



**HAL**  
open science

# Rôle des matériaux-soutports sur la mise en place du biofilm : Application au démarrage d'un procédé de méthanisation

Frédéric Habouzit

► **To cite this version:**

Frédéric Habouzit. Rôle des matériaux-soutports sur la mise en place du biofilm : Application au démarrage d'un procédé de méthanisation. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2010. Français. NNT: . tel-02813469

**HAL Id: tel-02813469**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02813469>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

Formation Doctorale : Génie des procédés  
Ecole Doctorale : Science des Procédés-Science des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

**Frédéric HABOUZIT**

Le vendredi 25 Juin 2010

**Rôle des matériaux-soutports sur la mise en place du biofilm :**  
**Application au démarrage d'un procédé de méthanisation**

JURY

<b>M<sup>me</sup>. M-N. BELLON-FONTAINE,</b> Professeur, AgroParisTech	Rapporteur
<b>M. P. BUFFIERE,</b> Professeur, INSA Lyon	Rapporteur
<b>M. C. GHOMMIDH,</b> Professeur, Université Montpellier II	
<b>M. T. BOUCHEZ,</b> Chargé de Recherches, Cemagref Antony	
<b>M. J-P. STEYER,</b> Directeur de Recherches, INRA Narbonne	
<b>M. N. BERNET,</b> Directeur de Recherches, INRA Narbonne	Directeur de Thèse







A Carlos Pelayo Ortiz



## REMERCIEMENTS

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire fait partie d'un projet franco-indien. Il a été effectué grâce au soutien financier du **Centre Franco-Indien Pour la Recherche Avancée** au **Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Narbonne**. Je remercie vivement **Jean-Philippe STEYER**, Directeur de Recherche, directeur de ce laboratoire, de m'avoir fourni les moyens de réaliser ce travail

Je suis très reconnaissant envers **Nicolas BERNET**, Directeur de Recherche, directeur de cette thèse. Il a encadré très activement ce travail. Ses conseils furent judicieux, son attention permanente, ses connaissances et ses compétences scientifiques ainsi que son soutien sans faille ont rendu sa collaboration précieuse pour l'élaboration de ce travail. La confiance qu'il m'a accordée n'a d'égale que ma profonde reconnaissance.

Madame **Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE**, professeur de l'Agro Paris Tech, m'a fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Que le présent manuscrit soit le témoignage de mes vifs remerciements.

Il convient d'adresser des remerciements très chaleureux à **Pierre BUFFIERE**, professeur de l'INSA de Lyon, qui m'a fait le plaisir d'avoir accepté de juger ce travail. Je lui suis particulièrement reconnaissant de l'intérêt qu'il porte à mon travail.

Je suis très honoré de la présence parmi les membres de ce jury, de **Charles GHOMMIDH**, professeur de l'université de Montpellier II. Ma reconnaissance va également à **Théodore BOUCHEZ**, chargé de recherche du CEMAGREF. Qu'ils soient respectueusement remerciés d'avoir eu l'amabilité d'accepter d'examiner ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à **Jean-François LAFOLIE** et **Romain BRIANDET**, qui en plus de m'avoir orienté dans le cadre leur participation à mon comité de thèse m'ont toujours prodigué leurs conseils en toute simplicité et avec beaucoup de sympathie.

Je tiens à exprimer ma plus profonde estime à **Gaëlle GEVAUDAN**. Une grande partie de ces travaux n'aurait pu être réalisée sans elle. Que son implication et sa disponibilité soient ici saluées.

Nombreux sont ceux qui, ces dernières années, ont apporté leur contribution à notre travail, parmi les personnes dont les commentaires ou la perspicacité nous ont été précieux, nous citerons : **Renaud ESCUDIE**, **Jérôme HAMELIN** et **Kim MILFERSTEDT** du LBE ainsi que **Jean-Marie HERRY** et **Gilles GERLOT** de l'Unité de Recherche de Bioadhésion et Hygiène des Matériaux de l'INRA à Massy.

Je tiens enfin à remercier les étudiantes ayant pris part à la réalisation du travail expérimental : **Virginie DAVID** et **Francine RAMONEDA** ainsi que les spécialistes du dessin technique **Adrien MONTANA** et **Emanuel ROQUE** sans oublier tout le personnel du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de L'INRA de Narbonne pour son efficacité et ses compétences.

## NOMENCLATURE

<b>AB</b>	Interactions polaires donneur ou accepteur d'électrons ou acide-base de Lewis
<b>ABS</b>	Acrylonitrile Butadiene Styrene
<b>ATR</b>	Attenuated Total Reflection
<b>AGV</b>	Acide Gras Volatil (en g.l <sup>-1</sup> )
<b>BATH</b>	Bacterial Adhesion To Hydrocarbons Solvent
<b>BSR</b>	Bactéries sulfato-réductrices
<b>CE</b>	Capillary Electrophoresis
<b>CVA</b>	Charge Volumique Appliquée (k <sub>DCO</sub> .m <sup>-3</sup> .j <sup>-1</sup> )
<b>DCOt/s</b>	Demande chimique en oxygène totale /soluble (en g.l <sup>-1</sup> )
<b>DLVO</b>	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
<b>DTS</b>	Distribution des Temps de Séjour
<b>EL</b>	Interactions électrostatiques
<b>EPS</b>	Exocellular Polymeric Substances (Polymères extracellulaires)
<b>FISH</b>	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
<b>FTIR</b>	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
<b>LF</b>	Lit Fluidisé
<b>INRA</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>LBE</b>	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement
<b>LTI</b>	Lit turbulé inverse
<b>LW</b>	Interactions électrodynamiques ou Lifshitz-van der Waals
<b>MATS</b>	Microbial Adhesion To Solvent
<b>MES</b>	Matières En Suspension (en g.l <sup>-1</sup> )
<b>MS</b>	Matières Sèches (en g.l <sup>-1</sup> )
<b>MV</b>	Matières Volatiles (en g.l <sup>-1</sup> )
<b>MVS</b>	Matières Volatiles en Suspension (en g.l <sup>-1</sup> )
<b>MVA</b>	Matières Volatiles Attachées (en g.l <sup>-1</sup> )
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (amplification par polymérisation en chaîne)
<b>qPCR</b>	Quantitative PCR
<b>PE</b>	Polyéthylène
<b>PP</b>	Polypropylène
<b>PVC</b>	Polyvinyle chloride (Polychlorure de vinyle)
<b>SDI</b>	Simpson Diversity Index (Indice de Diversité de Simpson)
<b>SSCP</b>	Single Strand Conformation Polymorphism
<b>TSH</b>	Temps de Séjour Hydraulique (j)
<b>UASB</b>	Up-flow Anaerobic Sludge Blanket

- $\gamma$  énergie de surface ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ) ou tension de surface ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ )
- $\gamma^-$  composante donneur d'électron de l'énergie libre de surface  
ou paramètre électron-donneur de la composante acide-base ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )
- $\gamma^+$  composante accepteur de l'énergie libre de surface  
ou paramètre électron-accepteur de la composante acide-base ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )
- $\gamma^{\text{AB}}$  composante polaire ou acide-base de l'énergie libre de surface ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )
- $\gamma^{\text{LW}}$  composante apolaire ou de Lifschitz van der Waals de l'énergie libre de surface  
( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )
- $\theta$  angle de contact ( $^\circ$ )
- $\zeta$  potentiel électrocinétique (potentiel Zêta) – (mV)

<b>INTRODUCTION</b>	<b>21</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>27</b>
<b>I.1 Les biofilms</b>	<b>28</b>
I.1.1 Formation du biofilm	28
I.1.1.1 Etape d'induction	29
I.1.1.2 Etape d'accumulation	31
I.1.1.3 L'étape de maturation du biofilm	33
I.1.2 Composition du biofilm	34
I.1.3 Etude des paramètres influents	34
I.1.3.1 Le support	35
I.1.3.2 Les micro-organismes	38
I.1.3.3 Le milieu liquide et les conditions hydrodynamiques	43
I.1.4 Méthodes d'études du biofilm	43
I.1.4.1 Adhésion de cultures pures	44
I.1.4.2 Coagrégation de cultures mixtes	46
I.1.4.3 Coadhésion de cultures « mixtes »	46
I.1.4.4 Microscopie	47
I.1.4.5 Micro-électrodes	49
I.1.4.6 Etudes des polymères extracellulaires (EPS)	50
I.1.5 Conclusion sur les biofilms	50
<b>I.2 Les procédés de méthanisation à biofilm</b>	<b>51</b>
I.2.1 Le processus de digestion anaérobie	51
I.2.1.1 Activité du consortium anaérobie méthanogène	52
I.2.1.1.1 Les voies métaboliques	52
I.2.1.1.2 Hydrolyse et acidogenèse	53
I.2.1.1.3 Acétogenèse	53
I.2.1.1.4 Les archées méthanogènes	54
I.2.1.2 Conditions physico-chimiques	56
I.2.1.2.1 Le pH	56
I.2.1.2.2 La température	56
I.2.1.2.3 Le potentiel d'oxydoréduction	56
I.2.1.2.4 L'intensité lumineuse	56
I.2.1.3 Besoins nutritionnels	57
I.2.1.3.1 Macroéléments	57
I.2.1.3.2 Oligo-éléments	58

I.2.2	Digestion anaérobie et dépollution	58
I.2.2.1	Les procédés anaérobies intensifs	59
I.2.2.2	Performances des procédés anaérobies à biomasse fixée	61
I.2.2.3	Les limites des performances des procédés anaérobies à biomasse fixée	62
I.2.2.4	Conclusion sur les procédés de dépollution anaérobies à biofilms	63
I.2.3	Démarrage des digesteurs anaérobies à biofilm	64
I.2.3.1	Définition	64
I.2.3.2	Paramètres influents	64
I.2.3.2.1	La technologie	65
I.2.3.2.2	L'alimentation	66
I.2.3.2.2.1	Le type d'effluent à traiter	66
I.2.3.2.2.2	Le rapport C/N	67
I.2.3.2.2.3	Les compléments alimentaires	67
I.2.3.2.2.4	Les cations	67
I.2.3.2.3	La biomasse	68
I.2.3.2.3.1	Structure microbienne	68
I.2.3.2.3.2	L'origine et l'acclimatation de la flore microbienne	68
I.2.3.2.3.3	La quantité de biomasse utilisée	69
I.2.3.2.3.4	La stratégie d'inoculation	69
I.2.3.2.3.5	Le temps de contact	70
I.2.3.2.4	Les conditions de culture	71
I.2.3.2.4.1	La température, le pH et la force ionique	71
I.2.3.2.4.2	Les conditions hydrodynamiques	71
I.2.3.2.4.3	Stratégie de montée en charge	72
I.2.3.2.4.4	Conduite automatique des bioprocédés	75
I.2.3.2.5	Support	75
I.2.3.2.5.1	Effet de la taille	76
I.2.3.2.5.2	Effet de la topographie	76
I.2.3.2.5.3	Effet de la nature chimique	77
I.2.3.2.5.4	Effet d'un traitement préliminaire	78
I.2.3.3	Conclusion sur le démarrage des procédés de méthanisation à biofilm	78
<b>I.3</b>	<b>Conclusion sur l'étude bibliographique</b>	<b>80</b>
	<i>Synthèse de l'étude bibliographique</i>	<b>82</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>83</b>
<b>II.1</b>	<b>Réacteurs et périphériques</b>	<b>84</b>
II.1.1	Réacteur Annulaire Rotatif	84
II.1.1.1	Description du réacteur annulaire rotatif	84
II.1.1.2	Les supports	85

## SOMMAIRE

---

II.1.1.3	Capteurs et connexions	86
II.1.2	Le réacteur à lit fixe	87
II.1.2.1	Description du réacteur à lit fixe	87
II.1.2.2	Distribution des Temps de Séjour (DTS)	88
II.1.2.3	Les supports	89
II.1.2.4	Capteurs, connexions et acquisition	91
II.1.3	Paramètres de fonctionnement des réacteurs	92
<b>II.2</b>	<b>Stratégies de démarrage et de montée en charge</b>	<b>93</b>
<b>II.3</b>	<b>Inocula</b>	<b>94</b>
<b>II.4</b>	<b>Alimentation des réacteurs</b>	<b>95</b>
<b>II.5</b>	<b>Analyses physico-chimiques</b>	<b>97</b>
II.5.1	Dosage des composés solubles	97
II.5.1.1	Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)	97
II.5.1.2	Dosage de l'éthanol	97
II.5.1.3	Dosage des acides gras volatils (AGV)	97
II.5.2	Dosages des matières particulaires	98
II.5.2.1	Dosages des matières en suspension (MES et MVES)	98
II.5.2.2	Quantification de la biomasse fixée	99
II.5.2.2.1	Sur les coupons du RAR	99
II.5.2.2.2	Sur les supports du LF	99
II.5.3	Détermination de la production de biogaz	99
II.5.3.1	Mesure du débit de biogaz	99
II.5.3.2	Détermination de la composition du gaz	99
II.5.4	Caractérisation des supports	100
II.5.4.1	Mesure de rugosité	100
II.5.4.2	Mesure de l'énergie de surface	101
<b>II.6</b>	<b>Mesure de l'adhésion</b>	<b>102</b>
<b>II.7</b>	<b>Etude biologique de la structure microbienne du biofilm</b>	<b>103</b>
II.7.1	Prélèvements	104
II.7.2	Extraction de l'ADN et purification de l'ADN total des échantillons	104
II.7.3	Amplification PCR	105
II.7.4	Polymorphisme de conformation des ADN simples brins et électrophorèse capillaire	105
II.7.5	Amplification par polymérisation en chaîne par polymérase quantitative	106
II.7.6	Indice de diversité	107
<b>II.8</b>	<b>Analyses statistiques utilisées</b>	<b>108</b>
	<b><i>Synthèse du choix du matériel et des méthodes</i></b>	<b>110</b>

<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>111</b>
<b>III.1 Etude de l'adhésion des micro-organismes de la méthanisation</b>	<b>113</b>
III.1.1 Caractérisation des matériaux	113
III.1.1.1 Mesures des paramètres de la rugosité	113
III.1.1.2 Mesure de l'énergie de surface	115
III.1.1.3 Conclusion	117
III.1.2 Mesure de l'adhésion initiale des micro-organismes	118
III.1.2.1 Variabilité de l'adhésion	118
III.1.2.2 Caractérisation granulométrique de l'inoculum	122
III.1.2.3 Taux de recouvrement	125
III.1.2.3 Aspect qualitatif de l'adhésion initiale	129
III.1.2.3.1 Empreinte moléculaire	129
III.1.2.3.2 Proportion d'archées	133
III.1.3 Conclusion sur l'adhésion initiale des micro-organismes	135
<b>Schéma synoptique de l'étude de l'adhésion initiale</b>	<b>136</b>
<b>Synthèse de l'étude de l'adhésion initiale</b>	<b>137</b>
<b>III.2 Etude de la colonisation par les micro-organismes</b>	<b>138</b>
III.2.1 Suivi des réacteurs au cours de la colonisation	138
III.2.2 Etude du biofilm après 15 jours de croissance	143
III.2.2.1 Quantification des biofilms à 15 jours	143
III.2.2.2 Les populations archéennes du biofilm à 15 jours	146
III.2.2.3 Empreinte moléculaire des biofilms à 15 jours	149
III.2.3 Etude du biofilm après 30 jours de croissance	152
III.2.3.1 Quantification des biofilms à 30 jours	152
III.2.3.2 Les populations archéennes à 30 jours	154
III.2.3.3 Empreinte moléculaire des biofilms à 30 jours	156
III.2.4 Discussion sur la mise en place des biofilms	159
<b>Schéma synoptique de l'étude de la colonisation</b>	<b>164</b>
<b>Synthèse de l'étude de la colonisation</b>	<b>165</b>
<b>III.3 Etude du démarrage d'un réacteur à lit fixe.</b>	<b>166</b>
III.3.1 Données générales sur les réacteurs à lits fixes	167
III.3.2 Caractérisation des matériaux	168
III.3.2.1 Mesure de la rugosité	168
III.3.2.2 Mesure de l'énergie de surface	170
III.3.2.3 Conclusion	171
III.3.3 L'épuration dans les réacteurs à lits fixes	173
III.3.4 La colonisation des supports des réacteurs à lits fixes	181

## SOMMAIRE

---

III.3.4.1	Quantification des biofilms	181
III.3.4.2	Les populations archéennes	182
III.3.4.3	Empreinte moléculaire	184
III.3.5	Conclusion sur le suivi des réacteurs à lits fixes	186
	<i>Schéma synoptique de l'étude du démarrage d'un réacteur à lit fixe</i>	<b>188</b>
	<i>Synthèse de l'étude du démarrage d'un réacteur à lit fixe</i>	<b>189</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>190</b>
	<b>Conclusion</b>	<b>191</b>
	<b>Perspectives</b>	<b>193</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>196</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>210</b>
A.	Angles de contact	211
B.	ACP des paramètres de surfaces des coupons du RAR	213
C.	Suivi des réacteurs a lits fixes : « PE » et « PP »	217
D.	Suivi des réacteurs a lits fixes : « PVC » et « Bioflow 30® »	222
E.	Suivi des réacteurs a lits fixes : « PP » et « PVC »	227
F.	Suivi des réacteurs a lits fixes : « PE » et « Bioflow 30® »	232
G.	Profils bactériens des biofilms des Lits Fixes	237
H.	Profils archéens des biofilms des Lits Fixes	240

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution du nombre d'articles scientifiques au cours du temps.....	23
Figure I-1: Courbe de croissance d'un biofilm .....	28
Figure I-2 : Différences d'accessibilité des corps sphériques à une surface plane.....	31
Figure I-3 : Représentation de l'angle de contact ( $\theta$ ) au point triple.....	35
Figure I-4 : Goniomètres G10 (Krüss, Allemagne) .....	36
Figure I-5 : Représentation schématique du déplacement de particules chargées.....	39
Figure I-6 : Dispositif expérimental du zétamètre laser zetaphoremeter II.....	40
Figure I-7 : Représentation schématique des flux dans les chambres à flux :.....	45
Figure I-8 : Principales voies métaboliques, nature des populations microbiennes et flux de C.....	52
Figure I-9 : Arbre phylogénétique simplifié des êtres vivants .....	54
Figure I-10 : Evolution de l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) lors des réactions de conversion.....	55
Figure I-11 : Equivalence énergétique d'un mètre cube de méthane .....	58
Figure I-12 : Comparaison des procédés à fortes charges.....	62
Figure II-1 : Réacteur annulaire rotatif (RAR).....	85
Figure II-2 : Vue éclatée du réacteur annulaire rotatif (RAR) .....	85
Figure II-3 : Photographie des coupons utilisés dans le RAR.....	86
Figure II-4 : Schéma d'ensemble du réacteur annulaire rotatif (RAR) .....	87
Figure II-5 : Schéma du réacteur à lit fixe.....	88
Figure II-6 : Comparaison des valeurs normées des DTS (Lit fixe à Bioflow 30®).....	89
Figure II-7 : Bioflow 30® (Rauschert GmbH).....	90
Figure II-8 : Connexions utilisées sur le procédé LF à Bioflow 30®.....	92
Figure II-9 : Schéma simplifié de l'unité optique d'un granulomètre LASER.....	95
Figure II-10 : Photographie du rugosimètre Mahr M2 (Mahr GmbH, Göttingen, Germany).....	101
Figure II-11 : Photographie du goniomètre Kruss G10 .....	101
Figure II-12 : Principe de la microscopie à épifluorescence.....	102
Figure II-13 : Représentation schématique de l'étude de la structure microbienne du biofilm.....	103
Figure III-1 : Cercle des corrélations des paramètres des coupons du RAR.....	116
Figure III-2 : Représentation des matériaux en fonction des axes de corrélations .....	117
Figure III-3 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées et des bactéries.....	120
Figure III-4 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées et des bactéries.....	121
Figure III-5 : Répartition granulométrique des particules de l'inoculum (en volume relatif).....	122
Figure III-6 : Répartition granulométrique des particules de l'inoculum (en nombre relatif).....	123
Figure III-7 : Répartition granulométrique des particules adhérees aux matériaux.....	124
Figure III-8 : Exemple d'images traitées lors du calcul du taux de recouvrement.....	126
Figure III-9 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées .....	130
Figure III-10 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées .....	131
Figure III-11 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries .....	132
Figure III-12 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries.....	133
Figure III-13 : Pourcentage d'archées dans l'inoculum et dans les populations adhérees.....	134
Figure III-14 : Cinétique de l'évolution du rendement épuratoire et de la CVA (RAR 1 et 2) .....	140

## LISTE DES FIGURES

---

Figure III-15 : Cinétique de l'évolution de la concentration en AGV et de la CVA (RAR 1 et 2).....	141
Figure III-16 : Cinétique de l'évolution du pourcentage de DCO due aux AGV (RAR 1 et 2).....	142
Figure III-17 : Les différents compartiments d'un système à biofilm .....	145
Figure III-18 : Concentration cellulaire et proportion d'archées des biofilms après 15 jours .....	147
Figure III-19 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries (en haut).....	149
Figure III-20 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées de l'inoculum .....	150
Figure III-21 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries de l'inoculum.....	150
Figure III-22 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées fortement attachées.....	151
Figure III-23 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries fortement attachées.....	151
Figure III-24 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées libres .....	151
Figure III-25 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries libres.....	151
Figure III-26 : Masse de biofilm sur chacun des matériaux après 15 et 30 j d'activité .....	153
Figure III-27 : Proportion d'archées dans l'inoculum, dans les biofilms et le milieu liquide.....	155
Figure III-28 : Concentration cellulaire dans chacun des biofilms.....	156
Figure III-29 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées fortement attachées.....	157
Figure III-30 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries fortement attachées.....	157
Figure III-31 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées fortement attachées.....	157
Figure III-32 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries fortement attachées.....	157
Figure III-33 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées libres .....	158
Figure III-34 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries libres.....	158
Figure III-35 : Masse des biofilms et quantité de cellules sur les coupons après 15 jours.....	159
Figure III-36 : Masse des biofilms et quantité de cellules sur les coupons après 30 jours.....	162
Figure III-37 : Valeurs des paramètres de rugosité des supports utilisés .....	169
Figure III-38 : Valeurs des paramètres d'énergie de surface des supports utilisés.....	171
Figure III-39 : Représentation des matériaux en fonction des axes de corrélation .....	172
Figure III-40 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C1).....	177
Figure III-41 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C2).....	178
Figure III-42 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C3).....	178
Figure III-43 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C4).....	179
Figure III-44 : Pourcentage d'archées dans l'inoculum et dans les populations.....	183
Figure III-45 : Cercle des corrélations des profils SSCP bactériens des biofilms (C1 à C4).....	184
Figure III-46 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries attachées .....	185
Figure III-47 : Cercle des corrélations des profils SSCP archéens des biofilms (C1 à C4).....	186
Figure A-1 : Valeurs des angles de contact (en degré) permettant le calcul des énergies de surfaces .....	211
Figure A-2 : Mesures d'angles de contact à l'aide du goniomètre Krüss G23 sur du Cloisonyle®.....	212
Figure C-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PE et PP (C1).....	217
Figure C-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PE-C1) .....	218
Figure C-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PP-C1) .....	218
Figure C-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PE-C1) .....	219
Figure C-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PP-C1) .....	219

## LISTE DES FIGURES

---

Figure C-6 : Evolution des concentrations en AGV (PE-C1) .....	220
Figure C-7 : Evolution des concentrations en AGV (PP-C1) .....	220
Figure C-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PE-C1) .....	221
Figure C-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PP-C1) .....	221
Figure D-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PVC et Bf30 (C2) .....	222
Figure D-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (Bf30-C2) .....	223
Figure D-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PVC-C2) .....	223
Figure D-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (Bf30-C2) .....	224
Figure D-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PVC-C2) .....	224
Figure D-6 : Evolution des concentrations en AGV (Bf30-C2) .....	225
Figure D-7 : Evolution des concentrations en AGV (PVC-C2) .....	225
Figure D-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (Bf30-C2) .....	226
Figure D-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PVC-C2) .....	226
Figure E-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PVC et PP (C3) .....	227
Figure E-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PP-C3) .....	228
Figure E-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PVC-C3) .....	228
Figure E-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PP-C3) .....	229
Figure E-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PVC-C3) .....	229
Figure E-6 : Evolution des concentrations en AGV (PP-C3) .....	230
Figure E-7 : Evolution des concentrations en AGV (PVC-C3) .....	230
Figure E-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PP-C3) .....	231
Figure E-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PVC-C3) .....	231
Figure F-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PE et Bf30 (C4) .....	232
Figure F-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PE-C4) .....	233
Figure F-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (Bf30-C4) .....	233
Figure F-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PE-C4) .....	234
Figure F-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (Bf30-C4) .....	234
Figure F-6 : Evolution des concentrations en AGV (PE-C4) .....	235
Figure F-7 : Evolution des concentrations en AGV (Bf30-C4) .....	235
Figure F-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PE-C4) .....	236
Figure F-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (Bf30-C4) .....	236
Figure G-1 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des biofilms (C1 à C4) .....	237
Figure G-2 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports en PE .....	237
Figure G-3 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports en PP .....	238
Figure G-4 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports en PVC .....	238
Figure G-5 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports Bf30 .....	239
Figure H-1 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées .....	240
Figure H-2 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports en PE .....	240
Figure H-3 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports en PP .....	241
Figure H-4 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports en PVC .....	241

## LISTE DES FIGURES

---

*Figure H-5 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports Bf30..... 242*

## LISTE DES TABLEAUX

---

<i>Tableau I-1 : Caractéristiques énergétiques de liquides utilisés pour les mesures de <math>\theta</math></i> .....	37
<i>Tableau I-2 : Solvants utilisés pour la méthode MATS :</i> .....	41
<i>Tableau I-3 : Méthodes d'étude de l'adhésion microbienne</i> .....	46
<i>Tableau I-4 : Caractéristiques des démarrages de procédés à lit fixe ou fluidisé</i> .....	65
<i>Tableau II-1 : Caractéristiques des réacteurs à lit fixe</i> .....	88
<i>Tableau II-2 : Masses des différents supports de type Bioflow 30® utilisés dans le LF</i> .....	90
<i>Tableau II-3 : Calcul des paramètres de fonctionnement des réacteurs</i> .....	92
<i>Tableau II-4 : Concentrations et activités spécifiques des inocula</i> .....	94
<i>Tableau II-5 : Caractéristiques physico-chimiques du vin utilisé pour l'alimentation</i> .....	96
<i>Tableau II-6 : Composition de la solution d'éléments métalliques</i> .....	96
<i>Tableau II-7 : Séquences cibles des amorces utilisées</i> .....	105
<i>Tableau II-8 : Amorces utilisées lors de la PCRq</i> .....	106
<i>Tableau III-1 : Paramètres de rugosité des supports du RAR</i> .....	114
<i>Tableau III-2 : Paramètres d'énergies de surface des supports du RAR</i> .....	115
<i>Tableau III-3 : Comparatif des taux d'adhésion lors du test de variabilité en triplicats (%)</i> .....	118
<i>Tableau III-4 : Comparatif des indices de diversité lors du test de variabilité en triplicats</i> .....	119
<i>Tableau III-5 : Pourcentage de surface recouverte après 2 h de contact</i> .....	127
<i>Tableau III-6 : <math>r</math> et <math>R^2</math> entre adhésion et rugosité ou énergie de surface</i> .....	128
<i>Tableau III-7 : Quantité de biomasse faiblement (fraction 1) et fortement attachée (fraction 2) sur les coupons après 15 jours de colonisation (en <math>g.m^{-2}</math>)</i> .....	144
<i>Tableau III-8 : Proportions d'archées sur les coupons après 15 jours</i> .....	146
<i>Tableau III-9 : Quantité de biomasse faiblement (fraction 1) et fortement attachée (fraction 2) sur les coupons après 30 jours de colonisation (en <math>g.m^{-2}</math>)</i> .....	152
<i>Tableau III-10 : Proportions d'archées faiblement (fraction 1) et fortement attachée</i> .....	154
<i>Tableau III-11 : Paramètres de rugosité des supports du LF</i> .....	168
<i>Tableau III-12 : Paramètres d'énergie de surface des supports du LF</i> .....	170
<i>Tableau III-13 : Paramètres de production de méthane lors de la comparaison des LF</i> .....	176
<i>Tableau III-14 : Principaux paramètres quantitatifs permettant la comparaison des LF</i> .....	180
<i>Tableau III-15 : Paramètres quantitatifs des biofilms des LF</i> .....	181

# **INTRODUCTION**

---

## INTRODUCTION

La découverte de la digestion anaérobie (ou méthanisation) remonte à 1776 lorsque A.VOLTA durant une de ses promenades observa que du gaz se libérait d'un marais. Après avoir étudié ce phénomène et fait plusieurs expériences, il mit en évidence que le «gaz des marais» était inflammable. Un peu plus tard (1787), A.L. LAVOISIER lui donne le nom de «gas hidrogenium carbonatrum» mais le terme de «méthane» fut proposé en 1865 et confirmé en 1892 par un congrès international de nomenclature chimique. Pendant ce temps, la présence de ce gaz est mise en évidence dans d'autres sites (tas de fumier, ...) et son origine attribuée à l'activité microbienne. A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, la première installation produisant du méthane voit le jour à Exeter en Grande-Bretagne, elle permet l'éclairage des rues de la ville.

Les développements modernes de la méthanisation sont issus des travaux d'IMHOFF sur les boues urbaines et de DUCELLIER sur les rejets d'élevages. Ils sont toujours utilisés de nos jours et la digestion anaérobie s'est révélée être un procédé adapté pour le traitement des effluents des Industries Agro-Alimentaires. Toutefois, les faibles taux de croissance des micro-organismes anaérobies imposent aux procédés rustiques des temps de séjour hydrauliques élevés (une dizaine de jours pour les effluents liquides, de 20 à 55 jours pour les déchets solides) ainsi que des charges volumiques appliquées souvent réduites ( $1\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{j}^{-1}$ ) et donc un volume utile important. La mise au point de procédés plus compacts, grâce à une rétention importante de la biomasse active sous la forme de biofilms ou de boue granulaire, a rendu possibles des traitements à moyenne puis à forte charge appliquée. Dans ce type de réacteur, la concentration en biomasse active élevée permet de diminuer le temps de séjour hydraulique tout en maintenant un temps de séjour de la biomasse (âge de boues) élevé, et donc le volume du réacteur à performance équivalente.

Une simple recherche par mots-clés sur le « Web of Knowledge » permet d'appréhender l'intérêt actuel pour les « biofilms » et la « digestion anaérobie ». La Figure 1 illustre bien cette attention caractérisée par une production scientifique en forte progression depuis le début des années 1990. Elle reste cependant encore peu abondante si l'on combine les deux mots clés.

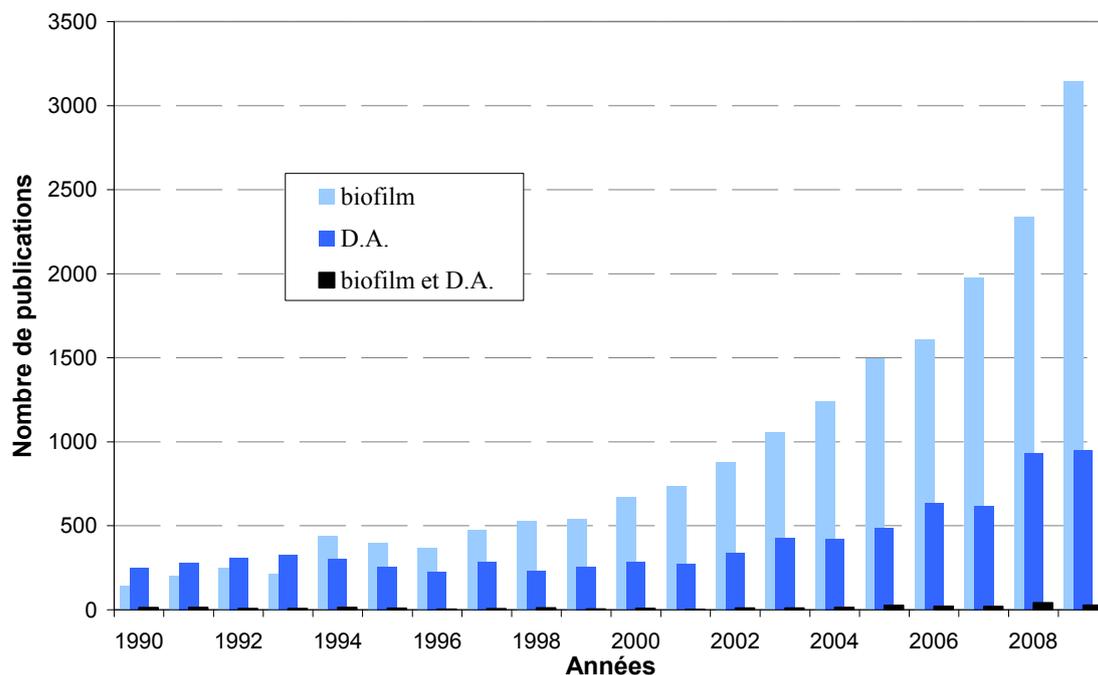


Figure 1 : Evolution du nombre d'articles scientifiques au cours du temps se rapportant aux seuls mots clés « biofilm » et « anaerobic digestion » (D.A.) ou aux deux simultanément.

La majorité des études sur les biofilms sont menées en cultures pures et rarement en condition anaérobie. Les travaux sur la digestion anaérobie des effluents liquides portent plus sur les réacteurs à granules (628 publications entre 1990 et 2010) que sur les procédés anaérobies à biofilm (284 publications).

Ces procédés intensifs semblent s'imposer pour le traitement des effluents. Dans le cas des réacteurs à biofilm, même si les très hautes performances de ce type de réacteurs de digestion anaérobie peuvent être améliorées, il reste encore une étape mal maîtrisée, celle du démarrage. La réduction du temps de démarrage est étroitement liée à la formation et à la maturation d'un biofilm actif mais la colonisation de tous les matériaux solides n'est probablement pas qu'une question de temps. Des travaux récents (CRESSON *et al.* 2008) ont mis en lumière le rôle primordial des premiers instants de contact entre le support et la biomasse libre. De plus, la littérature met en avant le fait que la nature des interactions biomasse/support/milieu est dépendante de nombreux paramètres liés à l'environnement (pH, force ionique, conditions hydrodynamiques,...) ainsi qu'aux « surfaces » des cellules et des solides (rugosité, énergies de surface,...) (PALMER *et al.* 2007; HORI *et al.* 2010).

## INTRODUCTION

Les connaissances que nous voulons acquérir sur le rôle de chacun des paramètres contrôlant cette colonisation peuvent nous permettre de mettre tous les atouts de notre côté afin que la période de démarrage soit la moins longue possible, mais aussi que le biofilm formé soit le plus performant. Ainsi, nous pensons que l'efficacité du système peut être optimisée par une meilleure connaissance des liens qui existent entre le consortium anaérobie et le matériau du support microbien.

Pour cela, nous avons défini la période de démarrage d'un réacteur méthanogène à biomasse fixée comme étant la **durée nécessaire à la mise en place d'un biofilm suffisamment mature pour présenter une activité stable**, c'est à dire au temps nécessaire pour amener le réacteur à sa charge nominale avec une efficacité d'épuration acceptable souvent fixée à 80 %. Cette définition étant établie, **nous nous proposons d'améliorer cette période de démarrage**, c'est à dire de mieux appréhender cette étape dans le cas des réacteurs intensifs de méthanisation, afin d'obtenir, de manière simultanée si possible, un gain de temps et un biofilm de meilleure qualité. Cela n'est possible qu'en contribuant à la compréhension des mécanismes de mise en place et de maturation des biofilms méthanogènes. Or, pour connaître avec précision les mécanismes de la fixation d'une population de micro-organismes anaérobies sous la forme d'un biofilm, il n'est pas possible d'échapper à une approche multidisciplinaire large. Ainsi, lors des étapes initiales de mise en contact des micro-organismes et du support, une évaluation préalable des caractéristiques physico-chimique des matériaux est nécessaire ; l'utilisation de techniques microbiologiques d'investigation puissantes (microscopie, biologie moléculaire,...) doit nous permettre de visualiser *in situ* le développement du biofilm. Ainsi, le développement récent d'outils moléculaires semi-quantitatifs pourrait permettre de mieux cibler certains groupes microbiens qui se fixent sur les matériaux.

**L'objectif de ce travail est de mieux comprendre le rôle des matériaux de fixation sur la formation des biofilms anaérobies afin d'améliorer l'étape de démarrage des procédés.**

**Notre but est de déterminer le lien éventuel entre les caractéristiques du support et celles de l'adhésion et de la fixation des micro-organismes responsables de la digestion anaérobie. Pour cela, les caractéristiques de matériaux supports seront confrontées à des données quantitatives et qualitatives sur l'adhésion et la formation du biofilm, puis aux performances (rendement épuratoire, charge volumique appliquée maximale atteinte et durée de démarrage) des réacteurs de méthanisation.**

## INTRODUCTION

Quatre axes d'exploration vont nous aider à atteindre cet objectif :

- La caractérisation des matériaux :

Les matériaux ont été choisis parmi ceux couramment utilisés dans l'industrie : des polymères plastiques. La caractérisation des matériaux choisis est réalisée en termes de **rugosité et d'énergie de surface**. S'agissant dans tous les cas de polymères plastiques, il n'est peut-être pas, *a priori*, possible de déceler des différences notables. Ils seront donc comparés à des supports minéraux : l'acier inoxydable 304 et le verre borosilicaté.

- Le rôle des matériaux sur l'adhésion initiale des micro-organismes :

Un test d'adhésion rapide des micro-organismes responsables de la digestion anaérobie a été effectué à l'aide d'un réacteur annulaire rotatif. Il nous permet de mesurer l'impact de la nature des matériaux sur l'adhésion initiale du consortium microbien. Cette évaluation est à la fois quantitative et qualitative.

- Le rôle des matériaux sur la colonisation par les micro-organismes :

Un test de colonisation des matériaux a été effectué à l'aide d'un réacteur annulaire rotatif. Il nous permet de mesurer l'impact de la nature des matériaux sur la colonisation des supports par le consortium microbien. Cette évaluation est à la fois quantitative et qualitative.

- Le démarrage d'un réacteur à lit fixe.

Les démarrages de réacteur à lit fixe contenant des supports microbiens de natures différentes ont été comparés. Cette étude permet de tester l'impact de la nature physico-chimique des supports sur la durée du démarrage d'un réacteur à lit fixe. Son objectif est de mesurer la mise en place d'un biofilm anaérobie avec chacun des matériaux choisis.

Ces différents axes doivent permettre de répondre aux questions suivantes :

- l'adhésion des micro-organismes responsables de la digestion anaérobie peut-elle être reliée aux caractéristiques physico-chimiques des matériaux ? Si oui, l'impact est-il d'ordre quantitatif ou/et qualitatif ?

- les caractéristiques physico-chimiques des matériaux ont-elles un lien avec la colonisation de ces matériaux par les micro-organismes ? Si oui, l'impact est-il d'ordre quantitatif ou qualitatif ?

- Les différences de colonisation observées sont-elles de nature à modifier le démarrage des réacteurs intensifs de méthanisation ?

## **INTRODUCTION**

Dans ce manuscrit, le chapitre 1 fait le point sur les connaissances bibliographiques relatives aux biofilms et à la digestion anaérobie. Il se conclut sur les enjeux scientifiques de la thèse. Le chapitre 2 établit les principes et les spécifications techniques des matériels et méthodes utilisés lors des expérimentations. Dans le chapitre 3, ce sont l'ensemble des résultats de l'étude qui sont présentés et discutés. Ce travail se conclut par un résumé des résultats obtenus et par les perspectives d'études qu'ils engendrent.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1 LES BIOFILMS

Il s'agit de structures au sein desquelles des cellules microbiennes sont englobées dans une matrice complexe. Ce sont les conditions environnementales de cet assemblage qui vont en déterminer la structure. Plus de 99% des populations bactériennes existent au sein de biofilms (COSTERTON *et al.* 1987). Les bactéries libres (planctoniques) ne profitent pas des nombreux avantages qu'offre cette stratégie de survie développée par les micro-organismes fixés (benthoniques). Ce mode de vie fixée pouvant, en effet, garantir une position plus stable en optimisant l'accès aux nutriments, les transferts de matière et les échanges d'informations chimiques et biologiques (quorum sensing, transfert de gènes...). En outre, plus les cellules microbiennes sont proches de la couche basale, plus elles sont protégées des agressions du milieu extérieur (rayonnement, substances toxiques, prédation...) et sont donc plus aptes à survivre dans des conditions d'environnement défavorables. Ces avantages prennent encore plus d'ampleur dans le cas de biofilms mettant en jeu une chaîne trophique où les différentes espèces syntrophes profitent d'une proximité spatiale et ainsi d'une meilleure disponibilité des substrats. Les biofilms jouent donc un rôle de réservoirs d'espèces microbiennes et garantissent l'équilibre écologique.

#### I.1.1 Formation du biofilm

En première approximation Characklis et Marshall proposent trois phases : induction, accumulation et plateau (CHARACKLIS *et al.* 1990). La croissance d'un biofilm prend alors la forme d'une courbe sigmoïde (Figure I-1).

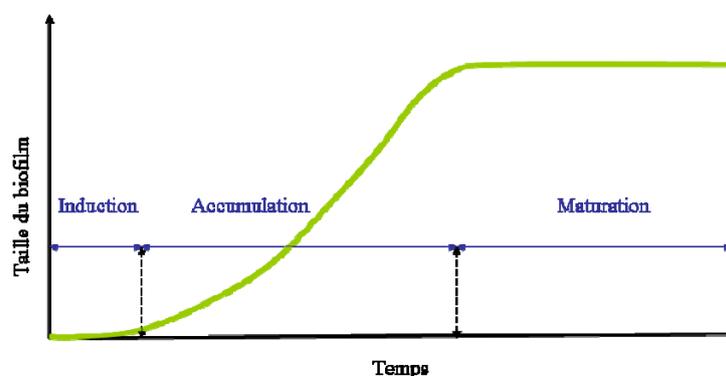


Figure I-1: Courbe de croissance d'un biofilm .

La formation d'un biofilm mature est généralement décrite selon 3 ou 4 étapes successives en fonction des auteurs. Mais, selon le niveau de détail de la description, le nombre d'étapes peut varier. Ainsi, l'étape d'induction peut prendre en compte le conditionnement de la surface et le transport des cellules microbiennes vers cette surface (BUSSHER *et al.* 1995). Bos et al (BOS *et al.* 1999) vont plus loin encore en décrivant 5 stades lors de l'étape d'induction.

### I.1.1.1 Etape d'induction

**Le conditionnement** de la surface est un processus quasi instantané lorsqu'un solide est plongé dans un liquide. Les molécules situées à la surface du solide réagissent avec les molécules du milieu aqueux. La charge de surface du solide peut être modifiée soit par ionisation soit par adsorption d'ions. Des macromolécules organiques sont aussi susceptibles d'être adsorbées à la surface du solide et facilitent la fixation ultérieure de micro-organismes.

**Le transport** des cellules microbiennes vers la surface du support solide peut être passif comme celui dû aux forces de gravité dans un environnement calme (sédimentation), aux mouvements browniens ou au déplacement du liquide dans lequel support et microbes sont plongés. Si l'écoulement du liquide est laminaire, la diffusion prédominera tandis que la convection sera majoritaire en régime turbulent. Le transport peut aussi être actif dans le cas où les micro-organismes sont mobiles (bactéries ciliées ou flagellées).

La phase d'induction proprement dite correspond à une période d'adhésion pendant laquelle les bactéries s'adaptent à leur nouvel environnement. Elle comprend une adhésion réversible, un ancrage et une co-adhésion.

**L'adhésion réversible** dépend des forces électriques existant entre le support et la cellule, c'est à dire des propriétés physico-chimiques des surfaces mises en jeu. Dans cette approche, les micro-organismes et le support sont soumis à trois forces non covalentes : les forces de Van der Waals, les forces de Lewis et les forces entre doubles couches électriques. Afin de modéliser le phénomène d'adhésion des micro-organismes sur un support, deux théories différentes ont décrit les interactions physico-chimiques non covalentes (de type van der Waals (LW), Lewis acide-base (électron-donneur/électron- accepteur) (AB) et électrostatiques (EL) entre la surface du micro-organisme et celle du support.

- La première est la théorie de la stabilité de l'état colloïdal ou DLVO (DERJAGUIN *et al.* 1941; VERWEY *et al.* 1948), qui décrit l'adhésion comme un équilibre entre interactions électrostatiques (EL) et interactions de type London-van der Waals (LW).

- La seconde, basée sur l'énergie de Gibbs mise en œuvre lors de la création et de la destruction d'interactions entre les deux corps, est la théorie du mouillage. Elle décrit les mouvements de colloïdes d'après la thermodynamique des surfaces appliquée aux micro-organismes en suspension. Elle prend en compte l'ensemble des interactions intermoléculaires, à l'exception des interactions électrostatiques.

L'unité de ces deux théories obtenue en 1988 est appelée théorie DLVO étendue (XDLVO). Elle combine l'ensemble des forces primaires précédemment décrites (LW, AB, EL et BR) (Van OSS *et al.* 1988). L'enthalpie libre (Energie libre de Gibbs) qui en découle ( $\Delta G^{\text{TOT}}$ ) est alors donnée par l'équation :

$$\Delta G^{\text{TOT}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}} + \Delta G^{\text{EL}} \quad [1]$$

Où :

$\Delta G^{\text{LW}}$  : L'enthalpie libre liée aux forces de van der Waals

$\Delta G^{\text{AB}}$  : L'enthalpie libre liée aux forces acide-base de Lewis

$\Delta G^{\text{EL}}$  : L'enthalpie libre liée aux forces électrostatiques

Ces interactions seront attractives si  $\Delta G^{\text{TOT}} < 0$  et répulsives dans le cas contraire.

Cependant, le simple fait que les micro-organismes ne soient pas de simples particules colloïdales inertes limite la portée de la théorie DLVO. Les caractéristiques des surfaces cellulaires sont hétérogènes dans l'espace et dans le temps. Elles peuvent changer en fonction des modifications des conditions physiologiques et environnementales (SANIN 2003), les micro-organismes sont capables de produire des composés extracellulaires et peuvent présenter des appendices protéiques (flagelles, pili, fimbriae) susceptibles de modifier leurs propriétés d'adhésion, spécifique ou non, à des surfaces (ZITA *et al.* 1997 ; IWABUCHI *et al.* 2003). L'exemple illustré (Figure I-2) montre comment une cellule peut établir un contact avec une surface grâce à des appendices pénétrant le champ de répulsion.

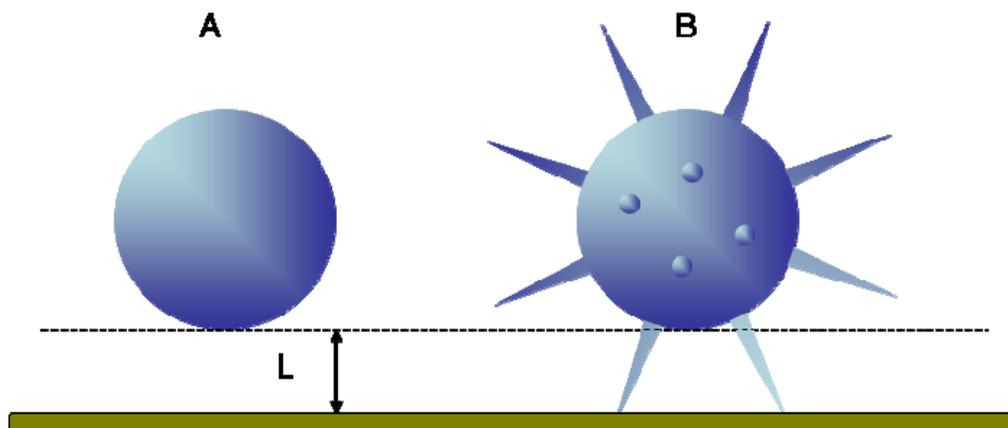


Figure I-2 : Différences d'accessibilité des corps sphériques à une surface plane  
 A : particule lisse, B : particule avec appendices, L : distance minimale. D'après (Van OSS 2005)

Dans cette figure, la valeur de L indique la distance la plus faible entre une cellule ou particule hydrophile lisse (A) ne pouvant pas entrer en contact avec une surface hydrophile plane. Leur répulsion mutuelle les empêche de s'approcher à moins de 4 ou 5 nm environ. A cette même distance, une cellule ou particule sphérique semblable mais pourvue d'appendices (B) peut établir un contact avec une surface hydrophile plane grâce à ces structures extracellulaires qui pénètrent facilement le champ de répulsion.

Ainsi adsorbé à la surface, le micro organisme peut consolider sa fixation. Les substances, généralement polysaccharidiques sécrétées, lui permettront de s'encapsuler à la surface. Cet **attachement irréversible** (ou bio-attachement) est beaucoup plus lent et dépend de la nature du microbe et de son activité métabolique, ainsi que des conditions physico-chimiques du milieu liquide. En parallèle, les processus de **co-adhésion** et de **co-agrégation** interviennent, certains micro-organismes ne pouvant adhérer qu'avec d'autres cellules. Des interactions entre les espèces bactériennes débutent pour générer un biofilm multi-spécifique. A ce stade, la phase d'ancrage est terminée mais une désorption reste toujours possible. Ce n'est donc que par abus de langage que l'adjectif « irréversible » est utilisé pour caractériser cette étape. Une désorption étant plus difficile comparée à celle de l'adhésion réversible.

#### I.1.1.2 Etape d'accumulation

Cette deuxième phase de la formation du biofilm se fait grâce à la prolifération des micro-organismes et au développement de la matrice extracellulaire. Cette extension crée un nouvel environnement encore plus propice au développement microbien. La multiplication des cellules en place entraîne la formation de micro-colonies qui vont confluer pour aboutir à la

formation d'une couche épaisse. Un microenvironnement se met en place dans cette matrice de polymères. La croissance des micro-organismes est favorisée grâce à une certaine homéostasie. Dans ces conditions propices, la croissance du biofilm peut se produire grâce à la division des cellules et à leur redistribution par mouvement actif. Elles vont initier la formation du biofilm car elles sont capables de se mouvoir grâce à leurs cils et flagelles mais aussi par glissement ou par contraction. A cela s'ajoute le recrutement de cellules libres dans le milieu liquide environnant. Les cellules sont entourées d'une faible quantité de polymères extracellulaires (EPS). Ces EPS sont composées de polysaccharides et de protéines, parfois de lipides et d'acides aminés (FLEMMING *et al.* 2001). La croissance et la structure du biofilm sont largement déterminées par la production de cette matrice. La capacité des micro-organismes à sécréter des exopolymères favorise aussi l'attraction du support en permettant de réduire la barrière d'énergie libre à l'interface. Associée au métabolisme, l'étape de fixation irréversible est plus lente que la précédente : elle n'est plus purement chimique. Le regroupement des micro-organismes en agrégats autour de la surface et la présence de nutriments favorisent la synthèse d'exopolysaccharides qui, en s'additionnant aux liaisons déjà existantes, vont créer une matrice dans laquelle les bactéries seront immobilisées de manière très forte.

Le phénomène de «quorum-sensing» (ou signalisation intercellulaire), considéré comme étant un mécanisme de régulation clé dans l'adaptation écologique des bactéries, se met en place (DAVIES *et al.* 1998). Ce système, qui permet aux micro-organismes de se comporter comme une population et non comme des cellules individuelles, est fondé sur la production de phéromones diffusibles (homosérines lactones chez les Gram négatif, peptides chez les Gram positif). Ces molécules appelées auto-inducteurs diffusent à travers l'enveloppe bactérienne et lorsque leur concentration atteint un seuil critique elles induisent l'activation de gènes ciblés grâce à un activateur transcriptionnel spécifique (JOUENNE 2008). D'autres systèmes à deux composants (protéine kinase senseur et protéine régulatrice) ont été révélés (DOREL *et al.* 1999) ; (PARKINS *et al.* 2001) ; (PRIGENT-COMBARET *et al.* 2001)

Dans le cas de réacteurs où le milieu est fortement agité, les mécanismes hydrodynamiques sont prépondérants. Dans des conditions d'écoulement laminaire, les agrégats de cellules ressemblent à des champignons, le biofilm est qualifié d'anisotropique. Sous des contraintes hydrodynamiques fortes, ces agglomérats cellulaires s'allongent dans le sens du courant sous forme de bannières (COSTERTON *et al.* 1995) ; (PICIOREANU *et al.* 1998).

### I.1.1.3 L'étape de maturation du biofilm

L'augmentation en épaisseur du biofilm est corrélée à l'équilibre entre la charge organique appliquée et l'intensité des contraintes. Cette épaisseur atteint un plateau lorsque les phénomènes de croissance, conditionnés par l'accès au substrat, sont contrebalancés par le détachement.

La **croissance** du biofilm dépend de la charge surfacique en substrat appliquée, c'est à dire de la quantité de substrat apportée par unité de surface et par unité de temps. La quantité de biomasse augmente en fonction de la quantité de nutriments accessibles jusqu'à ce que la résistance diffusionnelle soit trop importante. L'augmentation de l'épaisseur du biofilm atteint alors une valeur maximale. C'est à ce moment que le détachement intervient, il compense la croissance et permet aux micro-organismes de retrouver un environnement plus favorable (O'TOOLE *et al.* 2000).

Le **détachement** du biofilm peut être dû à plusieurs phénomènes décrits par Turan :

- l'érosion ou la perte de petites sections de biofilm,
- la mue, en anglais « sloughing », une perte massive et rapide liée à un changement brutal de l'environnement
- et l'abrasion qui se produit lors de collisions du support microbien (TURAN 2000).

A ce stade de la maturation du biofilm, il est possible d'observer un détachement naturel de micro-colonies sans raisons apparentes. Il a même été montré que le détachement pouvait être précédé d'une modification des cellules avec une synthèse de flagelles et une perte de pili (SAUER *et al.* 2001). A ce stade de développement, les propriétés physiques du biofilm vont dépendre des conditions hydrodynamiques. Plus elles seront fortes plus les biofilms seront fins et denses (LIU *et al.* 2002). Les grappes de cellules décrites au paragraphe précédent vont s'allonger selon les lignes de courant, et ce en lien avec la force hydrodynamique.

Dans le cas de populations mixtes, la distribution des différentes populations microbiennes à travers le biofilm résulte des gradients de concentrations des différents substrats générés par la résistance diffusionnelle du biofilm. Des observations montrent une organisation spatiale du biofilm sous la forme d'une succession de couches des différents groupes trophiques (BATSTONE *et al.* 2004). Lors de la digestion anaérobie et d'après l'ordre d'utilisation des

substrats, les bactéries acidogènes, qui présentent une croissance rapide, composent majoritairement les couches externes du biofilm, tandis que les méthanogènes acétoclastes sont plutôt présentes dans les parties internes et profondes. Alors que Cresson obtient un biofilm relativement homogène en termes de répartition des groupes d'archées et de bactéries (CRESSON *et al.* 2009). Cette différence est dépendante de la nature substrat. Le premier auteur utilisait des effluents de brasserie et de sucreries de canne, le second travaillait avec de l'éthanol pour lequel il y a moins de limitation diffusionnelle.

Le fait que les bactéries des biofilms soient plus résistantes aux agressions montre qu'elles ont un métabolisme et une physiologie différents des cellules planctoniques (STEWART *et al.* 2001). Ces différences ne pouvant pas être expliquées simplement par le fait que les micro-organismes sont attachés et présents dans une matrice d'exopolymères. En effet le phénotype « biofilm » est génétiquement programmé. Des réseaux de régulation complexes impliqués dans l'attachement des bactéries à une surface et dans leur différenciation en biofilm ont été mis en évidence (D'ARGENIO *et al.* 2004).

### **I.1.2 Composition du biofilm**

L'eau est le constituant majeur du biofilm frais (environ 97% de la masse du biofilm). La composante bactérienne représente couramment 10 à 25 % de la masse sèche du biofilm, les 75 à 90 % restants sont principalement la matrice extracellulaire. Cette matrice est majoritairement composée d'eau, et de macromolécules d'origine microbienne (EPS pour Exocellular Polymeric Substances). Ces EPS renferment souvent en majorité des exopolysaccharides et en moindre mesure des protéines, d'autres sucres, ainsi que de petites quantités d'acides nucléiques et de phospholipides.

Chaque biofilm est une communauté microbienne unique (TOLKER-NIELSEN *et al.* 2000). La très grande variabilité des micro-organismes en nature et proportion, ainsi que celle des milieux dans lesquels ils se développent, rend très difficile la détermination de la composition précise de la matrice. Elle n'est valable que pour un instant donné et dans des conditions environnementales précises.

### **I.1.3 Etude des paramètres influents**

La formation d'un biofilm est dépendante des micro-organismes, de la surface du support et de la nature du milieu liquide dans lequel ils sont plongés. Le biofilm se construit puis évolue

en fonction de toutes les interactions possibles entre ces acteurs. Tous vont avoir un impact sur l'architecture du biofilm et sur la structuration des populations microbiennes au sein de celui-ci.

### I.1.3.1 Le support

Le type de support joue un rôle d'abord dans l'adsorption des micro-organismes puis lors de la croissance du biofilm. Dès les premiers instants, le contact entre micro-organismes et substrats n'est possible qu'en fonction des paramètres de surface de ces derniers. Plus tard, lorsque les premières microcolonies seront installées, c'est la structure du biofilm qui sera influencée par la taille du support ou la surface accessible. Lors du choix des matériaux intéressants pour la création et le maintien d'un biofilm plusieurs méthodes peuvent être employées pour caractériser des supports :

- La mesure des angles de contact est employée pour obtenir des paramètres de mouillabilité ou d'**hydrophobicité** d'un matériau. C'est une méthode largement acceptée même s'il est difficile de relier l'adhésion à ce seul paramètre (PALMER *et al.* 2007) .

Généralement, une goutte de liquide déposée sur un solide ne s'étale pas complètement mais prend la forme d'une calotte sphérique caractérisée par un angle de contact (angle formé entre la surface du solide et la tangente à la surface du liquide au point de raccordement, il est noté :  $\theta$  et est lié aux tensions de surfaces entre le liquide, le solide et l'air.

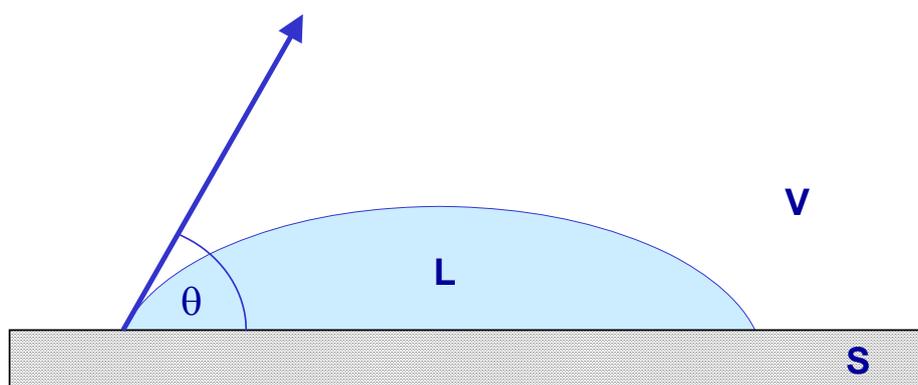


Figure I-3 : Représentation de l'angle de contact ( $\theta$ ) au point triple solide (S), liquide (L), vapeur (V).

Cet angle décrit la forme d'une gouttelette liquide en contact avec un solide. Le plus souvent les instruments utilisés (goniomètres) mesurent les angles par imagerie sur une caméra CCD en analysant sur PC les images capturées (HADJIEV *et al.* 2007). Les tensions de surface et interfaciales des liquides peuvent être mesurées directement à partir de la forme de la goutte.

La tension superficielle changera en fonction du liquide utilisé. Les mesures peuvent être statiques, à l'équilibre, ou dynamiques, ou varier en fonction du temps. Les angles de contact offrent une indication, facile à mesurer, sur la couche la plus superficielle des solides.

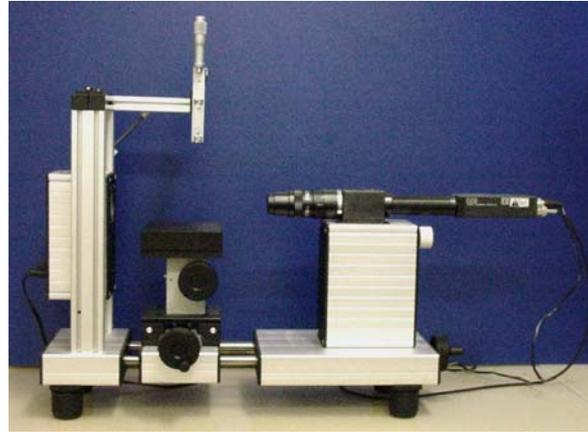


Figure I-4 : Goniomètres G10 (Krüss, Allemagne)

Les tensions superficielles des supports solides ou des cellules microbiennes sont reliées à l'angle de contact par l'équation de Young - van Oss (Van OSS *et al.* 1988) :

$$2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+}) = \gamma_L (1 + \cos \theta) \quad [2]$$

Avec :

$\gamma^{LW}$  : composante apolaire ou de Lifschitz van der Waals de l'énergie libre de surface ( $\text{mJ/m}^2$ )

$\gamma^+$  : composante accepteur de l'énergie libre de surface ou paramètre électron-accepteur de la composante acide-base ( $\text{mJ/m}^2$ )

$\gamma^-$  : composante donneur d'électron de l'énergie libre de surface ou paramètre électron-donneur de la composante acide-base ( $\text{mJ/m}^2$ )

$\gamma$  : énergie de surface ( $\text{mJ/m}^2$ ) ou tension de surface ( $\text{mN/m}$ ) d'un corps

$\gamma^{AB}$  : composante polaire ou acide-base de l'énergie libre de surface ( $\text{mJ/m}^2$ )

$\theta$  : angle de contact ( $^\circ$ )

L'équation de Young - van Oss à trois inconnues ( $\gamma^{LW}$ ,  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$ ) liées au solide testé peut être résolue en réalisant des mesures d'angles avec trois liquides purs (L) de propriétés connues (quelques exemples sont donnés dans le Tableau I-1).

Tableau I-1: Caractéristiques énergétiques de liquides utilisés pour les mesures de  $\theta$  et détermination des tensions de surface (en mN/m)

Liquide	Formule	$\gamma$	$\gamma^{LW}$	$\gamma^{AB}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
Eau	H <sub>2</sub> O	72,8	21,8	51,0	25,5	25,5
Formamide	CH <sub>3</sub> NO	58,1	39,0	19,1	2,3	39,6
$\alpha$ - bromonaphtalène	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> Br	44,4	44,4	0	0	0
Diiodométhane	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	54,5	54,5	0	0	0

D'après (CARRE 1989) et (BELLON-FONTAINE *et al.* 1996)

- Plusieurs paramètres sont utilisés pour qualifier la **rugosité** d'une pièce. Ils sont définis dans la norme internationale ISO 12085. La méthode de mesure consiste à enregistrer un profil à l'aide d'un instrument à contact puis à effectuer son traitement. La micro-géométrie de la surface se décompose en 4 ordres : les écarts de forme, les écarts d'ondulation, les écarts de rugosité périodique (stries, sillons) et les écarts de rugosité aperiodique (fentes, piqûres). Le profil qui nous intéresse, le profil de rugosité, est dérivé du profil primaire par suppression des composantes de grandes longueurs d'onde. Il permet de déterminer les paramètres suivants :

- paramètre R : profondeur moyenne des motifs de rugosité
- paramètre AR : pas moyen des motifs de rugosité
- paramètre RX : profondeur maximum d'une irrégularité de profil

La rugosité est souvent citée comme étant un paramètre favorable à la mise en place d'un biofilm (PALMER *et al.* 2007). Dans les cas où elle faiblit elle fait peu varier la fixation mais le biofilm formé est plus fragile.

- la **taille** est mesurée facilement dans le cas où les supports utilisés ont des formes géométriques, sinon les problèmes liés à l'irrégularité peuvent être contournés grâce à l'estimation du diamètre moyen. Dans le cas de particules très petites, l'utilisation d'une lame graduée et d'un microscope classique est envisageable.

- **la surface spécifique**, définit, en général, la surface totale par unité de masse ou de volume du produit, qui est accessible aux micro-organismes. C'est une donnée essentielle de la caractérisation des solides finement divisés et des matériaux poreux. Il existe plusieurs méthodes permettant d'atteindre directement ou indirectement cette surface spécifique. Une classe importante de méthodes fait appel à l'adsorption, et les nombreux appareillages développés à partir des phénomènes d'adsorption sont spécifiquement conçus pour la mesure de la surface spécifique ; dans cette classe, on peut également inclure les appareillages qui exploitent les phénomènes de perméamétrie gazeuse.

### I.1.3.2 Les micro-organismes

La grande complexité des micro-organismes rend difficile la description de tous les paramètres qui les caractérisent. Lorsque l'intérêt de l'étude porte sur les propriétés physico-chimiques des micro-organismes, il est possible de mettre en œuvre des techniques applicables aux surfaces solides (hydrophobicité) ou aux colloïdes (potentiel zéta). A ce niveau le terme de « surface microbienne » sera à proscrire, le terme d'interface étant plus approprié lorsqu'il s'agit de micro-organismes. Du point de vue de l'écologie microbienne, il est possible d'utiliser des techniques moléculaires afin de déterminer, voire de suivre, les espèces en présence, leur diversité et leur répartition.

Les conditions initiales de culture et son âge ainsi que la ou les espèce(s) présente(s), leur concentration respective et leur état physiologique sont variables. Il ne faut donc pas perdre de vue le fait que tous les paramètres décrits dans ce paragraphe ne sont homogènes ni dans l'espace ni dans le temps et peuvent modifier l'adhésion initiale.

- La mesure des angles de contact est employée pour obtenir des paramètres de mouillabilité ou d'**hydrophobicité** dans le cas de micro-organismes cultivés en souche pure. Les mesures sont effectuées comme pour les matériaux, mais réalisées sur des « tapis bactériens » obtenus par filtration d'une suspension contenant environ  $10^9$  cellules/mL à travers un filtre en acétate de cellulose de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ . Un temps de séchage d'environ 20 minutes est généralement nécessaire à l'élimination du fluide interstitiel (MEYLHEUC 2000). L'hydrophobicité des micro-organismes est aussi fonction de leur état physiologique (PALMER *et al.* 2007).

- La détermination des **propriétés électriques** des « surfaces » des micro-organismes est effectuée par l'évaluation du potentiel zêta. Le potentiel électrocinétique ( $\Psi_0$ ) de cellules microbiennes en suspension n'est pas directement mesurable mais peut être déterminé par la mesure du potentiel zêta ( $\zeta$ ) à la surface de friction de la couche limite par différentes méthodes électrocinétiques :

$$\Psi_0 = \zeta (1+z/a) \exp (\lambda Dz) \quad [3]$$

avec : a, rayon de la particule ; z, distance entre la surface de la particule et la surface de friction et  $1/\lambda D$ , épaisseur de la double couche ionique diffuse (Longueur de Debye).

Le potentiel zêta peut être obtenu à partir des mesures de mobilité électrophorétique et utilisation de modèles mathématiques, tels que l'équation de Smoluchowski :

$$\zeta = (4\pi\eta / \varepsilon) m_e \quad [4]$$

avec :  $\eta$ , viscosité du milieu ;  $\varepsilon$ , permittivité du milieu ;  $m_e$ , mobilité électrophorétique.

Les cellules microbiennes sont mises en suspension dans une solution d'électrolyte (eau physiologique,  $KNO_3$ , tampon phosphate...) et vont se déplacer avec une vitesse qui leur est propre sous l'action d'un champ électrique (Figure I-5).

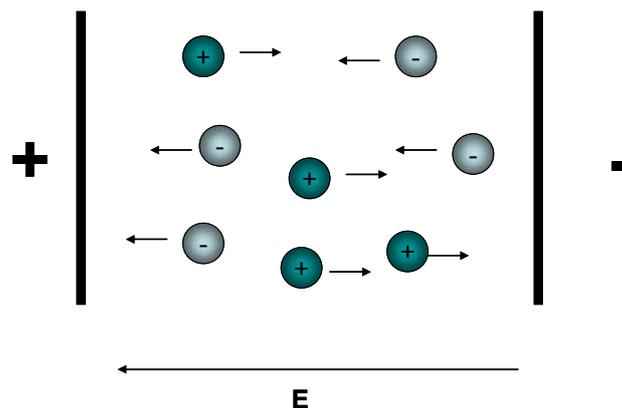


Figure I-5 : Représentation schématique du déplacement de particules chargées négativement ou positivement sous l'action d'un champ électrique (E).

Le sens du déplacement permet de déterminer le signe de la charge globale des particules alors que leur vitesse peut être reliée à la mobilité électrophorétique (rapport de la vitesse sur le champ électrique).

A l'interface entre une surface chargée et une solution électrolytique, il existe une couche de solution dite « double couche ». La plupart des modèles (Gouy-Chapman, Stern) y inscrivent une couche fixe et une couche diffuse. Cette dernière a une épaisseur qui varie en fonction de la force ionique de la solution, elle diminue lorsque la force augmente.

Soumises à un champ électrique les particules acquièrent une certaine mobilité qui dépend de leur charge et de celle de leur cortège ionique. Au sein de la double couche il existe un plan dit de cisaillement (très proche de celui délimitant la couche fixe de la diffuse ou plan externe de Helmholtz) délimitant deux comportements parmi les ions (ceux qui accompagnent la particule dans son mouvement et les autres qui, ayant une attirance plus faible, se séparent progressivement de la surface).

Le potentiel zêta est le potentiel au niveau de ce plan de cisaillement. Il dépend principalement de 2 paramètres : le potentiel au plan interne de Helmholtz et la force ionique de la solution. Il est accessible expérimentalement par des mesures électrocinétiques.

Ces mesures peuvent être réalisées à l'aide d'un zétamètre (Figure I-6) dans lequel la vitesse de déplacement des micro-organismes, éclairés par un faisceau laser sous l'action d'un champ électrique, est mesurée à l'aide d'une chaîne d'acquisition numérique.

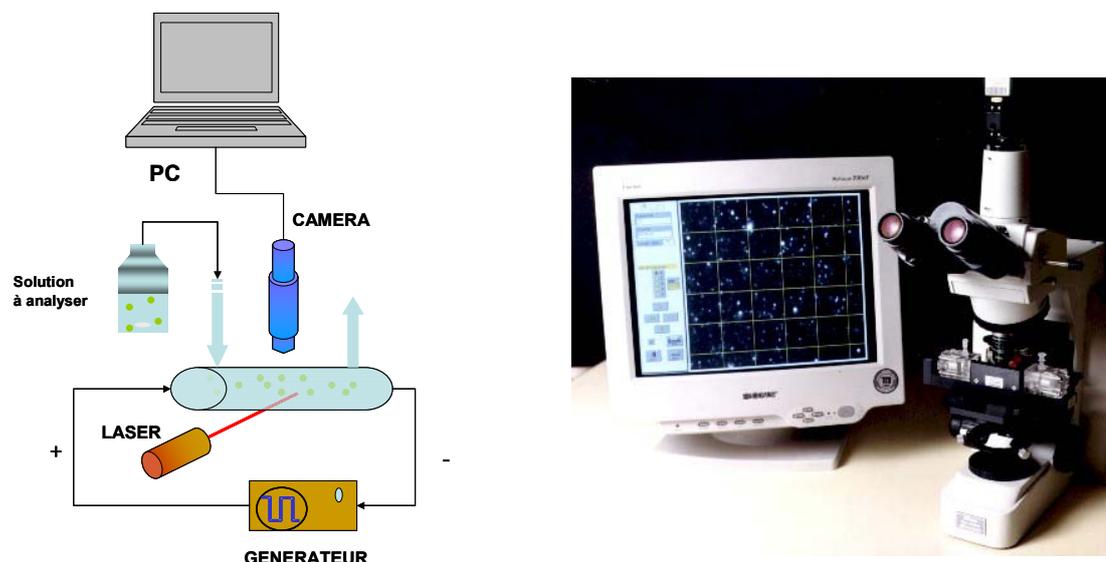


Figure I-6 : Dispositif expérimental du zétamètre laser zetaphoremeter II (CAD instrumentation, France).

Ici aussi cet aspect est fonction de l'état des micro-organismes : le potentiel zêta est négatif, en principe, à pH = 7 mais varie selon l'espèce, les conditions de culture, l'âge de la culture et la force ionique (PALMER *et al.* 2007).

- Le **caractère hydrophobe/hydrophile**, acide/base au sens de Lewis, des bactéries peut être déterminé à l'aide des méthodes B.A.T.H. (Bacterial Adhesion To Hydrocarbons Solvent) (ROSENBERG *et al.* 1980) ou M.A.T.S. (Microbial Adhesion To Solvent) (BELLON-FONTAINE *et al.* 1996).

Ces méthodes reposent sur la comparaison des affinités respectives d'un micro-organisme pour des solvants aux propriétés physico-chimiques connues (Tableau I-2) : un solvant monopolaire acide (accepteur d'électrons) : le chloroforme, un solvant monopolaire basique (donneur d'électron) : l'acétate d'éthyle, et deux solvants apolaires : décane et hexadécane. L'estimation des caractéristiques électron-donneur et électron-accepteur ainsi que l'affinité pour les solvants apolaires nous permettent de déduire le caractère hydrophile/hydrophobe de la souche.

Afin de s'affranchir des interactions électrostatiques entre micro-organismes et solvants, les cellules sont généralement placées dans un liquide de force ionique élevée (NaCl  $1,5 \cdot 10^{-1}$  M).

Tableau I-2 : Solvants utilisés pour la méthode MATS : composantes van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), accepteur ( $\gamma^+$ ) et donneur d'électron ( $\gamma^-$ ) de l'énergie libre de surface des solvants (en  $\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ ).

	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
<b>Chloroforme</b>	27,2	3,8	0
<b>Hexadécane</b>	27,7	0	0
<b>Acétate d'éthyle</b>	23,9	0	19,4
<b>Décane</b>	23,9	0	0

Expérimentalement, la suspension microbienne à analyser est mise en contact avec le solvant concerné par forte agitation, l'émulsion obtenue est ensuite laissée au repos pendant 15 minutes. L'estimation de l'affinité des cellules pour chacun des solvants est obtenue par la variation de l'absorbance de la phase aqueuse avant et après son contact avec le solvant ou par un comptage des bactéries totales par microscopie en cellule de Mallassez.

- L'étude de la **diversité et de l'évolution des populations microbiennes** est possible grâce à l'utilisation d'outils d'investigation basés sur des techniques moléculaires utilisant les propriétés des gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr). Cette approche moléculaire permet d'inventorier et d'identifier les populations présentes dans les écosystèmes microbiens complexes à travers la diversité de leurs génomes.

Il est possible d'obtenir rapidement une image (empreinte ou fingerprint en anglais) de la microflore de l'écosystème en représentant les communautés microbiennes par des profils électrophorétique de fragments d'ADN. Toutes les méthodes utilisées sont basées sur une amplification par PCR de l'ADN de l'écosystème. Certaines séparent les produits de PCR selon leur taille comme l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou la T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism). D'autres techniques utilisent les différences de mobilité électrophorétique des produits de la PCR pour les différencier en fonction des séquences. Il s'agit de la D/TGGE (Denaturant / Temperature Gradient Gel Electrophoresis), la TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) qui se différencie par ses conditions de migration électrophorétique non dénaturantes (DABERT *et al.* 2002; DENG *et al.* 2008).

Lors de la SSCP, après amplification par PCR de l'ADNr 16S de l'écosystème, les produits de la PCR sont dénaturés par la chaleur puis refroidis brusquement avant d'être placés sur le gel d'acrylamide. Dans ce gel, ils sont ensuite séparés selon leur séquence. En effet, les fragments simple-brin obtenus présentent des différences de mobilité car ils adoptent des conformations stables par appariement au niveau de leurs séquences complémentaires. Cette conformation secondaire dépend de la séquence nucléotidique propre à chaque fragment d'ADN. Ainsi, des fragments de même taille mais de séquences nucléotidiques différentes peuvent être séparés. L'emploi de molécules fluorescentes et d'un séquenceur automatique d'ADN permet la détection des fragments. La communauté microbienne apparaît alors sous la forme d'un profil de pics. L'identification de chaque pic est réalisée par clonage des produits de PCR, tri des clones par SSCP et séquençage des clones présentant un pic qui co-migre avec les pics du profil complexe de la communauté microbienne. Ces méthodes paraissent a priori plus discriminantes que les méthodes basées seulement sur l'analyse de la taille des fragments. De plus, elles ne génèrent qu'un fragment d'ADN par espèce microbienne ciblée, ce qui facilite l'analyse dans le cas de communautés microbiennes complexes. Des travaux ont mis en évidence le potentiel de la méthode de SSCP pour l'étude de l'écosystème des digesteurs

anaérobies (DELBES *et al.* 2001; LECLERC *et al.* 2004). Deux ans de suivi d'une population d'un digesteur anaérobie de laboratoire ont montré une dynamique des communautés microbiennes. Les archées présentaient comparativement une diversité plus réduite et une apparente stabilité (ZUMSTEIN *et al.* 2000).

### I.1.3.3 Le milieu liquide et les conditions hydrodynamiques

Le milieu liquide est l'acteur de la formation d'un biofilm le plus facile à étudier. Il est possible de déterminer rapidement nombre de ses caractéristiques principales en laboratoire : température, pH, mais aussi type et vitesse d'écoulement. Cela devient moins évident lorsque l'on a affaire à des milieux plus élaborés dont la force ionique n'est plus calculable et où la composition en solutés est difficile à déterminer. Il est même très difficile de mesurer leur impact dans des environnements plus complexes surtout lorsque leurs propriétés sont variables dans le temps. L'impact du liquide est double. Dans les tous premiers instants, il va permettre le conditionnement du support et des micro-organismes. Plus tard ce seront les conditions hydrodynamiques et les nutriments qui contrôleront la structure du biofilm (STOODLEY *et al.* 1999). L'adsorption de micro-organismes la plus forte se produit généralement pour des valeurs de pH variant de 3 à 6, l'optimum dépend du point isoélectrique relatif des micro-organismes. Cette adsorption est réversible. Différents électrolytes, sels inorganiques ou nutriments peuvent aussi modifier l'adhésion. L'hydrodynamique est un paramètre essentiel pour la structuration du biofilm. Il influence le transfert externe des substrats qui peut à lui seul expliquer la morphologie d'un biofilm (PICIOREANU *et al.* 2000) mais également les contraintes (cisaillement, attrition) exercées sur le biofilm qui vont influencer sa densification (MICHAUD *et al.* 2003).

### I.1.4 Méthodes d'études du biofilm

Lors des dernières années, l'avancée de techniques d'investigation *in situ* comme la microscopie confocale à balayage laser, les fluorochromes, les microélectrodes et l'analyse d'images a permis de modifier notre vision de l'architecture des biofilms. Ces techniques peuvent aussi être utilisées lors de la mise en place d'expériences permettant l'étude de la fixation microbienne. Dans ce paragraphe, sont décrites, selon le phénomène étudié et l'utilisation de cultures pures ou non, les différentes méthodes d'analyse les plus couramment utilisées aujourd'hui afin de mesurer la formation d'un biofilm

### I.1.4.1 Adhésion de cultures pures

L'adhésion des micro-organismes en culture pure sur des supports inertes est dépendante des affinités biomasse/support. Les changements apportés par les conditions expérimentales modifient ces interactions, rendant les résultats difficiles à interpréter et limitant leurs comparaisons d'un laboratoire à l'autre. Cependant, comme nous allons le voir lors de la description des méthodes d'étude du biofilm, elles ont toutes leur intérêt. Cinq d'entre elles peuvent être décrites selon leur niveau de complexité. Le choix pouvant se faire aussi en fonction des conditions prévalant dans l'écosystème naturel ou en fonction du prix de revient. La méthode dite "Microbial adhesion to hydrocarbons"(MATH) met en œuvre le mélange par vortex des micro-organismes avec une petite quantité d'hydrocarbures afin de créer des micro-gouttelettes de phase d'hydrocarbures qui serviront de substrat hydrophobe pour l'adhésion des micro-organismes. La turbidité de la phase aqueuse est ensuite mesurée et donne une indication du nombre de micro-organismes accrochés (ROSENBERG *et al.* 1983). Une variante de cette méthode intègre l'étude cinétique de la turbidité en fonction du temps de mélange (LICHTENBERG *et al.* 1985).

Les méthodes à lamelles (slide methods) utilisent l'exposition d'une lame de support dans une suspension microbienne agitée ou non. Après exposition le support est rincé et les micro-organismes sont dénombrés, soit par mesure de la DCO, soit par marquage fluorescent (LIU 1995) ; (WIRTANEN *et al.* 1996).

Les méthodes utilisant les grains de support (bead methods) se distinguent des précédentes par l'augmentation de la surface spécifique.

Les systèmes à lits fixe ("packed-bed") utilisent une colonne remplie de support à granulométrie définie dans laquelle passe la suspension bactérienne. La concentration de l'effluent en micro-organismes est déterminée par comptage de type Coulter-counter ou par spectrophotométrie. L'avantage de ce type de système sur les précédents réside dans la possibilité d'utiliser les équations de transfert de masse lorsque la porosité du lit de particule est connue et lorsque les particules peuvent être assimilées à des sphères (ELIMELECH 1995). L'inconvénient étant l'impossibilité d'observer le dépôt bactérien et son arrangement spatial.

Les chambres d'écoulement (ou chambres à flux) sont des dispositifs expérimentaux très répandus pour étudier *in vitro* la formation de biofilm. Elles permettent de mettre en évidence les interactions cellules/support lors de l'étude de l'adhésion microbienne au support sous des conditions hydrodynamiques contrôlées ; et ce avec des conditions de transfert de masse et des paramètres expérimentaux, tels que le taux de cisaillement ou la vitesse des fluides, qui sont maîtrisés (Figure I-7).

