L, Zhou S, Wang Y, Liu Z & Xu R. (2011). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresource technology* 102(7):4820-4826.

Annexe 1: Données brutes de toutes les fermentations en matières de MES, CFU, concentration en lipides et teneur en lipides

Fermentation 1: Boues non lavées. MES initial =30 g/L, Glycerol=0 g/L; pH=6,5; Température: 28 °C

Temps	CFU/mL	MES (g/L)	Teneur en lipide (% p/p MES)	Concentration en lipide. (g/L)
0 h	1,36E+07	10,35	9,89	1,02
8 h	5,90E+07	10,45	1,08	1,16
12 h	9,1E+08	12,75	1,87	1,77
16 h	1,12E+09	14,15	18,35	2,60
24 h	1,54E+09	15,15	23,05	3,49
36 h	2,76E+09	16,55	28,69	4,75
48 h	5,3E+09	15,8	28,90	4,57
53 h	2,5E+09	15,15	27,49	4,16

Fermentation 2: Boues lavées. MES initial =30 g/L, Glycérol=0 g/L; pH=6,5; Température: 28 °C

Temps	CFU/mL	MES (g/L)	Teneur en lipide (% p/p MES)	Concentration en lipide (g/L)
0 h	1,52E+07	9,45	9,91	0,94
8 h	4,20E+07	10,85	10,83	1,18
12 h	7,35E+08	11,75	16,00	1,88
16 h	9,45E+08	11,95	17,04	2,04
24 h	1,23E+09	12,35	24,51	3,03
36 h	2,41E+09	12,5	26,97	3,37
48 h	1,63E+09	11,9	30,22	3,60
53 h	1,03E+09	11,75	27,80	3,27

Fermentation 3: Boues lavées. MES initial =35 g/L, Glycérol=0 g/L; pH=6,5;
Température: 28 °C

Temps	CFU/mL	MES (g/L)	Teneur en lipide (% p/p MES)	Concentration en lipide (g/L)
0 h	8,25E+06	17,87	8,90	1,59
8 h	8,95E+07	18,80	13,87	2,61
16 h	3,90E+08	20,00	18,18	3,64
24 h	9,60E+08	21,47	22,33	4,79
36 h	1,96E+09	21,93	25,90	5,68
48 h	4,05E+09	22,73	28,34	6,44
53 h	6,00E+09	22,73	27,39	6,23

Fermentation 4: Boues lavées. MES initial =35 g/L, Glycérol=40 g/L; pH=6,5;
Température: 28 °C.

Temps	CFU/mL	MES (g/L)	Teneur en lipide (% p/p MES)	Concentration en lipide (g/L)	Concentration en glycérol (g/L)
0 h	7,75E+06	14,47	9,06	1,31	37,38
8 h	1,74E+08	16,20	13,62	2,21	34,34
16 h	2,46E+09	21,60	18,58	4,01	29,23
24 h	5,10E+09	27,80	25,13	6,99	20,27
36 h	9,00E+09	41,13	36,00	14,81	2,73
48 h	1,34E+10	47,67	41,05	19,57	0,42
53 h	1,49E+10	49,00	41,63	20,40	0,03

Fermentation 5: Boues lavées. MES initial=40 g/L, Glycérol=0 g/L; pH=6,5;
Température: 28 °C

Temps	CFU/mL	MES (g/L)	Teneur en lipide (% p/p MES)	Concentration en lipide (g/L)
0 h	6,60E+07	18,40	8,15	1,50
8 h	8,40E+07	18,80	11,08	2,08
16 h	4,20E+08	18,93	18,12	3,43
24 h	9,50E+08	19,07	21,05	4,01
36 h	1,77E+09	19,33	24,33	4,70
48 h	1,25E+09	18,13	26,76	4,85
53 h	1,17E+09	17,87	25,43	4,54

