

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO – INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

MATIERE D'ŒUVRE

MICROBIOLOGIE

Premier jour :

1 - Microflore des boues d'épuration

Par élève :

- matériel courant du poste de microbiologie
- colorants nécessaires à la réalisation de la coloration de Gram
- réactif oxydase extemporané
- 1 VF en surfusion
- 1 GTS en boîte de pétri
- 1 galerie API NON E (prévoir 48h d'incubation pour la galerie API NON E)
- 1 notice d'ensemencement de la galerie
- souche de *Pseudomonas* nitrate réductase \oplus stade N_2 isolée sur boîte de pétri (GTS) noté S(x)

1-2- Traitement des boues avant leur épandage

Par élève :

- 6 BP vides stériles
- pipettes de 1 mL stériles ou équivalent
- 1 flacon de 100 mL de gélose PCA en surfusion à 50 °C
- 1 flacon de 40 mL de gélose PCA en surfusion à 50 °C
- 6 tubes de 9 mL d'eau ϕ stérile
- 1 tube de BN avec 5.10^6 bactéries par mL noté B(x)
- 1 agitateur mécanique (Vortex)

Dans la salle :

- réserve de matériel
- sachets à autoclave
- bac de Javel
- paniers à autoclave

Deuxième jour :

1 - Microflore des boues d'épuration

Par élève :

- 1 fond noir
- 1 notice de lecture de la galerie + 1 feuillet de report des résultats
- 1 index ou 1 logiciel d'identification (ou plusieurs si possible)

2 – Traitement des boues avant leur épandage

- 1 fond noir
- feutre ou compteur de colonies

Dans la salle :

- 1 index ou 1 logiciel d'identification (ou plusieurs si possible)
- réserve de matériel
- sachets à autoclave
- bac de Javel
- paniers à autoclave

BIOCHIMIE

1.3. Dosage de la teneur en N total par la méthode de Kjeldhal

Produits chimiques

Par élève :

- | | |
|---|--------|
| - hydrogénocarbonate de potassium pur et anhydre | 0,5 g |
| - solution d'acide sulfurique à environ 0,04 mol/L | 150 mL |
| - solution d'hydroxyde de sodium à environ 0,1 mol/L | 70 mL |
| - lessive de soude (NaOH à 300 g/L) distillation traditionnelle : | 120 mL |
| distillation automatique : | 2 L |

- indicateurs de pH :
 - méthylorange 1 flacon
 - bleu de bromothymol 1 flacon
- échantillon : noter "minéralisé" 5 mL
 - réaliser une solution de NH_4Cl à 0.9 g/L

Matériel

- 1 micropipette de type P1000 ou pipette de 1 mL
- 1 pipette jaugée de 10 mL
- 1 coupelle de pesée
- 2 (ou 4 ?) erlens de 250 mL
- 1 bécher de 250 mL
- 1 fiole de 100 mL
- 1 fiole de 20 ou 100 mL
- 1 burette de 25 mL
- 1 éprouvette de 100 mL
- lunette de sécurité
- distillateur automatique ou matériel de distillation traditionnelle avec mode d'emploi
- balance de précision.

2.2 Contrôle biochimique : dosage du P dans les eaux épurées par la méthode de Briggs

Produits chimiques

- dihydrogénophosphate de potassium pur et anhydre 0,6 g
- réactif sulfomolybdique 3 mL
 - pour 500 mL :
 - molybdate d'ammonium 40 g
 - eau distillée 200 mL
 - dissoudre (tiédir éventuellement puis laisser refroidir)
 - ajouter :
 - eau distillée 200 mL
 - acide sulfurique pur 120 mL
- solution d'hydroquinone à 10 g/L 3 mL
 - à préparer extemporanément !
- solution de sulfite de sodium à 200 g/L 3 mL
 - à préparer extemporanément !
- échantillon : noter "eau épurée" 20 mL
 - réaliser une solution de KH_2PO_4 à 2.63 mg/L.

Matériel

- 10 tubes à essai
- micropipettes de type P1000 ou pipettes adaptées – P 100
- 1 coupelle de pesée
- 1 bécher de 250 mL
- 1 fiole de 100 mL
- 1 fiole de 20 ou 100 mL
- 8 macrocuvettes pour spectro
- balance de précision
- spectrophotomètre
- parafilm

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-ALIMENTAIRES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

CONTRÔLE DES TRAITEMENTS DES EAUX USÉES ET DES BOUES DANS UNE STATION D'ÉPURATION EN ZONE SENSIBLE

Premier jour : 4 H 30

Les eaux usées sont dirigées vers les stations d'épuration afin d'être assainies. Une fois les traitements opérés, elles ne doivent plus contenir qu'une quantité réduite de matières polluantes. Les eaux épurées sont alors rejetées dans les rivières et les fleuves tandis que les boues d'épuration, résidu secondaire, sont généralement épandues sur les terres agricoles.