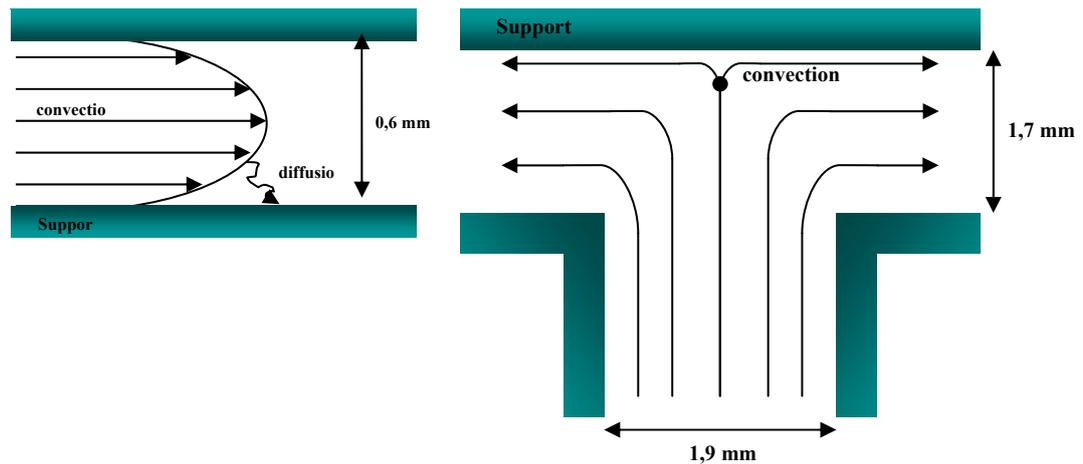


Figure I-7 : Représentation schématique des flux dans les chambres à flux : lames parallèles (à gauche) et stagnation ponctuelle (à droite) (BAKKER *et al.* 2002)

Ces dispositifs sont le plus souvent caractérisés par une faible surface spécifique et ainsi la concentration en micro-organismes reste quasiment constante jusqu'à la couverture complète du support. Parmi eux, nous trouvons les systèmes à disque rotatif (« rotating disc ») (DICKINSON *et al.* 1995), à lames parallèles (« parallel plate ») (CHRISTERSSON *et al.* 1987) et (SJOLLEMA *et al.* 1989) et à flux avec stagnation ponctuelle (Stagnation point flow) (DABROS *et al.* 1987). Les deux derniers outils présentent un maximum d'avantage car ils permettent des mesures d'adhésion faciles dans des milieux homogènes (Tableau I-3).

L'utilisation d'un microscope adapté permet l'observation *in situ* de l'arrangement spatial (MUELLER *et al.* 1992) et (Van HOOGMOED *et al.* 1997).

Tableau I-3 : Méthodes d'étude de l'adhésion microbienne  
(BOS *et al.* 1999)

Méthodes	Transport massique		Dénombrement		Mesures	
	contrôlé	théorie disponible	direct	<i>In situ</i>	adhésion	rétection
MATH	-	-	-	-	+	-
Lamelle	-	-	+/-	-	-	+
Grain	-	-	-	-	-	+
Lit fixe	+	+	-	-	+	+
Stagnation ponctuelle	+	+	+	+	+	+
Chambres à flux Lames parallèles	+	+	+	+	+	+
Disque rotatif	+	+	-	-	+	+

#### I.1.4.2 Coagrégation de cultures mixtes

Après mélange de deux populations bactériennes, il est possible de mesurer leur coagrégation. Pour cela deux types de méthodes existent : celles qui mesurent la taille des agrégats parmi lesquelles on trouve des techniques de mesure visuelle semi-quantitatives ou de turbidité à l'état stable et celles qui mesurent la cinétique de coagrégation par mesure turbidimétrique. L'observation microscopique est possible après fixation sur lame au glutaraldéhyde.

#### I.1.4.3 Coadhésion de cultures « mixtes »

Les techniques d'études de la coadhésion de culture mixtes sont plus rares. Des auteurs ont modifié la méthode MATH et prévoient de faire adhérer chacune des populations séparément, l'une après l'autre puis de mesurer l'adhésion de la seconde par mesure d'absorbance (ELLEN *et al.* 1994). Mais cette méthode ne permet pas l'étude de mélanges complexes de populations et n'étudie que la fixation d'une population après l'autre.

### I.1.4.4 Microscopie

Différentes techniques permettent de mesurer la progression de la colonisation d'un support. La microscopie à balayage (en anglais scanning electron microscopy ou SEM) permet de visualiser la morphologie du biofilm alors que la microscopie à épifluorescence après marquage révèle sa structure et sa densité cellulaire. La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus forte énergie (plus courte longueur d'onde). L'ensemble des techniques décrites ci-après sont des outils puissants de plus en plus accessibles.

**La microscopie confocale laser à balayage** procure une image avec un bruit de fond faible et permet d'observer la structure tridimensionnelle d'échantillons sans découpe physique endommageant les échantillons (STOODLEY *et al.* 1999). Pour éviter que l'image d'un objet épais ou incliné par rapport à l'objectif ne soit nette que sur une partie, la microscopie confocale à balayage utilise un diaphragme en avant du détecteur. Ce trou d'aiguille (pinhole) n'autorise que la détection de signaux fluorescents provenant du plan focal, les photons en provenance des autres plans étant bloqués. Le terme *confocal* provient du fait que le plan focal objet et le plan du diaphragme sont des plans *focaux conjugués*.

Un faisceau laser balaye la préparation selon l'axe XY à chaque observation. La fluorescence qui est réémise par la préparation lors du balayage est mesurée par un photomultiplicateur en différents points du champ observé (typiquement : 512 x 512 points). Il est possible de reconstituer une image en relief par empilement d'images obtenues lors du déplacement de la platine dans l'axe z. Les images obtenues ont une très faible profondeur de champ : de l'ordre de 0,6µm dans les meilleures conditions (BROWN *et al.* 2001). De plus les différentes vitesses de balayage offrent la possibilité d'obtenir des images ayant une haute définition (MARTIN-CERECEDA *et al.* 2001).

La microscopie confocale laser à balayage permet également la détection individuelle ou simultanée de plusieurs composés fluorescents. Avec plusieurs photomultiplicateurs, différentes couleurs peuvent être imagées simultanément. En microscopie de fluorescence, on peut visualiser des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes en les marquant avec des fluorochromes comme le Di Aminido Phenyl Indol (DAPI). C'est un colorant

spécifique de l'ADN, il absorbe les radiations violettes (max 372 nm) et restitue une fluorescence bleue (max 456 nm).

En l'absence de méthode permettant de limiter l'observation des fluorophores à un plan focal, on parlera de **microscopie à épifluorescence** (à lumière réfléchie). Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission. Les fluorochromes les plus classiques sont la rhodamine et ses dérivés, la fluorescéine et ses dérivés et le Di Amino Phenyl Indol (DAPI). Ils émettent respectivement dans le rouge, le vert et le bleu.

La **spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée** (FTIR-ATR) peut permettre l'analyse d'échantillons dont la superficie est aussi petite que 10  $\mu\text{m}^2$  quand le spectromètre est relié à un microscope infrarouge. Ce spectromètre utilise des bandes d'absorption dans la partie infrarouge du spectre pour identifier les matières organiques. Ces bandes résultent ordinairement de modes vibrationnels intramoléculaires qui absorbent le rayonnement infrarouge dans des régions particulières, permettant l'identification de groupes fonctionnels. Il n'est pas toujours aisé d'obtenir des spectres infrarouges de bonne qualité, en particulier pour les échantillons solides. Bien que le nombre de techniques et les performances des appareils se soient accrus depuis l'introduction de la FTIR, l'échantillonnage et les techniques utilisées doivent être choisis avec soin afin d'optimiser les résultats. Dans certains cas, l'analyse par transmission s'avère difficile. C'est le cas lors de l'étude des surfaces. Il convient alors d'utiliser d'autres accessoires FTIR comme l'ATR. L'utilisation de cette technique peut permettre le suivi de la colonisation éventuelle d'un support.

**L'hybridation fluorescente in-situ** (en anglais Fluorescent *in situ* hybridization ou **FISH**) est une technique de biologie moléculaire utilisant des sondes nucléiques (des fragments d'ADN simple brin) marquées à l'aide d'une molécule fluorescente et permettant de voir des éléments à l'intérieur de la cellule. Elle présente l'avantage de marquer les bactéries sans modifier leur distribution spatiale. Le nombre croissant de séquences d'ARNr disponibles dans les bases de données a permis la construction de sondes complémentaires de nombreux groupes microbiens (eucaryotes, bactéries et archées). Des sondes spécifiques de différents

groupes phylogénétiques de méthanogènes, de bactéries sulfato-réductrices ou de bactéries syntrophes ont été mises au point et permettent la détection et la quantification de groupes ou d'espèces qui composent une communauté microbienne anaérobie. La combinaison de sondes de spécificité différentes permet de déterminer l'abondance et d'appréhender la distribution spatiale de cellules spécifiques parmi l'ensemble des cellules présentes, par une simple observation microscopique en épifluorescence. Ces sondes peuvent être utilisées sur de l'ADN ou de l'ARN, ou sur des protéines. Des techniques utilisent le marquage à la dioxygénine qui est reconnue par un anticorps spécifique marqué par une molécule fluorescente (WAGNER *et al.* 1994). L'utilisation de la microscopie confocale couplée à la technique FISH est particulièrement bien adaptée à l'étude des biofilms puisque elle permet de visualiser les différents groupes de micro-organismes marqués et leur arrangement, et d'obtenir des informations sur l'identité et la localisation des micro-organismes, leur proportion dans l'écosystème, voire leur activité métabolique (BATSTONE *et al.* 2001).

### I.1.4.5 Micro-électrodes

Même si les microsondes électrochimiques sont connues depuis les années 1970, la plupart des électrodes citées dans la littérature scientifique le sont depuis 1998. Seules les sondes pH ou à glucose sont plus anciennes. Selon leur type, elles ont une durée de vie allant de quelques jours (sondes à cellules immobilisées) à un an (sonde de type "Clark"). De même, le diamètre de la pointe de mesure varie de 1 à 20  $\mu\text{m}$  (100  $\mu\text{m}$  pour les sondes à ion métallique). L'utilisation de microsondes optiques est idéale pour mesurer les gradients d'intensité lumineuse des communautés microbiennes *in situ* (KUHL 2005). Des microsondes électrochimiques existent aujourd'hui dans le commerce (Unisense 2007). Elles permettent la détection d' $\text{O}_2$ , d' $\text{H}_2$ , d' $\text{H}_2\text{S}$  et de  $\text{N}_2\text{O}$  ainsi que la mesure de pH et de potentiel redox. Ce sont des appareils relativement simples d'utilisation et peu onéreux, qui peuvent aussi mesurer des paramètres physiques tels que les flux.

Ces outils permettent l'étude de l'activité dans les biofilms en mesurant des gradients de concentrations qui peuvent permettre de calculer les vitesses locales de transformation comme la respiration aérobie ou la dénitrification. D'autres sondes sont capables de mesurer les concentrations en ions ( $\text{H}^+$ ,  $\text{NO}^2$ ,  $\text{NO}^3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}^{3-}$ ) voire en  $\text{CH}_4$  ou en acides gras volatils (AGV) si elles utilisent des cellules immobilisées (REVSBECH 2005). Dans ce cas leur durée de vie n'excède pas quelques semaines.

Damgaard a utilisé une microsonde à méthane d'un diamètre de 20 $\mu$ m, cette sonde est capable de mesurer la pression partielle en méthane avec une résolution de 5  $\mu$ mol.l<sup>-1</sup> grâce à des bactéries fixées, oxydant le méthane. Il a prouvé son efficacité lors de l'étude de sédiments lacustres, des fonds de rizière ainsi que dans des granules méthanogènes et des biofilms anaérobies de 3,5 mm d'épaisseur (DAMGAARD *et al.* 2001).

### I.1.4.6 Etudes des polymères extracellulaires (EPS)

A ce jour, aucune méthode permettant d'isoler uniquement les polymères extracellulaires sans contamination par des composés d'origine intracellulaire n'a été mise au point. Les EPS ont longtemps été définis comme des polysaccharides mais la plupart des travaux récents reconnaissent que les EPS comprennent également d'autres types de biopolymères.

Ainsi leur composition varie en fonction de la méthode d'extraction employée, selon l'origine composition de l'effluent d'alimentation, mais également selon les paramètres de fonctionnement du procédé d'épuration. L'utilisation combinée de la microscopie confocale laser à balayage et de conjugués tels les lectines fluorées permet une vision tridimensionnelle du biofilm (NEU *et al.* 2001).

### I.1.5 Conclusion sur les biofilms

L'intérêt que nous portons aujourd'hui aux biofilms est lié à la prise de conscience de leur ubiquité et au fait qu'ils concernent plus de 90% de la biomasse microbienne. De nombreux travaux effectués depuis dix ans ont facilité l'établissement de certains principes généraux. Ils nous ont permis d'appréhender la manière dont les bactéries isolées peuvent se regrouper et s'organiser en structures complexes et différenciées. Un modèle de structure a été élaboré et est couramment admis même s'il comporte des faiblesses. En effet, les voies métaboliques déclenchant la formation du biofilm, les facteurs d'adhérence impliqués dépendent des micro-organismes concernés (structure et dynamique des populations) et de leur environnement (diffusion, gradients de pH, accumulation de métabolites...). La biologie de ces systèmes constitue un nouveau champ d'investigation, elle ne remet pas en cause les connaissances établies à ce jour mais nécessite une approche globale pluridisciplinaire faisant intervenir des connaissances en physiologie microbienne, génie des procédés, biologie moléculaire et biochimie. Les applications ne manquent pas car les biofilms microbiens sont très liés aux activités humaines. L'intérêt que nous leur portons n'est pas toujours associé aux risques

sanitaires ou industriels qu'ils sont susceptibles d'engendrer. En effet, nous utilisons aussi largement les aspects positifs des biofilms au travers des biotechnologies. Ainsi l'industrie du traitement des effluents par voie biologique utilise les biofilms à leur avantage. Dans les procédés aérobies comme anaérobies, l'immobilisation cellulaire sur un support est obtenue par la mise en contact d'un support fixe ou mobile avec des populations microbiennes. Dans ces systèmes, le rôle du biofilm est fondamental, sa structure est fonction du type de réacteur utilisé et des conditions qui lui sont appliquées. La vitesse à laquelle le biofilm atteint sa maturité a un rôle primordial dans le démarrage du procédé.

### **I.2 LES PROCÉDES DE METHANISATION A BIOFILM**

La digestion anaérobie, ou fermentation méthanique, est la transformation de la matière organique en biomasse, méthane et dioxyde de carbone par un écosystème microbien complexe fonctionnant en absence d'oxygène (MOLETTA 1993). Le méthane est produit par des microorganismes méthanogènes strictement anaérobies. La digestion anaérobie est utilisée afin d'éliminer la pollution organique de rejets industriels en consommant peu d'énergie, en produisant peu de boues et en générant un gaz combustible. Les premiers systèmes fonctionnels de méthanisation ont été développés dans les années 1920 par l'allemand Imhoff, puis en France par Isman et Ducellier avant d'être oubliés. Pendant les années soixante 70, lors des chocs pétroliers, ces techniques ont été redécouvertes. C'est la nécessité de trouver d'autres sources d'énergies qui a permis le développement de procédés anaérobies acceptant des charges polluantes beaucoup plus élevées.

#### **I.2.1 Le processus de digestion anaérobie**

La méthanisation se produit dans des milieux anaérobies naturels. Le gaz des marais qui contient une forte proportion de méthane provient de la décomposition des déchets organiques végétaux des marécages mais aussi des lacs et des rizières. Les sols des zones humides telles que les forêts tropicales, la toundra et les tourbières ainsi que les processus de digestion des animaux participent à la production du méthane. Les ruminants et les termites sont la source d'une quantité importante de gaz et les sédiments marins sont responsables d'une partie du méthane dissout dans l'eau de mer. Le méthane atmosphérique est un gaz à effet de serre important.

I.2.1.1 Activité du consortium anaérobie méthanogène

I.2.1.1.1 Les voies métaboliques

La méthanogenèse est le processus microbiologique au cours duquel des réactions d'oxydation des composés organiques, qui engendrent l'énergie requise par des micro-organismes, sont couplées à des réactions de réduction aboutissant finalement à la production de méthane. Les voies métaboliques simplifiées, décrivant le processus de cette transformation, ont été exposées dans un modèle, aujourd'hui largement accepté (Figure I-8).

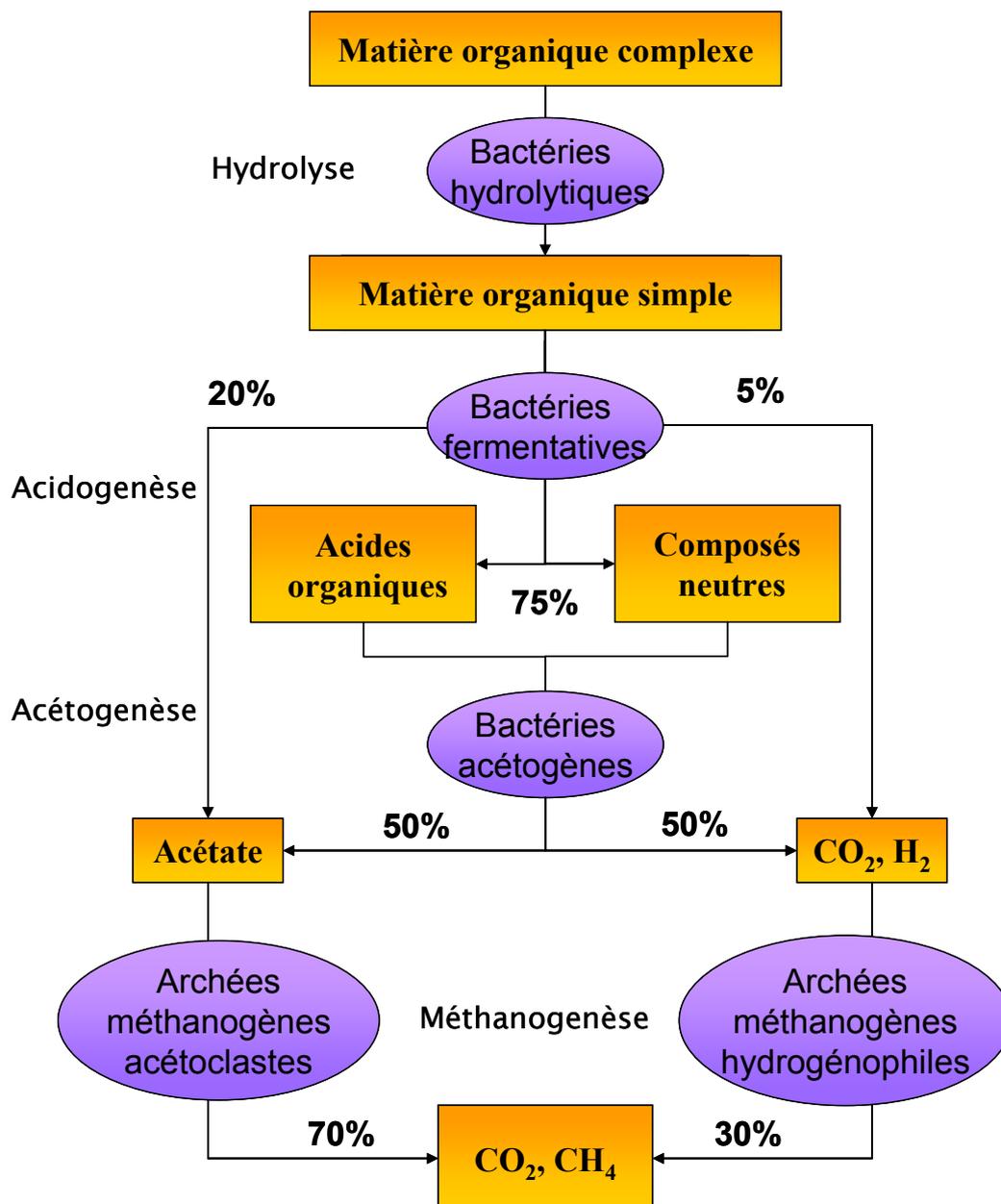


Figure I-8 : Principales voies métaboliques, nature des populations microbiennes et flux de C (en % de DCO) intervenant dans la digestion anaérobie (ZEIKUS 1982).

Ce modèle fait intervenir plusieurs types de micro-organismes classés dans trois phases distinctes :

- les bactéries hydrolytiques et fermentatives (hydrolyse et acidogénèse),
- les bactéries acétogènes (acétogénèse),
- et les archées méthanogènes (méthanogénèse).

Le processus de croissance microbienne est un processus endergonique. Pour obtenir cette énergie, les micro-organismes effectuent des réactions biochimiques d'oxydoréduction. Les trois communautés doivent constituer un écosystème équilibré pour que l'essentiel des équivalents réducteurs produits comme déchets au cours de l'anabolisme bactérien se retrouve finalement dans le méthane.

### I.2.1.1.2 Hydrolyse et acidogénèse

L'étape d'hydrolyse est réalisée par plusieurs groupes d'eubactéries anaérobies strictes et facultatives dont la nature dépend de la composition qualitative et quantitative de l'alimentation. Les principales espèces appartiennent aux genres *Clostridium*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Enterobacteroides*, *Propionibacterium* et *Butivibrio* (ARCHER *et al.* 1990).

### I.2.1.1.3 Acétogénèse

Au cours de cette étape, l'oxydation des substrats (surtout les acides propionique et butyrique et l'éthanol) est couplée à la formation d'hydrogène, de dioxyde de carbone et d'acétate. Elle représente l'activité de trois groupes de bactéries : les homoacétogènes des genres *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Sporomusa*, *Acetogenium*, *Acetoanaerobicum*, *Pelobacter*, *Butyribacterium*, *Eubacterium*... (ARCHER *et al.* 1990), les syntrophes des genres *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophus*... (CLARENS 1989) et les sulfato-réductrices des genres *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas*... (WIDDEL 1988).

Il est important de noter que, lorsque la pression partielle en hydrogène s'élève, cette oxydation est thermodynamiquement impossible (réaction endergonique). L'oxydation des substrats n'est possible qu'à des pressions partielles en hydrogène faibles ( $<10^{-4}$  atm.). Par conséquent, la croissance de la flore acétogène et l'utilisation du substrat dépendent strictement de l'élimination de l'hydrogène du milieu par les micro-organismes méthanogènes voire les bactéries sulfato-réductrices (en présence de sulfate). Cette association syntrophique

avec des bactéries méthanogènes hydrogénophiles permet de rendre les réactions endergoniques (HARPER *et al.* 1986; CADI 1994).

#### I.2.1.1.4 Les archées méthanogènes

Les micro-organismes actifs de cette dernière étape sont réunis dans un groupe qui leur est propre : celui des archées. Ils possèdent, en effet, des caractéristiques spécifiques par rapport aux bactéries et aux eucaryotes, notamment en ce qui concerne leurs coenzymes (GORRIS *et al.* 1994). Les archées constituent un des trois statuts de règne primaire (Figure I-9), avec les eubactéries et les eucaryotes (WOESE *et al.* 1977).

Ces archées n'utilisant qu'un nombre restreint de substrats, il est possible de classer les méthanogènes selon cette caractéristique. Ainsi, l'acétate est métabolisé par les bactéries méthanogènes acétoclastes des genres *Methanosaeta* (anciennement *Methanothrix*) et *Methanosarcina* qui sont à l'origine de la plus grande partie du méthane produit dans les réacteurs biologiques de dépollution. Les méthanogènes hydrogénophiles, comme les espèces des genres *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanobrevibacter*, utilisent l'hydrogène et le dioxyde de carbone (FERRY 1993) pour d'autres ce sera le méthanol (*Methanosarcina*).

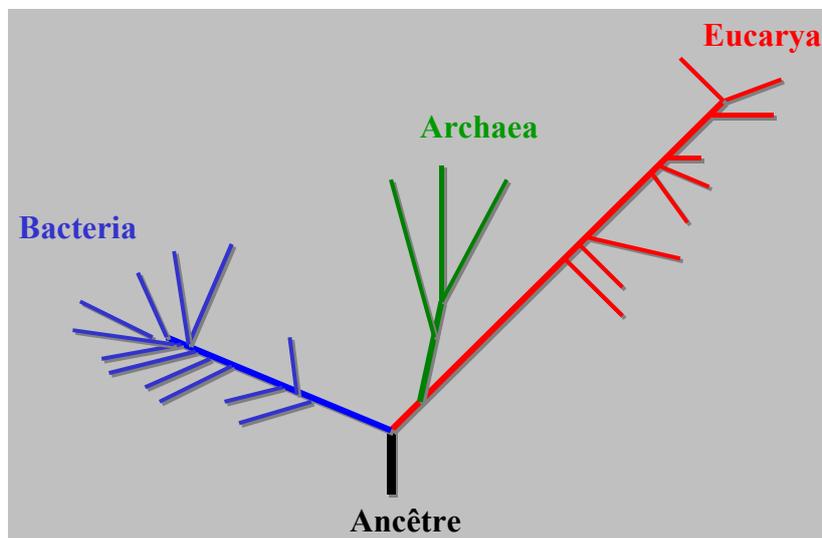


Figure I-9 : Arbre phylogénétique simplifié des êtres vivants (BROWN *et al.* 1997).

La réduction du  $\text{CO}_2$  en  $\text{CH}_4$  nécessite un minimum d'hydrogène ( $\text{H}_2 > 10^{-6}$  atm.) pour être exergonique. Il existe une niche énergétique correspondant à une association de ces micro-organismes (Figure I-10). Elle est délimitée par les valeurs d'enthalpie libre (énergie libre de Gibbs) de plusieurs réactions en fonction de la pression partielle en hydrogène.

Le temps de doublement moyen des méthanogènes acétoclastes est élevé. 1,5 jours pour *Methanosarcina* contre 7 jours pour *Methanosæta*. 2 à 3 jours sont nécessaire à *Methanosarcina barkeri*, 7 à *Methanosaeta soehngenii* et 10 à *Methanosæta concili* (GUJER *et al.* 1983; ZEHNDER 1988).

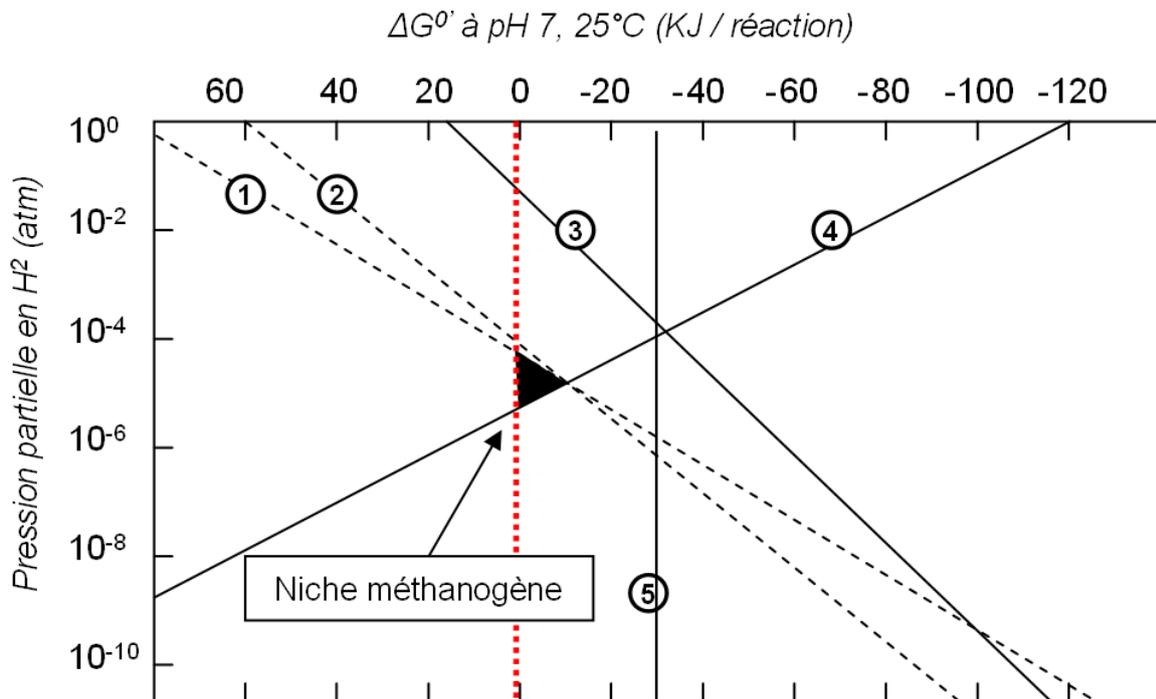


Figure I-10 : Evolution de l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) lors des réactions de conversion de l'éthanol, du propionate, du butyrate en acétate et de la production de méthane à partir de  $H_2/CO_2$  en fonction de la pression partielle en hydrogène. [propionate] = [butyrate] = [éthanol] = [acétate] = 1 mM ;  $[HCO_3^-] = 100$  mM ; pression en  $CH_4 = 0,5$  atm. 1, 2 et 3 : acétogenèse du propionate, du butyrate et de l'éthanol, 4 et 5: méthanogenèse autotrophe ( $H_2, CO_2$ ) et acétoclaste. (CRESSON 2006) adapté de (HARPER *et al.* 1986).

Les caractéristiques cinétiques des populations microbiennes présentes sont très différentes et il existe de nombreuses interrelations. Ainsi, la croissance de la flore productrice de méthane dépend de celle des bactéries des phases précédentes. Mais les interrelations les plus importantes portent sur le devenir de l'hydrogène. En effet, les bactéries utilisatrices d'hydrogène sont fondamentales pour assurer l'équilibre du système : le maintien par les méthanogènes d'une très faible pression partielle en hydrogène est indispensable pour permettre l'activité de la population acétogène.

### I.2.1.2 Conditions physico-chimiques

Les principaux facteurs physico-chimiques qui affectent le procédé de digestion anaérobie sont le pH, la température et le potentiel d'oxydoréduction.

#### I.2.1.2.1 Le pH

Le pH optimum de la digestion anaérobie se situe autour de la neutralité (MATSUMO A. *et al.* 1992). Celui des bactéries acidogènes se situe entre 5,5 et 6 (ZOETEMEYER *et al.* 1982), les acétogènes préfèrent un pH proche de la neutralité tandis que les méthanogènes ont une activité maximale dans une gamme de pH comprise entre 6 et 8. Toutefois, la méthanisation peut se produire dans des milieux légèrement acides ou alcalins (BOONE *et al.* 1986).

#### I.2.1.2.2 La température

L'activité du consortium méthanogène est dépendante de la température. Deux plages de températures optimales peuvent être définies : la zone mésophile (autour de 35°C) et la zone thermophile (environ 55-60°C) avec une décroissance de l'activité de part et d'autre de ces températures (POHLAND F.G. 1992) ; (NZOZHEVNIKOVA *et al.* 1994).

La majorité des espèces bactériennes a été isolée dans des environnements mésophiles, mais tous les groupes trophiques des étapes de digestion anaérobie possèdent des espèces thermophiles utilisant les mêmes voies métaboliques que les bactéries mésophiles avec des performances analogues (RACAULT 1986). Il reste possible de travailler à des températures différentes des optima avec des performances plus faibles (CADI 1994).

#### I.2.1.2.3 Le potentiel d'oxydoréduction

Ce paramètre représente l'état de réduction du système, il affecte l'activité des méthanogènes. Ces organismes exigent en effet, outre l'absence d'oxygène, un potentiel d'oxydoréduction inférieur à -330 mV pour initier leur croissance (ZEHNDER 1988).

#### I.2.1.2.4 L'intensité lumineuse

Les effets mutagènes des rayonnements UV sur les populations méthanogènes sont réversibles après une exposition relativement courte (2 à 3 heures) à une lumière blanche (KIENER *et al.* 1985). Plusieurs archées sont sensibles à la lumière (OLSON *et al.* 1991). Les auteurs ont mis en évidence le rôle létal d'un rayonnement visible ( $\lambda = 398 \text{ nm}$ ) tout en précisant que le

coenzyme F420 n'est pas impliqué. Cette précision est d'importance car ce coenzyme émet de la lumière à une longueur d'onde de 420 nm lorsqu'il est soumis à un rayonnement UV. Après 40 h de culture en présence de lumière, les cellules de *Methanosarcina acetivorans* exposées sont très peu viables, même après un retour à l'obscurité pendant plusieurs jours. Les cultures de *M. acetivorans* et *Methanobacterium thermoautotrophicum*  $\Delta H$  sont totalement inhibées lors d'une exposition lumineuse équivalente à 720 W.m<sup>2</sup>. De même 870 W.m<sup>2</sup> sont nécessaires pour obtenir le même résultat avec *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg.

### I.2.1.3 Besoins nutritionnels

Comme tout micro-organisme, chaque micro-organisme constituant la flore méthanogène demande un apport suffisant de macroéléments (C, N, P, S) et d'oligo-éléments pour sa croissance.

#### I.2.1.3.1 Macroéléments

Les besoins en macroéléments peuvent être évalués grossièrement à partir de la formule brute décrivant la composition d'une cellule (C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>N) (SPEECE *et al.* 1964) dans (PFEFFER 1979). Pour les archées méthanogènes, le milieu de culture doit avoir des teneurs en carbone (exprimée en DCO), en azote et en phosphore au moins dans la proportion 400-7-1 (HENZE *et al.* 1983) et (STRONACH *et al.* 1986) compte tenu de l'assimilation de seulement 15% du substrat carboné. Ces rapports sont basés sur la quantité effectivement consommée et non sur la quantité apportée (PFEFFER 1979). Les sources de carbone des archées méthanogènes sont simples et limitées en nombre. L'ammonium est leur principale source d'azote. Certaines espèces fixent l'azote moléculaire alors que d'autres ont besoins d'acides aminés (CLARENS 1989). Les besoins en azote représentant 11 % de la masse sèche volatile de la biomasse et les besoins en phosphore 1/5 de ceux de l'azote. Les archées méthanogènes possèdent de hautes teneurs en protéines Fe-S qui jouent un rôle important dans le système transporteur d'électrons et dans la synthèse de coenzymes. Aussi la concentration optimale de soufre varie-t-elle de 1 à 2 mM (DANIELS *et al.* 1986). Cette flore utilise généralement les formes réduites comme le sulfure d'hydrogène. Les méthanogènes assimilent le phosphore sous forme minérale (FERRY 1993).

### I.2.1.3.2 Oligo-éléments

Certains oligo-éléments sont nécessaires à la croissance des méthanogènes. Il s'agit plus particulièrement du nickel, du fer et du cobalt. En effet, ce sont des constituants de coenzymes et de protéines impliquées dans leur métabolisme (DIEKERT *et al.* 1980; GRAF *et al.* 1981; HAMMEL *et al.* 1984; WHITMAN *et al.* 1992). Le magnésium est essentiel puisqu'il entre en jeu dans la réaction terminale de synthèse du méthane ainsi que le sodium apparaissant dans le processus chimio-osmotique de synthèse de l'ATP (JARELL *et al.* 1988; ROUVIERE *et al.* 1988). Il existe des facteurs de croissance stimulant l'activité de certains méthanogènes tels que les acides gras ou des vitamines qui peuvent être apportés par des mélanges complexes comme l'extrait de levure ou la trypticase peptone (MURRAY *et al.* 1985; JARELL *et al.* 1988).

## I.2.2 Digestion anaérobie et dépollution

Les eaux de rejets, industrielles ou urbaines dans certains cas, peuvent être traitées par digestion anaérobie et leurs avantages en tant que procédé de dépollution sont nombreux :

- le méthane produit est utilisable comme source d'énergie, ainsi 1 m<sup>3</sup> de méthane est équivalent à 1 litre de mazout (Figure I-11) et il est inodore. Le biogaz contient de 55 à 85 % de méthane et peut être débarrassé de l'hydrogène sulfuré. Sa valorisation sur place est sûre en terme de débouchés et l'investissement faible dans le cas d'une valorisation thermique directe par combustion (COUTURIER 1996).

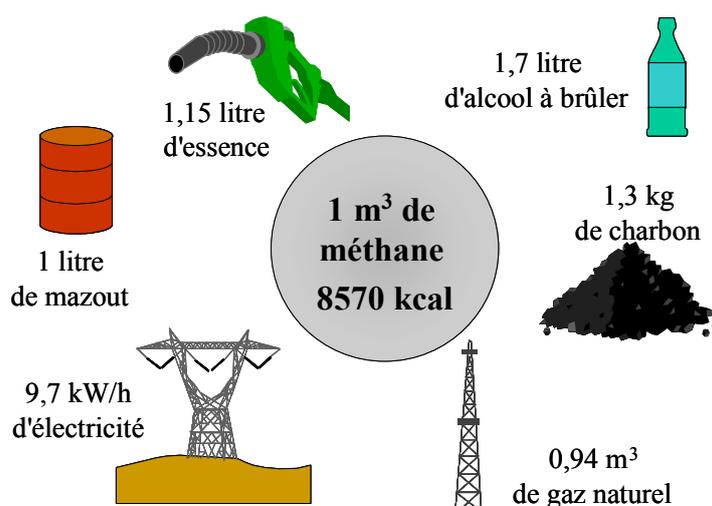


Figure I-11 : Equivalence énergétique d'un mètre cube de méthane  
D'après (DEMEYER *et al.* 1981)

- les quantités de boues obtenues sont faibles (3 à 5 fois moindre que par voie aérobie),
- la biomasse active a des besoins limités et s'adapte à des effluents très divers.

Il existe cependant des inconvénients :

- les conditions d'anaérobiose doivent être strictement respectées,
- la digestion anaérobie est sensible aux perturbations des conditions physico-chimiques du milieu réactionnel qui peuvent rendre les procédés instables,
- les procédés anaérobies permettent rarement un rejet direct de l'effluent traité dans le milieu naturel, un post-traitement aérobie est alors nécessaire,
- et surtout, une faible vitesse de croissance bactérienne rend la période de démarrage des réacteurs assez longue.

Néanmoins ce dernier inconvénient peut être atténué grâce à l'évolution des procédés. En effet, la concentration des cellules à l'intérieur du réacteur, sur un support sous forme d'un biofilm ou entre elles pour former des granules, a permis d'augmenter les performances et de garantir une plus grande robustesse du système biologique. Ces réacteurs anaérobies à forte charge, nous parlons alors de procédés intensifs, ont démontré leur potentiel pour le traitement des effluents.

### I.2.2.1 Les procédés anaérobies intensifs

Dans la grande majorité des applications en biotechnologies, il est important de maintenir le biofilm dans des conditions optimales pour la dégradation de composés. Il en va de même du point de vue du traitement d'effluents par voie anaérobie où l'utilisation de micro-organismes à taux de croissance faible entraîne des longues périodes de démarrage. Un réacteur intensif est principalement caractérisé par une charge volumique appliquée (CVA) élevée et un temps de séjour hydraulique (TSH) court. Dans le cas des réacteurs de méthanisation où le taux de croissance de certains micro-organismes est relativement faible, il est nécessaire d'augmenter le temps de rétention des micro-organismes dans l'enceinte réactionnelle. Cela est possible en utilisant soit des systèmes de séparation solide/liquide (procédés contact anaérobies, réacteurs séquentiels discontinus ou Sequencing Batch Reactor, bioréacteurs à membranes), soit la capacité naturelle des micro-organismes à s'agréger entre eux (réacteurs à boues floculantes ou granulaires) ou à se fixer sur un support solide au sein d'une matrice de polymères biologiques (réacteurs à biofilm).

Il existe différents types de réacteurs à biomasse fixée selon si le support microbien est mis en mouvement (réacteur à support mobile) ou pas (réacteur à lit fixe). Ces derniers, appelés également biofiltres anaérobies peuvent mettre en œuvre un support en vrac ou orienté (ou ordonné). Les réacteurs à lit mobile peuvent être distingués en fonction du mode de mise en mouvement du support. Les réacteurs à lit expansé ou fluidisé sont ceux dont le support est mis en suspension par un courant de liquide, ascendant (lit fluidisé ascendant, LFA) ou descendant (lit fluidisé descendant ou inverse, LFD), en fonction de la densité du support (VAN DEN BERG 1986; IZA *et al.* 1990; WHEATLEY 1990). Si le lit de particules n'est expansé que de 20 à 30% (vitesses proches du minimum de fluidisation), on parle de réacteur à lit expansé. Si le taux d'expansion est supérieur à 30%, on parle de lit fluidisé (LAGUERIE *et al.* 1991). Dans les réacteurs à lit turbulé inverse (LTI), c'est du gaz qui est utilisé pour fluidiser le support microbien de masse volumique inférieure à celle de l'eau (BUFFIERE *et al.* 2000). A partir d'un certain débit de gaz, le solide se répartit tout au long de la colonne .

Dans les réacteurs à lit fixe en vrac, le support diminue la turbulence du fluide et permet ainsi la sédimentation partielle de la biomasse en suspension. Lors du fonctionnement, soit la biomasse produite forme un biofilm sur les particules soit elle s'accumule entre les particules de support (effet de filtre). Ces deux phénomènes entraînent un colmatage progressif du filtre, la formation de chemins préférentiels pour l'effluent et induisent une diminution des performances épuratoires .

Dans les réacteurs à support fixe orienté, les risques de colmatage sont réduits par l'utilisation de supports présentant des taux de vides importants ce qui permet le lessivage des particules en suspension. Dans le cas du cloisonyle<sup>®</sup>, l'orientation du support permet également une augmentation de la vitesse ascensionnelle du liquide ascendant et donc une augmentation des forces de cisaillement au fur et à mesure de la colonisation, ce qui favorise le détachement et donc ralentit le colmatage.

Il en va de même pour les réacteurs à lit mobile où les possibilités de colmatage sont réduites par les supports microbiens en mouvement. Cette mobilité permet en outre d'assurer un bon mélange du milieu réactionnel. Cependant dans les réacteurs à lit fluidisés, la colonisation du support n'est pas identique pour toutes les particules et la vitesse de fluidisation optimale qui permet de maintenir les particules les plus lourdes (*i.e.* les moins colonisées) en fluidisation tout en évitant de perdre les particules les plus légères (*i.e.* les plus colonisées) est un paramètre difficile à maîtriser. Un lit de boues peut même se former en haut de réacteur à lit fluidisé ascendant. De plus, à des charges volumiques élevées, des problèmes

hydrodynamiques liés à la production importante de biogaz peuvent apparaître, ainsi que des phénomènes de bullage par à-coups, de contraction initiale ou tassement du lit.

Les lits fluidisés descendants anaérobies limitent ces problèmes car la fluidisation est favorisée par l'écoulement du biogaz à contre courant du liquide. Ils peuvent toutefois connaître des problèmes de colmatage sur la boucle de recirculation liquide.

Dans le réacteur à lit turbulé inverse (LTI) le gaz qui est injecté au bas du réacteur assure seul la fluidisation du support, ce qui la rend totalement indépendante du débit d'alimentation liquide. La hauteur du lit est parfaitement contrôlée et stable puisque les particules flottantes ne descendent pas en dessous de la zone d'injection du gaz mis à part les particules trop colonisées qui peuvent ainsi être récupérées au fond du réacteur par décantation. Les collisions entre les particules sont responsables de l'abrasion qui en détachant une partie du biofilm permet le contrôle de sa taille (BUFFIERE *et al.* 2000). Ce procédé offre une surface de colonisation plus importante que les procédés ascendants classiques pour deux raisons. D'une part, par l'utilisation de support de très petite taille (inférieure au mm parfois) et d'autre part par l'augmentation de la concentration de solide rendue possible par la diminution de la vitesse de fluidisation (COMTE GAUTRON 1998).

### 1.2.2.2 Performances des procédés anaérobies à biomasse fixée

Les performances épuratoires d'un réacteur de méthanisation dépendent de la quantité de biomasse active présente. L'obtention d'une concentration maximale de micro-organismes anaérobies est donc un paramètre important.

Dans les réacteurs anaérobies à lit fixe, les charges organiques maximales traitées peuvent s'élever jusqu'à  $40 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  avec des temps de séjour situés entre 10 et 50 heures. Les procédés à support organisé s'accommodent de la présence de matières en suspension présentes dans l'effluent mais leur temps de séjour hydraulique doit cependant être ajusté à leur cinétique d'hydrolyse (VAN DEN BERG 1986).

Les concentrations en biomasse dans les réacteurs à lit mobile se situent couramment entre 15 et  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  mais peuvent atteindre  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (WEILAND *et al.* 1991). De fortes CVA peuvent ainsi être appliquées soit en utilisant des effluents très concentrés soit en appliquant un TSH très court. Elles sont le plus souvent de l'ordre de 20 à  $30 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ , même si la conduite de réacteurs pilotes permet d'atteindre des CVA de  $120 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  (AIVASIDIS *et al.* 1988; EHLINGER *et al.* 1994; BUFFIERE 1996), voire de 150 à  $180 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  (IZA 1991). Les réacteurs à support mobile sont généralement plus performants que les filtres anaérobies (Figure I-12).

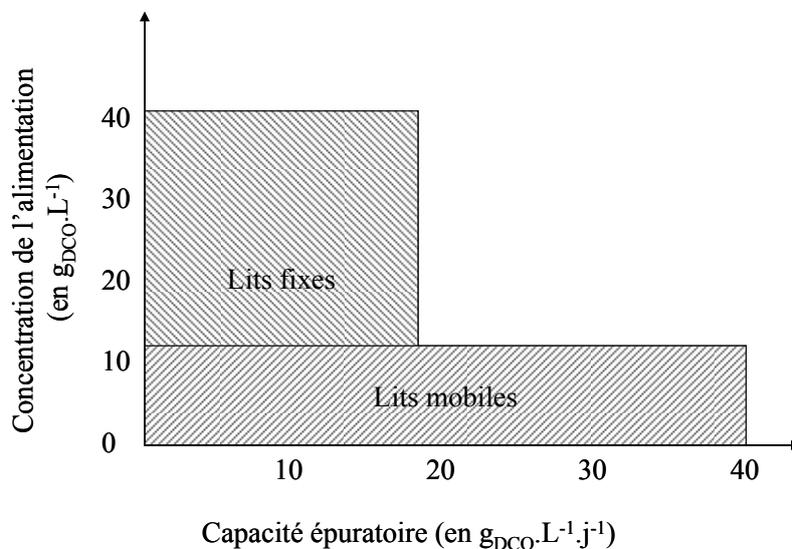


Figure I-12 : Comparaison des procédés à fortes charges en termes de CVA et de concentration de l'effluent - d'après (WEILAND *et al.* 1991).

### I.2.2.3 Les limites des performances des procédés anaérobies à biomasse fixée

Il existe une différence fondamentale entre la taille et l'activité biologique d'un biofilm (AUSTERMANN-HAUN *et al.* 1994). Nous l'avons vu, la biomasse active (les micro-organismes) représente un pourcentage variable du volume total du biofilm et l'accumulation de biomasse attachée peut avoir lieu au détriment de l'activité biologique du biofilm (MICHAUD *et al.* 2003).

Au sein de ce biofilm les problèmes de diffusion et d'accès aux substrats vont croissant avec son épaisseur. Cette limitation du transfert de matière affecte la diffusion de nutriments vers la cellule et l'élimination des produits (KENNEDY *et al.* 1987). L'organisation spatiale des différentes espèces au sein du biofilm est fonction des transferts de matière. Ainsi, pour un bon fonctionnement de la chaîne trophique de la méthanisation, l'arrangement des groupes bactériens aura autant d'importance que l'accumulation de biomasse (BATSTONE *et al.* 2004).

Ce rôle de barrière de diffusion justement attribué à la structure polymérique du biofilm est amplifié par la nature des composants du mélange dans lequel il baigne : les transports de matière (nutriments, gaz, cellules, etc...) sont plus difficiles dans un milieu riche en colloïdes comme cela peut être le cas dans le traitement d'eaux usées.

### I.2.2.4 Conclusion sur les procédés de dépollution anaérobies à biofilms

Notre travail expérimental aura pour but de mettre en lumière le rôle des matériaux utilisés comme support microbien. Nous avons donc délibérément omis de parler des réacteurs à granules lors de cette étude bibliographique.

Parmi les différents procédés intensifs de méthanisation, nous avons vu que le réacteur à lit fluidisé est le plus efficace. Avec un temps de séjour plus court et une charge organique plus élevée il offre une qualité de rejet identique. Il possède une grande capacité de rétention de biomasse grâce à l'utilisation de supports particuliers. Cela facilite la fixation d'une biomasse plus abondante et une surface d'échange liquide-solide plus élevée. Combiné au caractère hydraulique parfaitement mélangé du réacteur, le contact entre les cellules et leur substrat est considérablement amélioré. Cependant, le réacteur à lit fluidisé est un système complexe et son démarrage est considéré comme extrêmement délicat. C'est le développement de systèmes de contrôles automatiques permettant un suivi en temps réel de la réaction et une réponse rapide et appropriée aux signes de déstabilisation qui peut en faciliter la conduite (STEYER *et al.* 1999).

Pour ce qui concerne les réacteurs anaérobies à lit fixe, ils offrent aussi de bonnes performances épuratoires. Lorsque le support est disposé en vrac ils sont très adaptés au traitement d'effluents contenant peu de matières en suspension. Les principaux avantages du procédé de biofiltration sont la conception simple du réacteur, la tolérance aux variations de concentration et de température de l'effluent à traiter, la possibilité d'adopter un aspect modulaire qui facilite l'adaptation aux variations de charge ainsi que l'absence de mélange mécanique. Toutes ces caractéristiques ont bien sûr orienté notre décision lors du choix d'un procédé pour l'étude des matériaux de support microbien dans la troisième partie de ce rapport. Dans cette étude, des comparatifs mettent en jeu des réacteurs dans lesquels les supports sont fabriqués dans des matériaux possédant des densités parfois très différentes. Leur utilisation dans des systèmes à fluidisation aurait nécessité des forces très différentes d'un réacteur à l'autre afin d'obtenir les vitesses minimales de fluidisation. Ainsi, les forces mises en jeu dans les différents réacteurs ne permettraient pas d'obtenir les conditions hydrodynamiques homogènes. Le choix du lit fixe s'est donc imposé afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus pour chacun des réacteurs.

### **I.2.3 Démarrage des digesteurs anaérobies à biofilm**

#### I.2.3.1 Définition

La phase de démarrage peut être définie de différentes manières. Un industriel la verra comme étant le temps mis pour amener un système à son point de fonctionnement nominal, choisi *a priori*. Cette définition, manquera de rigueur pour un biologiste qui préférera y voir la période correspondant à la mise en place d'un biofilm établi, c'est à dire la formation d'un arrangement spatial des différents groupes trophiques les uns par rapport aux autres et vis à vis de leur substrat. Ainsi dans le cas de la digestion anaérobie, ce sera le temps nécessaire à la sélection et à la structuration spatiale d'un consortium microbien efficace pour la dégradation des polluants. La notion d'arrangement des flores bactériennes dans le biofilm peut avoir autant d'importance que l'accumulation de biomasse. L'intégrité et la structure du biofilm sont influencées par l'environnement qui peut être soumis à des variations plus ou moins fréquentes. Cet arrangement tridimensionnel complexe peut donc être considéré comme une structure dynamique et l'arrangement spatial des populations d'archées et de bactéries au sein du biofilm évolutif.

Dans l'industrie du traitement des eaux usées, la question du démarrage des réacteurs à biomasse fixée se résume souvent à savoir comment favoriser la fixation de la biomasse en un minimum de temps sans déstabiliser l'écosystème. Le but étant d'atteindre au plus vite les conditions de fonctionnement nominales. Ainsi, pour un industriel, la réduction de la durée de démarrage est un paramètre essentiel pour augmenter la compétitivité des réacteurs anaérobies à fortes charges. Le démarrage peut correspondre au temps nécessaire pour amener le réacteur à sa charge nominale avec une efficacité d'épuration acceptable. Elle est le plus souvent fixée à 80% (PRAKASH *et al.* 1996). Dans le cas de la digestion anaérobie où les micro-organismes ont un taux de croissance faible, les périodes de démarrage sont très longues. Elles peuvent varier de 2 à 12 mois (BULL *et al.* 1983). Il est possible d'attribuer ces grands écarts à la définition qu'il est fait du démarrage, selon que l'étude est réalisée par un laboratoire de recherche ou un industriel.

#### I.2.3.2 Paramètres influents

Tous les paramètres susceptibles de modifier les interactions physico-chimiques peuvent potentiellement influencer l'adhésion microbienne : la nature du matériau, la composition du liquide ou les micro-organismes en présence. Tous jouent un rôle en lien avec les paramètres

environnementaux tels que le pH, la température, la conductivité, la présence et la concentration en nutriments et en éléments traces ainsi que les paramètres opératoires comme le temps de séjour hydraulique, le mélange des phases et le design du réacteur. Le démarrage est principalement influencé par des paramètres liés à:

- la composition de l'effluent,
- l'inoculum : sa nature, son activité et sa faculté d'adaptation (WEILAND *et al.* 1991),
- la stratégie de montée en charge,
- le conditions hydrodynamiques,
- et à la formation du biofilm, elle même influencée par l'état des surfaces.

#### I.2.3.2.1 La technologie

Le Tableau I-4 répertorie quelques données de la littérature concernant des périodes de démarrage en fonction des effluents et des procédés utilisés pour les traiter. La nature des supports utilisés dans le travaux cités dans ce tableau sont à peine évoqués. Aucune tentative de lien avec les performances épuratoires ou la vitesse de démarrage n'est faite.

Tableau I-4 : Caractéristiques des démarrages de procédés à lit fixe ou fluidisé

Origine de l'effluent	Procédé	CVA ( $\text{DCO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ )	Durée (jours)	Source
Glucose	Lit fixe	6	40	(HANAKI <i>et al.</i> 1988)
	Lit fluidisé	20	60	(GARCIA-CALDERON 1997)
Sucrierie (betterave)	Lit fixe	18	90	(CAMILLIERI 1988)
	Lit fluidisé	8	120	(IZA <i>et al.</i> 1990)
		10	200	(PARIS <i>et al.</i> 1988)
Amidonnerie	Lit fixe	8	90	(Van ROMPU <i>et al.</i> 1988)
		15	300	(CAMILLIERI 1988)
		6	592	(TANTICHAROEN <i>et al.</i> 1988)
	Lit fluidisé	35	10	(HOLST <i>et al.</i> 1997)
Distillerie	Lit fixe	25	63	(BALAGUER <i>et al.</i> 1997)
		40	60	(BUFFIERE 1996)
	Lit fluidisé	30	60	(GARCIA-CALDERON 1997)
Laiterie	Lit fixe	60	50	(HOLST <i>et al.</i> 1997)
		15	200	(CAMILLIERI 1988)
	Lit fluidisé	5	30	(Da MOTTA MARQUES <i>et al.</i> 1989)

De manière générale, il s'avère très difficile de comparer, en termes de vitesse de démarrage, les performances de réacteurs issus de technologies différentes. D'autres paramètres comme l'origine de l'effluent ou la stratégie de montée en charge interviennent. Par exemple, un effluent synthétique simple comme le glucose va permettre d'arriver rapidement à la charge nominale quel que soit le type de procédé (40 jours pour le lit fixe contre 60 pour le lit fluidisé). Contrairement à un effluent complexe comme celui des amidonneries qui semble difficile à traiter en lit fixe. Pour ce type d'effluent, la période de démarrage d'un lit fixe peut dépasser l'année.

Les réacteurs à lit fluidisé semblent beaucoup plus efficaces dans ce domaine que les lits fixes. En effet, ils présentent généralement des temps de démarrage plus courts (de 10 à 120 jours) que les lits fixes. Lorsque ce n'est pas le cas, les durées de démarrage des lits fluidisés sont allongées en raison du temps nécessaire pour atteindre une charge nominale souvent beaucoup plus élevée.

### I.2.3.2.2 L'alimentation

#### I.2.3.2.2.1 *Le type d'effluent à traiter*

Les durées des phases de démarrage sont différentes selon le type d'effluent traité. Dans le cas d'effluents synthétiques, les durées de démarrage sont plus courtes (40 jours) si le procédé utilisé est un filtre anaérobie (HANAKI *et al.* 1988) comparé aux 60 jours du lit fluidisé (GARCIA-CALDERON 1997). Dans cette configuration où l'alimentation se fait sous forme de glucose ou d'AGV, les durées de démarrage sont supérieures à la moyenne de la littérature. Il faut cependant noter que les CVA maximales obtenues lors des études sont souvent honorables (HSU *et al.* 1993).

En poursuivant l'analyse des résultats obtenus lors de l'utilisation d'effluents réels, nous constatons que le type d'alimentation a une importance moindre. Une étude distingue plusieurs catégories de substrats : les effluents de sucrerie avec des temps de démarrage de l'ordre de 3 mois, les effluents laitiers et de distillerie pour lesquels les temps sont un peu plus longs (6 à 8 mois) et les effluents d'amidonnerie ou d'usine chimique qui constituent une classe à part avec des temps de démarrage proches de l'année (CAMILLIERI 1988). Les effluents d'amidonnerie semblent en effet plus difficiles à traiter puisqu'il nécessitent 90 voire 200 jours de démarrage en lit fixe (PARIS *et al.* 1988; Van ROMPU *et al.* 1988) par rapport à des effluents de distillerie ou d'abattoirs (30 jours pour TIMUR *et al.* 1988, 20 jours pour KANG *et al.* 1997, 60 jours pour BUFFIERE 1996 et GARCIA-CALDERON 1997).

La complexité de l'effluent joue un rôle puisque pour une même technologie, l'utilisation d'effluents synthétiques d'une part, et d'effluents réels de l'autre, ne mène pas aux mêmes conclusions. Dans les deux, cas il existe une différence mais elle n'est pas due seulement à la nature de l'alimentation puisque le type de procédé mis en œuvre a une importance qui est variable selon la technologie choisie (cas du glucose). Dans plusieurs cas, la CVA obtenue à l'issue des tests est d'autant plus élevée que la période de démarrage est lente. Ces résultats soulèvent l'importance de l'aspect qualitatif du biofilm formé.

### *1.2.3.2.2.2 Le rapport C/N*

Pour les archées méthanogènes, le milieu de culture doit avoir une proportion DCO/N/P d'au moins 400-7-1. Ce rapport DCO/N est différent pour les bactéries fixées puisqu'il est proche de 100/1. Cette propriété peut être attribuée au fait qu'une carence relative en azote stimule la production d'exopolysaccharides (ANNACHHATRE *et al.* 1992). Une étude montre qu'un réacteur à lit fixe alimenté avec un rapport C/N de 100/1 pendant les quinze premiers jours a une efficacité supérieure de 20% à celle d'un réacteur alimenté avec un ratio normal (100/7) (PUNAL *et al.* 2000). C'est une caractéristique à prendre en compte dans le cas où la composition de l'alimentation peut être ajustée.

### *1.2.3.2.2.3 Les compléments alimentaires*

La croissance des méthanogènes nécessite des oligo-éléments. CRESSON *et al.* 2006 ont montré l'efficacité d'un apport d'oligo-éléments sur la restauration de l'activité méthanogène et sur la croissance du biofilm d'un réacteur de méthanisation à lit fluidisé inverse (CRESSON *et al.* 2006). La plupart des études qui font part de l'utilisation d'éléments nutritifs ou de vitamines dans leurs procédés les utilisent en mélange sous forme d'extrait de levure ou de trypticase peptone. Il n'est donc pas possible de connaître l'efficacité de chacun d'entre eux. Un test sur l'effet de l'apport en éléments minéraux (Fe, Ni, Co, Mo) montre leur rôle essentiel lors du démarrage puisque la vitesse de colonisation est de 1,5 à 2 fois plus élevée lors de la suppression de la carence (LAUWERS *et al.* 1989). Un autre auteur souligne la nécessité d'utiliser du cuivre et du zinc (CAMILLIERI 1988).

### *1.2.3.2.2.4 Les cations*

La présence d'ions réduit la barrière d'énergie libre entre les interfaces solide/biofilm par formation de ponts qui diminuent la perméabilité de la paroi cellulaire, favorisant ainsi la

sécrétion des polysaccharides. Les cations tels que le calcium (100 à 200 mg  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{l}^{-1}$ ) et le magnésium ont un effet bénéfique sur la formation et la consolidation du biofilm (CAMILLIERI 1988 ; CHARACKLIS 1990 ; ANNACHHATRE *et al.* 1992). Il est possible d'obtenir un biofilm mature après 30 jours avec 100mg de  $\text{Ca}^{2+}$  au lieu de 90 jours pour le témoin (da MOTTA MARQUES *et al.* 1990). L'utilisation de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en lieu et place de la soude lors de la régulation du pH est envisageable (CHARACKLIS 1990).

### 1.2.3.2.3 La biomasse

Peu d'études précises ont été effectuées sur le rôle de la biomasse lors de la mise en route d'un digesteur, cependant il est possible de mettre en avant trois aspects essentiels de ce paramètre : d'une part, il est nécessaire de sélectionner l'origine des boues utilisées, ensuite la quantité d'inoculum doit être adaptée aux différentes contraintes opérationnelles et enfin la manière dont est réalisée l'inoculation (massive, fractionnée, continue) doit être choisie.

#### 1.2.3.2.3.1 Structure microbienne

Plusieurs auteurs mettent en avant le rôle de l'architecture et la nature des groupements chimiques présents à la surface des cellules microbiennes (BAR-NESS *et al.* 1989 ; Van der MEI 1989 ; HANCOCK 1991 ; BRIANDET 1999 ; GIOVANNACCI 1999). La composition de la paroi microbienne fait varier le degré d'hydrophobicité de la surface cellulaire. Ces groupements chimiques influent sur les propriétés physico-chimiques de cette surface et donc sur l'adhésion des micro-organismes.

#### 1.2.3.2.3.2 L'origine et l'acclimatation de la flore microbienne

La qualité de l'inoculum utilisé est très souvent mise en cause lors de l'obtention de faibles performances ou de démarrages trop longs (BARBER *et al.* 1998). Ainsi faut-il apporter des micro-organismes adaptés et efficaces en termes de dégradation des polluants pour obtenir un gain de temps conséquent. D'après Heijnen, l'ensemencement par des boues provenant d'un autre réacteur traitant le même effluent permet de démarrer directement à la charge nominale (HEIJNEN *et al.* 1989). Dans le meilleur des cas, l'inoculum doit aussi apporter des conditions environnementales favorables (pouvoir tampon, potentiel d'oxydo-réduction).

Si l'idéal est de réaliser l'inoculation en utilisant la sortie d'un réacteur en fonctionnement, il n'est pas toujours possible d'obtenir la quantité d'inoculum nécessaire. Ainsi des auteurs (CHEN *et al.* 1985; CAMILLIERI 1988; AUSTERMANN-HAUN *et al.* 1994)

recommandent-ils l'acclimatation de boues anaérobies de stations urbaines, (réputées pour leur polyvalence), de bassins ou de lagunes de stockage des effluents en les adaptant pendant une période de 1 semaine à 3 mois. Elles possèdent généralement une flore bactérienne variée qui peut traiter de nombreux types d'effluents. De même, il est possible d'avoir recours aux mélanges de boues d'origine différente (station, lagune) toujours dans l'objectif d'assurer une grande diversité dans les populations bactériennes de l'inoculum (VOGEL *et al.* 1988a).

### *1.2.3.2.3.3 La quantité de biomasse utilisée*

Rares sont les auteurs à préciser les quantités d'inoculum utilisées lors de leurs études et il est délicat de faire le lien entre la quantité de boues utilisées, la vitesse de colonisation, et la vitesse de démarrage du réacteur. Certains n'utilisent que 30 ml de boues d'un digesteur pour un réacteur à lit fluidisé de 4 litres (BULL *et al.* 1983) mais dans la majorité des cas, la quantité de boues se situe autour de 20 à 50 % du volume pour les réacteurs à lit fluidisé, (WEILAND *et al.* 1988 ; da MOTTA MARQUES *et al.* 1990) et 50 à 100 % pour des réacteurs à lit fixe ou à lit de boues (CAMILLIERI 1988 ; PARIS *et al.* 1988).

Une étude recommande tout de même une concentration de  $20 \text{ kg}_{\text{VSS}} \cdot \text{m}^{-3}$  de boues acclimatées (ANNACHHATRE *et al.* 1992) tandis qu'ailleurs un ensemencement massif est préconisé afin de multiplier les contacts entre le support et la biomasse libre (SALKINOJA SALONEN *et al.* 1983 ; WEILAND *et al.* 1991). Camillieri propose le calcul de l'activité des boues afin d'établir une quantité standard d'inoculation suivant la charge nominale à traiter. Ainsi pour une activité de  $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{g}_{\text{MV}} \cdot \text{j}^{-1}$ , la quantité à inoculer afin de traiter une charge de  $15 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  devrait être de  $15/0,5=30 \text{ g}_{\text{MV}} \cdot \text{L}^{-1}$  (CAMILLIERI 1988). S'il n'est pas possible de disposer d'une quantité de boues suffisante, d'autres stratégies peuvent être mises en œuvre.

### *1.2.3.2.3.4 La stratégie d'inoculation*

Dans la majorité des cas, pour des raisons pratiques, c'est un ensemencement massif qui est réalisé avec un démarrage direct du réacteur. Certains auteurs favorisent la mise en contact en faisant fonctionner le réacteur en boucle fermée pendant quelques jours (da MOTTA MARQUES *et al.* 1990 ; HSU *et al.* 1993) avant de démarrer l'alimentation. D'autres mettent en place un système de recirculation des boues (CAMILLIERI 1988) ou bien réensemencent en continu avec une partie de la sortie d'un autre réacteur (HOLST *et al.* 1997).

La recirculation des boues permet d'augmenter le temps de contact des micro-organismes avec le support. Elle réintroduit les cellules en suspension et maintient de bonnes conditions physico-chimiques.

Certains opérateurs utilisent une stratégie d'inoculation progressive ou fractionnée (LAUWERS *et al.* 1989 ; PRAKASH *et al.* 1996). La stratégie utilisée par HOLST *et al.* (1997) prévoit, en plus d'un ensemencement massif, une alimentation du réacteur avec un mélange d'effluent à traiter et d'effluent de sortie d'un réacteur traitant le même type d'eaux usées, et ce, pendant la première semaine (HOLST *et al.* 1997). Cette méthode présente plusieurs avantages : d'une part, elle permet d'ensemencer le réacteur en continu, et donc de compenser les pertes de biomasse dues au lessivage, d'autre part, elle permet d'ajuster les conditions environnementales à celles du réacteur en fonctionnement (pouvoir tampon, alcalinité, potentiel d'oxydoréduction).

Le contact entre les populations libres et le support doit être maximal même si une trop forte concentration en cellules libres limite la croissance du biofilm (HSU *et al.* 1993). En effet, si une forte concentration en solide est un point clé pour favoriser les contacts et l'adhésion, la compétition entre biomasse libre et biomasse fixée retarde le développement du biofilm (ANNACHHATRE *et al.* 1992). Un lessivage progressif et rapide des bactéries libres est nécessaire après la formation de la première couche cellulaire sur le support (MICHAUD 2001). Dans ce cas il faut éviter la surcharge organique des cellules fixées car elle entraînerait des conséquences néfastes sur la formation du biofilm.

### *1.2.3.2.3.5 Le temps de contact*

La durée de la phase d'inoculation varie habituellement de quelques jours à quelques semaines (MARIN *et al.* 1999 ; CELIS-GARCIA *et al.* 2005 ; YE *et al.* 2005). Une étude montre qu'elle peut être réduite à quelques heures seulement (CRESSON *et al.* 2009). Elle met en évidence une fixation précoce (temps inférieur à 12 heures) de certaines espèces du consortium anaérobie (*Desulfovibrio* sp. A2 et *Sporomusa ovata*) ainsi qu'une adhésion préférentielle et une croissance des micro-organismes (*Pelobacter* sp. cloneM113 et *Sporomusa* sp. DR6) dont l'aptitude à la fixation est meilleure (CRESSON *et al.* 2009).

### I.2.3.2.4 Les conditions de culture

#### I.2.3.2.4.1 *La température, le pH et la force ionique*

La température de culture peut influencer sur les propriétés physico-chimiques de surface des souches bactériennes car c'est un facteur impliqué dans la production de structures exocellulaires (flagelles). Ainsi l'adhésion d'une souche sauvage *L. monocytogenes* NCTC 7973 sur de l'acier inoxydable est dix fois plus importante que celle mesurée pour son mutant flagelline (-) (VATANYOOPAISARN *et al.* 2000). En outre, ces structures cellulaires peuvent faciliter le déplacement cellulaire augmentant ainsi leur vitesse de transport vers les surfaces cibles et leur vitesse de dépôt (MEYLHEUC 2000).

De la même manière, le pH et la force ionique du milieu liquide modifient l'adhésion en changeant les caractéristiques électriques des différents corps en présence. L'adhésion d'*E.coli* sur du verre est dépendante du pH (HAMADI *et al.* 2008). Une diminution de la force ionique du liquide de suspension diminue l'adhésion de *Listeria monocytogenes* Scott A à l'acier 304, diminution attribuée à un effet répulsif des interactions électrostatiques établies entre la bactérie et le support récepteur (BRIANDET *et al.* 1999b).

#### I.2.3.2.4.2 *Les conditions hydrodynamiques*

Les premières investigations liées aux contraintes hydrodynamiques ont tout d'abord été liées à l'agitation qui permet l'homogénéisation du support, des bactéries et du substrat et favorise ainsi les transferts mais aussi les phénomènes d'attrition et d'érosion du biofilm. Par la suite les études sont relatives au débit de liquide dans l'environnement proche du biofilm en création. Depuis peu elles s'étendent vers une caractérisation plus précise des profils des conditions hydrodynamiques.

La mise en place ainsi que la maturation d'un biofilm anaérobie sont dépendantes des conditions hydrodynamiques qui règnent dans le réacteur (CRESSON *et al.* 2007). De fortes contraintes favorisent l'installation d'un biofilm fin et résistant avec des activités biologiques élevées qui compensent la faible quantité de biofilm (PICIOREANU *et al.* 2001). Selon le type de réacteur à biomasse fixée, les conditions hydrodynamiques modifient la vitesse et la nature de la fixation et donc le développement ultérieur du biofilm. Ainsi, la fixation dans les réacteurs à lit fixes où les contraintes hydrodynamiques sont faibles est plus rapide et le biofilm plus épais que dans les réacteurs à lit mobile. Par contre dans ces derniers, les problèmes de colmatage à long terme sont moins probables (HEIJNEN *et al.* 1989).

Lors des conditions d'agitation sévères pouvant régner dans les procédés, l'existence de zones protégées à la surface du support va permettre de favoriser la fixation initiale des cellules (FOX *et al.* 1990 ; GARCIA-CALDERON *et al.* 1996). Une très haute activité cellulaire telle qu'une activité spécifique finale de  $1,3 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{g}_{\text{MV}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  compense la limitation du nombre de cellules fixées par les fortes contraintes hydrodynamiques (MICHAUD *et al.* 2003). La résistance du biofilm à ces contraintes serait due à la plus grande quantité de polymères sécrétées dans les biofilms denses (OHASHI *et al.* 1994).

En fait la structure du biofilm dépend des caractéristiques de détachement liées à l'attrition et aux forces de cisaillement d'une part et aux transferts de matière d'autre part (KWOK *et al.* 1998) et (PICIOREANU *et al.* 2000).

Si les conditions hydrodynamiques ne sont pas stables, le biofilm ne se forme pas de manière homogène, les modifications autour du biofilm génèrent une variété de structure de ce biofilm (PICIOREANU *et al.* 2001). Des études font part de perte massive de biomasse liée à une mauvaise évacuation du biogaz lors du dysfonctionnement de la fluidisation de lit anaérobie (DIAZ-BAEZ 1988 ; HSU *et al.* 1993). Ce problème disparaît dans le cas de l'utilisation d'un réacteur à lit fluidisé inverse (dans lequel le gaz et le liquide s'écoulent à contre-courant) ou à lit turbulent inverse (dans lequel l'expansion est assurée par un flux ascendant de gaz) où malgré les fortes CVA les conditions hydrodynamiques sont régulières tout au long de la période de fonctionnement du réacteur (GARCIA-CALDERON 1997 ; BUFFIERE *et al.* 2000).

Le temps de séjour du liquide appliqué au système peut avantager la croissance des populations libres ou fixées. Il faut appliquer un taux de dilution supérieur au taux de croissance des bactéries libres, ce qui provoque leur lessivage et permet ainsi de privilégier le développement des bactéries fixées (HEIJNEN *et al.* 1989 ; RITTMAN 1989 ; Van LOOSDRECHT *et al.* 1996 ; CRESSON *et al.* 2007).

### *1.2.3.2.4.3 Stratégie de montée en charge*

Un avantage important de l'épuration anaérobie par rapport aux procédés aérobies réside en partie dans une production de boues beaucoup plus réduite. L'inconvénient majeur associé est le faible taux de croissance des micro-organismes méthanogènes. Le risque de déséquilibre de l'écosystème bactérien est fort lorsque l'on vise une montée en charge du procédé. Si cette instabilité peut être atténuée grâce à l'évolution des procédés, il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'un paramètre à surveiller.

L'élaboration d'une stratégie cohérente de montée en charge nécessite donc à la fois de maintenir une activité biologique maximale tout au long du démarrage et de s'assurer que l'augmentation de la charge est sans risque. Afin d'atteindre la CVA nominale sans créer de perturbations de l'écosystème anaérobie, deux paramètres primordiaux sont communément contrôlés (MICHAUD 2001).

### *Le temps de séjour hydraulique (TSH)*

Le temps de séjour hydraulique correspond au temps de séjour de la biomasse libre car les micro-organismes planctoniques sont en suspension dans la phase liquide. Puisque l'opérateur veut favoriser la croissance de la biomasse fixée, le taux de dilution du système doit être inférieur au taux de croissance des bactéries planctoniques afin de les lessiver (Van LOOSDRECHT *et al.* 1993). L'étude d'une stratégie par baisse du TSH en réacteur compartimenté permet d'obtenir un démarrage plus rapide mais aussi plus stable (BARBER *et al.* 1998) par rapport à une stratégie d'augmentation de la concentration de l'alimentation à TSH constant. Les auteurs font l'hypothèse que la perturbation due à la baisse du TSH est moins importante que la hausse de la concentration de l'alimentation. Plus récemment, une autre étude menée au LBE montre que, dans l'optique d'un démarrage rapide, la stratégie du lessivage de la biomasse libre favorise la croissance du biofilm et permet d'atteindre un rendement épuratoire plus élevé que dans le cas d'une diminution exponentielle du TSH (CRESSON *et al.* 2008). En fixant un TSH très court dès la mise en route du procédé, l'opérateur permet le lessivage rapide des bactéries libres et évite ainsi leur mobilisation du substrat au détriment des micro-organismes attachés.

### *L'activité biologique*

La stratégie de démarrage consiste à augmenter l'apport en matière organique en conservant une activité biologique optimale et ce sans perturber l'écosystème. Le plus souvent, il s'agit d'augmenter la charge appliquée en maintenant le rendement d'épuration à une valeur élevée (stratégie de l'épuration maximale) alors qu'une autre stratégie consiste à augmenter la charge tant que la quantité de matière organique dégradée augmente ; c'est la stratégie de la charge maximale.

La **stratégie de l'épuration maximale** est couramment utilisée dans l'industrie. Elle consiste à augmenter l'apport en matière organique, le plus souvent par paliers de 5 à 10%, tout en conservant un rendement épuratoire suffisamment élevé de près de 80% (ARAKI *et al.* 1994).

Il est possible de suivre l'évolution du système en mesurant les concentrations d'AGV en sortie ou bien celles du pH ou du débit de gaz. Des auteurs préconisent une concentration minimale d'acides gras volatils de l'ordre de 20 meq.l<sup>-1</sup> d'acide acétique (CAMILLIERI 1988). Les inconvénients de cette stratégie sont son manque d'agressivité (HSU *et al.* 1993) et les à-coups de charge qui peuvent perturber l'écosystème (WEILAND *et al.* 1988).

La **stratégie de la charge maximale** est liée à des critères d'activités biologiques plutôt qu'à un critère de performance d'épuration (HEIJNEN *et al.* 1989). Dans cette stratégie la montée en charge est continue et progressive puisque la CVA progresse en fonction de l'augmentation de la dégradation organique par les bactéries. L'alimentation d'un procédé avec un effluent dilué par la sortie du réacteur est une méthode utilisée par les industriels. Elle consiste à fixer dès le début un temps de séjour correspondant à celui de la charge nominale. Afin de démarrer à faible charge, l'effluent à traiter est alors dilué en conséquence. La concentration de l'alimentation est augmentée progressivement en diminuant le facteur de dilution jusqu'à atteindre la concentration de l'effluent à traiter. Les chocs transitoires sont ainsi évités et l'activité biologique reste optimale (STRONACH *et al.* 1986). Cette méthode donne de bons résultats lorsque le procédé est conduit de manière automatique en fonction des données en temps réel puisque il est possible d'atteindre une efficacité de dépollution finale de 90% lors d'un démarrage en 63 jours (BALAGUER *et al.* 1997) ou bien grâce à une stratégie prédéfinie où un débit d'alimentation croissant et continu est appliqué de manière progressive (WEILAND *et al.* 1988). Cette procédure nécessite une adaptation en temps réel du débit d'alimentation ou une stratégie prédéfinie de montée en charge progressive (WEILAND *et al.* 1988 ; STEYER *et al.* 1999). Dans ce dernier cas, il convient toutefois de prendre certaines précautions pour éviter la surcharge.

La stratégie de l'épuration maximale conduit à des temps de démarrage plus longs car il n'y a pas de sélection des micro-organismes en faveur des plus actifs et le substrat est limité avant chaque montée en charge pour assurer un rendement épuratoire suffisant. A l'inverse, ce type de méthode permet d'éviter les surcharges organiques, ce qui est plus sécurisant. Un comparatif met en avant cette différence : le démarrage selon la méthode de la charge maximale est réalisé en 140 jours, tandis que la stratégie de l'épuration maximale prend 200 jours (HSU *et al.* 1993).

### I.2.3.2.4.4 Conduite automatique des bioprocédés

Pour le démarrage des lits fluidisés anaérobies, il est intéressant d'utiliser des systèmes de conduite automatisés (EHLINGER 1994 ; STEYER *et al.* 1999). L'utilisation d'un contrôle du système peut permettre de réduire la durée de la phase de démarrage (CECCHI *et al.* 1992). Grâce à une alimentation autorégulée par le pH un lit fixe est démarré en 36 jours pour atteindre une charge de  $60 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  (AUSTERMANN-HAUN *et al.* 1994). Le dispositif Méthaveil (EHLINGER *et al.* 1994 ; HOLST *et al.* 1997) basé sur l'analyse de 3 paramètres mesurés en ligne : pH, débit de biogaz et concentration d' $\text{H}_2$  dans la phase gazeuse, permet de suivre la stabilité du réacteur. Une montée en charge progressive peut être réalisée et les corrections sur le débit d'alimentation facilitent l'optimisation du temps pour amener le digesteur à sa charge nominale sans dysfonctionnement.

Ces systèmes de conduite automatisés connaissent un développement certain dans les laboratoires, mais leur application est aujourd'hui très limitée à l'échelle industrielle. Les raisons de ce retard sont multiples, nous n'en retiendrons que les deux principales. D'une part, la fiabilité et le coût des capteurs en ligne (tant en investissement qu'en maintenance) constituent encore un obstacle que les opérateurs de digesteurs ne souhaitent pas franchir. D'autre part, ils préfèrent utiliser des installations surdimensionnées de 15 à 30 % plutôt que d'en optimiser le fonctionnement par des systèmes de conduite optimale. Pour illustrer cet état de fait, nous pouvons mentionner que peu de digesteurs industriels affichent des charges nominales supérieures à  $40 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ , alors qu'il est communément admis que des systèmes comme les lits fluidisés peuvent atteindre des charges supérieures à  $120 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$  (AIVASIDIS *et al.* 1988 ; BUFFIERE 1996 ; STEYER *et al.* 1999).

### I.2.3.2.5 Support

Le support joue un rôle majeur dans le processus de création du biofilm, en particulier pendant les premières étapes de l'accumulation, et il peut influencer le taux de micro-organismes accumulés ainsi que leur distribution initiale de la population de cellules. Les principales qualités d'un support requises pour l'adhésion de micro-organismes sont décrites dans ce paragraphe.

### *1.2.3.2.5.1 Effet de la taille*

De la taille d'un support peut dépendre la quantité de biofilm. En effet, plus le support sera petit, plus sa surface spécifique sera grande. Ainsi, lorsque le biofilm aura atteint sa maturité, l'efficacité spécifique du lit sera élevée. Cela permettra d'appliquer une charge volumique plus importante. A taille égale (diamètre apparent équivalent) un support avec une plus grande surface spécifique fixera une plus grande quantité de biofilm (SILVA *et al.* 2006). Il faut cependant nuancer ces propos en fonction du type de procédé mis en œuvre. Dans un lit fixe, le fait de diminuer la taille du support augmente aussi les risques de colmatage. Les supports de petite taille seront destinés à un usage en réacteur à lit fixe dans lesquels ils seront utilisés en fluidisation. Une faible taille de particule permettra alors de diminuer la quantité de support à utiliser mais le nombre de particules devra être optimal pour éviter l'abrasion (HEIJNEN *et al.* 1989).

### *1.2.3.2.5.2 Effet de la topographie*

Les micro-organismes s'attachent préférentiellement aux supports rugueux (PEREIRA *et al.* 2000). Ceci s'explique d'une part par l'augmentation de la surface spécifique (exprimée en  $m^2/m^3$ ) et d'autre part par une protection supplémentaire contre les forces de cisaillement. Un changement de topographie peut aussi entraîner des modifications chimiques favorisant les interactions physicochimiques (LUMSDEN *et al.* 1981). **La surface disponible** pour la colonisation est un critère de rapidité d'adhésion. A ce titre, les réacteurs à lit mobile ont un avantage important par rapport aux réacteurs à lit fixe car les surfaces offertes sont plus élevées. Mais le rôle de la topographie ne semble pas majeur lors de l'adhésion initiale. Les caractéristiques du support les plus importantes vont être liées à **la présence de microcavités à sa surface** de quelques dizaines de  $\mu m$  (KURODA *et al.* 1988 ; FOX *et al.* 1990 ; ANNACHHATRE *et al.* 1992) et à sa charge (BORJA *et al.* 1994). Les micro-organismes trouvent dans ces rugosités une zone protégée des frictions et de la turbulence.

La limite de cet effet positif de la rugosité est atteinte lorsque les angles deviennent trop aigus et augmentent le taux d'abrasion. Cette abrasion n'atteignant pas les micro-organismes des pores ou des failles du support, l'influence de la rugosité sur la formation des biofilms est davantage liée à la recolonisation rapide d'un support grâce aux micro-organismes déjà présents (QUIRYNEN *et al.* 1995).

### *1.2.3.2.5.3 Effet de la nature chimique*

C'est dans les premiers instants de l'exposition du support au liquide réactionnel que l'adsorption des macromolécules organiques puis la fixation des micro-organismes peut être facilitée. **La charge de surface du matériau et son hydrophobicité** ont donc un rôle très important qui dépend de la nature du solide lui-même et des caractéristiques du liquide dans lequel il est plongé (KURODA *et al.* 1988 ; VERRIER *et al.* 1988). La composition chimique, l'hydrophobicité et la capacité d'absorption qui en découlent sont parfois décrites comme améliorant l'adhésion réversible des bactéries (VERRIER *et al.* 1988 ; GJALTEMA *et al.* 1997).