Fermentation 6: Boues lavées. MES initial=40 g/L, Glycérol initial= 40 g/L plus 10 g/L ajouté à 24h; pH=6,5; Température: 28 °C

Temps	CFU/mL	MES (g/L)	Teneur en lipide (% p/p MES)	Concentration en lipide (g/L)	Concentration en glycérol (g/L)
0 h	7,00E+07	15,80	8,14	1,29	41,316
8 h	1,28E+08	16,00	12,05	1,93	38,94
16 h	5,70E+08	16,20	16,51	2,67	36,312
					Avant ajout 33,82
24 h	1,67E+09	16,70	20,10	3,36	Après ajout 41,10
36 h	1,58E+09	16,70	20,83	3,48	39,804
48 h	1,40E+09	16,70	20,98	3,50	39,66
53 h	1,21E+09	16,60	20,68	3,43	39,552

Fermentation 7: Boues centrifugées. MES initial =35 g/L. Glycérol=40 g/L.
pH=6,5. Température=28 °C

Temps	CFU/mL	MES (g/L)	Teneur en lipide (% p/p MES)	Concentration en lipide (g/L)	Concentration en glycérol (g/L)
0 h	1,02E+07	14,4	9,12	1,31	47,964
8 h	1,89E+08	22,8	13,13	2,99	38,844
16 h	1,09E+09	31,6	19,95	6,30	30,024
24 h	1,74E+10	36,7	26,88	9,87	22,692
36 h	2,59E+10	43,1	33,74	14,54	14,664
48 h	3,14E+10	49,6	38,66	19,17	3,72
53 h	2,42E+10	48,1	36,40	17,51	2,472
60 h	2,33E+10	47,9	34,77	16,66	1,704
66 h	2,29E+10	47,1	31,71	14,94	1,224

Annexe 2: Calcul des taux de croissance, des taux spécifiques de croissance, des taux de production de lipides et des taux spécifiques de production de lipides pour chaque fermentation.

Fermentation 1: Boues non lavées. MES initial =30 g/L, Glycérol=0 g/L; pH=6.5;
Température: 28 °C

Temps (h)	MES (g/l)	MES sans lipide (g/l)	dx/dt (g/l/h-1)	(dx/dt)/x (h-1)	Lipide (g/l)	dp/dt (g/l/h-1)	(dp/dt)/x (h-1)
0	9,9689	9,0541	0	0	0,9148	0	0
2	10,3513	9,3705	0,1912	0,01847111	0,9808	0,033	0,00318801
4	10,7585	9,6701	0,2036	0,01892457	1,0884	0,0538	0,0050007
6	11,1857	9,9529	0,2136	0,01909581	1,2328	0,0722	0,00645467
8	11,6281	10,2189	0,2212	0,01902288	1,4092	0,0882	0,00758507
10	12,0809	10,4681	0,2264	0,01874033	1,6128	0,1018	0,00842652
12	12,5393	10,7005	0,2292	0,01827853	1,8388	0,113	0,00901167
14	12,9985	10,9161	0,2296	0,01766358	2,0824	0,1218	0,00937031
16	13,4537	11,1149	0,2276	0,01691728	2,3388	0,1282	0,00952898
18	13,9001	11,2969	0,2232	0,01605744	2,6032	0,1322	0,00951072
20	14,3329	11,4621	0,2164	0,01509813	2,8708	0,1338	0,00933517
22	14,7473	11,6105	0,2072	0,01405003	3,1368	0,133	0,0090186
24	15,1385	11,7421	0,1956	0,0129207	3,3964	0,1298	0,00857417
26	15,5017	11,8569	0,1816	0,01171484	3,6448	0,1242	0,00801202
28	15,8321	11,9549	0,1652	0,0104345	3,8772	0,1162	0,00733952
30	16,1249	12,0361	0,1464	0,00907913	4,0888	0,1058	0,00656128
32	16,3753	12,1005	0,1252	0,00764566	4,2748	0,093	0,00567929
34	16,5785	12,1481	0,1016	0,00612842	4,4304	0,0778	0,00469283
36	16,7297	12,1789	0,0756	0,00451891	4,5508	0,0602	0,00359839
38	16,8241	12,1929	0,0472	0,0028055	4,6312	0,0402	0,00238943
40	16,8569	12,1901	0,0164	0,0009729	4,6668	0,0178	0,00105595
42	16,8233	12,1705	-0,0168	-0,00099862	4,6528	-0,007	-0,00150447
44	16,7185	12,1341	-0,0524	-0,00313425	4,5844	-0,0342	-0,00746008
46	16,5377	12,0809	-0,0904	-0,0054663	4,4568	-0,0638	-0,0143152
48	16,2761	12,0109	-0,1308	-0,00803632	4,2652	-0,0958	-0,02246085
50	15,9289	11,9241	-0,1736	-0,01089843	4,0048	-0,1302	-0,03251099
52	15,4913	11,8205	-0,2188	-0,01412406	3,6708	-0,167	-0,04549417
54	14,9585	11,7001	-0,2664	-0,01780927	3,2584	-0,2062	-0,06328259

