

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES**

PAR

NATHALIE IMBEAULT

B. Sc. (Biologie)

**PRODUCTION D'ACIDES GRAS PAR BIODÉGRADATION ANAÉROBIE DU
PERMÉAT DE LACTOSÉRUM DANS UN BIORÉACTEUR EN CONTINU**

OCTOBRE 1997



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RÉSUMÉ

Un bioréacteur à lit fluidisé a été utilisé pour étudier la production d'acides gras lors de la biodégradation anaérobie du perméat de lactosérum. Pour optimiser ce type de traitement, les paramètres suivants ont également été suivis :

Les concentrations en sucre sont étudiées afin de connaître l'efficacité de biodégradation du système lors de la croissance du biofilm. En augmentant la concentration en sucre à l'alimentation de 5 à 30 g/L, il y a augmentation de l'efficacité à dégrader l'effluent passant de 10 à 21% (Entrée vs Sortie) correspondant à un biofilm de plus en plus mature.

Les acides gras retrouvés sont l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide iso-butyrique ainsi que l'acide n-butyrique. Ce dernier est le principal produit recueilli au point d'échantillon de la sortie composant ce mélange, en moyenne à 75%, correspondant à ce que l'on doit obtenir lors d'une fermentation acide. En général, l'acide acétique est le principal produit au niveau du perméat brut. Sa concentration est faible à l'alimentation mais augmente aux autres points d'échantillonnage au fur et à mesure que les bactéries en produisent lors de la fermentation du perméat.

Les bactéries ont été répertoriées dans le but d'évaluer dans le temps, le changement dans la composition bactérienne du biofilm à différentes concentrations en sucre à l'alimentation. Les espèces bactériennes inventoriées dans le bioréacteur sont au nombre de 15 : *Pseudomonas maltophilia*, *P. paucimobilis*, *P. sp.*, *P. fluorescens*, *Salmonella sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*, *Aeromonas hydrophila/caviæ*, *Staphylococcus hominis*, *S. cohnii*, *S. aureus*, *S. simulans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter fæcium*, *E. avium* et une espèce filamenteuse non identifiée. L'attachement bactérien sur les grains de charbon est effectué surtout par des bactéries telles que *Micrococcus*. La composition bactérienne

change avec les différentes concentrations en sucre, observant soit des cocci ou des bactéries filamenteuses.

L'adénosine triphosphate (ATP) est dosée pour estimer la concentration bactérienne présente au niveau du lit fluidisé. L'ATP est un nucléotide présent dans toute cellule vivante, comme les bactéries, et sa quantité par cellule varie très peu pour des conditions d'équilibre donné. Au début des essais, les concentrations d'ATP sont plus élevées au niveau du lit qu'au niveau du liquide du bioréacteur, ce qui est expliqué par la formation du biofilm sur les grains. Progressivement les concentrations d'ATP sont de plus en plus élevées au niveau des liquides. Ceci est expliqué par le vieillissement du biofilm; les bactéries mortes situées dans les couches antérieures du biofilm en se détachant vont entraîner des bactéries vivantes, ce qui augmente leur concentration dans le liquide.

Le débit de **biogaz** produit est proportionnel à la concentration en sucre. En moyenne, 61 L de biogaz sont produits par jour composé à 3% en méthane (CH_4) et à 97% en dioxyde de carbone (CO_2). Aucun autre gaz n'a été détecté. Ce projet a été réalisé à l'Université du Québec à Chicoutimi en collaboration avec l'usine Nutrinor à Chambord.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier les organismes qui ont fourni une aide financière pour permettre la réalisation de ce projet soit FODAR, la Fondation de l'UQAC et l'Association Québécoise des Techniques de l'Environnement.

Un merci spécial à mes deux directeurs de recherche pour leur dévouement et surtout leur patience: Dr Raynald Côté et Dr Marcel Paquet. Ce projet n'aurait pu se réaliser sans l'aide technique de mesdames Hélène Gagnon et France-Ida Jean et de messieurs Robert Forcier, Jean-Marc Gauthier, Conrad Chrétien et André Barrette. Un sincère remerciement à monsieur Michel Gauthier, assistant de recherche, qui a donné de son temps sans compter.

Merci également à tous ceux qui m'ont apporté une aide quelconque tout au long de ce projet: André Claveau, Marie-Christine Bouchard, André Pichette, Jean Briand, Louis Imbeau et Sylvain Quessy.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ANNEXES.....	IX
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	2
1.2 Différents types de bioréacteur	6
1.2.1 <i>Le bioréacteur à lit fluidisé</i>	8
1.2.2 <i>Le bioréacteur de type UASB</i>	9
1.2.3 <i>Le bioréacteur à lit fixe</i>	10
1.3 Biofilm bactérien	11
1.4 Mesure de la biomasse par dosage de l'ATP	17
1.5 Produits provenant de la dégradation bactérienne du perméat de lactosérum	18
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
2.1 Montage expérimental.....	23
2.2 Sucre	27
2.3 Biogaz.....	29
2.4 ATP.....	29
2.5 Acides gras.....	34
2.6 Bactéries.....	36

CHAPITRE III: RÉSULTATS	41
3.1 Paramètres de fonctionnement du bioréacteur	42
3.1.1 <i>Concentration d'alimentation de 5 g/L</i>	42
3.1.2 <i>Concentration d'alimentation de 10 g/L</i>	46
3.1.3 <i>Concentration d'alimentation de 20 g/L</i>	51
3.1.4 <i>Concentration d'alimentation de 30 g/L</i>	55
3.2 Comparaison des résultats obtenus à différentes concentrations en sucre.....	59
3.2.1 <i>Concentration en sucre</i>	59
3.2.2 <i>Biofilm et ATP</i>	59
3.2.3 <i>Biogaz</i>	61
3.2.4 <i>Acides gras</i>	61
3.2.5 <i>Bactéries</i>	64
CHAPITRE IV: DISCUSSION	67
4.1 Efficacité de la biodégradation du perméat	68
4.2 Biogaz.....	71
4.3 Biofilm et ATP	73
4.4 Acides gras.....	75
4.5 Bactéries.....	78
CHAPITRE V: CONCLUSION.....	82
RÉFÉRENCES	84
ANNEXES.....	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Modèle général de biodégradation anaérobie.....	4
Figure 2: Différents types de lits.....	7
Figure 3: Étapes de la formation d'un biofilm bactérien.....	12
Figure 4: Schéma simplifié du bioréacteur utilisé.....	25
Figure 5: Procédure originale utilisée lors de l'identification d'une colonie bactérienne.....	37
Figure 6: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 5 g/L.....	43
Figure 7: Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration en sucre de 5 g/L.....	45
Figure 8: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 10 g/L.....	47
Figure 9: Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration en sucre de 10 g/L.....	50
Figure 10: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 20 g/L.....	52
Figure 11: Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration en sucre de 20 g/L.....	54
Figure 12: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 30 g/L.....	56
Figure 13: Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration en sucre de 30 g/L.....	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Composition moyenne du lactosérum de fromage.....	3
Tableau 2: Facteurs influençant le développement du biofilm.....	14
Tableau 3: Détermination colorimétrique des sucres.....	28
Tableau 4: Procédure d'extraction de l'ATP.....	31
Tableau 5: Détermination quantitative de l'ATP.....	33
Tableau 6: Procédure d'extraction des acides gras.....	35
Tableau 7: Composition des différents milieux de culture utilisés.....	38
Tableau 8: Comparaison des résultats observés aux différentes concentrations d'alimentation en sucre.....	60
Tableau 9: Comparaison des concentrations d'acides gras à différents points d'échantillonnage pour chaque concentration d'alimentation en sucre.....	62
Tableau 10: Liste des bactéries (A: aérobies; B: anaérobies) sur les grains du lit et dans les liquides du bioréacteur à différentes concentrations en sucre et dans l'inoculum et le perméat utilisés.....	65

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Courbe étalon pour la détermination des concentrations de sucre.....	92
Annexe 2: Courbe étalon pour la détermination des concentrations d'ATP.....	94
Annexe 3: Exemple d'un tracé de luminométrie (ATP).....	96
Annexe 4: Aires d'intégration des standards d'acides gras.....	98
Annexe 5: Exemple de calcul de la concentration d'un acide gras à partir des aires d'intégration.....	100
Annexe 6: Exemple de calcul du débit de biogaz produit par gramme d'acide gras.....	102
Annexe 7: Valeurs numériques correspondants aux figures 6 à 13.....	104
Annexe 8: Précision sur les méthodes de dosage des sucres, des acides gras et de l'ATP.....	109

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1.1 Problématique

Depuis quelques années, la protection de l'environnement est une question de plus en plus préoccupante. Une région comme le Saguenay-Lac-Saint-Jean, possédant un territoire exceptionnellement diversifié en milieux aquatiques (lacs, rivières, fjord), renferme de nombreuses espèces de poissons souvent recherchées par des pêcheurs, et représentatives des principales espèces pêchées au Québec. Dans la société industrielle d'aujourd'hui, il devient urgent de traiter adéquatement les effluents de toutes sortes.

Par exemple, les eaux résiduares produites lors de la fabrication du fromage, qui au Québec sont de l'ordre de 400 millions de litres par année (Environnement Canada, 1986), sont principalement composées de perméat de lactosérum. Le lactosérum est le liquide recueilli lors de la fabrication du fromage, et le perméat est ce même liquide mais ayant subi une ultrafiltration. À l'avenir, le terme perméat sera utilisé pour désigner le perméat de lactosérum de fromage.

La fabrication du fromage s'effectue en trois étapes principales: la coagulation ou caillage du lait à l'aide de cultures sélectionnées, l'égouttage et l'affinage. Lors de l'égouttage, une déshydratation du lait caillé est effectuée et une pâte de consistance variable est obtenue. Durant cette étape, ce n'est pas seulement l'eau qui se sépare, mais également une partie des éléments en solution, le tout formant ce qui est communément appelé le petit lait de fromage. Ce petit lait ou lactosérum contient entre autres du lactose, des minéraux et certaines protéines solubles du lait qui n'ont pas précipité sous l'action des

ferments et des enzymes (Tableau 1). Généralement, l'industrie du fromage procède à une ultrafiltration du lactosérum afin de limiter les rejets. Cette ultrafiltration retient les principales protéines du lactosérum (retentat) mais laisse passer l'eau et les petites molécules (constituant le perméat de lactosérum). Le perméat de lactosérum a donc une composition comparable à celle du lactosérum, exception faite des protéines (Jacques, 1993).

Tableau 1: Composition moyenne du lactosérum de fromage (Tiré de Garcia *et al.*, 1991).

PRODUITS	QUANTITÉ (%)
Lactose	3,8 à 4,2%
Protéines	0,8 à 1,0%
Minéraux	0,7 à 0,8%
Acide lactique et autres produits	0,1 à 0,8%
Gras	0,3 à 0,6%
Eau	94 à 95%

L'hydrate de carbone ou sucre principal du perméat est le lactose; environ 80% à 90% de la demande biologique en oxygène (DBO) du lactosérum lui est attribuée (Yu et Pinder, 1993; Hwang et Hansen, 1992; Barnett *et al.*, 1994; Kisaalita *et al.*, 1987). Le lactose peut être dégradé par trois types de bactéries anaérobies agissant en synergie: les acidogènes, les acétogènes et les méthanogènes. Le modèle général de la digestion anaérobie du lactosérum de fromage démontre une biodégradation des protéines, des lipides et des sucres

(glucose, lactose, galactose, etc.) en produits intermédiaires comme des acides et des sucres simples (Figure 1). Chacune des étapes principales est assurée par l'activité de bactéries spécifiques. Le produit de chacune des étapes agit comme le substrat de l'étape suivante (Stronach *et al.*, 1986). Les acidogènes dégradent le lactose en acides (acétique, propionique, butyrique et lactique) rendant le milieu acide et inhibant ainsi, les deux autres types de bactéries (Yu et Pinder, 1993).

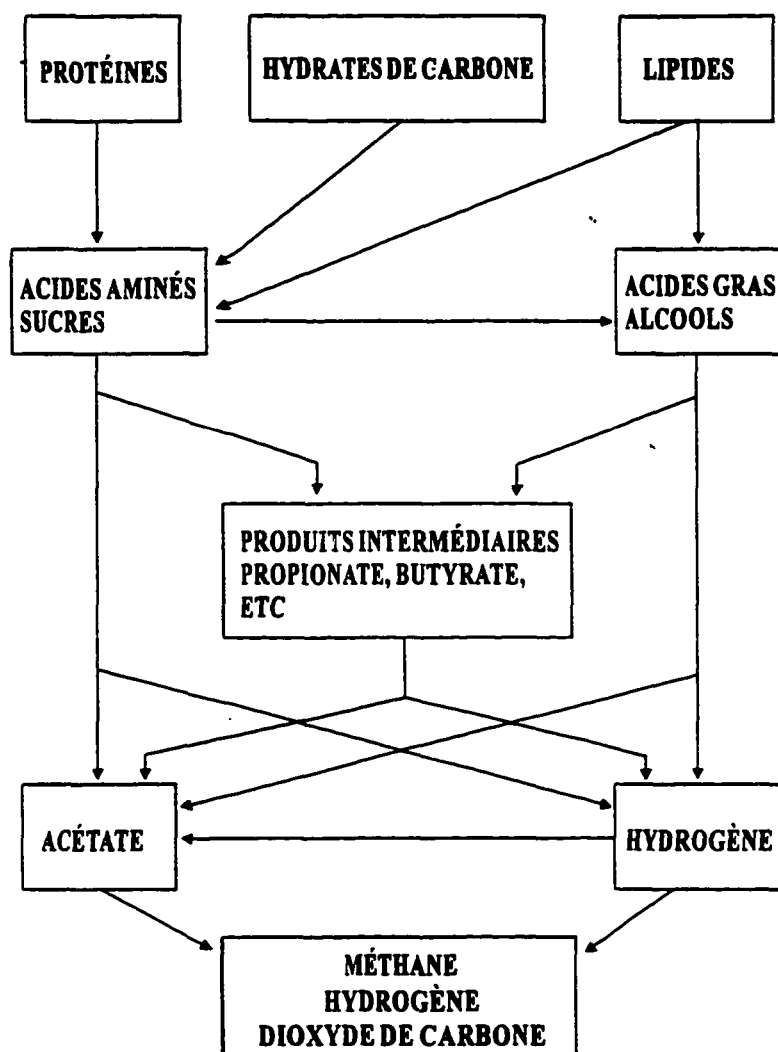


Figure 1: Modèle général de biodégradation anaérobie (Tiré de Stronach *et al.*, 1986).