Des auteurs mettent en avant le rôle majeur de l'hydrophobicité de supports minéraux lors de leur colonisation par un consortium méthanogène et mettent en évidence une relation directe entre la capacité de rétention cellulaire et l'énergie libre d'adhésion positive (PEREIRA *et al.* 2000). Ainsi selon le support utilisé et selon le milieu réactionnel les différentes populations microbiennes ne se fixeront pas avec la même efficacité. Une étude montre une différence de fixation pour les bactéries hydrolytiques et les archées méthanogènes selon que le support est de la sépiolite ou de la bentonite (BORJA *et al.* 1994). Une autre note un taux de fixation différent des méthanogènes sur la sépiolite et la diabase selon s'il s'agit de populations hydrogénophiles ou acétoclastes (SANCHEZ *et al.* 1994). Un taux variable de méthanogènes peut être mesuré selon la nature du matériau à rendement épuratoire constant (SILVA *et al.* 2006).

La comparaison de plusieurs supports à porosité équivalente montre une différence de performance des réacteurs avec un avantage aux matériaux organiques par rapport aux matériaux inorganiques (YANG *et al.* 2004). Une étude compare l'efficacité de 3 supports microbiens différents dans des réacteurs identiques traitant le même effluent. La durée de démarrage de ces 3 réacteurs est la même qu'il s'agisse de sépiolite, de pierre ponce ou de sable : 63 jours (BALAGUER *et al.* 1997).

D'autres interactions avec le milieu liquide sont à prendre en compte comme le relargage éventuel de composés du support solide ayant soit un effet stimulant (MURRAY *et al.* 1981) soit un effet inhibiteur direct (ALVES *et al.* 1999) ou indirect par modification du pH (RANALLI *et al.* 1995).

### *1.2.3.2.5.4 Effet d'un traitement préliminaire*

Afin de diminuer la durée de démarrage de réacteurs anaérobies plusieurs auteurs se sont intéressés au prétraitement des supports avec des polymères inertes, des biopolymères, ou encore avec des bactéries à vitesse de croissance élevée. Dans les premiers cas, les interactions responsables de l'adhésion bactérienne ne se feront plus entre le solide et le micro-organisme, mais entre le micro-organisme et le film adsorbé.

Une étude testant 6 types de **polymères** (amidon, polyacrylamide, xanthane, carboxyméthylcellulose, alun et un flocculant) lors d'essais de traitement de matériaux en couches soit humides, soit séchées à l'air, soit cuites à 120°C ne met en évidence aucun effet dans tous les cas (SWITZENBAUM *et al.* 1985). L'utilisation de polymères n'augmente pas les performances de filtres anaérobie (Da MOTTA MARQUES *et al.* 1989).

La modification du comportement bioadhésif des souches peut être obtenue par un changement des propriétés physico-chimiques de la surface réceptrice (Van OSS *et al.* 1988). L'utilisation de biopolymères extraits de boues anaérobies permet l'obtention d'une période de démarrage plus courte : 60 jours au lieu de 90 (da MOTTA MARQUES *et al.* 1990). Une amélioration nette de la vitesse de démarrage et de colonisation est obtenue lors de l'utilisation de biopolymères produits par *Klebsiellia aerogenes* (DIAZ-BAEZ 1988). Le même auteur montre que l'utilisation de polymères cationiques augmente les vitesses de colonisation. Cependant, il s'avère que lors des deux travaux, les activités des biofilms sont plus faibles que celles des réacteurs témoins.

La précolonisation par un biofilm dénitrifiant a été testée pendant plusieurs périodes variant de quelques minutes à quelques jours sans résultats probants (SWITZENBAUM *et al.* 1985). De meilleurs résultats sont obtenus lors de la précolonisation par des boues aérobies pendant 1 jour et 6 jours puisque la précolonisation prolongée réduit de 45 jours (pour le témoin) à 20 jours la durée de mise en place d'un biofilm mature. Ici aussi dans les deux cas, le biofilm présente une activité beaucoup plus faible que le témoin.

### 1.2.3.3 Conclusion sur le démarrage des procédés de méthanisation à biofilm

Différents points clés viennent d'être abordés, il en découle que dans un procédé de méthanisation à biomasse fixée l'utilisation d'une précolonisation, soit par des polymères, soit par des bactéries, n'apporte pas les résultats escomptés en terme d'activité des biofilms créés. De même le type de procédé ne semble pas conditionner les démarrages malgré le fait que les lits mobiles atteignent des CVA optimales plus importantes que dans le cas des lits fixes.

Au contraire d'autres paramètres impliqués modifient la durée et la qualité du démarrage. La **nature de l'effluent** semble importante puisque les durées s'allongent considérablement (x3) lorsque l'effluent est d'une nature complexe. Ce résultat doit être tempéré par la CVA maximale obtenue. Elle est souvent plus élevée lorsque le démarrage est long. Dans ce cas la qualité du biofilm peut être mise en avant. Les **conditions de culture** des micro-organismes (température, pH, intensité lumineuse, potentiel redox) doivent être respectées. Afin de diminuer le temps de formation du biofilm, l'utilisation d'une quantité suffisante de vitamines et d'oligo-éléments (Fe, Ni, Mo, Co, Zn, Cu) ainsi que l'établissement d'un rapport C/N/P adéquat doivent permettre d'assurer de bonnes conditions de fixation et de croissance. La qualité de l'**inoculum** va permettre d'améliorer la période de démarrage. Il est donc judicieux de choisir des boues actives et acclimatées au substrat. La quantité de boues utilisée dépendra de la CVA ainsi que de la stratégie de montée en charge fixée par l'opérateur. Il s'agit là de paramètres très fortement liés aux facteurs biologiques qui permettent aux conditions environnementales d'être optimales pour le développement microbien. L'étude bibliographique a montré qu'ils étaient bien connus aujourd'hui et largement surveillés.

Il n'en va pas toujours de même avec les aspects technologiques qui n'ont pas tous été abordés dans les études précédentes. Du point de vue du génie des procédés, les études sont nombreuses. Elles ont facilité l'évolution des procédés vers l'obtention de réacteurs très performants. En permettant de séparer le temps de séjour de la biomasse et le temps de séjour hydraulique de l'effluent ainsi qu'en concentrant la biomasse disponible dans le milieu réactionnel, les procédés à cultures fixées atteignent maintenant des performances épuratoires élevées. Depuis peu, l'intérêt des auteurs s'est portée vers le démarrage de ces procédés afin d'en réduire la durée. Différentes stratégies de conduite ont été élaborées. L'utilisation de la stratégie dite « de la charge maximale » permet un gain de temps qui peut être encore augmenté par le contrôle automatique du procédé. La dernière en date montre qu'il est impératif d'éliminer les micro-organismes libres le plus rapidement possible. C'est possible en diminuant le TSH. Un bon mélange du réacteur est nécessaire pour optimiser le contact entre le support et les micro-organismes

Lorsque le choix d'un support microbien pour méthaniseur est étudié, il est souvent simplement décrit comme étant « bon » ou « mauvais » en fonction de son utilisation. Pourtant, dans d'autres domaines d'application, ce sont souvent plusieurs critères qui sont décrits et qui vont conditionner la qualité de la colonisation. Ainsi, l'étude bibliographique nous apprend qu'un bon support doit généralement avoir des qualités physiques telles qu'une

surface spécifique importante, une porosité ou éventuellement une rugosité facilitant la fixation des micro-organismes et être mécaniquement stable. D'un point de vue chimique, il est préférable d'opter pour un matériau biologiquement inerte. Selon le procédé employé, il vaut mieux choisir un matériau peu colmatable pour un filtre anaérobie et un support dont la distribution de taille soit uniforme pour les lits fluidisés ou turbulés.

### **I.3 CONCLUSION SUR L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Un biofilm est défini comme étant une communauté de micro-organismes agrégés en microcolonies, enrobées dans une matrice qu'ils ont eux même secrétée et adhérant sur une surface inerte. L'intérêt que nous portons au mode de vie microbien en biofilm est récent mais aujourd'hui nous avons conscience qu'il est le plus courant et le plus adapté à la colonisation d'environnements divers. Les travaux effectués ces dernières années ont permis d'établir les principes généraux de la formation des biofilms. Il s'agit d'un champ d'investigation encore récent qui met en œuvre des approches complémentaires liées à des disciplines d'étude aussi variées que la physiologie microbienne, le génie des procédés, la biologie moléculaire ou la biochimie.

Dans les systèmes de traitement des eaux usées, le rôle du biofilm est fondamental. La vitesse de sa formation au sein des réacteurs joue un rôle primordial dans le démarrage du procédé. C'est encore plus vrai dans les milieux anaérobies où les vitesses de croissance des micro-organismes sont faibles. La qualité de ce démarrage est dépendante de nombreux paramètres et les facteurs d'adhérence impliqués dépendent des micro-organismes concernés et de leur environnement : support solide et milieu liquide.

En digestion anaérobie, les travaux menés jusqu'à présent concernant le démarrage de réacteurs intensifs à biofilms, se résument le plus souvent à la recherche des meilleures conditions hydrodynamiques : le choix du matériau solide est principalement basé sur ses propriétés physiques : densité, taille, forme voire porosité dans le meilleur des cas. Cependant, l'étude bibliographique nous apprend que les connaissances concernant les premiers instants de contact d'un consortium de bactéries anaérobies sous forme libre avec une surface sont encore lacunaires. Quelles sont les propriétés des matériaux qui facilitent le passage d'une population de cellules libres à une communauté qui adhère sous forme de biofilm ? Pour sortir de l'ombre, nous disposons aujourd'hui de nouveaux outils d'étude très puissants notamment

ceux de biologie moléculaire. Leur utilisation peut nous permettre de répondre aux questions soulevées par la bibliographie.

Ainsi, les objectifs scientifiques de cette thèse s'agencent autour de deux axes principaux. L'étude du **lien éventuel entre les propriétés du support et l'adhésion puis la colonisation des micro-organismes de la digestion anaérobie**. L'objectif appliqué étant d'**améliorer l'étape de démarrage des procédés** en définissant des critères de choix des matériaux supports

Pour répondre à ces objectifs, deux approches ont été choisies : la première vise à comprendre l'impact du support sur l'adhésion et la colonisation du biofilm anaérobie. Elle a été menée dans un réacteur annulaire rotatif qui permet de maîtriser les paramètres opératoires et notamment l'hydrodynamique. La seconde approche plus appliquée vise à améliorer les réacteurs de méthanisation. Dans ce cas, des réacteurs à lit fixe ont été mis en œuvre à l'échelle du laboratoire avec pour objectif de relier la nature du support aux performances épuratoires du procédé.

Nous présentons dans le chapitre suivant l'essentiel des matériels et méthodes utilisés lors des études.

### *Synthèse de l'étude bibliographique*

Jusqu'à l'apparition d'outils plus puissants, tous les fondements de la microbiologie étaient établis sur une tradition de culture en milieu liquide. Or, plus de 90% des micro-organismes vivant sur terre existent sous forme de micro-colonies engluées dans une gangue d'exopolymères que les microbes ont eux même produit : les biofilms. L'étude de ce nouvel aspect de la microbiologie est facilitée par l'essor technologique des méthodes d'observation. Bien sûr, les nombreuses connaissances déjà établies sur les cultures planctoniques ne sont pas remises en cause. Depuis une trentaine d'années, l'intérêt des scientifiques se porte vers ce « nouveau » mode de vie microbien et tout particulièrement vers la mise en place de ces biofilms. Ainsi, les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion ont émergées. L'attachement initial des microbes au support est fortement dépendant des propriétés physico-chimiques de la surface du support.

Dans le cas de la digestion anaérobie, les conditions environnementales de mise en place d'un biofilm sur un support dans un réacteur de méthanisation sont les mêmes que celles pour la culture des micro-organismes en milieu liquide. Elles doivent être optimales (pH, température, potentiel redox) si l'on veut obtenir une croissance de la biomasse. Une complémentation en nutriments peut s'avérer nécessaire. Si l'inoculum utilisé est activé et acclimaté à l'effluent à traiter, il peut permettre un démarrage plus rapide. La stratégie de montée en charge a aussi son importance, elle doit s'adapter à l'activité maximale des micro-organismes présents. Tout ceci implique qu'un suivi au plus près, éventuellement par l'utilisation d'une conduite automatisée, est un gage de réussite. Du point de vue des procédés intensifs à biofilms, les travaux accomplis concernent surtout (i) la recherche des meilleures conditions hydrodynamiques, (ii) le choix du matériau solide, principalement basé sur ses propriétés physiques : densité, taille, forme voire porosité dans le meilleur des cas. Le but avoué est l'obtention des meilleures performances possibles.

Les données générales obtenues sur l'adhésion de bactéries et la colonisation de solides peuvent être très utiles dans le domaine du traitement anaérobie d'effluent. Les connaissances acquises peuvent être appliquées aux réacteurs intensifs de méthanisation afin d'accélérer la mise en place d'un biofilm actif et ainsi de réduire la période de démarrage.

# **MATERIELS ET METHODES**

---

## II. MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre, les dispositifs expérimentaux puis le matériel biologique employé au cours de ce travail seront exposés. Ensuite, les différentes méthodes d'analyses utilisées lors du suivi de ces réacteurs seront indiquées. Puis, il sera présenté le mode opératoire permettant l'estimation de l'adhésion et de la colonisation des supports microbiens. Par la suite, les techniques de biologie moléculaire permettant la caractérisation d'un écosystème méthanogène seront décrites et enfin, ce sera le tour des tests statistiques susceptibles d'être appliqués.

### II.1 REACTEURS ET PERIPHERIQUES

#### II.1.1 Réacteur Annulaire Rotatif

Un **réacteur annulaire rotatif** (RAR) a été mis en œuvre afin de caractériser la mise en place d'un biofilm de la digestion anaérobie sur différents matériaux. Il permet de comparer les matériaux en fonction de leur capacité à fixer ces populations et leur aptitude à la colonisation par ces micro-organismes sous des conditions hydrodynamiques contrôlées.

##### II.1.1.1 Description du réacteur annulaire rotatif

Le RAR utilisé est le modèle 1320LJ de la société Biosurface Technologies Corp., Bozeman, MT, USA (Figure II-1). Il est composé d'un cylindre externe statique et d'un cylindre rotatif interne. Le volume utile du réacteur déterminé par l'espace existant entre les deux cylindres est de 1 litre. Un moteur à vitesse variable permet la mise en mouvement du cylindre rotatif interne et le contrôle du cisaillement au sein du milieu liquide. Vingt coupons de matériaux peuvent être installés sur le cylindre rotatif interne (Figure II-2)

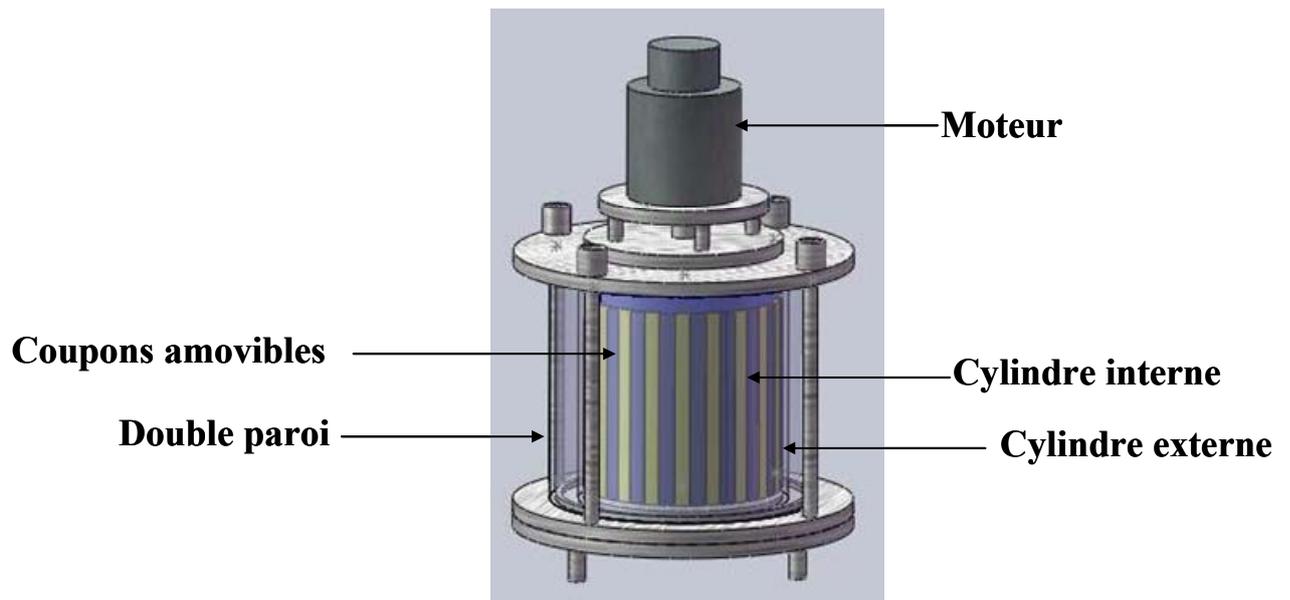


Figure II-1 : Réacteur annulaire rotatif (RAR)

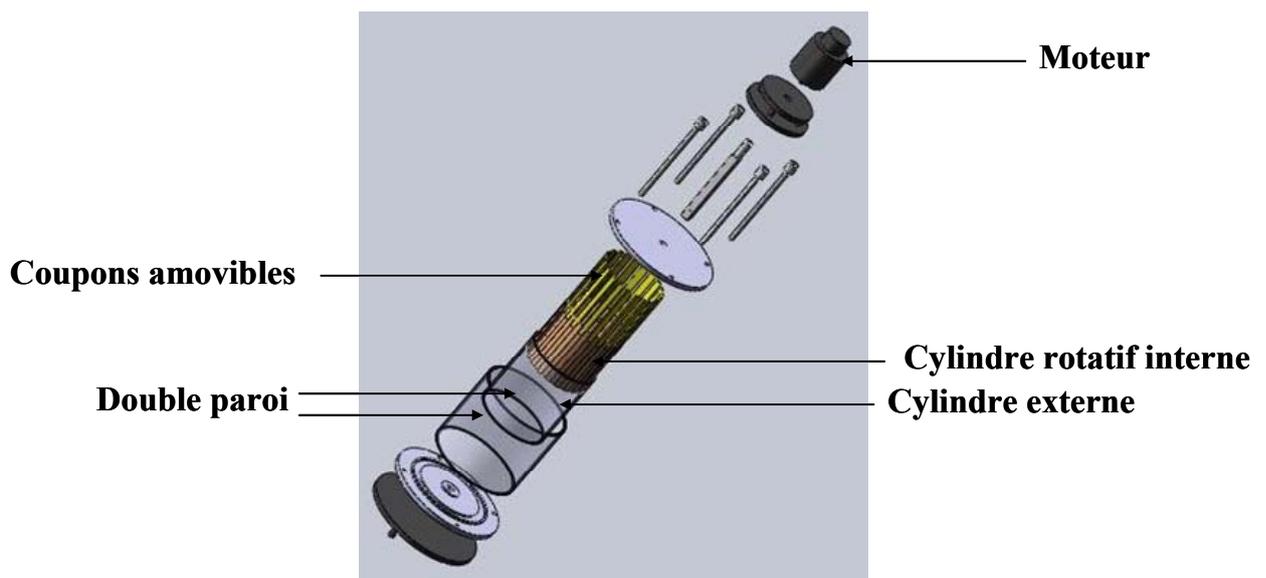


Figure II-2 : Vue éclatée du réacteur annulaire rotatif (RAR)

### II.1.1.2 Les supports

Sept matériaux (polyéthylène (PE), polypropylène (PP), polychlorure de vinyle (PVC), acrylonitrile butadiène styrène (ABS), polycarbonate (PC), verre borosilicaté et acier inoxydable 304L) ont été utilisés. Les coupons (Figure II-3) ont été fabriqués spécialement pour le RAR décrit précédemment. La surface de chaque coupon est de 21,85 cm<sup>2</sup> (14,58 mm de large et 149,9 mm de long pour une épaisseur de 1,6mm).

Avant chaque utilisation, qu'il s'agisse de mesure de rugosité, d'énergie de surface, de test d'adhésion ou bien de colonisation, les supports subissent un nettoyage avec une solution RBS35 à 2% (Agent liquide alcalin moussant à base de tensio-actifs distribué par la Société des Traitements Chimiques de Surface, Lambersart, France). Le protocole utilisé a été décrit par Meylheuc (MEYLHEUC *et al.* 2006).

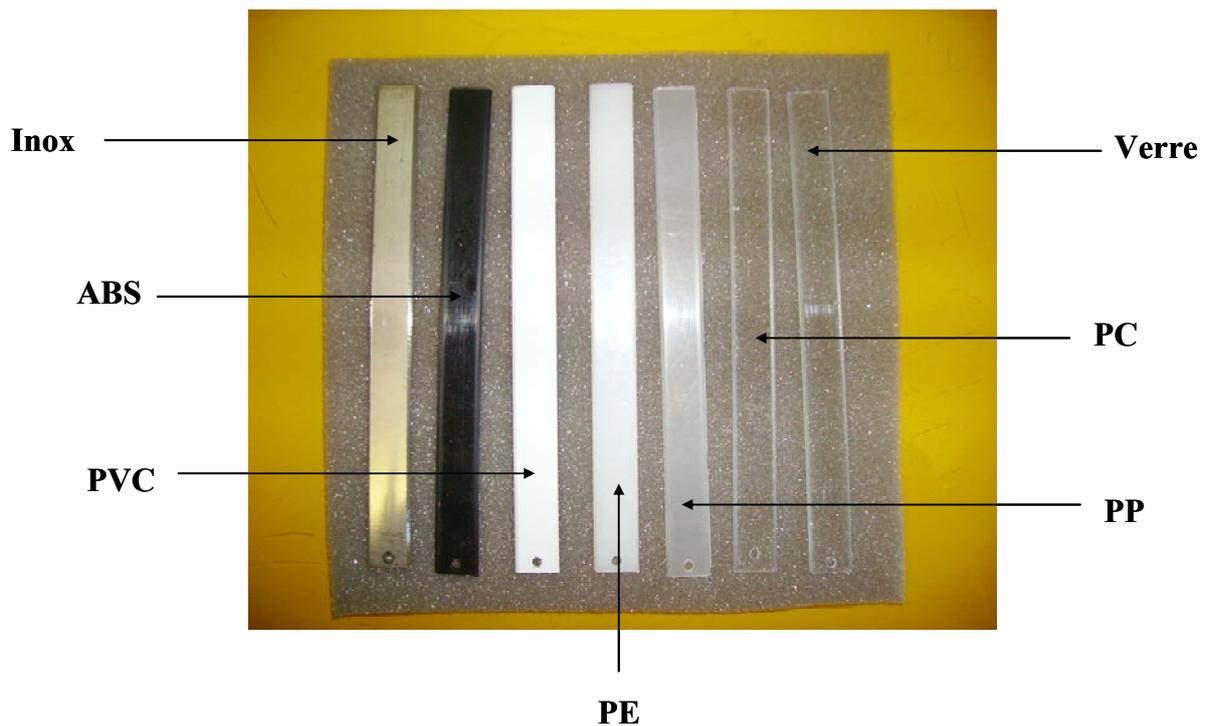


Figure II-3 : Photographie des coupons utilisés dans le RAR

### II.1.1.3 Capteurs et connexions

Le réacteur possède une double enveloppe thermostatée afin de maintenir une température du milieu réactionnel proche de 37°C. Lorsque le réacteur est conduit en mode continu, l'alimentation de l'effluent est réalisée par le haut. Le liquide est évacué par le bas du réacteur au moyen d'une surverse qui maintient un niveau constant dans le réacteur. Une boucle de recirculation du liquide permet la mesure et la régulation du pH.

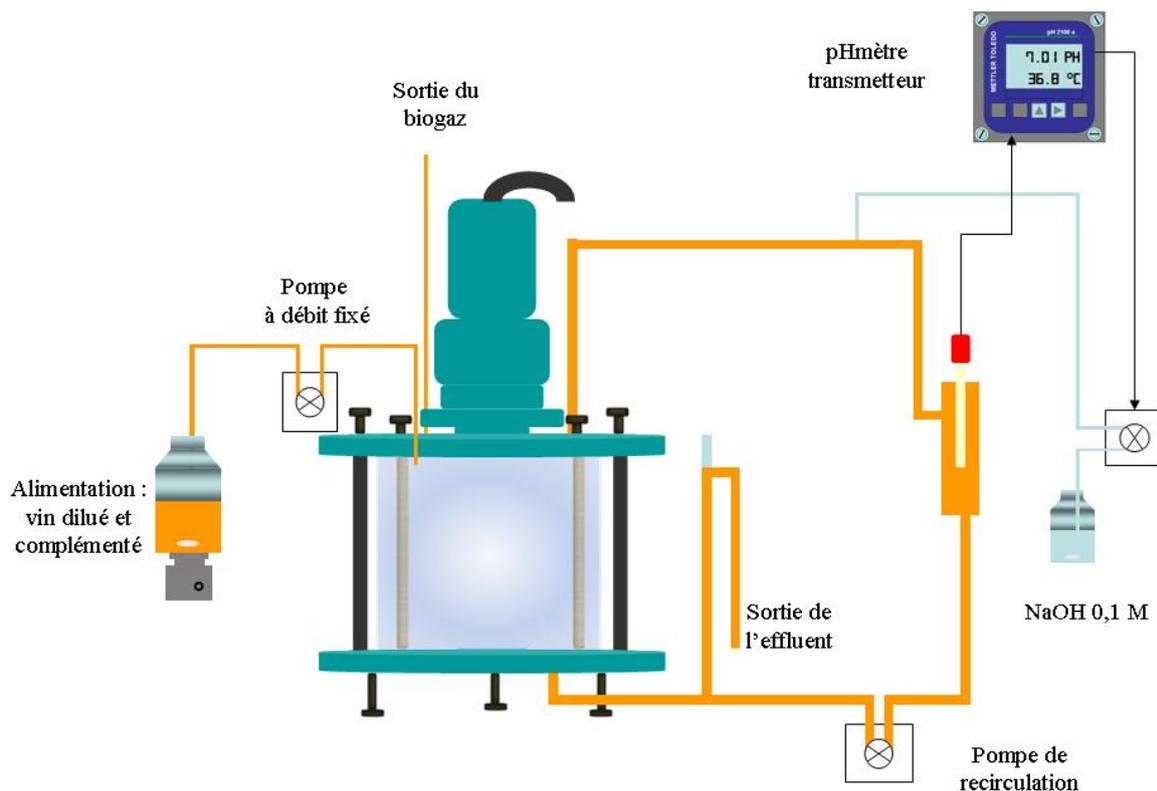


Figure II-4 : Schéma d'ensemble du réacteur annulaire rotatif (RAR)

### II.1.2 Le réacteur à lit fixe

Le **réacteur à lit fixe** (LF) va nous permettre de comparer l'efficacité de plusieurs matériaux lorsqu'ils sont utilisés comme support des populations de la digestion anaérobie. Il permet de comparer les performances des réacteurs lors des démarrages en fonction de chacun des matériaux.

#### II.1.2.1 Description du réacteur à lit fixe

Le réacteur est un digesteur anaérobie à lit fixe dans lequel les supports sont déposés en vrac. Il est constitué d'une colonne circulaire en PVC d'une hauteur de 56 cm et d'un diamètre de 20 cm. Le volume total du réacteur est de 16,7 litres et son volume utile de 15,1 litres. Tous les réacteurs à lit fixe utilisés lors de l'étude sont identiques et contiennent 230 modules de support. La surface spécifique totale développée dans chaque réacteur est de 2,56 m<sup>2</sup>. Le schéma du dispositif expérimental est présenté à la Figure II-5.

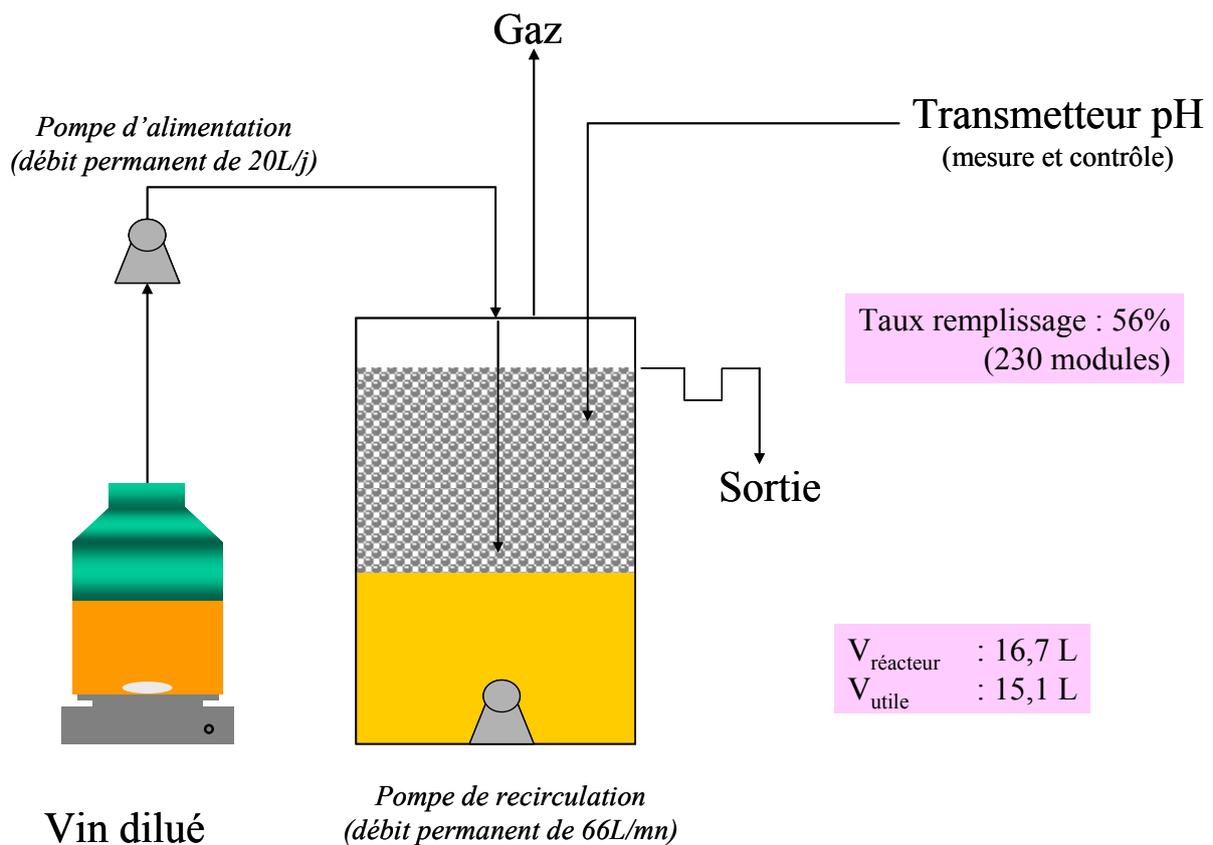


Figure II-5 : Schéma du réacteur à lit fixe

Selon la nature des matériaux utilisés pour la fabrication des supports certaines caractéristiques du réacteur peuvent varier. Le Tableau II-1 détaille les principales caractéristiques de ce réacteur.

Tableau II-1 : Caractéristiques des réacteurs à lit fixe

Caractéristiques des Lits Fixes	PP	PE	Bf 30	PVC
Densité du support	0,9	0,92	0,955	1,57
Volume de liquide (en L)	13,85	14	14,25	13,65

### II.1.2.2 Distribution des Temps de Séjour (DTS)

Une détermination de la distribution des temps de séjour (DTS) a été entreprise en utilisant la méthode de la réponse impulsionnelle à une injection de traceur. 20 mL de solution saturée en NaCl ont été injectés à l'aide d'une seringue dans le circuit d'alimentation en fonctionnement et les prélèvements sont effectués au niveau de la sortie par surverse. Cette DTS permet de mettre en évidence les caractéristiques hydrauliques du réacteur. Les valeurs normées de la

DTS ( $E\theta$ ) et du temps ( $\theta$ ) favorisent la comparaison entre le réacteur étudié et un réacteur théorique parfaitement mélangé fonctionnant dans les mêmes conditions.

$T_s$  représentant le rapport du volume utile total du réacteur sur le débit de recirculation tel que :

$$E\theta = T_s E(t) \text{ et } \theta = t/T_s \quad [5]$$

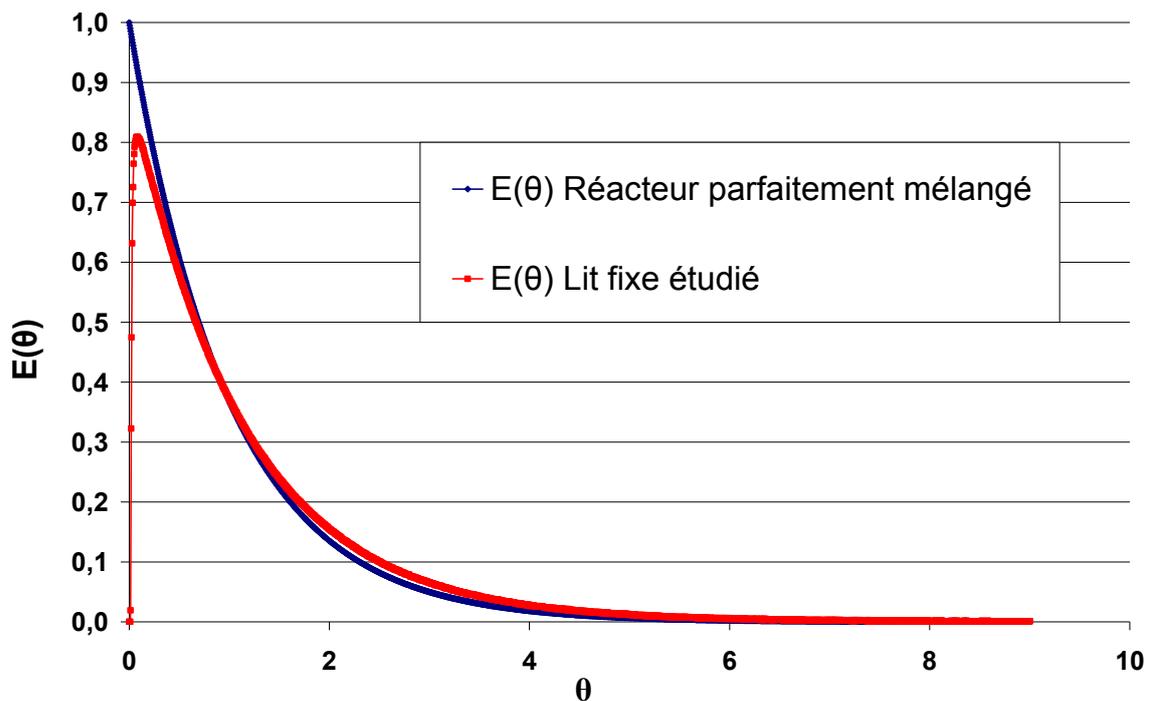


Figure II-6 : Comparaison des valeurs normées des DTS (Lit fixe à Bioflow 30®).

La Figure II-6 décrit l'évolution de  $E_\theta$ , la valeur normée de  $E(t)$ , en fonction de  $\theta$ , la valeur normée du temps  $t$  pour les deux réacteurs. Elle met en évidence un mélange quasi identique et permet de conclure que le réacteur utilisé a un comportement très proche de celui des réacteurs de type parfaitement mélangés.

### II.1.2.3 Les supports

Les supports utilisés sont fabriqués à notre demande en polyéthylène (PE), en polypropylène (PP) et en polychlorure de vinyle (PVC) par Wintex Engineering (Coimbatore, Inde) sur le modèle du Bioflow 30® (Bf30) commercialisé par la société Raushert (Raushert GmbH D-96347 Steinwiesen). Ils ont 35 et 30 mm de diamètres et 29 mm de hauteur. Leur surface spécifique est de  $320 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$  (Figure II-7).



Figure II-7 : Bioflow 30® (Rauschert GmbH)

Pour chacun des matériaux, 200 supports ont été pesés ; les résultats de ces mesures sont résumés dans le Tableau II-2.

Tableau II-2 : Masses des différents supports de type Bioflow 30® utilisés dans le LF

<b>Poids (en g)</b>	<b>PE</b>	<b>PP</b>	<b>PVC</b>	<b>Bf30</b>
<b>Maximum</b>	5,080	5,081	8,656	5,439
<b>Minimum</b>	4,888	4,730	8,380	5,109
<b>Moyenne</b>	<b>4,998</b>	<b>4,825</b>	<b>8,568</b>	<b>5,212</b>
<b>Ecart type</b>	0,035	0,087	0,032	0,035

Avant chaque utilisation, qu'il s'agisse de mesure de rugosité, d'énergie de surface ou bien de colonisation, les supports subissent un nettoyage avec une solution RBS35 à 2 %. Le protocole utilisé a été décrit par Meylheuc (MEYLHEUC *et al.* 2006).

### II.1.2.4 Capteurs, connexions et acquisition

Une pompe péristaltique (MasterFlex) assure l'alimentation du réacteur. L'apport d'effluent est réalisé en continu par le bas. Une recirculation du mélange réactionnel est assurée par une pompe immergée (SICCE) avec un débit constant de  $66 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Cette pompe garantit, à la fois, un bon mélange de l'alimentation entrante avec la phase liquide du réacteur, une régulation correcte de la température ainsi qu'une homogénéisation de la concentration en cellules libres. La régulation du pH de l'alimentation s'effectue par apport de soude (NaOH 1M) grâce à un régulateur intégré au pH-mètre qui actionne une pompe doseuse à partir d'une consigne prédéfinie à 6,8. Le réacteur est plongé dans un bain d'eau thermostatée afin de maintenir une température du milieu réactionnel à  $37^\circ\text{C}$ . Le liquide est évacué par le haut du réacteur au moyen d'une surverse qui maintient un niveau constant dans le réacteur. Les valeurs de pH des réacteurs et du débit de biogaz sont collectées par un ordinateur via les convertisseurs numériques/analogiques dans un logiciel MSPC (Modular Supervision and Process Control) développé au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement. Ce système permet l'acquisition, le traitement et le stockage des données.

Toutes les connexions nécessaires au contrôle du procédé sont présentées sur le schéma suivant (Figure II-8).

Tous les signaux analogiques 4-20 mA sont envoyés sur un transmetteur d'entrées et sorties (TES) de marque Leroy Automatique Industrielle. Il s'agit de convertisseurs analogique-numérique à partir desquels un micro-ordinateur pourra enregistrer les mesures. Le TES utilisé est équipé de quatre entrées et quatre sorties analogiques 4-20 mA et de quatre entrées et quatre sorties tout ou rien.

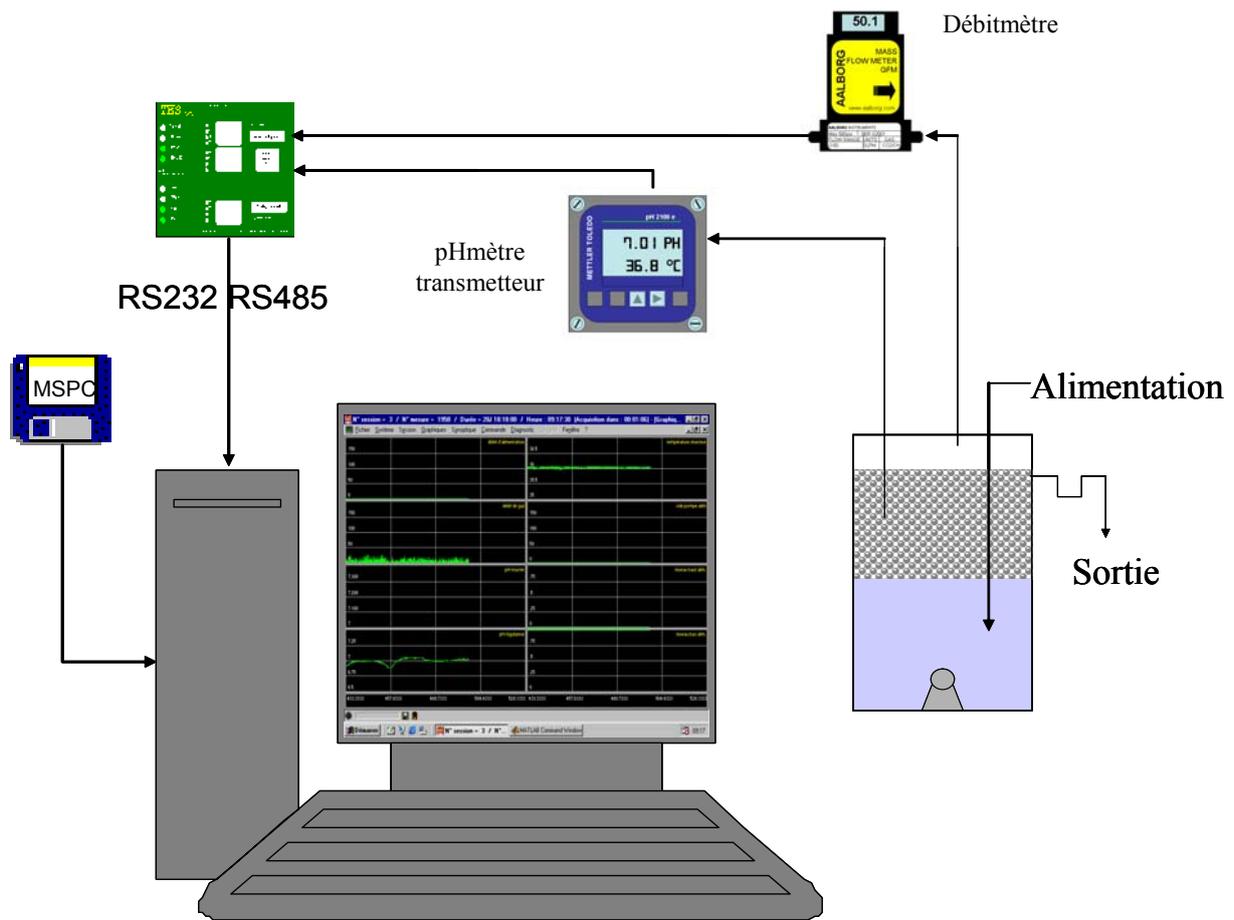


Figure II-8 : Connexions utilisées sur le procédé LF à Bioflow 30®

### II.1.3 Paramètres de fonctionnement des réacteurs

Nous introduisons dans ce paragraphe différentes définitions relatives aux paramètres de fonctionnement des réacteurs.

Tableau II-3: Calcul des paramètres de fonctionnement des réacteurs

Paramètre	Abréviation	Formule	Unité
Temps de séjour hydraulique	TSH	$TSH = V_R/Q_A$	h
Charge volumique appliquée	CVA	$(S_0 \cdot Q_A)/V_R$	$g_{DCO} \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$
Rendement épuratoire	$Y_S$	$100 \cdot ((S_0 - S)/S_0)$	%
Rendement en Méthane	$Y_{CH_4}$	$V_{CH_4} / DCO_{deg}$	$L_{CH_4} \cdot g_{DCOdeg}^{-1}$
Activité Spécifique du Biofilm	$Y_{bf}$	$DCO_{deg} / (MVA \cdot V_s)$	$g_{DCO} \cdot g_{MV}^{-1} \cdot j^{-1}$

Avec :

$V_R$  : volume de toute la phase liquide ( $m^3$ ),

$V_s$  : volume total de support ( $m^3$ ),

- $Q_A$  : débit volumique d'alimentation ( $m^3.h^{-1}$ ),  
 $S_0$  : concentration de l'alimentation (en g DCO.L<sup>-1</sup>),  
 $S$  : concentration en sortie (en kg .m<sup>-3</sup>),  
 $V_{CH_4}$  : volume de méthane produit ( $m^3$ ).

### **II.2 STRATEGIES DE DEMARRAGE ET DE MONTEE EN CHARGE**

Le démarrage correspond au temps nécessaire pour amener le réacteur à sa charge nominale avec une efficacité d'épuration conforme aux spécifications souhaitées, souvent 80% de rendement. L'objectif étant d'augmenter la charge volumique appliquée (CVA), définie précédemment (Cf. paragraphe II.1.3) le plus rapidement possible, sans inhiber l'écosystème.

La stratégie de démarrage choisie se caractérise par un temps de séjour hydraulique (TSH) fixe et court (inférieur à 24h) et par une charge volumique appliquée (CVA) augmentée de façon exponentielle. Cet accroissement est obtenu par la modification quotidienne de la DCO de l'effluent.

En pratique, la durée du démarrage est fixée *a priori* à  $n$  jours, durée nécessaire pour amener un système à son point de fonctionnement nominal. Durant ce laps de temps, la montée en charge respecte une augmentation exponentielle suivant une suite géométrique de premier terme  $CVA_i$  (*i.e.* la charge initiale) et de raison  $\alpha$ , tel que :

$$\alpha = \sqrt[n]{\frac{cva_f}{cva_0}} \quad [6]$$

La charge volumique appliquée au jour  $j$  ( $CVA_j$ ) est calculée en fonction de la charge volumique appliquée le jour précédent ( $CVA_{j-1}$ ) selon :

$$cva_j = \alpha \times cva_{j-1} \quad [7]$$

L'augmentation de la charge se déroule jusqu'à une charge finale  $CVA_f$  tel que :

$$cva_f = \alpha^n \times cva_0 \quad [8]$$

### II.3 INOCULA

Des boues anaérobies provenant d'un autre réacteur de laboratoire traitant le même type d'effluent (éthanol) ont été utilisées comme inoculum. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 1500 g pendant 10 min. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot remis en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 9 g.L<sup>-1</sup>. La concentration de la biomasse ainsi que son activité méthanogène sont mesurées comme décrit par Ruiz (RUIZ *et al.* 2002). Avant chaque inoculation, des tests en fioles thermostatées à 37°C sous agitation magnétique, ont permis de caractériser l'activité des inocula. La concentration est exprimée en g de Matière Volatile en Suspension (MVS) par litre, et l'activité spécifique en g de Demande Chimique en Oxygène (DCO) éliminée par g de MVS et par jour. Les quantités ainsi que l'activité de chaque inoculum sont reportées dans le Tableau II-4.

Tableau II-4 : Concentrations et activités spécifiques des inocula

	<b>Concentration</b> (g <sub>MVS</sub> .L <sup>-1</sup> )	<b>Activité spécifique</b> (g <sub>DCOéliminée</sub> .g <sub>MVS</sub> <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )
<b>RAR Adhésion</b>	1,8	0,67
<b>RAR Colonisation</b>	2,05	0,65
<b>LF Comparatif 1 (PE et PP)</b>	1,01	0,61
<b>LF Comparatif 2 (PVC et Bf 30)</b>	1,1	0,62
<b>LF Comparatif 3 (PP et Bf 30)</b>	1,1	0,61
<b>LF Comparatif 4 (PE et Bf 30)</b>	1,05	0,65

La taille des particules, lorsqu'elle est mesurée, est déterminée par granulométrie laser. Ces mesures sont réalisées grâce à un granulomètre LS 200 (Beckman Coulter). Il se compose d'un banc optique et d'un module externe destiné à l'analyse de suspensions en milieu aqueux. Lors d'une mesure, les particules sont transportées en suspension par un courant d'eau au travers d'une cellule contenant 126 détecteurs. Lorsqu'une particule recoupe l'un des faisceaux laser, celui-ci est diffracté suivant un angle qui peut donc être relié à la taille de la particule en utilisant un modèle de diffraction en faisant l'hypothèse que la particule présente une forme sphérique. Le LS200 est capable de mesurer des particules dont la taille varie de 0,375 µm à 2 mm en une seule analyse.

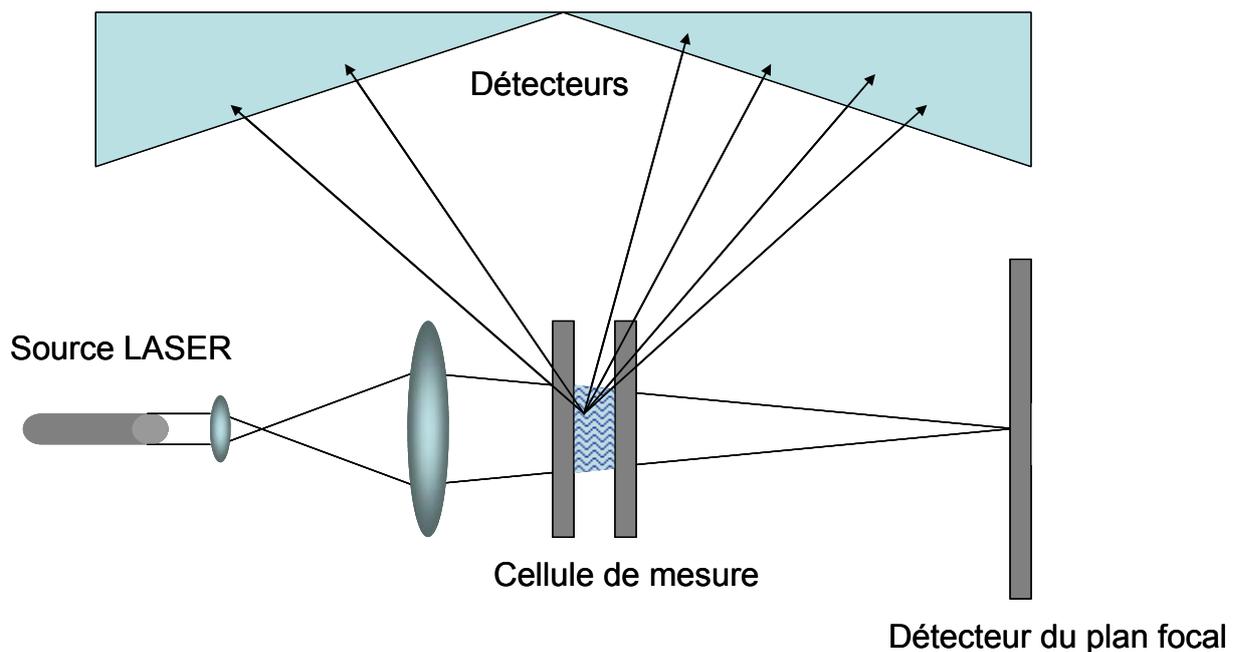


Figure II-9 : Schéma simplifié de l'unité optique d'un granulomètre LASER

Les mesures sont basées sur la diffraction et la diffusion d'un faisceau laser (théorie de Fraunhofer et de Mie). Lorsqu'une particule est éclairée par un faisceau de lumière monochromatique, il apparaît un motif de diffraction sous forme de franges concentriques alternativement claires et sombres. L'intensité du rayonnement diffracté dépend du rayon des particules. L'analyse des franges de diffraction permet de déterminer la taille des particules et leur distribution dans l'échantillon.

#### **II.4 ALIMENTATION DES REACTEURS**

Nous avons fait le choix d'un effluent semi-synthétique à base de vin qui nous permet de maîtriser sa composition pendant toute la durée de l'étude. Ce type d'effluent pour lequel la quasi-totalité de la matière organique biodégradable est sous forme d'éthanol présente aussi l'avantage d'être facilement biodégradable et de produire des intermédiaires métaboliques de dégradation connus et facilement quantifiables. Les caractéristiques du vin utilisé sont présentées dans le Tableau II-5.

Tableau II-5 : Caractéristiques physico-chimiques du vin utilisé pour l'alimentation

Analyses	Concentrations moyennes	Unités
<b>Ethanol</b>	102,4	g.L <sup>-1</sup>
<b>DCOt</b>	223	g O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup>
<b>DCOs</b>	200	g O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup>
<b>MES</b>	130	mg.L <sup>-1</sup>
<b>AGV totaux</b>	0,695	g d'AGV.L <sup>-1</sup>
<b>Acide acétique</b>	0,695	g.L <sup>-1</sup>
<b>NTK</b>	213	mg.L <sup>-1</sup>
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	28	mg.L <sup>-1</sup>
<b>Pt</b>	120	mg P.L <sup>-1</sup>
<b>pH</b>	9	

Le vin dilué a été complété en azote et phosphore (ajout en proportion d'hydrogénophosphate d'ammonium et de chlorure d'ammonium) afin d'obtenir un rapport C/N/P optimal pour la digestion anaérobie égal à 400/7/1. La carence en éléments traces métalliques est supprimée par l'addition d'une solution minérale (Tableau II-6) à raison de 5 mL par m<sup>3</sup> d'alimentation.

Tableau II-6 : Composition de la solution d'éléments métalliques.

Elément	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Elément	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Bore</b>	0,858	<b>Aluminium</b>	11,25
<b>Baryum</b>	1,61	<b>Manganèse</b>	12,71
<b>Cobalt</b>	1,75	<b>Strontium</b>	18,331
<b>Nickel</b>	6,498	<b>Zinc</b>	14,873
<b>Fer</b>	9,925	<b>Cuivre</b>	20,215

### **II.5 ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES**

Des prélèvements en entrée du réacteur (alimentation), dans le réacteur anaérobie et en sortie sont effectués pour suivre son fonctionnement. Les concentrations en substrats organiques (DCO, éthanol) ont été mesurées en entrée et en sortie du système. Les concentrations en MVS et MES dans le réacteur et en AGV ont également été mesurées. Le débit d'alimentation et le débit de biogaz produit ont été mesurés au moyen de compteurs adaptés.

#### **II.5.1 Dosage des composés solubles**

Les dosages des composés solubles sont effectués sur le surnageant de centrifugation à 30 000 g pendant 10 mn, lorsque les échantillons contiennent de la biomasse. Ils sont convenablement dilués pour les besoins de chaque dosage.

##### **II.5.1.1 Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)**

Une méthode rapide permet de mesurer la DCO. Ce kit de mesure, commercialisé par la société Hach, nécessite 2 mL de surnageant d'échantillon. Après 2 heures de chauffage à 150°C, la DCO de l'échantillon est déterminée par la mesure de l'absorption à 620 nm grâce à un spectrophotomètre Hach DR/2010.

##### **II.5.1.2 Dosage de l'éthanol**

L'éthanol est dosé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Intersmat IGC 121 DFL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est une colonne remplie avec un mélange de 60/80 Carbopack B / 5% Carbowax 20 M. La solution injectée (2 µL) est composée pour moitié d'un volume de la solution à doser et pour moitié d'une solution d'étalon interne (solution aqueuse de méthanol à 2g/L).

##### **II.5.1.3 Dosage des acides gras volatils (AGV)**

La nature (acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate et isovalérate) et la concentration des acides gras volatils sont déterminées à l'aide d'un chromatographe Varian 3900, d'un passeur automatique d'échantillons CP8400 et d'un logiciel Galaxie™. L'injection automatique est effectuée à l'aide de seringues 701N (0-10Ll) ou 75 N (0-5Ll) (Hamilton)

dans l'injecteur à 210°C. La colonne utilisée est une colonne Econocap FFAP d'une longueur de 15 m, d'un diamètre de 0,53 cm et d'une épaisseur de film de 1,2 µm (Alltech) dans laquelle circule le gaz vecteur (azote 5.0) à un débit de 6 mL/min. La température du four est de 120°C. Le chromatographe est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme dont la température est fixée à 280°C. L'hydrogène 5.0 et l'air sont utilisés pour la flamme du détecteur. Le volume d'échantillon injecté est de 1 µL. L'analyse est effectuée sur la phase soluble (surnageant de centrifugation). Un volume d'étalon interne est ajouté à chaque volume d'échantillons (1 g d'acide éthyl-2-butyrique dans 1 L d'eau acidifiée à 5 % avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). La gamme d'étalonnage est préparée à partir des six composés dosés à une concentration égale à 1 g.L<sup>-1</sup>. Les échantillons sont préparés, tout comme la gamme étalon, en mélangeant un volume d'échantillon et un volume d'étalon interne. La gamme d'étalonnage est comprise entre 0,25 et 1 g.L<sup>-1</sup> et le seuil de quantification se situe à 0,1 g.L<sup>-1</sup>. L'erreur de mesure est de l'ordre de 2%.

### **II.5.2 Dosages des matières particulières**

#### **II.5.2.1 Dosages des matières en suspension (MES et MVES)**

La détermination des différentes fractions de la matière est réalisée par pesées et séchages des boues, selon la méthode du poids constant. Ces mesures sont effectuées après centrifugation de 40 mL d'échantillon à 30 000 g pendant 10 mn. Le culot ainsi obtenu est rincé et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Il est ensuite placé dans un creuset en porcelaine préalablement taré qui est passé à l'étuve (104°C, 24 heures) puis pesé. La différence entre le poids de l'échantillon séché et celui du creuset détermine les matières en suspension (MES). Les résultats sont exprimés en grammes par litre.

Le passage du résidu obtenu lors du dosage des MES au four à 550°C pendant 2 heures permet de quantifier les matières minérales. La différence avec les matières en suspension donne les matières volatiles en suspension (MVES). Les résultats sont également exprimés en grammes par litre.

### II.5.2.2 Quantification de la biomasse fixée

#### II.5.2.2.1 Sur les coupons du RAR

Après extraction du réacteur le biofilm est détaché. Une première fraction est récoltée par simple trempage dans l'eau distillée. Une seconde l'est après décrochage mécanique (jet d'eau distillée) et chimique (le coupon est agité dans une solution de RBS à 2% à 50°C pendant 20 min. puis il subit 5 rinçages à l'eau distillée durant 5 min. à la même température). Dans les deux cas, les fractions obtenues sont filtrées sur filtre stérile (diamètre des pores de 0,2 µm). Le filtre, préalablement taré, est ensuite mis à l'étuve (105°C) pendant 24 heures. A sa sortie du four, le filtre est refroidi dans un dessiccateur puis pesé. Les matières attachées (MS) sont calculées en retranchant la masse restante après le passage au four, à celle du coupon mesuré avant l'introduction dans le RAR. Les résultats sont exprimés en  $\text{g.m}^2_{\text{support}}^{-1}$ .

#### II.5.2.2.2 Sur les supports du LF

Les modules sont rincés à l'eau distillée par simple trempage. Puis, placés dans un creuset taré au préalable ils sont séchés pendant 24 heures dans un four à 105°C. Après refroidissement en absence d'humidité, il est possible de connaître la masse de matières sèches attachées (MS), par différence entre les deux masses. Les résultats peuvent être exprimés en  $\text{g.m}^2_{\text{support}}$  ou en  $\text{g.m}^2_{\text{réacteur}}$ .

### II.5.3 Détermination de la production de biogaz

#### II.5.3.1 Mesure du débit de biogaz

Le volume de biogaz est déterminé en sortie des réacteurs alimentés en continu par passage dans un compteur massique (Aalborg GFM17). Il est étalonné pour un mélange CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> (50/50) et accepte des débits jusqu'à 100 mL/mn.

#### II.5.3.2 Détermination de la composition du gaz

Le biogaz est directement prélevé dans le ciel gazeux du réacteur à l'aide d'une seringue. Sa composition est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe est un appareil de marque Shimadzu GC-8A équipé d'un catharomètre et relié à un intégrateur Shimadzu CR-3A.

Le chromatographe comprend un four équipé de deux colonnes et un catharomètre. La première colonne (Hayesep Q, Touzart & Matignon) est en inox (longueur : 2 m ; diamètre intérieur : 1/8 de pouces) garnie de Silicagel 80/100 mesh, elle sépare le CO<sub>2</sub> des autres composés gazeux. La seconde colonne (Touzart & Matignon) est aussi en inox (longueur : 2m ; diamètre intérieur 1/8 de pouce), elle est placée en série après une colonne vide de 10 m de longueur qui ralentit le passage des gaz au niveau du tamis moléculaire et sépare, grâce à un tamis moléculaire (5 angströms), les autres composés gazeux entre eux : H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>. Le gaz vecteur utilisé est l'argon (2,8 bar).

Les dosages sont réalisés dans les conditions opératoires suivantes : l'injection (1 mL) se fait directement dans l'injecteur porté à 100°C. La température dans le four est de 30°C. La détection est réalisée à l'aide d'un catharomètre (principe du pont de Wheatstone) pour lequel l'intensité du courant s'élève à 80 mA. L'étalonnage externe est effectué à partir d'un mélange gazeux contenant 25% de CO<sub>2</sub>, 0,2 % de N<sub>2</sub>O, de 5 % d'H<sub>2</sub>, de 2 % d'O<sub>2</sub>, de 10 % de N<sub>2</sub> et de 57,8 % de CH<sub>4</sub>. Les résultats sont exprimés en pourcentage (v/v).

### **II.5.4 Caractérisation des supports**

Avant chaque analyse, les supports sont lavés selon le protocole décrit par Meylheuc (MEYLHEUC *et al.* 2006) et précédemment cité dans les paragraphes II.1.1.2 et II.1.2.3. Les caractérisations ont été réalisés à l'UMR de Bioadhésion et d'Hygiène des Matériaux (INRA-AgroParisTech) à Massy.

#### **II.5.4.1 Mesure de rugosité**

Les paramètres de rugosité (Ra, Rz, Rmax, Rpk, Rvk) ont été obtenus à l'aide d'un rugosimètre Mahr (modèle M2, Mahr GmbH, Göttingen, Allemagne). La longueur de mesure est de 5,6 mm et la longueur d'onde limite (ou « cut-off ») utilisée de 0,8 mm. Cette longueur d'onde permet le filtrage des mesures liées à la forme et à l'ondulation de la pièce mesurée. Les données obtenues pour chaque échantillon testé sont les moyennes de neuf mesures : trois mesures dans chaque direction : parallèle, perpendiculaire et intermédiaire.



Figure II-10 : Photographie du rugosimètre Mahr M2 (Mahr GmbH, Göttingen, Germany).

### II.5.4.2 Mesure de l'énergie de surface

La mesure de l'énergie de surface de chaque matériau a été déterminée par la mesure de l'angle de contact.

Les angles de contact des supports, après nettoyage, ont été mesurés à l'aide d'eau dé-ionisée, de formamide et de di-iodométhane avec deux goniomètres Kruss (Modèles G10 et G23).

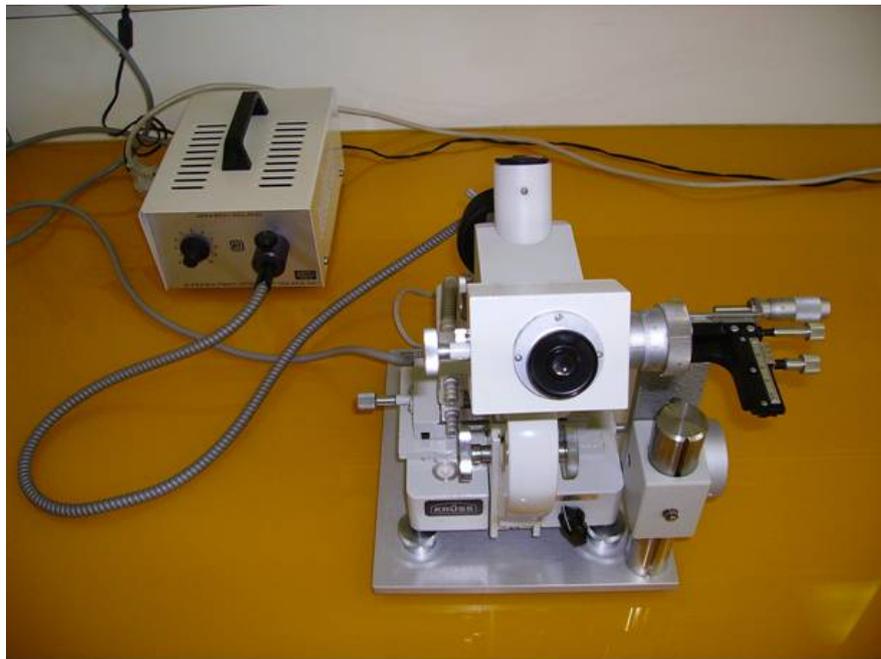


Figure II-11 : Photographie du goniomètre Kruss G10

**II.6 MESURE DE L'ADHESION**

La quantité relative d'organismes adhérents est déterminée de deux manières selon la quantité mesurée :

- L'observation microscopique permet de quantifier le taux de recouvrement. Elle est utilisée lors de la mesure de l'adhésion initiale (paragraphe III.1.2). Ces observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Olympus BX60 équipé d'objectifs Olympus Uplan Apo 100X à immersion. Les champs microscopiques mesurés ont une taille de 0,0046 mm<sup>2</sup>. 30 champs sont observés sur chaque coupon.

La source lumineuse est constituée par une lampe à vapeur de mercure (Olympus U-ULS100HG). Un système optique, constitué d'un miroir dichroïque (Olympus U-MWU) et d'un jeu de filtres (*Filtre Excitation 330-385 λ nm et Filtre d'arrêt 420 λ nm*) permet d'observer les signaux émis par le fluorochrome lors de l'excitation UV (543 nm) de l'échantillon préalablement marqué au DAPI (diamidino-4,6-phényllindol-2 dichlorhydrate).

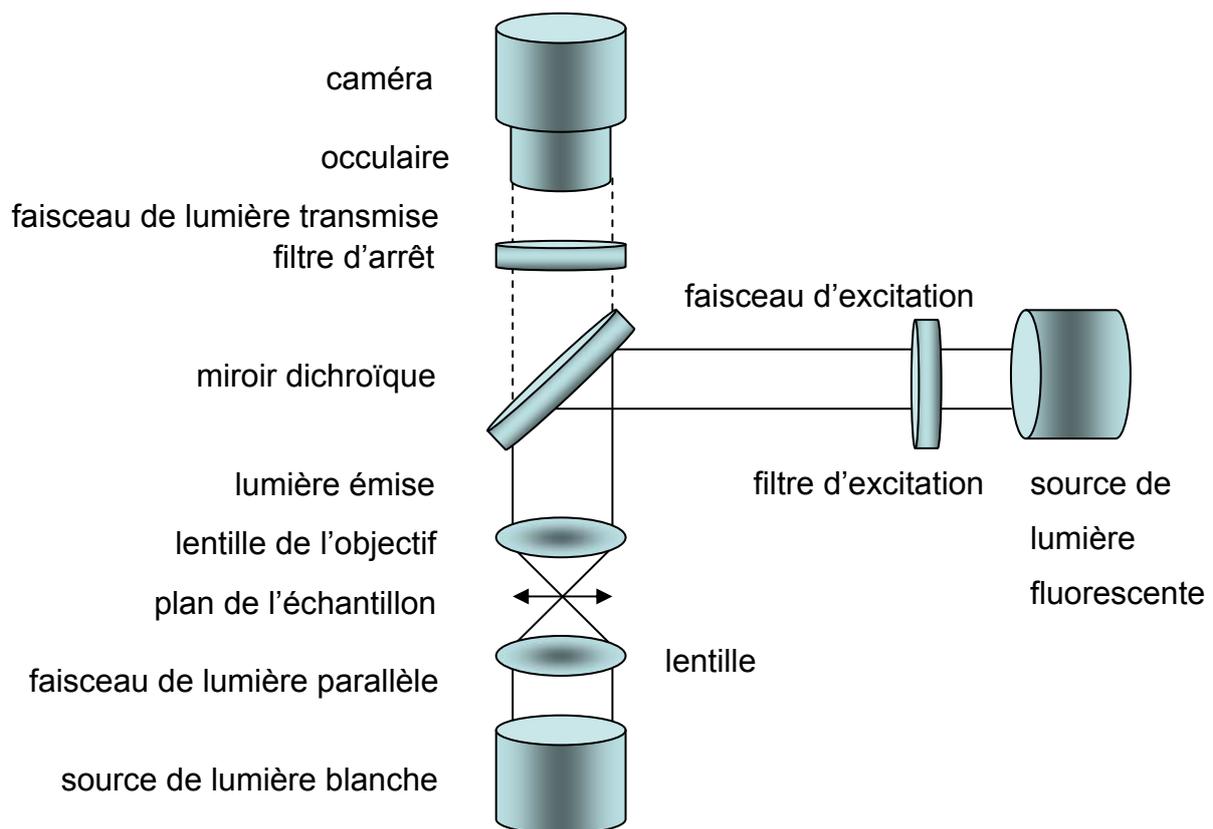


Figure II-12 : Principe de la microscopie à épifluorescence

Une illumination concomitante de l'objet par épifluorescence et par lumière transmise (contraste de phase) permet de superposer l'image de la fluorescence avec l'image de la

structure cellulaire. Le signal fluorescent observé est donné par la totalité des signaux émis par l'objet, qu'ils soient sur le plan de la mise au point (plan focal) ou non.

Les images ont été numérisées à l'aide d'une caméra numérique Nikon DMX 1200F ( $12.10^6$  pixels) capable de capter des signaux de faible intensité ( $10^{-4}$  lux) puis digitalisées en noir et blanc par un logiciel libre (Gimp v2.4.5). L'adhésion est ensuite mesurée grâce à un autre logiciel du domaine public (Image J, National Institutes of Health, USA) qui permet le calcul de la quantité relative des pixels noirs.

- La pesée du gâteau de filtration issue du traitement de la solution de rinçage des coupons des RAR ou modules des LF (paragraphes III.1.1 et III.3.2) permet de quantifier le biofilm présent.

### II.7 ETUDE BIOLOGIQUE DE LA STRUCTURE MICROBIENNE DU BIOFILM

Les techniques moléculaires mises en œuvre sont toutes basées sur la détection et l'analyse des gènes codant pour la petite sous-unité des ARN ribosomiques 16S (Figure II-13).

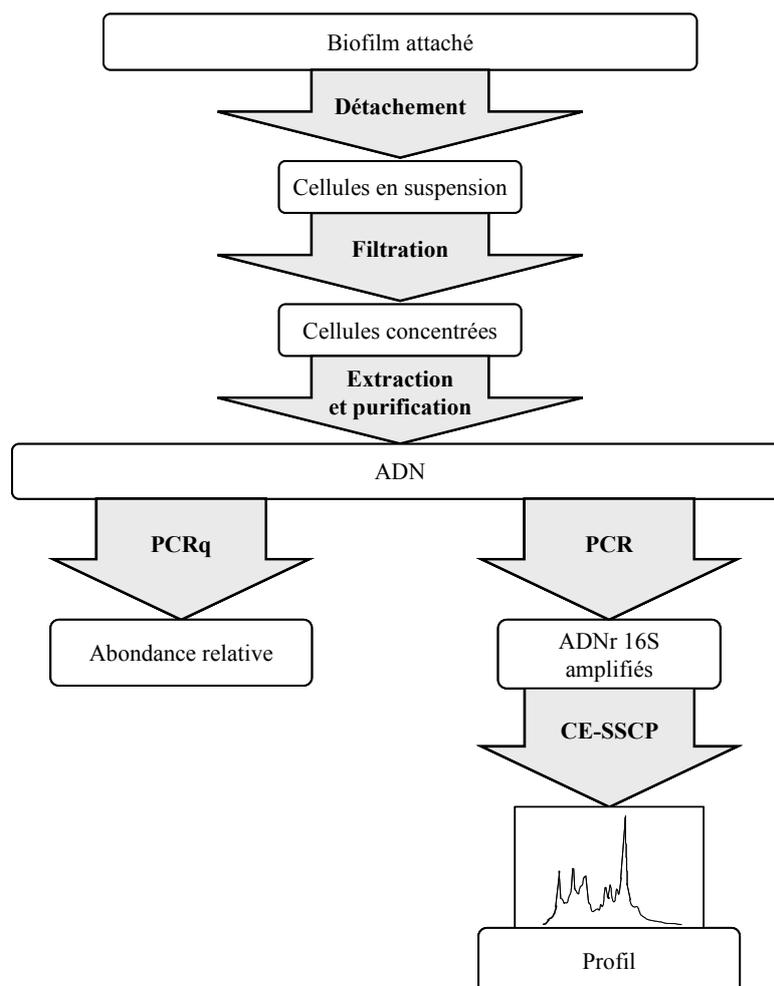


Figure II-13 : Représentation schématique de l'étude de la structure microbienne du biofilm

La structure de la communauté microbienne des bactéries et archées attachées sur chaque matériau est analysée après une extraction d'ADN, une amplification par polymérisation en chaîne par polymérase (PCR) et par polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins et électrophorèse capillaire (CE-SSCP). Une PCR quantitative (qPCR) est utilisée pour mesurer la quantité de bactéries et d'archées attachées.

### **II.7.1 Prélèvements**

Les cellules microbiennes adhérentes sont récoltées par extraction avec une solution de RBS35 à 2% à 50°C pendant 20 min. puis 5 fois à l'eau dé-ionisée à 50° C pendant 5 min et 5 à 20 °C pendant 5 min.

Les biofilms présents sur les coupons du RAR ou sur les supports du LF sont récoltés de la manière décrite au paragraphe II.5.2.2.

### **II.7.2 Extraction de l'ADN et purification de l'ADN total des échantillons**

Les échantillons sont concentrés sur des membranes de filtration (diamètre des pores de 0,2 µm) puis stockés à – 80 °C. L'extraction d'ADN est effectuée à partir d'un protocole pré-établi à la différence près que les filtres broyés sont remis en suspension dans 400 µL de 4 M guanidine thiocyanate–0,1 M Tris (pH 7,5) et 120 µl de N-lauroyl sarcosine à 10 % (ROUSSELON *et al.* 2004).

La lyse cellulaire se fait par broyage à l'aide de billes de zirconium (0,1mm de diamètre) dans un vibro-broyeur pendant 10 min à vitesse maximale, puis par chauffage à 95°C pendant 10 min. Les inhibiteurs de PCR (acides humiques) sont éliminés par lavages successifs au PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). L'ADN est précipité par l'isopropanol. Pour améliorer la précipitation, 5 µL d'ADN carrier (polyA) sont ajoutés. L'ADN est ensuite récolté par centrifugation (15 min, 15000 rpm). La purification est réalisée sur micro-colonne du Kit QIAamp Mini Kit (Qiagen) permettant l'obtention de 30µL de matrice. Des aliquots sont conservés à -20°C.

Afin de vérifier si les produits d'extraction ne sont pas contaminés, un témoin est réalisé à partir d'un filtre stérile qui subit toutes les étapes d'extraction et d'amplification avant d'être comparé aux échantillons, par analyse SSCP.

De même, il est procédé à une estimation de la quantité et de la qualité de l'ADN obtenu. L'ADN subit une électrophorèse et migre à travers un gel d'agarose (0,7%) dans un tampon de Tris Borate EDTA (TBE 1X), en présence de bromure d'éthidium (BET). Il est ensuite

visualisé sous lumière U.V. La taille et la concentration des fragments d'ADN ainsi obtenus sont évalués par comparaison avec le marqueur de taille  $\lambda$  Hind III (Proméga), recouvrant un intervalle de 125 à 23130 paires de bases.

### II.7.3 Amplification PCR

Afin d'analyser la structure de toutes les communautés microbiennes, la région V3 de la sous unité 16S de l'ARNr est amplifiée en utilisant les amorces listées Tableau II-7 (WERY *et al.* 2008).

Tableau II-7 : Séquences cibles des amorces utilisées

Amorce	Direction	Sequence (5'-3')	E. coli position	Concentration	ARN16S ciblé
W02 <sup>a</sup>	Anti-sens	GNTACCTTGTTACGACTT	1492	100 ng.l <sup>-1</sup>	Universal
W17 <sup>a</sup>	Sens	ATTCYGGTTGATCCYGSCRG	3	100 ng.l <sup>-1</sup>	<i>Archaea</i>
W104 <sup>b</sup>	Anti-sens	TTA CCG CGG CTG CTG GCA C6-FAM500		130ng.l <sup>-1</sup>	Universal
W49 <sup>b</sup>	Sens	AGG TCC AGA CTC CTA CGG G	330	130ng.l <sup>-1</sup>	<i>Bacteria</i>
W36 <sup>b</sup>	Sens	TCCAGGCCCTACGGGG	333	130ng.l <sup>-1</sup>	<i>Archaea</i>

<sup>a</sup>(GODON *et al.* 1997) <sup>b</sup>(ZUMSTEIN *et al.* 2000)

Lors de l'amplification des ADNr 16S des populations d'archées, il est parfois nécessaire d'abaisser le seuil de détection en procédant à une PCR nichée car l'amplification directe de la région V3 donne un signal trop faible. Deux PCR successives sont réalisées à partir du même ADN total : le couple d'amorces W02-W17 permet d'amplifier l'intégralité de l'ADNr 16S des *Archaea*, lors d'une première PCR. Ensuite, le produit de cette première PCR est utilisé comme matrice pour une seconde à l'aide des amorces W104-W36

L'amplification est, là aussi, vérifiée sur un gel d'agarose à 0,7% et la taille des fragments est visualisée grâce à un marqueur de taille (Proméga) recouvrant l'intervalle de 100 à 2642 paires de bases. Les produits de PCR sont purifiés sur des colonnes Quiaquick (Qiagen) afin d'éliminer les brins 16S non incorporés.

### II.7.4 Polymorphisme de conformation des ADN simples brins et électrophorèse capillaire

Une analyse CE-SSCP permet la séparation des fragments d'ADN de même taille mais de composition différente. Les profils des empreintes sont obtenus avec la méthode décrite par SEN *et al.* 2008. Avant analyse, 1  $\mu$ L de produits de la dilution est ajouté à 18  $\mu$ L de

formamide (Applera®) et 1 µL de standard interne de taille (Rox 400 HD, Applied Biosystems, California, USA) dilué 10 fois. Chaque échantillon est dénaturé pendant 5 min à 94°C puis placé directement dans la glace pendant 5 min. Après cette renaturation rapide, les fragments d'ADNr 16S simple brin adoptent une conformation secondaire stable qui permettra de les séparer par électrophorèse capillaire. Un analyseur génétique ABI 3130 (Applied Biosystems) est utilisé pour mener à bien cette électrophorèse. Il est équipé d'un tube capillaire de 50 cm rempli de 5,6 % de polymère d'analyse de conformation (Applied Biosystems). L'injection d'ADN dans les capillaires nécessite l'application de 5 kV pendant 3 secondes. L'électrophorèse est effectuée sous 15 kV et 32 °C en 30 min. Les profils d'empreinte de CE-SSCP sont analysés et les statistiques calculées grâce aux logiciels SAFUM (ZEMB 2007) et Matlab 6.5 (MathWorks).

### **II.7.5 Amplification par polymérisation en chaîne par polymérase quantitative**

Les réactions de PCRq se déroulent dans des plaques de 96 puits (Applied Biosystems, Foster City, CA) et ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). 12,5 µl de pc Master mix Plus pour sondes (Erogène France, Angers, France), 5 µl d'extrait d'ADN dilué 10 ou 100 fois, 1µl d'amorce sens (5'-3'), l'amorce anti-sens et la sonde Taquant à 200 nM de concentrations finales sont ajoutées pour chaque analyse. Une incubation initiale à 50 °C pendant 2 min, une seconde pendant 10 min à 95 °C et 40 cycles de dénaturation (95 °C-15 sec, 60 °C 1 min) sont nécessaires.

Tableau II-8 : Amorces utilisées lors de la PCRq

Nom	Direction	Sequence (5'-3')
<b>BAC338F</b>	Sens	ACTCC TACGG GAGGC AG
<b>BAC805R</b>	Anti-sens	GACTA CCAGG GTATC TAATC C
<b>BAC516F</b>	Taqman	Yakima Yellow- TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C –TAMRA
<b>ARC787F</b>	Sens	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC
<b>ARC1059R</b>	Anti-sens	GCCAT GCACC WCCTC T
<b>ARC915F</b>	Taqman	6-FAM- AGGAA TTGGC GGGGG AGCAC –TAMRA

(YU *et al.* 2004)

Une courbe standard est tracée lors de chaque essai, en utilisant 10 dilutions en eau stérile (Aguettant Laboratory, Lyon, France) des produits de la PCR de clones environnementaux cités par by Snell (SNELL-CASTRO 2005).

Les clones DF10 et LC103 sont utilisés comme standard pour les archées et les bactéries respectivement. Les concentrations initiales en ADN sont mesurées grâce au spectrophotomètre Genequant pro (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Trois mesures sont obtenues par échantillons pour chaque lot d'amorce. L'abondance relative des archées est exprimée en comparaison avec l'abondance des bactéries dans l'échantillon.

### II.7.6 Indice de diversité

La diversité est la richesse d'une communauté biologique en espèces. Elle peut être appréciée par un indice qui permet de comparer la richesse de deux communautés, en particulier lorsque le nombre d'individus récoltés dans chacune d'entre elles est très différent (RICKLEFS *et al.* 2003). Son expression est fonction de deux paramètres : le nombre d'espèces et le nombre d'individus par espèce. Différents indices de diversité ont été mis au point pour tenir compte de la variation des distributions d'abondance lors de comparaison entre échantillons. Ces indices tiennent compte à la fois de la richesse de l'espèce et de l'abondance des espèces. Les plus connus sont les indices de Shannon-Weaver et de Simpson (SHANNON *et al.* 1948; SIMPSON 1949).

Ils expriment l'importance relative du nombre des espèces abondantes dans un milieu donné. Ainsi, plus la proportion des espèces rares est forte et celle des espèces abondantes réduite, plus l'indice de diversité est grand. L'indice est minimum quand tous les individus appartiennent à la même espèce ; il est maximum quand chaque individu représente une espèce distincte.

Le terme "Indice de diversité de Simpson" peut faire référence à plusieurs définitions proches. Il nous paraît donc important de préciser que dans cette étude l'indice utilisé pour mesurer la biodiversité des écosystèmes est calculé de la manière suivante :

$$SDI = -\log D \quad [9]$$

Où D représente la somme du nombre d'individus de chaque espèce sur le nombre total d'individus :

$$D = \sum (n / N)^2 \quad [10]$$

où n = nombre total d'organismes d'une espèce particulière  
N = nombre total d'organismes de toutes les espèces

Plus cette valeur est élevée, plus la diversité est grande.

### **II.8 ANALYSES STATISTIQUES UTILISEES**

Les analyses mathématiques ont été réalisées avec le logiciel Xlstat (Xlstat v7.5.2 Addinsoft Paris France).

Un test statistique non-paramétrique (Kruskal-Wallis) est utilisé pour comparer des groupes indépendants de données. La probabilité-critique (P-value) teste la signification statistique de chaque facteur à travers l'hypothèse testée. Une P-value inférieure à 0,01, indique un effet statistique significatif à 99,0% de niveau de confiance.

Les analyses en composantes principales (ACP) permettent l'examen des corrélations entre les variables et l'identification des états se différenciant fortement des autres. C'est une méthode très efficace pour l'analyse de données quantitatives (continues ou discrètes) se présentant sous la forme de tableaux à M observations / N variables. Elle permet de :

- visualiser et analyser rapidement les corrélations entre les N variables,
- visualiser et analyser les M observations initialement décrites par N variables sur un graphique à deux ou trois dimensions, construit de manière à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible,
- construire un ensemble de P facteurs non corrélés ( $P \leq N$ ) qui peuvent ensuite être réutilisés par d'autres méthodes (la régression par exemple).

Le "Type d'ACP" choisi est Pearson, ce qui signifie que les calculs sont basés sur une matrice composée des coefficients de corrélation de Pearson, le coefficient de Pearson étant le coefficient de corrélation classiquement utilisé.

Dans une ACP, un facteur correspond à chaque valeur propre et chaque facteur est une combinaison linéaire des variables de départ. Les facteurs ont la particularité de ne pas être corrélés entre eux. Les valeurs propres et les facteurs sont le plus souvent triés par ordre décroissant de variabilité représentée.