Fermentation 2: Boues lavées. MES initial =30 g/L, Glycérol=0 g/L; pH=6.5;
 Température: 28 °C

Temps (h)	MES (g/l)	MES sans lipide (g/l)	dx/dt (g/l/h-1)	(dx/dt)/x (h-1)	lipide (g/l)	dp/dt (g/l/h-1)	(dp/dt)/x (h-1)
0	9,4263	8,5703	0	0	0,856	0	0
2	9,88602	8,90652	0,22986	0,02325102	0,9795	0,06174	0,00624518
4	10,30206	9,18586	0,20802	0,02019208	1,1162	0,06838	0,00663751
6	10,67634	9,41194	0,18714	0,01752848	1,2644	0,07406	0,00693683
8	11,01078	9,58888	0,16722	0,01518694	1,4219	0,07878	0,00715481
10	11,3073	9,7203	0,14826	0,01311188	1,587	0,08254	0,00729971
12	11,56782	9,81012	0,13026	0,01126055	1,7577	0,08534	0,00737736
14	11,79426	9,86226	0,11322	0,00959959	1,932	0,08718	0,00739173
16	11,98854	9,88034	0,09714	0,00810274	2,1082	0,08806	0,00734535
18	12,15258	9,86848	0,08202	0,00674918	2,2841	0,08798	0,00723961
20	12,2883	9,8303	0,06786	0,00552233	2,458	0,08694	0,00707502
22	12,39762	9,76972	0,05466	0,00440891	2,6279	0,08494	0,00685132
24	12,48246	9,69066	0,04242	0,00339837	2,7918	0,08198	0,00656762
26	12,54474	9,59674	0,03114	0,00248232	2,948	0,07806	0,00622253
28	12,58638	9,49208	0,02082	0,00165417	3,0943	0,07318	0,00581422
30	12,6093	9,3803	0,01146	0,00090885	3,229	0,06734	0,0053405
32	12,61542	9,26532	0,00306	0,00024256	3,3501	0,06054	0,00479889
34	12,60666	9,15106	-0,00438	-0,00034744	3,4556	0,05278	0,00418668
36	12,58494	9,04114	-0,01086	-0,00086294	3,5438	0,04406	0,00350101
38	12,55218	8,93968	-0,01638	-0,00130495	3,6125	0,03438	0,00273897
40	12,5103	8,8503	-0,02094	-0,00167382	3,66	0,02374	0,00189764
42	12,46122	8,77692	-0,02454	-0,00196931	3,6843	0,01214	0,00097422
44	12,40686	8,72346	-0,02718	-0,00219072	3,6834	-0,00042	-3,39E-05
46	12,34914	8,69354	-0,02886	-0,00233701	3,6556	-0,01394	-0,00112882
48	12,28998	8,69128	-0,02958	-0,00240684	3,5987	-0,02842	-0,00231245
50	12,2313	8,7203	-0,02934	-0,00239876	3,511	-0,04386	-0,00358588
52	12,17502	8,78452	-0,02814	-0,00231129	3,3905	-0,06026	-0,00494948
54	12,12306	8,88786	-0,02598	-0,00214302	3,2352	-0,07762	-0,00640267