Le processus de la digestion anaérobie du lactosérum peut se résumer en trois étapes: (a) une étape d'hydrolyse, dans laquelle les enzymes extracellulaires sont produites par les micro-organismes présents dans le système afin de briser les composés organiques en composés plus simples et solubles; (b) une étape de production d'acides, dans laquelle les bactéries acidogènes convertissent ces composés organiques simples (e.g. des polysaccharides comme la cellulose ou des monosaccharides comme le glucose) en acides gras volatils comme les acides acétique et propionique; (c) une étape de méthanogénèse dans laquelle les bactéries méthanogènes produisent les enzymes intracellulaires requises pour convertir les acides organiques en produits finaux gazeux, contenant principalement du méthane (proportion dans le biogaz: 58%) et du dioxyde de carbone (proportion dans le biogaz: 28%). Les autres gaz, comme l'hydrogène, représentent environ 12% du biogaz (Ghaly et Ben-Hassan, 1989). La phase méthanogène est la dernière étape mais aussi la plus importante, car c'est au cours de cette étape que l'acide acétique est converti en méthane; tous les autres acides ont été convertis précédemment en acide acétique ou en acétate (Pretorius, 1994). Lorsque les deux dernières étapes sont présentes dans le même bioréacteur, ce sont les méthanogènes qui déterminent la vitesse de dégradation puisqu'elles sont à croissance lente; leur activité est donc prise comme une mesure de l'activité du processus bactérien global (Pretorius, 1994).

Par leur demande biologique et chimique en oxygène élevée (DBO et DCO respectives de 30 000 et 60 000 mg/L en moyenne) et la présence de nombreux sels d'acides gras ($R\text{-COONa}$), les effluents de fromageries constituent une menace non négligeable pour l'environnement (Environnement Canada, 1986).

Ces sels sont nuisibles aux poissons à cause de leur toxicité aigüe. Malgré cette toxicité, les sels d'acides gras peuvent être dégradés et la DBO et la DCO, réduites par voie microbienne. Les procédés biologiques de traitement des eaux permettent ainsi la dégradation des polluants organiques grâce à leur conversion par des micro-organismes. Ces procédés peuvent s'effectuer en présence d'oxygène (aérobie) ou en absence d'oxygène (anaérobie).

Dans la première partie de ce chapitre, d'abord le principe de la fluidisation et les différents types de bioréacteurs existants dont celui utilisé dans ce projet seront présentés. Pour terminer ce premier chapitre, les différents paramètres qui régissent les bioréacteurs ainsi que les objectifs visés par cette étude seront exposés.

1.2 Différents types de bioréacteur

Les procédés de biotransformation occupent une place de plus en plus importante à l'intérieur de l'industrie laitière. Une caractéristique générale de tous les systèmes de biotransformation est le biofilm qui est souvent en relation avec le principe de fluidisation. Kunii et Levenspiel (1991) ont défini la fluidisation comme l'opération au cours de laquelle des particules solides en viennent à se comporter comme un liquide. À un certain débit, les forces de friction entre les particules et le fluide contrebalancent le poids des particules et le solide devient en suspension dans le fluide. Il est important de noter que le principe de fluidisation s'applique lorsque le fluide est gazeux ou liquide. On ne s'attardera ici qu'aux phénomènes s'appliquant au liquide.

Ainsi, à partir d'un même montage, il est possible d'observer différents régimes d'opération en fonction du débit du fluide. Premièrement, concernant le lit fixe, à faible vitesse les grains de solide demeurent fixes, le fluide ne faisant que percoler à travers les vides (Figure 2a). Avec une augmentation de la vitesse, un régime est atteint pour lequel les particules deviennent en suspension dans le courant ascendant du fluide, c'est le lit à fluidisation minimale (expansion du lit correspondant à environ 20%) (Figure 2b). En augmentant la vitesse au-delà de la vitesse minimale de fluidisation, un phénomène différent est observé selon le type de fluide, liquide ou gazeux. Pour la fluidisation avec un liquide, l'augmentation du débit se traduit par une expansion progressive du lit. Ce dernier conserve une grande stabilité. Cela correspond à un lit fluidisé particulaire ou homogène (expansion du lit pouvant atteindre 300%) (Figure 2c).

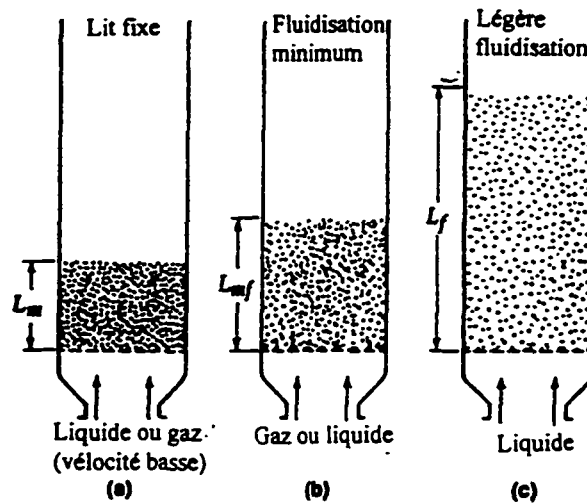


Figure 2: Différents types de lits (Tiré de Kunii et Levenspiel, 1991).

Selon Stronach *et al.* (1986), la limite entre un lit expansé et un lit fluidisé est indéfinie et dépend presque exclusivement du degré de fluidisation; ce dernier est fonction de la densité, de la porosité et de la taille des particules ainsi que de la vitesse du fluide. Un bioréacteur à lit expansé offre des avantages: grande surface de contact entre les bactéries fixées et l'effluent à traiter, contrôle facile de l'âge moyen des bactéries, protection des bactéries dans le biofilm contre le choc toxique ou de la charge. Cependant, il est possible d'observer dans un lit fluidisé, des instabilités qui dépendent davantage de la taille, de la forme et de l'homogénéité des particules comme le renardage ou passages préférentiels et le pistonage.

1.2.1 Le bioréacteur à lit fluidisé

Les applications d'un bioréacteur à lit fluidisé sont multiples. Il peut être utilisé pour le traitement des eaux usées des municipalités, des aciéries et fonderies, de l'industrie chimique, des installations de transformation de la nourriture et des breuvages, de l'industrie automobile et des pâtes et papiers (Bu'lock et Kristiansen, 1987; Vembu et Tyagi, 1990). Également, depuis quelques années, les lits fluidisés anaérobies sont utilisés pour traiter les effluents d'usines d'épuration (Toldra *et al.*, 1987). Les réacteurs à lit fluidisé sont préférables aux autres pour le traitement des effluents industriels comportant de gros volumes et des charges organiques élevées.

Samson *et al.* (1990), ont indiqué que le réacteur à lit fluidisé présente des taux de diminution de la DCO et de production de méthane très satisfaisants. De

plus, ce réacteur aurait l'avantage d'être très résistant aux variations dans la concentration et la composition de l'effluent à traiter. Au point de vue de la consommation d'énergie, compte tenu du haut taux de recirculation, la demande en énergie se limite à celle nécessaire pour maintenir la fluidisation et elle est largement compensée par la production de méthane. Également, selon Toldra *et al.* (1987), les réacteurs biologiques à lit fluidisé présentent plusieurs avantages comparativement à d'autres réacteurs biologiques: une plus grande surface de contact entre les micro-organismes et le fluide; des problèmes minimes de circulation, de congestion et de passages de gaz; une épaisseur du biofilm contrôlée par le type de particules; une vitesse du liquide ascendant minimisant la résistance à la diffusion à travers le biofilm; peu d'infrastructures requises et une distribution uniforme du courant liquide. C'est ce type de bioréacteur qui est utilisé dans ce projet.

1.2.2 Le bioréacteur de type UASB

Le bioréacteur de type UASB (« Upflow anaerobic sludge blanket ») est un système qui consiste à faire pénétrer l'affluent à traiter par la base du réacteur. Ainsi, l'eau usée monte à travers un lit de boue contenant des bactéries et traverse une région où les bactéries s'agglomèrent et sédimentent en granules d'environ 4 mm de diamètre. Par la suite, l'eau traitée traverse une zone calme permettant la décantation des bactéries qui se sont détachées du lit (Bu'lock et Kristiansen, 1987). Ce type de réacteur peut traiter des eaux usées provenant des usines de transformation d'aliments et des papeteries (Samson *et al.*, 1990).

L'avantage de ce type de réacteur est sa capacité à obtenir de fortes concentrations de micro-organismes agglomérés (granules).

D'après plusieurs auteurs, le système UASB demeure un des meilleurs traitements anaérobies du perméat (Garcia *et al.*, 1991; Schroder et De Haast, 1989; Yan *et al.*, 1989, 1990, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1991; Ozturk *et al.*, 1993; Hwang et Hansen, 1992; Cohen *et al.*, 1994; Strydom *et al.*, 1995). Selon ces mêmes auteurs, il présente tout de même quelques désavantages: un temps de rétention hydraulique élevé; une absence de recirculation; un apport supplémentaire de nutriments pour les bactéries; un ajout de tampon pour contrôler le pH; une perte de biomasse et une longue période d'acclimatation pour les bactéries.

1.2.3 Le bioréacteur à lit fixe

Le réacteur à lit fixe est également appelé réacteur à biofilm anaérobie ou filtre anaérobie. Ce procédé trouve des utilisations dans le traitement des eaux usées dans les domaines agro-alimentaire et municipal (Bu'lock et Kristiansen, 1987). En ce qui a trait à ce type de réacteur, c'est une technique moins efficace que le réacteur UASB; il présente, à long terme, un problème de colmatage mais par contre, il a les avantages d'être plus stable, plus sûr et plus facile à opérer que le lit de type UASB (Samson *et al.*, 1990).

Plusieurs types de systèmes peuvent être utilisés pour dégrader les rejets de fromageries: des réacteurs à filtres anaérobies (Tanaka et Matsuo, 1986;

Viraraghavan et Kikkeri, 1990a;1990b; Mendez *et al.*, 1989); des systèmes à membranes comme l'ultrafiltration et l'osmose inversée et des bassins d'aération (Barnett *et al.*, 1994); des réacteurs à multiplaques, comme celui utilisé à l'usine Lactel de Chambord au Lac-Saint-Jean (Mulligan *et al.*, 1993; Guiot *et al.*, 1995); des réacteurs à lit fixe mais à courant descendant (De Haast *et al.*, 1985); des fermenteurs (Kisaalita *et al.*, 1987); des réacteurs anaérobie à contact rotatif (Lo *et al.*, 1988); des réacteurs à lit fluidisé (Toldra *et al.*, 1987; Streicher *et al.*, 1990; Motta-Marques *et al.*, 1990).

1.3 Biofilm bactérien

Lorsqu'on parle de biofilm, il s'agit en général de cellules immobilisées sur un support inerte et fréquemment enlisées dans une matrice polymérique d'origine bactérienne (Characklis et Marshall, 1990). Ce biofilm n'est pas nécessairement uniforme dans le temps et l'espace et il peut être composé d'une fraction significative de matière inorganique retenue par la matrice organique. Ainsi, toute surface immergée dans un fluide peut être colonisée par des cellules bactériennes. Les micro-organismes attachés croissent, prolifèrent et peuvent former des substances polymériques extra-cellulaires formant une matrice structurelle autour des cellules et éventuellement, produire une couche structurée de fibres interreliées ou biofilm (Stronach *et al.*, 1986). Cette définition conduit à la présentation d'un modèle de formation du biofilm en cinq étapes: 1) le transport des molécules organiques et leur adsorption sur la surface; 2) le transport des micro-organismes; 3) leur attachement; 4) la formation du biofilm par l'activité

métabolique des micro-organismes attachés; 5) le détachement des parties matures du biofilm causé par les forces hydrauliques (Figure 3).

La matrice du biofilm joue un rôle protecteur pour les micro-organismes qu'elle abrite. Comme principal avantage, le biofilm permet d'obtenir des biomasses bactériennes élevées à l'intérieur d'un volume restreint, augmentant ainsi la productivité et la stabilité des procédés (Stronach *et al.*, 1986). Afin de mieux comprendre le rôle que peut jouer le biofilm, il est nécessaire de l'étudier comme une composante d'un système plus complexe appelé par Characklis et Marshall (1990), le système biofilm. Ce dernier est constitué du biofilm proprement dit, de la couche de liquide ou d'air qui le superpose et du support sur lequel le biofilm est immobilisé.

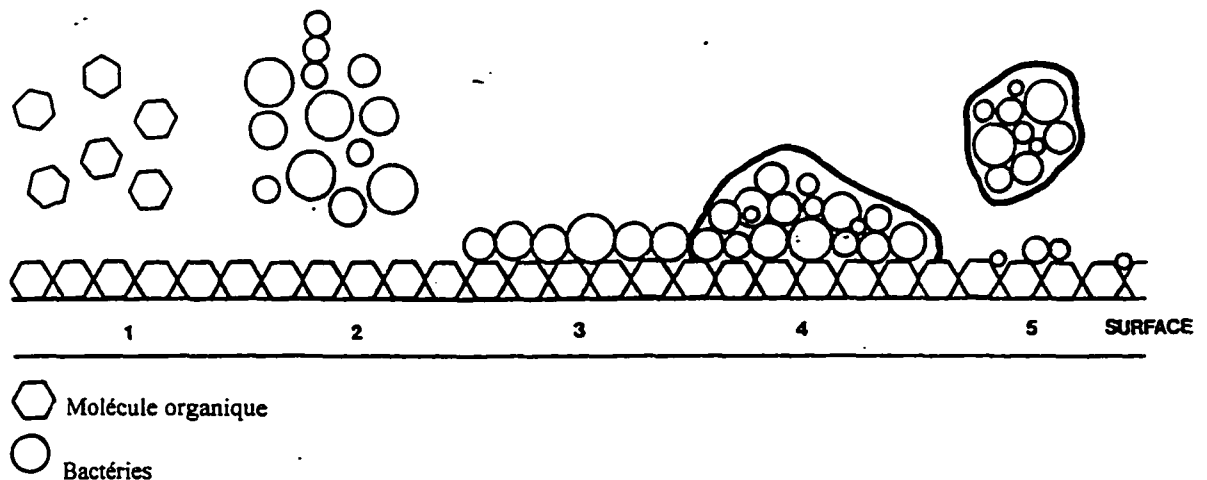


Figure 3: Étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Tiré de Stronach *et al.*, 1986).