Idéalement, les deux premières valeurs propres correspondent à un % élevé de la variabilité, si bien que la représentation sur les deux premiers axes factoriels est de bonne qualité.

Le premier graphique particulier à la méthode est le cercle des corrélations. Il correspond à une projection des variables initiales sur un plan à deux dimensions constitué par les deux premiers facteurs. Lorsque deux variables sont loin du centre du graphique, soit elles sont proches les unes par rapport aux autres donc significativement positivement corrélées ( $r$  proche de 1), soit orthogonales les unes par rapport aux autres et donc sont significativement non-corrélées ( $r$  proche de 0), soit symétriquement opposées par rapport au centre, elles sont alors significativement négativement corrélées ( $r$  proche de -1).

Lorsque les variables sont relativement proches du centre du graphique, alors toute interprétation est hasardeuse, et il est nécessaire de se référer à la matrice des corrélations à d'autres plans factoriels pour interpréter les résultats.

Le cercle des corrélations est aussi utile pour interpréter la signification des axes.

Pour confirmer le fait qu'une variable est fortement liée à un facteur, il suffit de consulter la table des cosinus : plus le cosinus est élevé (en valeur absolue), plus la variable est liée à l'axe.

Plus le cosinus est proche de zéro, moins la variable est liée à l'axe.

Un autre objectif de l'ACP est de représenter les individus sur une carte à deux dimensions, et ainsi d'identifier des tendances.

### *Synthèse du choix du matériel et des méthodes*

Le rôle des propriétés des matériaux-soutiens sur la mise en place du biofilm est étudié lors de deux approches : l'adhésion puis la colonisation des micro-organismes de la digestion anaérobie sont examinées.

Pour répondre à nos objectifs, nous avons tout d'abord choisi d'utiliser un réacteur annulaire rotatif (RAR) qui permet de maîtriser les paramètres opératoires et notamment l'hydrodynamique. La seconde approche plus appliquée vise à améliorer les réacteurs de méthanisation. Dans ce cas, des réacteurs à lit fixe (LF) ont été mis en œuvre à l'échelle du laboratoire avec pour objectif de relier la nature du support aux performances épuratoires du procédé.

La stratégie de démarrage choisie facilite la mise en place d'un biofilm lors de la compétition entre biomasse planctonique et benthonique. Elle se caractérise par un temps de séjour hydraulique (TSH) fixe et court (inférieur à 24h) et par une charge volumique appliquée (CVA) augmentée de façon exponentielle. Cet accroissement est obtenu par la modification quotidienne de la DCO de l'effluent. L'objectif est d'augmenter la CVA le plus rapidement possible, sans inhiber l'écosystème pour amener le réacteur à sa charge nominale avec une efficacité d'épuration de 80% en un minimum de temps. Un effluent à base de vin complétement nous permet de maîtriser sa composition pendant toute la durée de l'étude. L'éthanol est le composé principal et présente l'avantage d'être facilement biodégradable et de produire des intermédiaires métaboliques de dégradation connus et facilement quantifiables.

La caractérisation des matériaux se fait, d'une part, à l'aide des paramètres de rugosité ( $R_a$ ,  $R_z$ ,  $R_{max}$ ,  $R_{pk}$ ,  $R_{vk}$ ) définis dans la norme internationale ISO 12085 et, d'autre part, grâce à la détermination des énergies de surface effectuées par une mesure des angles de contact.

L'étude de la diversité et de l'évolution des populations microbiennes est possible grâce à l'utilisation de la PCRq et de la SSCP, outils d'investigation basés sur des techniques moléculaires.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

---

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

Nous avons vu dans la première partie de ce travail que l'optimisation de la période de démarrage d'un réacteur intensif de méthanisation est souvent résumée à la diminution de sa durée. Cette période est tout au plus pondérée avec la valeur de la charge volumique appliquée (CVA) maximale atteinte. Des études complémentaires sont nécessaires si l'on veut parfaire nos connaissances.

Les 3 acteurs dans la mise en place du biofilm sont les micro-organismes, le milieu liquide et le support solide. Ce dernier est le seul élément inerte. C'est donc celui qui apparaît comme étant le plus stable, le plus facile à maîtriser. L'étude du support et de ses caractéristiques doit nous permettre d'établir les bases d'un travail qui dépassera le cadre de cette thèse. Le choix de notre sujet de travail effectué en fonction de l'étude bibliographique précédente s'est donc focalisé sur la recherche de liens éventuels entre les caractéristiques de surface des matériaux et la performance des réacteurs de digestion anaérobie. Ainsi, nous avons choisi de commencer notre investigation par la recherche de l'impact du matériau utilisé comme support microbien sur le démarrage d'un réacteur intensif de méthanisation.

Une première étape a permis d'analyser l'influence des caractéristiques physico-chimiques des matériaux sur l'adhésion initiale des micro-organismes intervenant lors de la digestion anaérobie (paragraphe III.1). Dans la seconde partie de ce chapitre (paragraphe III.2) nous avons cherché à vérifier si cette influence se maintenait au cours de la croissance du biofilm après 15 et 30 jours. C'est au cours d'une troisième phase expérimentale (paragraphe III.3) que les résultats obtenus dans les réacteurs annulaires ont été validés sur des procédés de traitement lors du suivi des performances de réacteurs à lit fixe (LF) pendant la période de démarrage.

La caractérisation des matériaux est décrite avant chaque utilisation des supports : une première fois lors de l'analyse de l'impact de ces caractéristiques sur l'adhésion des micro-organismes de la digestion anaérobie puis sur celle de la colonisation par ces mêmes cellules, une deuxième fois, lors de la dernière étude où les résultats seront reliés aux précédents grâce au démarrage d'un réacteur à lit fixe.

### **III.1 ETUDE DE L'ADHESION DES MICRO-ORGANISMES DE LA METHANISATION**

Avant d'entreprendre l'étude de l'impact des matériaux sur les performances d'un réacteur de méthanisation, il fallait dans un premier temps connaître de manière plus précise les caractéristiques de ces matériaux. L'analyse des surfaces des 7 coupons est décrite dans ce chapitre puis le lien est fait avec l'adhésion des micro-organismes.

#### **III.1.1 Caractérisation des matériaux**

Les états physique et chimique de la surface des matériaux sont des paramètres essentiels pour comprendre l'impact du support sur la mise en place du biofilm. L'étude bibliographique a montré que plusieurs caractéristiques peuvent influencer sur l'adhésion des micro-organismes. L'attachement est tout d'abord contrôlé par les charges de surfaces des micro-organismes et des supports (GILBERT *et al.* 1991 ; BOS *et al.* 1999 ; HORI *et al.* 2010). C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier le rôle l'**énergie de surface**. La colonisation du support est aussi sensible aux irrégularités de surface (JANSEN *et al.* 1995 ; BOULANGE-PETERMANN *et al.* 1997 ; SCHEUERMAN *et al.* 1998 ; KERR *et al.* 1999 ; TIDE *et al.* 1999 ; FLINT *et al.* 2000). La **rugosité** est donc naturellement le second paramètre testé. L'ensemble des matériaux utilisés pour les expériences en réacteur annulaire rotatif sont analysés dans ce paragraphe.

##### **III.1.1.1 Mesures des paramètres de la rugosité**

Les coupons utilisés dans le RAR ont été spécialement conçus pour être insérés dans le cylindre interne. Le Tableau III-1 présente 5 paramètres de rugosité caractérisant la morphologie de surface de chaque support utilisé dans le RAR. Les moyennes et déviations standard obtenues lors de 9 mesures sont indiquées.

Tableau III-1 : Paramètres de rugosité des supports du RAR  
(moyenne et écart-type).

Echantillon	Paramètres de rugosité ( $\mu\text{m}$ )				
	Ra	Rz	Rmax	Rpk	Rvk
<b>PP</b>	$0,04 \pm 0,006$	$0,64 \pm 0,311$	$1,62 \pm 0,453$	$0,11 \pm 0,085$	$0,14 \pm 0,000$
<b>Acier inox.</b>	$0,13 \pm 0,019$	$1,10 \pm 0,028$	$1,565 \pm 0,53$	$0,13 \pm 0,078$	$0,33 \pm 0,014$
<b>PE</b>	$0,13 \pm 0,048$	$0,89 \pm 0,269$	$1,58 \pm 0,141$	$0,18 \pm 0,057$	$0,27 \pm 0,311$
<b>ABS</b>	$0,04 \pm 0,003$	$0,76 \pm 0,021$	$1,84 \pm 0,615$	$0,14 \pm 0,021$	$0,23 \pm 0,121$
<b>PC</b>	$0,02 \pm 0,002$	$0,13 \pm 0,042$	$0,23 \pm 0,042$	$0,042 \pm 0,12$	$0,07 \pm 0,021$
<b>Verre</b>	$0,00 \pm 0,000$	$0,07 \pm 0,007$	$0,09 \pm 0,028$	$0,01 \pm 0,007$	$0,01 \pm 0,000$
<b>PVC</b>	$0,03 \pm 0,001$	$0,55 \pm 0,099$	$0,84 \pm 0,191$	$0,09 \pm 0,028$	$0,07 \pm 0,014$

Ra : Moyenne arithmétique des valeurs du profil. Rzi : somme de la plus grande des hauteurs de pic et de la plus grande des profondeurs de creux du profil d'une longueur de base Rz : Moyenne arithmétique des valeurs individuelles Rzi sur l'ensemble des i longueurs de base consécutives considérées. Rmax : distance entre le pic le plus haut et le creux le plus bas des 5 sections mentionnées dans la définition de Rz. Rpk : hauteur moyenne des pics dépassant la partie centrale du profil. Rvk : profondeur moyenne des creux dépassant la partie centrale du profil .

La gamme de valeurs de rugosité des 7 matériaux utilisés dans le RAR n'est pas très étendue. Cela tient principalement à la nature de la mesure. La rugosité concerne surtout les défauts micro-géométriques de surface. Ces défauts sont principalement des stries creusées par les outils qui ont servi à la fabrication de la pièce (le coupon dans notre cas). Ainsi la rugosité moyenne, Ra, ne représente-t-elle pas forcément la meilleure grandeur pour déterminer si le matériau utilisé est capable d'influencer l'adhésion microbienne. En effet, la gamme de valeur semble faible en comparaison avec la taille des micro-organismes. Cependant, certains matériaux (PP, PE, ABS et l'inox) ont des valeurs de Rmax comprises entre 1 et 2  $\mu\text{m}$  et donc plus proches de la taille des micro-organismes. De plus, aucune donnée bibliographique n'a fixé de limite à la taille des détails « visibles » par la bactérie.

A ce niveau de topographie, il existe un lien entre les paramètres mesurés sur chaque coupon. Par exemple, les valeurs les plus faibles pour les 5 paramètres sont toujours obtenues pour le même matériau : le verre.

Des différences sont observées entre les supports en terme de morphologie de surface. Les paramètres de rugosité, précédemment présentés, sont mesurés sur les 7 supports qui seront utilisés ultérieurement dans le réacteur annulaire et peuvent être classés dans trois groupes. Dans le premier on retrouve ceux dont la rugosité est la plus élevée : l'acier inoxydable, l'ABS et le PE. Le PC, le PVC et surtout le verre prennent place dans le deuxième, celui où les valeurs des paramètres sont les plus faibles. Tandis que le PP est un intermédiaire et représente le dernier groupe.

### III.1.1.2 Mesure de l'énergie de surface

Le Tableau III-2 présente les paramètres d'énergie de surface de tous les matériaux utilisés dans les études de la mise en place du biofilm anaérobie. Les valeurs des angles de contact sont visibles en annexe A.

Tableau III-2 : Paramètres d'énergies de surface des supports du RAR  
(moyenne et écart-type).

Echantillon	Energies de surface ( $\text{mJ m}^{-2}$ )				
	$\gamma$	$\gamma_{\text{LW}}$	$\gamma_{\text{AB}}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$
<b>PP</b>	$35,6 \pm 1,7$	$34,1 \pm 1,4$	$1,6 \pm 1,0$	$3,5 \pm 1,1$	$0,2 \pm 0,2$
<b>Acier inox.</b>	$32,2 \pm 1,8$	$31,7 \pm 0,6$	$0,5 \pm 1,7$	$7,8 \pm 2,8$	$0,0 \pm 0,0$
<b>PE</b>	$39,8 \pm 1,1$	$37,4 \pm 1,7$	$2,4 \pm 0,8$	$3,5 \pm 1,0$	$0,4 \pm 0,2$
<b>ABS</b>	$45,3 \pm 2,5$	$39,5 \pm 1,8$	$5,8 \pm 1,8$	$14,2 \pm 2,1$	$0,6 \pm 0,3$
<b>PC</b>	$52,0 \pm 1,3$	$46,6 \pm 0,8$	$5,4 \pm 1,1$	$4,4 \pm 1,1$	$1,7 \pm 0,5$
<b>Verre</b>	$52,5 \pm 2,1$	$40,5 \pm 1,8$	$12 \pm 1,1$	$8,1 \pm 0,7$	$4,4 \pm 0,7$
<b>PVC</b>	$51,2 \pm 1,9$	$43,1 \pm 1,5$	$8,1 \pm 1,2$	$6,5 \pm 1,2$	$2,5 \pm 0,5$

L'énergie de surface totale ( $\gamma$ ) est la somme de la composante dispersive ( $\gamma_{\text{LW}}$ ) et de la composante polaire ( $\gamma_{\text{AB}}$ ) qui est elle-même divisée en une composante « donneur d'électron » ( $\gamma^-$ ) et une composante « accepteur d'électron » ( $\gamma^+$ ).

Les valeurs les plus hautes ont été obtenues avec l'ABS, le PVC, le PC et le verre pour lesquels les valeurs des principaux paramètres d'énergie de surface ( $\gamma$ ,  $\gamma_{\text{LW}}$  et  $\gamma_{\text{AB}}$ ) sont plus élevées que les moyennes établies pour l'ensemble des matériaux. Le verre se distingue aussi par une composante polaire élevée ( $12 \text{ mJ.m}^{-2}$ ). C'est l'acier qui possède les valeurs les plus faibles (cas des  $\gamma$ ,  $\gamma_{\text{LW}}$ ,  $\gamma_{\text{AB}}$  et  $\gamma^+$ ). La composante « donneur d'électron » ( $\gamma^-$ ) de l'énergie de surface bouleverse tous les classements que l'on peut établir. Van Oss a suggéré que la

composante  $\gamma_{LW}$  de la plupart des matériaux organiques était proche de  $40\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$  (Van OSS *et al.* 1988). Les valeurs du tableau précédent (Tableau III-2) le confirment avec une moyenne de  $40,14\text{ mJ m}^{-2}$  pour les matériaux plastiques. L'écart type est proche de  $5\text{ mJ m}^{-2}$ , c'est une valeur suffisamment élevée pour balayer une large gamme. L'ensemble des matériaux choisis pour les études en RAR possède un registre d'énergie de surface qui varie entre  $32\text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$  (acier inoxydable) et  $52,5\text{ mJ m}^{-2}$  (verre).

Une analyse en composantes principales (Cf l'ACP en annexe B) permet de mettre en évidence des corrélations entre les 10 paramètres de surface étudiés. Les deux premières valeurs propres correspondent à un pourcentage élevé de variabilité (86,14 %). La représentation sur ces deux axes factoriels est donc de bonne qualité. Le cercle des corrélations tracé dans la Figure III-1 permet de mettre en évidence deux corrélations positives, d'une part entre les valeurs de rugosité ( $R_a$ ,  $R_z$ ,  $R_{max}$ ,  $R_{pk}$ ,  $R_{vk}$ ) et d'autre part entre les principales valeurs d'énergie de surface ( $\gamma$ ,  $\gamma_{LW}$ ,  $\gamma_{AB}$ ,  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$ ). Toutes sont très impliquées dans le calcul du facteur F1. C'est l'autre axe (F2) qui permet de différencier la composante « donneur d'électron » des paramètres d'énergie de surface :  $\gamma^-$  contribue à lui seul à plus de 76 % de ce deuxième facteur. Ce graphe permet aussi de voir que les paramètres de rugosité sont négativement corrélés à ceux de l'énergie de surface.

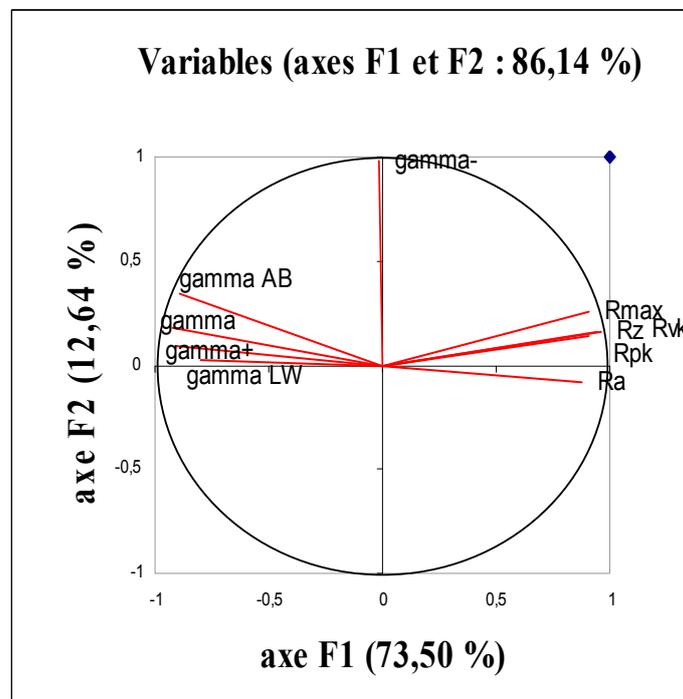


Figure III-1 : Cercle des corrélations des paramètres des coupons du RAR (rugosité et énergie de surface)

Si les 7 matériaux étudiés dans le RAR sont représentés sur ce même type de graphe, il est possible d'identifier certaines tendances (Figure III-2).

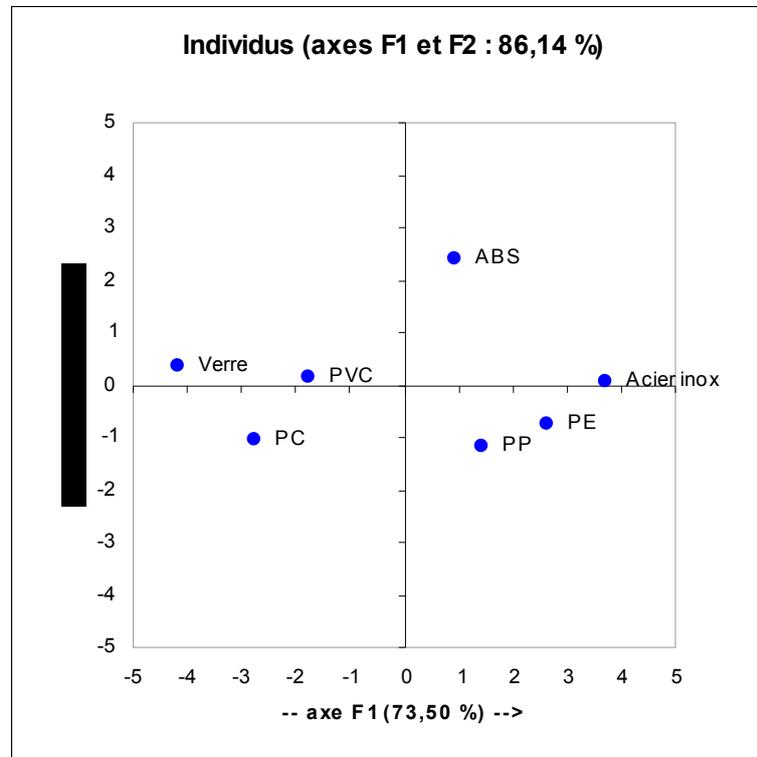


Figure III-2 : Représentation des matériaux en fonction des axes de corrélations (coupons utilisés dans le RAR)

L'ABS est le matériau le plus original, il se distingue, sur l'axe F2, par une valeur particulière. Cette particularité est liée à une valeur de  $\gamma$  beaucoup plus élevée que celles mesurées sur les autres matériaux, elle est deux fois plus élevée que la moyenne. Sur l'axe F1, le verre et l'acier inoxydable désignent les deux extrêmes, tant au niveau des mesures de rugosité qu'à celui des énergies de surface

### III.1.1.3 Conclusion

Les coupons (ABS, PC, Acier inoxydable, PP, PE, verre et PVC) spécialement élaborés pour le réacteur annulaire rotatif présentent une surface relativement lisse. Dans l'ensemble les mesures sont homogènes en termes de rugosité. En termes d'énergie de surface, les matériaux choisis pour les études en RAR se répartissent dans un registre large. Si l'on prend en considération les données bibliographiques (Van OSS 1994 ; HADJIEV *et al.* 2007), il apparaît que les valeurs d'énergie de surface ne sont pas directement liées à la nature du polymère. Les propriétés des matériaux sont différentes en fonction de leur nature mais elles ne sont pas directement liées à la nature des matériaux. Par exemple, la valeur de gamma du

PE utilisé lors de notre étude ( $39,8 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) est plus proche de celle du PP ( $35,6 \text{ mJ. m}^{-2}$ ) que de celle du PE cité par Van Oss ( $33 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) (Van OSS 1994).

### **III.1.2 Mesure de l'adhésion initiale des micro-organismes**

Cette expérience se déroule dans le RAR maintenu à  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , les autres conditions environnementales, comme le pH ou le potentiel redox, ne sont pas contrôlées pendant les 2 heures de contact. Initialement ce sont celles de l'inoculum (Cf paragraphe II.3). L'étude vise à rechercher une relation entre les caractéristiques de rugosité et d'énergie de surface des coupons utilisés dans le réacteur (décrites dans le paragraphe III.1.1.) et l'adhésion des micro-organismes responsables de la digestion anaérobie. Un test préliminaire de reproductibilité est d'abord effectué.

#### **III.1.2.1 Variabilité de l'adhésion**

Afin de déterminer la variabilité de l'adhésion sur les matériaux, une expérience indépendante à été menée, en utilisant des coupons de PVC et d'acier inoxydable en triple exemplaire. Les 6 coupons sont installés en même temps dans le RAR. Les conditions environnementales sont les mêmes que celles de l'expérience principale à suivre. Seul l'inoculum est différent, Bien que d'origine identique (même réacteur), il a été récolté à un moment différent et cela peut suffire à modifier significativement sa composition (ZUMSTEIN *et al.* 2000).

Le but de ce test est de déterminer la variabilité quantitative et qualitative de la biomasse qui adhère aux trois coupons de chaque matériau. Le Tableau III-3 suivant indique le taux de recouvrement (adhésion moyenne et écart type par coupon) sur les 3 coupons en PVC ou en acier inoxydable.

Tableau III-3 : Comparatif des taux d'adhésion lors du test de variabilité en triplicats (%)

	Adhésion	Moyenne et écart type
PVC1	$1,46 \pm 0,35$	
PVC2	$1,33 \pm 0,36$	$1,42 \pm 0,08$
PVC3	$1,46 \pm 0,33$	
Inox1	$1,09 \pm 0,65$	
Inox2	$1,17 \pm 0,91$	$1,16 \pm 0,07$
Inox3	$1,23 \pm 1,07$	

Pour chaque matériau, les quantités de micro-organismes adhérents sont équivalentes d'un coupon à l'autre. Les variabilités en terme quantitatif sont faibles. Les écart types, mesurés à partir des valeurs de recouvrement des surfaces, varient de 0,08% pour le PVC et de 0,07 % pour l'acier inoxydable. De même, l'analyse de l'aspect qualitatif des populations adhérentes d'un coupon à l'autre ne montre que de faibles différences. En effet, les profils électrophorétiques des 2 groupes microbiens étudiés qui ont adhérents sur le PVC et sur l'acier inoxydable sont superposables entre triplicats d'un même matériau mais différents entre matériaux (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

L'indice de diversité (Cf paragraphe II.7.6) dans les populations adhérentes est calculé pour les archées et les bactéries.

Tableau III-4 : Comparatif des indices de diversité lors du test de variabilité en triplicats

	Bacteria		Archaea	
	PVC	Acier inox.	PVC	Acier inox.
Coupon 1	5,82	3,83	2,08	2,27
Coupon 2	4,79	3,87	2,52	2,76
Coupon 3	4,98	4,05	2,16	/
Moy	5,2	3,9	2,3	2,5
ET	0,5	0,1	0,2	0,3

Qu'il s'agisse des archées ou des bactéries, les indices ne varient pas de manière notable. La variabilité du SDI est faible : 0,2 et 0,5 dans le cas des triplicats en PVC et 0,3 et 0,1 dans le cas des triplicats en acier inoxydable, respectivement pour les archées et pour les bactéries.

Dans les deux cas, PVC et acier, les variations quantitatives (écart types des valeurs de recouvrement) et qualitatives (SDI) sont faibles. Qu'il s'agisse de mesurer le pourcentage de recouvrement des coupons par la biomasse responsable de la méthanisation ou d'estimer la proportion relative des archées parmi la biomasse ayant adhérent, nous pouvons faire abstraction des variations susceptibles d'exister entre plusieurs coupons d'un même matériau. Cette affirmation n'est valable que dans le cas où les matériaux sont mis en œuvre dans des conditions identiques, en particulier avec le même inoculum.

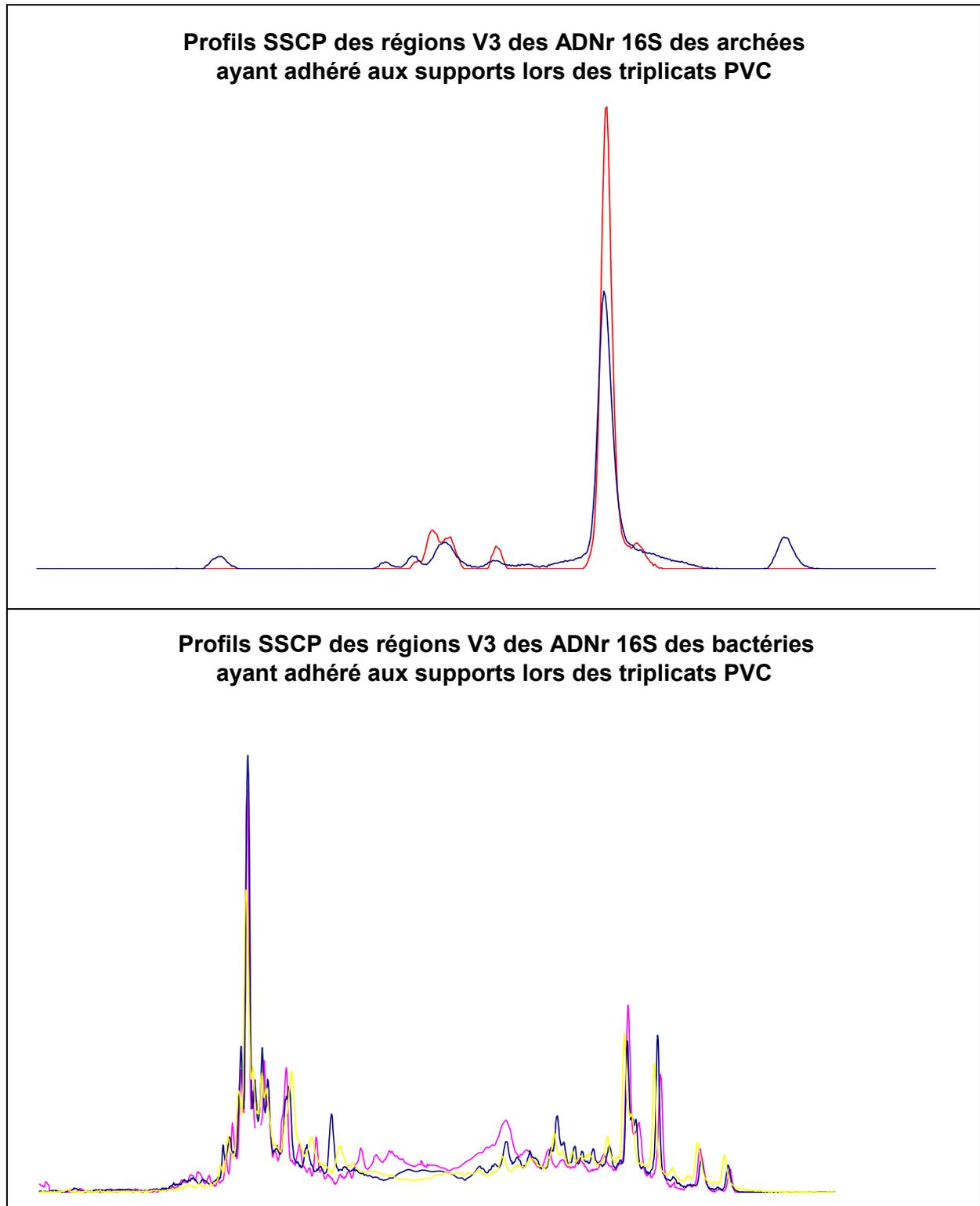
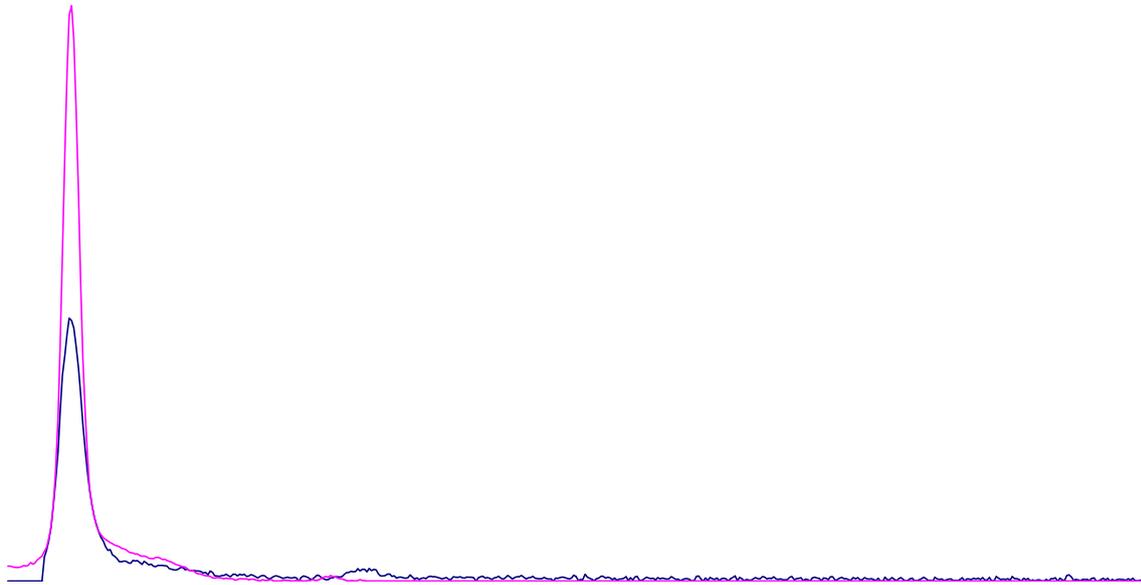


Figure III-3 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées et des bactéries ayant adhéré aux supports lors des triplicats sur PVC.

**Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées  
ayant adhéré aux supports lors des triplicats acier inoxydable.**



**Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries  
ayant adhéré aux supports lors des triplicats acier inoxydable.**

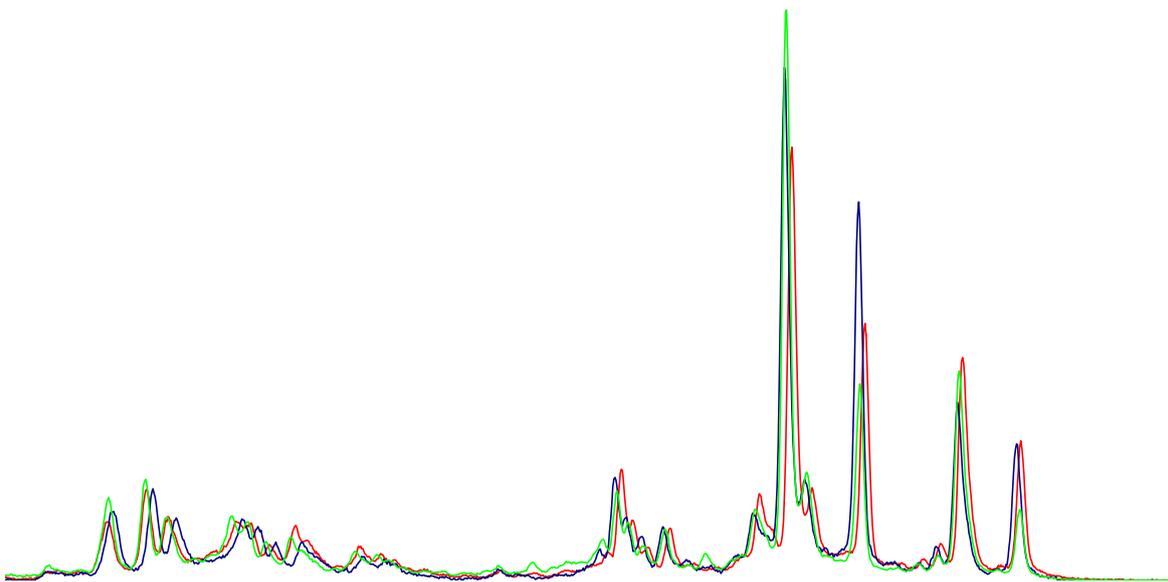


Figure III-4 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées et des bactéries ayant adhéré aux supports lors des triplicats sur acier inoxydable.

III.1.2.2 Caractérisation granulométrique de l'inoculum

L'analyse granulométrique de l'inoculum a été effectuée. Son intérêt réside dans la caractérisation des agrégats présent dans l'inoculum.

La courbe de distribution volumique des particules en fonction des diamètres équivalents est présentée à la Figure III-5. Elle ne suit pas une loi normale. Les diamètres des particules varient de 0,37 à 121,8  $\mu\text{m}$  avec une valeur moyenne de 21,6  $\mu\text{m}$  mais l'écart type est très élevé (30,5  $\mu\text{m}$ ). Ainsi certains agrégats peuvent dépasser les 120  $\mu\text{m}$  de diamètre. La médiane des diamètres équivalents (définie comme le diamètre équivalent répartissant les termes de la série en deux groupes de même pourcentage volumique) est de 15,65  $\mu\text{m}$ .

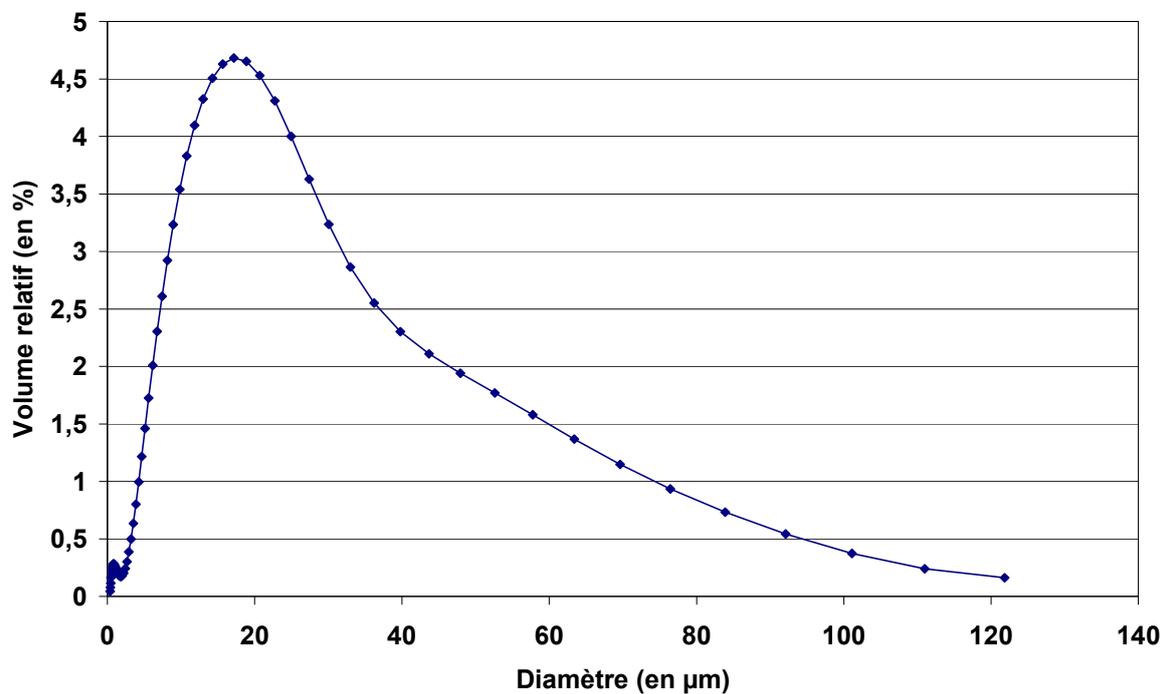


Figure III-5 : Répartition granulométrique des particules de l'inoculum (en volume relatif)

L'histogramme de distribution exprimée en nombre de particules en fonction des diamètres équivalents fournit d'autres informations.

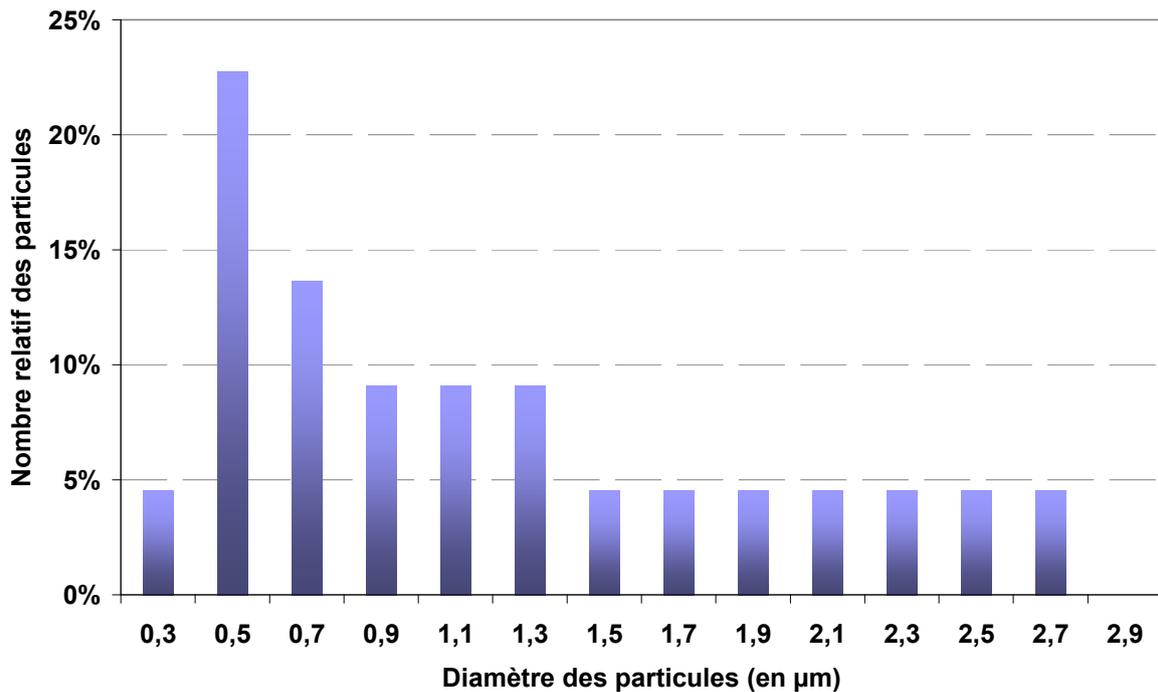


Figure III-6 : Répartition granulométrique des particules de l'inoculum (en nombre relatif)

Ce graphique permet de nuancer les données du précédent car il met en évidence le nombre très important de particules dont le diamètre apparent est faible malgré le fait que les plus petites particules ne représentent qu'une faible proportion du volume total. Plus de la moitié des particules présentes dans l'inoculum ont un diamètre inférieur à  $1\mu\text{m}$ , ce qui correspond sans doute pour une large part à des bactéries libres. Lors de cette expérience nous utiliserons donc un inoculum qui contient beaucoup de cellules libres. Cependant certains micro-organismes sont sous forme d'agrégats qui peuvent atteindre des tailles très importantes.

Un graphique identique basé sur la distribution des particules qui ont adhéré sur les 7 coupons est tracé sur la Figure III-7. Les moyennes et écarts types des valeurs obtenues sur l'ensemble des coupons y sont représentés.

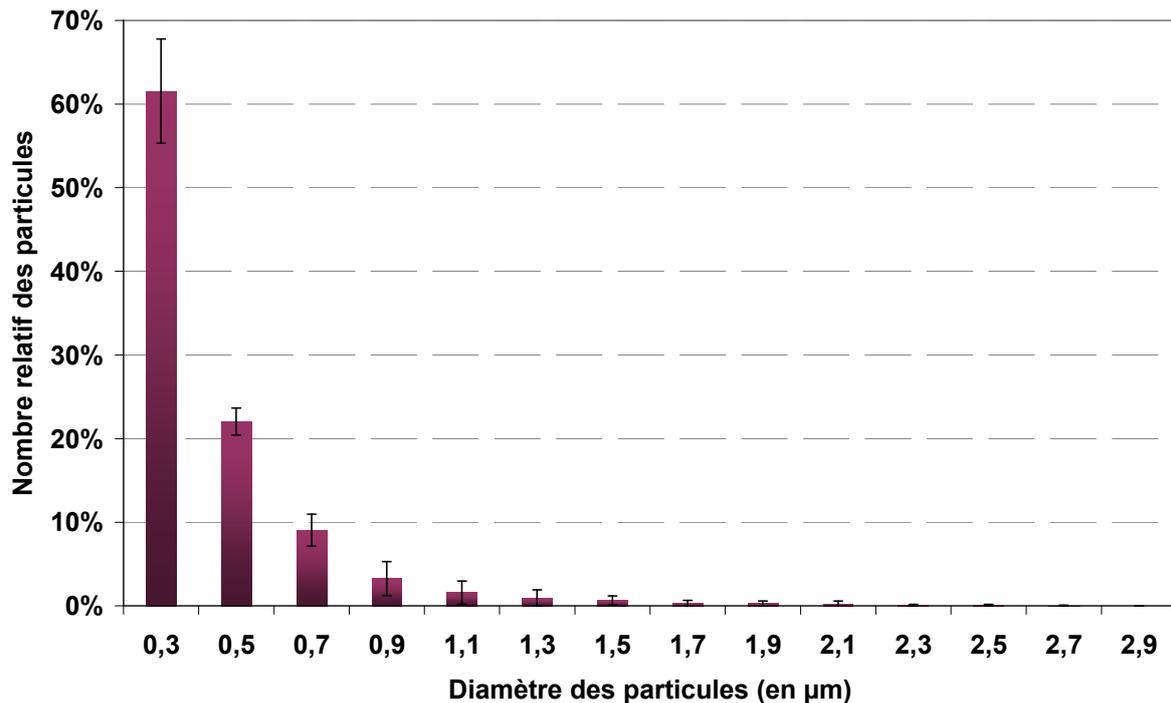


Figure III-7 : Répartition granulométrique des particules adhérees aux matériaux  
Valeur moyenne et écart type exprimés en nombre relatif

Les écarts types sont faibles, ce qui indique une certaine homogénéité dans la distribution des particules attachées entre les matériaux, lorsqu'elle est exprimée en nombre relatif en fonction des diamètres équivalents. Il n'y a pas de différences notables entre les matériaux en ce qui concerne la distribution des particules. L'allure de cette distribution est différente de celle obtenue lors de l'analyse de l'inoculum. La proportion des plus petites particules est très importante : près de 96% des particules adhérees possèdent un diamètre apparent inférieur à  $1\mu\text{m}$ . Les plus gros éléments visibles dans l'inoculum n'apparaissent plus sur les coupons. Cette différenciation peut être en partie expliquée par les conditions expérimentales. Les coupons sont des lamelles de matériaux placées verticalement sur un cylindre rotatif. Même si ce dispositif permet une homogénéisation de la suspension, cet agencement ne facilite pas l'adhésion des gros agrégats.

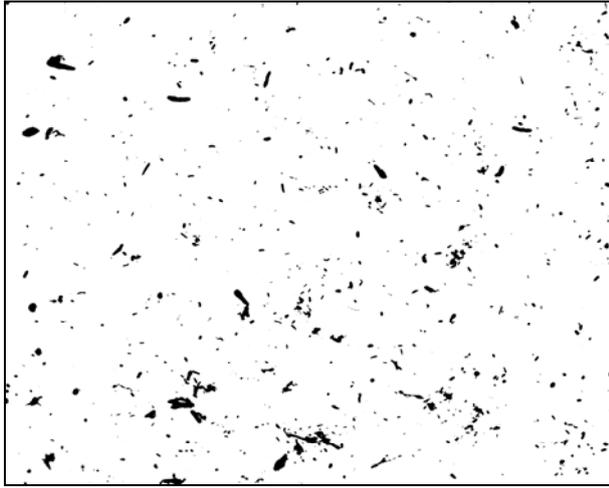
### III.1.2.3 Taux de recouvrement

Les coupons représentant les 7 matériaux (PE, PP, PVC, ABS, PC, verre borosilicaté et acier inoxydable 304L) ont été installés sur le cylindre rotatif interne du RAR (Figure II-2). Ils sont extraits après 2 heures de contact avec l'inoculum décrit au paragraphe II.3.

L'aspect quantitatif de l'adhésion présenté dans ce paragraphe a été obtenu par observation directe en microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI. Le taux de recouvrement des coupons est déterminé par l'analyse des images obtenues. Il correspond au pourcentage de surface occupée par les micro-organismes.

Cette expérience a été effectuée en double. Pour chacune, ce sont plus de 230 photographies (à raison de 30 photographies pour chacun des 7 coupons de matériau) qui ont été réalisées. Les images ont été numérisées puis digitalisées en noir et blanc. L'adhésion est ensuite mesurée par le calcul de la quantité relative des pixels noirs. La Figure III-8 donne un aperçu des images obtenues. Ces images montrent la répartition des particules adhérees sur plusieurs matériaux. Les photos prises afin de mener à bien cette étude montrent plus que des cellules isolées, des agrégats microbiens sont aussi observés.

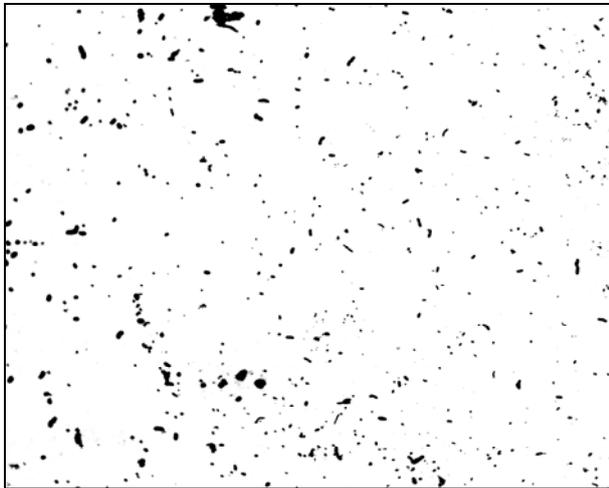
Les résultats obtenus lors de la mesure quantitative de l'adhésion prennent donc aussi en compte les phénomènes de co-adhésion et de co-agrégation. Il en ira donc de même lors de la mesure de l'aspect qualitatif de ce test dans le paragraphe III.1.2.3. Ainsi, en fonction des définitions établies dans l'étude bibliographique (Cf paragraphe I.1.1) sur la formation des biofilms, nous pouvons d'ores et déjà affirmer que les mesures de recouvrement peuvent prendre en compte non seulement l'adhésion de cellule isolées mais aussi l'adhésion d'agrégats, la co-adhésion et la co-agrégation. Pour simplifier, le terme d'« adhésion » sera seul utilisé dans la suite du manuscrit.



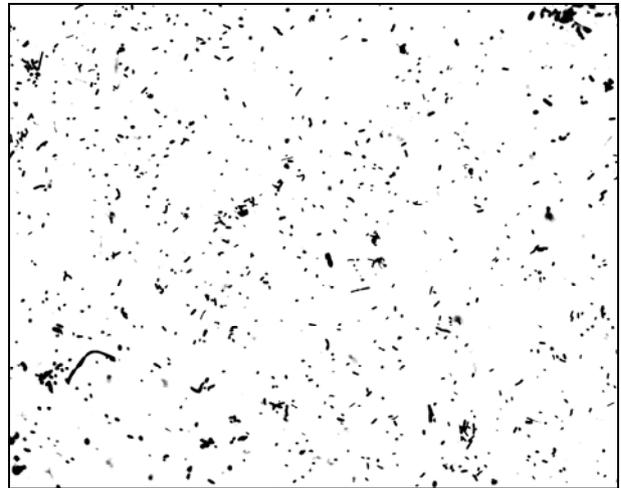
Acier inoxydable (76 x 61  $\mu\text{m}$ )



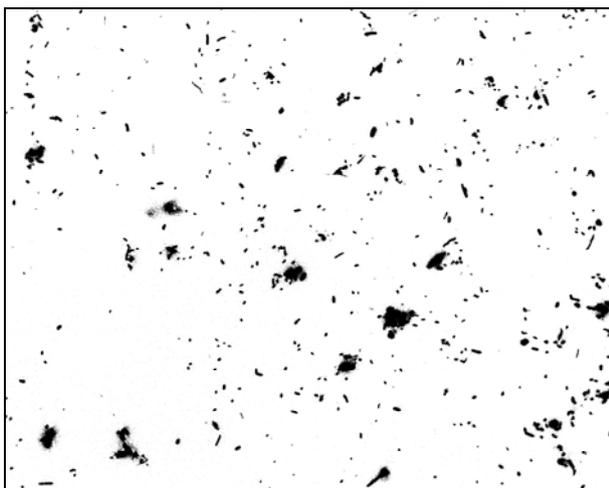
PE (76 x 61  $\mu\text{m}$ )



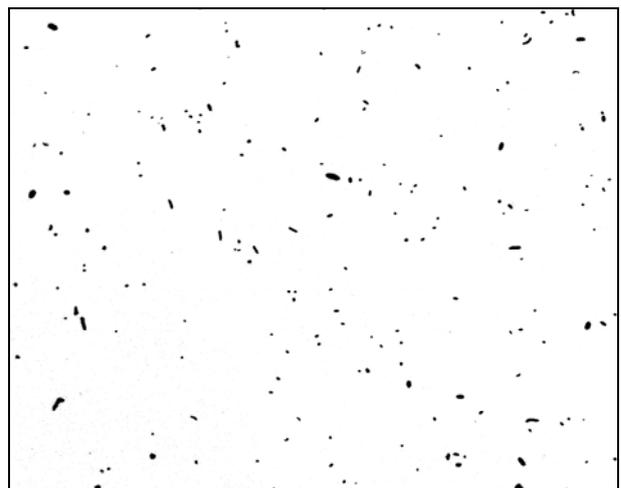
ABS (76 x 61  $\mu\text{m}$ )



PC (76 x 61  $\mu\text{m}$ )



PP (76 x 61  $\mu\text{m}$ )



Verre (76 x 61  $\mu\text{m}$ )

Figure III-8 : Exemple d'images traitées lors du calcul du taux de recouvrement

Les pourcentages de surface occupée par les micro-organismes ayant adhéré aux matériaux sont présentés dans le Tableau III-5. Les deux expérimentations en réacteur annulaire rotatif ont été mises en place dans les mêmes conditions opératoires. Seuls les deux inocula étaient différents ; ils provenaient du même réacteur de laboratoire mais ont été prélevés à deux ans d'intervalle. Chacun est caractérisé par une concentration en biomasse et une activité biologique (Cf paragraphe II.3). Le Tableau III-5 indique les moyennes et les écart-type des valeurs de surface occupée lors des deux expériences.

Tableau III-5 : Pourcentage de surface recouverte après 2 h de contact  
(Lors de deux expériences).

<b>Matériaux</b>	<b>Adhésion Test 1 (%)</b>	<b>Adhésion Test 2 (%)</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart type (relative et proportionnelle)</b>
<b>PP</b>	1,42	1,32	1,37	0,44 soit 32 %
<b>Acier inox.</b>	1,579	1,05	1,32	0,31 soit 23 %
<b>PE</b>	1,547	1,04	1,29	0,38 soit 29 %
<b>ABS</b>	0,962	0,61	0,79	0,20 soit 25 %
<b>PC</b>	0,804	0,66	0,68	0,30 soit 44 %
<b>Verre</b>	0,306	0,27	0,29	0,15 soit 52 %
<b>PVC</b>	0,121	0,26	0,19	0,12 soit 63 %

Un test statistique de comparaison de variance entre les données du tableau précédent à été effectué. La normalité de la distribution des échantillons ne pouvant être déterminée ( $n < 30$ ) et l'homoscédasticité ayant été rejetée (un test de Levenne montre une hétérogénéité des variances avec une  $p\text{-value} < 0,0001$  et  $\alpha = 0,05$ ), c'est un test statistique non-paramétrique qui a permis l'analyse des variances. Le résultat du test de Kruskal-Wallis ( $p\text{-value} < 0,0001$ ;  $\alpha = 0,001$ ) confirme la différence notable entre les mesures d'adhésion sur les échantillons.

La différence de taux de recouvrement entre les deux tests est importante. L'écart type mesuré varie d'au moins 23% (acier inoxydable) et peut atteindre 63 % (PVC). Cependant, si l'on procède au classement des matériaux en fonction de leur taux de recouvrement, l'ordre est quasiment le même dans les deux expériences (les classements de PC et ABS sont inversés mais sont très proches dans les deux cas). La qualité de l'inoculum étant le seul paramètre modifié entre les deux expériences, on notera dès à présent son rôle important lors de l'adhésion.

L'adhésion des micro-organismes est très différente en fonction des matériaux du support. En terme quantitatif, les matériaux facilitant les phénomènes d'adhésion sont le PP, l'acier inoxydable et le PE. Les valeurs moyennes de la surface recouverte par les micro-organismes en 2 heures sur ces coupons sont respectivement de 1,37, 1,32 et 1,29 %. Au contraire, le verre et le PVC pénalisent cette adhésion avec un pourcentage respectif de 0,29 et 0,19 %. Les données expérimentales des Tableau III-1 et Tableau III-5 sont utilisées pour calculer les facteurs de corrélation entre la quantité d'adhésion et la rugosité ou l'énergie de surface (Tableau III-6).

Tableau III-6 : r et R<sup>2</sup> entre adhésion et rugosité ou énergie de surface.

	Rugosité					Energie de surface				
	Ra	Rz	Rmax	Rpk	Rvk	$\gamma$	$\gamma_{LW}$	$\gamma_{AB}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$
<b>r</b>	0,70	0,70	0,72	0,69	0,77	-0,92	-0,76	-0,93	-0,30	-0,87
<b>R<sup>2</sup></b>	0,50	0,49	0,52	0,47	0,59	0,84	0,58	0,86	0,09	0,76

r : coefficients de corrélation et R<sup>2</sup> : coefficients de détermination

Ce tableau met en évidence les liens entre le phénomène d'adhésion observé et les paramètres de surface des matériaux utilisés.

L'adhésion croît avec la rugosité de la surface des matériaux : les valeurs de r sont positives pour tous les paramètres de rugosité. Mais, à cause des valeurs très faibles des coefficients de détermination entre l'adhésion et la rugosité (R<sup>2</sup> toujours inférieur à 0,6 quel que soit le paramètre choisi), il est possible d'affirmer que la rugosité de surface n'est pas un paramètre influent lors de l'adhésion dans la gamme de rugosité des coupons employés.

Contrairement à l'énergie de surface puisque l'adhésion décroît avec la hausse de chacun des paramètres : les valeurs des facteurs de corrélation sont négatives pour tous les paramètres mesurés mais avec un R<sup>2</sup> très élevé entre l'adhésion et  $\gamma$  ou  $\gamma_{AB}$ . Nos résultats montrent que l'utilisation de matériaux dont la surface possède une faible énergie facilite considérablement l'adhésion des micro-organismes responsables de la digestion anaérobie.

Il est admis que l'adhésion microbienne est directement liée à la topographie d'un support comme l'a montré une étude de Verran *et al.* (VERRAN *et al.* 2001). Mais d'autres auteurs relativisent en montrant que cet attachement n'est pas affecté par la rugosité si les valeurs de Ra varient de 0,05 à 0,9  $\mu\text{m}$  (HILBERT *et al.* 2003). Dans notre cas, les différences de taux

de recouvrement observées ne peuvent s'expliquer par les différences de rugosité observées entre les différents matériaux.

En premier lieu, les facteurs de corrélation entre les taux de recouvrement et les paramètres de rugosité, même s'ils sont positifs, sont faibles. Dans le Tableau III-6, la valeur maximale pour  $R^2$  est de 0,6 (Rvk). Dans les conditions de notre test, où le taux de cisaillement est faible, la morphologie de surface n'a pas d'influence sur les premières étapes de la colonisation

Les facteurs de corrélation entre les taux de recouvrement et les valeurs d'énergie de surface sont négatifs et très élevés. La valeur de  $r$  la plus élevée est de -0,93. Elle est calculée entre le recouvrement des coupons et l'énergie de surface. L'utilisation de matériaux possédant une énergie libre faible facilite toujours l'adhésion des micro-organismes. Dans notre cas, une valeur de  $\gamma$  plus faible que  $40 \text{ mJ.m}^{-2}$  favorise l'attachement des populations anaérobies. Néanmoins, cette valeur d'énergie de surface n'est pas directement reliée à la nature du matériau. Par exemple, la valeur de  $\gamma$  du coupon de PE utilisé lors de cette étude ( $39,8 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) est plus proche de la valeur de  $\gamma$  de celui de PP ( $35,6 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) que d'un substrat en PE ( $33 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) utilisé par d'autres (Van OSS 1994).

L'énergie totale de surface joue un rôle important dans l'adhésion primaire. Généralement, une énergie de surface faible rend plus aisée l'adhésion des micro-organismes. Ceci est aussi confirmé par nos résultats dans le cas de culture mixte (*Archaea* et *Bacteria*) : une valeur de  $\gamma$  inférieure à  $40 \text{ mJ m}^{-2}$  favorise l'adhésion de la population globale anaérobie. Contrairement à la morphologie de surface qui n'est pas un paramètre de poids dans les premiers instants de la colonisation, au moins dans la gamme de variation de rugosité des coupons testés.

### III.1.2.3 Aspect qualitatif de l'adhésion initiale

En parallèle, l'aspect qualitatif est obtenu par l'utilisation des techniques CE-SSCP et PCRq.

#### III.1.2.3.1 Empreinte moléculaire

Les coupons, délicatement extraits du cylindre interne du RAR, subissent en premier lieu un rinçage par trempage dans de l'eau distillée stérile. Puis les cellules sont récoltées par trempage sous agitation pendant 20 minutes dans une solution de RBS à 2% et deux séries de 5 rinçages à l'eau distillée. La première série de rinçage est effectuée à  $50^\circ\text{C}$ , la seconde à  $20^\circ\text{C}$ .

Pour chacun des matériaux testés, nous avons filtré la solution de RBS et les 10 solutions de rinçage. Chaque filtre, relatif à un matériau, a été analysé (extraction d'ADN total, amplification de la région variable V3 des gènes des ARN ribosomiques par PCR, électrophorèse SSCP des produits de PCR). Les cellules provenant de l'inoculum ont, elles aussi, été traitées.

Les résultats obtenus sont des profils électrophorétiques. Ils correspondent à une empreinte moléculaire de l'échantillon analysé. Chaque pic témoigne de la présence d'au moins une espèce bactérienne et l'aire sous les pics représente l'abondance relative de l'espèce bactérienne correspondante. L'alignement des profils permet la comparaison des populations bactériennes présentes. Les empreintes moléculaires relatives aux archées de l'écosystème présent sur les supports ou dans l'inoculum sont présentées sur la Figure III-9.

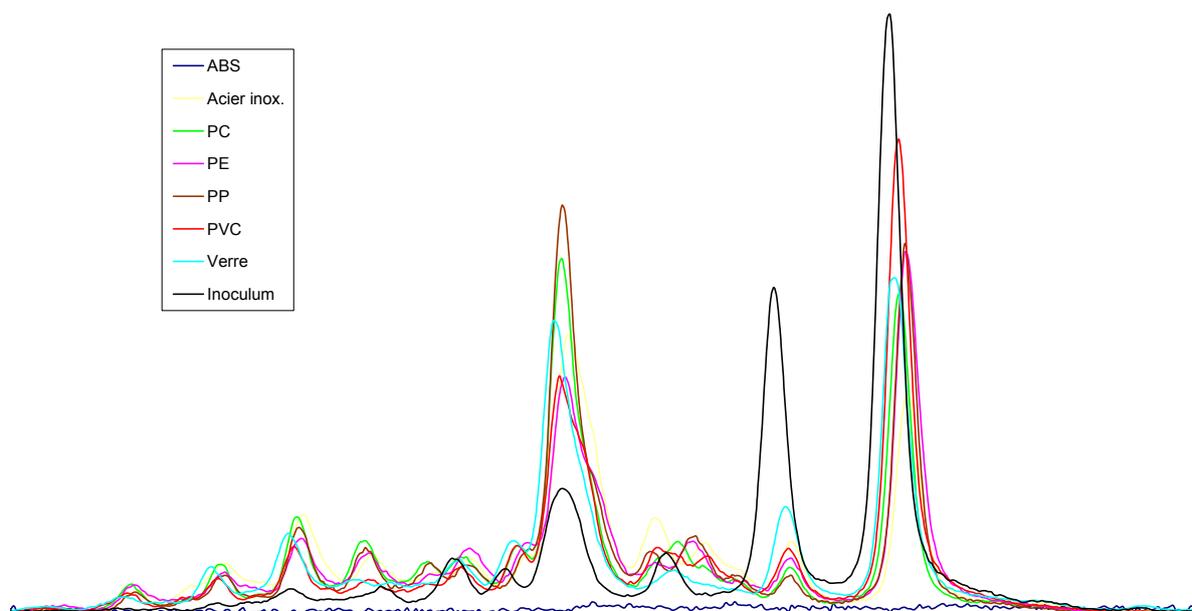


Figure III-9 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées ayant adhéré aux supports ou présentes dans l'inoculum.

Les empreintes des écosystèmes archées sont superposables. Deux heures seulement après le contact initial, ces populations présentes dans l'inoculum ont adhéré au support. Cet aspect confirme la théorie d'une fixation précoce, conformément aux travaux de Cresson (CRESSON *et al.* 2009). L'ensemble des profils liés aux archées attachées aux différents supports sont très proches entre eux mais sont différents du profil de l'inoculum. Ce fait suggère que l'adhésion des archées semble davantage liée aux caractéristiques des micro-

organismes qu'à celles des matériaux. L'utilisation des profils obtenus en CE-SSCP permet de déterminer les proportions relatives des populations dominantes tant dans l'inoculum utilisé que dans la biomasse attachée sur chaque coupon. Une procédure mathématique, basée sur les distances euclidiennes entre profils, permet de visualiser les distances génétiques entre les communautés. Les résultats de cette Analyse en Composantes Principales (ACP) sont présentés dans la Figure III-10. Les distances physiques entre les points sont proportionnelles aux distances génétiques entre profils.

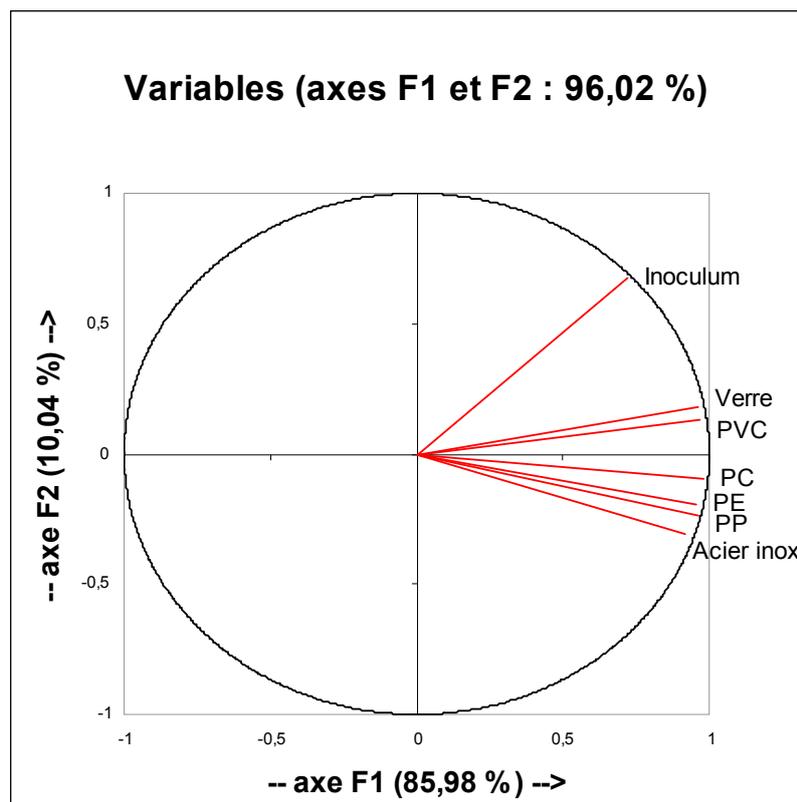


Figure III-10 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées (biomasse adhérente et inoculum)

Plus de 92 % des différences génétiques entre échantillons sont exprimées dans les deux axes principaux. Pour chaque population, les résultats des analyses statistiques mettent en lumière l'importance des propriétés des matériaux dans l'adhésion des archées et des bactéries.

Pour les populations archées, quel que soit le matériau utilisé, les différences des structures des communautés entre l'inoculum et les populations attachées sont très élevées et plus significatives qu'entre les différentes populations adhérentes entre elles.

Les profils SSCP des différentes populations bactériennes montrent une disparité plus importante que dans le cas des archées (Figure III-11).

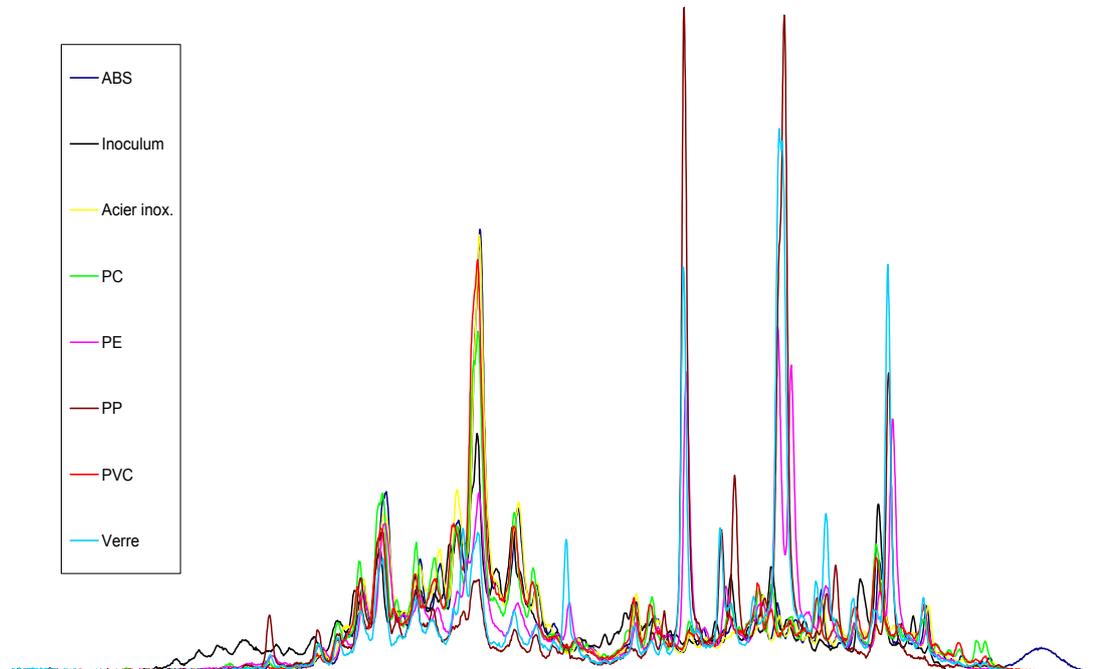


Figure III-11 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries ayant adhéré aux supports ou présentes dans l'inoculum.

La comparaison de ces profils à celui de l'écosystème initial (inoculum) fait apparaître deux groupes. Les coupons en PP, verre et PE semblent avoir attiré les mêmes populations bactériennes. Les autres coupons ont été moins sélectifs pour les bactéries présentes dans l'inoculum. L'ACP effectuée à partir de ces données n'est donc pas aussi contrastée pour les bactéries qu'elle l'était pour les archées (Figure III-12).

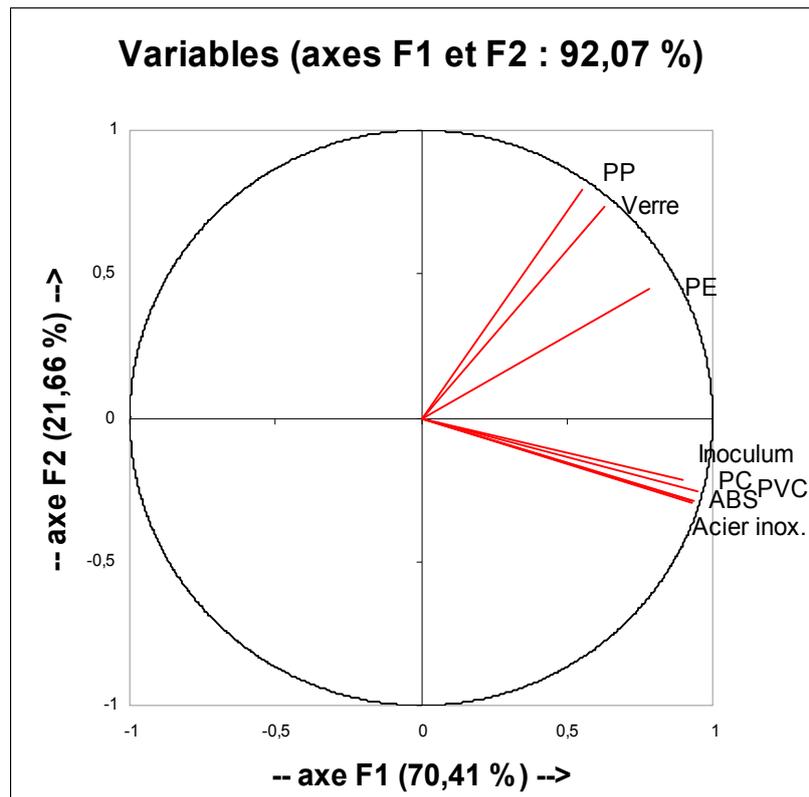


Figure III-12 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries. (biomasse adhérente et inoculum)

Plusieurs profils SSCP (Acier inoxydable, PC, PVC et ABS) sont proches de celui de l'inoculum. En effet, les communautés attachées au PP, au verre et au PE diffèrent significativement des précédents.

Les résultats démontrent que toutes les archées présentes dans l'inoculum n'adhèrent pas aux supports. Mais, lorsque cette adhésion existe, elle est quasiment identique pour tous les matériaux en termes d'empreinte moléculaire. En ce qui concerne les bactéries, la conclusion est différente à cause d'une adhésion plus spécifique en fonction du support.

### III.1.2.3.2 Proportion d'archées

Sachant que l'adhésion des archées est un phénomène clef lors de la mise en place d'un biofilm de digestion anaérobie, la quantité relative de bactéries et d'archées (exprimée en %) adhérent au substrat a aussi été mesurée par PCR quantitative. La quantité relative d'archées est comparée au nombre total de micro-organismes (Archaea + Bacteria) sur les différents matériaux (Figure III-13). Ce ratio est aussi déterminé pour l'inoculum.

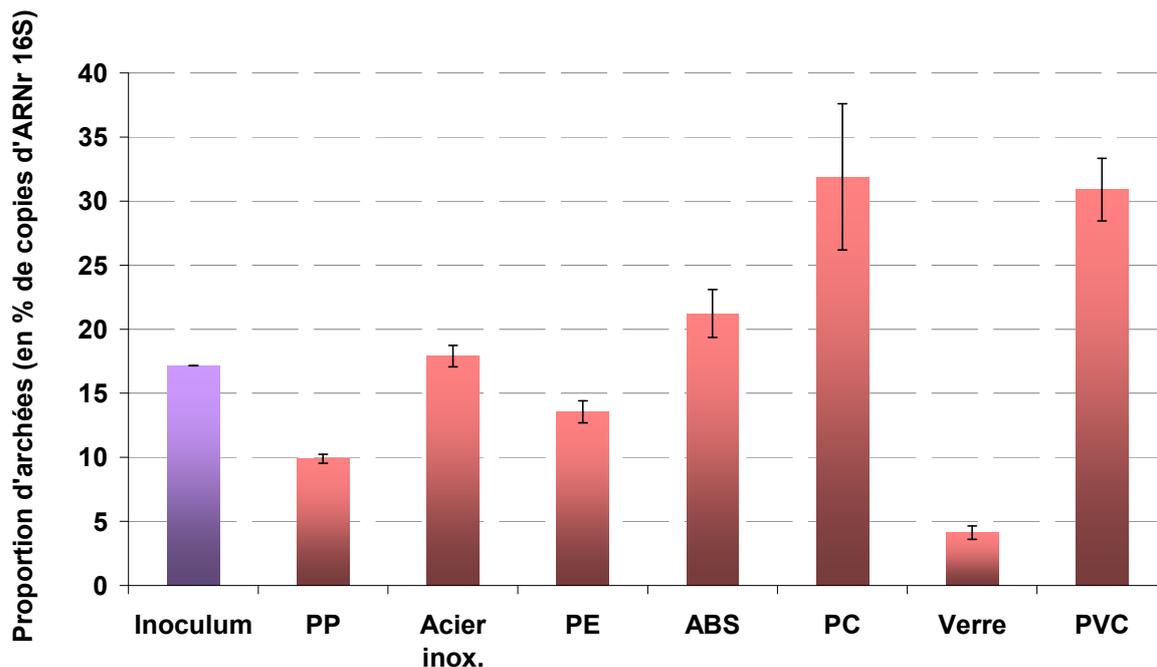


Figure III-13 : Pourcentage d'archées dans l'inoculum et dans les populations adhérees (copies d'ADNr 16S)

Deux polymères, le PVC et le PC, présentent une augmentation significative de la proportion d'archées en comparaison de celle de l'inoculum. Ce pourcentage des archées dépasse 30% contre 17 pour l'inoculum. Le pourcentage des archées dans la communauté microbienne ayant adhéree sur l'ABS et sur l'acier inoxydable est proche de celui de l'inoculum. En ce qui concerne le PP, le PE et le verre, la proportion relative baisse, parfois même très fortement dans le cas du verre.

La quantité relative des archées dans la population totale est fortement dépendante du matériau utilisé. Plusieurs matériaux (ABS, PC et PVC), pour lesquels le taux de recouvrement est faible (de 0,19 à 0,79 %, Cf Tableau III-5 ), favorisent clairement l'adhésion des archées. Cela a pour conséquence l'augmentation de leur proportion relative sur le support. De 17 % dans l'inoculum, cette valeur passe respectivement à 21, 32 et 31 % pour les coupons en ABS, PC et PVC.

### **III.1.3 Conclusion sur l'adhésion initiale des micro-organismes**

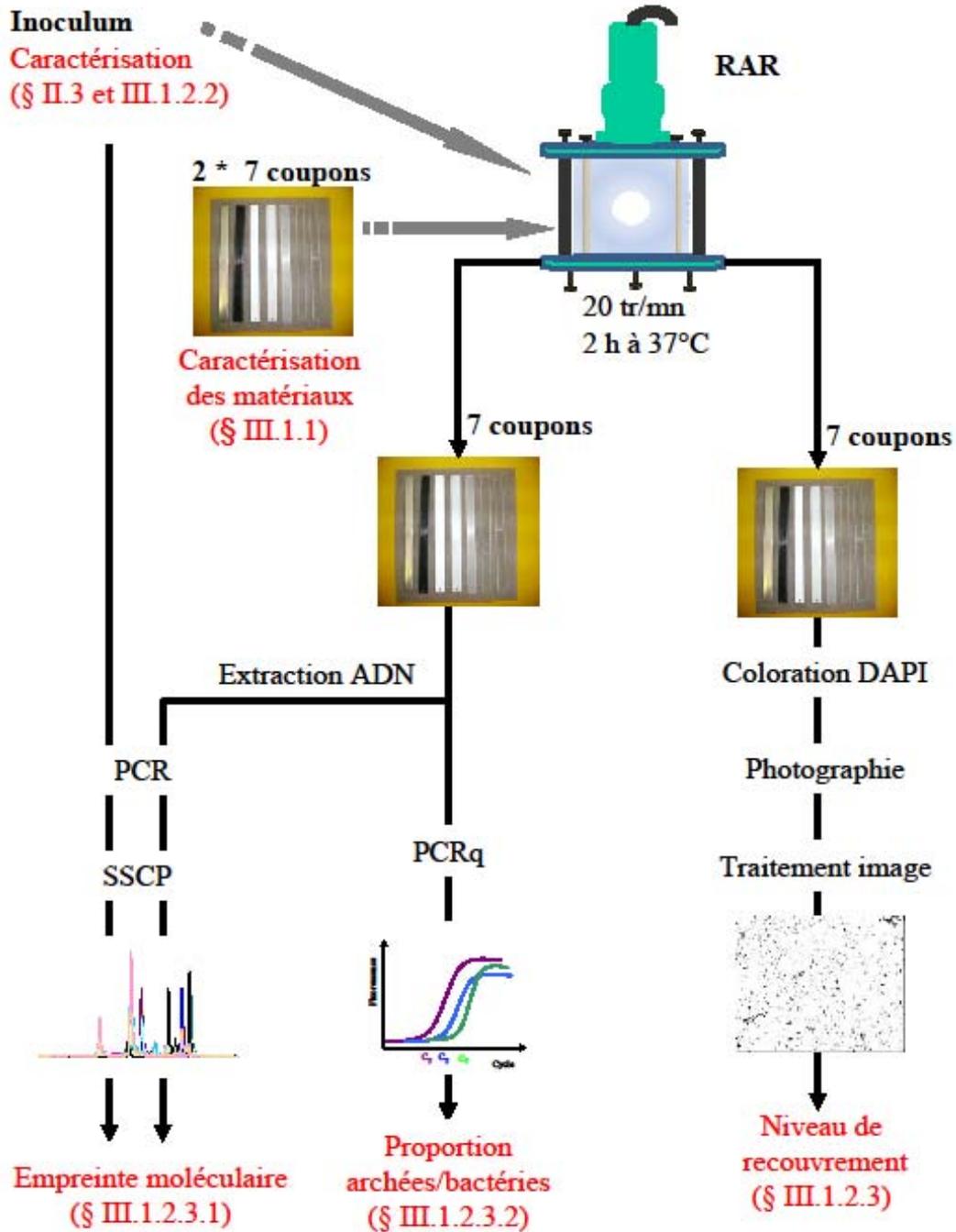
Nos résultats montrent que l'utilisation de matériaux à faible énergie de surface rend plus facile la première étape de la mise en place d'un biofilm anaérobie de méthanisation. En fonction du matériau utilisé, l'adhésion des micro-organismes est quantitativement différente. Les substrats testés peuvent être classés par ordre décroissant en fonction de l'affinité que les micro-organismes ont pour eux tel que : PP, acier inoxydable, PE, ABS, verre et PVC. Mais l'affinité des micro-organismes pour ces matériaux peut aussi être différencié en fonction du groupe microbien observé (*Bacteria* ou *Archaea*).

Ces résultats vont à l'encontre de ce que l'on trouve dans les installations industrielles de traitement anaérobie où de très bonnes performances sont généralement atteintes avec des supports microbiens en PVC. PVC et PP sont cités comme étant avantageux lors de la fabrication de supports (GRUNZ *et al.* 1999).

Mais cette remarque n'est valable que lorsque l'on se limite à mesurer la quantité totale de biomasse adhérente.

Ainsi, la faible adhésion relative du consortium de la digestion anaérobie peut parfois être compensée par une sélection plus importante d'archées, responsables de l'étape limitante de la réaction globale de méthanisation. Si cette augmentation de la proportion relative des archées sur le support est vraie pour cette étape initiale (adhésion, co-adhésion et co-agrégation), il n'est pas possible d'affirmer qu'elle l'est lors de la croissance ultérieure du biofilm et qu'elle a un impact sur les performances d'un réacteur de méthanisation. Les études suivantes (Cf paragraphes III.2 et III.3) répondront à ces questions.

*Schéma synoptique de l'étude de l'adhésion initiale*



### *Synthèse de l'étude de l'adhésion initiale*

L'adhésion du consortium microbien responsable de la digestion anaérobie a été observée. Sept coupons de différents matériaux (PVC, PC, PP, PE, ABS, acier inoxydable et verre) ont été utilisés comme matériau-support des micro-organismes dans un réacteur annulaire rotatif. La surface des coupons est caractérisée en terme de rugosité ( $R_a$ ,  $R_z$ ,  $R_{max}$ ,  $R_{pk}$ ,  $R_{vk}$ ) et d'énergie de surface ( $\gamma$ ,  $\gamma_{LW}$ ,  $\gamma_{AB}$ ,  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$ ). Cet examen a révélé que la gamme de valeurs de rugosité des matériaux utilisés n'est pas très étendue contrairement au registre d'énergie de surface. Une analyse en composantes principales (ACP) a permis de mettre en évidence les corrélations des valeurs de rugosité entre elles. Il en va de même pour les principales valeurs d'énergie de surface. Les paramètres de rugosité étant négativement corrélés à ceux de l'énergie de surface.

L'analyse granulométrique de l'inoculum nous renseigne sur la distribution des particules et agrégats présents. L'allure moyenne de cette distribution mesurée sur les coupons est homogène bien que différente de celle obtenue lors de l'analyse de l'inoculum. La proportion des plus petites particules, dont font partie les cellules microbiennes, est plus importante et les plus gros éléments visibles dans l'inoculum n'apparaissent plus sur les coupons.

L'adhésion des micro-organismes est différente en fonction des matériaux. En terme quantitatif, le PP, l'acier inoxydable et le PE facilitent les phénomènes d'adhésion contrairement au verre et au PVC. Les facteurs de corrélation entre l'adhésion et la rugosité, même s'ils sont positifs, sont très faibles, tandis que ceux calculés avec les valeurs d'énergie de surface sont négatifs et très élevés. L'utilisation de matériaux possédant une énergie libre faible facilite l'adhésion des micro-organismes de la digestion anaérobie. Cependant, la valeur d'énergie de surface n'est pas directement reliée à la nature du matériau. L'aspect qualitatif est obtenu par l'utilisation des techniques CE-SSCP et PCRq. L'ensemble des profils liés aux archées attachées aux différents supports sont très proches entre eux et sont différents du profil de l'inoculum. L'adhésion des archées semble plus liée aux caractéristiques des micro-organismes qu'à celles des matériaux. Les profils SSCP des populations microbiennes montrent une disparité plus importante que dans le cas des archées. La quantité relative des archées dans la population totale est fortement dépendante du matériau utilisé. Deux polymères, le PVC et le PC, pour lesquels le taux de recouvrement est faible présentent une augmentation significative de la proportion d'archées en comparaison de celle de l'inoculum.