Fermentation 3: Boues lavées. MES initial =35 g/L, Glycérol=0 g/L; pH=6.5;
Température: 28 °C

Temps (h)	MES (g/l)	MES sans lipide (g/l)	dx/dt (g/l/h-1)	(dx/dt)/x (h-1)	lipide (g/l)	dp/dt (g/l/h-1)	(dp/dt)/x (h-1)
0	17,774	16,1942	0	0	1,5798	0	0
2	18,08512	16,24852	0,15556	0,00860155	1,8366	0,12838	0,00709865
4	18,39256	16,29506	0,15372	0,00835773	2,0975	0,13046	0,00709309
6	18,69584	16,33474	0,15164	0,0081109	2,3611	0,13182	0,00705077
8	18,99448	16,36848	0,14932	0,00786123	2,626	0,13246	0,0069736
10	19,288	16,3972	0,14676	0,00760888	2,8908	0,13238	0,00686333
12	19,57592	16,42192	0,14396	0,00735393	3,154	0,13158	0,00672152
14	19,85776	16,44366	0,14092	0,00709647	3,4141	0,13006	0,00654958
16	20,13304	16,46334	0,13764	0,00683652	3,6697	0,12782	0,00634877
18	20,40128	16,48188	0,13412	0,0065741	3,9194	0,12486	0,0061202
20	20,662	16,5002	0,13036	0,00630917	4,1618	0,12118	0,00586487
22	20,91472	16,51932	0,12636	0,00604168	4,3954	0,11678	0,00558363
24	21,15896	16,54026	0,12212	0,00577155	4,6187	0,11166	0,0052772
26	21,39424	16,56394	0,11764	0,00549868	4,8303	0,10582	0,00494619
28	21,62008	16,59128	0,11292	0,00522292	5,0288	0,09926	0,0045911
30	21,836	16,6232	0,10796	0,00494413	5,2128	0,09198	0,00421231
32	22,04152	16,66072	0,10276	0,00466211	5,3808	0,08398	0,00381008
34	22,23616	16,70486	0,09732	0,00437665	5,5313	0,07526	0,00338458
36	22,41944	16,75654	0,09164	0,00408752	5,6629	0,06582	0,00293584
38	22,59088	16,81668	0,08572	0,00379445	5,7742	0,05566	0,00246383
40	22,75	16,8862	0,07956	0,00349714	5,8638	0,04478	0,00196835
42	22,89632	16,96612	0,07316	0,00319527	5,9302	0,03318	0,00144914
44	23,02936	17,05746	0,06652	0,00288849	5,9719	0,02086	0,0009058
46	23,14864	17,16114	0,05964	0,00257639	5,9875	0,00782	0,00033782
48	23,25368	17,27808	0,05252	0,00225857	5,9756	-0,00594	-0,00025544
50	23,344	17,4092	0,04516	0,00193454	5,9348	-0,02042	-0,00087474
52	23,41912	17,55552	0,03756	0,00160382	5,8636	-0,03562	-0,00152098

Fermentation 4: Boues lavées. MES initial =35 g/L, Glycérol=40 g/L; pH=6.5; Température: 28 °C.