Le système biofilm peut être classifié en termes de phase (au sens thermodynamique) et de compartiments. Les compartiments pouvant être observés dans un tel système sont le support, la base du biofilm, la surface du biofilm, le liquide et la couche de gaz environnante. Chacun des compartiments effectue des échanges avec les compartiments adjacents, de même que s'observent des échanges et des transformations à l'intérieur d'un même compartiment. Ainsi, à l'intérieur de chacun de ces compartiments et entre ceux-ci, s'effectuent des échanges qui sont essentiels pour le fonctionnement harmonieux de l'ensemble du processus de biotransformation. Selon Characklis et Marshall (1990), la principale différence dans le comportement d'un biofilm microbien et une population microbienne est que l'activité microbienne dans le biofilm est limitée par le transport de masse et la diffusion. Ainsi, le transport de masse dans un liquide est l'étape qui contrôle le développement du biofilm. Vembu et Tyagi (1990) soulignent qu'il est possible de contrôler l'épaisseur du biofilm autour des particules de solide en limitant l'expansion du lit afin de réduire le transport et le lessivage de la biomasse. Le lit fluidisé permet donc d'obtenir une très grande surface de contact biofilm/support puisque chaque particule est enrobée du biofilm. Ainsi, selon Yu et Pinder (1993) et Bolte et Hill (1990), la dégradation du lactose s'effectue mieux lorsque le biofilm est mince. Avec un biofilm épais, le produit doit diffuser à travers tout le biofilm avant d'être dégradé. Les phénomènes de transport, d'adsorption, de multiplication, d'érosion, de séparation et de désorption conditionnent la formation et le développement du biofilm (Characklis et Marshall, 1990). Selon Senthilnathan et Ganczarczyk (1990), les facteurs influençant la formation du biofilm sont nombreux; il y a tout

d'abord les facteurs reliés aux caractéristiques de la surface du solide, à celles propres aux micro-organismes et à celles de l'environnement (Tableau 2).

Ces auteurs ajoutent que plusieurs des facteurs ne peuvent être contrôlés, particulièrement ceux ayant trait aux micro-organismes, à l'exception de la concentration et de l'âge de la culture bactérienne. Au niveau des caractéristiques de l'environnement, seule la présence d'espèces compétitives ou contributives ne peut être modifiée. Pour ce qui est des caractéristiques du solide, elles sont contrôlables par le type de solide utilisé. Parmi l'ensemble de ces facteurs, les effets de la température et du pH, de la concentration d'acides gras volatils et des nutriments influencent l'efficacité du système.

Tableau 2: Facteurs influençant le développement du biofilm (Tiré de Senthilnathan et Ganczarczyk, 1990)

Surface du solide	Micro-organismes	Environnement
-Nature physique du solide	-Espèce	-pH
-Propriétés chimiques de la surface	-Caractéristiques chimiques de la surface du support	-Force ionique
-Concentration	-Concentration	-Hydrodynamique
-Taille et forme	-Age et condition de la culture	-Présence d'espèces compétitives
-Surface de contact	-Taille et forme	-Présence d'espèces contributives
-Rugosité et porosité		-Temps de contact
		-Température

La plupart des procédés industriels de traitement opèrent entre 30-40°C puisque les bactéries nécessaires à la dégradation anaérobie sont reconnues

comme étant principalement mésophiles. Par contre, Safley et Westerman (1994), considèrent que la digestion anaérobie de produits laitiers peut s'effectuer avec succès à des températures allant de 10 à 23°C; à une température inférieure à 10°C, la digestion est extrêmement lente (Viraraghavan et Kikkeri, 1990b). Selon ces derniers auteurs, la digestion anaérobie à la température ambiante (21°C) peut s'effectuer sans trop affecter l'efficacité, où seulement une différence de 5 à 6% de réduction de DCO est observée, comparativement au même système fonctionnant à 30°C. Par contre, à partir de 45°C, il se produit la même chose qu'à partir de 10°C, soit une inhibition des bactéries (Desai *et al.*, 1994). Également, selon Viraraghavan et Kikkeri (1990b), les températures élevées n'aident pas le réacteur à se stabiliser plus rapidement après les effets d'un choc. Les résultats de ces mêmes auteurs indiquent qu'un filtre anaérobie peut être démarré à 21°C sans aucun désavantage. Par contre, il est clair que l'efficacité d'un système à 35°C, pour éliminer la DCO, est beaucoup plus élevée (76-92%) qu'un système fonctionnant à 21°C (55-85%). Ce phénomène est démontré également par Cordoba *et al.* (1988); leur étude démontre que l'efficacité d'enlèvement de la DCO diminue avec une diminution de la température.

Pour ce qui est du pH, la majorité des bactéries présente une croissance optimale pour un pH entre 6,5 et 7,5, alors qu'un pH inférieur à 5,0 ou supérieur à 8,5 entraîne une inhibition de leur croissance. Pour ce qui est des bactéries méthanogènes, elles tolèrent un pH aux environs de la neutralité et leur activité commence à être inhibée à un pH inférieur à 6,5 dans les digesteurs conventionnels et à un pH de 5,5 dans un réacteur à lit fixe. Matsumoto *et al.* (1992), ont étudié l'effet du pH sur les méthanogènes dans un réacteur à lit

fluidisé. Ils ont conclu qu'un pH de 6,2 est optimal pour la dégradation du lactose en méthane puisqu'il accélère l'acidogénèse sans inhiber la méthanogénèse. L'existence d'un gradient de pH dans le biofilm et la capacité d'adaptation des méthanogènes à des pH faibles seraient les facteurs expliquant leurs résultats. Par contre, selon Pretorius (1994), il existe deux catégories de substrat: la première ne générant pas de tampon interne, comme par exemple les hydrates de carbone, et dépendant complètement d'un tampon provenant d'une source extérieure, et la deuxième, laquelle génère un tampon interne, par exemple, les protéines. Selon Lo et Liao (1986), sans contrôle de pH, dans un système de digestion anaérobie, les réacteurs ne peuvent pas maintenir une opération stable à l'intérieur de 30 jours.

Pour ce qui est de l'effet des concentrations d'acides gras volatils, Sreekrishan *et al.* (1990) ont démontré que les acides influençaient la production de méthane. Selon Stronach *et al.* (1986), l'inhibition des méthanogènes par de fortes concentrations d'acides gras volatils s'explique par une diminution de l'activité métabolique causée par une diminution du pH intracellulaire suite à l'adsorption d'acides volatils non-ionisés. Par contre, l'acclimatation permet de surmonter cet effet inhibiteur. Parmi les oligo-éléments limitant l'activité bactérienne; le sélénium, le tungstène et le nickel sont tous retrouvés nécessaires à la synthèse d'enzymes par les micro-organismes anaérobies (Stronach *et al.*, 1986). Également, certains cations divalents favorisent l'adhésion ou la floculation des micro-organismes. Ces mêmes cations, une fois ajoutés, augmentent la résistance du biofilm (Streicher *et al.*, 1990). Selon ces mêmes auteurs, d'autres études doivent être effectuées pour déterminer lequel des éléments utilisés

comme additifs sont réellement essentiels pour une formation complète du biofilm. Selon Jewell (1990), la dimension du biofilm n'est pas toujours représentative de la quantité de biomasse active présente, car il y a une certaine quantité de cellules mortes qui demeurent accrochées au biofilm. Le principe de biomasse active est sans doute à la base du phénomène voulant qu'un biofilm mince donne un meilleur rendement qu'un biofilm plus épais (Petrozzi *et al.*, 1992). Pour estimer correctement la biomasse active d'un biofilm, il est possible d'évaluer sa concentration en adénosine triphosphate (ATP).

1.4 Mesure de la biomasse par dosage de l'ATP

L'adénosine triphosphate (ATP) est un nucléotide présent dans toute cellule vivante et constitue la principale voie d'emmagasiner et d'utilisation de l'énergie des organismes vivants. Le caractère énergétique de l'ATP réside dans la force des liens unissant les groupements phosphates terminaux de la molécule. Ainsi, l'énergie obtenue du catabolisme des aliments sert à la synthèse d'ATP, par l'ajout supplémentaire de groupements phosphatés aux molécules d'adénosine diphosphate (ADP) et d'adénosine monophosphate (AMP). À l'inverse, la rupture (hydrolyse) de ces liaisons inter-phosphates permet la réalisation de processus avides d'énergie comme la biosynthèse.

Roe et Bhagat (1982) soulignent que les mécanismes biochimiques cellulaires tendent à maintenir une concentration relativement constante d'ATP. Cependant, des chocs environnementaux comme de hautes températures, des écarts de pH et la présence de substances toxiques peuvent causer des

changements au niveau des concentrations cellulaires normales d'ATP. De plus, l'addition de substrat, sa composition, l'inanition (privation totale ou partielle d'éléments nutritifs) des bactéries et des variations dans les populations microbiennes peuvent résulter en de légères modifications de la teneur cellulaire en ATP. Par contre, la phase de croissance des bactéries ne semblerait pas exercer une influence majeure sur le ratio ATP/cellule. L'ATP n'existe qu'à l'intérieur des cellules vivantes et est détruite rapidement après la mort de celles-ci. Comme la quantité d'ATP par cellule ne varie pas significativement pour des conditions données d'équilibre, il est donc possible d'utiliser l'ATP comme mesure de la concentration des cellules vivantes dans un échantillon (Diaz-Burgos *et al.*, 1993). Plusieurs auteurs ont proposé l'ATP comme paramètre de contrôle de l'activité microbienne des systèmes biologiques de traitement des eaux (Chung et Neethling, 1988; Roe et Bhagat, 1982; Kucknerowicz et Verstraete, 1979). Roe et Bhagat (1982) ont même employé des mesures d'ATP dans les boues activées, afin de vérifier un modèle biocinétique basé sur l'équation de Monod. Par contre, seulement Chung et Neethling (1988) ont testé l'application de l'ATP aux systèmes anaérobies de traitement des eaux.

1.5 Produits provenant de la dégradation bactérienne du perméat de lactosérum

Plusieurs auteurs ont étudié la biodégradation du lactosérum de fromage à l'aide de bioréacteurs (Motta-Marques *et al.*, 1990; Schroder et De Haast, 1989; Yan *et al.*, 1989; Mulligan *et al.*, 1993; Ozturk *et al.*, 1993; Streicher *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1990; Guiot *et al.*, 1995; Gutierrez *et al.*, 1991; Hwang et Hansen,

1992; Lo et Liao, 1986; Lo *et al.*, 1988; Mendez *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1994). Plusieurs de ces auteurs ont étudié la biodégradation du perméat en terme de produits récoltés, mais aucun n'a concentré ses efforts sur la production d'acides gras en tant que tel; d'où l'intérêt de cette étude.

Ainsi comme produits importants, quelques acides gras volatils sont retrouvés. Le perméat ne comportant pas de protéines (retenues avec le solide lors de l'ultrafiltration), il est normal de ne pas retrouver d'acides gras à longues chaînes puisque ces derniers proviennent seulement de la dégradation des protéines (Tanaka et Matsuo, 1986). D'après plusieurs auteurs, les acides gras volatils les plus fréquents retrouvés lors de la dégradation bactérienne sont l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide n-butyrique et l'acide n-valérique (Wildenauer et Winter, 1985; Tanaka et Matsuo, 1986; Kisaalita *et al.*, 1987; Lo et Liao, 1986; Strydom *et al.*, 1995). Initialement, les produits laitiers sont caractérisés par une absence d'acides gras volatils (autre que l'acide acétique). Cependant, aussitôt que la dégradation microbienne démarre, la concentration d'acides gras volatils augmente rapidement (Strydom *et al.*, 1995). Il est préférable d'avoir une quantité d'acide acétique dans le perméat de lactosérum car il est le précurseur direct de la méthanogénèse (Strydom *et al.*, 1995). Selon Yan *et al.* (1989), la concentration en acides gras est considérée comme une bonne indication des conditions d'un réacteur anaérobie et un changement dans la concentration d'acides gras reflète un changement dans la population bactérienne du processus anaérobie.

Comme autre produit de la dégradation bactérienne, on retrouve entre autres le méthane (Figure 3) (Viraraghavan et Kikkeri, 1990a). Le méthane est un

combustible de premier choix pour la production d'énergie; il est d'autant plus rentable qu'il peut être utilisé par le même système qu'il l'a produit (Hwang et Hansen, 1992). En général, les compositions de biogaz les plus élevées en méthane sont obtenues lorsque les concentrations en sucre de l'affluent sont basses (Yan *et al.*, 1988). Les digestions anaérobies produisent non seulement du méthane mais aussi du dioxyde de carbone (CO_2), et quelques autres traces de gaz comme le sulfure d'hydrogène (H_2S), l'hydrogène, des vapeurs d'eau et de l'azote (N_2) (Ghaly et Ben-Hassan, 1989). Même si la quantité de méthane augmente avec la température, sa concentration dans le biogaz diminue. Cela s'explique par le fait que la solubilité du dioxyde de carbone dans l'eau à température basse est plus forte que celle du méthane (Viraraghavan et Kikkeri, 1990a; 1990b). La quantité globale de biogaz augmente avec un temps de rétention hydraulique élevé (Desai *et al.*, 1994).