### **III.2 ETUDE DE LA COLONISATION PAR LES MICRO-ORGANISMES**

Dans le cas particulier des cultures mixtes, avec des populations aussi différentes que les archées ou les bactéries, le choix d'un matériau pour le support peut influencer l'adhésion de certaines catégories de micro-organismes de la communauté. L'étude précédente (paragraphe III.1.2) a révélé que des matériaux comme le PVC ou le PC possèdent des caractéristiques qui favorisent l'adhésion initiale des archées contrairement au PP, au PE et surtout au verre. Dès lors, la question de savoir si cette influence perdure lors de la mise en place du biofilm peut être posée. Une réponse affirmative pourrait expliquer les bons résultats obtenus par des procédés intensifs de digestion anaérobie utilisant des supports bactériens en PVC (GRUNZ *et al.* 1999).

Le but de l'expérience suivante est donc d'évaluer la persistance éventuelle d'un taux avantageux d'archées lors de la suite de la colonisation des matériaux, c'est-à-dire l'établissement d'un biofilm.

#### **III.2.1 Suivi des réacteurs au cours de la colonisation**

Afin de visualiser la mise en place du biofilm lors du démarrage des réacteurs anaérobies, cette nouvelle expérience se prolonge bien après les phénomènes d'adhésion que nous avons mesurés après 2 h de contact. La colonisation des sept matériaux déjà étudiés (paragraphe II.1.1.2) est ici mise en œuvre pendant 30 jours. Attendu que les RAR ont un volume utile faible (1 litre) ils sont relativement fragiles. Techniquement, l'ouverture répétée du réacteur afin d'en extraire des coupons à différents stades de leur colonisation s'avère périlleuse, notamment pour le maintien de l'anaérobiose. Cette expérience est donc réalisée grâce à deux RAR « jumeaux » démarrés et conduits dans les mêmes conditions opératoires. Le premier est stoppé après 15 jours d'activité, le second au 30<sup>ième</sup> jour. Cet intervalle nous semble judicieux compte tenu du faible taux de croissance des micro-organismes anaérobies et des connaissances que nous avons du démarrage des méthaniseurs (CRESSON, 2006).

Il faut s'attendre à une période de latence de plusieurs jours (LAUWERS *et al.* 1989; SANCHEZ *et al.* 1994). De plus, un délai de 30 jours est une durée acceptable pour cette étape d'après la littérature (Tableau I-4).

Comme dans l'expérience précédente (paragraphe III.1.2) les RAR sont équipés de deux jeux de sept coupons des mêmes matériaux que ceux utilisés dans l'étude de l'adhésion à 2 heures : PP, PE, PC, PVC, ABS, acier inoxydable et verre. Pour chaque matériau, le premier coupon est utilisé pour la mesure de la biomasse attachée (matière sèche) et l'autre pour la caractérisation des populations adhérentes (SSCP et qPCR).

A ce stade de la mise en place de la méthode d'étude, nous sommes conscients que l'interprétation des résultats peut être limitée par un biais. En effet, la mise en commun des différents coupons dans le même réacteur peut minimiser les différences de colonisation des coupons. Les raisons qui nous ont décidé à choisir tout de même cette méthode sont doubles. *Primo* l'homogénéisation n'est pas certaine et dans le cas contraire la mise en évidence de différences entre matériaux sera d'autant plus significative. *Secundo*, l'utilisation des coupons dans des réacteurs différents provoquerait des biais encore plus importants liés à une évolution différente des populations microbiennes. Nous avons vu précédemment l'impact de l'inoculation sur les résultats, même en utilisant le même réacteur comme source d'inoculum.

Pendant l'expérience les RAR sont maintenus à 37°C et à l'obscurité pendant 15 jours pour le RAR 1 et 30 jours pour le RAR 2. Le pH est contrôlé à 6,8 pendant toute la durée de l'expérience afin d'éviter une acidification trop importante du milieu par accumulation d'acides gras volatils. Concentration et activité de l'inoculum sont décrites au paragraphe II.3. Durant cette période, les réacteurs sont alimentés en continu. Le TSH est fixé à 16,8 h ce qui correspond pour les RAR utilisés à un débit constant de 1,5 litre par jour. La CVA est augmentée de manière exponentielle dès que la période d'adaptation est terminée. Cette augmentation est effectuée en modifiant la concentration en charge polluante de la solution d'alimentation. Cette stratégie de démarrage a été choisie d'après les bons résultats déjà obtenus au laboratoire (CRESSON *et al.* 2008). Une alimentation en vin très diluée et un TSH très court permettent un lessivage rapide des micro-organismes libres et favorisent la fixation et la croissance des microorganismes attachés.

Les courbes de la Figure III-14 représentent les cinétiques du rendement en DCOs de chacun des réacteurs.

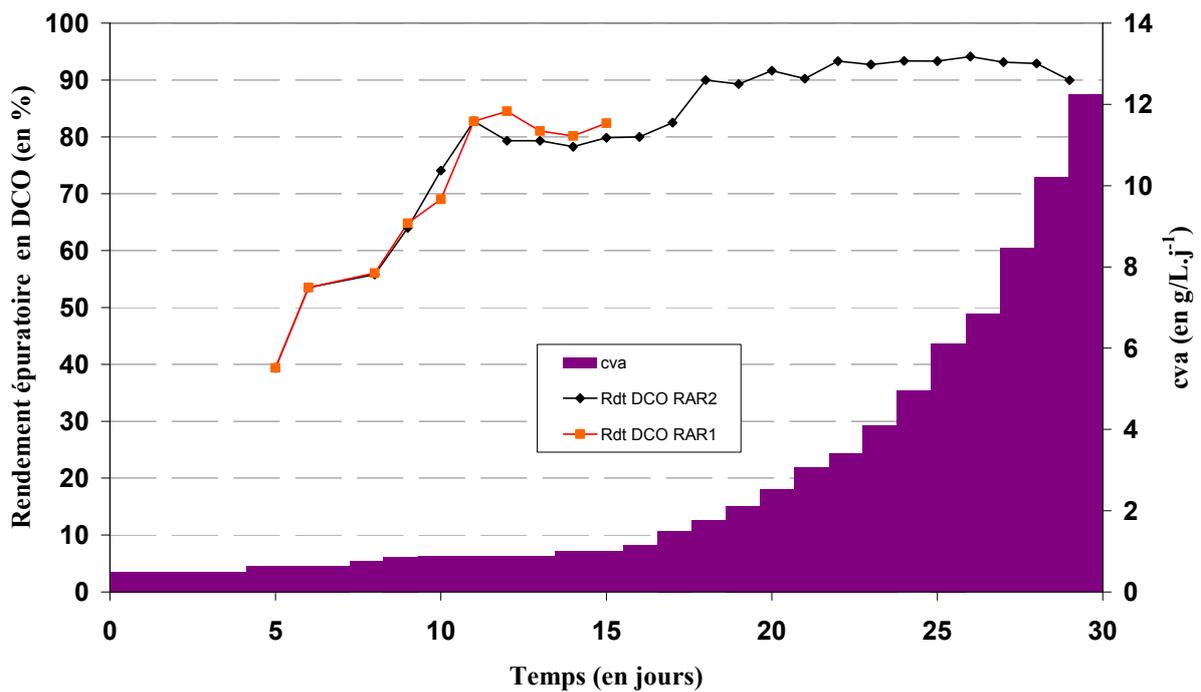


Figure III-14 : Cinétique de l'évolution du rendement épuratoire et de la CVA (RAR 1 et 2)

Pendant toute la durée du suivi du RAR 1, les réacteurs se comportent de la même manière. Au 11<sup>ème</sup> jour, ils atteignent 80% de rendement épuratoire (calculé à partir des DCOs entrante et sortante). A cette date, nous pouvons considérer que la période d'adaptation est terminée.

Nous avons vu au paragraphe I.2.1.1.4 que les AGV, intermédiaires de la réaction globale de la méthanisation, sont des indicateurs du déroulement de la digestion anaérobie, leur accumulation est la preuve d'un dysfonctionnement des archées méthanogènes (Cf Figure I-8). Les cinétiques d'évolution des concentrations en AGV dans les réacteurs sont visibles sur la Figure III-15.

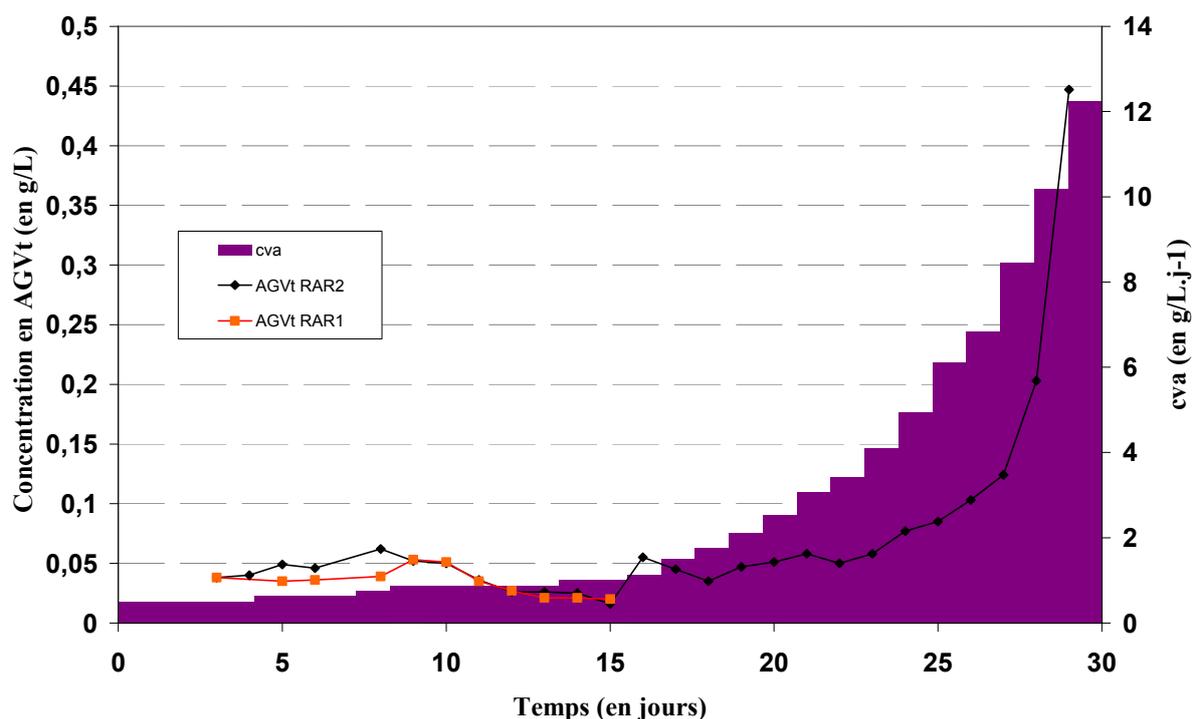


Figure III-15 : Cinétique de l'évolution de la concentration en AGV et de la CVA (RAR 1 et 2)

Ces courbes montrent qu'entre le 11<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour, la concentration en AGV dans les réacteurs a tendance à diminuer lorsque la CVA est constante. Cela traduit une croissance de la biomasse épuratrice. La consommation de l'éthanol de l'alimentation, sans aucune accumulation transitoire d'AGV, ainsi que les bonnes performances de dégradation (80 % de la DCOs est éliminée), sont la preuve d'une bonne activité de méthanisation. Le suivi de la concentration en AGV nous amène à la même conclusion.

La proportion de DCO représentée par ces AGV est calculée (Figure III-16). Dans la phase liquide des réacteurs, la charge organique, exprimée en DCO, est représentée par l'éthanol de l'alimentation et les intermédiaires de la réaction (AGV). L'analyse régulière des effluents des RAR révèle que, tout au long de l'expérience, l'acétate correspond à la totalité des AGV. Il s'agit là d'un effet de la source de carbone, quasiment uniquement représenté par l'éthanol du vin, comme décrit par l'équation de réaction de dégradation anaérobie de l'éthanol :



Le calcul de la proportion de cette DCO due aux AGV donne un éclairage supplémentaire sur l'activité biologique du réacteur. Le déséquilibre entre les deux groupes microbiens (archées et bactéries) augmente en fonction de l'augmentation de cette proportion.

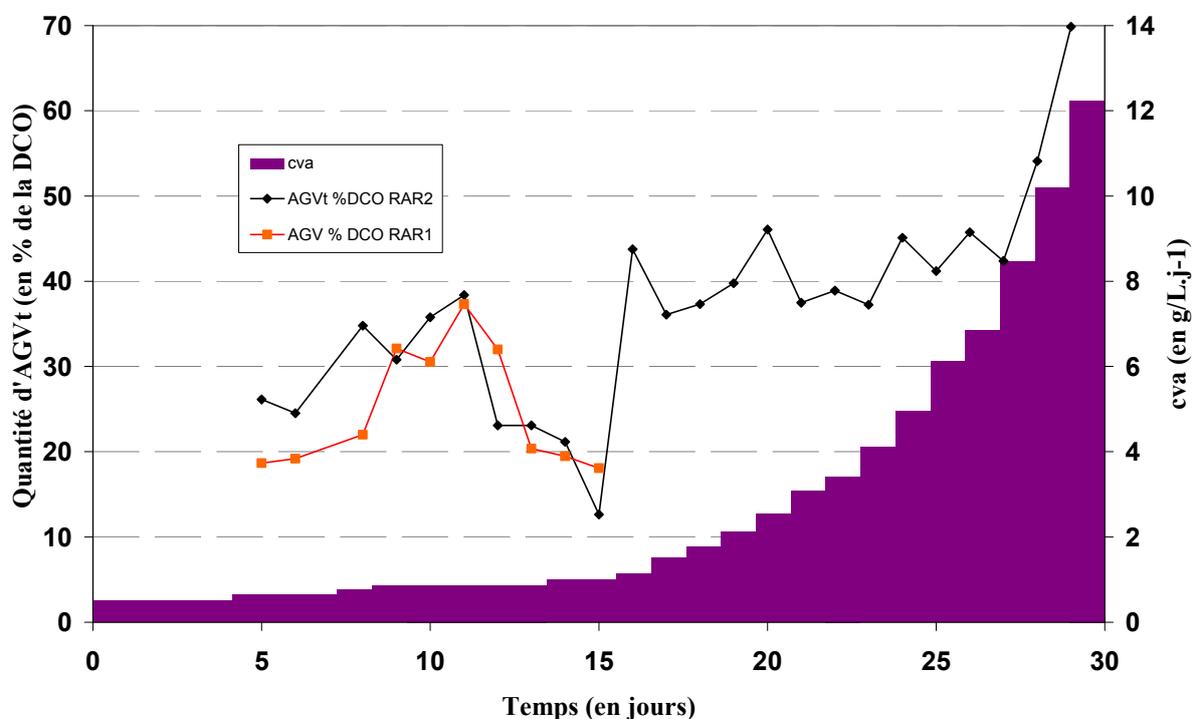


Figure III-16 : Cinétique de l'évolution du pourcentage de DCO due aux AGV (RAR 1 et 2)

Dans la Figure III-16, les courbes qui représentent cette proportion dans les RAR montrent qu'elle augmente pendant la période d'acclimatation (jusqu'au jour 11). Globalement, lors de cette période, les bactéries acidogènes ont une activité plus importante que celle des archées. Plusieurs choses peuvent l'expliquer. D'une part les bactéries précèdent les archées dans la chaîne trophique et s'installent donc plus tôt, et d'autre part leur temps de doublement est plus court. A CVA constante (du jour 11 au jour 15) le pourcentage de DCO imputable aux AGV chute. C'est le signe d'un rééquilibrage dans l'ensemble de la chaîne trophique. Cette donnée est parfaitement corrélée à la fois avec la baisse de la concentration en AGV et avec un rendement épuratoire satisfaisant (80%). C'est après cette période d'acclimatation qu'ont été effectués l'ouverture du RAR1 et la caractérisation des biofilms des coupons. En ce qui concerne le RAR2, la CVA n'a cessé d'être augmentée à partir de ce jour et de manière exponentielle. Elle est passée de 1 à plus de 12 gDCOs.L-1.j-1 en moins de deux semaines (Figure III-15).

Pendant ce temps, le réacteur garde un rendement épuratoire très élevé (supérieur à 90%). La concentration en AGV, ainsi que leur proportion dans la DCO de l'effluent, n'augmentant que dans les 3 derniers jours avant l'arrêt et l'ouverture du réacteur RAR2.

### **III.2.2 Etude du biofilm après 15 jours de croissance**

#### III.2.2.1 Quantification des biofilms à 15 jours

Les coupons sont extraits un par un et rincés individuellement une première fois dans de l'eau déminéralisée stérile. La biomasse qui se décroche à ce moment là est considérée comme faiblement attachée (fraction 1). Elle est quantifiée par filtration puis pesée du gâteau. La qualité de la balance utilisée est telle que les valeurs mesurées inférieures à  $1.10^{-3}$  g ne doivent pas être prises en compte. Pour nos coupons, dont la surface est de  $21,85 \text{ cm}^2$  le seuil de détectabilité est donc fixé à  $454 \text{ mg/m}^2$ . La biomasse fortement attachée (fraction 2) est ensuite décrochée par action mécanique (jet d'eau déminéralisée stérile) et par « nettoyage » à l'aide d'une solution de RBS (Cf. paragraphe II.7.1). La mesure de biomasse est effectuée avec la même technique.

La vérification de l'élimination totale de la biomasse fixée est effectuée par observation directe des coupons en microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI, méthode préalablement décrite au paragraphe II.6 et utilisé pour la mesure du taux de recouvrement.

Le Tableau III-7 montre les résultats obtenus lors de la quantification massique des biofilms après 15 jours d'activité. Sur certains coupons, la quantité de matière sèche est trop faible pour que la valeur mesurée soit fiable. Ainsi toutes les mesures inférieures à 1 mg n'ont pas été prises en compte.

Tableau III-7 : Quantité de biomasse faiblement (fraction 1) et fortement attachée (fraction 2) sur les coupons après 15 jours de colonisation (en g.m<sup>-2</sup>)

<b>RAR1 (15 jours)</b>			
	<b>Fraction 1</b>	<b>Fraction 2</b>	<b>Total</b>
<b>PP</b>	1,05	1,14	2,19
<b>Acier</b>	indéetectable	0,36	0,36
<b>PE</b>	indéetectable	0,78	0,78
<b>ABS</b>	indéetectable	0,96	0,96
<b>PC</b>	indéetectable	0,78	0,78
<b>PVC</b>	indéetectable	0,82	0,82
<b>Verre</b>	indéetectable	indéetectable	indéetectable

Après 15 jours de fonctionnement, la quantité totale de biomasse présente sur les matériaux est homogène pour les coupons en PE, ABS, PC et PVC. Elle varie entre 0,78 et 0,96 g.m<sup>-2</sup>. L'acier inoxydable et le verre n'ont pas permis une aussi bonne colonisation. Seulement 1 mg de biomasse est présent sur le coupon en acier, tandis que la quantité de biofilm sur le verre n'a pas pu être déterminée. C'est sur le PP que le biofilm est le plus présent, où la biomasse sèche atteint 2,19 g.m<sup>-2</sup>.

Des auteurs décrivent le biofilm en deux compartiments (CHARACKLIS *et al.* 1990). Le premier est représenté par la base du film, proche du support, bien structurée dans laquelle le transport diffusif est prépondérant. La surface externe du biofilm constitue le second compartiment qui fait le lien entre le liquide et la partie basale (Figure III-17). Cet auteur décrit un gradient décroissant dans la densité du biofilm du support vers le liquide avec une diminution plus prononcée dans la partie superficielle, surtout dans le cas de micro-organismes filamenteux. Chacun des deux compartiments pouvant être majoritaire voire largement dominant en fonction des micro-organismes qui les composent et des conditions de culture.

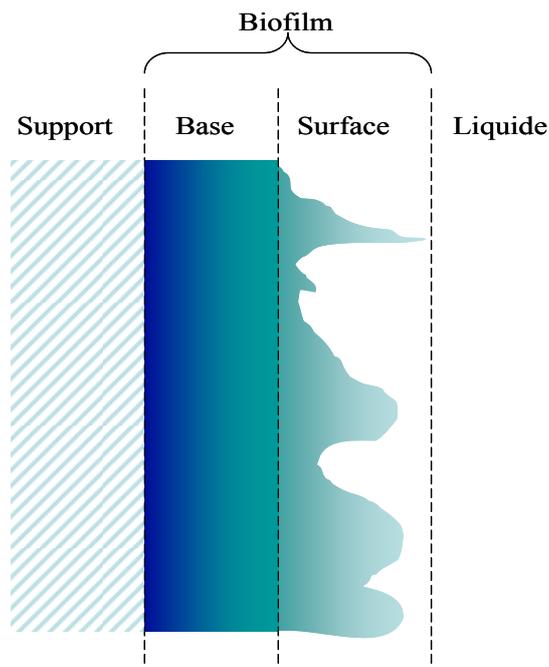


Figure III-17 : Les différents compartiments d'un système à biofilm  
D'après (CHARACKLIS *et al.* 1990)

Dans la littérature, cet aspect stratifié du biofilm est évoqué dans plusieurs études. Melo et ses collaborateurs ont identifié des couches plus ou moins sensibles au détachement. Les couches basales étant plus fortement ancrées (MELO *et al.* 1984). Plus proche de notre travail, des auteurs ont observé la même structure dans des biofilms anaérobies (DROSTE *et al.* 1990). D'autres montrent une évolution du biofilm au cours du temps. La résistance à la tension dans le biofilm augmente en fonction de la profondeur et de l'âge du biofilm (OHASHI *et al.* 1994). En observant le détachement progressif du biofilm en fonction de l'augmentation des forces hydrodynamiques, une étude a mis en lumière la stratification de biofilms aérobies et anoxiques en fonction de sa profondeur (DERLON *et al.* 2008). Le biofilm basal est plus résistant au détachement et reste biologiquement actif. Cette observation a été faite dans différentes conditions hydrodynamiques, de source de carbone, d'accepteur d'électron, de CVA ou de durée de culture.

Dans notre étude, après 15 jours de fonctionnement, la quantité de biofilm superficiel est rarement détectable par la méthode employée. Il faudrait pour cela qu'il représente au moins 1 mg de matière sèche par coupon. Ce n'est pas le cas des biofilms présents sur les PE, PVC, PC, ABS, acier inoxydable et verre.

Ainsi, seul le PP présente 2 compartiments quantifiables du biofilm après 15 jours de fonctionnement du réacteur. L'intérêt de différencier la partie faiblement attachée de celle qui l'est fortement prend son sens lors de l'analyse de ce coupon. La partie faiblement attachée représente plus de 40 % de la masse sèche du biofilm. Cette fraction du biofilm représente-t-elle une part du biofilm en voie de consolidation où se différencie-t-elle en termes de composition? A ce stade rien ne permet de privilégier une de ces hypothèses. Nous y reviendrons lors d'une analyse qualitative plus poussée. Il faut cependant noter que même sans prendre en compte la partie superficielle du biofilm, la quantité fortement attachée à ce support (PP) est largement supérieure à celle que l'on trouve sur les autres matériaux.

### III.2.2.2 Les populations archéennes du biofilm à 15 jours

La PCRq permet la mesure des quantités de bactéries et d'archées de l'échantillon. Les données fournies sont exprimées en nombre de copie d'ADN codant pour l'ARNr 16 S et peuvent être ramenées à la masse de biofilm en fonction de la prise d'essai. La quantité relative d'archées peut être comparée au nombre total de micro-organismes (Archaea + Bacteria) sur les différents matériaux. Le Tableau III-8 présente le récapitulatif des pourcentages d'archées après 15 jours et après 30 jours de colonisation. Il est parfois possible de comparer cette quantité relative entre la partie du biofilm qui est faiblement attachée de celle qui l'est fortement. La méthode employée pour les prélèvements des deux fractions est décrite au début du paragraphe III.2.2.

Tableau III-8 : Proportions d'archées sur les coupons après 15 jours selon la force de l'adhésion (en % copies)

<b>RAR1 (15 jours)</b>			
<b>Adhésion</b>	<b>Fraction 1</b>	<b>Fraction 2</b>	<b>Total</b>
<b>PP</b>	14,8	11,6	12,1
<b>Acier</b>	11,5	6,9	7,7
<b>PE</b>	12,7	6,1	8,8
<b>ABS</b>	20,1	1,8	7,4
<b>PC</b>	15,1	25,90	16,0
<b>PVC</b>	20,7	24,2	22,9
<b>Verre</b>	14,5	13,2	13,5

A la fin de la période d'adaptation, c'est à dire au bout de 15 jours de fonctionnement, les proportions d'archées sont très variables selon les coupons. Elles varient du simple (7,4 % sur le coupon en ABS) au triple (22,9 % pour le PVC). L'ABS, l'acier inoxydable et le PE ne favorisent pas une colonisation préférentielle des archées, les proportions des archées étant plutôt faibles sur les coupons correspondants (7,4 ; 7,7 et 8,8% respectivement). La prédilection des archées pour le PP (12,1 %), le PC (16 %) et le verre (13,5 %) est moyenne. Les résultats de la PCRq exprimés en nombre de copies par g de biofilm ainsi que la proportion d'archées parmi ces copies sont regroupés dans la Figure III-18.

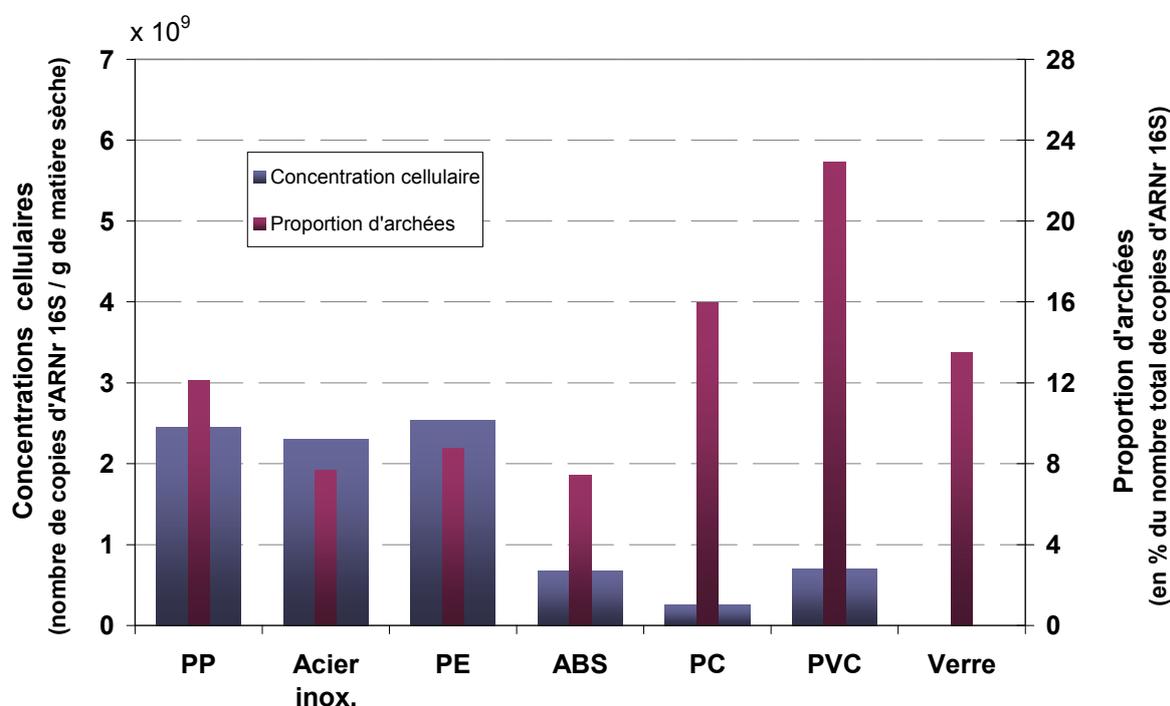


Figure III-18 : Concentration cellulaire et proportion d'archées des biofilms après 15 jours

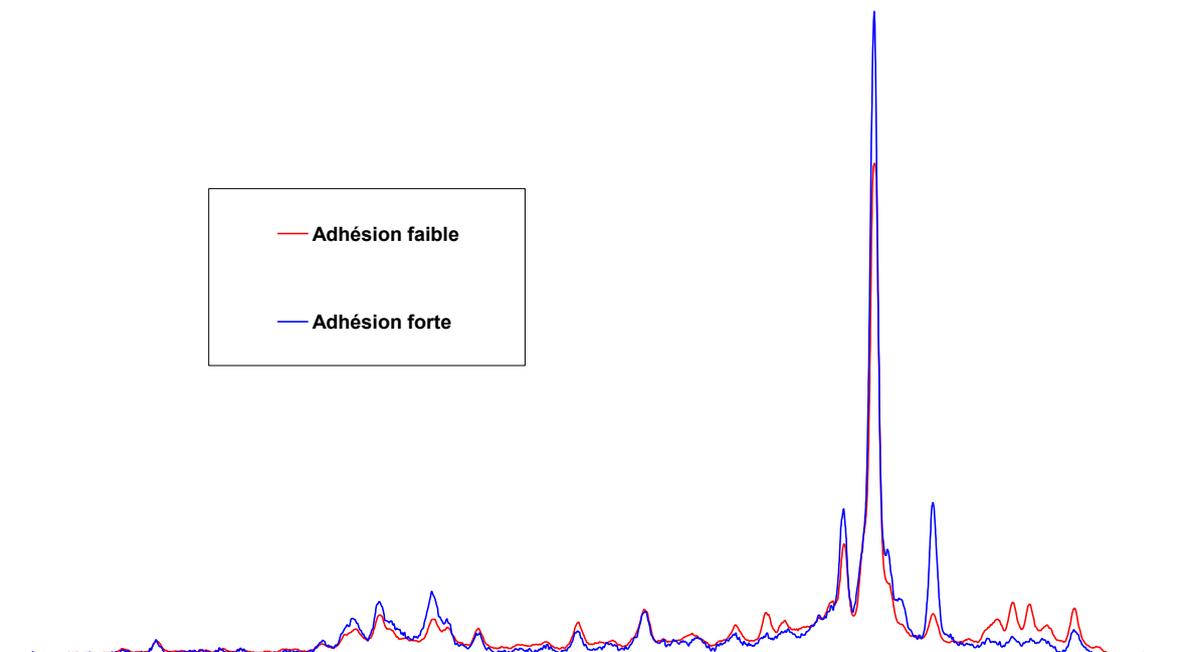
Cette mesure s'apparente plus à la détermination d'une activité cellulaire car le nombre de copies est variable d'une cellule à l'autre. Il est de 1,77 pour les archées et de 4 pour les bactéries (KLAPPENBACH *et al.* 2001). Il s'agit de valeurs moyennes qui peuvent être modifiée en fonction des espèces et de l'état physiologique des cellules.

Ce sont le PVC et le PC qui ont plutôt la faveur de cette catégorie de micro-organismes. C'était déjà le cas lors du test d'adhésion. Après 2 heures de contact, la biomasse cellulaire ayant adhéré sur ces coupons était composée de plus de 30 % d'archées. L'aspect quantitatif des biofilms est lui aussi en adéquation avec les résultats obtenus lors des tests d'adhésion

puisque les supports en PP, PE et acier sont encore ceux sur lesquels les biofilms sont les plus importants.

### *Cas particulier du coupon en PP*

Dans le cas du PP, nous avons souligné dans le paragraphe III.2.2.1 une particularité à ce stade de construction du biofilm. Ce matériau est le seul à présenter une partie importante du biofilm faiblement attachée. Nous avons cherché à comparer les profils de populations de bactéries et d'archées pour chacune de ces fractions (Figure III-19). Chaque pic témoigne de la présence d'au moins une espèce bactérienne et l'aire sous les pics représente l'abondance relative de l'espèce microbienne correspondante. L'alignement des profils permet la comparaison des populations microbiennes présentes.



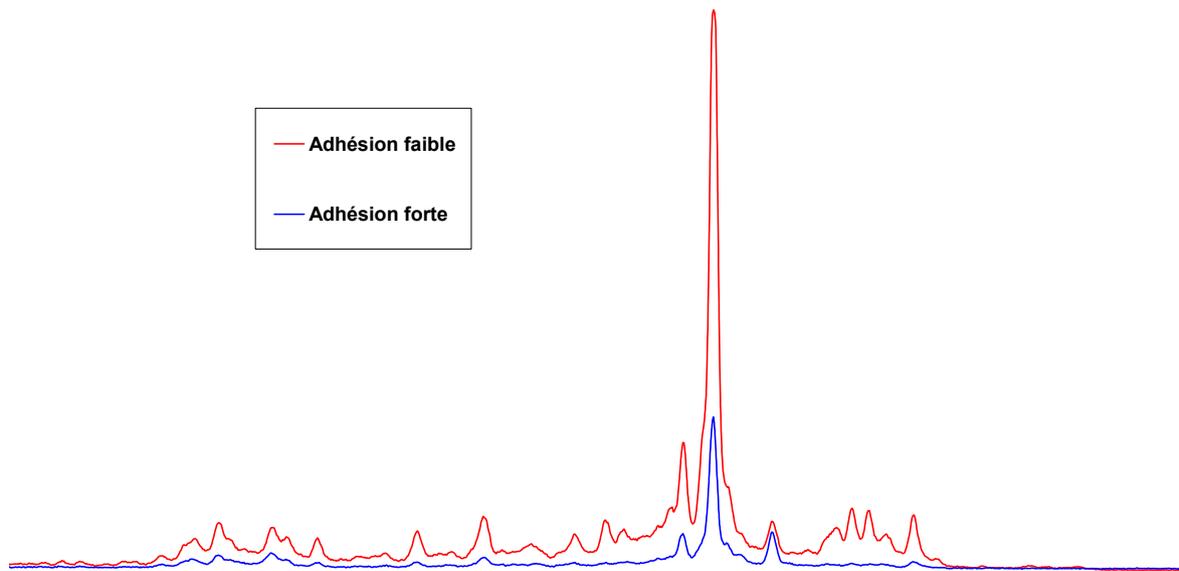


Figure III-19 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries (en haut) et des archées (en bas) formant les deux parties du biofilm sur le coupon en PP après 15 jours

Les profils des bactéries sont très proches. Les profils d'archées présentent une différence dans l'intensité du signal mais sont également assez proches. L'analyse qualitative séparée des deux fractions du biofilm ne montre pas de différence significative. Le taux d'archées dans les deux fractions est proche de 12 %. Les cellules présentes dans ce biofilm sont identiques dans les deux compartiments. La nature des EPS qui représentent l'autre partie du biofilm est donc identique dans chacune des deux fractions qui ne diffèrent que par l'intensité de la force qui leur permet de rester au contact du support. La différence provient sûrement d'une disparité dans la structure de la gangue d'EPS. La partie faiblement attachée est très probablement en voie de consolidation.

### III.2.2.3 Empreinte moléculaire des biofilms à 15 jours

Nous avons procédé de la même manière que précédemment (paragraphe III.2.2.1) afin de récupérer les micro-organismes nécessaires à l'étude qualitative de la colonisation. L'utilisation des techniques utilisées ont été décrites au paragraphe II.7. La CE-SSCP permet d'obtenir, sous la forme de profils électrophorétiques, une empreinte moléculaire de l'échantillon analysé.

Les empreintes moléculaires de l'écosystème présent sur les supports après 15 jours de fonctionnement ou dans l'inoculum sont effectuées. Les Analyses en Composantes Principales (ACP) basées sur les distances euclidiennes entre profils sont présentées dans les figures suivantes. La première est relative aux archées (Figure III-19) et la seconde aux bactéries (Figure III-20).

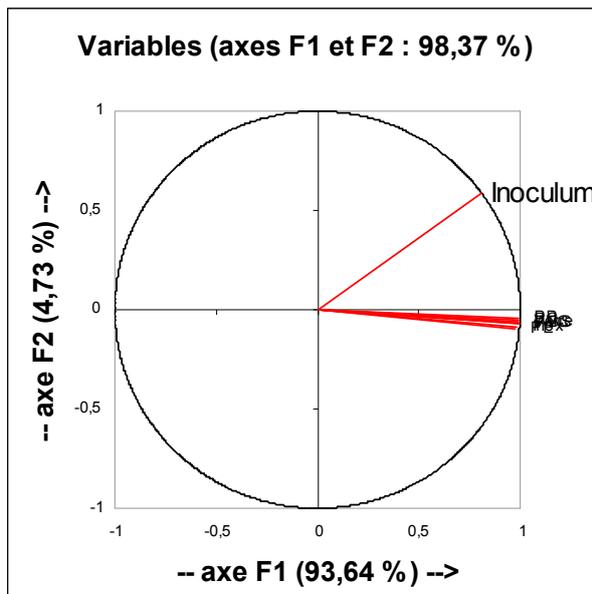


Figure III-20 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées de l'inoculum et fortement attachées après 15 jours

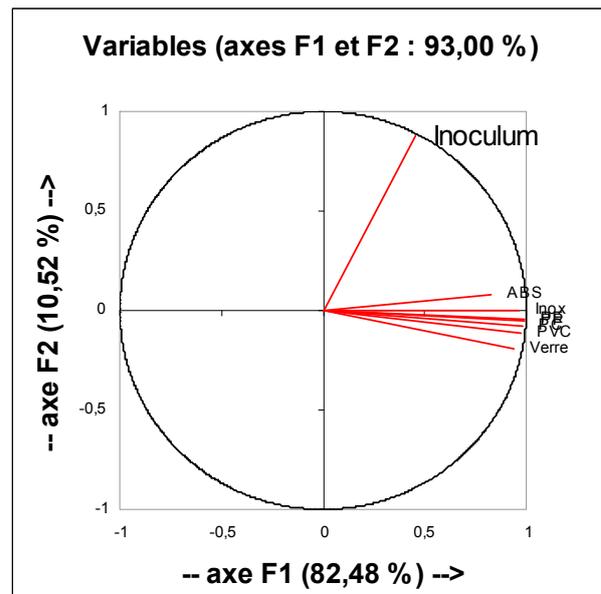


Figure III-21 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries de l'inoculum et fortement attachées près 15 jours

Les distances physiques entre les points sont proportionnelles aux distances génétiques entre profils. Plus de 93% des différences génétiques entre échantillons sont exprimées dans les deux axes principaux. Pour chaque population, les résultats des analyses statistiques mettent en lumière l'importante homogénéité des profils, seul celui correspondant à l'inoculum se détache des autres. A ce stade de la colonisation des coupons, l'aspect qualitatif des populations présentes (archées et bactéries) n'est pas variable en fonction des matériaux.

Afin de corroborer ce résultat, l'analyse (ACP) est aussi effectuée sans les données de l'inoculum (Figure III-22 et Figure III-23). Il est important de noter que les aspects des graphes sont identiques à ceux présentés aux figures précédentes. Les populations microbiennes des biofilms sont plus proches entre elles qu'elles ne le sont de l'inoculum. Ceci est valable à la fois pour les populations bactériennes et pour les archées. Il existe une sélection des micro-organismes responsables de la formation des biofilms.

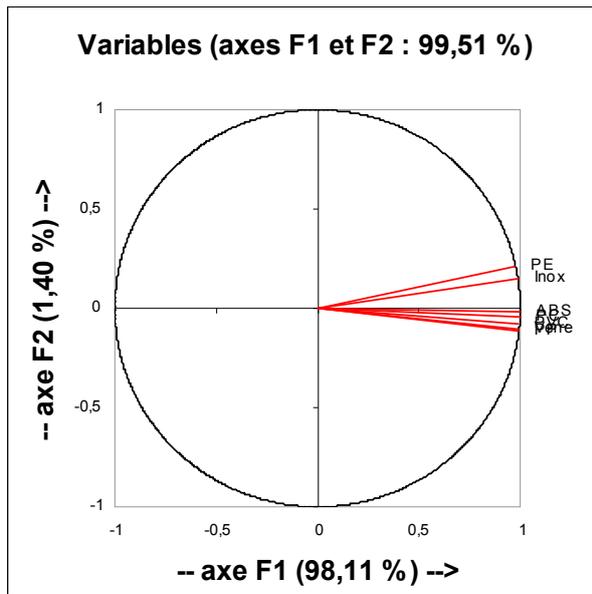


Figure III-22 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées fortement attachées après 15 jours

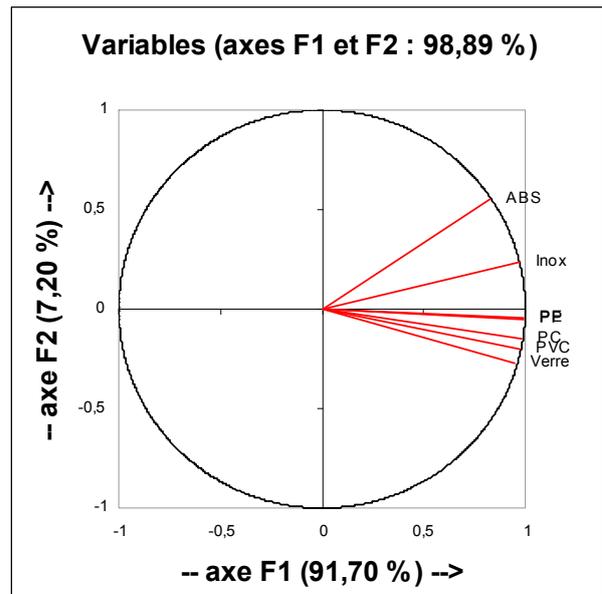


Figure III-23 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries fortement attachées après 15 jours

De la même manière, les figures Figure III-24 et Figure III-25 révèlent que les profils des populations libres au jour 15 sont très proches de ceux des populations attachées.

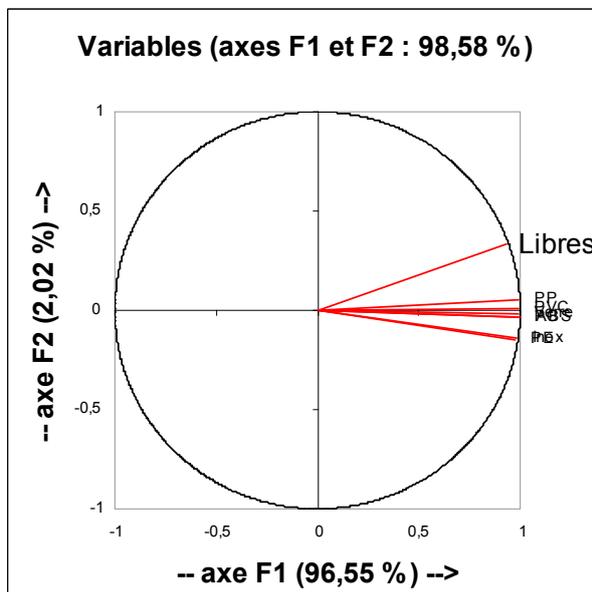


Figure III-24 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées libres et fortement attachées après 15 jours

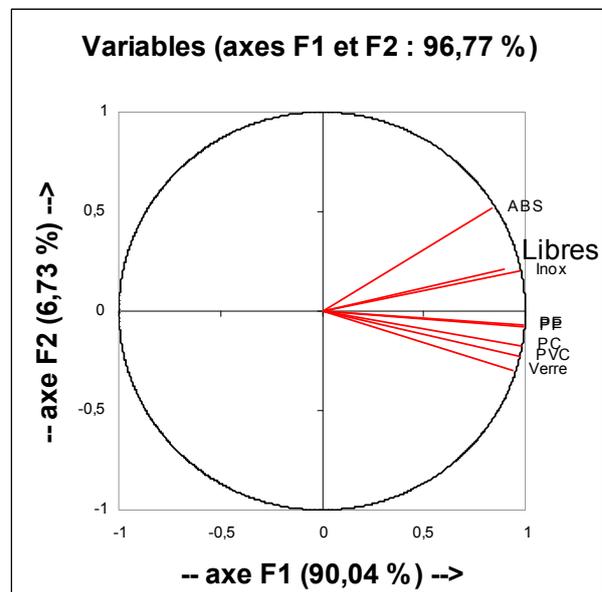


Figure III-25 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries libres et fortement attachées après 15 jours

Le lien entre les populations libres et celles des biofilms est évident. Malgré un TSH court incompatible avec le taux de croissance des archées, les archées sont toujours présentes dans

le milieu liquide. Ces populations sont donc très probablement originaires du biofilm par détachement.

### III.2.3 Etude du biofilm après 30 jours de croissance

Pendant les 15 jours qui ont suivi, le RAR2 a vu sa CVA être augmentée de 1 à 12,2 g DCO.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Durant cette période, 68g de DCO ont été apportés (Figure III-14).

#### III.2.3.1 Quantification des biofilms à 30 jours

Tableau III-9 montre les résultats obtenus lors de la quantification massique des biofilms après 30 jours d'activité.

Tableau III-9 : Quantité de biomasse faiblement (fraction 1) et fortement attachée (fraction 2) sur les coupons après 30 jours de colonisation (en g.m<sup>2</sup>)

<b>RAR2 (30 jours)</b>			
	<b>Fraction 1</b>	<b>Fraction 2</b>	<b>Total</b>
<b>PP</b>	0,91	5,11	6,02
<b>Acier</b>	0,82	2,61	3,43
<b>PE</b>	0,91	4,81	5,72
<b>ABS</b>	0,73	5,77	6,5
<b>PC</b>	1,19	1,19	2,38
<b>PVC</b>	0,62	5,36	5,98
<b>Verre</b>	0	3,52	3,52

Ce n'est qu'après 30 jours de fonctionnement que, sur certains matériaux, des biofilms voient leur taille être multipliée par 6 et atteignent ainsi les mêmes valeurs que celle du PP soit 6,02 g.m<sup>2</sup>. C'est le cas du PE, de l'ABS et du PVC qui atteignent, respectivement, 5,72, 6,5 et 5,98 g.m<sup>2</sup>. Mais ce sont l'acier et surtout le verre qui subissent les plus fortes croissances (x 7,5 pour l'acier et x 38,5 pour le verre). Tandis que les quantités de biofilm sur les coupons en PP ou PC évoluent peu lors des 15 derniers jours (x 2,5), celle du PC stagne à 2,38 g.m<sup>2</sup>. A ce stade de la croissance du biofilm, le compartiment basal que nous avons décrit représente 50 à 100 % de la masse totale du biofilm selon le matériau utilisé comme support. Les outils de biologie moléculaire nous éclaireront davantage par la suite sur l'état de ces biofilms.

Les quantités de biomasse totale attachée sont présentées sur la Figure III-26. La taille des 7 biofilms après 15 jours d'activité du réacteur est très hétérogène. Si la moyenne est proche de  $1 \text{ g.m}^{-2}$ , deux matériaux se détachent du groupe. Il s'agit du verre, sur lequel il n'a pas été possible de déterminer la masse du biofilm ( $<457 \text{ mg.m}^{-2}$ ), et du PP qui en facilite la mise en place et permet d'atteindre  $2,5 \text{ g.m}^{-2}$ .

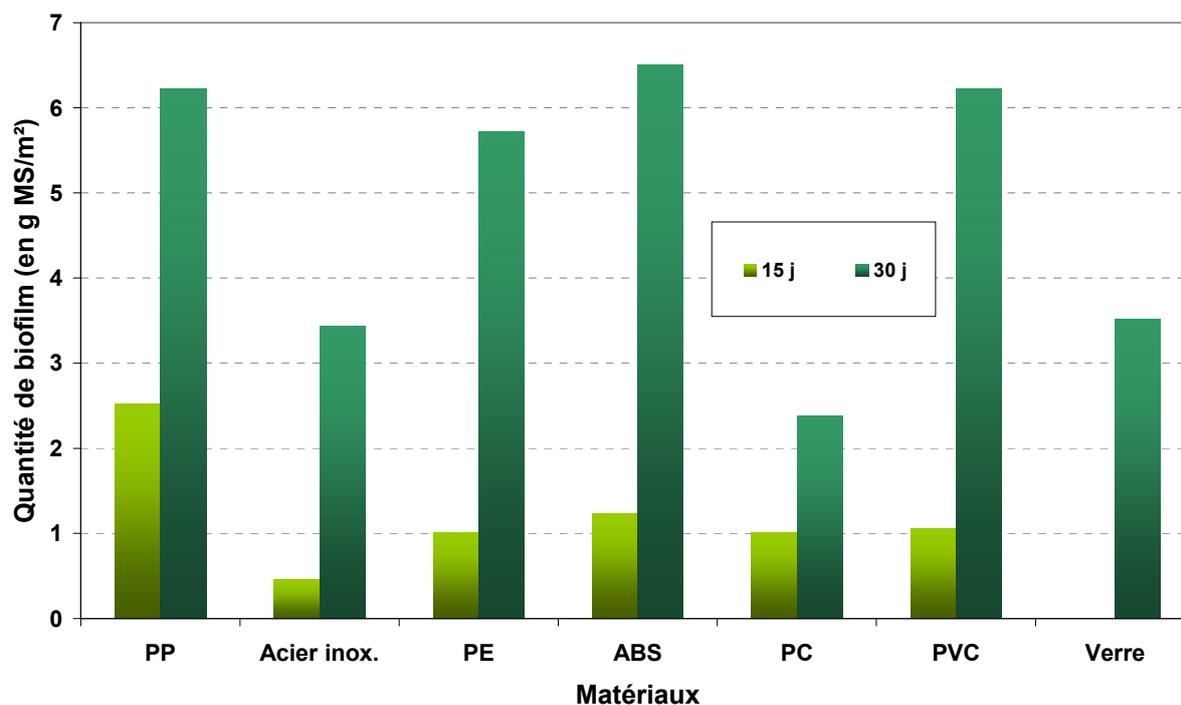


Figure III-26 : Masse de biofilm sur chacun des matériaux après 15 et 30 j d'activité

Une fois le démarrage du réacteur accompli, la quantité de biomasse est beaucoup plus homogène sur les différents coupons, même si des différences notables sont encore observées. L'écart type des valeurs de masse des biofilms diminue et passe de 72 à 35 % de la valeur moyenne. Il est difficile de savoir, à ce moment, si cela est dû à un phénomène biologique ou au biais méthodologique préalablement décrit. Cette tendance à l'uniformisation de la colonisation dépend, elle, d'un équilibre de l'écosystème ou bien du fait que tous les coupons sont présents en même temps dans le réacteur. A l'avenir il faudra répondre à cette question lors d'une analyse qualitative du biofilm. En tous cas, l'information principale de cette expérience est la rapidité de colonisation du coupon en PP.

III.2.3.2 Les populations archéennes à 30 jours

Le Tableau III-10 présente la répartition des archées sur chacun des coupons en distinguant les fractions fortement et faiblement attachées. Les proportions indiquées dans la première partie du tableau sont celles que nous avons analysées au paragraphe III.2.2.2, elles permettent de suivre l'évolution du paramètre pendant les quinze derniers jours.

Tableau III-10 : Proportions d'archées faiblement (fraction 1) et fortement attachée (fraction 2) sur les coupons après 15 et 30 jours (en %)

Adhésion	RAR1 (15 jours)			RAR2 (30 jours)		
	Fraction 1	Fraction 2	Total	Fraction 1	Fraction 2	Total
<b>PP</b>	14,8	11,6	12,1	<b>9,7</b>	<b>34,3</b>	<b>29,4</b>
<b>Acier</b>	11,5	6,9	7,7	<b>13,6</b>	<b>22,5</b>	<b>22,1</b>
<b>PE</b>	12,7	6,1	8,8	<b>8,5</b>	<b>31,4</b>	<b>30,5</b>
<b>ABS</b>	20,1	1,8	7,4	<b>13,1</b>	<b>30,2</b>	<b>29,8</b>
<b>PC</b>	15,1	25,9	16,0	<b>15,1</b>	<b>21</b>	<b>20,9</b>
<b>PVC</b>	20,7	24,2	22,9	<b>19,2</b>	<b>24,4</b>	<b>24,4</b>
<b>Verre</b>	14,5	13,2	13,5	<b>12,8</b>	<b>27,8</b>	<b>27,6</b>

A la fin du démarrage du RAR, c'est à dire 30 jours après l'inoculation, la proportion d'archées dans les biofilms a évolué sur tous les coupons, elle a plus que doublé depuis les prélèvements effectués à 15 jours. De plus, les écarts observés entre coupons lors de cette analyse se resserrent. En effet, si la proportion d'archées était de  $12,6 \% \pm 5,5 \%$  à la fin de la période d'adaptation, elle est de  $26,4 \% \pm 3,9 \%$  après 30 jours de fonctionnement du réacteur. Ainsi, comme le montre la Figure III-27, il devient beaucoup plus difficile de dégager des relations de cause à effet entre les matériaux. La proportion d'archées du biofilm une fois que celui-ci est formé semble s'uniformiser.

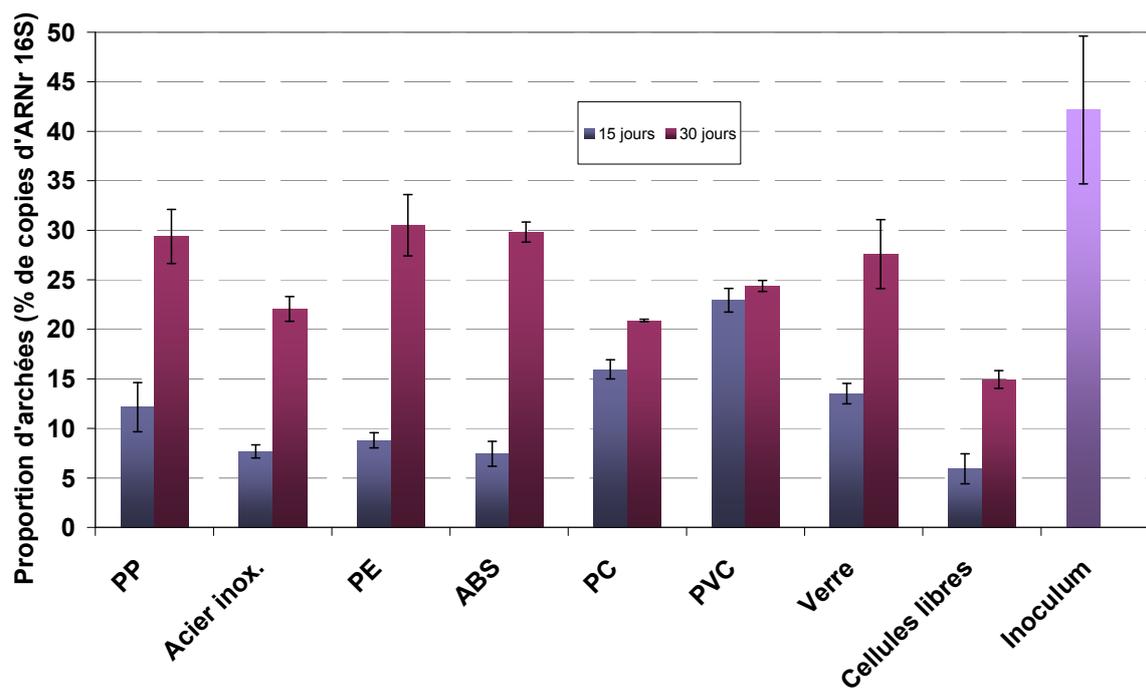


Figure III-27 : Proportion d'archées dans l'inoculum, dans les biofilms et le milieu liquide après 15 et 30 jours de fonctionnement.

Ce ratio est aussi déterminé pour l'inoculum et dans la biomasse libre à 15 et 30 jours. Il était de 42% dans l'inoculum au premier jour de l'étude dans les deux RAR. Cet inoculum possède un taux d'archées beaucoup plus élevé que celui utilisé lors du test d'adhésion (Cf. paragraphe III.1.2). Après 15 jours d'activité, les archées de la biomasse libre ne représentent plus que 6 % des micro-organismes mais ce taux remonte à 15 % au jour 30. Dans la première période, le volume d'alimentation journalière est tel que les micro-organismes qui n'adhèrent pas rapidement sont vite lessivés et la proportion d'archées chute de 42 à 6% dans la phase liquide. Le TSH maintenu empêche la multiplication des cellules possédant un temps de doublement élevé comme les populations archées. La CVA qui est de plus en plus élevée peut expliquer des concentrations de micro-organismes dans la solution plus importantes de jour en jour mais ne justifie pas l'augmentation de leurs proportions. Il existe un lien entre les populations archées fixées et libres que nous pourrions définir plus précisément lors de l'analyse de leur empreinte moléculaire.

Les données obtenues lors de la PCRq couplées aux mesures de biomasse servent à calculer les concentrations cellulaires des biofilms qui sont représentés dans la Figure III-28.

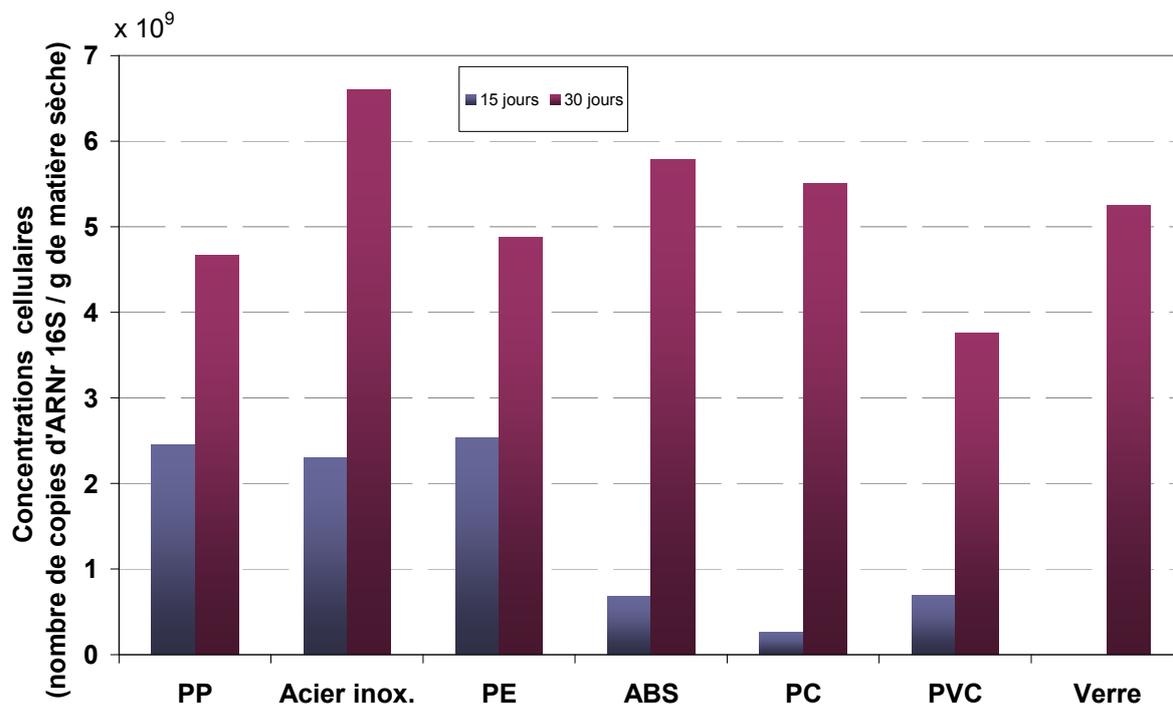


Figure III-28 : Concentration cellulaire dans chacun des biofilms après 15 et 30 jours de fonctionnement.

Nous avons vu dans le paragraphe III.2.2.2 que la richesse des biofilms en cellules microbiennes après 15 jours de fonctionnement est très variable d'un coupon à l'autre. C'est beaucoup moins vrai après 30 jours et la Figure III-28 permet d'effectuer la comparaison. La concentration cellulaire moyenne des biofilms dans le RAR2 est de  $5,2 \cdot 10^9 \pm 0,9 \cdot 10^9$  copies par g de biomasse. Ici aussi l'évolution des biofilms tend vers une homogénéisation puisque l'écart type, qui était de 70% au quinzième jour, n'est plus que de 17% au trentième.

### III.2.3.3 Empreinte moléculaire des biofilms à 30 jours

Les analyses en CE-SSCP sont effectuées sur les supports après 30 jours de fonctionnement. Les empreintes moléculaires de l'écosystème présent et de l'inoculum subissent des Analyses en Composantes Principales (ACP) qui sont présentées dans les figures suivantes. La première est relative aux archées (Figure III-29) et la seconde aux bactéries (Figure III-30).

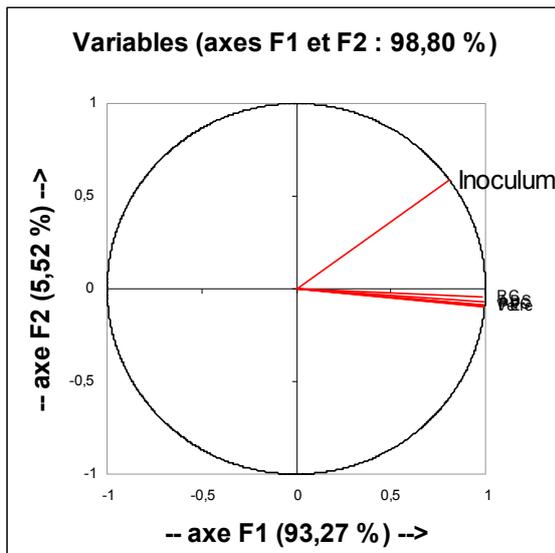


Figure III-29 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées fortement attachées après 30 jours et de l'inoculum

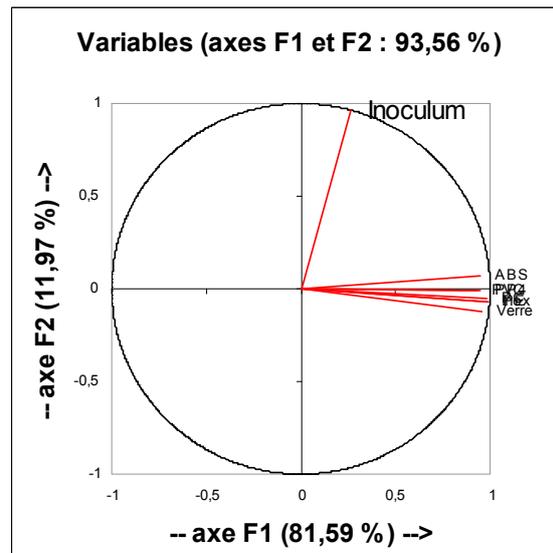


Figure III-30 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries fortement attachées après 30 jours et de l'inoculum

L'observation de ces deux figures inspire des conclusions identiques à celles déjà exposées lors de l'analyse du RAR1. Une sélection des populations archéennes et bactériennes est effectuée par les matériaux. Toutes celles de l'inoculum ne se retrouvent pas dans les biofilms.

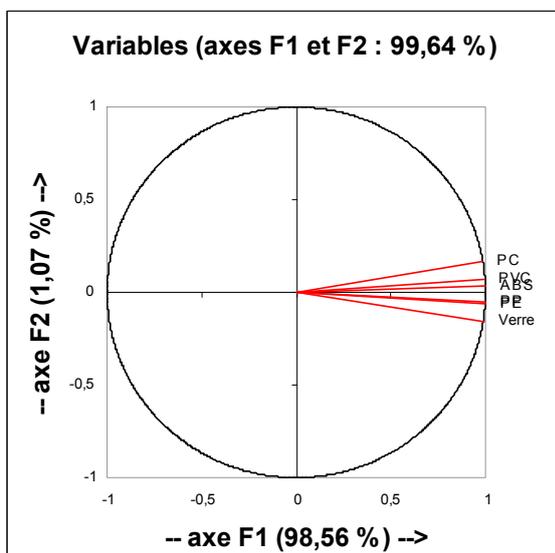


Figure III-31 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées fortement attachées après 30 jours

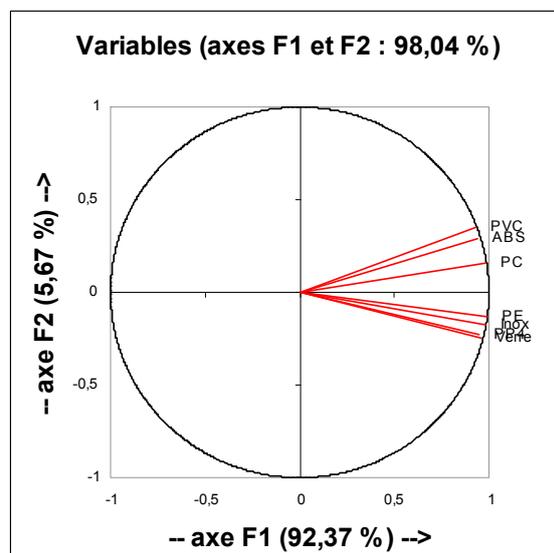


Figure III-32 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries fortement attachées après 30 jours

La Figure III-31 pour les archées et la Figure III-32 pour les bactéries montrent les mêmes résultats en absence des profils liés à l'inoculum, sans conséquences.

Si les profils SSCP des cellules libres sont impliqués dans le calcul des ACP nous obtenons les Figure III-33 et Figure III-34.

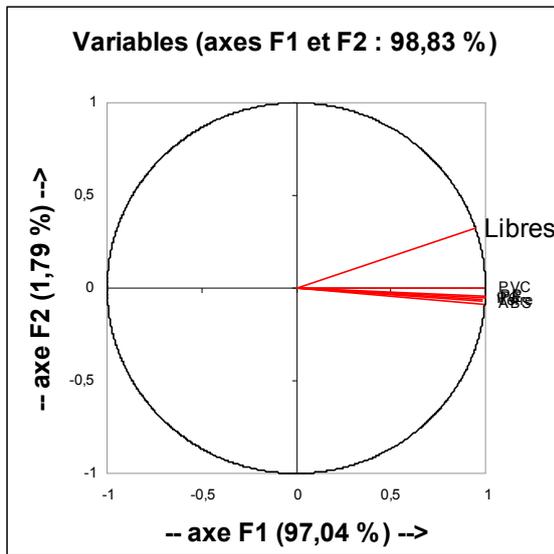


Figure III-33 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des archées libres et fortement attachées après 30 jours

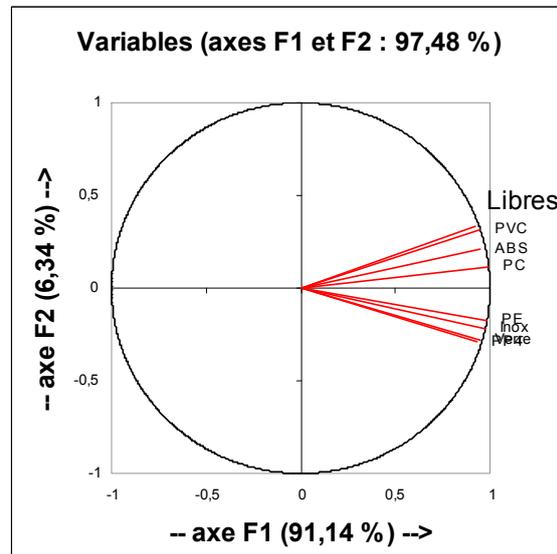


Figure III-34 : Cercle des corrélations des profils CE-SSCP des bactéries libres et fortement attachées après 30 jours

Ici aussi ce sont plus de 93% des différences génétiques entre échantillons qui sont exprimées dans les deux axes principaux, dont plus de 80% sur le premier axe. Les distances physiques entre les points sont proportionnelles aux distances génétiques entre profils. Qu'il s'agisse des archées ou des bactéries, la conclusion est la même après 30 jours de fonctionnement que celle obtenue après 15 j. Les populations qui forment le biofilm sont quasi identiques d'un coupon à l'autre. Les matériaux n'ont, à cette échelle, aucune influence sur l'aspect qualitatif de la mise en place du consortium microbien. Il est à noter que les populations de ces biofilms présentent un profil semblable mais cependant très différent de celui de l'inoculum. Comme à 15 jours, la même ACP réalisée en enlevant les profils de l'inoculum ne permet pas de différencier les profils des biofilms. Ils sont, là aussi, très proches de ceux des cellules libres.

### III.2.4 Discussion sur la mise en place des biofilms

La période de mise en place de nos biofilms matures, c'est-à-dire 30 jours de démarrage, se caractérise par une évolution différente en fonction des matériaux du support. La Figure III-35 présente, pour chaque support, la taille du biofilm (à gauche) ainsi que sa composition cellulaire en terme de copies d'ARN 16S archéens et bactériens (à droite) et ce pour les deux compartiments : basal et superficiel. Cet état des biofilms est celui qui apparaît au 15<sup>ème</sup> jour de l'étude.

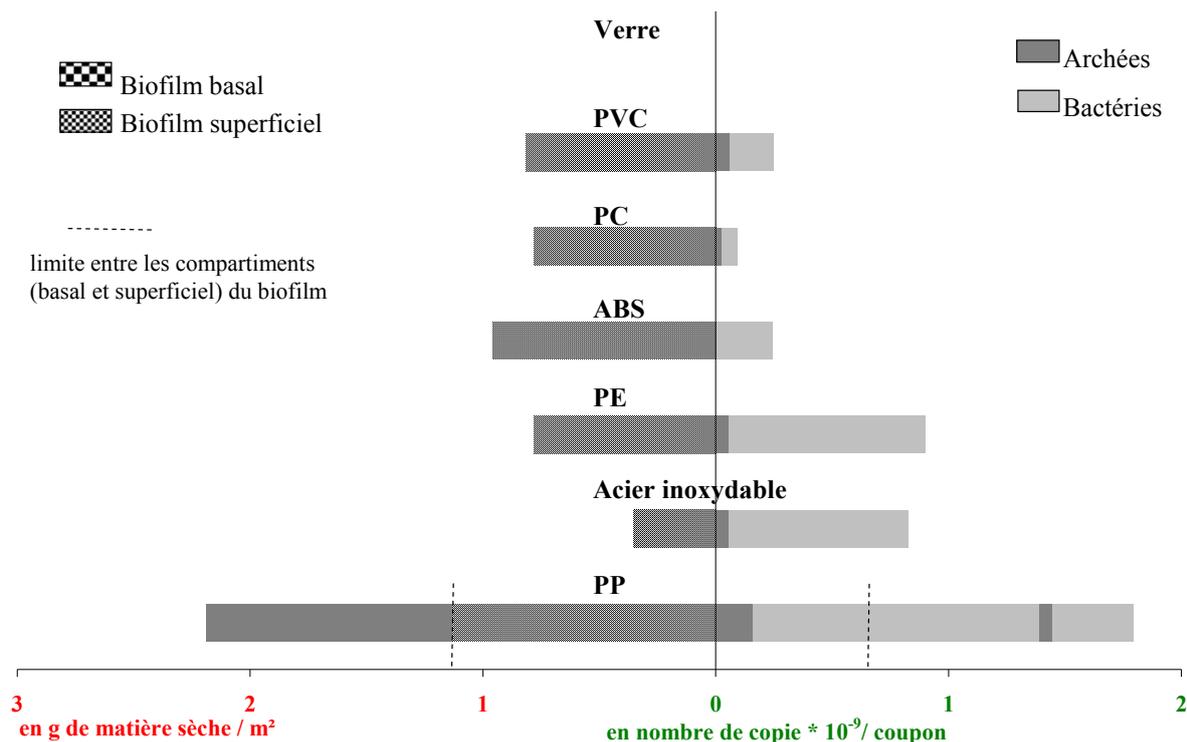


Figure III-35 : Masse des biofilms et quantité de cellules sur les coupons après 15 jours en fonction de la force de l'adhésion

En fonction des matériaux, la présence de biofilm est variable. Les coupons en verre et en acier n'en facilitent pas la croissance. Sur les autres coupons, la quantité est relativement homogène mais ces biofilms se différencient par leur composition. L'analyse du nombre de copies d'ARN 16S dans les deux compartiments des biofilms révèle de très grandes disparités :

- Le biofilm basal du coupon en PP est très riche en cellules ( $8,89.10^7$  copies d'ARN16S) mais la proportion d'archées y est faible (11,6 %). Le coupon en PE présente un biofilm basal riche en cellule ( $3,96.10^7$  copies d'ARN16S) mais très pauvre en archées (6,11 %). ABS, acier inoxydable et PVC portent un biofilm basal comportant un nombre équivalent de cellules ( $1,36 \pm 0,26.10^7$  copies d'ARN16S) mais leur proportion en archées est très variable : 1,81 ; 6,95 et 24,21 % respectivement. Il reste cependant possible de les différencier en fonction de la quantité d'archées qu'ils contiennent.

- Tous les coupons ne permettent pas la mise en place du même biofilm. Les différences observées le sont tout autant en terme de quantité totale de biofilm (cellules + EPS) qu'en terme de quantité de cellules. Tous ont une organisation particulière des cellules au sein du biofilm. Les proportions des populations archéennes parmi les populations globales du biofilm sont très variables.

L'impact des supports sur la mise en place du biofilm peut être analysé de deux manières. En termes de biomasse globale, deux matériaux se détachent dès la fin de la période d'adaptation en fonction de la quantité de biofilm : le coupon en PP par une quantité bien supérieure à la moyenne et le verre par une quantité très inférieure. D'un autre côté, l'analyse de la proportion des deux communautés principales dans la biomasse attachée est, elle aussi, très variable selon les coupons à ce stade. Le résultat de cette analyse montre une colonisation préférentielle des archées sur le PVC et sur le PC. Ainsi, malgré la faible quantité de biofilm créé sur le PVC après 15 jours de fonctionnement, le biofilm contient une proportion élevée d'archées parmi les cellules totales.

Les résultats obtenus dans la première partie de notre travail (paragraphe III.1.2) laissaient-ils présager une telle évolution ? Ce n'est pas évident au premier abord. Nous nous souvenons que le coupon en PP était celui sur lequel le taux de recouvrement était le plus important après 2 heures de contact. Après 15 jours de fonctionnement du réacteur, c'est toujours le coupon qui offre le biofilm le plus important. La valeur de recouvrement sur l'acier inoxydable était très proche de celle du PP, la quantité de biomasse par contre est une des plus faibles après colonisation. Sur les coupons de PE, PC et ABS l'adhésion initiale était moyenne, il en va de même pour la colonisation à 15 jours. Les résultats obtenus sur le verre confirment que ce n'est pas un matériau adapté à notre utilisation. Le PVC est le matériau sur lequel la biomasse adhère le moins. Néanmoins, il partage une particularité avec un autre coupon : le PC. Cette originalité réside dans le taux élevé d'archées dès les premiers instants du contact. Dans les

deux cas, ce taux élevé d'archées perdure après 15 jours tandis que la masse globale de biofilm à ce stade rejoint la moyenne des autres matériaux.

A la question initiale, qui est de savoir si les matériaux ont un impact sur l'adhésion des micro-organismes de la digestion anaérobie, nous avons répondu par l'affirmative en intégrant l'aspect sélectif de certains matériaux pour les archées. A celle de savoir si cet impact est toujours visible lors de la mise en place du biofilm, il est plus difficile de répondre de manière catégorique. Cependant, deux cas de figure sont très parlants. Le premier concerne le PP qui offre toujours, après deux heures ou après 15 jours, la plus grande quantité de biomasse sur le coupon avec à chaque fois une proportion d'archées plutôt faible. Le second cas intéressant est celui du PVC. La quantité de biomasse est médiocre après deux heures de contact et moyenne au bout de 15 jours et dans les deux cas les archées sont très présentes. Cela donne à penser que la quantité d'archées présente lors des premiers instants de contact détermine le développement du biofilm de notre consortium. C'est sans compter sur les données relatives au coupon d'acier pour lequel l'adhésion est quasiment aussi élevée que dans le cas du PP avec une proportion d'archées plus importante. Un biofilm conséquent est donc attendu, en vain. De la même manière, le PC facilitait l'adhésion des archées avec un pourcentage équivalent à celui du PVC (31,9 % et 30,9 %) et son taux de recouvrement était bien supérieur : 0,68 % contre 0,19 pour le PVC. Pourtant, le biofilm obtenu n'est pas plus massif après 15 jours de fonctionnement du réacteur.

Un autre paramètre entre en jeu et permet une organisation différente de chacun des biofilms en fonction du matériau-support. La cohésion du biofilm au travers de la nature des EPS, le phénomène de décrochement du biofilm restent des hypothèses.

La structure du biofilm dépend d'une grande variété de paramètres intrinsèques ou extrinsèques comme les espèces mises en jeu et du milieu ambiant (Mc LANDSBOROUGH *et al.* 2006). Dans notre expérience, tout est réuni pour offrir les mêmes conditions environnementales à tous les biofilms. De plus, l'analyse moléculaire montre que les espèces présentes ne varient pas d'un biofilm à l'autre. Difficile dès lors de croire à l'existence de biofilms qualitativement distincts.

Au bout de 30 jours, à la fin de la phase de démarrage, les résultats quantitatifs et qualitatifs sont différents. Le même type de graphe que précédemment est présenté sur la Figure III-36 qui permet la visualisation du biofilm après 30 jours de fonctionnement.

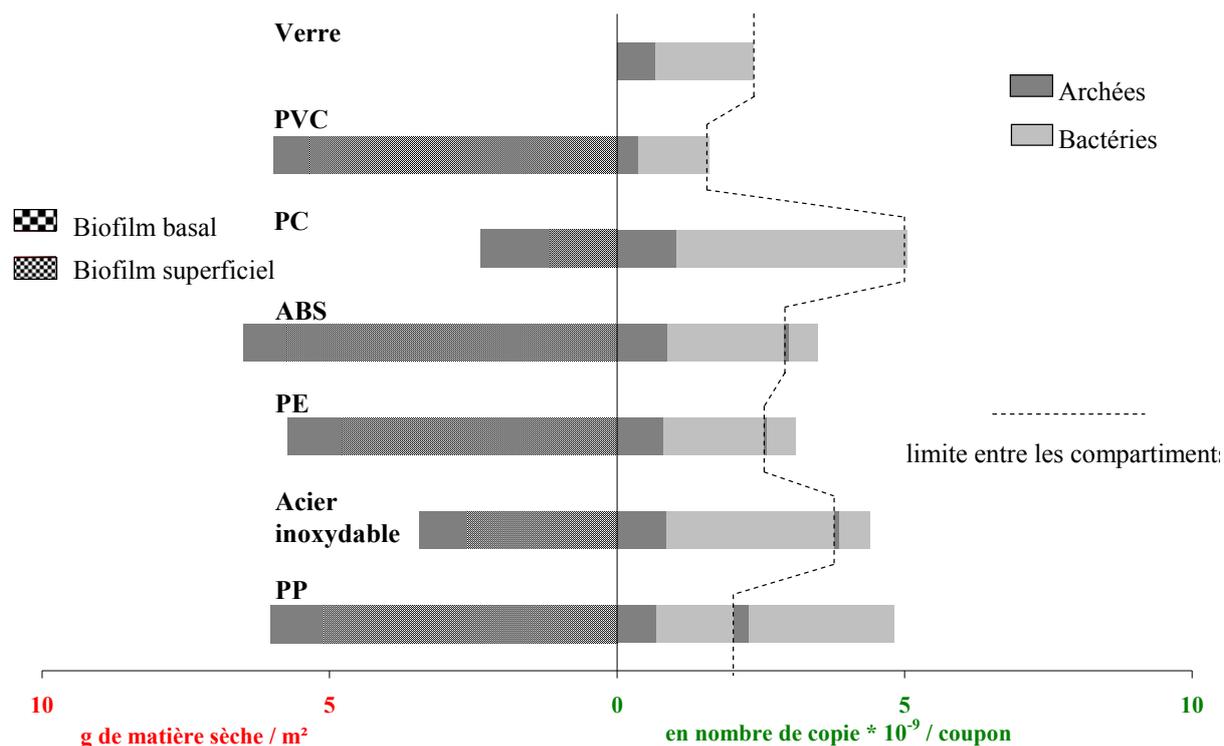


Figure III-36 : Masse des biofilms et quantité de cellules sur les coupons après 30 jours en fonction de la force de l'adhésion

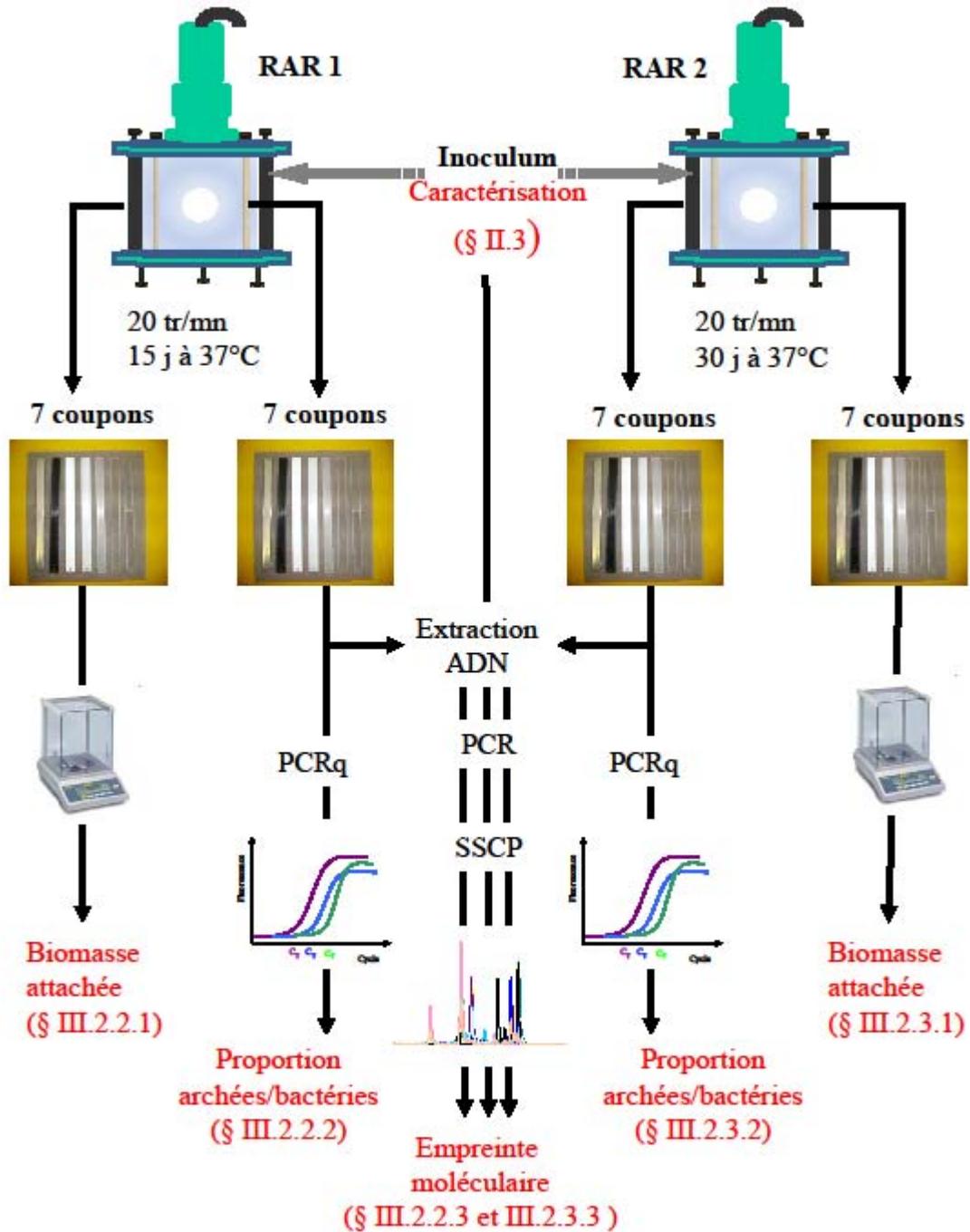
De manière générale, à ce stade de leur évolution, les biofilms sont caractérisés par l'apparition d'une partie superficielle. Ce compartiment, faiblement attaché, ne représente qu'une petite partie de la totalité du biofilm et se distingue par une plus faible proportion d'archées. L'ensemble des résultats s'homogénéise. Ainsi, la croissance des micro-organismes tend vers la création d'une même quantité de biofilm dont la proportion en archées est plus uniforme. La croissance de ce biofilm n'est pas forcément due qu'à la croissance microbienne. La construction de la matrice de polymères, même si elle est liée à la multiplication des cellules, joue aussi un rôle. Ainsi les biofilms obtenus peuvent se différencier en fonction de leur concentration en cellules. De plus notre expérience n'apporte pas de données liées à une sélection ou une organisation spatiale des groupes. Cette homogénéisation peut avoir plusieurs origines. Celle liée substrat en est une. Dans le paragraphe I.2.1.1.1 nous avons vu que la dégradation de la matière organique en méthane et dioxyde de carbone requiert l'activité combinée de plusieurs groupes de micro-organismes. Des observations effectuées sur des granules issues de réacteurs UASB montrent une organisation spatiale des groupes trophiques sous forme de couches successives. Les auteurs concluent à un effet des substrats complexes (composés de macromolécules organiques

nécessitant une phase d'hydrolyse importante et limitante) lors de l'alimentation du procédé (BATSTONE *et al.* 2004). Alors que si l'éthanol est le principal substrat carboné, ses propriétés de biodégradabilité, d'encombrement stérique et d'hydrophilie lui permettent de bien diffuser dans le biofilm (CRESSON *et al.* 2009). L'arrangement spatial des populations d'archées et de bactéries au sein du biofilm semble donc dicté par la nature du substrat. Dans notre cas, la source de carbone des micro-organismes est principalement l'éthanol du vin. L'alimentation des réacteurs ne possède pas de caractéristiques impliquant une mise en place particulière de la chaîne trophique de la digestion anaérobie.