Temps (h)	MES (g/l)	MES sans lipide (g/l)	dx/dt (g/l/h-1)	(dx/dt)/x (h-1)	lipide (g/l)	dp/dt (g/l/h-1)	(dp/dt)/x (h-1)	Glycérol (g/l)	dg/dt (g/l/h-1)	(dg/dt)/x (h-1)
0	14,582	13,0002	0	0	1,5818	0	0	36,958	0,17	0
8	16,0276	14,4242	0,1807	0,0112743	1,6034	0,0027	0,00016846	35,598	0,643	0,0401183
10	17,051	15,0562	0,5117	0,03000997	1,9948	0,1957	0,01147733	34,312	0,789	0,04627295
12	18,2912	15,7794	0,6201	0,03390155	2,5118	0,2585	0,01413248	32,734	0,9134	0,04993658
14	19,7242	16,5842	0,7165	0,03632593	3,14	0,3141	0,0159246	30,9072	1,0162	0,05152047
16	21,326	17,461	0,8009	0,0375551	3,865	0,3625	0,01699803	28,8748	1,0974	0,05145831
18	23,0726	18,4002	0,8733	0,03785009	4,6724	0,4037	0,01749694	26,68	1,157	0,05014606
20	24,94	19,3922	0,9337	0,03743785	5,5478	0,4377	0,01755012	24,366	1,195	0,047915
22	26,9042	20,4274	0,9821	0,03650359	6,4768	0,4645	0,01726496	21,976	1,2114	0,04502643
24	28,9412	21,4962	1,0185	0,03519204	7,445	0,4841	0,01672702	19,5532	1,2062	0,04167761
26	31,027	22,589	1,0429	0,03361266	8,438	0,4965	0,01600219	17,1408	1,1794	0,03801205
28	33,1376	23,6962	1,0553	0,031846	9,4414	0,5017	0,0151399	14,782	1,131	0,03413041
30	35,249	24,8082	1,0557	0,02994979	10,4408	0,4997	0,01417629	12,52	1,061	0,03010014
32	37,3372	25,9154	1,0441	0,02796407	11,4218	0,4905	0,01313703	10,398	0,9694	0,02596338
34	39,3782	27,0082	1,0205	0,02591535	12,37	0,4741	0,01203966	8,4592	0,8562	0,02174299
36	41,348	28,077	0,9849	0,02381977	13,271	0,4505	0,01089533	6,7468	0,7214	0,01744703
38	43,2226	29,1122	0,9373	0,02168541	14,1104	0,4197	0,0097102	5,304	0,565	0,01307187
40	44,978	30,1042	0,8777	0,01951398	14,8738	0,3817	0,00848637	4,174	0,387	0,00860421
42	46,5902	31,0434	0,8061	0,01730192	15,5468	0,3365	0,00722255	3,4	0,1874	0,00402231
44	48,0352	31,9202	0,7225	0,01504105	16,115	0,2841	0,00591441	3,0252	0	0
46	49,289	32,725	0,6269	0,01271886	16,564	0,2245	0,00455477	3,0928	0	0
48	50,3276	33,4482	0,5193	0,01031839	16,8794	0,1577	0,00313347	3,646	0	0
50	51,127	34,0802	0,3997	0,00781779	17,0468	0,0837	0,0016371	4,728	0	0
52	51,6632	34,6114	0,2681	0,00518938	17,0518	0,0025	4,84E-05	6,382	0	0
54	51,9122	35,0322	0,1245	0,00239828	16,88	-0,0859	-0,00165472	8,6512	0	0

Fermentation 5: Boues lavées. MES initial=40 g/L, Glycérol=0 g/L; pH=6.5; Température: 28 °C