Parmi tous les procédés étudiés jusqu'à présent, les bioréacteurs anaérobies à lit fluidisé sont particulièrement efficaces pour diminuer le sucre rejeté et ainsi diminuer la demande biologique en oxygène. Cependant, il est démontré que les paramètres régissant les bioréacteurs anaérobies à lit fluidisé ne sont pas très connus (Chung et Neethling, 1989). À cet effet, on peut supposer qu'un bon suivi des acides gras et de plusieurs autres paramètres lors du processus de dégradation microbienne est indispensable.

Lors de ce projet, l'évolution (pendant la période de formation du biofilm), des différents paramètres biologiques (bactéries, ATP, sucre, biogaz, acides gras) et physico-chimiques (pH, température, débit de biogaz, fluidisation) contrôlant un

bioréacteur mésophile anaérobie lors du processus de biodégradation a été suivie.

Les objectifs spécifiques de ce projet sont:

- Mesurer les variations temporelles de la concentration en sucre;
- Évaluer la variation temporelle de la biomasse bactérienne à l'aide de l'ATP cellulaire;
- Démontrer la possibilité de produire des acides gras lors du processus de dégradation;
- Énumérer et caractériser les populations bactériennes.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Montage expérimental

Le bioréacteur utilisé dans ce projet consiste en une colonne de "plexi-glass" (2,16 m de longueur et 5 cm de diamètre intérieur). La circulation du liquide dans la colonne se fait du bas vers le haut et ce déplacement s'effectue grâce à deux pompes péristaltiques (Modèle Watson Warlow 503-S): une pour l'alimentation du système fonctionnant à un débit équivalent à 78 mL/min (70 RPM) et l'autre pour assurer une recirculation du liquide à un débit équivalent à 934 mL/min (134 RPM).

Le débit total traité par le bioréacteur est de 112 L/jour de perméat dilué. Le ratio recirculation/alimentation est de 12. Le rapport minimum idéal de recirculation par rapport à l'alimentation est de 3 (Garcia *et al.*, 1991). Le liquide à traiter passe en moyenne 12 minutes dans le lit de charbon, et cela en maintenant constant le débit des pompes, ce qui signifie que le liquide passe en moyenne 1 minute dans le lit de charbon; en raison de la recirculation, il y passe 12 fois au total, ce qui donne 12 minutes. Ce temps représente le temps de rétention hydraulique (TRH).

Le charbon utilisé comme support bactérien est situé dans la partie inférieure de la colonne et le lit au repos mesure 43,2 cm de haut lorsqu'il n'y a aucune circulation de liquide, et remplit alors la colonne presque au tiers de sa capacité. Les grains le composant ont un diamètre moyen de 0,86 mm (14-25 mesh) et proviennent de la compagnie A.C. Carbone Canada Inc. Ces grains ont

la propriété d'être poreux, ce qui facilite l'adsorption de bactéries sur leur surface pour former un biofilm.

Le pH du système a été maintenu à 5,0 à l'aide d'un contrôleur de pH (pHmeter Barnant Company, type HD PH-P) utilisant le NaOH 1N comme base. Au cours des essais, la production de biogaz n'était pas recherchée mais bien une production d'acides gras; ce qui justifie le choix d'un pH acide. La température est maintenue à 37°C grâce à un système informatique (Modèle Omron E5CX). Le bioréacteur et son équipement sont représentés à la Figure 4.

On obtient environ 9 Litres de lactosérum pour chaque kilogramme de fromage produit (Hwang et Hansen, 1992). Sa teneur en hydrate de carbone en équivalents glucose a été mesurée à environ 58 355 mg/L $\pm 1\%$, mais peut varier considérablement de 27 000 à 60 000 mg/L. C'est pourquoi la concentration en sucre est mesurée (selon la procédure d'évaluation des sucres retrouvée plus loin) à chaque nouvelle boîte de perméat. Le perméat utilisé dans cette étude provenait de la fromagerie Nutrinor située à Chambord, Lac-Saint-Jean. À son arrivée, le perméat est placé au congélateur (-20°C) jusqu'à son utilisation. Après décongélation, le perméat est dilué avec de l'eau distillée afin d'obtenir une concentration précise en sucre. Le mélange est placé dans un réfrigérateur à 4°C et constitue l'alimentation du système.

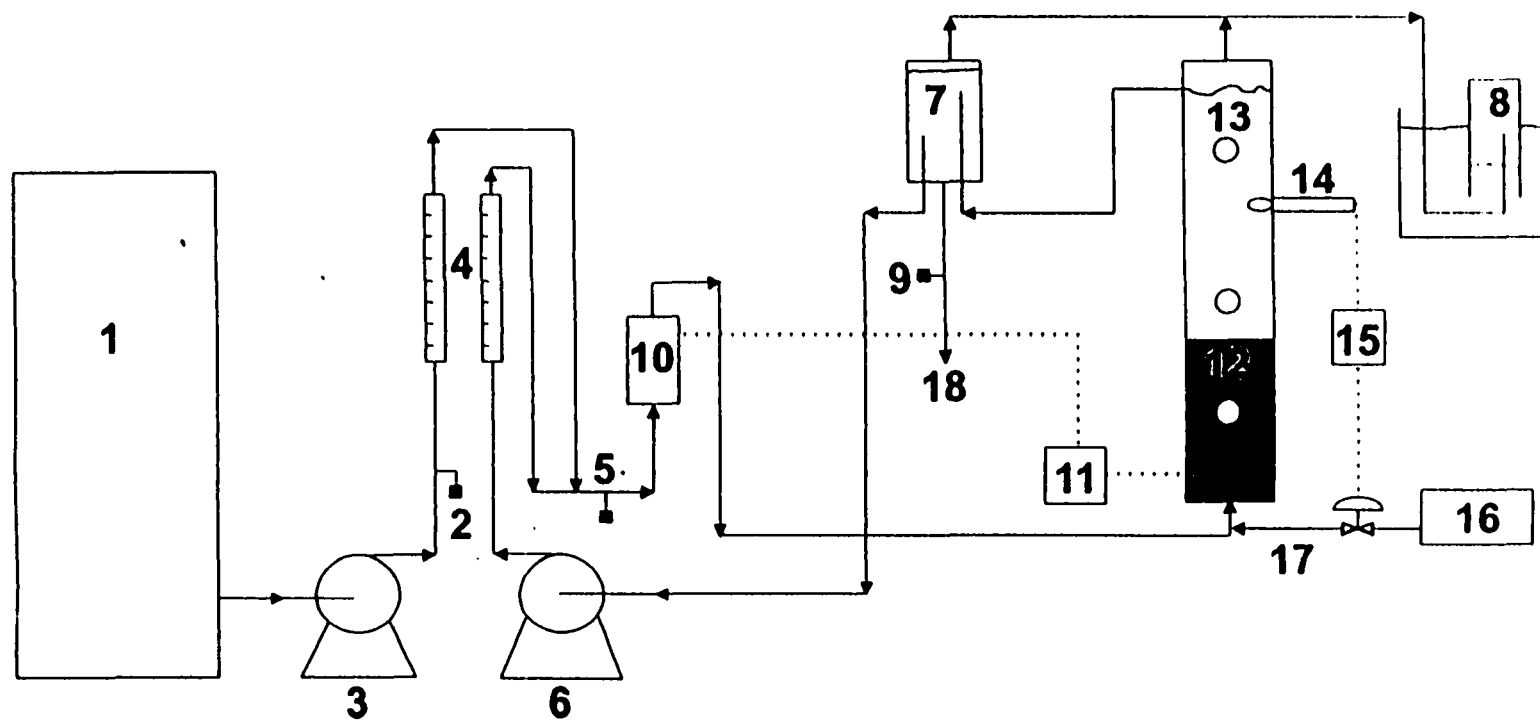


Figure 4: Schéma simplifié du bioréacteur utilisé: (1) Réservoir d'alimentation; (2) Prise échantillon de l'entrée; (3) Pompe pour l'alimentation; (4) Rotomètres; (5) Prise échantillon au point de mélange; (6) Pompe pour la recirculation; (7) Bassin de décantation; (8) Récupération du biogaz; (9) Prise échantillon de la sortie; (10) Chauffe-eau; (11) Contrôleur de température; (12) Lit de charbon; (13) Liquide dans le bioréacteur; (14) Électrode de pH; (15) Contrôleur de pH; (16) Réservoir de NaOH; (17) Entrée de NaOH; (18) Sortie du système.

La culture bactérienne utilisée comme inoculum provient du système de digestion anaérobie des boues produites par les installations de traitement des eaux domestiques de la Base militaire de Valcartier. Ces boues contiennent une population mixte de bactéries anaérobies acidogènes et méthanogènes. Un mélange de méthanogènes avec des acidogènes est plus efficace pour diminuer la DCO que des boues enrichies seulement avec des méthanogènes (Patoine *et al.*, 1994). Ces boues ont été conservées de façon anaérobie à 4°C, jusqu'à l'inoculation. Cette dernière s'effectue en anaérobiose en faisant barboter de l'azote (N_2) dans le récipient contenant les boues. Les boues diluées dans l'eau distillée sont ensuite aspirées par une des deux pompes du système jusqu'au niveau du lit de charbon; à partir de ce moment, le système fonctionne en circuit fermé pendant au moins 12 heures pour permettre à la majorité des bactéries de se fixer au support. L'inoculation s'est effectuée à deux reprises lors de l'expérimentation; au tout début, soit le 1er mai et une autre fois, le 27 mai après un bris du système.

L'échantillonnage s'est effectué pendant 50 jours et cela sans interruption. Les échantillons pour l'analyse de l'ATP et des acides gras ont été prélevés pendant trois jours consécutifs durant l'état quasi-stable du bioréacteur comme dans l'expérience de Lo et Liao (1986). Le bioréacteur fonctionnait avec une alimentation continue en perméat à concentration d'équivalents glucose par Litre (g/L) la plus constante possible, soit approximativement 5 g/L pour les 12 premiers jours, suivis de 15 jours à environ 10 g/L, 11 jours aux alentours de 20 g/L et environ 30 g/L était recherché pour les 7 derniers jours. Selon Yu et Pinder

(1993), 1g de lactose est équivalent à 1,067g de DCO pour l'oxydation complète de ce sucre.

2.2 Le sucre

Les échantillons de liquide sont prélevés en trois (3) points (Figure 4): à l'alimentation (point 2), au point de mélange de l'alimentation et de la recirculation soit l'entrée du système (point 5) et à la sortie du système (point 9). Un volume d'environ 50 mL y est prélevé et cela à toutes les 12 heures, pendant les 45 jours de l'expérimentation. Par la suite, la détermination colorimétrique des sucres a été effectuée pour chacun des échantillons selon le protocole présenté au Tableau 3. La réaction chimique qui se produit est expliquée plus bas.

Le phénol en présence d'acide sulfurique est employé pour la microdétermination colorimétrique quantitative des sucres et de leurs dérivés méthylés, des oligosaccharides et des polysaccharides, selon la méthode originalement développée par Dubois *et al.*, (1956). La réaction entre le phénol et les sucres implique la déshydratation des sucres (hexoses) en 5-(hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde (HMF), en présence d'acides forts. La réaction subséquente du phénol avec HMF mène à la formation d'un chromogène inconnu. L'intensité de la couleur produite est fonction de la quantité de phénol ajoutée. Cette technique est l'une des plus utilisées pour l'analyse des sucres (Rahman et Richards, 1987; Aminoff *et al.*, 1970).

Tableau 3: Détermination colorimétrique des sucres.

- 1) Prélever 10 mL d'échantillon liquide du bioréacteur;
- 2) Diluer l'échantillon pour obtenir une concentration finale comprise entre 20 et 100 mg/L d'équivalents glucose;
- 3) Pipetter 1 mL de la solution diluée sur la paroi intérieure d'une éprouvette;
- 4) Pipetter 1 mL d'une solution phénol 5% sur la paroi intérieure de l'éprouvette. Agiter pendant 30 secondes à l'aide d'un agitateur (vortex);
- 5) En agitant simultanément l'éprouvette, pipetter 5 mL d'acide sulfurique concentré sur la paroi intérieure. Poursuivre l'agitation durant 30 secondes supplémentaires;
- 6) Laisser reposer la solution 30 minutes à température de la pièce et mesurer son absorbance à une longueur d'onde de 488 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre;
- 7) Calculer la concentration de l'échantillon en équivalents glucose, en utilisant une courbe de calibration construite à partir de solutions standards de D-glucose (Annexe 1) analysées de la même façon;
- 8) Rapporter ensuite la concentration de substrat dans le bioréacteur en tenant compte du facteur de dilution.

2.3 Le biogaz

Le biogaz produit est récupéré selon le principe du déplacement d'eau. Ce dispositif se compose d'un cylindre gradué de 2 Litres placé à l'envers dans un récipient d'eau permettant de récupérer le biogaz produit et surtout d'en évaluer la quantité durant une période de temps donnée. À chaque jour, le volume de biogaz produit en 15 minutes est noté.

Lorsque le bioréacteur était alimenté avec une concentration de 30 g/L d'équivalents glucose, une quantité de 400 μ L de biogaz a été prélevée. Cette opération avait pour objectif de connaître la composition du biogaz produit. Cette même quantité a été injectée dans un chromatographe à gaz de marque Fisher-Hamilton (Colonne 1: Desh; colonne 2: molecular sieve 5A 45/60 mesh; atténuation: 16; port: I; gaz porteur: hélium, 42cc/min; intégrateur de marque ABB Metrawatt SE 120 à 1 mv et 1 cm/min). Des quantités de 400 μ L de dioxyde de carbone (CO_2) et une autre de méthane (CH_4) ainsi que des mélanges de différentes proportions ont également été injectées comme standard.