Le biofilm est sans doute homogène en terme de distribution spatiale des microorganismes. Les conditions environnementales sont aussi susceptibles de modifier la création du biofilm en terme de quantité. L'épaisseur du biofilm peut être directement liée aux conditions hydrodynamiques, il en va de même pour son activité (CRESSON *et al.* 2007). Un aspect qui ne doit pas être négligé est celui du biais lié à la mise en place du test. Les différences dans les biofilms observés après 15 jours de fonctionnement disparaissent peut être à cause de la proximité des coupons. Aurions-nous obtenu les mêmes résultats en utilisant des réacteurs séparés ? Les populations qui colonisent plus rapidement un coupon sont peut-être sources d'ensemencement continu pour les autres coupons, aboutissant à terme à un biofilm homogène quel que soit le support.

Nous avons vu dans le paragraphe III.1.2 que les substrats testés en fonction de l'adhésion de ces mêmes micro-organismes peuvent être différenciés et que l'affinité d'une partie de la population microbienne (les archées par exemple) pour ces matériaux peut aussi être contrastée. Nous avons poursuivi par l'étude de la colonisation de ces matériaux afin de dévoiler un lien susceptible d'exister entre adhésion et colonisation. Il semblerait que ce lien existe mais il est difficile d'en déterminer la nature. Il ne perdure pas dans les conditions expérimentales appliquées ici. C'est-à-dire l'installation simultanée de tous les coupons dans le même réacteur. D'autres tests vont être abordés dans la suite du manuscrit afin de se s'affranchir de ce biais.

*Schéma synoptique de l'étude de la colonisation*



### *Synthèse de l'étude de la colonisation*

L'adhésion des micro-organismes de la digestion anaérobie sur les surfaces des matériaux-supports constitue une première étape dans le processus de formation du biofilm. Certains matériaux favorisent l'adhésion globale des micro-organismes de la digestion anaérobie (PP, acier inoxydable, PE), d'autres sont plus sélectifs envers les archées (PVC, PC). A ce stade, la formation du biofilm est à peine amorcée. Sa mise en place ne s'arrête pas là. Jusqu'à l'obtention d'un biofilm mature rien ne permet de prédire que les différences observées vont subsister une fois le biofilm installé.

Nous avons en partie répondu à cette question grâce à la mise en place de deux réacteurs annulaires rotatifs « jumeaux » afin d'estimer l'état du biofilm à différents stades de sa formation. Chacun des réacteurs est équipé de coupons des 7 matériaux utilisés dans l'étude de l'adhésion. Le premier réacteur est utilisé pour apprécier l'état du biofilm à la fin de la période d'adaptation après 15 jours de fonctionnement tandis que le second permet l'évaluation du biofilm plus mature. La période d'adaptation est relative à la durée nécessaire à l'obtention de l'équilibre de la chaîne trophique. Cet équilibre est évalué à l'échelle macroscopique sur les paramètres de fonctionnement des réacteurs, il est considéré comme atteint lorsque les concentrations en AGV sont décroissantes et le taux d'élimination du substrat organique redevenu supérieur à 80%. Une augmentation de la CVA est alors possible sans perturber le procédé. A ce stade, 15 jours après l'inoculation, le biofilm le plus important s'est accumulé sur le coupon en PP. C'est déjà sur ce matériau que l'adhésion était la plus forte après 2 heures de contact. L'idée selon laquelle la proportion d'archées est un paramètre important se confirme avec les résultats obtenus sur le PVC. Malgré un recouvrement initial faible, la quantité de biofilm formé après 15 jours est équivalente à celles obtenues sur les autres coupons.

La deuxième période commence dès que l'équilibre de la chaîne trophique est acquis et se termine lorsque la charge nominale préalablement déterminée est atteinte. A ce stade de croissance, les biofilms sont beaucoup plus homogènes entre les matériaux, tant quantitativement qu'en terme de proportion d'archées.

Lors de l'adhésion puis de la colonisation des micro-organismes, les matériaux jouent clairement un rôle mais il ne perdure pas toujours. Il est supposé que dans les conditions expérimentales appliquées la formation des biofilms est biaisée par l'installation simultanée de l'ensemble des coupons dans le même réacteur.

### **III.3 ETUDE DU DEMARRAGE D'UN REACTEUR A LIT FIXE.**

Nous avons vu dans les études précédentes que les matériaux utilisés comme support microbien jouent clairement un rôle dans l'adhésion des micro-organismes responsables de la digestion anaérobie (paragraphe III.1.1). Lors de la colonisation de ces mêmes supports (étudiée dans le paragraphe III.2), les biofilms qui se mettent en place sur les matériaux sont différents tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Cette variabilité est la preuve que l'effet du support est toujours visible après 15 jours de contact. Cependant, cet effet ne perdure pas au 30<sup>ème</sup> jour de fonctionnement du réacteur dans les conditions expérimentales mises en œuvre. L'existence d'un biais expérimental lié à l'installation simultanée de l'ensemble des coupons dans le même réacteur en est peut-être la cause. Afin de se s'en affranchir, d'autres tests mettant en œuvre des matériaux différents dans des réacteurs distincts vont être abordés dans cette partie du manuscrit.

Les premières phases de l'étude (paragraphe III.1.2 et III.2) ont été menées dans un réacteur annulaire rotatif. Il a permis de mesurer l'impact du matériau de support microbien sur la mise en place d'un biofilm anaérobie. L'existence d'un effet matériau-dépendant a été montrée en lien avec l'énergie de surface et l'idée selon laquelle la proportion d'archées est un paramètre important est confirmée.

L'intérêt de cette dernière phase expérimentale est de valider l'existence des liens établis entre les supports et les micro-organismes. Le biais suspecté de fausser les résultats obtenus après 30 jours d'utilisation du RAR est éliminé afin de relier ces conclusions aux performances épuratoires d'un réacteur de traitement. Afin de mener à bien cette dernière étude, nous avons choisi d'utiliser un réacteur à lit fixe (LF). Il devient l'objet de l'étude et la mise en place d'un biofilm est utilisée pour tester le procédé. Le but du travail est de relier l'impact des matériaux du support aux performances épuratoires afin de répondre à la question : « Les différences de colonisation observées sont-elles de nature à modifier le démarrage des réacteurs intensifs de méthanisation ? »

Quatre supports ont été utilisés. Tous sont fabriqués sur le même modèle, celui du Bioflow 30® (Bf30) présenté dans la Figure II-7. Le Bioflow 30® est un support en PE commercialisé par la société Raushert pour les stations aérobies à moyenne charge. Les autres supports sont fabriqués en polyéthylène (PE), en polypropylène (PP) et en chlorure de polyvinyle (PVC). Le suivi simultané de quatre réacteurs n'étant pas envisageable, nous avons analysé l'influence des supports sur la mise en place d'un biofilm anaérobie en plusieurs étapes.

Les supports sont testés deux par deux lors de quatre études comparatives :

- Comparatif 1 : support en PE et support en PP (C1)
- Comparatif 2 : support en PVC et support Bf30 (C2)
- Comparatif 3 : support en PVC et support en PP (C3)
- Comparatif 4 : support en PE et support Bf30 (C4)

Après la description du comportement de chacun des réacteurs lors de son démarrage, les performances épuratoires seront détaillées. Les aspects quantitatif et qualitatif seront abordés afin de décrire l'évolution de la colonisation des supports.

### **III.3.1 Données générales sur les réacteurs à lits fixes**

Nous savons que la qualité du démarrage est fortement dépendante de plusieurs paramètres. Ainsi, les conditions environnementales appliquées ont été choisies afin d'obtenir la meilleure croissance microbienne possible. Le pH est maintenu à 6,8 et la température à 37°C. Le potentiel redox ainsi que la luminosité sont contrôlés. L'alimentation, quelle que soit sa concentration en source de carbone, respecte un rapport DCO/N/P de 400/7/1 et elle est complémentée en nutriments. L'inoculum utilisé est actif et acclimaté à l'effluent à traiter. Sa concentration est proche de 1 gMVES.L<sup>-1</sup> et son activité de 0,65 gDCO éliminée.gMVES<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> (Cf. paragraphe II.3).

La stratégie de démarrage choisie se caractérise par un temps de séjour hydraulique (TSH) fixe et court (inférieur à 24h) et par une charge volumique appliquée (CVA) augmentée de façon exponentielle. Ainsi, les variations de la CVA dépendent uniquement des changements de concentration de l'alimentation, puisque le volume de l'effluent est sensiblement constant. La CVA, exprimée en kg de DCOs.m<sup>-3</sup> de réacteur.j<sup>-1</sup>, est rapportée au volume utile du digesteur.

Le dispositif mis en place doit nous permettre d'apprécier les performances du réacteur avec le support utilisé. Afin de les mesurer, des prélèvements ponctuels ont été effectués sur l'effluent avant et après traitement. Lors de ces expériences, certaines variables nous informent du déroulement de l'activité biologique au sein des procédés. Les cinétiques de l'évolution des concentrations en AGV, en DCOs et en MES sont donc établies.

N.B. : Les résultats des suivis des huit réacteurs vont être décrits dans les paragraphes suivants mais les représentations graphiques des cinétiques n'apparaîtront pas afin de ne pas surcharger le manuscrit. Le lecteur peut y avoir accès en annexe de ce rapport.

### III.3.2 Caractérisation des matériaux

La rugosité et l'énergie de surface ont été mesurées pour les quatre supports utilisés pendant les expériences en réacteur à lit fixe, comme précédemment pour les coupons utilisés dans le RAR. Les descriptions sont présentées et analysées dans la première partie de ce paragraphe.

#### III.3.2.1 Mesure de la rugosité

Les modules utilisés dans le LF ont été spécialement conçus pour cette étude. Ils sont produits par moulage. Le Tableau III-11 montre les 5 paramètres de rugosité caractérisant la morphologie de surface de chaque support utilisé dans le LF. Les moyennes et déviations standard obtenues lors de 9 mesures sont indiquées.

Tableau III-11 : Paramètres de rugosité des supports du LF (moyenne et déviation standard).

Support	Paramètres de rugosité ( $\mu\text{m}$ )				
	Ra	Rz	Rmax	Rpk	Rvk
<b>PP 2</b>	1,40 $\pm$ 0,20	7,78 $\pm$ 0,49	12,4 $\pm$ 2,62	4,70 $\pm$ 0,54	2,52 $\pm$ 0,94
<b>PE 2</b>	1,39 $\pm$ 0,04	7,04 $\pm$ 0,50	13,2 $\pm$ 1,25	4,16 $\pm$ 0,44	2,03 $\pm$ 0,52
<b>PVC 2</b>	1,68 $\pm$ 0,54	8,66 $\pm$ 2,52	12,1 $\pm$ 4,39	3,54 $\pm$ 1,62	1,82 $\pm$ 1,03
<b>Bioflow 30®</b>	0,35 $\pm$ 0,03	2,10 $\pm$ 0,11	3,28 $\pm$ 0,26	0,42 $\pm$ 0,03	0,84 $\pm$ 0,19

Ra: Moyenne arithmétique des valeurs du profil. Rz: Moyenne arithmétique des valeurs individuelles Rzi sur l'ensemble des  $i$  longueurs de base consécutives considérées. Rzi : somme de la plus grande des hauteurs de pic et de la plus grande des profondeurs de creux du profil d'une longueur de base. Rmax: distance entre le pic le plus haut et le creux le plus bas des 5 sections mentionnées dans la définition de Rz. Rpk : hauteur moyenne des pics dépassant la partie centrale du profil. Rvk : profondeur moyenne des creux dépassant la partie centrale du profil.

Ce tableau, qui répertorie les paramètres de rugosité des modules utilisés comme supports, met en évidence la différence entre le Bioflow 30® et les 3 autres supports. L'ensemble des valeurs des 5 paramètres sont homogènes pour les 3 supports fabriqués à notre demande (PP2, PE2 et PVC2). La rugosité moyenne (Ra) est proche de 1,5  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0,16  $\mu\text{m}$ ), tandis que la rugosité maximale (Rmax) varie autour de 12,5  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0,57  $\mu\text{m}$ ). Les mêmes valeurs mesurées sur le Bioflow 30® sont près de 4 fois moins élevées.

La Figure III-37 compare les caractéristiques de rugosité des supports du LF avec celles des matériaux des coupons utilisés précédemment.

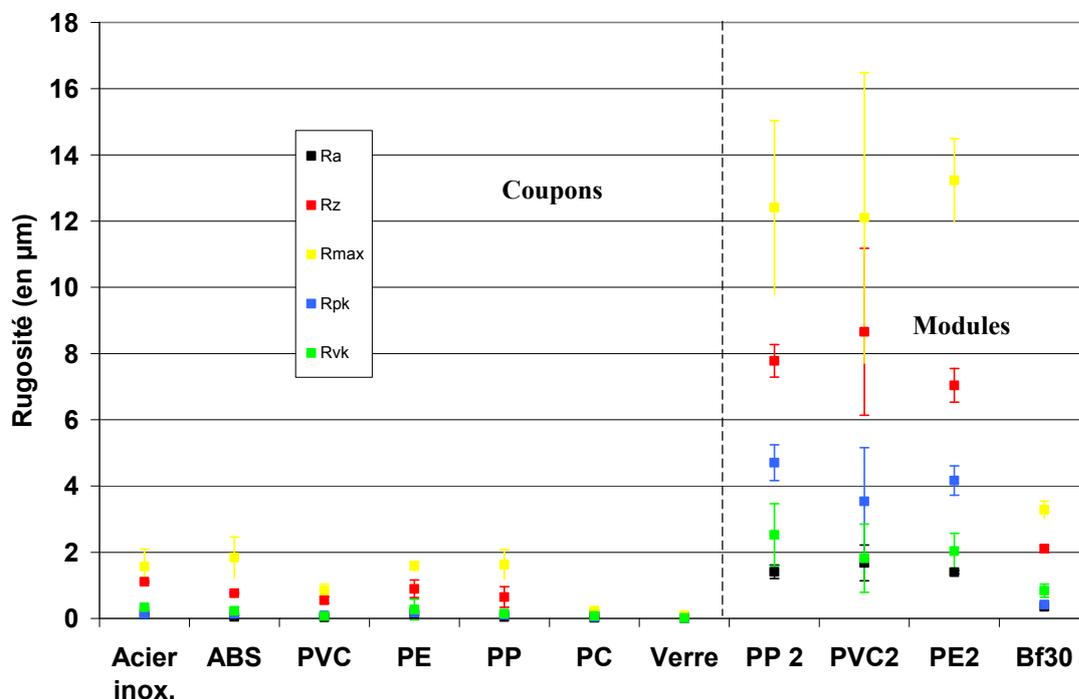


Figure III-37 : Valeurs des paramètres de rugosité des supports utilisés

Ce graphe montre les différences flagrantes entre les supports en termes de rugosité. Si la gamme de l'ensemble des paramètres est faible pour les coupons introduits dans le RAR elle est élargie avec ceux des supports utilisés dans le LF. Les écarts types des valeurs mesurées sont aussi caractéristiques du type de support. Tous les écarts types relatifs aux paramètres de rugosités des coupons du RAR sont faibles tandis que ceux liés aux supports fabriqués pour nos expériences sont beaucoup plus élevés. Le Bioflow 30® possède des valeurs intermédiaires. Ces différences de rugosités ne sont pas liées à la nature du support mais bien à sa fabrication.

En effet, tous les plastiques cités (PE, PP, PVC, ABS, PE2, PP2, PVC2 et Bioflow 30®) font partie de la famille des polymères linéaires (ramifiés ou non). Ils y sont regroupés en fonction de leur comportement à la chaleur. Ces thermoplastiques se trouvent à l'état « fondu » (état fluide ou déformable) lorsqu'ils sont portés à une température suffisante, variable selon le polymère. Cette caractéristique les rend susceptibles de s'écouler sous l'action d'une contrainte. Cela permet leur mise en forme au moyen de différentes techniques

(thermoformage, extrusion, injection). Lors de la mise en œuvre par injection, les plastiques amorphes (PVC, PC) sont plus tolérants que les semi-cristallins (PP, PE), ce qui rend leur usinage plus aisé.

Le degré d'homogénéité des supports produits tient à la fois du type d'usinage et de la volonté du fabricant. Les techniques de laminage ou d'extrusion sont plus faciles à mettre en œuvre que celle de moulage. Le soin mis en œuvre lors de la fabrication du moule a aussi son importance. Dans notre cas, le cahier des charges concernant la fabrication des supports en PP2, PE2 et PVC2 n'avait pas la précision de celui du modèle commercialisé par la société Rauschert GmbH (Bioflow 30®).

### III.3.2.2 Mesure de l'énergie de surface

Le Tableau III-2 présente les paramètres d'énergie de surface des quatre matériaux utilisés. Les valeurs des angles de contact sont visibles en annexe A. L'énergie de surface totale ( $\gamma$ ) est la somme de la composante dispersive ( $\gamma_{LW}$ ) et de la composante polaire ( $\gamma_{AB}$ ) qui est elle-même divisée en une composante « donneur d'électron » ( $\gamma^-$ ) et une composante « accepteur d'électron » ( $\gamma^+$ ).

Tableau III-12 : Paramètres d'énergie de surface des supports du LF (moyenne et déviation standard).

Echantillon	Energies de surface ( $\text{mJ m}^{-2}$ )				
	$\gamma$	$\gamma_{LW}$	$\gamma_{AB}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$
<b>PP2</b>	$32,8 \pm 4,3$	$28,5 \pm 2,6$	$4,4 \pm 3,4$	$0,8 \pm 0,7$	$6 \pm 5,8$
<b>PE2</b>	$35,5 \pm 2$	$34,6 \pm 1,1$	$0,9 \pm 1,7$	$0 \pm 0,1$	$6,6 \pm 3,6$
<b>PVC2</b>	$55 \pm 1,2$	$44,3 \pm 0,3$	$10,6 \pm 1,2$	$4,5 \pm 0,3$	$6,3 \pm 1,2$
<b>Bioflow 30®</b>	$44,3 \pm 7,4$	$34,5 \pm 2,4$	$9,8 \pm 7$	$1,2 \pm 1$	$19,6 \pm 13,9$

La gamme d'énergie de surface des matériaux employés pour la fabrication de ces supports varie entre  $32,8 \text{ mJ m}^{-2}$  et  $55 \text{ mJ m}^{-2}$ . C'est une gamme très large qui englobe toutes les valeurs mesurées sur les coupons préalablement utilisés en RAR (Figure III-38). Pour eux aussi, la composante  $\gamma_{LW}$  est proche de  $40 \text{ mJ m}^{-2}$  comme le prévoit van Oss pour la majorité des matériaux organiques (Van OSS *et al.* 1988).

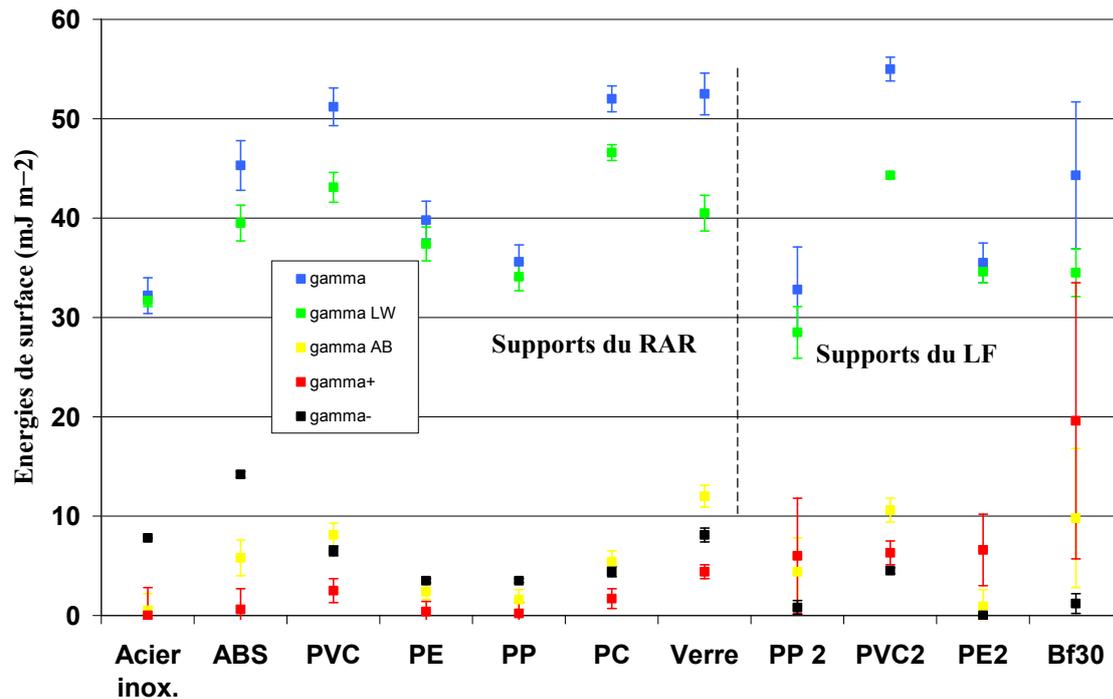


Figure III-38 : Valeurs des paramètres d'énergie de surface des supports utilisés

Les supports mis en œuvre dans les comparatifs de démarrage en lit fixe possèdent donc des composantes d'énergie de surface dans la même gamme que celles des coupons du RAR. Pour chacune des mesures les écarts types sont souvent plus importants. C'est le cas du PP2 et du PE2. C'est surtout vrai pour le Bioflow 30® pour lequel il est dès lors légitime de se poser la question de la pureté du matériau.

### III.3.2.3 Conclusion

Le graphe suivant (Figure III-39) représente l'ACP effectuée avec l'ensemble des données de surface de tous les supports employés lors des études en RAR et en LF. D'après cette ACP, ce sont les paramètres de rugosité qui prennent part à l'élaboration de l'axe F1 (à 81%) et 3 paramètres d'énergie de surface ( $\gamma$ ,  $\gamma_{LW}$  et  $\gamma_{AB}$ ) représentent plus de 85% de l'axe F2. Il permet de voir que les paramètres de rugosité sont négativement corrélés à ceux de l'énergie de surface. Les deux premières valeurs propres correspondent à un pourcentage élevé de variabilité (76,45%) preuve d'une bonne qualité de la représentation sur ces deux axes factoriels.

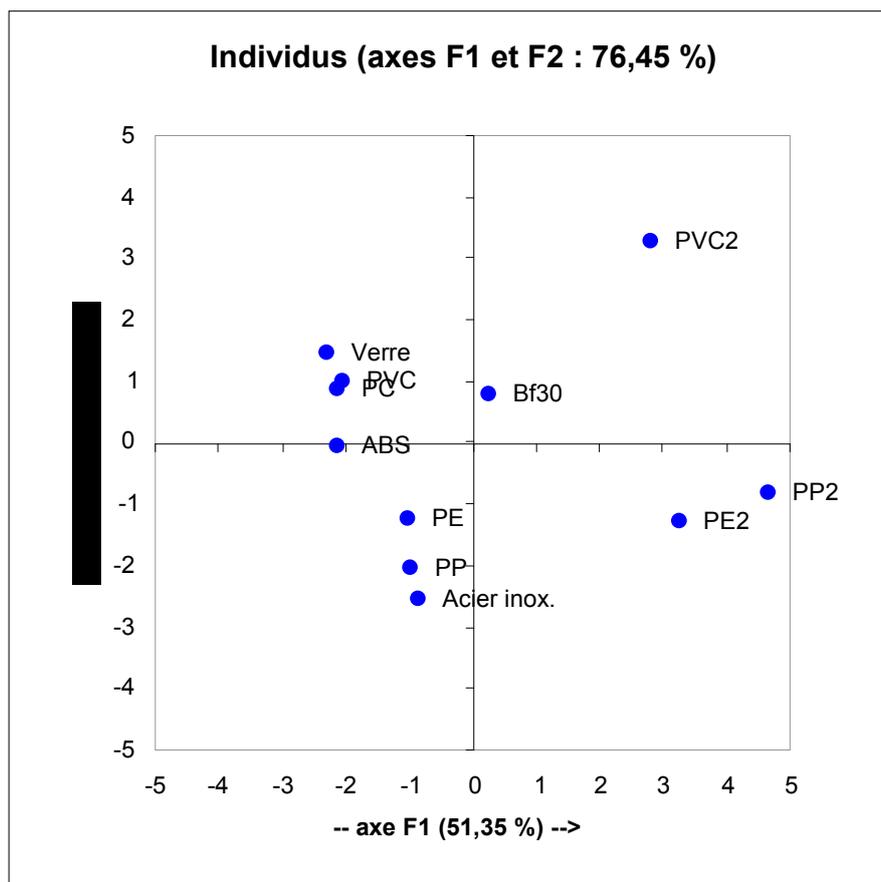


Figure III-39 : Représentation des matériaux en fonction des axes de corrélation (coupons du RAR et modules du LF)

L'axe F1 permet de distinguer les modules des coupons tandis que l'ensemble des supports sont distribués sur l'axe F2 en fonction de leur énergie de surface. Les supports industriels utilisés dans le lit fixe présentent une surface beaucoup plus rugueuse que les coupons spécialement élaborés pour le réacteur annulaire rotatif (ABS, PC, Acier inoxydable, PP, PE, verre et PVC). En comparant la morphologie de surface, cette différence peut être très élevée et  $R_a$ , la moyenne arithmétique, peut varier dans une gamme large (d'un facteur 1 à 10). De plus, les déviations standard de ces matériaux industriels montrent une plus grande hétérogénéité, probablement à cause de la fabrication par moulage. En se basant sur les écarts types élevés des données concernant sa rugosité, il est facilement imaginable que le fabricant a éprouvé des difficultés pour mouler les modules en PVC. Pour autant, les valeurs d'énergie de surface de ce support sont stables. Ce n'est pas le cas du Bioflow 30®, presque aussi lisse que les coupons obtenus par laminage mais dont les valeurs d'énergie de surface sont très fluctuantes, illustrant l'hétérogénéité du matériau employé. Une illustration intéressante à ce propos et qui montre que ce n'est pas là un cas particulier est visible en annexe sur la Figure

A-2 : M. Elle montre la très grande hétérogénéité des angles de contact de trois liquides à la surface de Cloisonyle® et par la même occasion celle des énergies de surface. L'utilisation récente de ce support dans un procédé pilote a tout de même donné de très bons résultats en terme de vitesse de démarrage (CRESSON 2006). Des coupons du RAR aux modules du LF, les matériaux se distinguent plus en raison de leur fabrication que de leur nature, il existe une certaine homogénéité dans le lien entre nature et énergie de surface de l'ensemble des matériaux décrits dans ce manuscrit.

### **III.3.3 L'épuration dans les réacteurs à lits fixes**

- Le temps de séjour hydraulique (TSH)

Afin de favoriser la fixation de la biomasse, le taux de dilution du milieu réactionnel, c'est-à-dire le rapport entre le volume de l'alimentation et celui du réacteur doit être inférieur au taux maximum de croissance des micro-organismes. Le TSH appliqué aux réacteurs facilite le lessivage rapide de la biomasse libre.

*Remarque : Les représentations de l'évolution des TSH lors des expériences C1 à C4 sont visibles en annexes (Figure C-1, Figure D-1, Figure E-1 et Figure F-1).*

- La charge volumique appliquée (CVA)

L'augmentation de la CVA est soutenue tout au long des expériences (C1 à C4). Pour chacun des comparatifs, la CVA initiale est de  $0,5 \text{ kg DCO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ . Ensuite, l'évolution exponentielle est variable selon les comparatifs. En fonction de la qualité du démarrage du réacteur, elle peut être augmentée jusqu'à  $30 \text{ kg DCO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$  tandis que la durée peut atteindre 55 jours.

*Remarque : Les représentations des évolutions des rendements épuratoires et des CVA lors des expériences C1 à C4 sont visibles en annexes (Figure C-2, Figure C-3, Figure D-2, Figure D-3, Figure E-2, Figure E-3, Figure F-2 et Figure F-3)*

- Le rendement épuratoire

Les taux d'épuration, calculés grâce aux mesures de DCOs effectuées en entrée et en sortie du procédé, sont suivis régulièrement. De manière générale, ils évoluent selon le même scénario suivant. Après la période de lessivage de l'inoculum, durant laquelle la DCO en sortie est supérieure à la DCO entrante, le rendement épuratoire est très faible durant plusieurs jours.

Puis il augmente pour atteindre la valeur seuil de 80%, c'est la période d'acclimatation des

micro-organismes à leur nouvel environnement. Si le taux d'épuration ne descend pas en dessous de ce seuil malgré une augmentation de CVA, le système est toujours en phase de démarrage. Lorsque les rendements diminuent et se dégradent suffisamment pour passer en dessous de 80%, le démarrage de notre réacteur est considéré comme terminé.

*Les représentations des évolutions des rendements épuratoires et des CVE lors des expériences C1 à C4 sont visibles en annexes (Figure C-4, Figure C-5, Figure D-4, Figure D-5, Figure E-4, Figure E-5, Figure F-4 et Figure F-5)*

### - La concentration en acides gras volatils (AGV)

Au début de chaque comparatif, la concentration en AGV dans les réacteurs est très basse. Cela est dû au fait que les inocula proviennent d'un réacteur parfaitement mélangé, alimenté en éthanol de manière semi-continue et sans surcharge. Les inocula ne contiennent donc pas d'AGV. Dès le début de l'alimentation la concentration en AGV augmente. C'est la période où le rendement épuratoire est encore faible. Ce n'est que lorsque le taux d'épuration devient plus conséquent que les AGV commencent à disparaître. Pendant cette période, il est intéressant d'observer que les AGV sont principalement sous forme d'acétate. Lors de l'augmentation de la CVA, le suivi de la concentration en AGV dans le réacteur permet de visualiser le retard de la population archée sur la population acidogène. Lors de la période d'adaptation, le rendement épuratoire est faible car l'acidification de l'éthanol n'est pas suivie par sa transformation en méthane. Dès que cela devient le cas, le rendement épuratoire croît en même temps que la disparition des AGV. Un équilibre est trouvé entre les deux populations. Cet équilibre est troublé par une modification environnementale provoquée par une augmentation de la CVA. Si chaque nouvelle augmentation est modérée (10 à 20%) un nouvel équilibre est atteint après un seul temps de séjour. L'augmentation de la CVA atteint son maximum lors que le biofilm ne peut plus croître. A ce stade de la création du biofilm, le système est parvenu à sa charge maximale, le démarrage est terminé. Dans le cas où l'équilibre n'est pas atteint, la concentration en AGV augmente. La population méthanogène n'est pas en mesure de consommer les AGV produits qui s'accumulent. C'est souvent le cas en fin d'expérience où les AGV forment près de la totalité de la DCO rejetée

*Remarque : Les représentations des évolutions des concentrations en AGV lors des expériences C1 à C4 sont visibles en annexes (Figure C-6, Figure C-7, Figure D-6, Figure D-7, Figure E-6, Figure E-7, Figure F-6 et Figure F-7).*

### - La concentration en matières en suspension

Initialement, la quantité de biomasse en suspension dans le réacteur a pour unique origine l'inoculation. Ensuite, sachant que l'alimentation est dépourvue de matière en suspension, c'est le débit continu d'alimentation du réacteur qui va lessiver le système. Le suivi de l'évolution des concentrations en MES et MVS à la sortie du réacteur permet de mettre en évidence le lessivage de la biomasse de l'inoculum. 4 à 5 TSH suffisent pour faire décroître rapidement ces concentrations. Cette diminution continue durant toute la période étudiée dans la plupart des cas. Elle induit une stabilité relative des matières volatiles particulaires (MVS) dans le milieu réactionnel proche de  $1 \text{ gL}^{-1}$ . Il arrive, cependant, que cette concentration augmente. C'est le cas dans les réacteurs des premier et troisième comparatifs (C1 et C3). Habituellement, le surcroît de la concentration en biomasse en suspension peut avoir deux origines. Il est lié soit au détachement de fragments du biofilm, soit à une multiplication des cellules libres. Le retour des micro-organismes fixés à l'état planctonique n'est pas exclu mais le décrochage d'une partie du biofilm serait plus marqué que ce que l'on peut observer. Aucun décrochage massif de biomasse du support n'a été constaté durant l'étude. C'est donc une croissance de micro-organismes en phase liquide qui est la plus vraisemblable. L'analyse des boues libres à la fin des expériences révèle que la proportion d'archées dans le milieu liquide est toujours très inférieure à celle du biofilm.

*Remarque : Les représentations des évolutions des concentrations en matières particulaires lors des expériences C1 à C4 sont visibles en annexes (Figure C-8, Figure C-9, Figure D-8, Figure D-9, Figure E-8, Figure E-9, Figure F-8 et Figure F-9).*

### -La production de biogaz

La mesure du biogaz produit associée à l'analyse de sa composition, c'est à dire au taux de méthane, est un paramètre clé du suivi d'un réacteur anaérobie. A partir des mesures de biogaz produit et de quantité de DCO apportée et éliminée, il est possible de calculer la productivité en biogaz. Cette productivité permet de suivre la dynamique de formation du biofilm au cours du démarrage.

Tous ces paramètres suivent le même profil durant l'évolution des huit réacteurs. La proportion de méthane dans le biogaz augmente puis se stabilise pour atteindre des valeurs de 70 à 90%. L'évolution de la production de biogaz varie en fonction de la charge polluante et du rendement épuratoire. Elle est fonction du volume d'effluent traité et suit donc de très près

celle de la quantité de DCO éliminée. Elle est très faible durant les premiers jours mais le débit augmente ensuite proportionnellement à l'augmentation de la CVE.

- Le rendement en méthane

Le rendement en méthane ( $Y_{CH_4}$ ) est un paramètre de suivi métabolique intéressant dans le cas des réacteurs anaérobies à biomasse fixée (MICHAUD *et al.* 2005). Ce n'est pas un critère de performance car sa valeur n'est pas liée au rendement d'épuration (da MOTTA MARQUES *et al.* 1990). Mais il est directement lié à l'activité microbienne car il correspond à la quantité de méthane produite par quantité de DCO dégradée. Dans des conditions stables, sa valeur est constante que les micro-organismes soient libres ou fixés. Théoriquement, elle est de  $0,35 L_{CH_4}.g_{DCO_{deg}}^{-1}$  (CNTP) (JENNETT *et al.* 1975). La durée durant laquelle la valeur du rendement en méthane est inférieure à la valeur théorique est indiquée, ainsi que les paramètres de productivité, dans le Tableau III-13.

Tableau III-13 : Paramètres de production de méthane lors de la comparaison des LF

		C 1		C 2		C 3		C 4		Unité
		PE	PP	Bf30	PVC	PP	PVC	PE	Bf30	
Productivité	biogaz	464	465	427	451	395	392	439	459	$L.kg_{DCO_e}^{-1}$
	méthane	343	327	200	319	308	311	276	217	$L.kg_{DCO_e}^{-1}$
Rendement en méthane		0,33	0,33	0,29	0,33	0,30	0,34	0,21	0,22	$L_{CH_4}.g_{DCO_e}^{-1}$
Délai (pour l'optimum)		30	23	15	10	9	9	$\infty$	$\infty$	jours

La productivité en biogaz varie peu (7%) autour de la valeur moyenne de 437 L/kg. Celle calculée pour le méthane est plus fluctuante ( $288 \pm 52$  L/kg). Les deux valeurs restent cependant conformes à celles de la littérature (MICHAUD *et al.* 2002 ; MICHAUD *et al.* 2005 ; CRESSON *et al.* 2007).

D'après les valeurs du rendement en méthane obtenues dans ce tableau, il apparaît clairement que certains supports ne facilitent pas la digestion anaérobie. Pour certains, comme le PP ou le PVC, les valeurs de rendements en méthane obtenues sont proche de la valeur théorique de la méthanisation de l'éthanol qui est de  $0,39 L_{CH_4}.g_{DCO_{deg}}^{-1}$  à 37°C et à pression atmosphérique (HICKEY *et al.* 1981; BALAGUER *et al.* 1997).

Pour d'autres (PE, Bioflow 30®), cette valeur n'est pas toujours atteinte et lorsque c'est le cas, le délai nécessaire à l'obtention de cet optimum est long. Ce délai, durant lequel la valeur du rendement en méthane est faible, représente la période où la mobilisation de la matière organique se fait vers une autre voie métabolique : celle de la synthèse des cellules et des EPS. Elle correspond à une phase où une partie de la DCO apportée n'est pas méthanisée. L'utilisation de la DCO par des voies anaboliques permet la croissance, la maintenance des micro-organismes et la production de polymères.

La Figure III-40 décrit l'évolution du rendement en méthane en fonction du temps au cours des quatre comparatifs. Les courbes ont un aspect sigmoïde intéressant.

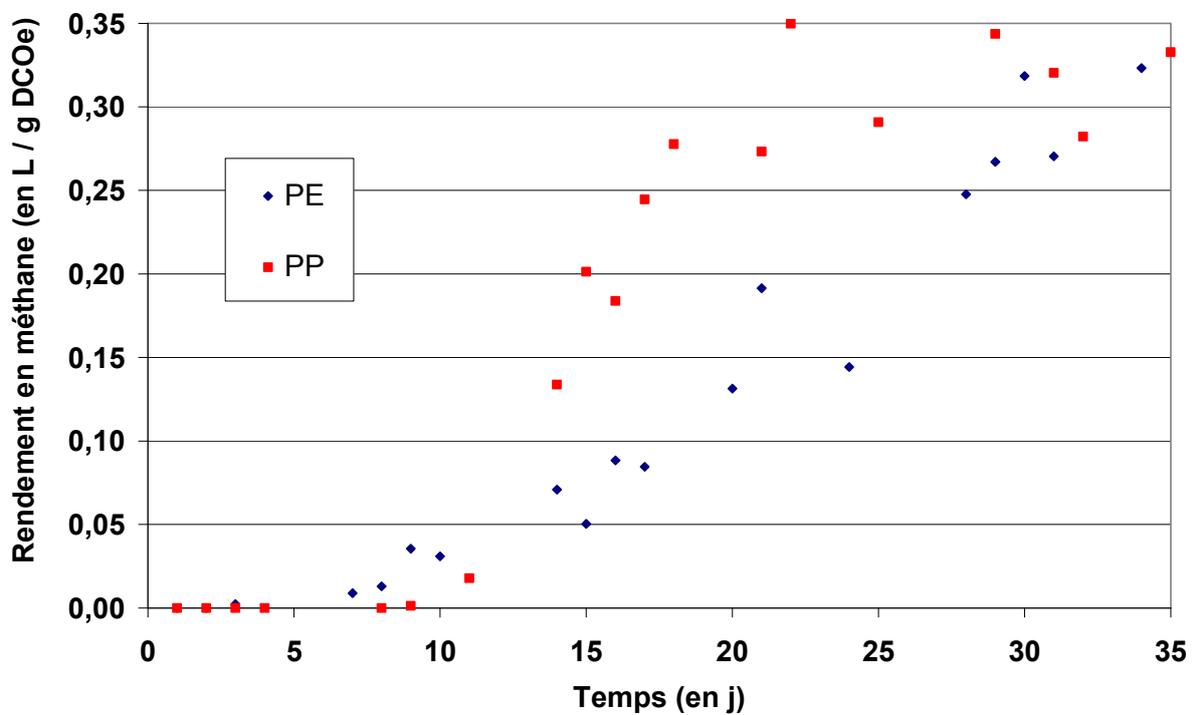


Figure III-40 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C1 )

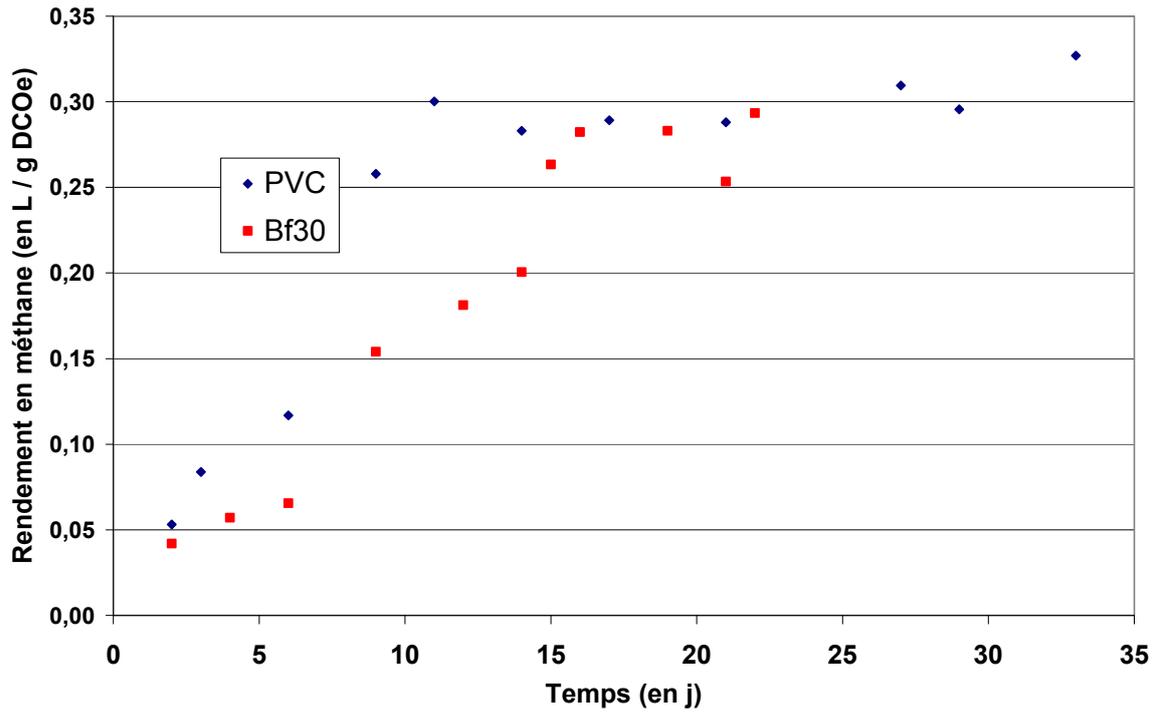


Figure III-41 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C2)

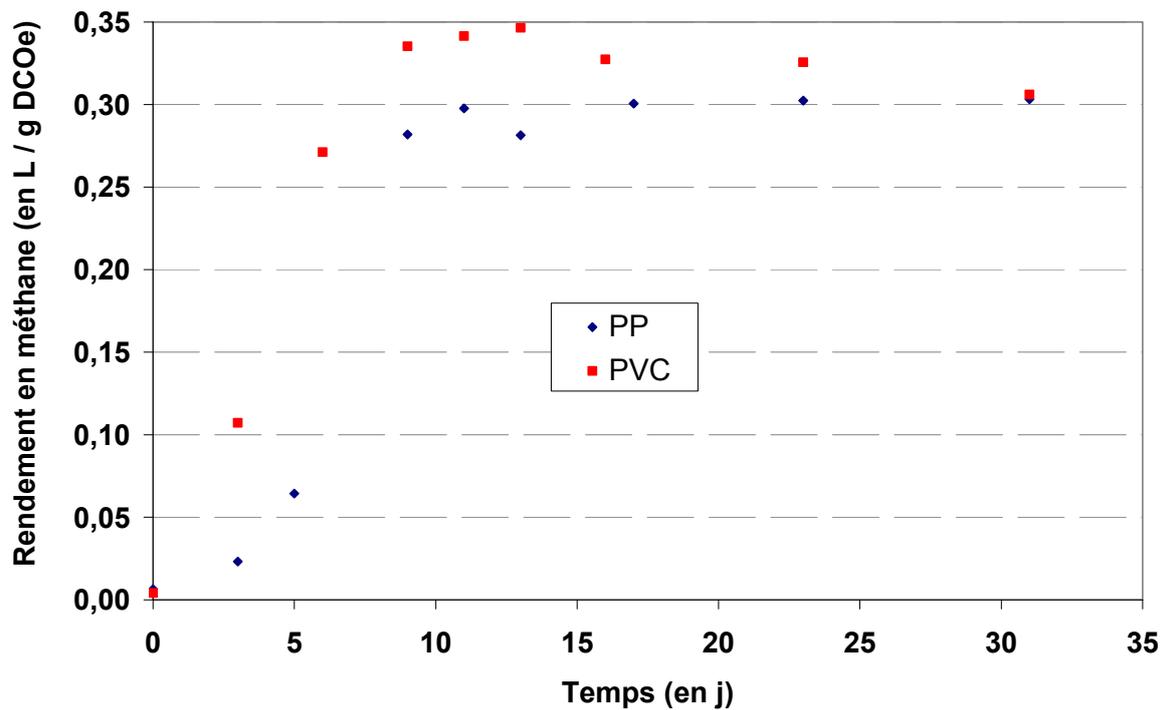


Figure III-42 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C3)

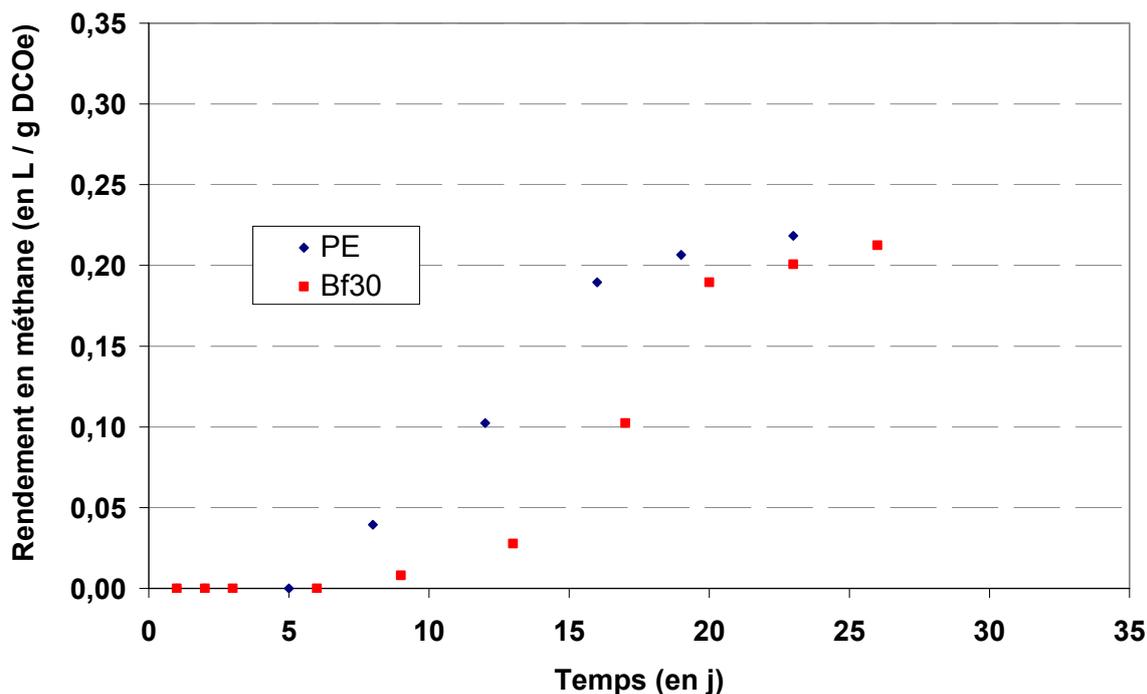


Figure III-43 : Evolution du rendement en méthane en fonction du temps (C4)

Cette figure permet un comparatif aisé des réacteurs en utilisant les cinétiques de rendement en méthane. Les pentes de chacune des courbes révèlent des activités très différentes d'un réacteur à l'autre. Pendant la première phase une grande partie du métabolisme des micro-organismes est orientée vers la production de biomasse. Ensuite, le rendement en méthane augmente, c'est le retour de l'activité microbienne au métabolisme catabolique complet de la digestion anaérobie, c'est à dire jusqu'au méthane. Le rendement optimum en méthane n'est pas forcément toujours atteint dans le même laps de temps en fonction des supports. Plusieurs auteurs rapportent l'observation de ce temps de latence dans la production de méthane de digesteurs (LAUWERS *et al.* 1990 ; SANCHEZ *et al.* 1994). L'effet des matériaux est visible et ils sont différenciables en fonction de la vitesse avec laquelle la valeur maximale du rendement en méthane est obtenue.

Un bilan général, sous forme de tableau, peut être fait afin de comparer les performances de chacun des réacteurs mis en place (Tableau III-14). Nous avons défini la période d'adaptation comme étant la durée comprise entre le premier contact des cellules avec le support et l'équilibre des populations. C'est le temps nécessaire au système pour atteindre un rendement de 80% depuis son inoculation. La durée de démarrage est comprise entre l'inoculation du

réacteur et le moment où une augmentation de la charge réduit le rendement épuratoire en deçà de 80%. Ce pourcentage correspond à l'objectif épuratoire que nous nous sommes fixé.

Tableau III-14 : Principaux paramètres quantitatifs permettant la comparaison des LF

		C 1		C 2		C 3		C 4		Unité
		PE	PP	Bf30	PVC	PP	PVC	PE	Bf30	
Adaptation	Durée	28	33	5	6	6	7	10	11	jours
	Activité	1,5	2,25	1,1	0,97	2,1	2,4	0,63	0,67	g DCOe.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Démarrage	Durée	35	55	11	34	31	31	19	13	Jours
	Activité	2,6	10	1,9	21,3	30	30	1,1	1	g DCOe.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
	Rendement épuratoire	83	88	80	96	97	97	82	80	% DCO

La comparaison des données de ce tableau avec celles de la Figure III-40 met en évidence une correspondance entre la durée de la période d'adaptation et la période de stabilisation du rendement en méthane. La mesure de ce paramètre peut être utilisée comme indicateur de l'équilibre des populations bactériennes et archéennes. Lorsque sa valeur atteint l'optimum la montée en charge peut être appliquée au procédé.

Chaque comparatif met en œuvre deux réacteurs possédant un support dans un matériau différent. La conduite est dépendante de la façon dont les réacteurs répondent aux tentatives de montée en charge. Or, lors des démarrages, chaque réacteur ne répond pas forcément de la même manière. La recherche de la meilleure performance est relative, puisqu'elle dépend du style de conduite des réacteurs.

Il existe clairement un effet « matériau » dans le démarrage des réacteurs de méthanisation à cellules fixées. Les réacteurs contenant des supports microbiens en PP ou en PVC montrent des performances intéressantes. Leurs performances épuratoires sont très supérieures à celles obtenues par les mêmes réacteurs contenant les supports en PE ou Bioflow 30®. Leurs rendements épuratoires peuvent atteindre 97% en DCOs et ce avec des CVA parfois égales à 30 g DCOe.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> (Cf. Tableau III-14). Ce sont ces mêmes matériaux qui facilitent le démarrage des réacteurs en diminuant la durée de la période d'adaptation. 10 jours après l'inoculation, les biofilms présents sur les supports en PP ou PVC ont déjà une activité de méthanisation (Cf. Tableau III-13).

### III.3.4 La colonisation des supports des réacteurs à lits fixes

Lors de la conception des réacteurs, nous avons pris soin de mettre en place un système contribuant à la fixation des micro-organismes. Ainsi, le mode de conduite avec un TSH court et l'homogénéisation permanente du milieu de culture favorisent la biomasse fixée au détriment des populations planctoniques. Notre volonté est d'attribuer au biofilm la plus grande partie de l'activité du réacteur. En effet, comme il est impossible d'accéder au biofilm durant le suivi des démarrages, le suivi des performances du réacteur est le seul moyen d'appréhender les performances du biofilm. Ce n'est qu'à la fin de l'expérience que l'accès au biofilm devient possible. Dès lors il est possible de le caractériser en termes de quantité et de populations. Des liens pourront alors être établis entre ses caractéristiques et ses performances.

#### III.3.4.1 Quantification des biofilms

A la fin de chaque comparatif, des modules sont extraits des réacteurs. La matière sèche est mesurée sur chacun d'eux. La moyenne de ces valeurs est calculée et la quantité de biofilm par réacteur est déterminée en fonction du nombre de modules. La concentration en MES est aussi mesurée dans le milieu liquide. Les résultats de ces mesures sont inscrits dans le Tableau III-15 ainsi que les activités et productivités des biofilms associées à chaque réacteur.

Tableau III-15 : Paramètres quantitatifs des biofilms des LF

	C 1		C 2		C 3		C 4	
	PE	PP	Bf30	PVC	PP	PVC	PE	Bf30
Biomasse attachée <sup>(1)</sup>	18,39	78,37	9,97	98,38	169,9	176,2	4,31	6,71
Biomasse libre <sup>(1)</sup>	12,95	6,35	34,2	26,80	61,38	52,39	11,83	5,36
Activité <sup>(2)</sup>	2,60	10,00	1,90	21,26	30,00	30,00	1,14	1,02
Productivité <sup>(3)</sup>	137	34	38	44	37	38	145	58

(1) en g par réacteur ; (2) en g DCOe.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> ; (3) en g biofilm.g DCOe<sup>-1</sup>

Dans le premier comparatif, la quantité importante de biomasse libre du réacteur « PE » est liée à une CVA imposée par le réacteur « PP » qui possède une meilleure activité globale.

Dans le second comparatif, c'est le réacteur « Bf30 » qui subit la CVA avec les mêmes effets.

L'aspect qualitatif du biofilm montre lui aussi clairement un effet « matériau » dans le démarrage des réacteurs de méthanisation à cellules fixées. Chaque comparatif est effectué à l'aide de deux réacteurs. Les réacteurs contenant des supports microbiens en PP ou en PVC sont ceux sur lesquels les biofilms sont les plus massifs. Le biofilm qui adhère au support en PP à la fin du premier comparatif est trois fois plus important que celui fixé sur celui en PE. Dans une deuxième expérience, il est 10 fois plus important sur le PVC que sur le Bioflow 30®. Ce n'est pas toujours le cas : dans les troisième et quatrième comparatifs, la quantité de biofilm est équivalente dans les deux réacteurs. Dans ces expériences, ni la quantité de biomasse fixée, ni l'activité épuratoire ne permet de différencier les supports. Une particularité du support en PE réside dans la quantité de DCO nécessaire à l'élaboration du biofilm. Dans nos tests, le biofilm qui croît sur ce matériau exige 2 à 4 fois plus de DCO que celui qui pousse sur les supports en PP, PVC ou Bioflow 30®.

L'activité épuratoire des LF dépend de la quantité de biomasse présente dans le réacteur. La corrélation entre la biomasse attachée et l'activité du réacteur est très élevée ( $R^2= 0,97$ ). Le faible impact de la biomasse libre sur l'activité du réacteur ( $R^2= 0,66$ ) est probablement lié à une augmentation de la charge, elle-même dépendante de l'activité du biofilm. Ce contraste peut s'expliquer par la différence de la nature des populations dans le biofilm et dans le milieu réactionnel. Une analyse de la distribution des archées et des bactéries dans ces deux compartiments biologiques s'impose.

### III.3.4.2 Les populations archéennes

Le lien avec les performances des réacteurs peut aussi être étudié. Le rendement épuratoire, la charge maximale obtenue et le délai d'adaptation aux matériaux sont comparés aux populations microbiennes en présence lors du démarrage des 8 réacteurs. Chaque écosystème correspondant est analysé en fonction du taux d'archées dans la population totale. Ces données sont comparées à celle de l'inoculum ainsi qu'à celles des populations planctoniques de chaque réacteur. Mis à part celui de l'inoculum, tous les prélèvements sont effectués à la fin de la mise en place d'un biofilm opérationnel comme nous l'avons défini précédemment en fonction, entre autres, du rendement en méthane.

La première partie de ce travail (paragraphe III.1.2) a révélé de grandes différences d'adhésion après seulement deux heures de contact des micro-organismes avec les matériaux testés. Cette étude a débouché, entre autre, sur la conclusion que certains matériaux

favorisaient l'adhésion des populations archées en augmentant leur proportion par rapport à celle de l'inoculum.

Une première comparaison des proportions d'archées adhérees sur les modules des lits fixes (Figure III-44) nous apprend qu'il n'en est rien et que l'on ne peut pas parler d'une augmentation du taux d'archées comme c'était le cas dans l'adhésion initiale.

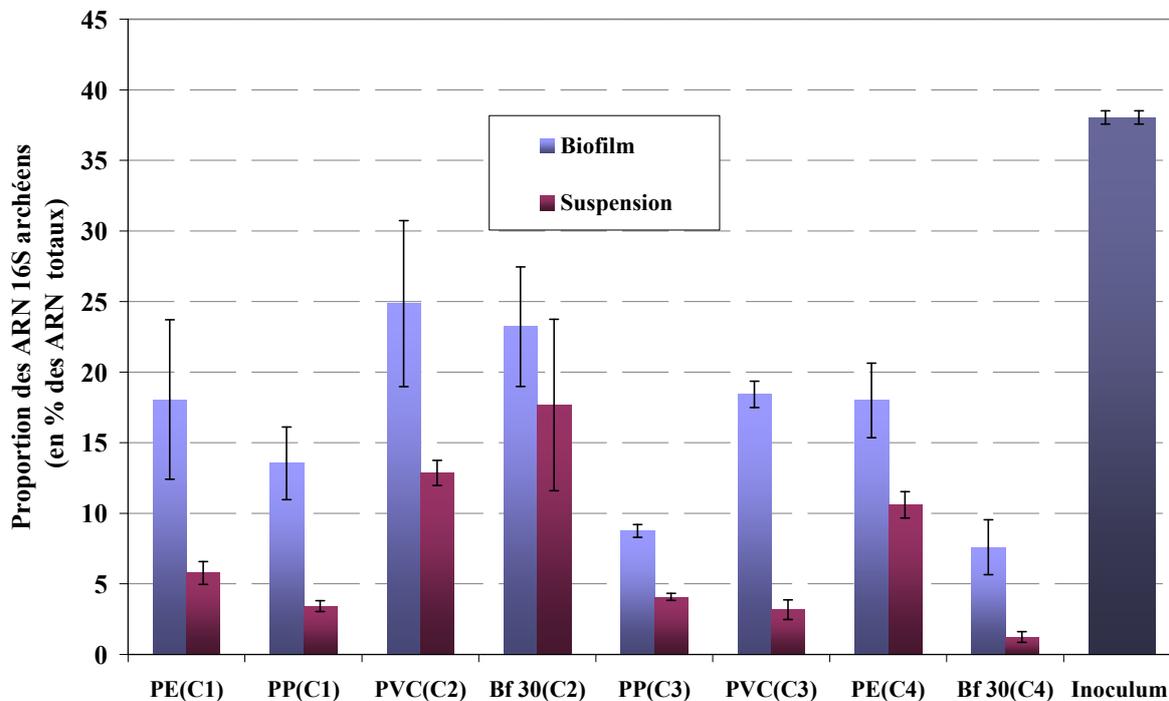


Figure III-44 : Pourcentage d'archées dans l'inoculum et dans les populations libres et adhérees sur les modules de LF des différents comparatifs (C1 à C4)

En poursuivant l'analyse de ces résultats, le deuxième aspect important qui apparaît réside dans les différences de proportions d'archées des biofilms par rapport à celles en suspension dans les milieux liquides. Les archées sont toujours significativement beaucoup plus concentrées dans les biofilms. Cet aspect de la distribution des populations microbiennes conforte l'idée initiale qui nous a poussé à choisir le mode de conduite des réacteurs. L'utilisation d'un TSH court a non seulement favorisé l'attachement des micro-organismes sur les modules mais a aussi avantage voire entretenu une concentration élevée d'archées dans les biofilms. C'est un avantage certain pour le système étudié car la réaction globale de la digestion anaérobie peut être perturbée en cas de défaillance des archées méthanogènes.

III.3.4.3 Empreinte moléculaire

Les profils SSCP élaborés à partir des prélèvements permettent de comparer les distributions des micro-organismes selon leurs espèces.

*Cas des bactéries*

Les populations bactériennes des inocula utilisés sont complexes. Il en va de même pour celles des biofilms et il est très difficile de remarquer une particularité parmi les 8 profils bactériens (Figure G-1, Figure G-2, Figure G-3, Figure G-4 et Figure G-5 en annexe).

Pour un matériau donné, d'un comparatif à l'autre, ce ne sont pas les mêmes populations qui adhèrent. L'étude des variations des profils bactériens en fonction des supports ne montre pas de lien direct entre la nature des matériaux et la distribution des bactéries attachées. Le matériau ne semble pas avoir d'impact sur un développement préférentiel de populations bactériennes particulières.

C'est une ACP qui ici encore nous permet d'y voir plus clair. Le cercle des corrélations basé sur l'ensemble des profils est donné dans la Figure III-45.

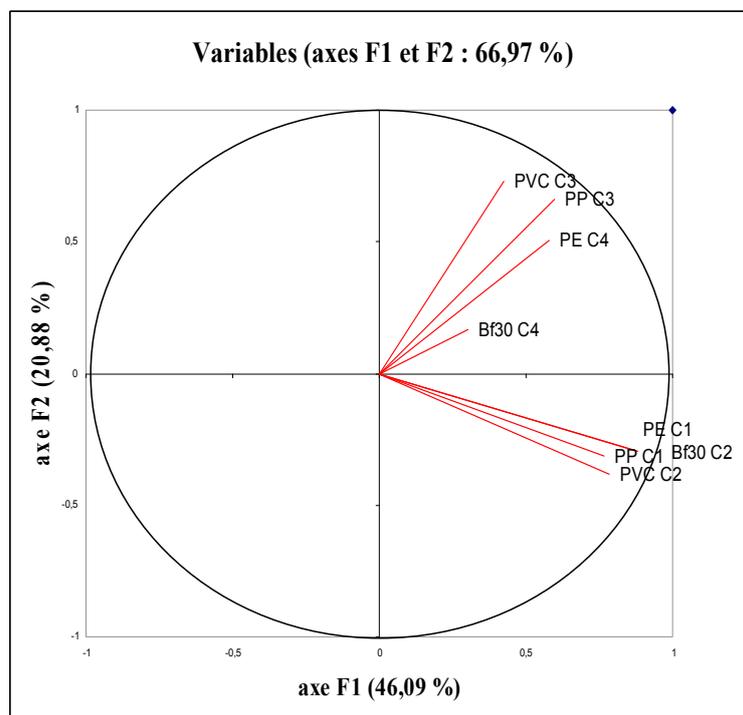


Figure III-45 : Cercle des corrélations des profils SSCP bactériens des biofilms (C1 à C4)

Il apporte un fait nouveau plutôt inattendu à cette échelle. L'étude bibliographique souligne bien en effet le rôle de l'inoculum lors de l'adhésion des micro-organismes mais ce que traduit la figure précédente est flagrant : la composition de l'inoculum a un impact majeur sur la composition du biofilm bactérien qui ne varie en fonction ni de la CVA, ni de la nature du matériau.

Lors de la comparaison des profils bactériens des populations attachées et libres pour chacun des 8 réacteurs aucun lien n'a pu être établi. Seuls les profils des bactéries du réacteur contenant le support en PVC sont identiques, qu'ils proviennent des prélèvements du biofilm ou des cellules libres et ce, dans les deux comparatifs où le support en PVC intervient (Figure III-46).

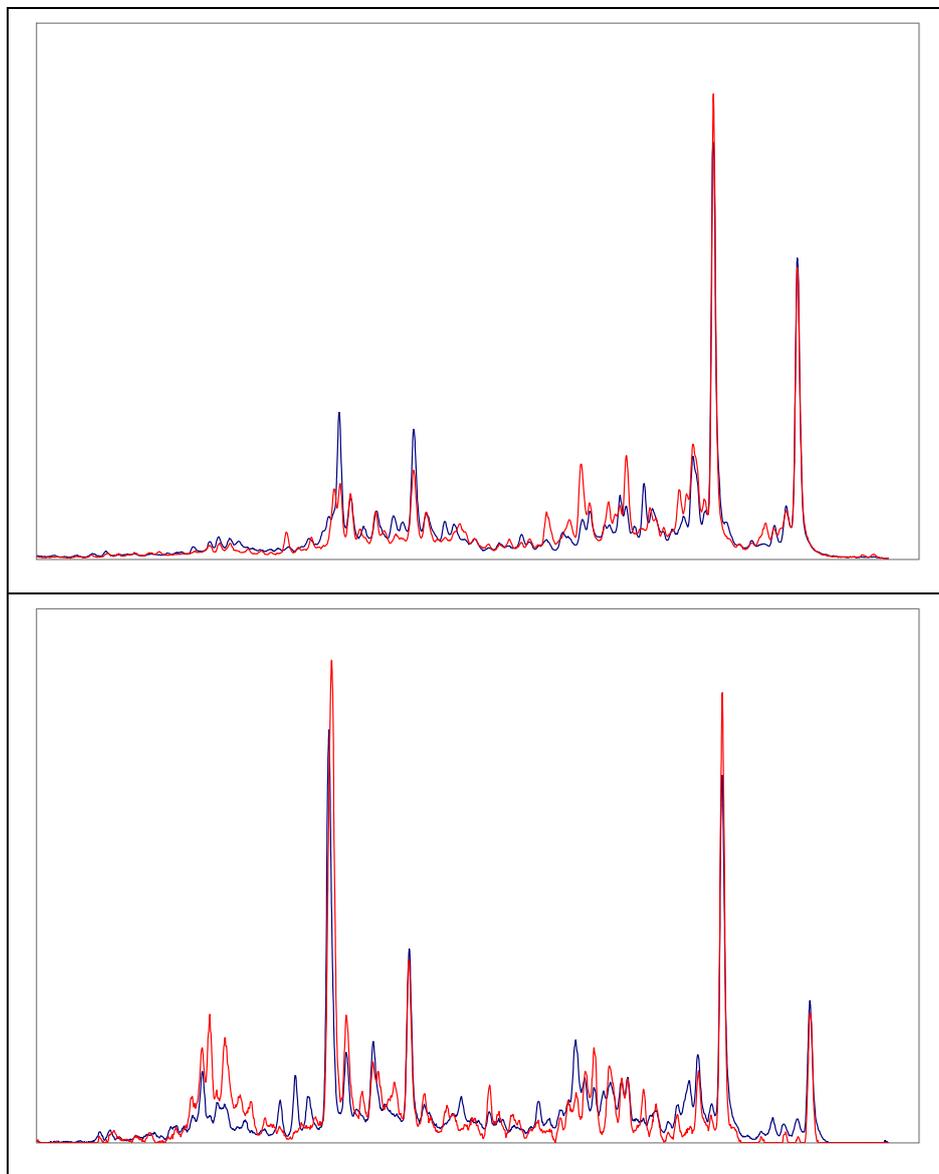


Figure III-46 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries attachées aux supports PVC lors des comparatifs C2 (en haut) et C3 (en bas).

*Cas des archées*

Lorsque cette analyse ACP est effectuée à l'aide des profils SSCP des archées, les résultats sont totalement différents. La Figure III-47 représente le cercle des corrélations obtenues avec l'ensemble des données des biofilms des quatre comparatifs.

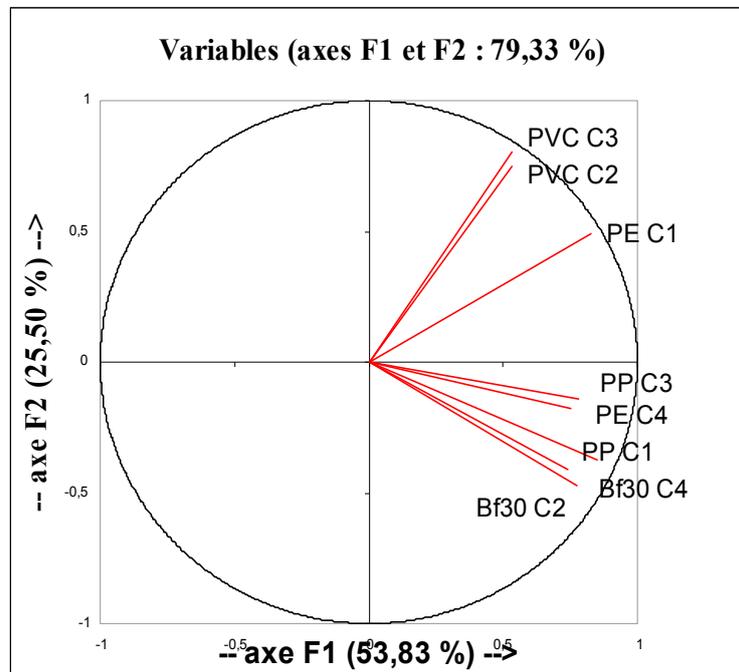


Figure III-47 : Cercle des corrélations des profils SSCP archéens des biofilms (C1 à C4)

Les populations archées sont, de manière évidente, indépendantes des inocula utilisés. C'était, rappelons-le, le cas pour les bactéries. Pour les archées ce sont bien les matériaux qui sélectionnent les populations qui participent à l'élaboration du biofilm.

**III.3.5 Conclusion sur le suivi des réacteurs à lits fixes**

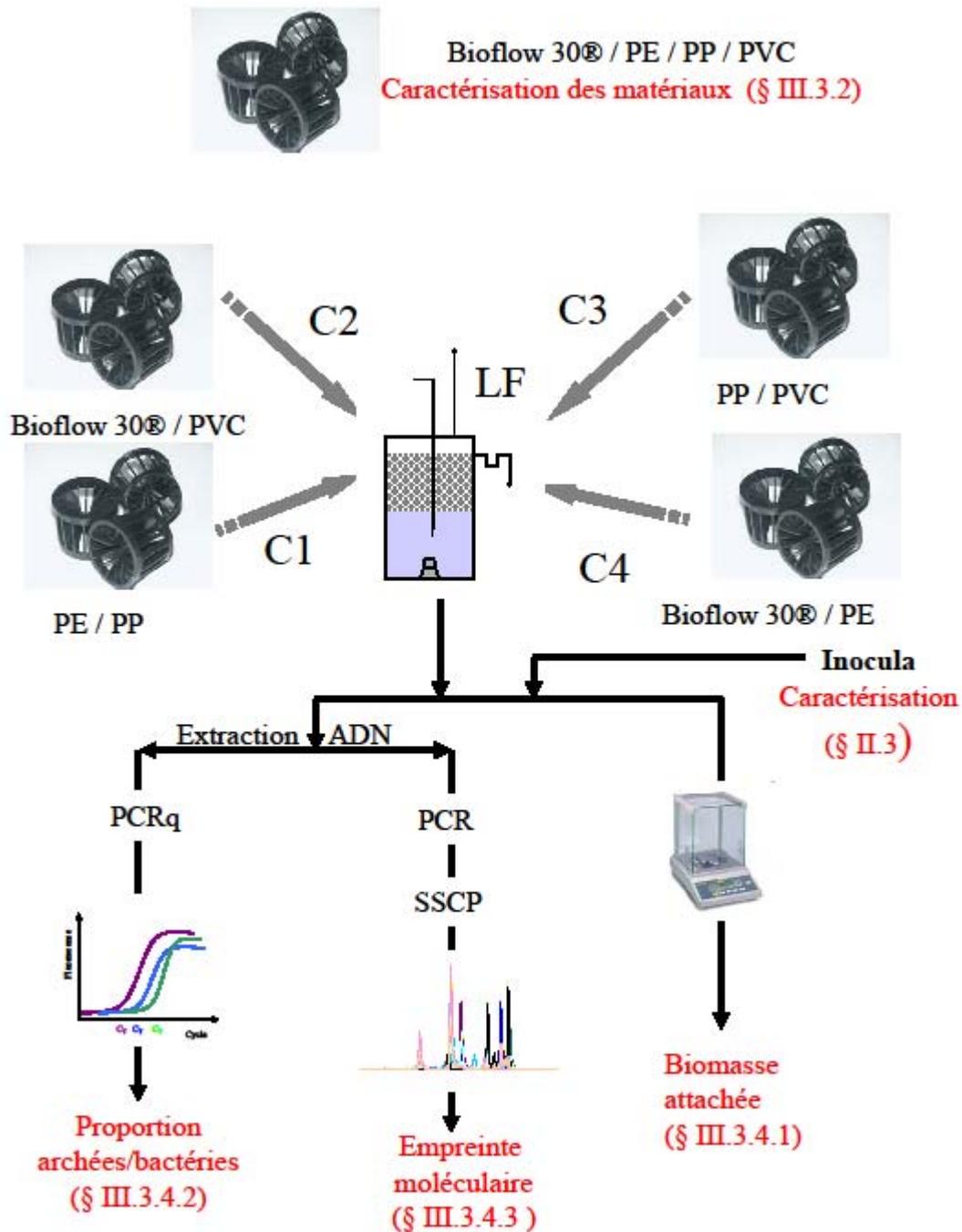
L'évolution du rendement en méthane souligne le rôle majeur de la nature du support microbien sur la formation du biofilm. La valeur optimale de ce paramètre n'est pas forcément toujours atteinte dans le même laps de temps en fonction des supports. Le temps de latence dans la production de méthane observée dans des méthaniseurs est principalement relié au temps nécessaire à la biomasse pour s'adapter au matériau ou pour modifier l'expression génique et acquérir le phénotype benthonique. La différence de vitesse avec laquelle la valeur maximale du rendement en méthane est obtenue va aussi dépendre de la nature de l'adhésion initiale. La quantité de cellules microbiennes ainsi que la proportion d'archées qui s'installent dès les premiers instants de contact avec les supports sont des aspects non négligeables.

En effet, les populations microbiennes des biofilms établis sont variables en fonction du matériau. Les espèces bactériennes du biofilm varient d'un support à l'autre et sont fortement dépendantes de la composition cellulaire de l'inoculum. Au contraire, les populations archées sont sensibles à la nature des matériaux du support. D'une expérience à l'autre, ce sont les mêmes populations qui adhèrent à un matériau donné.

Ainsi, à la question posée au début de cette étude « Les différences de colonisation observées sont-elles de nature à modifier le démarrage des réacteurs intensifs de méthanisation ? » la réponse apportée est affirmative. Le suivi de la colonisation des quatre supports a permis de mettre en évidence des différences liées aux matériaux. En effet, en fonction du support utilisé, la durée nécessaire avant l'obtention d'un biofilm bien établi peut varier fortement. En ce sens, les réacteurs à lit fixe qui mettent en œuvre des supports en PP ou en PVC ont un avantage certain

Cependant, cette affirmation peut être nuancée. Le mode de conduite d'un réacteur à biofilm peut masquer le rôle essentiel joué par le support. Ainsi pour un même matériau, les résultats peuvent être très différents en termes de performance et de colonisation.

*Schéma synoptique de l'étude du démarrage d'un réacteur à lit fixe*



### *Synthèse de l'étude du démarrage d'un réacteur à lit fixe*

Le biais susceptible de masquer l'influence des matériaux sur la composition du biofilm plus mature a été éliminée dans cette dernière étude. De nouveaux tests facilitent l'observation de la composition des biofilms ainsi que celle de leur formation sur quatre matériaux différents (PE, PP, PVC et Bioflow 30®). Afin de contrôler la persistance de l'effet des matériaux sur la mise en place d'un biofilm anaérobie chaque matériau est utilisé comme support unique d'un réacteur à lit fixe. La comparaison des réacteurs s'effectue en fonction du comportement de chacun des réacteurs lors de leur démarrage, de leur performance épuratoire tout en considérant l'évolution quantitative et qualitative de la colonisation des supports.

La surface des supports employés présente est caractérisée par une rugosité plus importante que celle des coupons utilisés lors des études antérieures, mais les valeurs d'énergie de surface appartiennent à la même gamme.

La mise en place des biofilms a été étudiée au sein de réacteurs à lits fixes. La montée en charge a été réalisée en augmentant la concentration de l'alimentation tout en maintenant un TSH inférieur au temps de doublement des populations d'archées. Le suivi du rendement méthane se révèle pertinent pour évaluer les performances des réacteurs et comparer l'impact des matériaux testés. En effet, la rapidité avec laquelle le rendement méthane théorique est atteint – même si elle est variable en fonction de la montée en charge appliquée – est dépendante du support utilisé. Les résultats obtenus indiquent ainsi que le PP et le PVC contribuent à la mise en place rapide du biofilm anaérobie.

Les résultats obtenus montrent que les caractéristiques de l'inoculum déterminent aussi la qualité du biofilm à venir. Concernant la composition du biofilm en termes d'espèces bactériennes, les populations adhérentes sont fortement dépendantes de la nature de l'inoculum. Au contraire, les populations d'archées des biofilms sont spécifiques au matériau et indépendantes de l'inoculum. Les caractéristiques de l'inoculum déterminent donc la qualité du futur biofilm. Cependant, pour un inoculum donné, les matériaux impactent fortement la sélection des populations d'archées.

Cette dernière étude valide l'existence des liens établis entre les supports et les micro-organismes. Les matériaux jouent un rôle dans la formation du biofilm anaérobie malgré des résultats très différents en termes de performance et de colonisation.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail s'intègre complètement dans la réflexion actuelle sur la préservation des ressources naturelles en diminuant l'impact de l'activité humaine sur son environnement. Il s'agit, en effet, d'augmenter les performances de systèmes d'épuration biologique d'effluents. Parmi eux, les procédés de digestion anaérobie se sont révélés très bien adaptés pour le traitement des effluents. C'est particulièrement le cas des procédés intensifs à biofilm. Qu'il s'agisse de réacteurs aussi différents que ceux à lit fixe (RAJESHWARI *et al.* 2000), à lit fluidisé (NICOLELLA *et al.* 2000) ou à lit turbulé (BUFFIERE *et al.* 2000), le principal inconvénient qui leur est reproché est la trop longue période de démarrage. L'objectif appliqué de notre travail est de réduire la durée de cette étape limitante.

Il est connu que les micro-organismes de l'inoculum adhèrent très rapidement sur la surface du support (CRESSON *et al.* 2008). Cette fixation quasi instantanée des micro-organismes aux matériaux témoigne de phénomènes passifs d'adhésion. Les forces qui interviennent sont de nature physico-chimique et varient en fonction de la nature du support, des micro-organismes et du milieu dans lequel ils sont plongés. De plus, lorsqu'un biofilm actif se développe, ce n'est qu'après un temps d'adaptation variable. Ces deux éléments nous ont conduits à nous intéresser d'une part aux paramètres susceptibles de faciliter l'adhésion des micro-organismes : l'énergie de surface et dans une moindre mesure la rugosité des matériaux du support et d'autre part à la recherche de liens les unissant à la formation du biofilm.

**Notre travail avait donc pour ambition d'évaluer l'influence de la nature des matériaux utilisés comme supports microbiens sur la mise en place d'un biofilm anaérobie.**

### CONCLUSION

Il est admis que les trois acteurs principaux « biomasse/support/milieu » sont interdépendants. De manière générale, la littérature cerne bien la nature des interactions qui interviennent dans la création d'un biofilm (HORI *et al.* 2010). L'originalité de notre travail réside en grande partie dans l'étude du biofilm anaérobie. Si la digestion anaérobie et la formation des biofilms sont deux domaines largement étudiés depuis une trentaine d'années, la mise en place d'un biofilm multi-espèces en condition anaérobie est un sujet peu exploré.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Différentes expériences présentées dans ce manuscrit ont permis de répondre à plusieurs questions.

- Dans une première étude, les techniques de caractérisation de supports ainsi que l'utilisation d'un réacteur annulaire rotatif nous ont permis de mettre en évidence le rôle des caractéristiques physico-chimiques des matériaux lors de l'adhésion des micro-organismes responsables de la digestion anaérobie. Nous avons montré que cette adhésion n'avait pas de lien avec la rugosité des supports dans la gamme étudiée mais qu'elle était négativement corrélée avec les valeurs d'énergie de surface. Ainsi les matériaux possédant une énergie libre de Gibbs faible comme le PP, le PE et l'acier inoxydable facilitent l'adhésion des micro-organismes contrairement au verre et au PVC. Cependant, la quantité relative des archées dans la population totale est aussi fortement dépendante du matériau utilisé. Deux polymères, le PVC et le PC, pour lesquels le taux de recouvrement est faible, présentent une augmentation significative de la proportion d'archées en comparaison de celle de l'inoculum.