Temps (h)	MES (g/l)	MES sans lipide (g/l)	dx/dt (g/l/h-1)	(dx/dt)/x (h-1)	Lipide (g/l)	dp/dt (g/l/h-1)	(dp/dt)/x (h-1)
0	18,427	17,0075	0	0	1,4195	0	0
2	18,49116	16,84786	0,03208	0,00173488	1,6433	0,11188	0,00605046
4	18,55948	16,68908	0,03416	0,00184057	1,8704	0,11356	0,00611871
6	18,63052	16,53112	0,03552	0,00190655	2,0994	0,11452	0,0061469
8	18,70284	16,37394	0,03616	0,0019334	2,3289	0,11476	0,00613597
10	18,775	16,2175	0,03608	0,0019217	2,5575	0,11428	0,00608682
12	18,84556	16,06186	0,03528	0,00187206	2,7837	0,11308	0,00600035
14	18,91308	15,90708	0,03376	0,00178501	3,006	0,11116	0,00587741
16	18,97612	15,75312	0,03152	0,00166104	3,223	0,10852	0,00571877
18	19,03324	15,59994	0,02856	0,00150053	3,4333	0,10516	0,00552507
20	19,083	15,4475	0,02488	0,00130378	3,6355	0,10108	0,00529686
22	19,12396	15,29586	0,02048	0,00107091	3,8281	0,09628	0,00503452
24	19,15468	15,14508	0,01536	0,00080189	4,0096	0,09076	0,00473827
26	19,17372	14,99512	0,00952	0,00049651	4,1786	0,08452	0,00440812
28	19,17964	14,84594	0,00296	0,00015433	4,3337	0,07756	0,00404387
30	19,171	14,6975	-0,00432	-0,00022534	4,4735	0,06988	0,00364509
32	19,14636	14,54986	-0,01232	-0,00064346	4,5965	0,06148	0,00321105
34	19,10428	14,40308	-0,02104	-0,00110132	4,7012	0,05236	0,00274075
36	19,04332	14,25712	-0,03048	-0,00160056	4,7862	0,04252	0,0022328
38	18,96204	14,11194	-0,04064	-0,00214323	4,8501	0,03196	0,00168547
40	18,859	13,9675	-0,05152	-0,00273185	4,8915	0,02068	0,00109656
42	18,73276	13,82386	-0,06312	-0,0033695	4,9089	0,00868	0,00046336
44	18,58188	13,68108	-0,07544	-0,00405987	4,9008	-0,00404	-0,00021742
46	18,40492	13,53912	-0,08848	-0,00480741	4,8658	-0,01748	-0,00094975
48	18,20044	13,39794	-0,10224	-0,00561745	4,8025	-0,03164	-0,00173842
50	17,967	13,2575	-0,11672	-0,00649635	4,7095	-0,04652	-0,00258919
52	17,70316	13,11786	-0,13192	-0,00745178	4,5853	-0,06212	-0,00350898
54	17,40748	12,97908	-0,14784	-0,0084929	4,4284	-0,07844	-0,00450611

Fermentation 6: Boues lavées. MES initial=40 g/L, Glycérol initial= 40 g/L plus 10 g/L ajouté à 24h; pH=6.5; Température: 28 °C