2.4 L'ATP

La réaction enzymatique bioluminescente du système luciférine-luciférase est considérée par plusieurs auteurs comme l'étape analytique finale de la mesure des concentrations d'ATP. Le dosage de l'ATP bactérien à l'aide de cette technique nécessite l'extraction préalable du nucléotide. Plusieurs agents d'extraction ont déjà été testés pour leur efficacité, notamment des solvants

organiques, des acides inorganiques et des tampons bouillants (Chappelle *et al.*, 1978). L'agent d'extraction idéal de l'ATP bactérien devrait permettre l'extraction complète du nucléotide avec hydrolyse minimale et ce, sans causer d'inhibition à la réaction enzymatique bioluminescente subséquente. Le tampon tris-hydroxyméthyle-aminométhane (TRIS) bouillant est le solvant d'extraction le plus utilisé pour les boues activées; il est actuellement le seul à être testé pour les boues anaérobies (Chung et Neethling, 1988; 1989). Les échantillons pour la mesure de l'ATP ont été prélevés dans le liquide du bioréacteur, au niveau des grains du lit de charbon et au niveau du liquide supérieur au lit à l'aide d'une seringue afin de préserver la condition d'anaérobiose. Le solvant choisi pour l'extraction de l'ATP est une solution bouillante de TRIS 20mM et d'acide tétraacétique d'éthylenediamine (EDTA) 2mM, pH 7,75. La préparation d'un litre de ce tampon (A) et le processus d'extraction (B) sont présentés au Tableau 4.

Une fois extrait, l'ATP peut être dosé au moyen de la réaction enzymatique bioluminescente des lucioles (Karl et Larock, 1975). À cette fin, des méthodes sensibles ont été développées sur la base du fait que la lumière émise par les lucioles nécessitait un apport absolu en ATP (Chung et Neethling, 1988). La production de lumière par les extraits d'antennes de lucioles est catalysée par l'enzyme luciférase et basée sur une réaction bioluminescente (Lemasters et Hackenbrock, 1978). À des concentrations d'ATP inférieures à 25 μ M, la teneur en ATP peut être calculée sur l'assertion qu'elle est directement proportionnelle à la luminescence.

Tableau 4: Procédure d'extraction de l'ATP.**A Préparation du tampon**

- 1) Dissoudre 2,4272 g de TRIS et 0,7445 g de EDTA dans 950 mL d'eau distillée, déminéralisée et stérile pour préparer 1 Litre de solvant;
- 2) Ajuster le pH de cette solution à 7,75 avec une solution de HCl concentrée;
- 3) Compléter le volume à un Litre avec de l'eau déminéralisée et stérile.

B Processus d'extraction

- 4) Prélever 0,1 mL d'échantillon du bioréacteur et l'ajouter à 10 mL de tampon bouillant;
- 5) Couvrir la solution bouillante de papier d'aluminium et prolonger l'extraction pendant 90 à 120 secondes;
- 6) Refroidir le mélange sur bain de glace jusqu'à la température de la pièce;
- 7) Compléter le volume perdu par évaporation à 10 mL avec de l'eau stérile;
- 8) Agiter, filtrer sur acétate de cellulose 0,45 μm et congeler le filtrat à -20°C , jusqu'à la détermination de la bioluminescence.

Des études ont démontré l'inhibition de l'activité enzymatique de la luciférase par la présence des cations Ca^{2+} , K^{+} et Na^{+} , des anions $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$, Cl^{-} , et NO_3^{-} , ainsi que par celle de certaines matières organiques dissoutes (Lefèbre *et al.*, 1988). Comme ces substances sont omniprésentes dans les eaux usées, leurs interactions avec la réaction enzymatique sont fort probables. Karl et Larock (1975) ont démontré que l'inhibition ionique de cette réaction était fonction de la

nature des ions présents ainsi que de leurs concentrations et de la concentration d'ATP dans l'échantillon. Ces auteurs ont de plus observé que l'ajout d'EDTA, à l'agent d'extraction, permettait de complexer les ions inhibiteurs et ainsi réduire l'interférence ionique. Cependant, l'addition excessive d'EDTA peut aussi inhiber l'émission de lumière, probablement en complexant les ions Mg^{2+} nécessaires au système luciférine-luciférase.

Les réactifs nécessaires pour ces essais ont été obtenus de la compagnie SIGMA (kit FL-AA). Le mélange enzymatique (FL-AAM) a été dilué 25 fois avec le tampon à dilution (FL-AAB), afin d'obtenir un réactif permettant l'analyse d'échantillons dans l'intervalle de concentrations d'ATP se situant entre $2E^{-10}$ et $2E^{-7}$ mole. Une courbe de calibration est construite dans le but de confirmer la linéarité de la bioluminescence entre ces deux extrémités (Annexe 2). La détermination quantitative de l'ATP à l'aide du luminomètre LKB, modèle 1250 s'effectue selon le protocole présenté au Tableau 5. Une fois le plateau de luminescence atteint (Annexe 3), le calcul de la concentration molaire en ATP dans l'échantillon inconnu est effectué selon la formule suivante :

$$\text{Concentration molaire d' ATP dans l'échantillon inconnu} = \frac{\text{concentration molaire d' ATP standard} * mV_i}{mV_s}$$

où mV_i = millivolts de l'inconnu
 mV_s = millivolts du standard

Tableau 5: Détermination quantitative de l'ATP.

- 1) Conserver les échantillons décongelés en tout temps sur la glace;
- 2) Préparer les réactifs nécessaires (enzymes et standards) et les conserver en tout temps sur la glace;
- 3) Mettre le luminomètre et l'enregistreur graphique sous tension 30 minutes avant leur utilisation;
- 4) Mettre l'appareil en position <<STANDARD IN>> et ajuster <<BACKGROUND SUB>> à zéro;
- 5) Ajuster <<GAIN>> pour obtenir une réponse de 10 mV à l'enregistreur et ceci en tenant compte de l'échelle de travail et mettre en position <<SAMPLE IN>>;
- 6) Ajuster <<BACKGROUND SUB>> afin d'obtenir une réponse de 0 mV à l'enregistreur;
- 7) Remettre en position <<STANDARD IN>> et réajuster <<GAIN>> à 10 mV;
- 8) Remplir le système d'injection de l'appareil avec du réactif enzymatique ainsi que la seringue qui y est fixée;
- 9) Pipetter 100 μ L de solution standard ou d'échantillon dans une cuvette de polystyrène appropriée à cette fin et la placer dans l'appareil en position <<SAMPLE IN>>;
- 10) Mettre l'enregistreur en marche à 0,5 mm/seconde;
- 11) Injecter 100 μ L de réactif enzymatique et mettre en marche l'agitateur de la cuvette.

Le volume de l'échantillon et sa dilution dans le tampon d'extraction sont ensuite pris en considération et la concentration en ATP rapportée est celle initialement contenue dans l'échantillon en mole/L. Pour avoir la valeur correspondante en mole/m³ de support pour les grains, on multiplie la concentration en mole/L par 2 (pour le facteur de dilution). La valeur obtenue est divisée par la masse de charbon correspondant à cette concentration d'ATP; ce qui donne une valeur en mole d'ATP/ g de support. Cette dernière est multipliée par la densité du charbon, soit 1,17 g/mL. Pour terminer on multiplie par 1×10^6 , pour obtenir la valeur en mole d'ATP/m³ de support.

2.5 Les acides gras

Il s'agit ici d'extraire les acides gras à courtes chaînes comme les acides acétique, propionique, iso-butyrique et n-butyrique. Les acides gras non volatils ou à longues chaînes n'ont pas été recherchés puisque les bactéries identifiées ne produisent pas ce genre d'acides, comme cela a été mentionné auparavant. Ainsi, des échantillons liquides provenant directement de l'alimentation (perméat brut), du point d'entrée, de la sortie du système et du liquide supérieur au lit de charbon ont été prélevés. Ces échantillons sont prélevés pendant les dernières 36 heures à chaque concentration d'alimentation (5, 10, 20 et 30 g/L) étudiée où l'état du bioréacteur est considéré stable. La procédure d'extraction et d'analyse GC-MS des acides gras volatils (GC Bulletin 856A, 1990) est présentée au Tableau 6.

Tableau 6: Procédure d'extraction des acides gras.

- 1) Prélever environ 50 mL d'échantillon liquide dans le bioréacteur;
- 2) Acidifier l'échantillon jusqu'à pH 2 avec du H_2SO_4 50% (environ 0,1 mL de H_2SO_4 50% pour 6 mL d'échantillon);
- 3) Placer l'échantillon acidifié dans une ampoule à décantation;
- 4) Ajouter 50 mL d'éther ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), mélanger doucement en inversant l'ampoule et évacuer le gaz quelques fois;
- 5) Récupérer la phase organique (celle du dessus);
- 6) Répéter l'étape #4 avec la phase restante;
- 7) Répéter l'étape #5;
- 8) Répéter les étapes 6 et 7;
- 9) Mélanger les phases organiques recueillies;
- 10) Ajouter du MgSO_4 jusqu'à formation d'un dépôt au fond. Laisser reposer 10 minutes pour enlever toute trace d'eau dans l'éther;
- 11) Évaporer l'échantillon jusqu'à l'obtention d'un volume final de 50 mL;
- 12) Injecter la quantité appropriée (1,2 μL) de l'extrait dans la colonne du chromatographe.

Le chromatographe utilisé est un GC-MS (Hewlett Packard 5700 A) muni d'un intégrateur (Hewlett Packard 3390 A). La colonne est du type 10% sp1200/1% H₃PO₄ 80/100 chromosorb, WAW 6' alloy R63780. Les différentes températures sont les suivantes: détecteur à ionisation de flamme: 200°C; four: 100°C; injecteur: 150°C. Le débit d'azote (N₂), utilisé comme gaz porteur, est de 40mL/min.

Avec les chromatogrammes obtenus, une moyenne des aires pour chaque acide (trois injections du même échantillon) est calculée. Ces aires sont comparées à celles des standards utilisés (Annexe 4). Les standards sont les acides acétique, propionique, iso-butyrique et n-butyrique. Les standards ont été traités de la même façon que les échantillons et la quantité injectée est la même, soit 1,2µL. Avec les aires d'intégration et les temps de rétention, il est possible d'identifier et de quantifier les acides présents. Avec la formule présentée en annexe (Annexe 5), il est possible d'obtenir la concentration en g/L de l'acide étudié.

2.6 Les bactéries

Pour conserver la condition d'anaérobiose, les bactéries sont prélevées à l'aide d'une seringue. Les bactéries proviennent des grains de charbon ainsi que du liquide supérieur au lit de charbon. Une fois prélevées, les bactéries sontensemencées de façon anaérobie sur deux types de milieux de culture. Ces milieux sont: Agar-agar (Merck n°1614) et viande-foie (Merck n°15045). Après une incubation de 48 heures, les colonies distinctes sont repiquées sur milieu

Agar-agar, VRBD (Merck n°10275), OF (Merck n°10282) et MacConkey (Merck n°5465). La composition et l'analyse de chacun de ces milieux sont présentées plus loin au Tableau 7. Des échantillons d'inoculum et de perméat ont également été ensemencés sur ces mêmes milieux. La procédure générale utilisée pour chaque colonie isolée est présentée à la Figure 5.

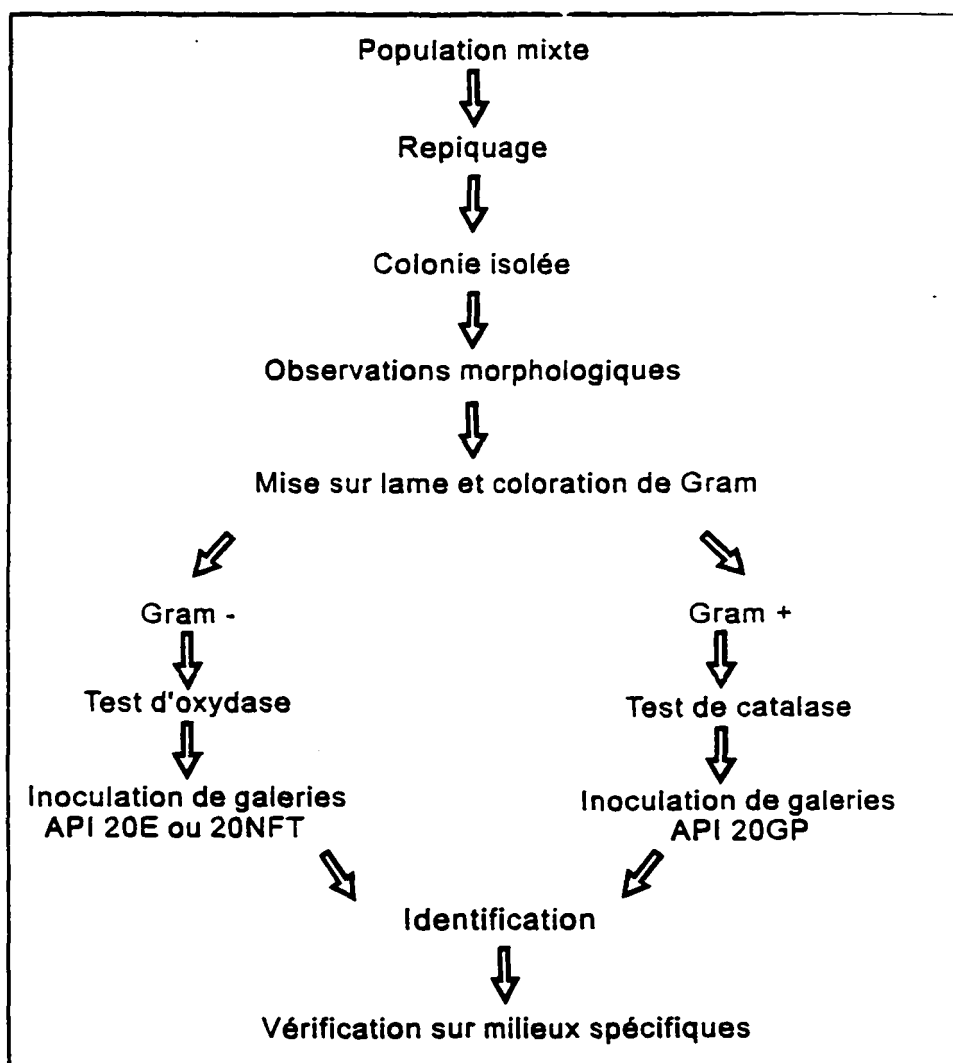


Figure 5: Procédure originale utilisée lors de l'identification d'une colonie bactérienne.