- Une deuxième étude, mettant en œuvre les mêmes matériaux, a permis de mettre en évidence des variations dans la colonisation de ces matériaux. Lors de cette étude, pendant laquelle la croissance des biofilms a été suivie, nous avons pu estimer l'état du biofilm à deux stades de sa formation. A la fin de la période d'adaptation, c'est-à-dire dès l'obtention de l'équilibre de la chaîne trophique, les résultats des analyses quantitatives et qualitatives effectuées confirment ceux déjà obtenu dans la première étude. Ainsi, lors de l'adhésion puis de la colonisation des micro-organismes, les matériaux jouent clairement un rôle : le biofilm le plus important s'est accumulé sur le coupon en PP. C'est déjà sur ce matériau que l'adhésion était la plus forte après 2 heures de contact. L'idée selon laquelle la proportion d'archées est un paramètre important se confirme avec les résultats obtenus sur le PVC. Malgré un recouvrement initial faible, la quantité de biofilm est équivalente à celles obtenues sur les autres coupons. A la fin de la période de démarrage, les biofilms sont beaucoup plus homogènes entre eux tant quantitativement qu'en terme de proportion d'archées. Le fait que les effets visibles au début de la colonisation ne perdurent pas dans les conditions expérimentales est peut-être lié à un biais de l'expérience, à savoir l'exposition simultanée de l'ensemble des coupons dans le même réacteur.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- La dernière étude met définitivement en avant la nature « matériau-dépendante » de la mise en place des biofilms. La vitesse d'obtention d'un biofilm mature est variable en fonction de la nature du support. Le PP et le PVC favorisent à la mise en place rapide du biofilm anaérobie. Les caractéristiques de l'inoculum déterminent aussi la qualité du biofilm à venir. Les populations bactériennes adhérees sont fortement dépendantes de la composition de l'inoculum. Cependant, ce sont les matériaux qui réalisent la sélection des populations archéennes du même biofilm. L'utilisation conjointe des outils moléculaires et du suivi des réacteurs a ainsi permis de confirmer le caractère matériau-dépendant de la mise en place d'un biofilm anaérobie de méthanisation. Certains matériaux facilitent l'adhésion puis la colonisation par les archées et même si cet avantage ne perdure pas jusqu'à la fin du démarrage, il est tout de même primordial quant à la vitesse de mise en place du biofilm.

Dans tous les cas, la nature du matériau sélectionné dépendra aussi du type de micro-organisme que l'on veut fixer et de la nature du milieu réactionnel (WEILAND *et al.* 1991). La vitesse d'immobilisation est affectée par les propriétés des matériaux du support et l'influence dépend aussi du type de micro-organisme. Des tests ont montré que *Methanothrix* se fixe plus facilement sur le PE que sur le PVC, alors c'est l'inverse avec *Methanospirillum* (VERRIER *et al.* 1987). L'adhésion sur les matériaux plastiques est probablement aussi affectée par les additifs utilisés lors de la production du matériau et de la fabrication du support. Un parallèle peut être établi entre nos observations et celles d'autres travaux qui suggèrent l'existence d'un effet substratum-dépendant du pré-conditionnement de surfaces par des biosurfactants (MEYLHEUC 2000).

### PERSPECTIVES

La **compréhension des processus d'adhésion** est une étape indispensable à l'**amélioration des procédés** anaérobies à biofilms. Les principales perspectives de recherche qui pourraient être mises en œuvre sont reliées au rôle de chacun des acteurs de la colonisation : supports, micro-organismes et environnement.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus et en fonction des axes de travail choisis, il semble nécessaire de poursuivre l'étude de l'adhésion.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La première étape sera de compléter le travail sur l'étude des matériaux utilisés comme supports. A très court terme, deux études vont permettre de compléter nos connaissances. La première sera l'occasion de consolider les conclusions établies pour les supports en PP et en PVC. La mise en place de deux réacteurs annulaires rotatifs « jumeaux » contribuera à la mise en place rapide de deux biofilms anaérobies afin de procéder à la validation de nos conclusions.

La seconde concerne l'étude de l'organisation spatiale du biofilm. Nous voulons confirmer l'hypothèse d'une répartition homogène des archées et des bactéries. L'utilisation de sondes marquant de manière sélective les populations archéennes et bactériennes permettra de visualiser *in situ* les différentes populations par microscopie laser confocale à balayage.

Ensuite notre but sera de procéder à l'identification des micro-organismes pionniers dans l'adhésion. L'étude de leurs propriétés physico-chimiques (potentiel zêta, composition de la paroi microbienne, hydrophobicité de la « surface » cellulaire) qui représentent des paramètres influents de l'adhésion des micro-organismes pourrait donner accès à l'identification des facteurs biologiques responsables de leur adhésion préférentielle au support.

Un autre type d'investigations à envisager porterait sur l'influence des conditions environnementales. Les connaissances que nous voulons acquérir sont doubles. La première concerne les conditions hydrodynamiques qui, largement abordés dans d'autres études, ne concernent jamais l'adhésion. Les propriétés physico-chimiques du milieu nous intéressent en second lieu. La nature de l'alimentation, la force ionique, le film conditionnant sont autant de pistes à approfondir.

A plus long terme, la recherche à mettre en œuvre doit porter essentiellement sur une meilleure maîtrise de la qualité du biofilm formé. En effet, si l'optimisation de la période de démarrage est un paramètre important, il ne nous semble pas être nécessairement le critère principal : une orientation différente doit être donnée à des études complémentaires. Le risque est grand en effet qu'une installation dans laquelle un biofilm a été rapidement mis en place ne soit pas en mesure de résister à des accidents. Nous avons donc l'intention de soumettre un biofilm récemment formé à différentes perturbations (chute de pH, augmentation massive de la CVA, diminution rapide du TSH, présence d'inhibiteur). Chacun de ces tests pourra être

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

effectué sur des réacteurs mis en place dans les conditions optimales. Ils nous renseigneront sur une qualité du biofilm formé : sa résistance aux perturbations.

L'approche pluridisciplinaire, amorcée dans ce manuscrit, s'avère primordiale afin de recueillir le plus grand nombre de données. Elle va se poursuivre afin de participer ainsi à l'amélioration des procédés anaérobies de traitement des effluents.

# **BIBLIOGRAPHIE**

---

## **BIBLIOGRAPHIE**

- AIVASIDIS, A., WANDREY C. (1988). Recent developments in process and reactor design for anaerobic wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* **20**(1): p. 211-218.
- ALVES, M. M., PEREIRA M. A., NOVAIS J. M., POLANCO F. F., MOTA M. (1999). A new device to select microcarriers for biomass immobilization: Application to an anaerobic consortium. *Water Environment Research* **71**(2): 209-217.
- ANNACHHATRE, A. P., BHAMIDIMARRI S. M. R. (1992). Microbial attachment and growth in fixed -film reactors : process startup considerations. *Biotechnol. Adv.* **10**: p. 69-91.
- ARAKI, N., HARADA H. (1994). Population dynamics of methanogenic biofilm consortium during a start-up period of anaerobic fluidized bed reactor. *Water Science and Technology* **29**(10-11): 361-368.
- ARCHER, D. B., KIRSOP B. H. (1990). The microbiology and control of anaerobic digestion. *Anaerobic Digestion, A Waste Treatment Technology*. A. Wheatley. London, Elsevier: 43-91.
- AUSTERMANN-HAUN, U., SEYFRIED C. F., ZELLNER G., DIEKMANN H. (1994). Start-up of anaerobic fixed film reactors: Technical aspects. *Water Science and Technology* **29**(10-11): 297-308.
- BAKKER, D. P., BUSSCHER H. J., VAN DER MEI H. C. (2002). Bacterial deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber : microbial adhesion mechanisms depend on the mass transport conditions. *Microbiology* **148**: 597-603.
- BALAGUER, M. D., VICENT M. T., PARIS J. M. (1997). A comparison of different support materials in anaerobic fluidized bed reactors for the treatment of vinasses. *Environ. Technol.* **18**: p. 539-544.
- BARBER, W. P., STUCKEY D. C. (1998). The influence of start-up strategies on the performance of an anaerobic baffled reactor. *Environmental Technology* **19**(489-501).
- BAR-NESS, R., ROSENBERG M. (1989). Putative role of a 70kDa outersurface protein in promoting cell-surface hydrophobicity of *Serratia marcescens* RZ. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2277-2281.
- BATSTONE, D. J., KELLER J., BLACKALL (2004). The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Research* **38**: 1390-1404.
- BATSTONE, D. J., KELLER J. (2001). Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type. *Water Research* **35**(7): 1723-1729.
- BELLON-FONTAINE, M. N., RAULT J., Van OSS C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* **7**: 47-53.
- BOONE, D. R., WORAKIT S., MATHRANI I. M., MAH R. A. (1986). Alcaliphilic methanogens from high pH lake sediments. *J. Syst. Appl. Microbiol.* **40**: 111-116.
- BORJA, R., BANKS C., MAESTROJUAN G., WANG Z. (1994). Antagonistic and synergistic effects of two mineral support particles on the hydrolysis and methanation of wastewater in immobilized cell anaerobic digesters. *Biotechnology Letters* **16**(8): 859-864.

- BORJA, R., BANKS C. J. (1994). Kinetics of anaerobic digestion of soft drink wastewater in immobilized cell bioreactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **60**: 327-334.
- BOS, R., VAN DER MEI H. C., BUSSCHER H. J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* **23**(2): 179.
- BOULANGE-PETERMANN, L., RAULT J., BELLON-FONTAINE M. N. (1997). Adhesion of streptococcus thermophilus to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* **11**: 201-216.
- BRIANDET, R. (1999). Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms - aspects physico-chimiques. ENSAR ENSA. Rennes: 170.
- BRIANDET, R., MEYLHEUC T., MAHER C., BELLON-FONTAINE M.-N. (1999b). *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(12): 5328-5333.
- BROWN, J. R., DOOLITTLE F. (1997). Archaea and the procaryote-to-eucaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(4): p. 456-502.
- BROWN, S., COUCHY I., FRAISIER V., SATIAT-JEUNEMAITRE B. (2001). Microscopies, marquages et imageries de la cellule végétale: vers une analyse structurale et fonctionnelle du protéome, Dynamique de la Compartimentation Cellulaire Institut des Sciences du Végétal CNRS.
- BUFFIERE, P. (1996). Etude et modélisation de l'influence de l'hydrodynamique sur les performances d'un réacteur de méthanisation à lit fluidisé. microbiologie option biotechnologie. Toulouse, Institut National des Sciences Appliquées: 200 p.
- BUFFIERE, P., BERGEON J. P., MOLETTA R. (2000). The inverse turbulent bed : a novel bioreactor for anaerobic treatment. *Water Res.* **34**(2): p. 673-677.
- BUFFIERE, P., MOLETTA R. (2000). Collision frequency and collisionnal particle pressure in three phase fluidized bed. *Chemical Engineering Science* **55**: p. 5555-5563.
- BULL, M. A., STERRITT R. M., LESTER J. N. (1983). An evaluation of single and separated phase anaerobic industrial wastewater treatment in fluidized bed reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: p. 1054-1065.
- BUSSHER, H. J., BOS R., van der MEI H. C. (1995). Initial Microbial Adhesion nis a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters* **128**: 229-234.
- CADI, Z. (1994). Méthanisation en bioréacteur à membrane: application à un effluent de papeterie. Ecologie microbienne, Université Claude Bernard Lyon I: 155.
- CAMILLIERI, C. (1988). Start-up of fixed-film stationary bed anaerobic reactors. 5th International symposium on anaerobic digestion, Bologna, Pergamon press.
- CARRE, A. (1989). Interface solide-liquide, phénomènes d'interface, agents de surface, principes et modes d'action,. Paris, J. Briant.
- CECCHI, F., PAVAN P., MATA-ALVAREZ J. (1992). Fast digester start-up under mesophilic conditions using thermophilic inoculum. *Water Science and Technology* **25**(4/5): 391-398.
- CELIS-GARCIA, L., RAZO-FLORES E., MONROY O. (2005). Sulfate reduction in biofilms: performance of an inverse fluidized bed reactor, Punta del Este - Uruguay, IWA.
- CHARACKLIS, W. G. (1990). Biofilm processes. Biofilms. Characklis W.G. and Marshall K.C. New York, John Wiley and sons: p. 195-231.

- CHARACKLIS, W. G., MARSHALL K. C. (1990). A basis for an interdisciplinary approach. Biofilms. Characklis W.G. and Marshall K.C. New York, John Wiley and sons: p. 3-15.
- CHEN, S. J., LI C. T., SHIEH W. K. (1985). Performance evaluation of the anaerobic fluidized bed system. 1 : substrate utilization and gas production. *Chem. Technol. Biotechnol.* **35B**: p.101-109.
- CHRISTERSSON, C. E., FORNALIK M. S., BAIER R. E., GLANTZ P. O. (1987). In vitro attachment of oral microorganisms to solid surfaces : evaluation of a controlled flow method. *Scand. J. Dent. Res.* **95**: 151-158.
- CLARENS, M. (1989). Etude de la fermentation de l'acétate par une bactérie méthanogène acétoclaste: *Methanosarcina* sp. MSTA-1. INSA, spécialité microbiologie. Toulouse, Institut National des Sciences Appliquées: 133.
- COMTE GAUTRON, M. P. (1998). Etude d'un nouveau réacteur triphasique : le lit turbulé inverse (Hydrodynamique et transfert de matière G/L). Génie des procédés. Toulouse, Institut National des Sciences Appliquées: 205 p.
- COSTERTON, J. W., CHENG K. J., GEESEY G., LAAD T. I., NICKEL J. C., DASGUPTA M., MARRIE T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Rev. Microbiol.* **41**: 435-464.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI Z., CALDWELL D. E., KORBER D. R., LAPPIN-SCOTT H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**: 711-745.
- COUTURIER, C. (1996). La valorisation énergétique du biogaz. Journées industrielles sur la digestion anaérobie, Narbonne.
- CRESSON, R. (2006). Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation. Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm. Sciences et procédés biologiques et industriels. Montpellier, UM2: 272 p.
- CRESSON, R., CARRERE H., BERNET N., DELGENES J. P. (2006). Biofilm formation during the start-up period of an anaerobic biofilm reactor - Impact of nutrient complementation. *Biochemical Engineering Journal*(Submitted).
- CRESSON, R., DABERT P., BERNET N. (2009). Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. *Journal of Applied Microbiology* **106**(3): 863-876.
- CRESSON, R., ESCUDIE R., CARRERE H., DELGENES J. P., BERNET N. (2007). Influence of hydrodynamic conditions on the start-up of methanogenic inverse turbulent bed bioreactor. *Water Research* **41**: 603-612.
- CRESSON, R., ESCUDIE R., STEYER J.-P., DELGENES P., BERNET N. (2008). Competition between planktonic and fixed microorganisms during the start-up of methanogenic biofilm reactors. *Water Research* **42**: 792-800.
- Da MOTTA MARQUES, D. M. L., CAYLESS S. M., LESTER J. N. (1989). An investigation of start-up in anaerobic filters utilising dairy waste. *Environ. Technol.* **10**(6): p. 567-576.
- da MOTTA MARQUES, D. M. L., CAYLESS S. M., LESTER J. N. (1990). Start-up regimes for anaerobic fluidised systems treating dairy wastewater. *Biological Wastes* **34**: 191-202.
- DABERT, P., DELGENES J. P., MOLETTA R., GODON J. J. (2002). Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* **1**: 39-49.

- DABROS, T., Van De VEN T. M. G. (1987). Deposition of latex particules on glass surfaces in an impinging jet. *Phys. Chem. Hydrodyn* **8**: 161-172.
- DAMGAARD, L. R., NIELSEN L. P., N.P. R. (2001). Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. *Wat. Res.* **35**(6): 1379-1386.
- DANIELS, L., BELAY N., RAJAGOPAL B. S. (1986). Assimilatory reduction of sulfate and sulfite by methanogenic bacteria. *Applied Environ. Microbiol.* **51**: p. 703-709.
- D'ARGENIO, D. A., MILLER S. I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *MICROBIOLOGY-SGM* **150**( 8): 2497-2502.
- DAVIES, D. G., PARSEK M. R., PEARSON J. P., IGLEWSKI B. H., COSTERTON J. W., GREENBERG E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- DELBES, C., MOLETTA R., GODON J. J. (2001). Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecology.* **35**: 19-26.
- DEMEYER, A., JACOB F., JAY M., MENGUY G., PERRIER G. (1981). La fermentation méthanique. La conversion bioénergétique du rayonnement solaire et les biotechnologies. Lavoisier. Paris: p. 213-249.
- DENG, W., Xi D., MAO H., METHA W. ( 2008). The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS* **35**(2): 265-274.
- DERJAGUIN, B., LANDAU L. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta physicochim*(14): 633.
- DERLON, N., MASSE A., ESCUDIE R., BERNET N., PAUL E. (2008). Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Research* **42**(8-9): 2102-2110.
- DIAZ-BAEZ, M. C. (1988). A study of factors affecting attachment in the startup and operation of anaerobic fluidized bed reactors. 5th International Symposium On Anaerobic Digestion, Bologna (Italy), Monduzzi (Bologna).
- DICKINSON, R. B., NAGE L. J. A., Mc DEVITT D., FOSTER T. J., PROCTOR T. A., COOPER S. L. (1995). Quantitative comparison of clumping factor-and coagulase mediated Staph. Aureus adhesion to surface-bound fibrinogen under flow. *Infect. Immun.* **63**: 3143-3150.
- DIEKERT, G., WEBER B., THAUER R. (1980). Nickel dependence of factor F-430 content in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archives of microbiology* **127**(3): 273-278.
- DOREL, C., VIDAL O., PRIGENT-COMBARET C., VALLET I., LEJEUNE P. (1999). Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E.coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 169-175.
- DROSTE, R. L., ANDRAS E., KENNEDY K. J. (1990). Initial biofilm formation of acetoclastic methanogenic bacteria. *Biofouling* **2**: 191-210.
- EHLINGER, F. (1994). Anaerobic biological fluidized beds: operating experiences in France. 7th International Symposium on Anaerobic Digestion, Capetown (South Africa).
- EHLINGER, F., ESCOFFIER Y., COUDERC J. P., LEYRIS J. P., MOLETTA R. (1994). Development of an automatic control system for monitoring an anaerobic fluidized bed. *Water Science and Technology* **29**(10/11): 289-298.
- ELIMELECH, M. (1995). Experimental techniques in particule deposition kinetics. Particle deposition and aggregation. Measurement, Modelling and Simulation. G. Elimelech, Jia and Williams. Bodmin, Hartnolls: 290-309.

- ELLEN, R. P., VEISMAN H., BUIVIDS I. A., ROSENBERG M. (1994). Kinetics of lactose-reversible coadhesion of actinomyces naeslundii WVU 398A and streptococcus oralis 34 on the surface of hexadecane droplets. *Oral Microbiol. Immunol.* **9**: 364-371.
- FERRY, J. G. (1993). Methanogenesis : Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics. New York, Chapman & Hall.
- FLEMMING, H. C., WINGENDER J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part 1: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* **43**(6): 1-8.
- FLINT, S. H., BROOKS J. D., BREMER P. J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of food engineering* **43**: 235-242.
- FOX, P., SUIDAN M. T., BANDY J. (1990). A comparison of media types in acetate fed expanded bed anaerobic reactors. *Water Research* **24**(7): 827-835.
- GARCIA-CALDERON, D. (1997). Hydrodynamique et conversion d'un réacteur anaérobie en fluidisation inverse. *Génie des procédés*. Montpellier, Université des Sciences et Techniques du Languedoc: 180 p.
- GARCIA-CALDERON, D., BUFFIERE P., MOLETTA R., ELMALEH S. (1996). Comparison of three granular support materials for anaerobic fluidized bed systems. *Biotechnology Letters* **18**(6): 731-736.
- GILBERT, P., EVANS D. J., EVANS E., DUGUID I. G., BROWN M. R. W. (1991). Surface characteristics and adhesion of Escherichia coli and Staphylococcus epidermis. *Journal of applied bacteriology* **71**(1): 72-77.
- GIOVANNACCI, I. (1999). Origine des Listeria monocytogenes et des Salmonella présentes sur les produits de découpe de porc, Université de Bretagne occidentale: 192.
- GJALTEMA, A., VAN DER MAREL N., VAN LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J. (1997). Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors : hydrodynamic conditions versus surface characteristics. *Biotechnol. Bioeng.* **55**(6): p. 880-889.
- GODON, J. J., ZUMSTEIN E., DABERT P., HABOUZIT F., MOLETTA R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**(7): 2802-2813.
- GORRIS, L. G. M., VANDERDRIFT C. (1994). Cofactor Contents of Methanogenic Bacteria Reviewed. *Biofactors* **4**(3-4): 139-145.
- GRAF, E., THAUER R. (1981). Hydrogenase from methanobacterium thermoautotrophicum, a nickel -containing enzyme. *FEBS LETTERS* **136**(1): 165-169.
- GRUNZ, A., DAYSS E., LEPS G. (1999). Biomass covering of plastics substrates depending on plasma treatment. *Surface and coatings technology* **116-119**: 831-835.
- GUJER, W., ZEHNDER A. J. B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Wat. Sci. Technol.* **15**: 127-167.
- HADJIEV, D., DIMITROV D., MARTINOV M., SIRE O. (2007). Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 840-848.
- HAMADI, F., LATRACHE H. (2008). Adhesion of E.coli to glass under different pH. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **2**: 295-302.
- HAMMEL, K., CORNWELL K., DIEKERT G., THAUER R. K. (1984). Evidence for a nickel-containing carbon-monoxide dehydrogénase in methanobrevibacter arboriphilicus. *Journal of Bacteriology* **157**(3): 975-978.
- HANAKI, K., HIRUNMASUWAN S. (1988). Startup of UASB and anaerobic filter treating synthetic wastewater in ambient temperature, Bologna (Italy), Monduzzi.

- HANCOCK, I. C. (1991). Microbial cell surface architecture. Microbial cell surface analysis, N. H. Mozesn, PS. Bussher, HJ. Rouxhet, PG. New York, VCH: 23-56.
- HARPER, S. R., POHLAND F. G. (1986). Recent development in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering* **28**(4): 585-602.
- HEIJNEN, J. J., MULDER A., ENGER W., HOEKS F. (1989). Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *Chem. Eng. J.* **41**: p. B37-B50.
- HENZE, M., HARREMOES P. (1983). Anaerobic treatment of waste water in fixed film reactors - A literature review. *Water Sci. Technol.* **15**: p. 1-101.
- HICKEY, R. F., OWENS R. W. (1981). Methane generation from high-strength industrial wastes with the anaerobic biological fluidized bed. 11th Biotechnology and bioengineering symposium John Wiley and sons.
- HILBERT, L. R., BAGGE-RAVN D., KOLD J., GRAM L. (2003). Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International biodeterioration and biodegradation* **52**: 175-185.
- HOLST, T. C., TRUC A., PUJOL R. (1997). Anaerobic fluidized beds : ten years of industrial experience. *Water Sci. Technol.* **36**(6/7): p. 415-422.
- HORI, K., MATSUMO S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* **48**: 424-434.
- HSU, Y., SHIEH W. K. (1993). Start-up of anaerobic fluidized bed reactors with acetic acid as the substrate. *Biotech. & Bioeng.* **44**: 329-336.
- IWABUCHI, N., SUNAIRI M., ANZAI H., MORISAKI H., NAKAJIMA M. (2003). Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in Rhodococcus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **30**: 51-60.
- IZA, J. (1991). Fluidized bed reactors for anaerobic wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* **24**(8): 109-132.
- IZA, J., PALENCIA J., FERNANDEZ-POLANCO F. (1990). Waste water management in a sugar beet factory: a case study of comparison between anaerobic technologies. *Water Science and Technology* **22**(9): 123-130.
- JANSEN, B., KOHNEN W. (1995). Prevention of biofilm formation by polymer modification. *J. Ind. Microbiol.* **15**: 391-396.
- JARELL, K. F., KALMOKOFF M. L. (1988). Nutritional requirements of the methanogenic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* **34**(5): p. 557-576.
- JENNETT, J. C., DENNIS N. D.-J. (1975). Anaerobic filter treatment of pharmaceutical waste. *Journal of Water Pollution Control Federation* **45**(1): 104-121.
- JOUENNE, T. (2008). Biofilms bactériens. *Techniques de l'ingénieur* **BIO600**: 1-8.
- KANG, H., TRITT W. P. (1997). Slaughterhouse wastewater treatment in a bamboo ring anaerobic fixed bed reactor. 8th International conference on anaerobic digestion **3**, Sendai.
- KENNEDY, K. J., DROSTE R. L. (1987). Diffusional limitations of anaerobic biofilms. *Canadian Journal of Civil Engineering* **14**(5): 631-637.
- KERR, A., BEVERIDGE C., COWLING M., HODGKIESS T., PARR A. C. S., SMITH M. J. (1999). Some factors affecting the accumulation of biofouling. *Journal of marine biology Ass. of UK* **79**(2): 357-359.
- KIENER, A., GALL R., RECHTEINER T., LEIINGER T. (1985). Photoreactivation in Methanobacterium thermoautotrophicum. *Arch. Microbiol.*, **143**: 147-150.

- KLAPPENBACH, J. A., SAXMAN P. R., COLE J. R., SCHMIDT T. M. (2001). rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research* **29**(1): 181-184.
- KUHL, M. (2005). Optical microsensors for analysis of microbial communities. *Methods in enzymology* **397**: 166-199.
- KURODA, M., YUZAWA M., KAKIBARA Y., OKAMURA M. (1988). Methanogenic bacteria adhered to solid supports. *Water Research* **22**(5): 653-656.
- KWOK, W. K., PICIOREANU C., ONG S. L., van LOOSDRECHT M. C. M., NG W. J., HEIJNEN J. J. (1998). Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structure in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **58**(4): 400-407.
- LAGUERIE, C., GUIGON P. (1991). La fluidisation. Toulouse, Technique et Documentation - Lavoisier.
- LAUWERS, A. M., HEINEN W., GORRIS L. G. M., Van der DRIFT C. (1989). Variation of parameters affecting the start-up of methanogenic fluidized bed reactors. *Biotechnology Letters* **11**(12): 907-912.
- LAUWERS, A. M., HEINEN W., GORRIS L. G. M., Van der DRIFT C. (1990). Early stage in biofilm development in methanogenic fluidized bed reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**: 352-358.
- LECLERC, M., DELGENES J. P., GODON J. J. (2004). Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology* **6**(8): 809-819.
- LICHTENBERG, D., ROSENBERG M., SCHARFMAN M., OFEK I. (1985). A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Lett.* **4**(141-146).
- LIU, Y. (1995). Adhesion kinetics of nitrifying bacteria on various thermoplastic supports. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **5**: 213-219.
- LIU, Y., TAY J.-H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* **36**(7): 1653-1665.
- LUMSDEN, J. B., STOCKER P. J. (1981). Composition of grain boundaries of type 304 stainless steel in low temperature sensitization condition. *Scripta metallurgica* **15**: 1295.
- MARIN, P., ALKALAY D., GUERRERO L., CHAMY R., SCHIAPPACASSE M. C. (1999). Design and startup of an anaerobic fluidized bed reactor. *Water Science and Technology* **40**(8): 63-70.
- MARTIN-CERECEDA, M., ALVAREZ A. M., SERRANO S., GUINEA A. (2001). Confocal and light microscope examination of protozoa and other micro-organisms in the biofilms from a rotating biological contactor wastewater treatment plant. *Acta Protozoologica* **40**(4): 263-272.
- MATSUMO A., SAKAMOTO M., NOIKE T. (1992). A new operation of carbohydrate containing wastewater treatment in an anaerobic fluidized bed system. *Water Sci. Technol.* **26**(9-11): p. 2453-2456.
- Mc LANDSBOROUGH, L., RODRIGUEZ A., PEREZ-CONESA D., WEISS J. (2006). Biofilms : At the interface between Biophysics and Microbiology. *FOBI* **1**: 94-114.
- MELO, L. F., PINHEIRO J. D. (1984). Fouling tests: equipment and methods. Fouling in Heat Exchange Equipment. J. W. S. a. A. M. Pritchard. New York, American Society for Mechanical Engineering: 43-49.
- MEYLHEUC, T. (2000). Influence de biosurfactants sur l'adhésion de *L.monocytogenes* à des surfaces inertes - Conséquences sur la désinfection. Microbiologie. Paris, Paris XI: 193 p.

- MEYLHEUC, T., METHIVIER C., RENAULT M., HERRY J. M., PRADIER C. M., BELLON-FONTAINE M.-N. (2006). Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. *Colloïd and surfaces B : Biointerfaces* **52**: 128-137.
- MICHAUD, S. (2001). Etude hydrodynamique et biologique d'un procédé de méthanisation à biofilm : le réacteur à lit turbulé inverse. *Génie des procédés*. Toulouse, Institut National des Sciences Appliquées: 195.
- MICHAUD, S., BERNET N., BUFFIERE P., DELGENES J.-P. (2005). Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. *Process Biochemistry* **40**: 2751–2755.
- MICHAUD, S., BERNET N., BUFFIERE P., ROUSTAN M., MOLETTA R. (2002). Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. *Water Research* **36**: 1385-1391.
- MICHAUD, S., BERNET N., DELGENES J. P., ROUSTAN M. (2003). Influence of hydrodynamic conditions on biofilm behavior in a methanogenic inverse turbulent bed reactor. *Biotechnology Progress* **19**(3): 858-863.
- MOLETTA, R. (1993). La digestion anaérobie : du plus petit au plus grand. *Biofutur*: 16-25.
- MUELLER, R. F., CHARACKLIS W. G., JONES W. L., SEARS J. T. (1992). Characterisation of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 1161-1170.
- MURRAY, P. A., ZINDER S. H. (1985). Nutritional requirements of methanosarcina sp strain TM-1. *Appl Environ Microbiol* **50**(1): 49-55.
- MURRAY, W., VAN DEN BERG L. (1981). Effect of support material on the development of microbial fixed films converting acetic acid to methane. *Journal of Applied Bacteriology* **51**: 257-265.
- NEU, T. R., SWERHONE G. D. W., LAWRENCE J. R. (2001). Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology* **147**: 299-313.
- NICOLELLA, C., van LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* **80**: 1-33.
- NZOZHEVNIKOVA, A. N., KOTSURBENKO O. R. (1994). Anaerobic digestion under psychrophilic conditions. 7th International symposium on anaerobic digestion, Cape Town.
- O'TOOLE, G., KAPLAN H. B., KOLTER R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49–79.
- OHASHI, A., HARADA H. (1994). Adhesion strength of biofilm developed in an attached growth reactor. *Water Science and Technology* **29**(10/11): 281-288.
- OLSON, K. D., McMAHON C. W., WOLFE R. S. (1991). Light Sensitivity of Methanogenic Archaeobacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **57**(9): 2683-2686.
- PALMER, J., FLINT S., BROOKS J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **34**(9): 577-588.
- PARIS, J. M., VINCENT T., BALAGUER M. D., CASSU C. (1988). Comparison of startup and performance of anaerobic filter and UASB reactors treating potato-starch wastewater. 5th International symposium on anaerobic digestion, Bologna, Pergamon Press.
- PARKINS, M., CERI H., STOREY D. G. (2001). *P. aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **40**(5): 1215-26.

- PEREIRA, M. A., ALVES M. M., AZEREDO J., MOTA M., OLIVEIRA R. (2000). Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **24**: 181-186.
- PFEFFER, J. T. (1979). Anaerobic digestion processes. 1st International symposium on anaerobic digestion, Cardiff.
- PICIOREANU, C., van LOOSDRECHT M., HEIJNEN J. (1998). Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and Bioengineering* **58**(1): 101-116.
- PICIOREANU, C., Van LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J. (2000). Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation : a two dimensional modeling study. *Biotechnology and Bioengineering* **69**: p 504-515.
- PICIOREANU, C., Van LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J. (2001). Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and Bioengineering* **72**(2): 205-218.
- POHLAND F.G. (1992). Anaerobic treatment : fundamental concepts, applications and new horizons. Lancaster, Malina J.F. and Pohland F.G.
- PRAKASH, R., KENNEDY K. J. (1996). Kinetics of an anaerobic fluidized bed reactor using biolite carrier. *Canadian Journal of Civil Engineering* **23**(6): 1305-1315.
- PRIGENT-COMBARET, C., BROMBACHER E., VIDAL O., AMBERT A., LEJEUNE P., LANDINI P., DOREL C. (2001). Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in Escherichia coli via Regulation of the csgD Gene. *Journal Of Bacteriology* **183**(24): 7213-7223.
- PUNAL, A., TREVISAN M., ROZZI A., LEMA J. M. (2000). Influence of C:N Ratio on the start-up of up-flow anaerobic filter reactors. *Water Research* **34**(9): 2614-2619.
- QUIRYNEN, M., BOLLEN C. M. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A Review of the literature. *J. Clin. Periodontol.* **22**: 1-14.
- RACAULT, Y. (1986). Contribution à l'étude du procédé de méthanisation par filtre anaérobie à flux ascendant : application au traitement des effluents d'établissements vinicoles. Chimie appliquée. Poitiers, U.E.R. Science fondamentales et appliquées: 223 p.
- RAJESHWARI, K. V., BALAKRISHNAN M., KANSAL A., LATA K., KISHORE V. V. N. (2000). State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable and sustainable energy reviews* **4**: p. 135-156.
- RANALLI, G., BALSARI P., COLOMBO M., SORLINI C. (1995). Anaerobic expanded-bed laboratory digester for the treatment of swine slurries. COD removal and methane generation. *Journal of Environmental Science and Health Part A - Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control* **30**(7): 1397-1409.
- REVSBECH, N. P. (2005). Analysis of microbial communities with electrochemical microsensors and microscale biosensors. *Methods in enzymology* **397**: 147-166.
- RICKLEFS, R. E., MILLER G. L. (2003). Écologie.
- RITTMAN, B. (1989). Detachment from biofilms. Structure and function of biofilms. Characklis W.G. and Marshall K.C. Chichester, John Wiley and sons: 49-58.
- ROSENBERG, M., GUTNICK D., ROSENBERG E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**: 29-33.
- ROSENBERG, M., ROSENBERG E., JUDES H., WEISS E. (1983). Bactériale adhérence to hydrocarbons and to surfaces in the oral cavity. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**: 1-5.

- ROUSSELON, N., DELGENES J.-P., GODON J.-J. (2004). A new real time PCR (TaqMan® PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **59**: 15-22.
- ROUVIERE, P. E., BOBIK T. A., WOLFE R. S. (1988). Reductive activation of methyl coenzyme M methylreductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta-H. *Journal of Bacteriology* **170**(9): 3946-3952.
- RUIZ, C., TORRIJOS M., SOUSBIE P., LEBRATO MARTINEZ J., DELGENES J.-P. (2002). Treatment of winery wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Water Science and Technology* **45**(10): 219-224.
- SALKINOJA SALONEN, M. S., NYNS E. J., SUTTON P. M. (1983). Starting-up of an anaerobic fixed-film reactor. *Water Science and Technology* **15**(8-9): 305-308.
- SANCHEZ, J. M., ARIJO S., MUNOZ M. A., MORINIGO M. A., BORREGO J. J. (1994). Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**: 480-486.
- SANIN, S. L. (2003). Effect of starvation on resuscitation and the surface characteristics of bacteria. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **38**(8): 1517-1528.
- SAUER, K., CAMPER A. K. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of bacteriology* **183**(22): 6579-6589.
- SCHEUERMAN, T. R., CAMPER A. K., HAMILTON M. A. (1998). Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Journal of colloid and interface science* **208**: 23-33.
- SEN, B., HAMELIN J. (2008). Structural divergence of bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-SSCP. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 2123-2132.
- SHANNON, C., WEAVER W. (1948). *A Mathematical Theory of Communication*. Urbana, Illinois, University of Illinois Press.
- SILVA, A. J., HIRASAWA M. B., FORESTI E., ZAIAT M. (2006). Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Ecology and environmental microbiology* **12**: 93-98.
- SIMPSON (1949). Measurement of diversity. *Nature*: 163:688.
- SJOLLEMA, J., BUSSCHER H. J., WEERKAMP A. H. (1989). Real-time enumeration of adhering microorganisms in a parallel plate flow cell using automated image analysis. *J. Microbial. Methods* **9**: 73-78.
- SNELL-CASTRO (2005). Caractérisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **52**: 229-242.
- SPEECE, R. E., McCARTY P. L. (1964). Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion. *Adv. Water Poll. Res.* **2**: p. 305-322.
- STEWART, P. S., COSTERTON J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *LANCET* **358**(9276): 135-138.
- STEYER, J. P., BUFFIERE P., ROLLAND D., MOLETTA R. (1999). Advanced control of anaerobic digestion processes through disturbances monitoring. *Wat. Res.* **33**(9): 9. 2059-2068.
- STOODLEY, P., LAPPIN-SCOTT H. M., BOYLE J. D., DEBEER D. (1999). Evolving perspectives of biofilm structure. *Biofouling* **14**(1): 75-90.
- STRONACH, S. M., RUDD T., LESTER J. N. (1986). Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment. *Biotechnology monographs*. Springer-Verlag. **2**: p. 184.

- SWITZENBAUM, M., SCHUER K., KALLMEYER K. (1985). Influence of materials and pre-coating on initial anaerobic biofilm development. *Biotechnology Letters* **7**(8): 585-588.
- TANTICHAROEN, M., REUNGYITTCHAWALY M., LOHA V., BHUMIRATANA S., LERTTRILUCK S. (1988). Biogas production from tapioca starch wastewater. 5th International symposium on anaerobic digestion, Bologna, Pergamon Press.
- TIDE, C., HARKIN S., GEESEY G., BREMER P., SCHOLZ W. (1999). The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING* **42**(2): 85-96.
- TIMUR, H., GÖNENC E. I., TIMUR A. M. (1988). Anaerobic treatment of raki distillation wastewater in fixed-bed reactors, Bologna (Italy), Monduzzi (Bologna).
- TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN S. (2000). Spatial organisation of microbial biofilm communities. *Microb Ecol* **40**(75-84).
- TURAN, M. (2000). Mechanisms of biofilm detachment in anaerobic fluidized bed reactors. *Environmental Technology* **21**(2): 177.
- Unisense (2007). <http://www.unisense.com/>.
- VAN DEN BERG, L. (1986). High rate reactors for methane production. Biotechnology and renewable energy. M. Moo-Young, S. Hasnain and J. Lamptey, Elsevier Applied Science: p. 268-275.
- Van der MEI, H. (1989). Physico-chemical surface properties of oral Streptococci. Groningen, University of Groningen.
- Van HOOGMOED, C. G., Van der MEI H. C., BUSSCHER H. J. (1997). The influence of calcium on the initial adhesion of *S. thermophilus* to stainless steel under flow studied by metallurgical microscopy. *Biofouling* **11**: 167-176.
- Van LOOSDRECHT, M. C. M., HEIJNEN J. J. (1993). Biofilm bioreactors for wastewater treatment. *TIBTECH* **11**(April): 117-121.
- Van LOOSDRECHT, M. C. M., HEIJNEN J. J. (1996). Biofilm processes. Immobilised living cell systems : modeling and experimental methods. Willaert R.G., Baron G.V. and De Backer L. New York, John Wiley and sons: p. : 255-272.
- Van OSS, C. J. (1994). Forces interfaciales en milieux aqueux. Paris.
- Van OSS, C. J. (2005). Force and gradient to interfaces. Ecole thématique CNRS - Interface microorganismes solution : de la cellule au biofilm. Ramonchant.
- Van OSS, C. J., GOOD R. J., CHAUDHURY M. K. (1988). Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Review* **88**: 927-941.
- Van ROMPU, K., GRUSENMEYER S., VERSTRATE W. (1988). Polyurethane carrier reactor to treat wastewaters from a starch, modified starches and syrups factory. 5th International symposium on anaerobic digestion, Bologna.
- VATANYOOPAISARN, S., NAZLI A., DODD C. E. R., REES C. E. D., WAITES W. M. (2000). Effect of Flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl. Enviro. Microbiol.* **66**(2): 860-863.
- VERRAN, J., BOYD R. D. (2001). The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: A review. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* **17**(1): 59-71.
- VERRIER, D., MORTIER B., ALBAGNAC G. (1987). Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnology Letters* **9**(10): 735-740.
- VERRIER, D., MORTIER B., DUBOURGUIER H. C., ALBAGNAC G. (1988). Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. 5th International symposium on anaerobic digestion, Bologna.
- VERWEY, E. J. W., OVERBEEK J. T. G. (1948). Theory of stability of lyophobic colloïds : the interaction of sol particles having an electric double layer /. Amsterdam, Elsevier.

- VOGEL, P., WINTER J. (1988a). Anaerobic degradation of phenol and cresol in petrochemical wastewater, Bologna (Italy), Monduzzi (Bologna).
- WAGNER, M., ASSMUS B., HARTMANN A., HUTZLER P. (1994). In-situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labeled, ribosomal RNA targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *Journal of microscopy - Oxford* **176**: 181-187.
- WEILAND, P., BUTTENBACH L. (1988). Study of different fluidized bed reactors using porous plastic materials as supports, Bologna (Italy), Monduzzi (Bologna).
- WEILAND, P., ROZZI A. (1991). The start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems : discussor's report - anaerobic treatment technology for municipal and wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **24**(8): 257-277.
- WERY, N., BRU-ADAN V., MINERVINI C., DELGENES J.-P., GARRELLY L., GODON J.-J. (2008). Dynamics of Legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a cooling tower facility. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(10): 3030–3037.
- WHEATLEY, A. (1990). Anaerobic digestion: a waste treatment technology. London, Elsevier applied science.
- WHITMAN, W. B., BOWEN T. L., BOONE D. R. (1992). The methanogenic bacteria. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. **1**: 719-767.
- WIDDEL, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate - and sulfur-reducing bacteria. Biology Anaerobic Microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 469-585.
- WIRTANEN, G., ALANKO T., MATTILA-SANDHOLM T. (1996). Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **5**: 319-326.
- WOESE, C. R., FOX G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(11): 5088-5090.
- YANG, Y., TADA C., MIAH M. S., TSUKAHARA K., YAGISHITA T., SAWAYAMA S. (2004). Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Materials Science and Engineering* **24**: 413-419.
- YE, F. X., CHEN Y. X., FENG X. S. (2005). Advanced start-up of anaerobic attached film expanded bed reactor by pre-aeration of biofilm carrier. *Bioresource Technology* **96**(1): 115-119.
- YU, Y., LEE C., KIM J., HWANG S. (2004). Group-Specific Primer and Probe Sets to Detect Methanogenic Communities Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction.
- ZEHNDER, A. J. B. (1988). Biology of anaerobic microorganisms. New York, Wiley and sons.
- ZEIKUS, J. G. (1982). Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion. 1st International symposium on anaerobic digestion, Travemünde.
- ZEMB, O. (2007). L'écosystème a-t-il une mémoire ? Importance de l'histoire sur la résilience fonctionnelle de communautés bactériennes hétérotrophes marines et anaérobies. Lyon, Université Claude Bernard-Lyon I: 252.
- ZITA, A., HERMANSSON M. (1997). Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ. *FEMS Microbiology Letters* **152**(2): 299-306.

- ZOETEMEYER, R. J., VAN DEN HEUVEL J. C., COHEN A. (1982). pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. *Water Res.* **16**: p. 303-311.
- ZUMSTEIN, E., MOLETTA R., GODON J.-J. (2000). Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**(1): 69-78.

# **ANNEXES**

---

## A. ANGLES DE CONTACT

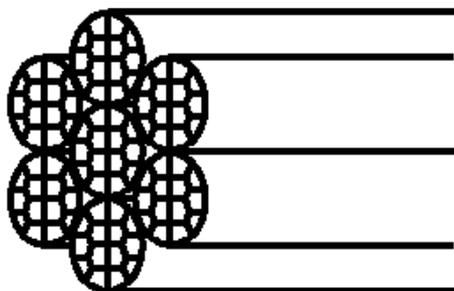
## MATERIAUX UTILISES

		Eau		Formamide		Di-iodo méthane	
		Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>Coupons</b>	<b>Acier</b>	84,4	2,6	70,4	2,7	54,6	1,1
	<b>ABS</b>	77,2	1,2	67,7	1,9	40,3	3,5
	<b>PVC</b>	91,5	1,3	78,6	1,0	32,7	3,4
	<b>PE</b>	92,5	1,3	74,1	1,4	44,3	3,2
	<b>PP</b>	92,9	1,0	74,9	2,4	50,4	2,5
	<b>PC</b>	90,6	0,5	72,6	2,2	23,6	2,3
	<b>Verre</b>	59,8	0,6	13,6	3,0	38,3	3,7
<b>Modules</b>	<b>PP 2</b>	95,8	7,2	85,4	0,1	60,2	4,5
	<b>PE2</b>	82,2	4,1	64,1	1,8	49,5	1,9
	<b>Bioflow 30®</b>	77,6	9,7	75,3	1,1	49,6	4,3
	<b>PVC2</b>	95,3	1,4	84,1	0,5	29,7	0,8

Figure A-1 : Valeurs des angles de contact (en degré) permettant le calcul des énergies de surfaces des coupons des RAR (goniomètre Krüss G210) et des modules des LF (goniomètre Krüss G23)

## CLOISONYLE®

Le Cloisonyle® est composé de tubes de PVC de 10 cm de diamètre divisés en 14 canaux qui offrent une surface spécifique de  $180 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$  tout en étant difficilement colmatable compte tenu de la distance entre les parois (2,6 cm).



## Cloisonyle

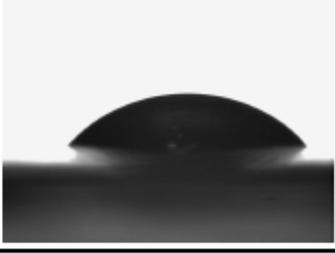
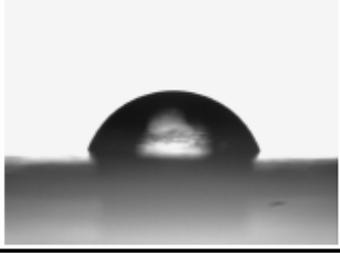
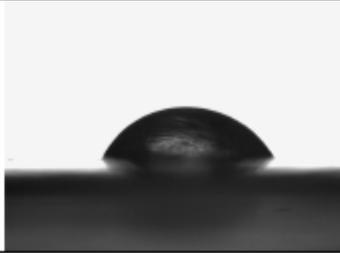
Diiodométhane	Formamide	Eau
		
		
		
$\theta=38.4 \pm 2.5$ GLW= $40.4 \pm 1.2$ G= $18.6 \pm 16.3$ G+= $0.3 \pm 0.6$ GAB= $4.6 \pm 7.5$ GT= $45.0 \pm 7.6$	$\theta=45.1 \pm 4.9$	$\theta=60.8 \pm 12.8$

Figure A-2 : Mesures d'angles de contact à l'aide du goniomètre Krüss G23 sur du Cloisonyle®

## B. ACP DES PARAMETRES DE SURFACES DES COUPONS DU RAR

XLSTAT 7.5.2 - Analyse en Composantes Principales (ACP)

Pondération uniforme (par défaut)

Aucune donnée manquante détectée

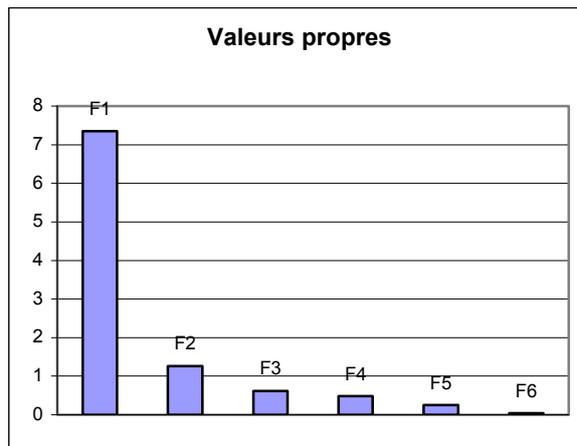
Coefficient de corrélation de Pearson (ACP normée, variances en 1/n)

Sans rotation des axes

Nombre de facteurs associés à des valeurs propres non triviales : 6

Moyenne et écart-type des colonnes :

	Moyenne	Ecart-type
Ra	0,060	0,047
Rz	0,597	0,353
Rmax	1,114	0,666
Rpk	0,102	0,054
Rvk	0,164	0,109
gamma	44,086	7,720
gamma L	38,986	4,735
gamma A	5,114	3,740
gamma+	1,400	1,480
gamma-	6,857	3,486



Matrice de corrélation :

	Ra	Rz	Rmax	Rpk	Rvk	G	G LW	G AB	G+	G-
Ra	1	<b>0,877</b>	0,651	<b>0,834</b>	<b>0,913</b>	-0,753	-0,650	-0,732	-0,685	-0,129
Rz	<b>0,877</b>	1	<b>0,895</b>	<b>0,920</b>	<b>0,933</b>	<b>-0,837</b>	<b>-0,756</b>	<b>-0,771</b>	<b>-0,814</b>	0,119
Rmax	0,651	<b>0,895</b>	1	<b>0,915</b>	<b>0,816</b>	<b>-0,786</b>	-0,703	-0,731	<b>-0,858</b>	0,213
Rpk	<b>0,834</b>	<b>0,920</b>	<b>0,915</b>	1	<b>0,872</b>	-0,708	-0,580	-0,728	<b>-0,823</b>	0,051
Rvk	<b>0,913</b>	<b>0,933</b>	<b>0,816</b>	<b>0,872</b>	1	<b>-0,814</b>	-0,698	<b>-0,797</b>	<b>-0,835</b>	0,157
gamma	-0,753	<b>-0,837</b>	<b>-0,786</b>	-0,708	<b>-0,814</b>	1	<b>0,929</b>	<b>0,884</b>	<b>0,820</b>	0,154
gamma L	-0,650	<b>-0,756</b>	-0,703	-0,580	-0,698	<b>0,929</b>	1	0,648	0,583	0,003
gamma A	-0,732	<b>-0,771</b>	-0,731	-0,728	<b>-0,797</b>	<b>0,884</b>	0,648	1	<b>0,951</b>	0,311
gamma+	-0,685	<b>-0,814</b>	<b>-0,858</b>	<b>-0,823</b>	<b>-0,835</b>	<b>0,820</b>	0,583	<b>0,951</b>	1	0,077
gamma-	-0,129	0,119	0,213	0,051	0,157	0,154	0,003	0,311	0,077	1

Valeurs propres :

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Valeur pr	7,350	1,264	0,617	0,480	0,250	0,040
% varianc	73,499	12,638	6,171	4,795	2,496	0,402
% cumul	73,499	86,136	92,308	97,103	99,598	100,000

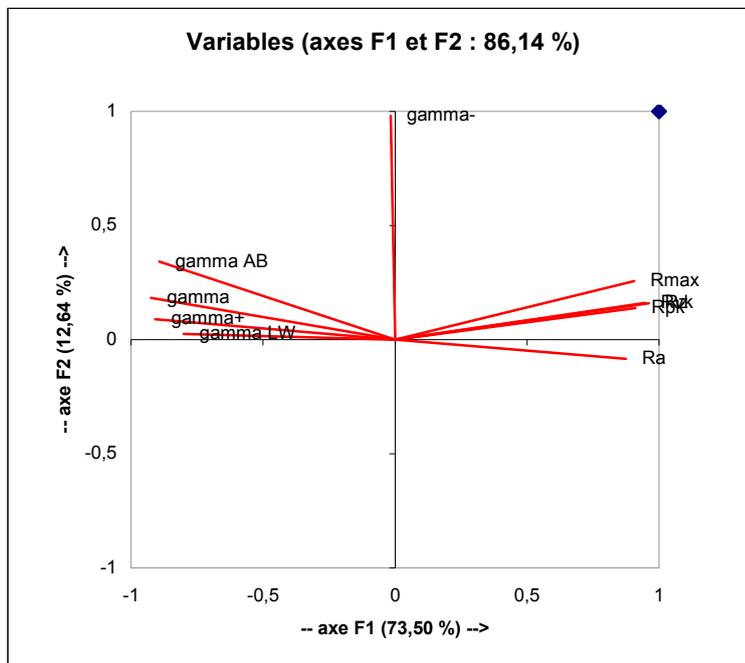
Nombre de valeurs propres triviales supprimées : 4

Vecteurs propres :

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ra	0,322	-0,075	0,141	0,663	-0,148	-0,120
Rz	0,354	0,142	0,031	0,180	0,133	0,870
Rmax	0,334	0,229	0,054	-0,337	0,477	-0,127
Rpk	0,336	0,123	0,364	0,111	0,496	-0,277
Rvk	0,349	0,144	0,105	0,234	-0,413	-0,296
gamma	-0,341	0,163	0,409	0,120	0,083	0,030
gamma L	-0,295	0,023	0,753	-0,057	-0,145	0,156
gamma A	-0,329	0,304	-0,113	0,311	0,362	-0,138
gamma+	-0,335	0,080	-0,272	0,471	0,234	0,060
gamma-	-0,006	0,872	-0,107	-0,111	-0,320	0,002

Coordonnées des variables :

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ra	0,874	-0,084	0,110	0,459	-0,074	-0,024
Rz	0,961	0,160	0,024	0,124	0,066	0,174
Rmax	0,906	0,257	0,042	-0,233	0,238	-0,026
Rpk	0,910	0,138	0,286	0,077	0,248	-0,056
Rvk	0,946	0,162	0,083	0,162	-0,206	-0,059
gamma	-0,924	0,183	0,322	0,083	0,041	0,006
gamma L	-0,801	0,026	0,592	-0,039	-0,073	0,031
gamma A	-0,892	0,341	-0,089	0,215	0,181	-0,028
gamma+	-0,909	0,090	-0,214	0,326	0,117	0,012
gamma-	-0,016	0,980	-0,084	-0,077	-0,160	0,000



Cosinus carrés des variables :

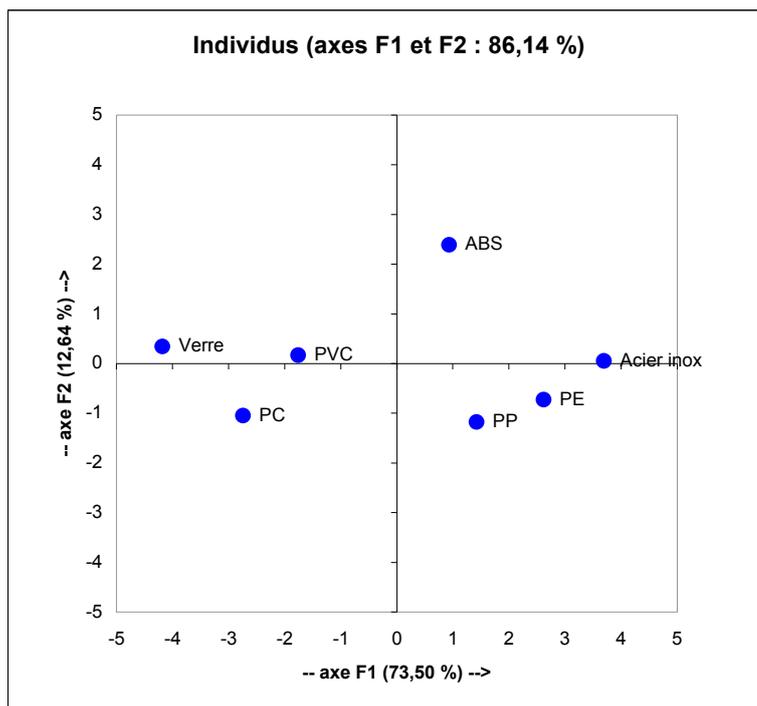
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ra	0,764	0,007	0,012	0,210	0,005	0,001
Rz	0,923	0,026	0,001	0,015	0,004	0,030
Rmax	0,820	0,066	0,002	0,054	0,057	0,001
Rpk	0,829	0,019	0,082	0,006	0,061	0,003
Rvk	0,895	0,026	0,007	0,026	0,043	0,004
gamma	0,854	0,033	0,103	0,007	0,002	0,000
gamma L	0,642	0,001	0,350	0,002	0,005	0,001
gamma A	0,796	0,116	0,008	0,046	0,033	0,001
gamma+	0,826	0,008	0,046	0,106	0,014	0,000
gamma-	0,000	0,961	0,007	0,006	0,026	0,000

Contributions des variables (%) :

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ra	10,397	0,562	1,978	43,892	2,183	1,431
Rz	12,565	2,030	0,094	3,232	1,756	75,704
Rmax	11,163	5,225	0,289	11,347	22,706	1,621
Rpk	11,278	1,510	13,218	1,223	24,627	7,697
Rvk	12,173	2,064	1,104	5,476	17,069	8,744
gamma	11,625	2,647	16,759	1,441	0,689	0,088
gamma L	8,728	0,052	56,716	0,325	2,114	2,442
gamma A	10,828	9,213	1,282	9,651	13,119	1,912
gamma+	11,238	0,640	7,412	22,192	5,474	0,362
gamma-	0,004	<b>76,056</b>	1,149	1,221	10,261	0,000

Coordonnées des individus :

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Acier ino)	3,694	0,054	-0,728	0,517	-0,699	0,175
ABS	0,933	2,386	0,409	-0,629	-0,018	-0,106
PVC	-1,758	0,166	0,504	0,269	0,544	0,391
PE	2,620	-0,725	0,800	0,835	0,427	-0,239
PP	1,425	-1,176	-0,775	-1,172	0,442	-0,018
PC	-2,740	-1,047	0,921	-0,426	-0,761	-0,038
Verre	-4,176	0,343	-1,131	0,607	0,066	-0,165



Cosinus carrés des individus :

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Acier inox)	<b>0,912</b>	0,000	0,035	0,018	0,033	0,002
ABS	0,122	<b>0,797</b>	0,023	0,055	0,000	0,002
PVC	<b>0,794</b>	0,007	0,065	0,019	0,076	0,039
PE	<b>0,766</b>	0,059	0,071	0,078	0,020	0,006
PP	0,364	0,248	0,108	0,246	0,035	0,000
PC	<b>0,735</b>	0,107	0,083	0,018	0,057	0,000
Verre	<b>0,907</b>	0,006	0,067	0,019	0,000	0,001

Contributions des individus (%) :

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Acier inox)	26,529	0,033	12,264	7,951	28,010	10,927
ABS	1,694	64,351	3,876	11,787	0,019	3,987
PVC	6,006	0,310	5,870	2,156	16,969	54,403
PE	13,347	5,939	14,834	20,771	10,435	20,389
PP	3,946	15,638	13,917	40,936	11,159	0,119
PC	14,589	12,402	19,632	5,419	33,161	0,512
Verre	33,889	1,327	29,607	10,980	0,248	9,663

## C. SUIVI DES REACTEURS A LITS FIXES : « PE » ET « PP »

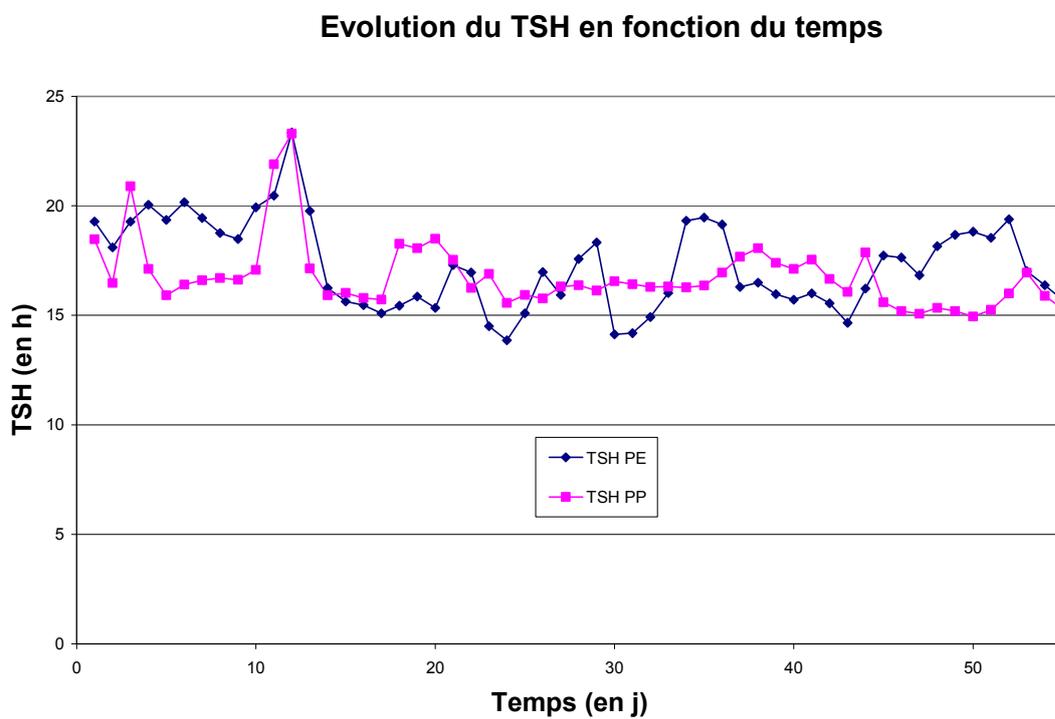


Figure C-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PE et PP (C1)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps (Réacteur "PE")

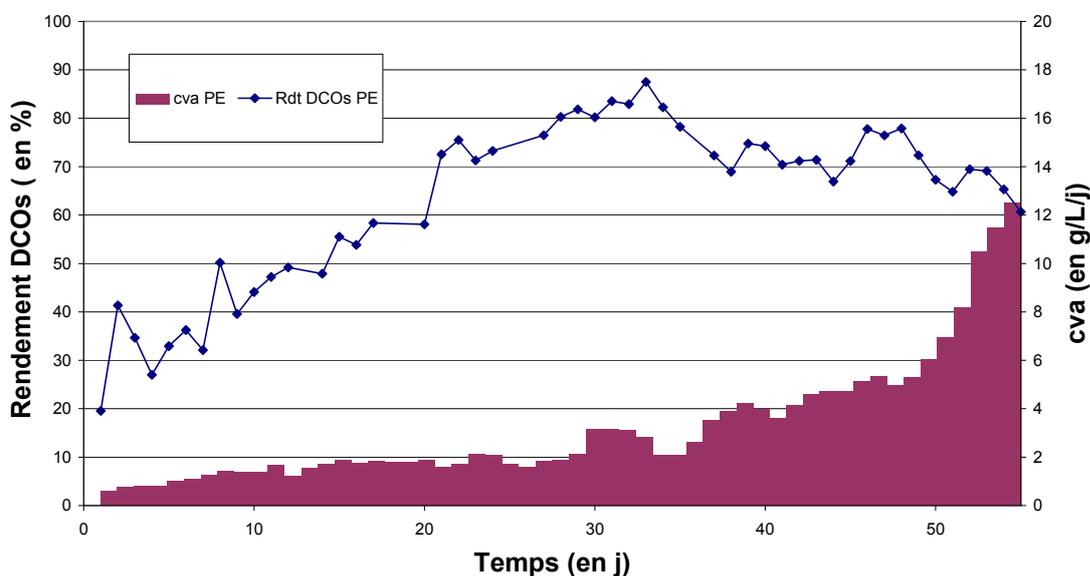


Figure C-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA ( PE-C1)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps (Réacteur PP)

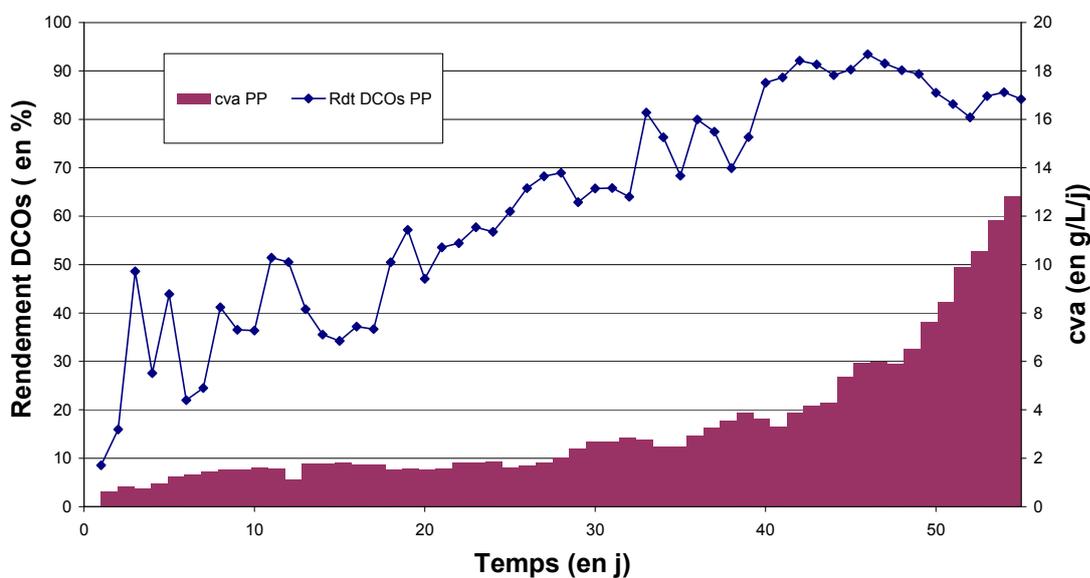


Figure C-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PP-C1)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cve en fonction du temps (Réacteur "PE")

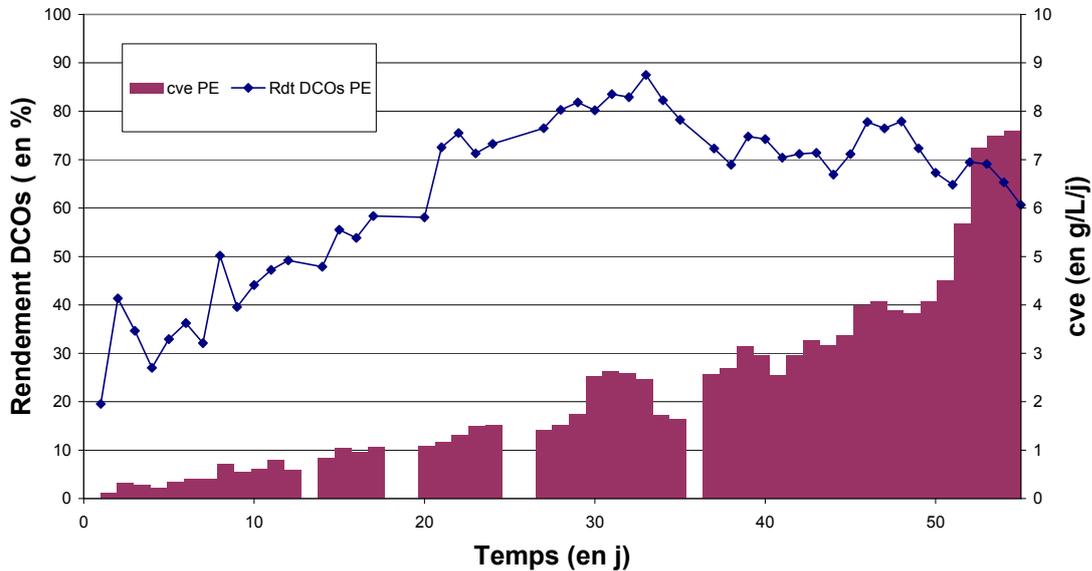


Figure C-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PE-C1)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cve en fonction du temps (Réacteur "PP")

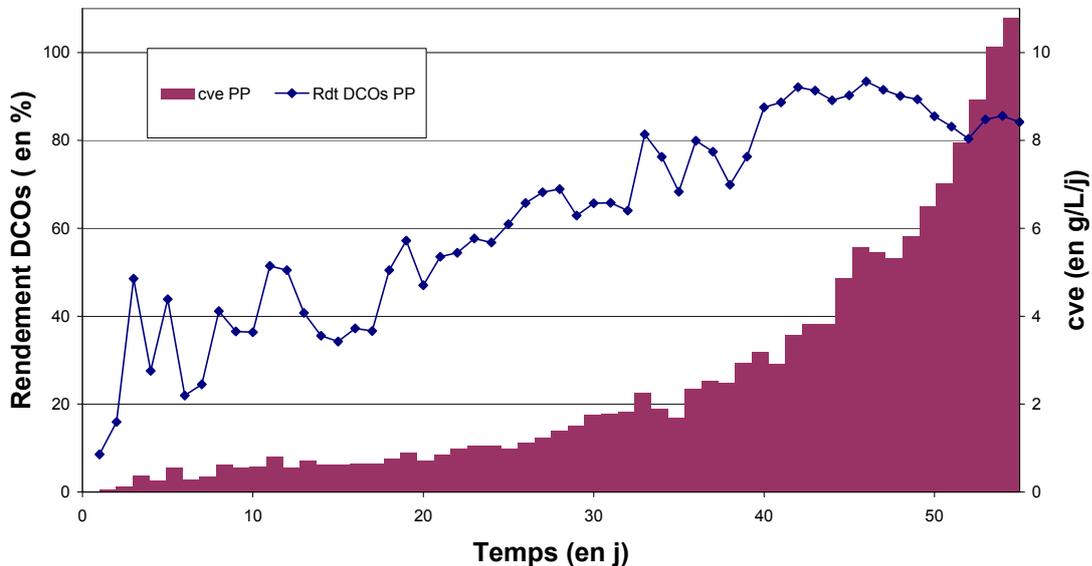


Figure C-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PP-C1)

**Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps  
(Réacteur "PE")**

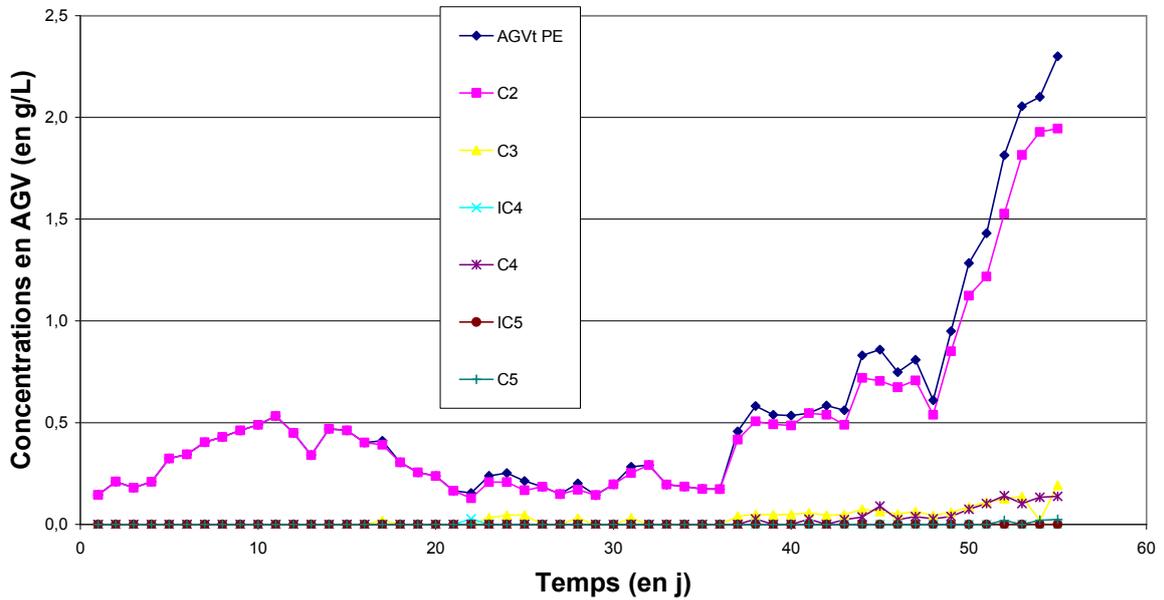


Figure C-6 : Evolution des concentrations en AGV (PE-C1)

**Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps  
(Réacteur "PP")**

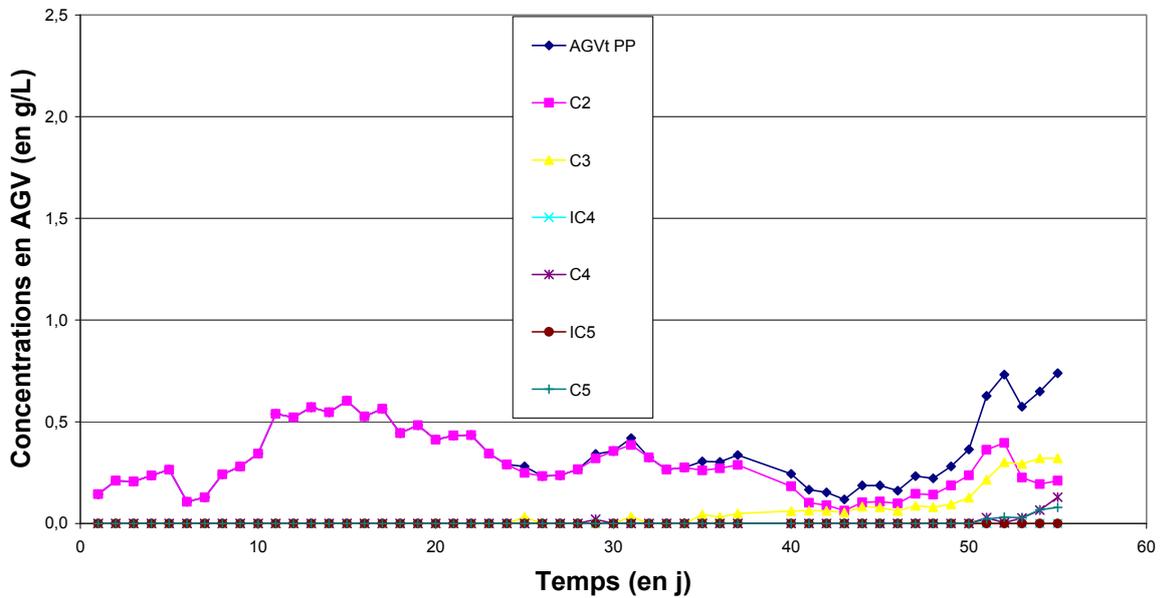


Figure C-7 : Evolution des concentrations en AGV (PP-C1)

### Evolutions des concentrations en matières sèches en fonction du temps (Réacteur "PE")

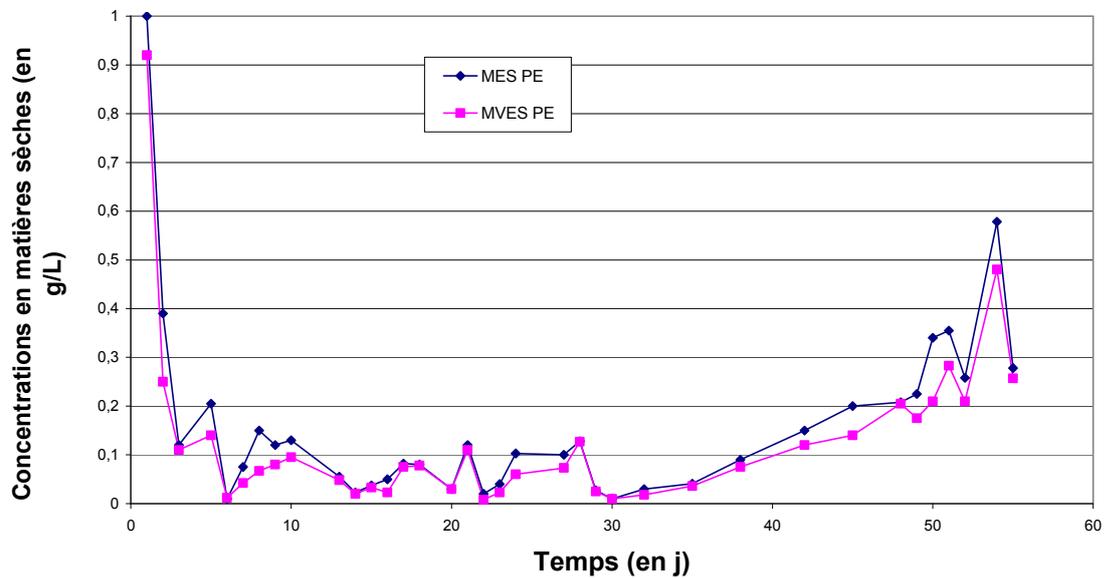


Figure C-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PE-C1)

### Evolutions des concentrations en matières sèches en fonction du temps (Réacteur "PP")

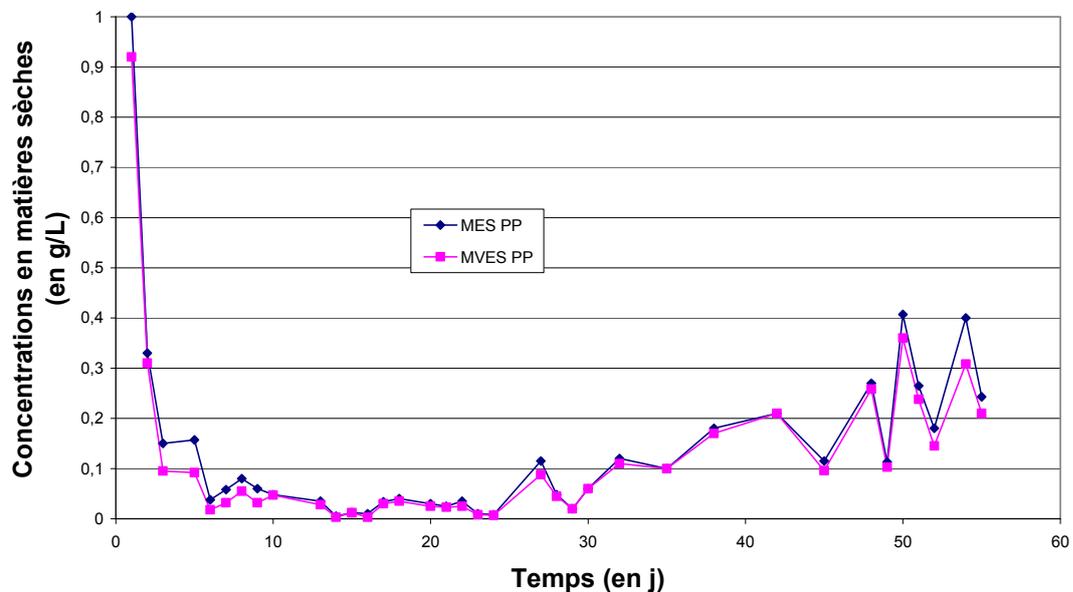


Figure C-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PP-C1)

## D. SUIVI DES REACTEURS A LITS FIXES : « PVC » ET « BIOFLOW 30® »

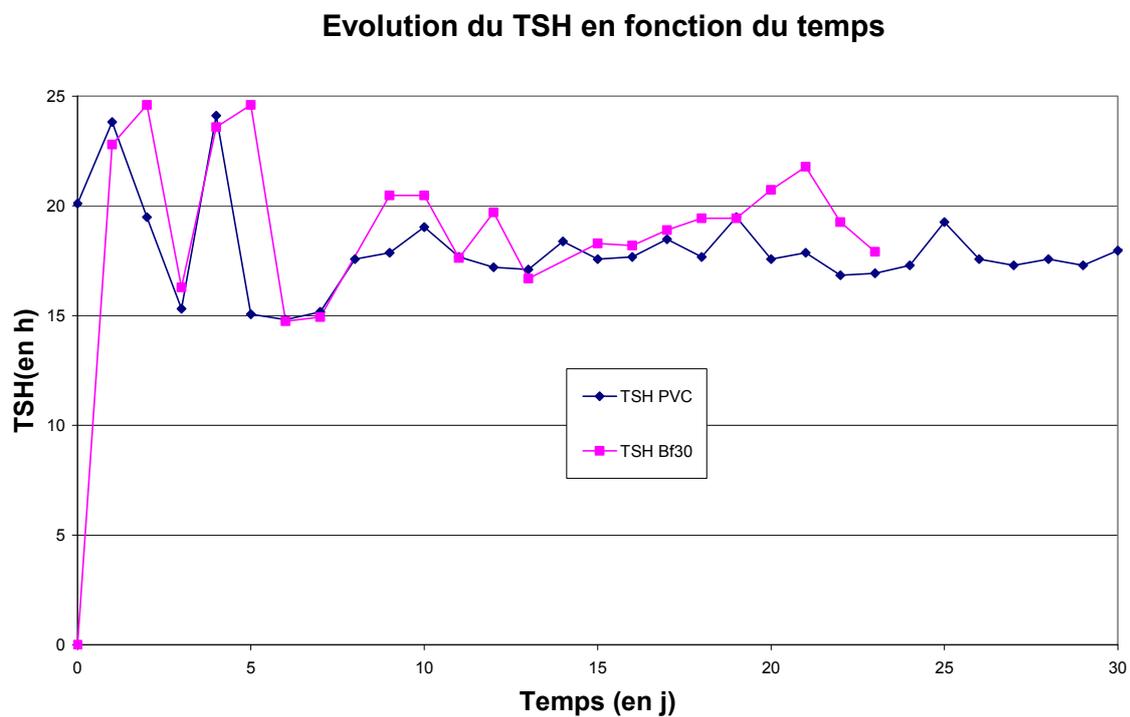


Figure D-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PVC et Bf30 (C2)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps (Réacteur "Bioflow 30")

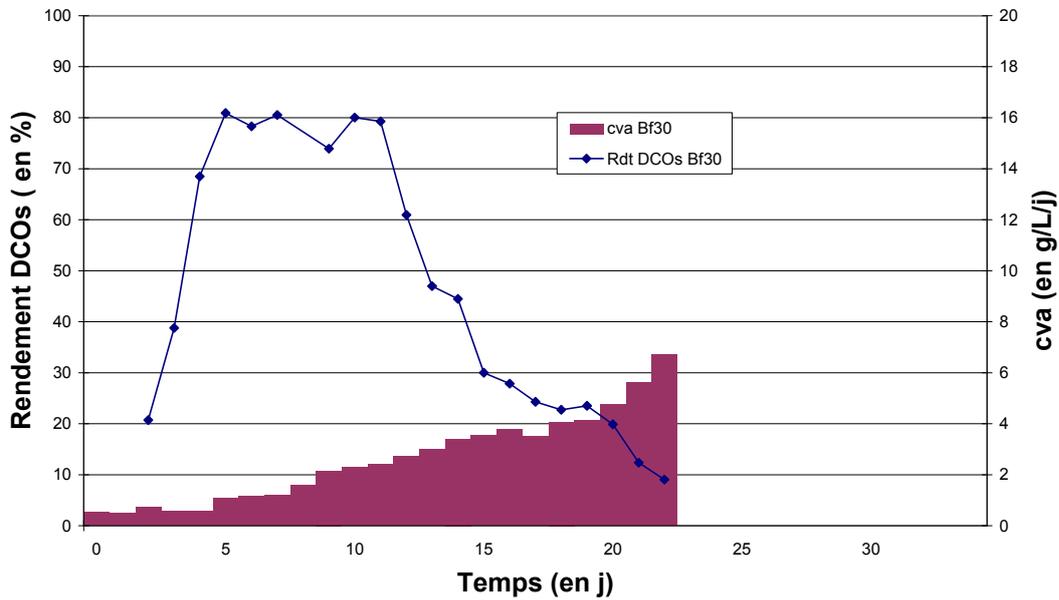


Figure D-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (Bf30-C2)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps (Réacteur "PVC")