Les stations d'épuration situées en zone sensible c'est-à-dire dont les eaux se déversent dans des milieux aquatiques menacés par des phénomènes d'eutrophisation, des eaux douces superficielles destinées à la production d'eau potable, des zones d'élevage de coquillage et des lieux de baignade, ont des contraintes particulières. En effet, l'eau doit subir des traitements complémentaires visant à éliminer 70 % de l'azote, 80 % du phosphore et 60 % des contaminants microbiologiques.

Ce sujet propose de déterminer d'une part l'efficacité des traitements complémentaires et d'autre part la composition des boues produites.

1. Étude des boues

1.1. Microflore des boues d'épuration. (16 points)

Les eaux usées sont constituées par les liquides issus des rejets domestiques, agricoles et industriels. La directive européenne du 21 Mai 1991 impose aux communes de plus de 2 000 habitants d'épurer leurs eaux usées avant de les déverser dans les rivières.

La première étape de l'épuration consiste à multiplier artificiellement les bactéries naturellement présentes dans les eaux usées afin d'accélérer le processus d'épuration. Ce procédé conduit à la formation d'un résidu appelé « boues d'épuration ». Ces boues, après un éventuel traitement, sont répandues sur les terrains agricoles afin de recycler leurs éléments minéraux et d'exploiter leurs qualités fertilisantes.

Les bactéries contenues dans les boues permettent notamment l'élimination de l'azote organique en deux étapes successives :

- le processus de nitrification conduisant à la synthèse de nitrates et faisant intervenir *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*.
- le processus de dénitrification permettant la transformation des nitrates en diazote et faisant intervenir différentes espèces bactériennes.

Une bactérie a été isolée de la boue ; elle est présentée sur GTS notée S(x).

1.1.1. Procéder à tous les tests nécessaires à une orientation de la bactérie ; on vérifiera le 2^{ème} jour si cette bactérie participe à la dénitrification.

NB : tous les examens et recherches doivent être montrés à un examinateur

1.1.2. À l'aide de la notice fournie, ensemençer la galerie miniaturisée, la gélose VF et la gélose de réisolement (GTS). Indiquer la température d'incubation.

1.2 Analyse microbiologique des boues avant épandage. (14 points)

Le traitement biologique précédent peut s'accompagner d'une « hygiénisation » des boues en vue de diminuer la charge microbienne avant l'épandage. Cette opération consiste à acidifier les boues à pH 3, avec addition de nitrite de sodium, dans le but de diminuer le nombre de germes de 3 logarithmes décimaux.

On se propose de dénombrer les bactéries présentes dans un prélèvement B effectué après le traitement d'« hygiénisation ».

1.2.1. Sachant qu'un dénombrement initial a établi la présence de 6.10^{10} bactéries par gramme de boue et que B correspond à une dilution préalable au 1/10 000 de l'échantillon de boue, calculer les dilutions à ensemençer de façon à obtenir un résultat exploitable même si le traitement d'hygiénisation n'a pas été efficace. Justifier.

1.2.2. A partir de B, effectuer un dénombrement dans la masse avec surcouche, en respectant les consignes suivantes :

- * milieu : PCA en surfusion à 50°C (le demander à un examinateur)
- * essais : 3 dilutions choisies
- * Inoculum : 1 mL
- * nombre de boîtes par essai : 2

Laisser les boîtes ensemençées sur la paillasse en indiquant la température d'incubation.

1.3 Dosage de la teneur des boues en N total par la méthode de Kjeldhal. (16points)

Afin d'évaluer les propriétés fertilisantes des boues avant leur épandage, un dosage de l'azote total est réalisé.

1.3.1. Mode opératoire

La méthode utilisée emploie deux solutions (acide sulfurique et hydroxyde de sodium) qui sont à étalonner préalablement.

* Etalonnage de la solution d'acide sulfurique à environ $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$

- peser exactement une masse m d'hydrogénocarbonate de potassium, voisine de $0,1 \text{ g}$
- introduire cette pesée dans un erlen et dissoudre avec environ 30 mL d'eau distillée
- ajouter quelques gouttes de méthylorange (hélianthine)
- doser par la solution d'acide sulfurique. Réaliser deux essais.

* Etalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium à environ $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$

- introduire dans un erlen 10 mL de solution d'hydroxyde de sodium
- 30 mL d'eau distillée- ajouter quelques gouttes de bleu de bromothymol
- doser par la solution d'acide sulfurique. Réaliser deux essais.

*** Minéralisation**

Elle a été réalisée préalablement sur une prise d'essai de 10 mL de boues, et en présence de 10 mL d'acide sulfurique et d'un comprimé de catalyseur.

Le minéralisat obtenu est présenté dans le matras de minéralisation.