Temps (h)	MES (g/l)	MES sans lipide (g/l)	dx/dt (g/l/h-1)	(dx/dt)/x (h-1)	lipide (g/l)	dp/dt (g/l/h-1)	(dp/dt)/x (h-1)	Glycérol (g/l)	dg/dt (g/l/h-1)	(dg/dt)/x (h-1)
0	15,775	14,543	0	0	1,232	0	0	41,569	0	0
2	15,83392	14,38232	0,02946	0,00186056	1,4516	0,109792	0,00693397	40,4418	0,5636	0,03559447
4	15,89556	14,23486	0,03082	0,00193891	1,6607	0,104544	0,00657693	39,4986	0,4716	0,02966866
6	15,95944	14,10024	0,03194	0,00200132	1,8592	0,099248	0,00621876	38,725	0,3868	0,02423644
8	16,02508	13,97808	0,03282	0,00204804	2,047	0,093904	0,00585981	38,1066	0,3092	0,01929476
10	16,092	13,868	0,03346	0,00207929	2,224	0,088512	0,00550037	37,629	0,2388	0,01483967
12	16,15972	13,76962	0,03386	0,00209533	2,3901	0,083072	0,00514068	37,2778	0,1756	0,01086652
14	16,22776	13,68246	0,03402	0,00209641	2,5453	0,077584	0,00478094	37,0386	0,1196	0,00737009
16	16,29564	13,60624	0,03394	0,00208277	2,6894	0,072048	0,00442131	36,897	0,0708	0,00434472
18	16,36288	13,54058	0,03362	0,00205465	2,8223	0,066464	0,00406188	36,8386	0,0292	0,00178453
20	16,429	13,485	0,03306	0,0020123	2,944	0,060832	0,00370272	36,849	0	0
22	16,49352	13,43922	0,03226	0,00195592	3,0543	0,055152	0,00334386	36,9138	0	0
24	16,55596	13,40276	0,03122	0,00188573	3,1532	0,049424	0,00298527	37,0186	0	0
26	16,61584	13,37544	0,02994	0,0018019	3,2404	0,043648	0,00262689	37,149	0	0
28	16,67268	13,35658	0,02842	0,00170458	3,3161	0,037824	0,00226862	37,2906	0	0
30	16,726	13,346	0,02666	0,00159393	3,38	0,031952	0,00191032	37,429	0	0
32	16,77532	13,34322	0,02466	0,00147002	3,4321	0,026032	0,0015518	37,5498	0	0
34	16,82016	13,34796	0,02242	0,00133292	3,4722	0,020064	0,00119285	37,6386	0	0
36	16,86004	13,35974	0,01994	0,00118268	3,5003	0,014048	0,00083321	37,681	0	0
38	16,89448	13,37818	0,01722	0,00101927	3,5163	0,007984	0,00047258	37,6626	0	0
40	16,923	13,403	0,01426	0,00084264	3,52	0,001872	0,00011062	37,569	0	0
42	16,94512	13,43372	0,01106	0,0006527	3,5114	-0,004288	-0,00025305	37,3858	0	0
44	16,96036	13,46996	0,00762	0,00044928	3,4904	-0,010496	-0,00061885	37,0986	0	0
46	16,96824	13,51134	0,00394	0,0002322	3,4569	-0,016752	-0,00098726	36,693	0	0

48	16,96828	13,55748	2,00E-05	1,18E-06	3,4108	-0,023056	-0,00135877	36,1546	0	0
50	16,96	13,608	-0,00414	-0,0002441	3,352	-0,029408	-0,00173396	35,469	0	0
52	16,94292	13,66252	-0,00854	-0,00050405	3,2804	-0,035808	-0,00211345	34,6218	0	0
54	16,91656	13,72066	-0,01318	-0,00077912	3,1959	-0,042256	-0,00249791	33,5986	0	0

Fermentation 7: Boues centrifugées. MES initial =35 g/L. Glycérol=40 g/L. pH=6.5. Température=28 °C