Tableau 7: Composition des différents milieux de cultures utilisés.

Milieux	Volume (mL)	Composition*	Concentration (g/L)
Agar-agar (n°1614)	1 000	-peptone/viande -extrait de viande -Agar-agar	5,0 3,0 12,0
Viande-foie (n°15045)	1 000	-base viande-foie -D(+)-glucose -amidon -sulfite de sodium -citrate ferrique d'ammonium -Agar-agar	20,0 0,75 0,75 1,2 0,5 11,0
Milieu nutritif test OF (n°10282)	1 000	-peptone de caséine -extrait de levure -chlorure de sodium -di-potassium hydrogénéphosphate -bleu de bromothymol -Agar-agar	2,0 1,0 5,0 0,2 0,08 2,5
Agar VRBD (n°10275)	1 000	-peptone/viande -extrait de levure -chlorure de sodium -D(+)-glucose -mélange de sels biliaires -rouge neutre -cristal violet -Agar-agar	7,0 3,0 5,0 10,0 1,5 0,03 0,002 13,0
Agar MacConkey (n°5465)	1 000	-peptone de caséine -peptone/viande -chlorure de sodium -lactose -mélange de sels biliaires -rouge neutre -cristal violet -Agar-agar	17,0 3,0 5,0 10,0 1,5 0,03 0,001 13,5

* Données provenant de Merck, manuel de microbiologie

L'Agar-agar est un polygalactoside extrait de certaines algues rouges marines dont les groupes hydroxyliques sont en partie estérifiés avec l'acide sulfurique. La grande majorité des micro-organismes ne peut pas décomposer l'agar-agar.

L'Agar viande-foie est utilisé pour la recherche des micro-organismes anaérobies. L'amidon facilite la germination des spores, le sulfite est réduit en sulfure par les sulfo-bactéries et réagit avec les ions ferriques en provoquant le noircissement des colonies.

Le milieu nutritif pour l'essai d'oxydation et de fermentation (OF) est utilisé pour la reconnaissance des métabolismes oxydatif et fermentaire des micro-organismes pendant la dégradation des glucides. Il sert en particulier à différencier et à classer les bactéries intestinales Gram-négatives. Une coloration jaune dans les tubes traduit une dégradation oxydative du glucide ajouté.

L'agar glucosé au cristal violet, au rouge neutre et à la bile (VRBD) sert au développement et à la numération de la totalité des Enterobactériacés dans les denrées alimentaires. La flore secondaire est inhibée par le cristal violet et les sels biliaires présents. Il contient, comme composé réactionnel, du glucose dont la dégradation en acide est révélée par un virage au rouge de l'indicateur de pH, le rouge neutre, ainsi que par un halo d'acides biliaires précipités autour des colonies.

L'Agar MacConkey est un agar sélectif pour *Salmonella*, *Shigella* et des bactéries coliformes présentes dans les fèces, l'urine, les denrées alimentaires, les eaux résiduaires, etc. Les sels biliaires et le cristal violet inhibent largement la flore Gram-positive. L'indicateur de pH, le rouge neutre, sert à mettre en évidence la dégradation du lactose. Les colonies lactose-négatives sont incolores, les colonies lactose-positives sont rouges avec un halo trouble dû aux acides biliaires précipités par l'abaissement du pH.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Pour les figures 6 à 13, une zone stable a été délimitée (lignes pointillées). Cette zone se veut représentative et permet de calculer des valeurs moyennes afin de comparer les résultats obtenus. Ces moyennes sont présentées aux Tableaux 8 et 9. Il est important de préciser que la plupart des résultats proviennent d'une donnée unique et non d'une série de données, d'où l'absence de calcul d'erreur pour les figures. Les précisions sur les méthodes de dosage du sucre, des acides gras et de l'ATP sont retrouvées à l'Annexe 8.

3.1 Paramètres de fonctionnement du bioréacteur

3.1.1 Concentration d'alimentation de 5 g/L

La Figure 6 illustre la variation temporelle des paramètres suivants: concentration en sucre, efficacité de biodégradation, débit de biogaz, concentration d'ATP et hauteur du lit de charbon. À l'alimentation du système, le sucre (partie a) est à une concentration de 5 g/L d'équivalents glucose. Une grande variabilité temporelle autant au point d'alimentation qu'aux autres points d'échantillonnage est observée. Les valeurs varient entre 2 et 7,5 g/L à l'alimentation, tandis qu'aux deux autres points d'échantillonnage, elles varient de 0,2 à 6 g/L. Aux trois points, les fluctuations présentent généralement beaucoup de similitude. Ainsi, à la 132^{ième} heure (T_{132}), il y a une forte baisse de la concentration du sucre à chaque point d'échantillonnage.

La partie b représente l'efficacité du système. Il indique, en pourcentage, la valeur de l'enlèvement du sucre entre le point d'entrée et la sortie.

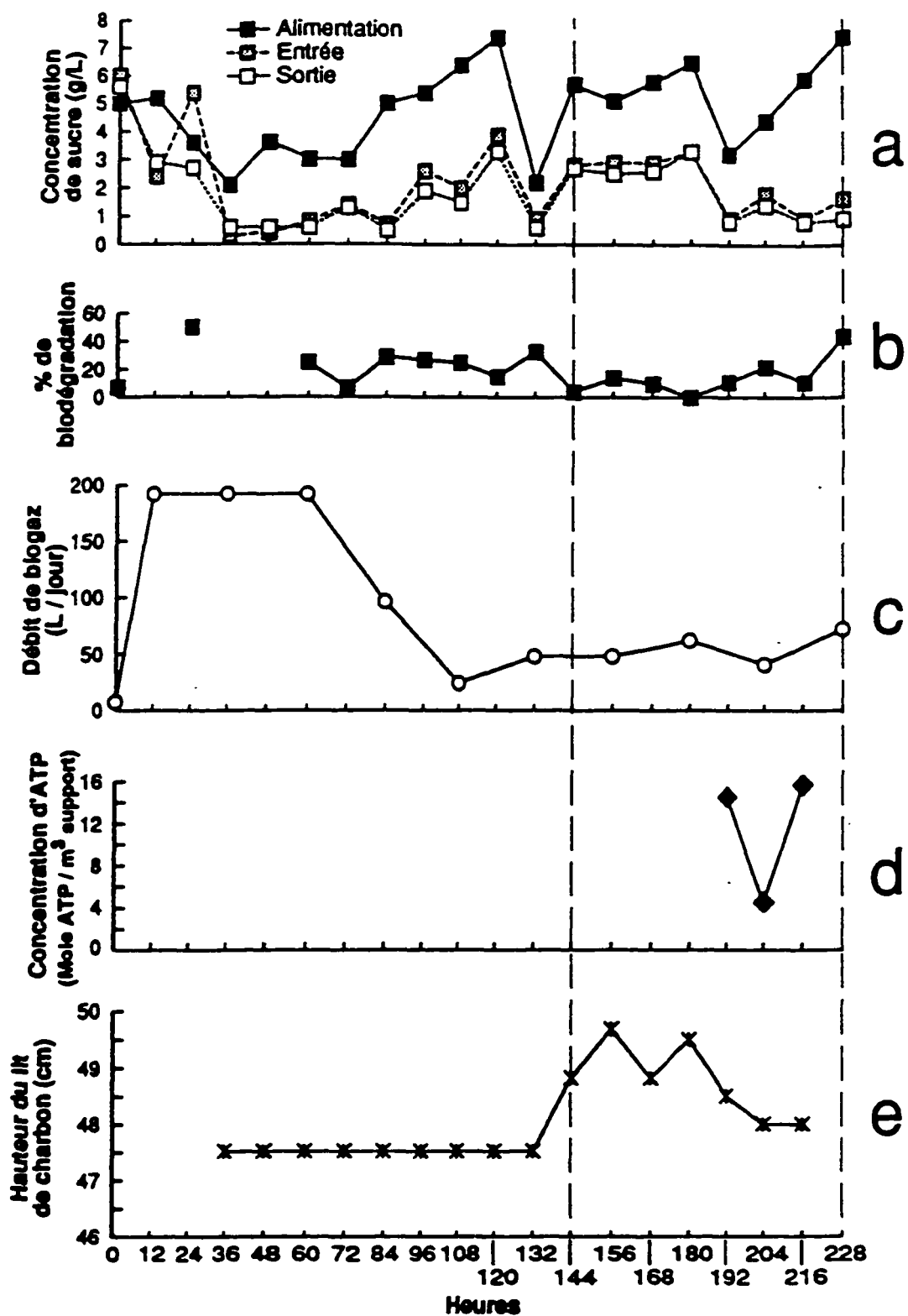


Figure 6: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 5 g/L.

À certains endroits, il y a absence de données parce que les concentrations en sucre à la sortie étaient plus élevées que celles observées au point d'entrée; puisque les valeurs de biodégradation devenaient négatives, elles ne sont donc pas présentées. Le bioréacteur dégrade en moyenne 10% du sucre lorsqu'il fonctionne à une concentration d'alimentation de 5 g/L.

La production de biogaz (partie c) augmente rapidement et elle atteint une valeur maximale de 190 L/jour à T_{12} . Après une période de plafonnement (ΔT_{12-60}), il y a une forte diminution pour atteindre une moyenne de 56 L/jour à $\Delta T_{108-228}$.

Les concentrations d'ATP (partie d) mesurées au niveau des grains de charbon à $\Delta T_{192-216}$ varient de 4,2 à 15,9 moles ATP/m³ de support. Cette variation fluctue dans le même sens que le biogaz mais à l'inverse pour le sucre (points d'entrée et de sortie) pour la même période de temps.

La hauteur du lit de charbon (partie e) est stable à 47,5 cm à ΔT_{36-132} et augmente jusqu'à 49,9 cm à T_{156} . Cette augmentation est similaire à celle du sucre pour $\Delta T_{132-156}$. La hauteur du lit diminue pour se stabiliser à 48 cm (T_{204}) jusqu'à la fin.

Quant aux acides gras (Figure 7), à chaque point d'échantillonnage les mêmes 4 acides mais en proportion différente sont retrouvés: soit l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide iso-butyrique et l'acide n-butyrique. À l'alimentation, soit dans le perméat brut, c'est l'acide acétique qui domine.

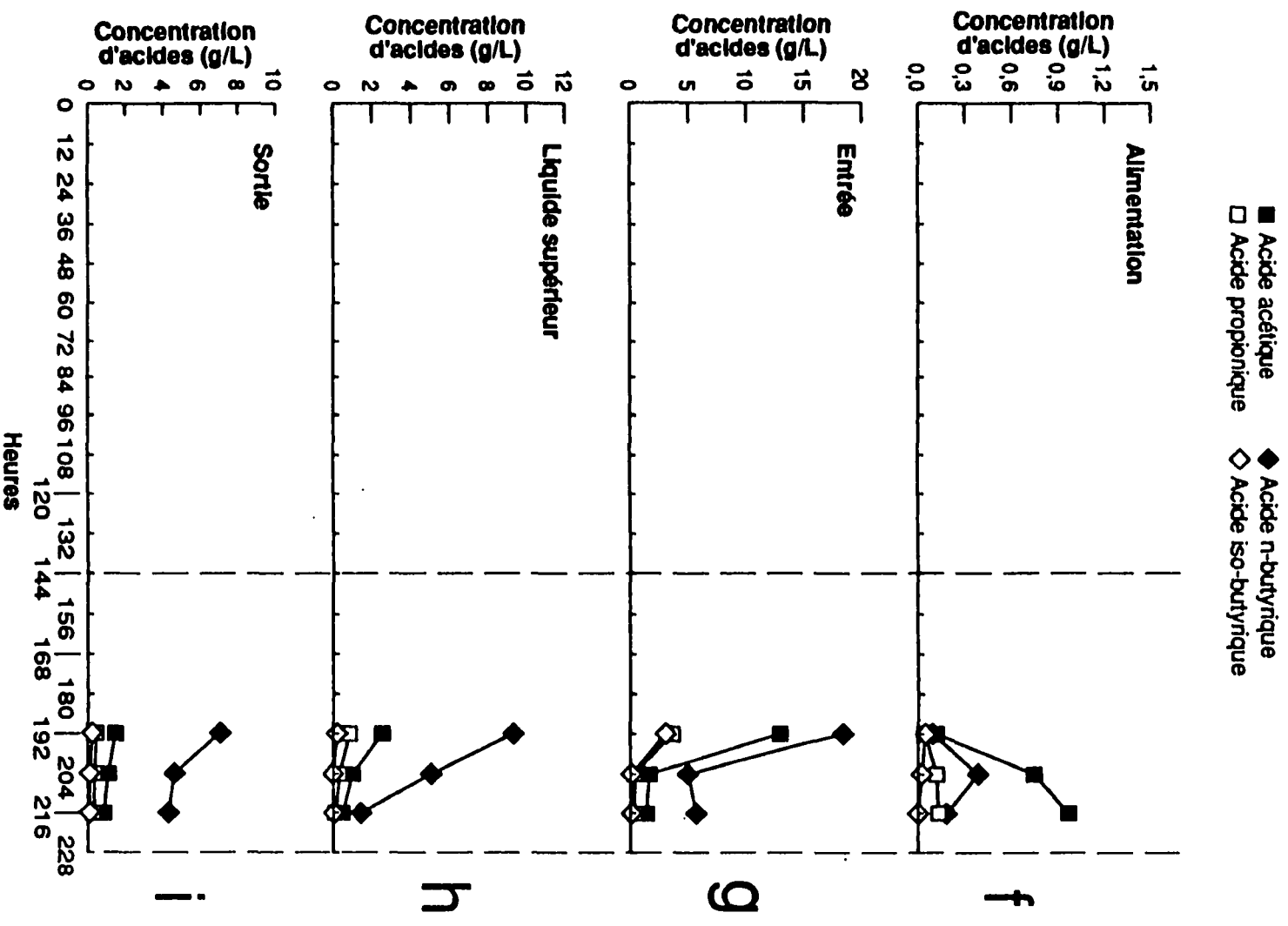


Figure 7 : Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration de sucre de 5 g/L.