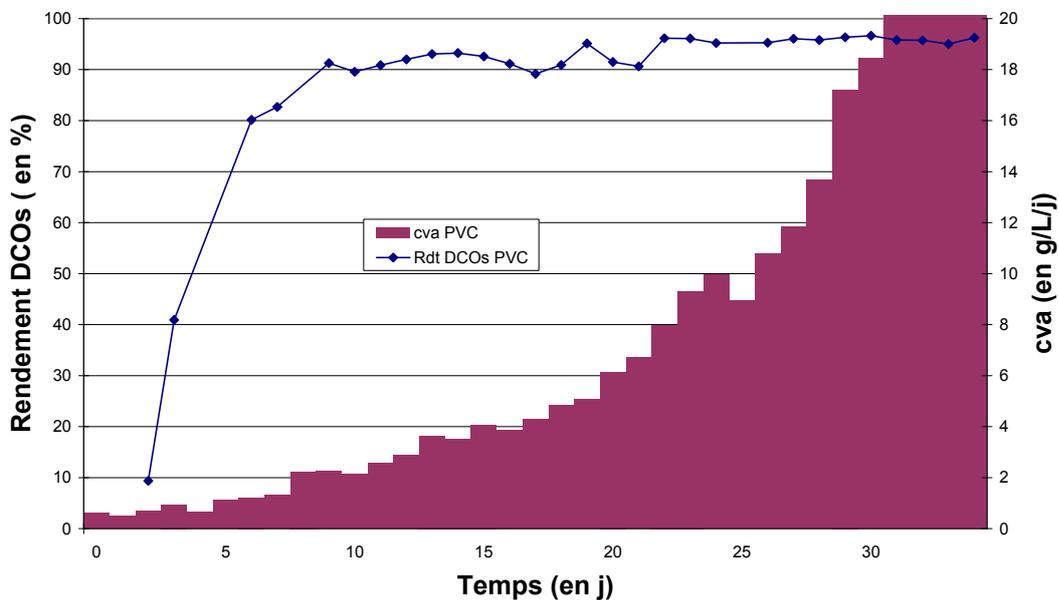


Figure D-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PVC-C2)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cve en fonction du temps (Réacteur "Bioflow 30")

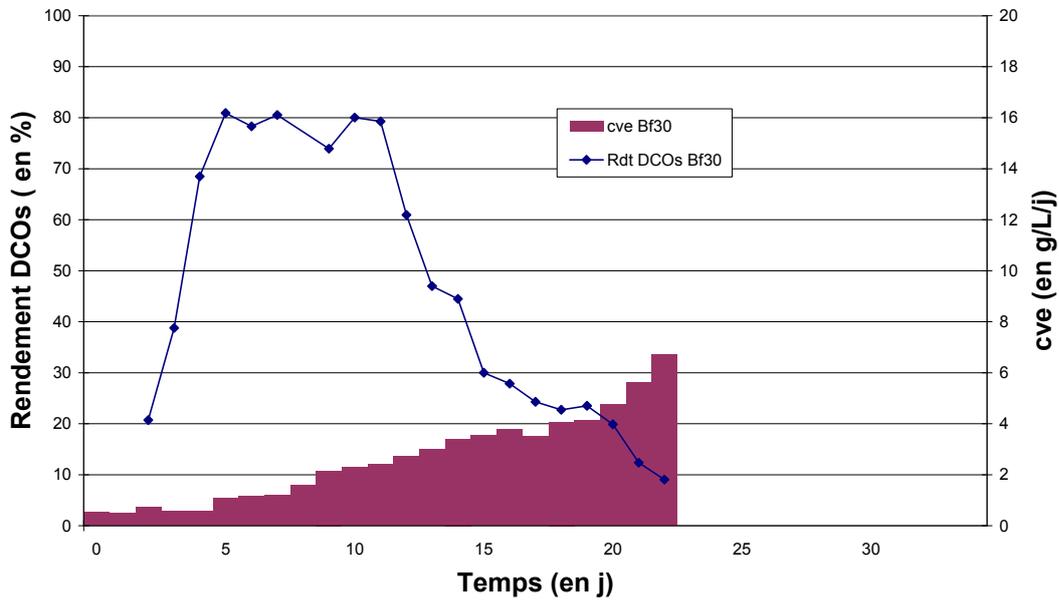


Figure D-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (Bf30-C2)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cve en fonction du temps (Réacteur "PVC")

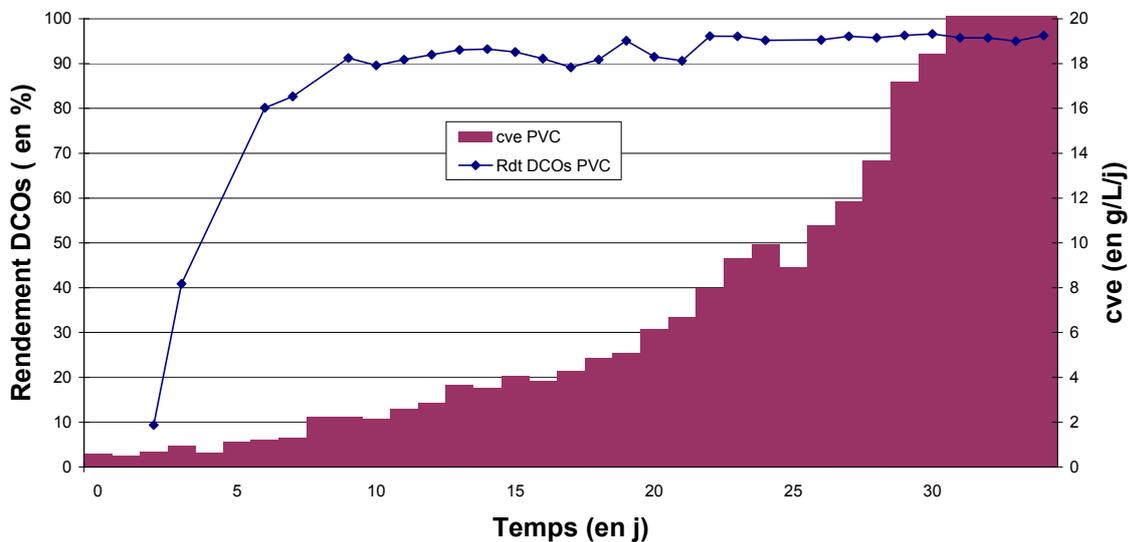


Figure D-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PVC-C2)

### Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps (Réacteur "Bf30")

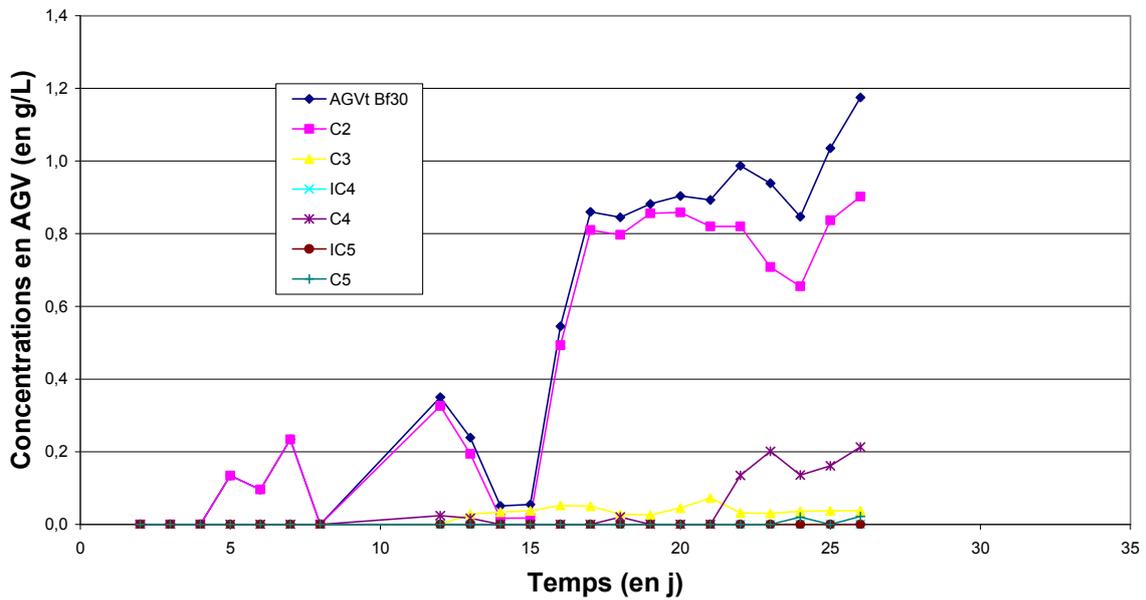


Figure D-6 : Evolution des concentrations en AGV (Bf30-C2)

### Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps (Réacteur "PVC")

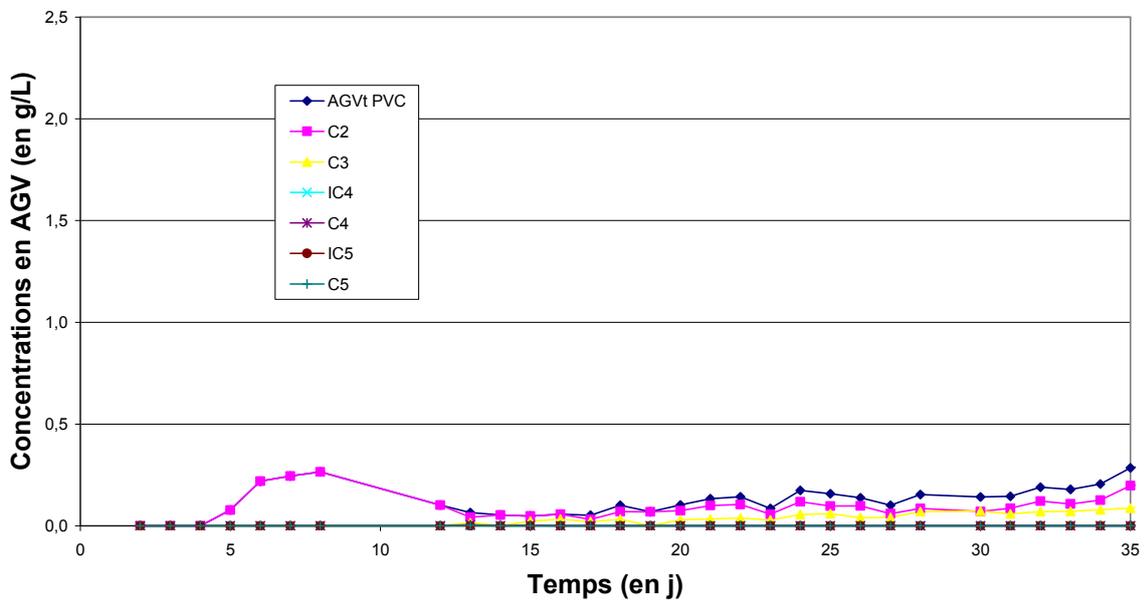


Figure D-7 : Evolution des concentrations en AGV (PVC-C2)

### Evolutions des concentrations en matières sèches en fonction du temps (Réacteur "Bf30")

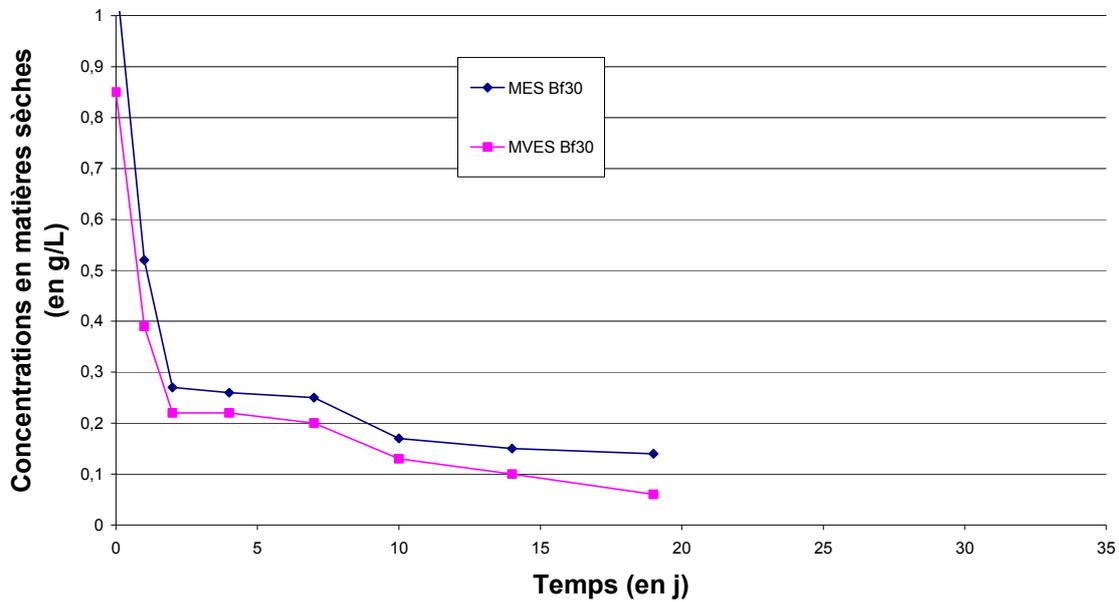


Figure D-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (Bf30-C2)

### Evolutions des concentrations en matières sèches en fonction du temps (Réacteur "PVC")

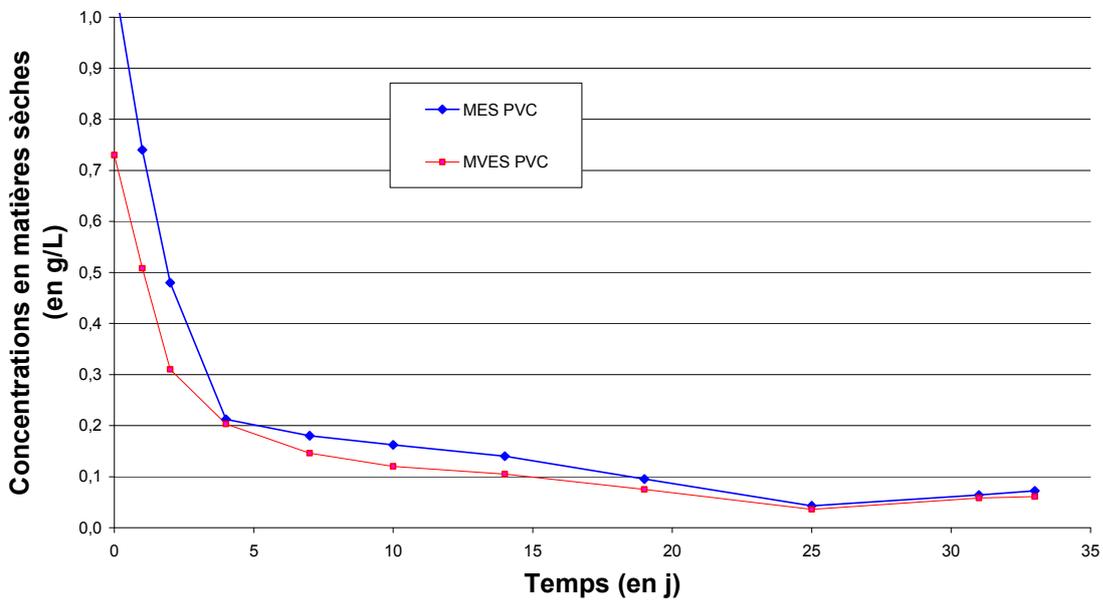


Figure D-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PVC-C2)

## E. SUIVI DES REACTEURS A LITS FIXES : « PP » ET « PVC »

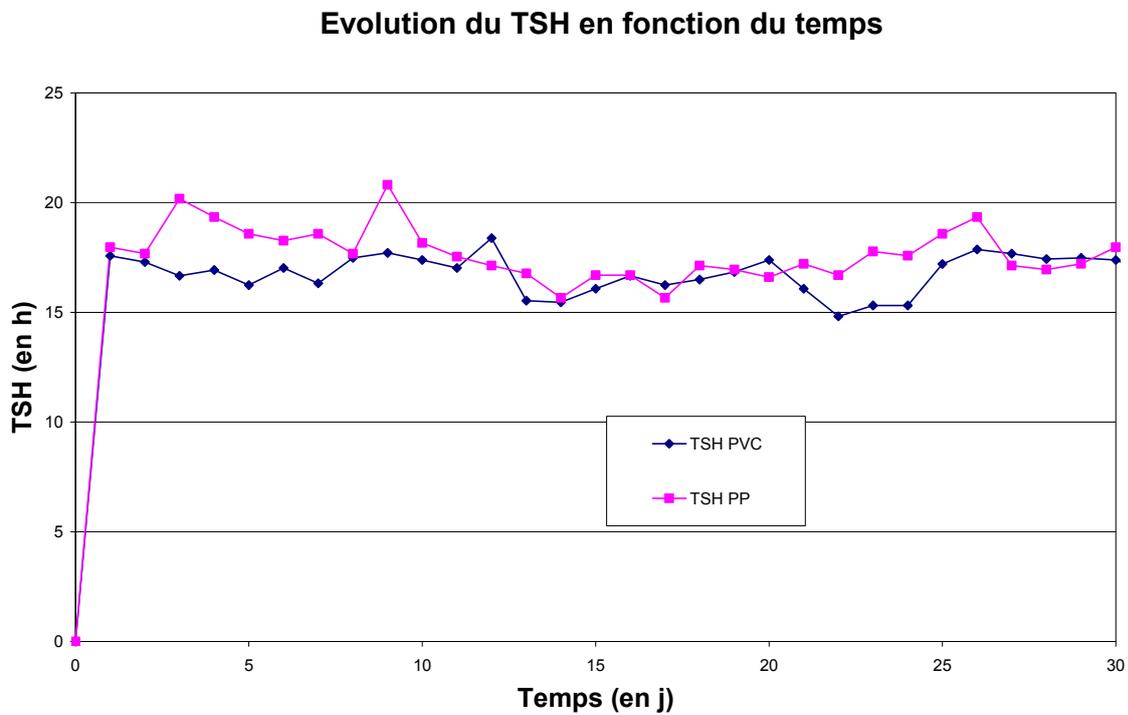


Figure E-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PVC et PP (C3)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps (Réacteur "PP")

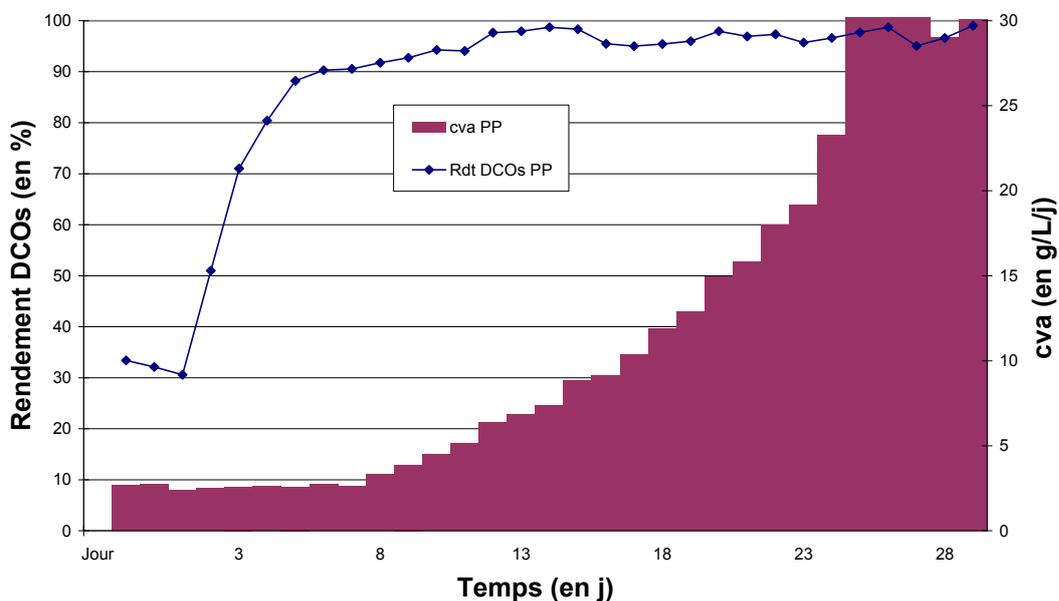


Figure E-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PP-C3)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps (Réacteur PVC)

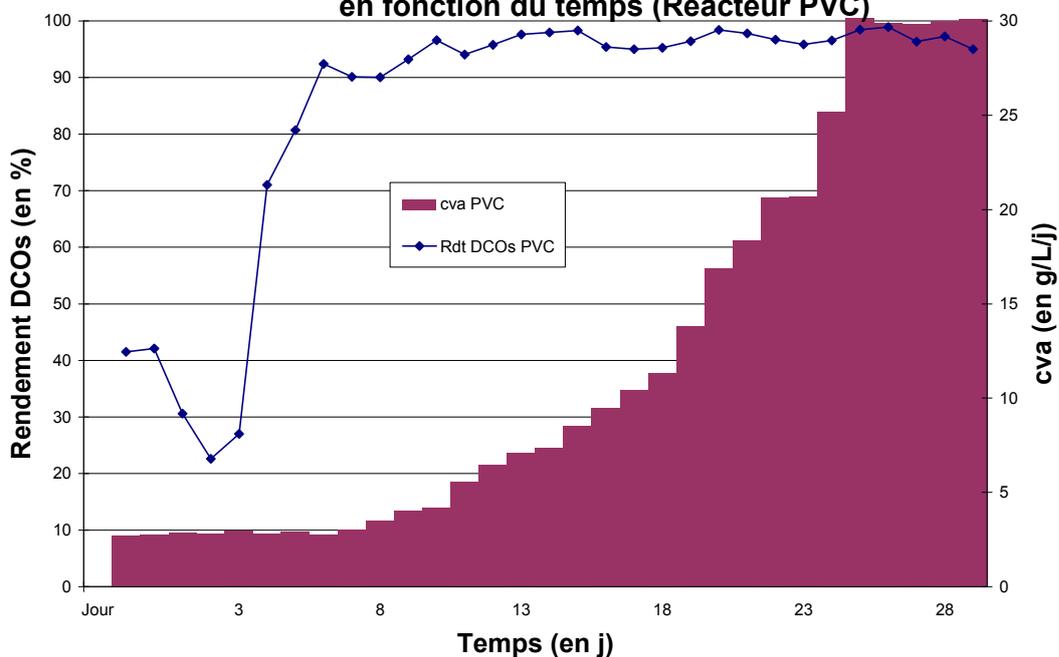


Figure E-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PVC-C3)

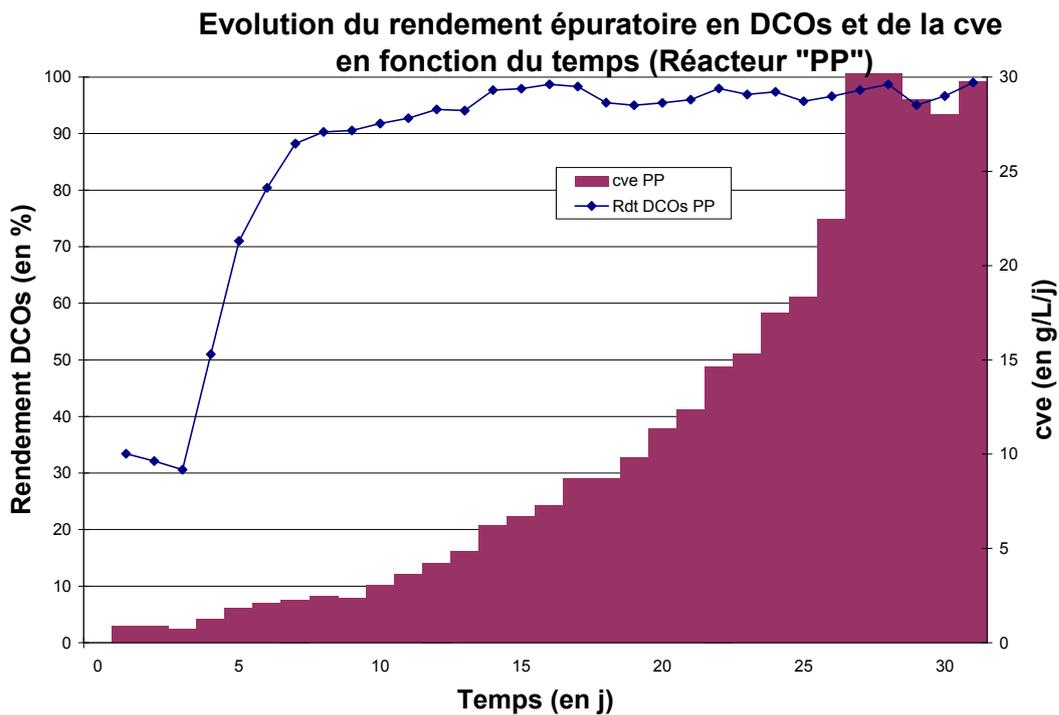


Figure E-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PP-C3)

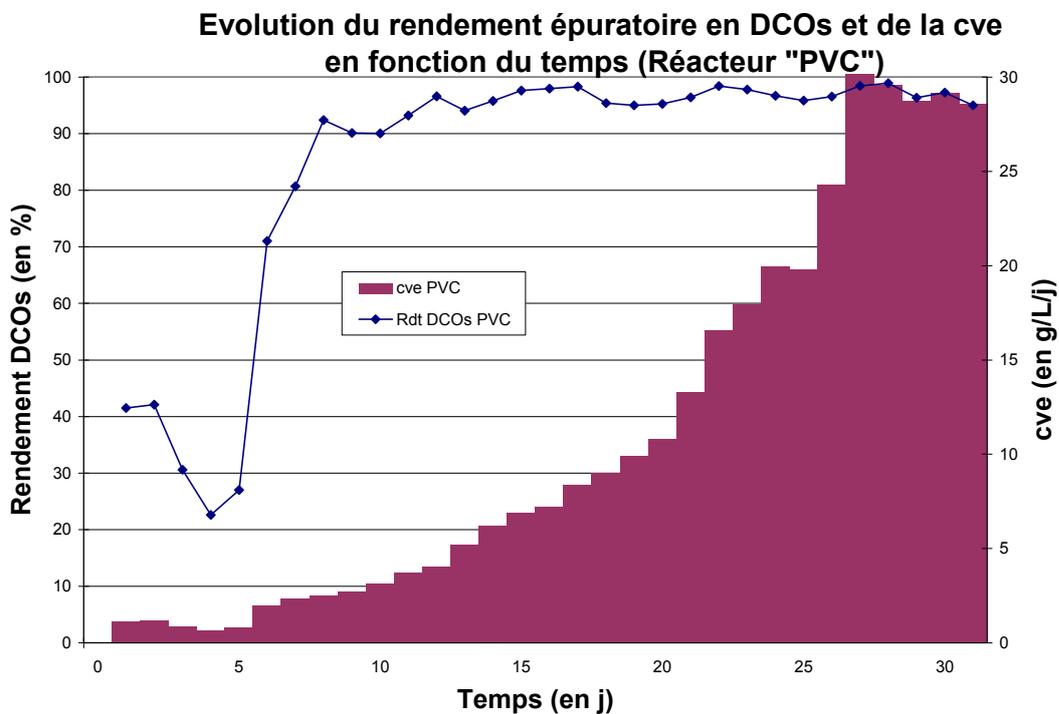


Figure E-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PVC-C3)

### Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps (Réacteur "PP")

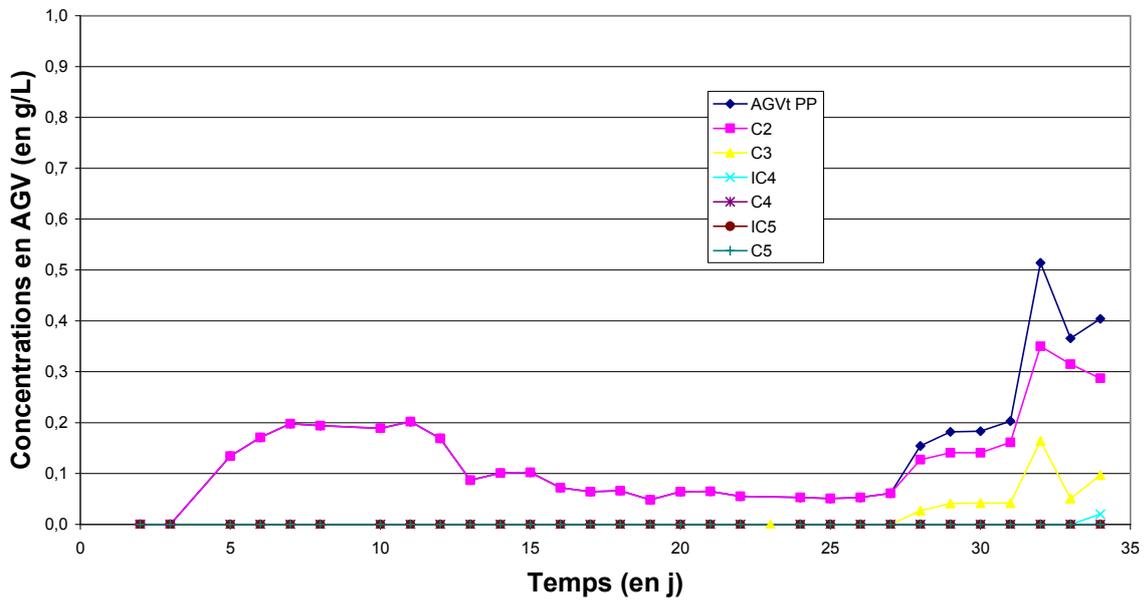


Figure E-6 : Evolution des concentrations en AGV (PP-C3)

### Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps (Réacteur "PVC")

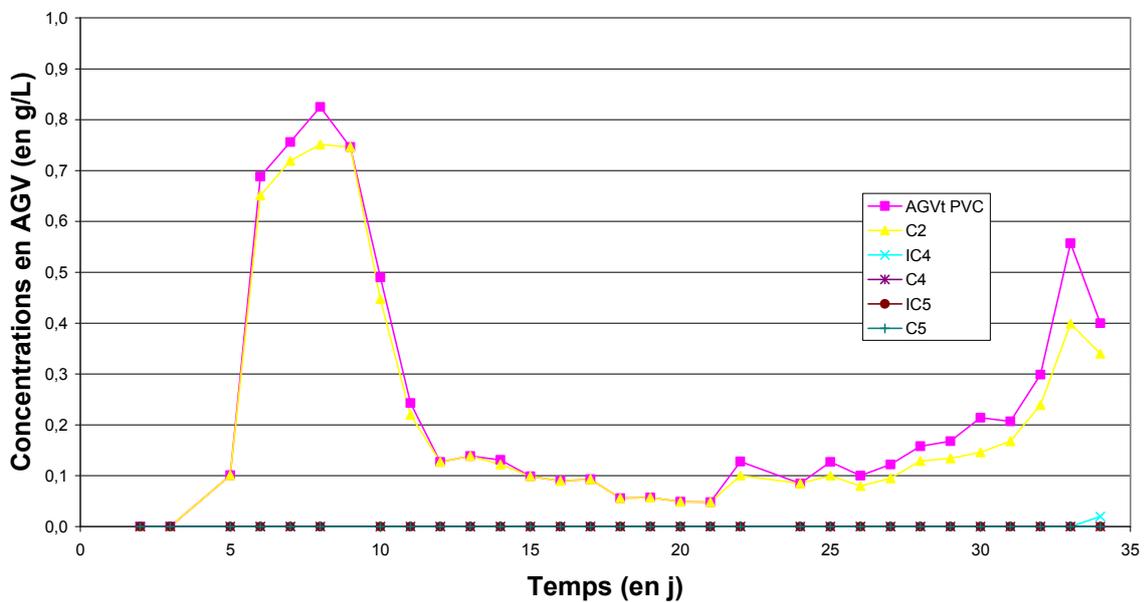


Figure E-7 : Evolution des concentrations en AGV (PVC-C3)

### Evolutions des concentrations en MES et MVES en fonction du temps (Réacteur "PP")

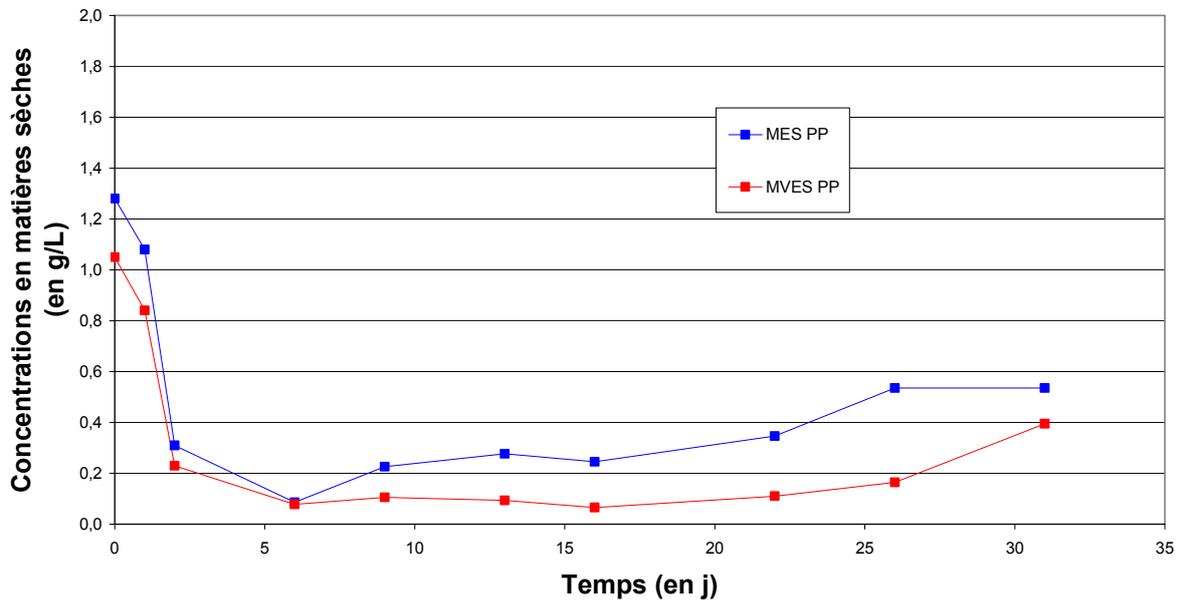


Figure E-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PP-C3)

### Evolutions des concentrations en MES et MVES en fonction du temps (Réacteur "PVC")

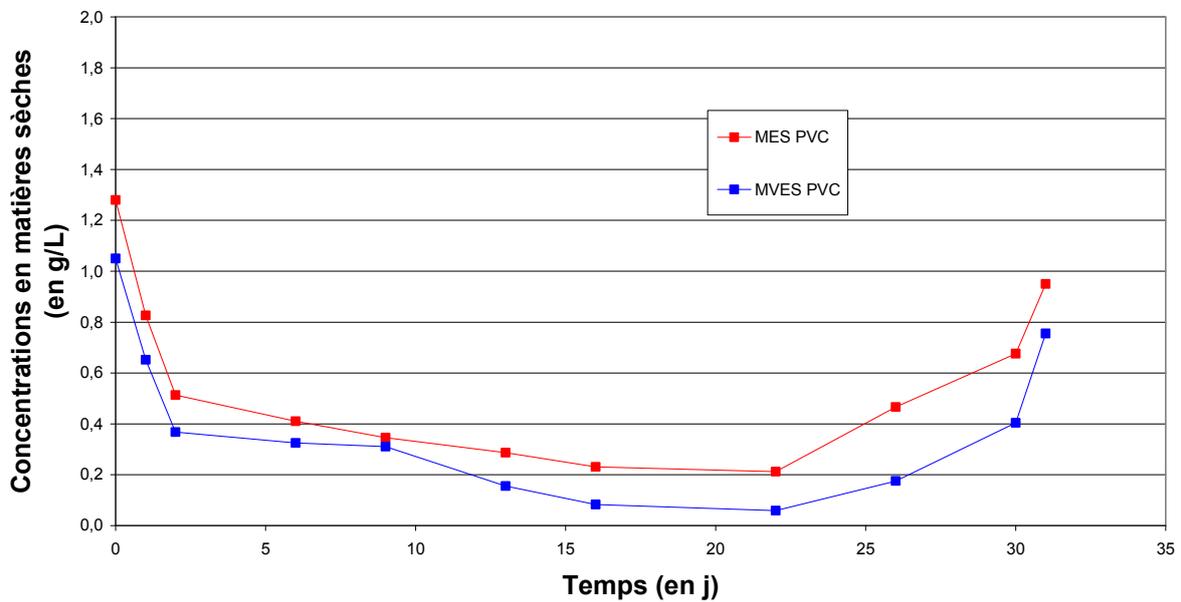


Figure E-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PVC-C3)

## F. SUIVI DES REACTEURS A LITS FIXES : « PE » ET « BIOFLOW 30® »

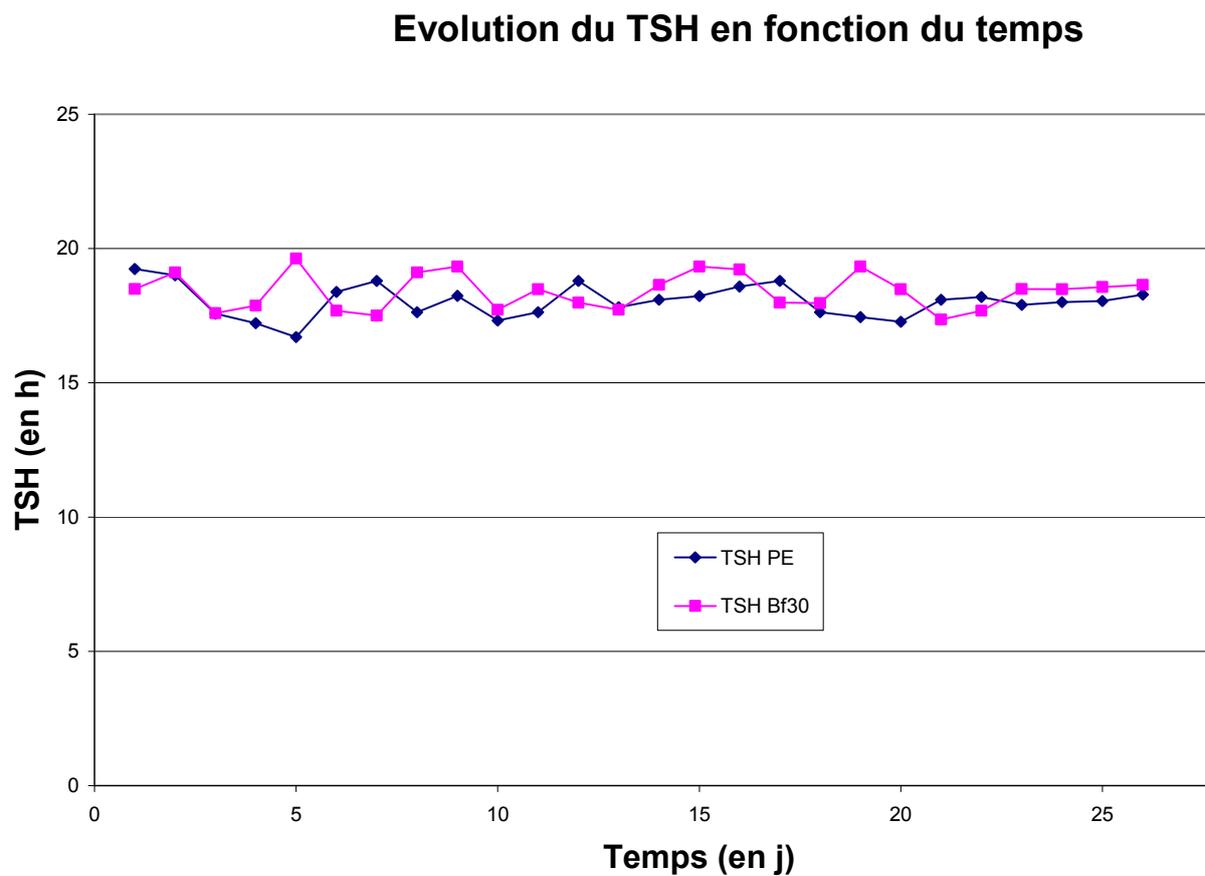


Figure F-1 : Evolution du TSH pour les réacteurs contenant les supports en PE et Bf30 (C4)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps ("Réacteur"PE)

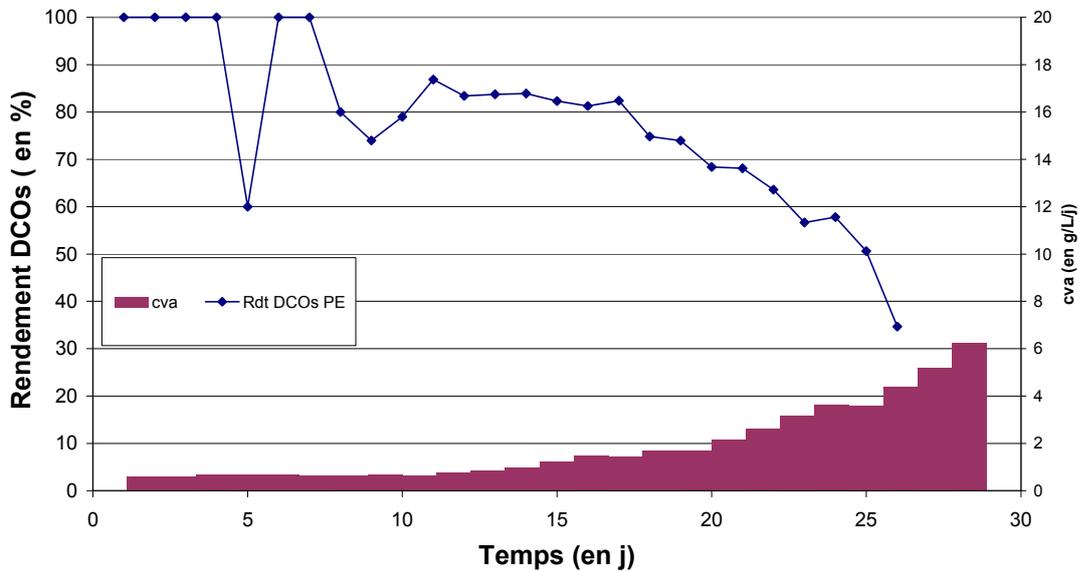


Figure F-2 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (PE-C4)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cva en fonction du temps (Réacteur "Bioflow 30")

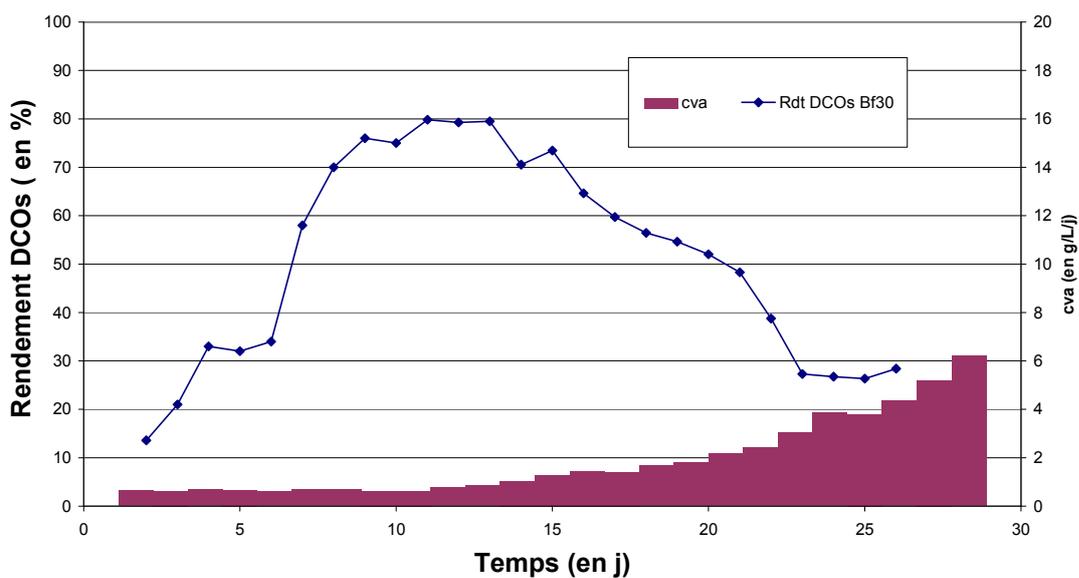


Figure F-3 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVA (Bf30-C4)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cve en fonction du temps ("Réacteur"PE)

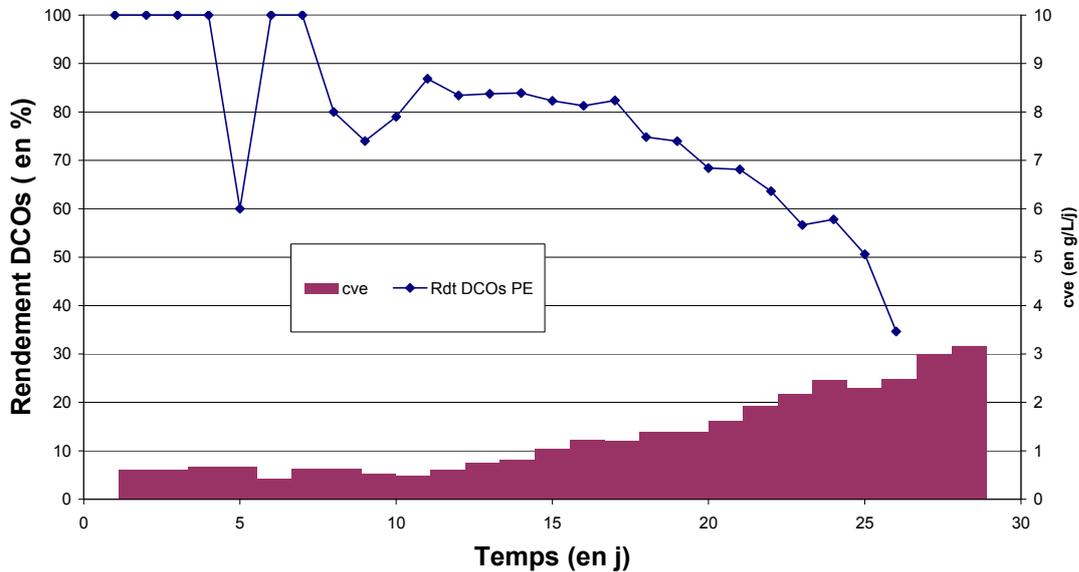


Figure F-4 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (PE-C4)

### Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la cve en fonction du temps (Réacteur "Bioflow 30")

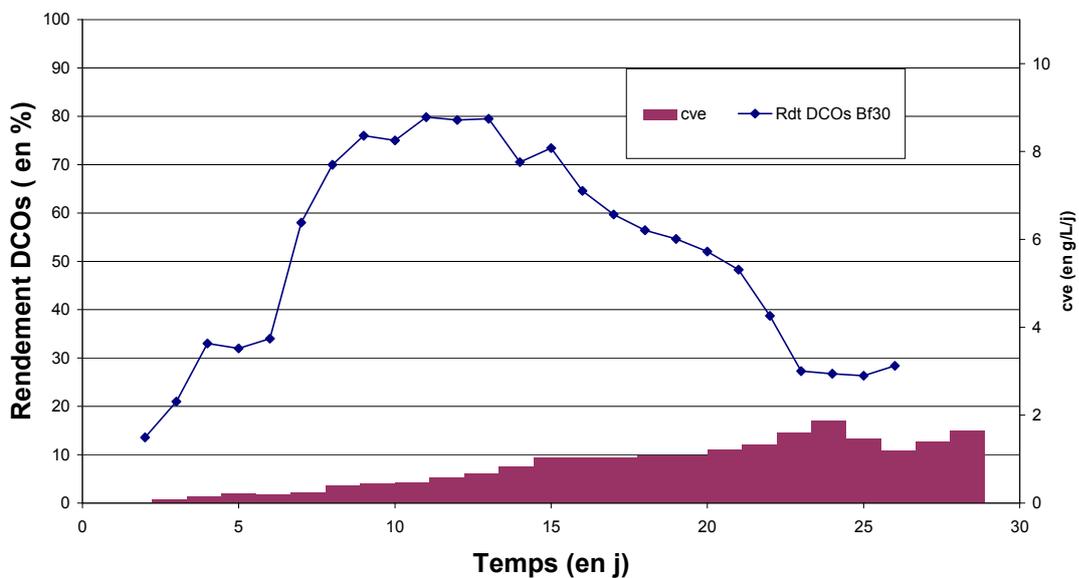


Figure F-5 : Evolution du rendement épuratoire en DCOs et de la CVE (Bf30-C4)

### Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps (Réacteur "PE")

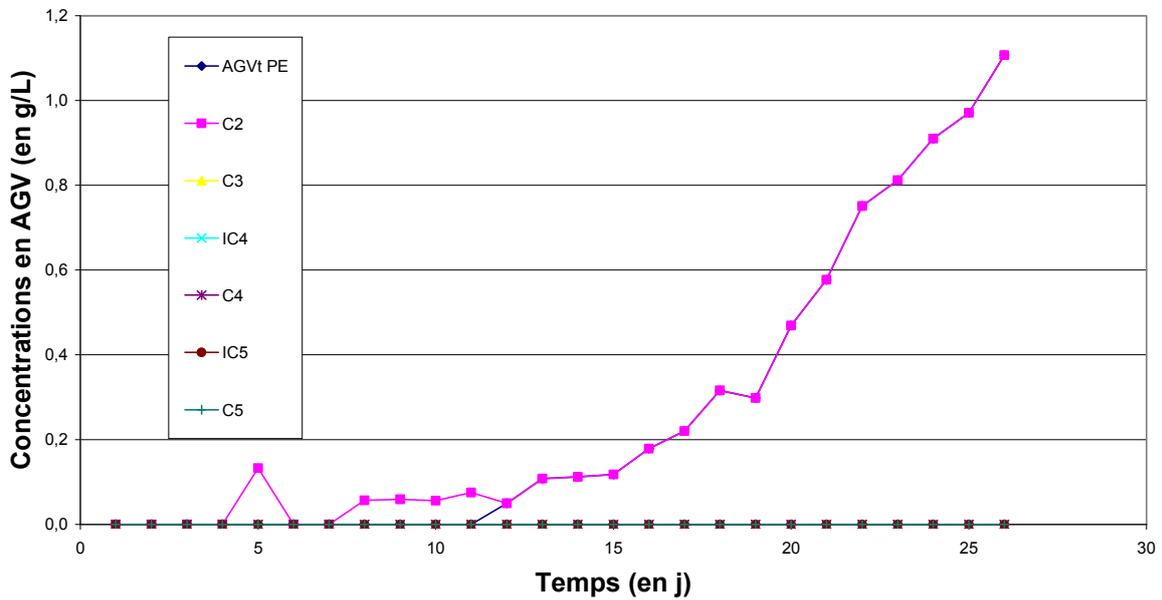


Figure F-6 : Evolution des concentrations en AGV (PE-C4)

### Evolutions des concentrations en AGV en fonction du temps (Réacteur "Bioflow 30")

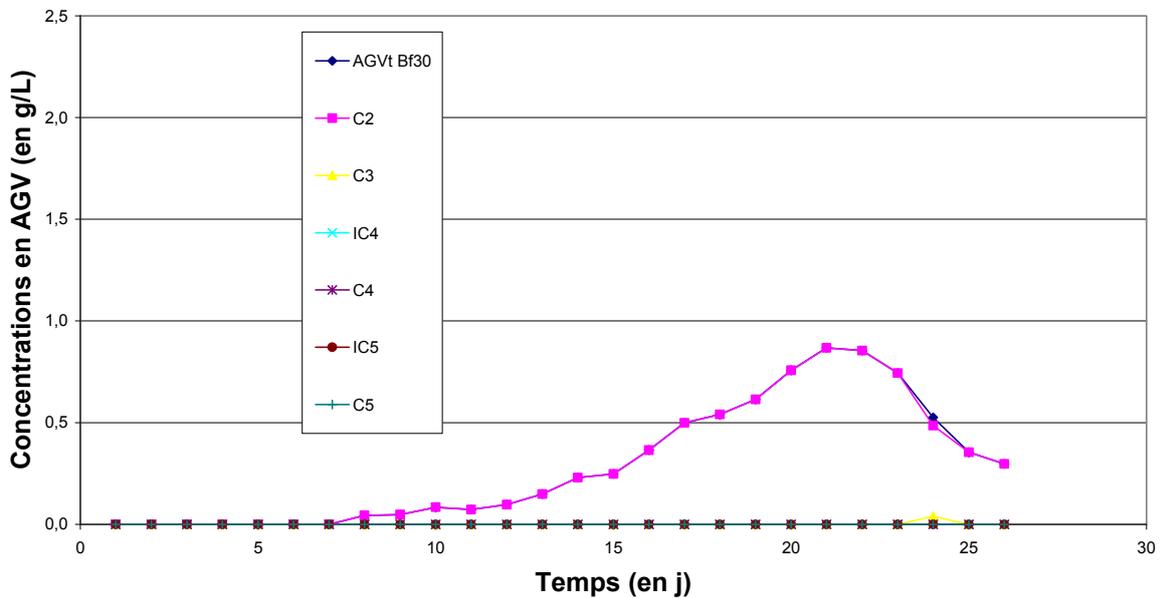


Figure F-7 : Evolution des concentrations en AGV (Bf30-C4)

### Evolutions des concentrations en matières sèches en fonction du temps (Réacteur "PE")

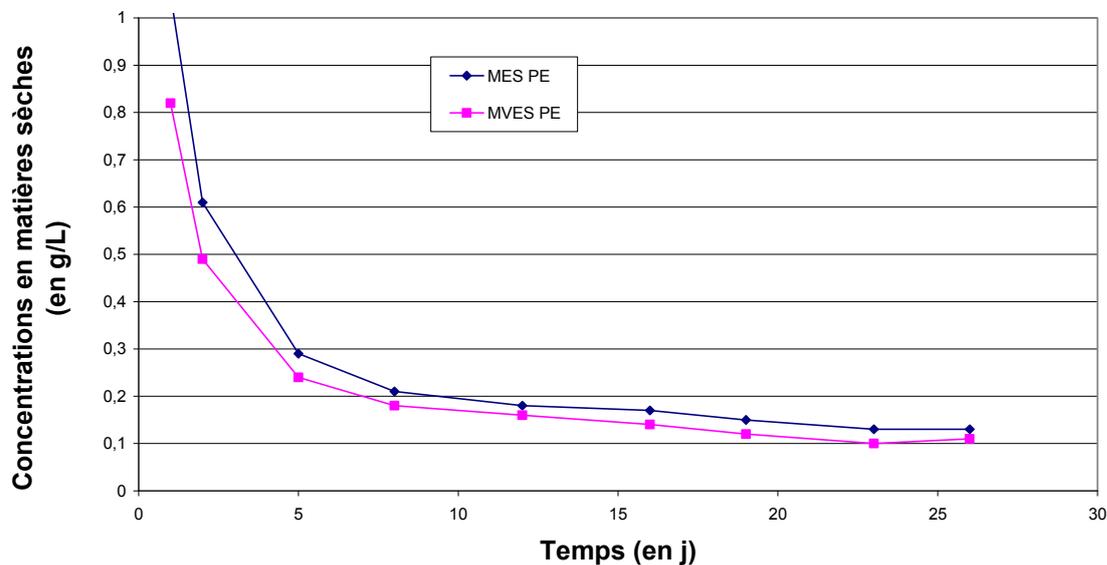


Figure F-8 : Evolution des concentrations en MES et MVES (PE-C4)

### Evolutions des concentrations en matières sèches en fonction du temps (Réacteur "Bioflow 30")

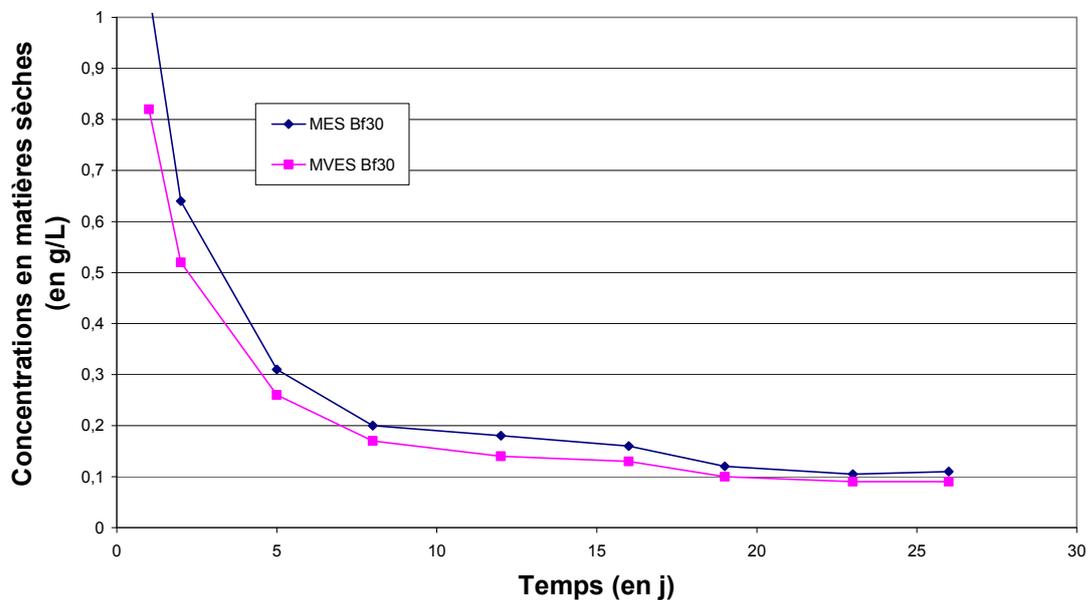


Figure F-9 : Evolution des concentrations en MES et MVES (Bf30-C4)

## G. PROFILS BACTERIENS DES BIOFILMS DES LITS FIXES

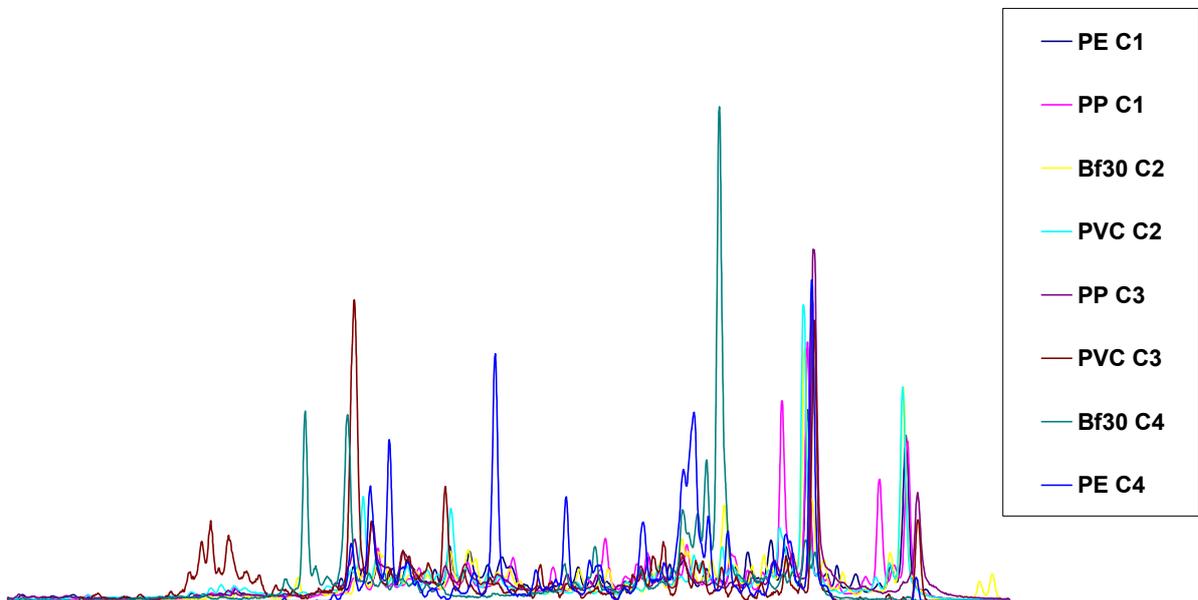


Figure G-1 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des biofilms (C1 à C4)

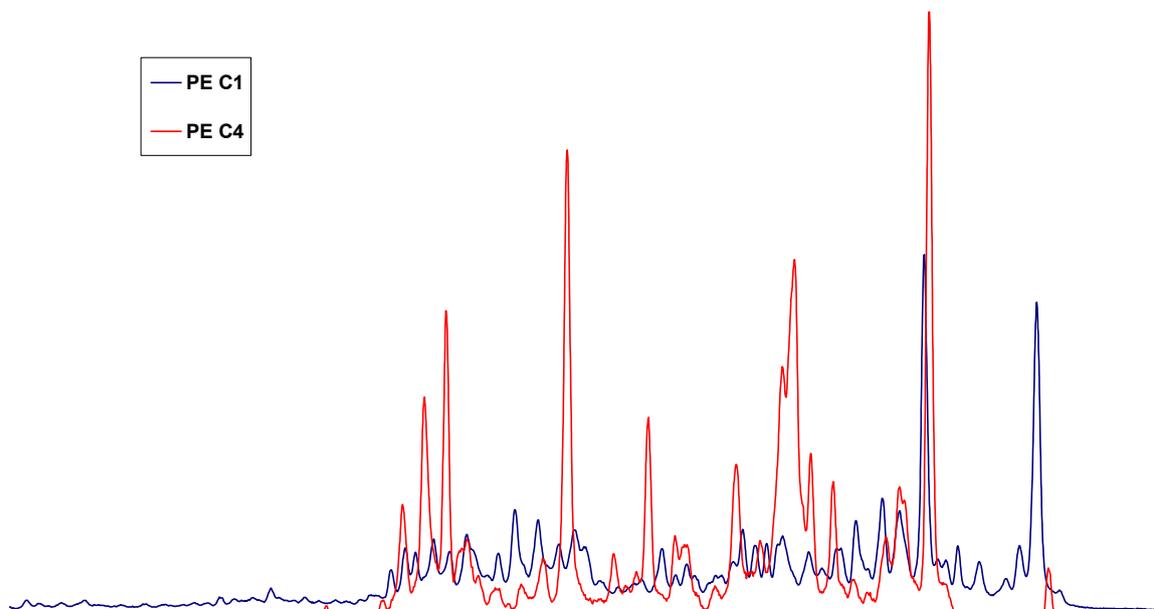


Figure G-2 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports en PE lors des comparatifs C1 et C4

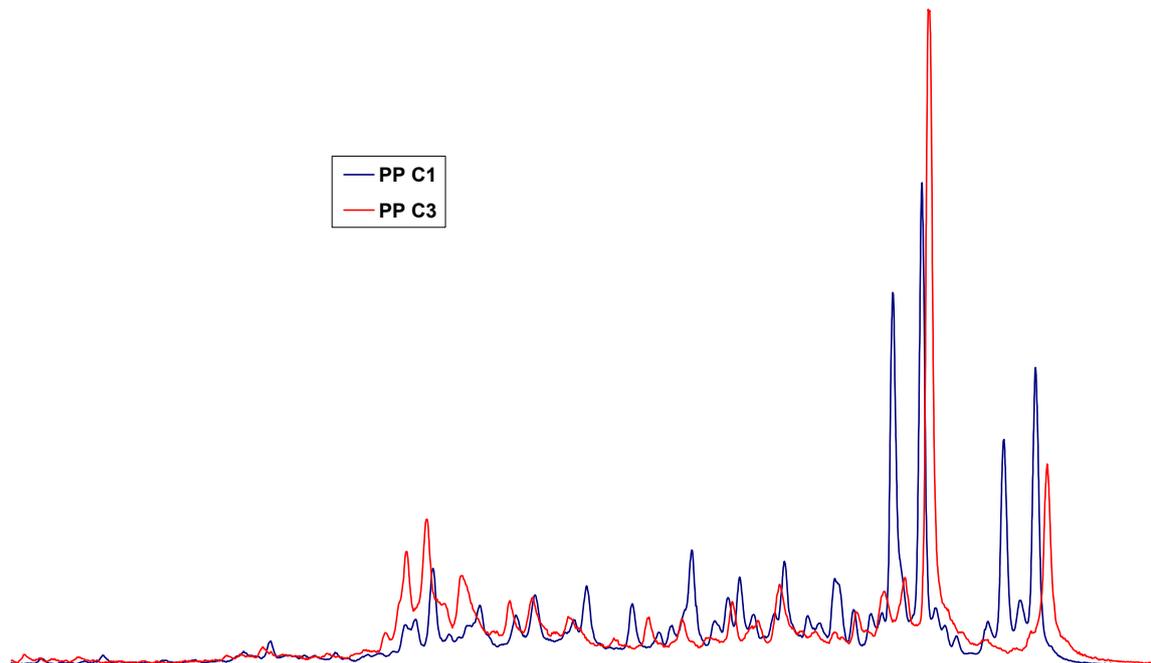


Figure G-3 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports en PP lors des comparatifs C1 et C3

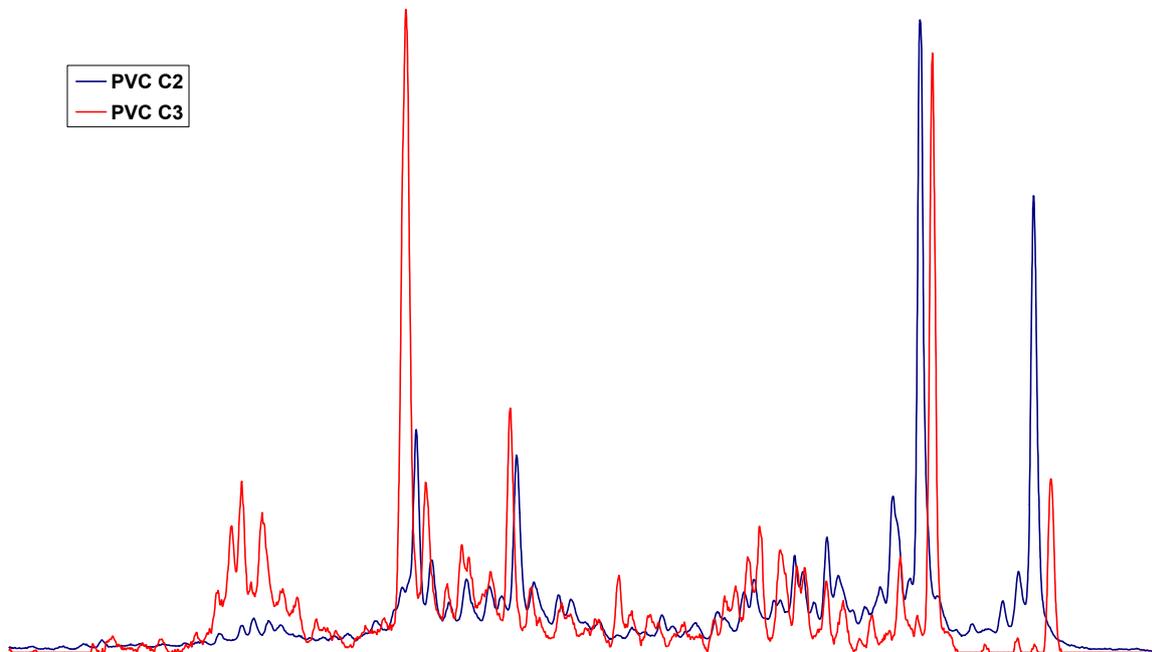


Figure G-4 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports en PVC lors des comparatifs C2 et C4

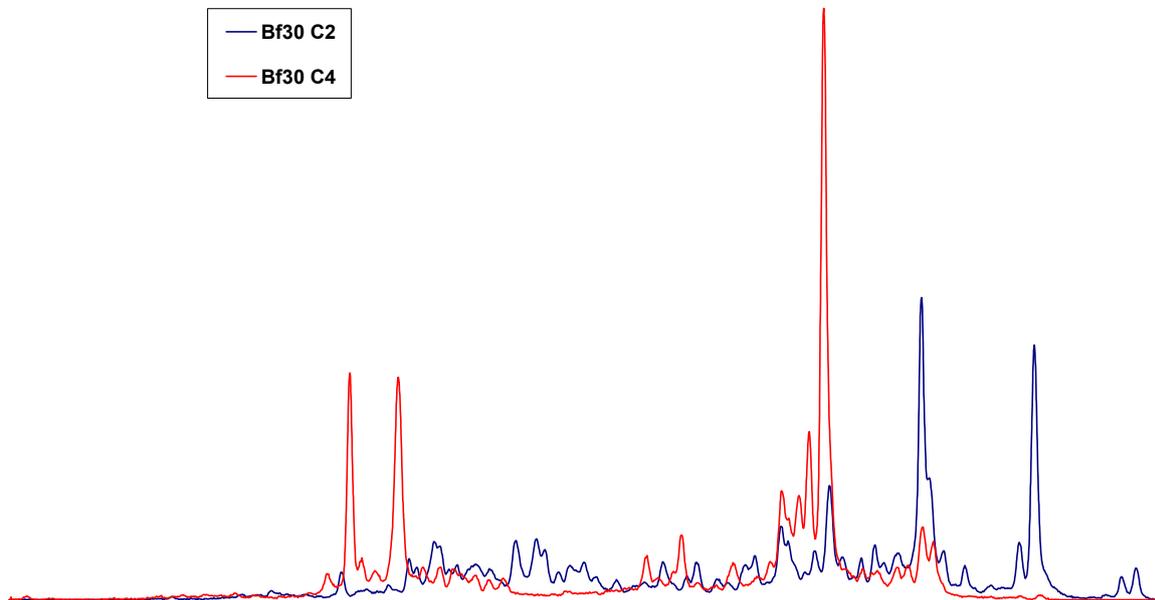


Figure G-5 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des bactéries des supports Bf30 lors des comparatifs C2 et C4

## H. PROFILS ARCHEENS DES BIOFILMS DES LITS FIXES

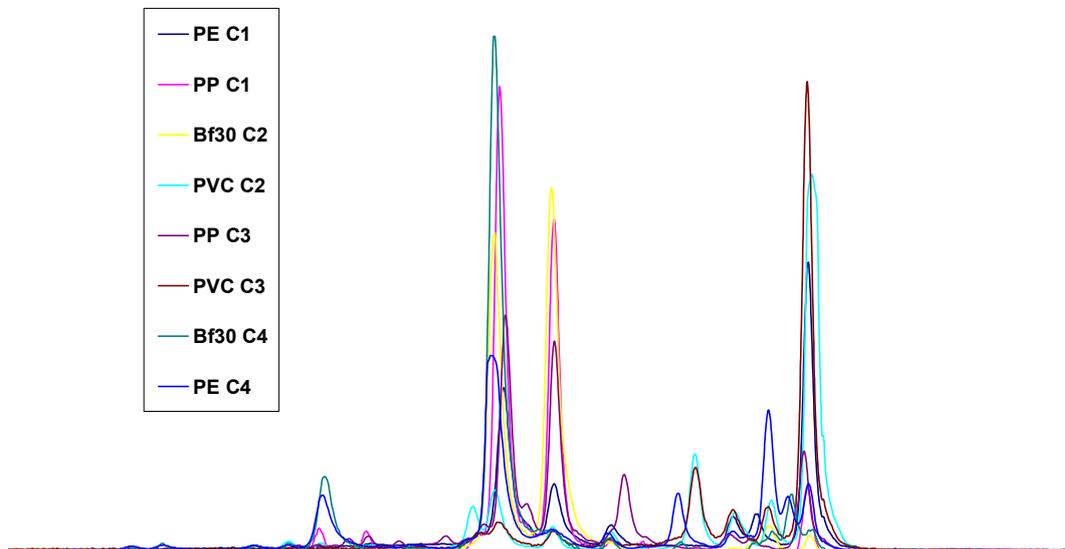


Figure H-1 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des biofilms des quatre comparatifs.

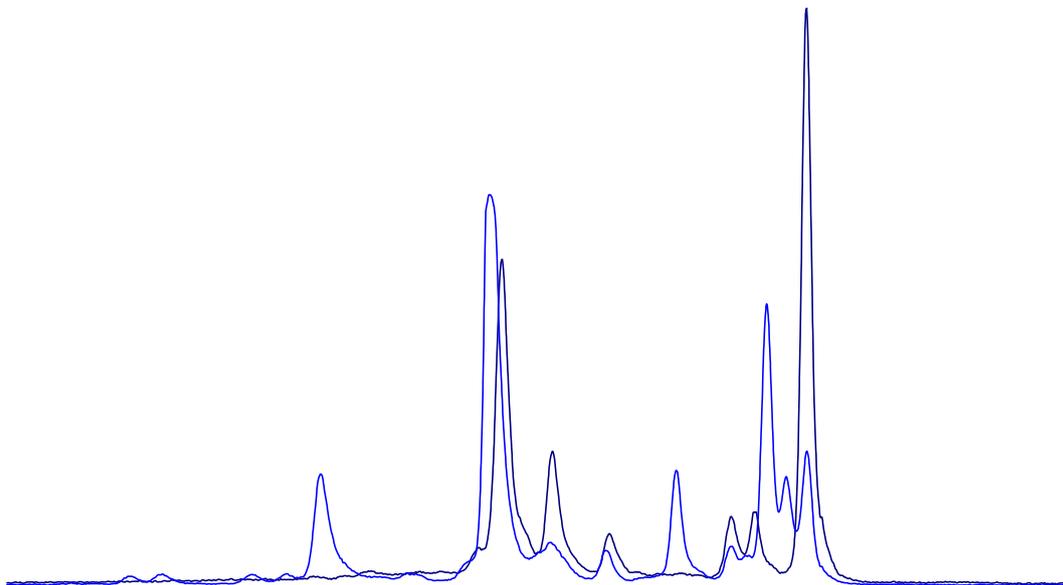


Figure H-2 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports en PE lors des comparatifs C1 et C4

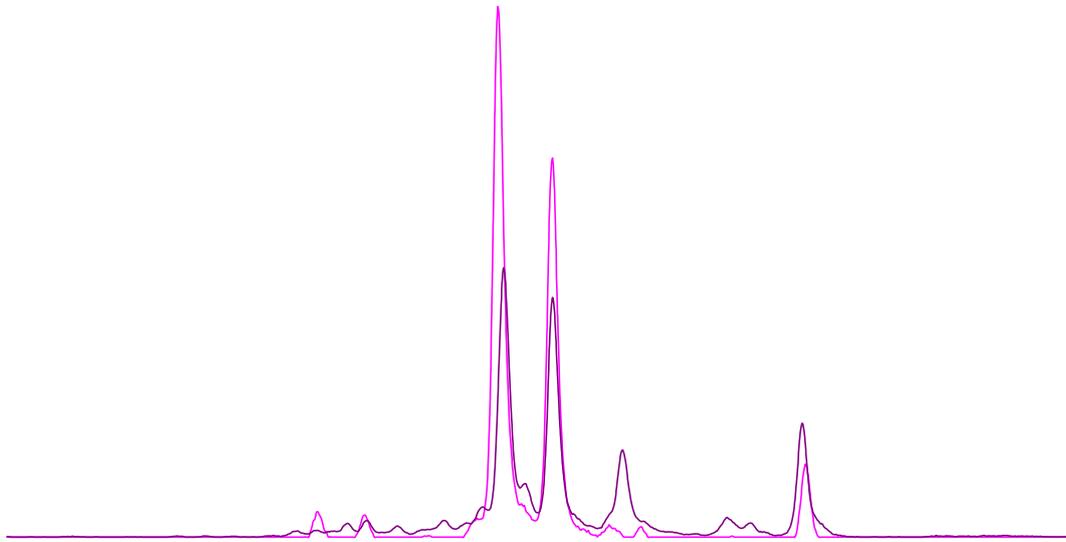


Figure H-3 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports en PP lors des comparatifs C1 et C3

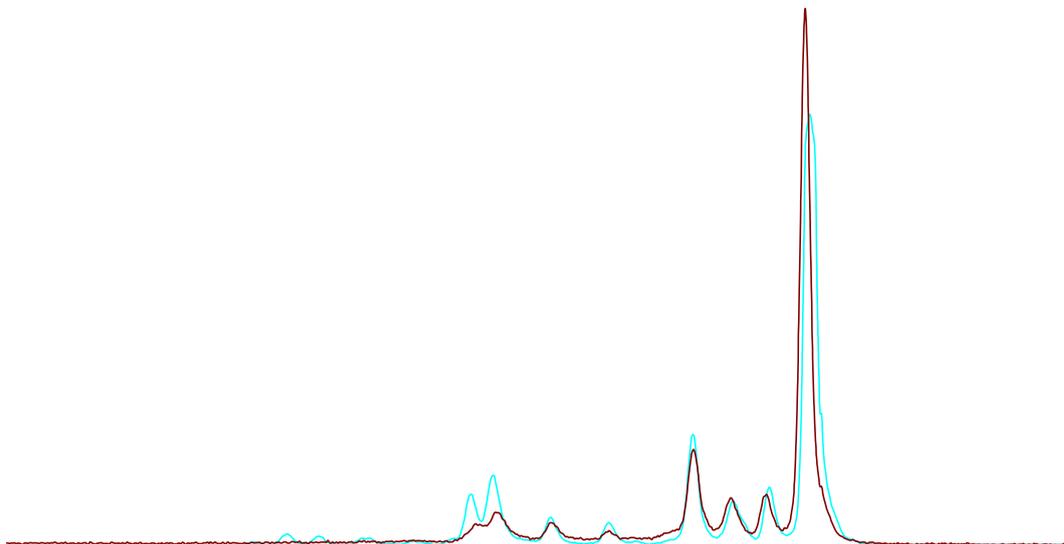


Figure H-4 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports en PVC lors des comparatifs C2 et C4

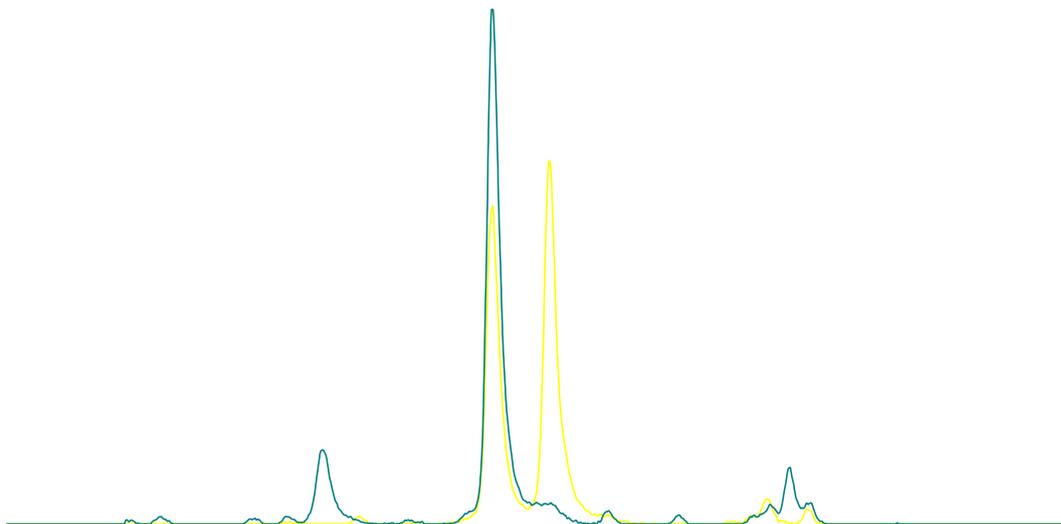


Figure H-5 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S des archées des supports Bf30 lors des comparatifs C2 et C4

## **NOTES**

---

## **ROLE DES MATERIAUX-SUPPORTS SUR LA MISE EN PLACE DU BIOFILM : APPLICATION AU DEMARRAGE D'UN PROCEDE DE METHANISATION**

Dans les systèmes anaérobies de traitement d'eaux usées, la biomasse microbienne complexe incluant archées et bactéries peut être maintenue au sein du procédé par l'adhésion aux supports solides sous forme de biofilm. Le but de ce travail est d'évaluer l'impact des propriétés des matériaux supports sur l'adhésion et la colonisation du consortium méthanogène. Différents matériaux (le polyéthylène, le polypropylène, le chlorure de polyvinyle, l'acrylonitrile butadiène styrène, le polycarbonate, le verre borosilicaté, l'acier inoxydable 304L et Bioflow 30 ®) sont décrits en termes de topographie par la détermination de rugosité et en termes d'énergie de surface par la mesure d'angle de contact. Le biofilm est évalué quantitativement et les structures communautaires bactériennes et archéennes sont observées grâce à l'analyse moléculaire à différents stades de sa mise en place. L'adhésion d'un consortium méthanogène sur les matériaux après deux heures de contact dans un réacteur annulaire rotatif révèle que les communautés adhérentes diffèrent de l'inoculum, y compris en termes de proportion archées/bactéries. Ce résultat a un impact significatif sur le démarrage de digesteurs anaérobies car les tendances observées sont confirmées pendant l'établissement du biofilm actif. La mise en œuvre de différents matériaux dans des réacteurs à lit fixe a permis de montrer que les populations d'archées des biofilms sont spécifiques au matériau et indépendantes de l'inoculum.

---

## **ROLE OF MATERIALS-SUBSTRATA ON THE IMPLEMENTATION OF BIOFILM FORMATION: APPLICATION TO THE START-UP OF AN ANAEROBIC BIOFILM PROCESS**

In anaerobic wastewater treatment systems, the complex microbial biomass including *Archaea* and *Bacteria* may be retained as a biofilm by attachment to solid supports. The aim of this study is to evaluate the impact of support material properties on adhesion and colonization. Various substrata (polyethylene, polypropylene, polyvinyl chloride, acrylonitrile butadiene styrene, polycarbonate, borosilicate glass, stainless steel 304L and Bioflow 30®) are described in terms of topography by determining roughness and in terms of surface energy by contact angle measurement. Adhesion is quantified and the bacterial and archaeal community structure are assessed by molecular analysis in various stages of the biofilm development. Adhesion of a methanogenic consortium on these substrata is measured after two hours of contact in a rotating annular reactor. The result reveals that the adhered communities were different from the parent inocula, including the *Archaea/Bacteria* ratio. This result has a significant impact on the start-up of anaerobic digesters because the observed tendencies are confirmed during the establishment of the active biofilm. Start-up of anaerobic fixed-bed reactors using different substrata showed that *Archaea* populations in the biofilms are specific to each of the material and independent of the inoculum.

---

ANAEROBIC DIGESTION; BIOFILM; MICROBIAL ADHESION; COMMUNITY STRUCTURE; ROUGHNESS; SURFACE ENERGY; FINGERPRINTING PROFILES

---

Université de Montpellier II

Ecole doctorale : Sciences des procédés. Science des aliments

---

Institut National de la Recherche Agronomique

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

Avenue des Etangs 11100 Narbonne France