Temps (h)	MES (g/l)	MES sans lipide (g/l)	dx/dt (g/l/h-1)	(dx/dt)/x (h-1)	Lipide (g/l)	dp/dt (g/l/h-1)	(dp/dt)/x (h-1)	Glycérol (g/l)	dg/dt (g/l/h-1)	(dg/dt)/x (h-1)
0	14,448	13,2263	0	0	1,2217	0	0	47,616	0	0
2	16,70576	15,13086	1,12888	0,0675743	1,5749	0,1766	0,0105712	45,48	1,068	0,06393005
4	18,90048	16,87718	1,09736	0,0580599	2,0233	0,2242	0,01186213	43,3424	1,0688	0,05654883
6	21,03072	18,47342	1,06512	0,05064591	2,5573	0,267	0,01269571	41,208	1,0672	0,05074482
8	23,09504	19,92774	1,03216	0,04469185	3,1673	0,305	0,0132063	39,0816	1,0632	0,04603586
10	25,092	21,2483	0,99848	0,03979276	3,8437	0,3382	0,0134784	36,968	1,0568	0,04211701
12	27,02016	22,44326	0,96408	0,03568003	4,5769	0,3666	0,01356765	34,872	1,048	0,03878585
14	28,87808	23,52078	0,92896	0,03216834	5,3573	0,3902	0,01351198	32,7984	1,0368	0,03590266
16	30,66432	24,48902	0,89312	0,02912571	6,1753	0,409	0,01333798	30,752	1,0232	0,03336777
18	32,37744	25,35614	0,85656	0,02645546	7,0213	0,423	0,01306465	28,7376	1,0072	0,03110808
20	34,016	26,1303	0,81928	0,02408514	7,8857	0,4322	0,01270579	26,76	0,9888	0,02906867
22	35,57856	26,81966	0,78128	0,02195929	8,7589	0,4366	0,01227144	24,824	0,968	0,0272074
24	37,06368	27,43238	0,74256	0,02003471	9,6313	0,4362	0,01176893	22,9344	0,9448	0,02549126
26	38,46992	27,97662	0,70312	0,01827714	10,4933	0,431	0,01120356	21,096	0,9192	0,02389399
28	39,79584	28,46054	0,66296	0,01665903	11,3353	0,421	0,010579	19,3136	0,8912	0,0223943
30	41,04	28,8923	0,62208	0,0151579	12,1477	0,4062	0,00989766	17,592	0,8608	0,02097466
32	42,20096	29,28006	0,58048	0,01375514	12,9209	0,3866	0,00916093	15,936	0,828	0,01962041
34	43,27728	29,63198	0,53816	0,01243516	13,6453	0,3622	0,00836929	14,3504	0,7928	0,01831908
36	44,26752	29,95622	0,49512	0,01118472	14,3113	0,333	0,00752245	12,84	0,7552	0,01705991
38	45,17024	30,26094	0,45136	0,00999242	14,9093	0,299	0,0066194	11,4096	0,7152	0,01583343
40	45,984	30,5543	0,40688	0,0088483	15,4297	0,2602	0,00565849	10,064	0,6728	0,01463118
42	46,70736	30,84446	0,36168	0,00774353	15,8629	0,2166	0,00463738	8,808	0,628	0,01344542
44	47,33888	31,13958	0,31576	0,0066702	16,1993	0,1682	0,0035531	7,6464	0,5808	0,01226898
46	47,87712	31,44782	0,26912	0,00562106	16,4293	0,115	0,00240198	6,584	0,5312	0,01109507

48	48,32064	31,77734	0,22176	0,00458934	16,5433	0,057	0,00117962	5,6256	0,4792	0,00991709
50	48,668	32,1363	0,17368	0,00356867	16,5317	-0,0058	-0,00011917	4,776	0,4248	0,00872853
52	48,91776	32,53286	0,12488	0,00255286	16,3849	-0,0734	-0,00150048	4,04	0,368	0,00752283
54	49,06848	32,97518	0,07536	0,00153581	16,0933	-0,1458	-0,00297136	3,4224	0,3088	0,00629325
56	49,11872	33,47142	0,02512	0,00051141	15,6473	-0,223	-0,00454002	2,928	0,2472	0,0050327
58	49,06704	34,02974	-0,02584	-0,00052663	15,0373	-0,305	-0,00621599	2,5616	0,1832	0,00373367
60	48,912	34,6583	-0,07752	-0,00158489	14,2537	-0,3918	-0,0080103	2,328	0,1168	0,00238796
62	48,65216	35,36526	-0,12992	-0,00267039	13,2869	-0,4834	-0,00993584	2,232	0,048	0,0009866
64	48,28608	36,15878	-0,18304	-0,00379074	12,1273	-0,5798	-0,0120076	2,2784	-0,0232	-0,00048047
66	47,81232	37,04702	-0,23688	-0,00495437	10,7653	-0,681	-0,01424319	2,472	-0,0968	-0,00202458