Immédiatement au point d'entrée, même si les concentrations d'acide acétique sont plus fortes qu'à l'alimentation, cet acide devient le produit secondaire, dominé par l'acide n-butyrique, ce qui fait que l'acide n-butyrique devient le principal produit. Cette tendance (diminution de l'acide acétique par rapport à l'acide n-butyrique) se poursuit jusqu'au point de sortie, où l'acide n-butyrique domine nettement sur les autres acides gras. Malgré une forte baisse de la concentration de l'acide acétique entre l'entrée et le point de sortie, ses concentrations demeurent tout de même supérieures à celle des acides propionique et iso-butyrique.

On observe donc qu'à la sortie du système fonctionnant à 5 g/L d'équivalents glucose, la production d'acide n-butyrique est plus élevée (de 4,3 à 6,8 g/L) que la production totale des acides acétique (de 0,89 à 1,71 g/L), propionique (de 0,24 à 0,37 g/L) et iso-butyrique (de 0,07 à 0,20 g/L). Les concentrations des acides tendent à diminuer à $\Delta T_{192-216}$, contrairement aux autres paramètres qui augmentent (sucre, biogaz, ATP) (Figure 6).

3.1.2 Concentration d'alimentation de 10 g/L

Dans la Figure 8, les variations temporelles des divers paramètres du bioréacteur pour une alimentation à 10 g/L d'équivalents glucose pendant 300 heures d'activité sont présentées.

Dans la partie a, une grande variabilité temporelle du sucre est observée. Les concentrations en sucre, entre l'alimentation et les deux autres points

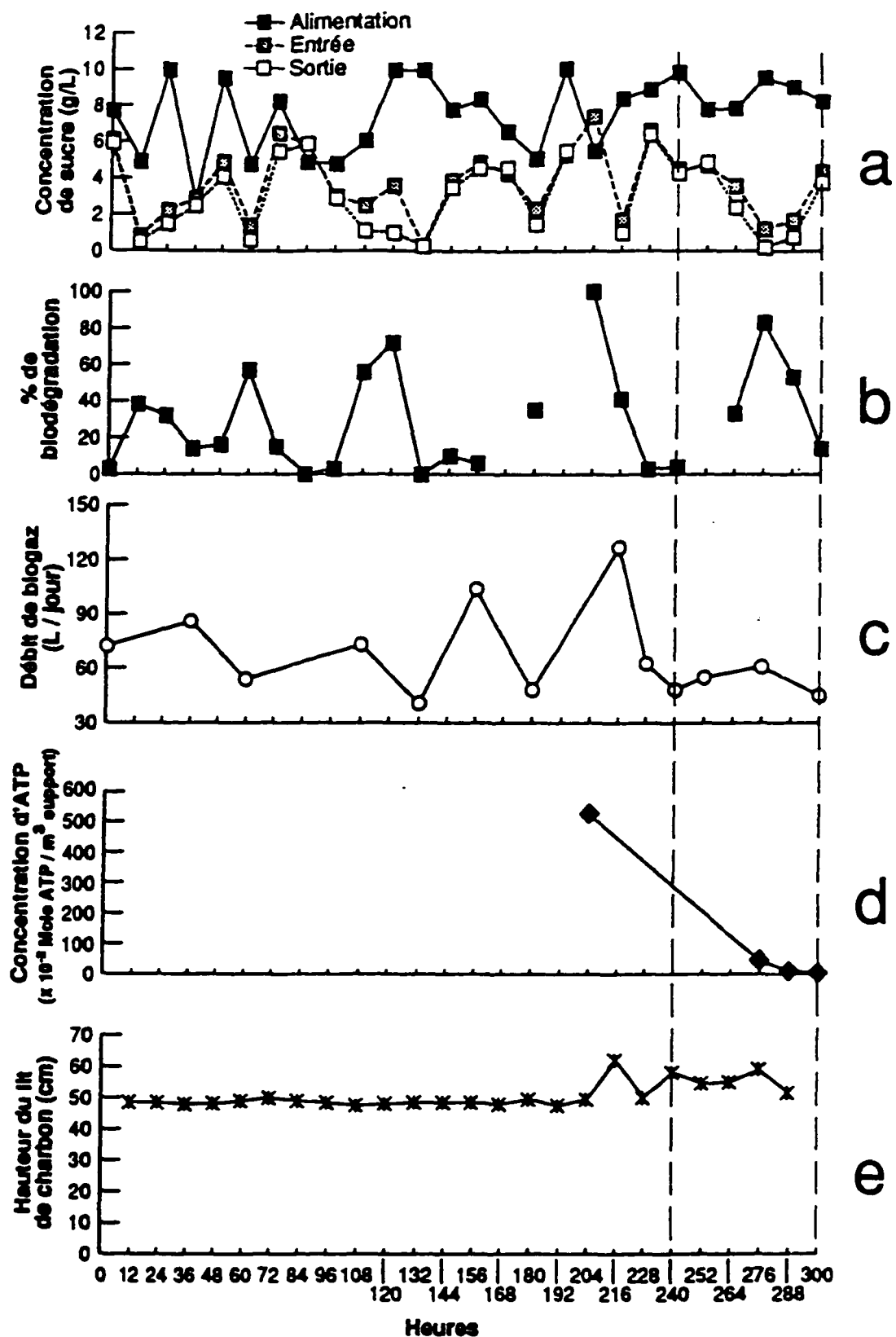


Figure 8: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 10 g/L.

d'échantillonnage, soit les points d'entrée et de sortie, fluctuent dans des sens différents pour certains temps donnés (T_{36} , T_{84} , T_{132} et T_{204}). Par contre, les variations des concentrations en sucre entre les points d'entrée et de sortie présentent beaucoup de similitude.

Concernant l'efficacité du système (partie b), le pourcentage de dégradation est plus élevé que celui pour une alimentation en sucre de 5 g/L avec une moyenne de 21%. Des valeurs maximales de 100 et 80% sont respectivement enregistrées aux T_{204} et T_{276} .

La quantité de biogaz (partie c) produit varie entre 40 et 130 L/jour. Elle est plutôt stable à $\Delta T_{228-300}$ et elle se situe en moyenne à 52 L/jour (zone pointillée). La plus forte production de gaz (T_{216}) suit de 12 heures le plus haut taux de biodégradation (100% à T_{204}).

Vers la fin de l'expérimentation à 10 g/L (T_{204}), le système s'est complètement déstabilisé avec une perte du lit de charbon, une baisse de la température et une augmentation du pH, ce qui a nécessité une autre inoculation du système avec des boues. Au moment du bris du système (T_{204}), la concentration d'ATP est de 5,21 moles d'ATP/m³ de support. En comparant cette dernière concentration d'ATP avec celles correspondant à $\Delta T_{276-300}$, on s'aperçoit que les concentrations en ATP étaient nettement supérieures avant cet accident. La concentration d'ATP (partie d) prise à $\Delta T_{276-300}$ est en moyenne de $1,6 \times 10^{-1}$ mole ATP/m³ de support. Cette variation fluctue dans le même sens que le biogaz et le sucre à l'alimentation.

La hauteur du lit (partie e) est relativement stable pendant presque toute la durée de l'expérimentation; elle varie très peu, soit de 50 à 58 cm à $\Delta T_{204-228}$ soit pour 24 heures seulement. Cette augmentation survient au même moment que le débit de biogaz (T_{216}) est à son taux le plus élevé.

À la Figure 9, l'absence totale de l'acide iso-butyrique est observée et cela à chaque point d'échantillonnage. Alors les acides acétique, propionique et n-butyrique sont les principaux produits obtenus à une alimentation de 10 g/L d'équivalents glucose. Comme précédemment, l'acide acétique domine au point de l'alimentation. Aux points d'entrée, du liquide supérieur et de la sortie, la concentration de l'acide n-butyrique demeure constante, tandis que l'acide acétique, lui, voit sa concentration augmenter. L'acide n-butyrique ne devient donc jamais le principal produit. Les acides acétique et n-butyrique sont les principaux produits tandis que l'acide propionique est toujours produit en minorité.

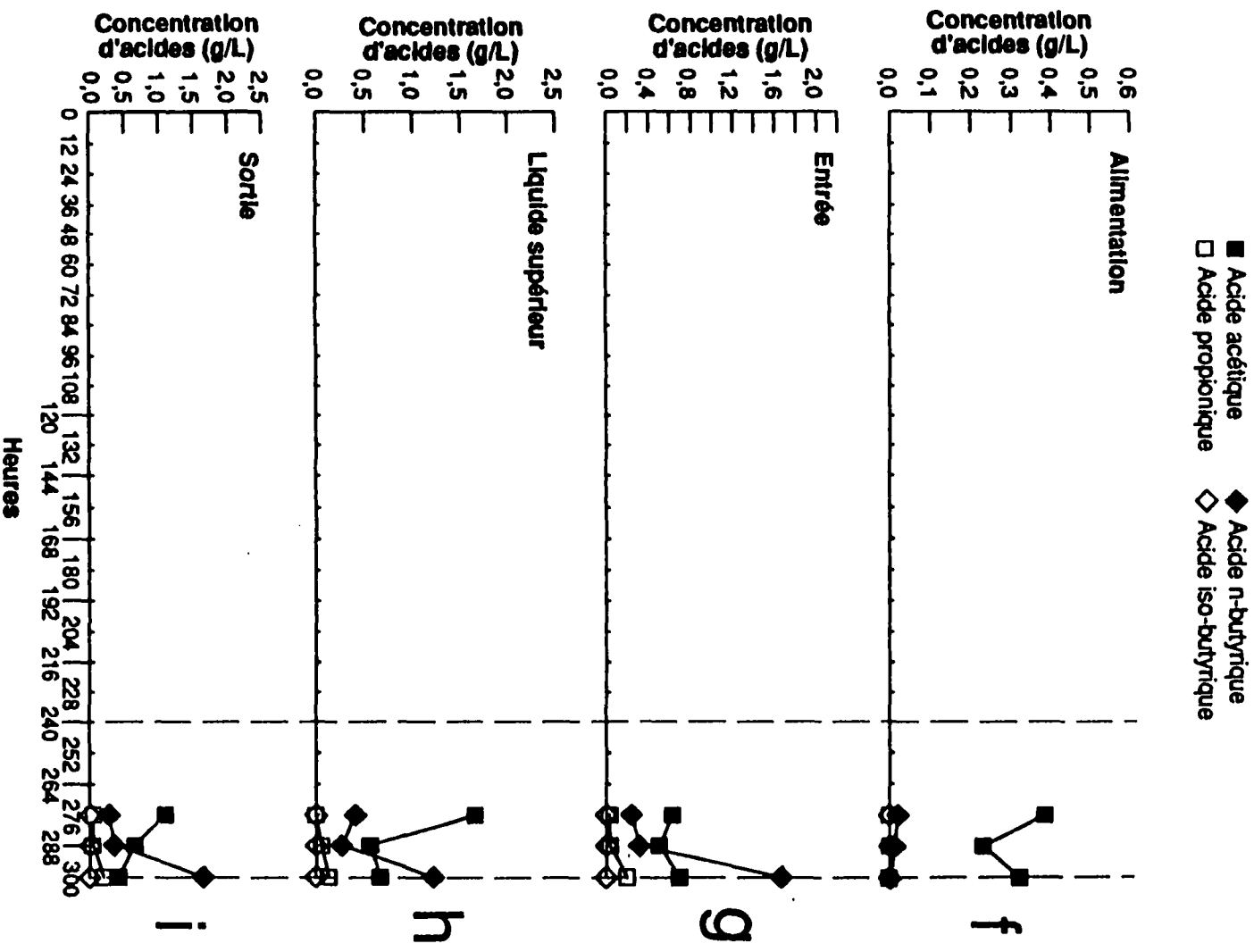


Figure 9 : Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration de sucre de 10 g/L.

3.1.3 Concentration d'alimentation de 20 g/L

L'examen de la Figure 10 montre la variabilité temporelle des divers paramètres pendant 252 heures de traitement du perméat à une concentration en glucose à l'alimentation de 20 g/L.

La concentration en sucre est relativement constante à l'alimentation durant toute l'expérience (partie a) variant de 13 à 18 g/L. Aux points d'entrée et de sortie, les valeurs sont plus faibles même si la variation est plus grande. Les concentrations en sucre entre le point d'entrée et le point de sortie fluctuent sensiblement dans le même sens.

À l'exception de la valeur de 48% observée à T_{24} , l'efficacité de biodégradation (partie b) est relativement faible. Elle se situe en moyenne à 3%, ce qui est faible comparativement aux autres concentrations d'alimentation.

La quantité de biogaz (partie c) fluctue considérablement; elle passe de 130 L/jour à 30 L/jour en 24 heures seulement ($\Delta T_{108-132}$). Par la suite, elle est plutôt stable et elle se situe en moyenne à 68 L/jour avec une autre augmentation à T_{228} atteignant presque 120 L/jour. À $\Delta T_{132-216}$, le débit du biogaz est le plus faible et c'est pendant cette même période que la plus faible efficacité du système est retrouvée (partie b).