*** Alcalinisation du minéralisat et déplacement de l'ammoniac.**

- L'entraînement à la vapeur se fera soit à l'aide d'un distillateur automatique soit avec un appareillage classique. Le distillat est récupéré dans un excès de solution d'acide sulfurique. Pour cela, préparer un erlen contenant :
 - 20 mL de solution d'acide sulfurique à environ 0,04 mol.L⁻¹
 - 25 mL d'eau distillée.
- Dosage de l'excès d'acide sulfurique

L'acide sulfurique en excès est dosé par une solution d'hydroxyde de sodium à environ 0,08 mol.L⁻¹, en présence de bleu de bromothymol.

1.3.2. Résultats

Déterminer :

- les concentrations en mol.L⁻¹ des solutions d'hydroxyde de sodium et d'acide sulfurique (CV = 1 %) (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à ± 2 CV, soit $\left| \frac{C_{\text{essai}} - C_m}{C_m} \right| < 2.CV$ ou $\left| \frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2} \right| < 2.CV$)
- la teneur en azote en mg.L⁻¹ des boues analysées (CV = 5 %)

Données :

- masse molaire de l'hydrogénocarbonate de potassium = 100,1 g.mol⁻¹.
- masse volumique de la boue = 1 kg.L⁻¹.

2. Analyse des eaux après traitement. (14 points)

Contrôle biochimique : dosage des phosphates dans les eaux épurées par la méthode de Briggs

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement éliminatoire des phosphates en station d'épuration, on se propose de doser les phosphates encore présents dans les eaux épurées. La proportion de phosphates éliminés permettra de calculer le rendement de l'épuration, grandeur caractérisant chaque station.

2.1. Mode opératoire

- Préparer une solution mère à 40 mmol.L^{-1} de P par pesée de KH_2PO_4 .
- Réaliser une solution étalon fille par dilution au 1/20 de la solution mère.
- Recopier le tableau, le compléter (gamme d'étalonnage et essais) et réaliser la manipulation.

Tube	unités	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
quantité de phosphates par tube	μmol	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1		
Sol. étalon fille	mL								
Eau épurée	mL							1	1
Eau distillée qsp 1,4 mL	mL								
réactif sulfomolybdique	mL	0,2							
Hydroquinone	mL	0,2							
Sulfite de sodium	mL	0,2							

- Homogénéiser.
- Laisser reposer 30 minutes à l'obscurité.
- Lire les absorbances à 700 nm.

a. Résultats

- Tracer la courbe d'étalonnage ou bien établir une régression linéaire.
- Déterminer la concentration en phosphates des eaux épurées. $\text{CV} = 4 \%$ (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à $\pm 2 \text{ CV}$, soit $\left| \frac{C_{\text{essai}} - C_m}{C_m} \right| < 2.\text{CV}$ ou $\left| \frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2} \right| < 2.\text{CV}$).
- Calculer le rendement d'épuration en phosphates de la station d'épuration étudiée. Est-il satisfaisant pour une station située en zone sensible ?

Données :

- Masse molaire du $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136,1 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Teneur en phosphates des eaux usées arrivant à la station : $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$.

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO – INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION U 52 - TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

CONTRÔLE DES TRAITEMENTS DES EAUX USÉES ET DES BOUES DANS UNE STATION D'ÉPURATION EN ZONE SENSIBLE

Deuxième jour : 1 heure 30

1. Microflore des boues d'épuration

Rappel du 1^{er} jour :

Les bactéries contenues dans les boues permettent notamment l'élimination de l'azote organique en deux étapes successives :

- le processus de nitrification conduisant à la synthèse de nitrates et faisant intervenir *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*.
- le processus de dénitrification permettant la transformation des nitrates en diazote et faisant intervenir différentes espèces bactériennes.

Une bactérie a été isolée de la boue et l'on veut vérifier si elle participe à la dénitrification.

Travail à réaliser :

- lire la galerie biochimique ensemencée.
- Procéder à l'identification du germe à l'aide des tableaux fournis, du code API ou du logiciel.
- D'après les indications du premier jour rappelées ci-dessus, conclure.

2. Traitement des boues avant leur épandage

Dénombrer la flore.

Calculer le nombre d'UFC (unités formant des colonies) par mL d'échantillon dilué.

Données: Formule de la norme AFNOR

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1 \cdot n_2)d}$$

N = nombre d'UFC de microorganismes par mL.

ΣC = somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.

n_1 = nombre de boîtes retenues à la 1^{ère} dilution (la plus petite).

n_2 = nombre de boîtes retenues à la 2^{ème} dilution (la plus grande).

d = taux de dilution de la première dilution.

V = volume d'inoculum en mL.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

Conclure au nombre de microorganismes par g de boue sachant que l'échantillon utilisé est dilué au 1/10 000.

Conclure quant à l'efficacité du traitement, sachant que le nombre initial de microorganismes par g de boue était de 6.10^{10} et que le traitement, pour être considéré comme efficace, doit réduire la quantité initiale de 3 logarithmes décimaux..