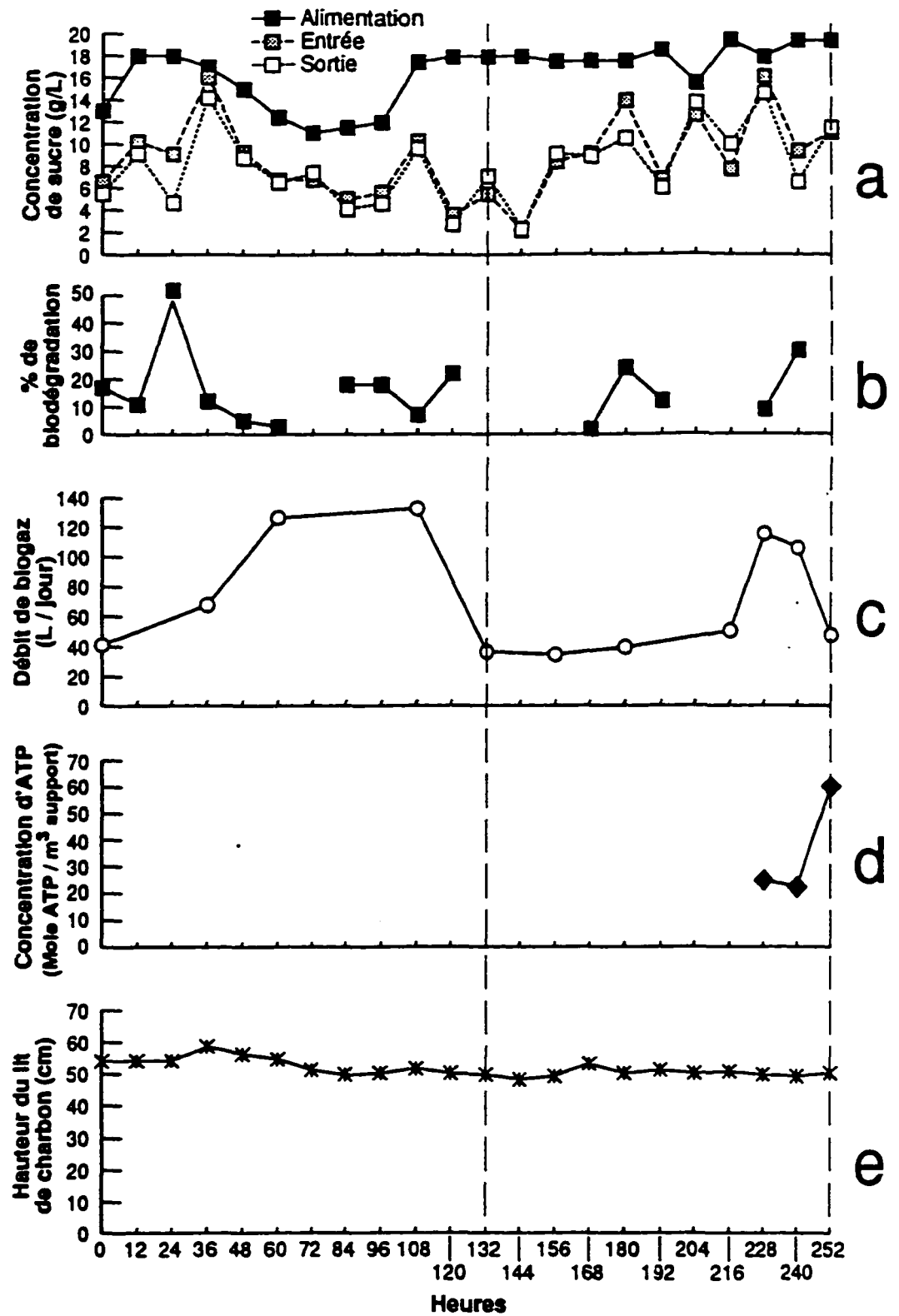


Figure 10: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 20 g/L.

La quantité d'ATP (partie d) mesurée à $\Delta T_{228-252}$ varie de 24 à 61 moles ATP/m³ de support. La concentration d'ATP est complètement à l'inverse du débit de biogaz et elle est sensiblement similaire aux concentrations en sucre aux points d'entrée et de sortie.

La hauteur du lit de charbon (partie e) est très stable et elle se maintient aux alentours de 50 cm pendant toute la durée de l'expérimentation, variant que de ± 3 cm.

Les acides produits (Figure 11) sont les mêmes que précédemment soit les acides acétique, propionique et n-butyrique. L'acide iso-butyrique est totalement absent des échantillons. Comme à une concentration en sucre à l'alimentation de 5 g/L, l'acide acétique domine nettement au point d'alimentation; aux autres points d'échantillonnage, la dominance est assurée par l'acide n-butyrique. Aux points d'entrée, du liquide supérieur et de la sortie, les quantités d'acide acétique et propionique sont relativement stables, contrairement à l'acide n-butyrique qui lui, fluctue temporellement.

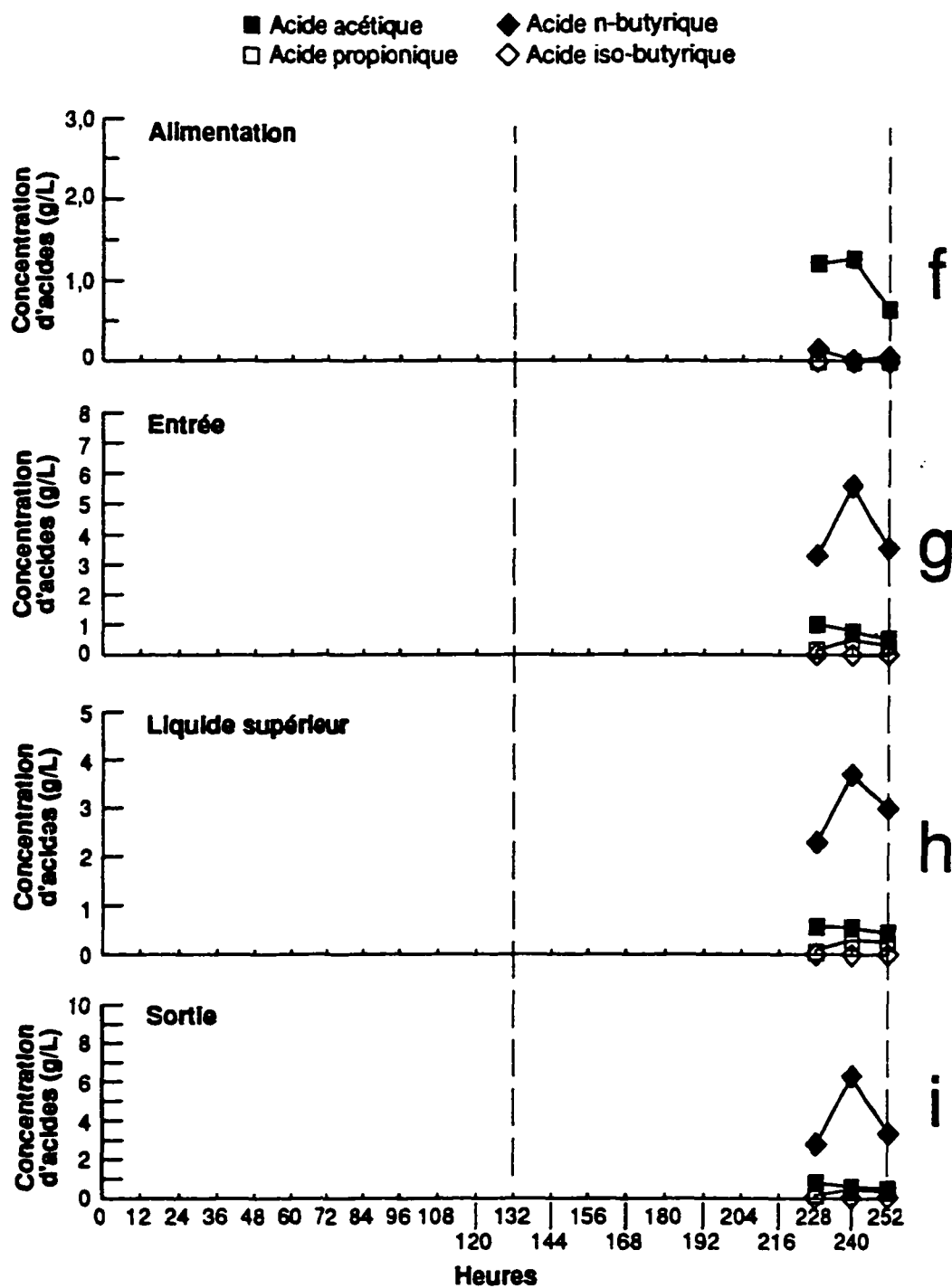


Figure 11 :Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration de sucre de 20 g/L.

3.1.4 Concentration d'alimentation de 30 g/L

Lorsque le bioréacteur a une concentration d'alimentation de 30 g/L, les concentrations en sucre sont très stables (Figure 12a). Les valeurs entre le point d'alimentation, le point d'entrée et le point de sortie fluctuent très peu et présentent beaucoup de similitude à l'exception toutefois des données enregistrées à T_{36} et à T_{96} au point d'entrée. Cependant, la différence entre le point d'entrée et le point de sortie est plus marquée qu'aux autres concentrations d'alimentation.

Concernant l'efficacité de biodégradation (partie b), on observe une efficacité moyenne du système de 21%. La meilleure efficacité se retrouve à T_{36} avec 65%.

La quantité de biogaz (partie c) augmente, passant de 30 L/jour à 95 L/jour à ΔT_{12-132} . Par contre, on observe une quantité moyenne de 67 L/jour de biogaz, soit une valeur plus élevée qu'aux autres concentrations d'alimentation.

La quantité d'ATP (partie d) mesurée à $\Delta T_{108-132}$ est en moyenne de 19,4 moles ATP/m³ de support. Durant cette période la concentration d'ATP a fluctué dans le même sens que le biogaz mais inversement à la concentration en sucre.

La hauteur du lit de charbon (partie e) se maintient aux alentours de 51 cm. Elle augmente légèrement à T_{120} où l'on observe également un fort débit de biogaz et une concentration élevée en ATP.

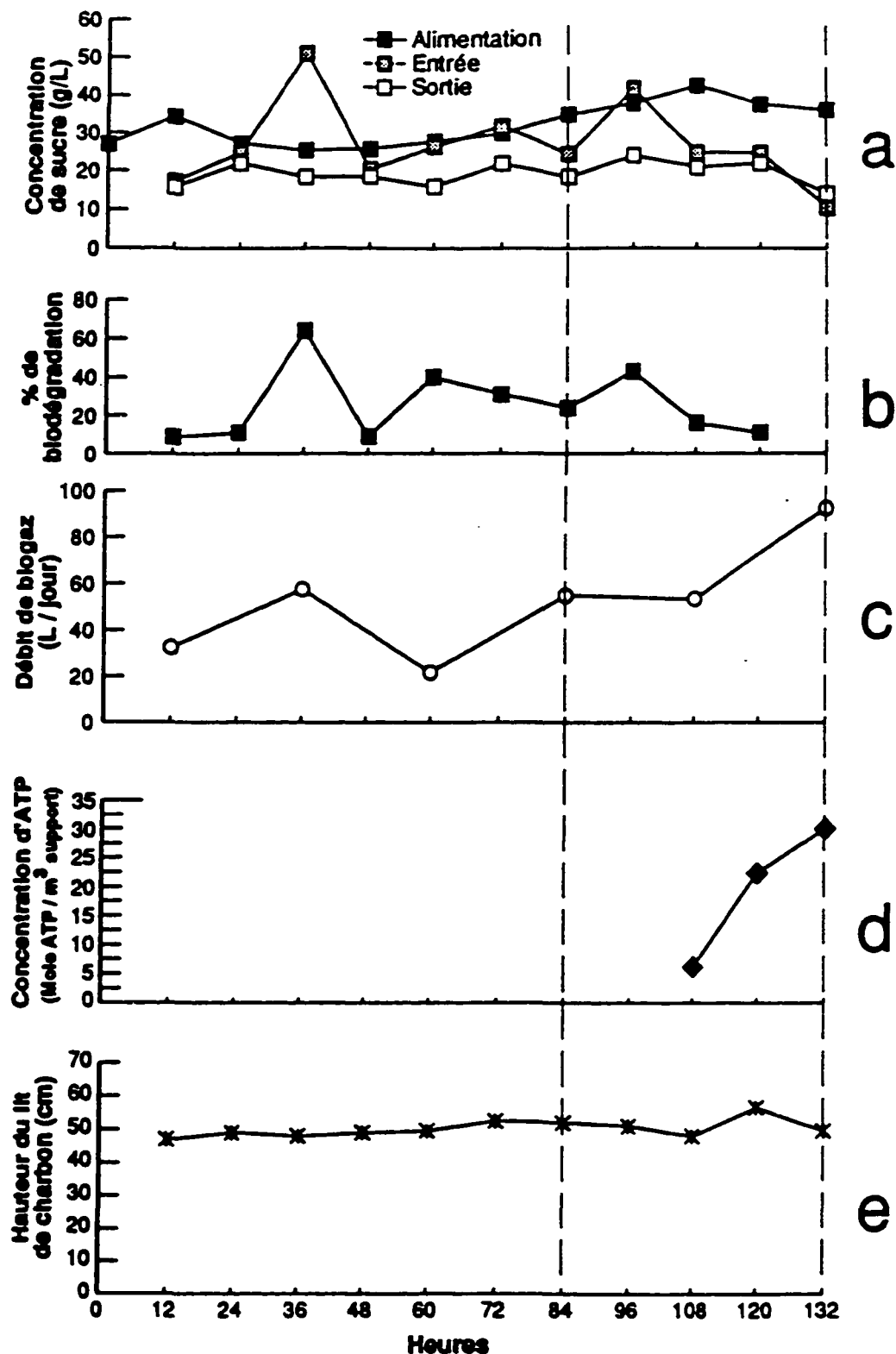


Figure 12: Variation temporelle des paramètres mesurés pour une alimentation à une concentration en sucre de 30 g/L.

À la Figure 13, les acides produits sont à nouveau au nombre de 4 soit l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide n-butyrique et l'acide iso-butyrique, même si la concentration de ce dernier demeure très faible. Donc, à la sortie du système fonctionnant à 30 g/L d'équivalents glucose, il y a présence d'acide n-butyrique (de 1,9 à 7,3 g/L), d'acide acétique (0,5 à 1,7 g/L), d'acide propionique (0,1 à 2,02 g/L) et d'acide iso-butyrique (0 à 0,04 g/L).

Après toutes ces observations, il est possible de dire que l'acide n-butyrique est le principal acide produit, peu importe la concentration en sucre à l'alimentation alors que l'acide acétique est le principal acide gras au niveau du perméat brut. Ce qui diffère à 30 g/L, c'est que les concentrations en acides gras tendent à augmenter avec le temps, contrairement aux autres concentrations d'alimentation.

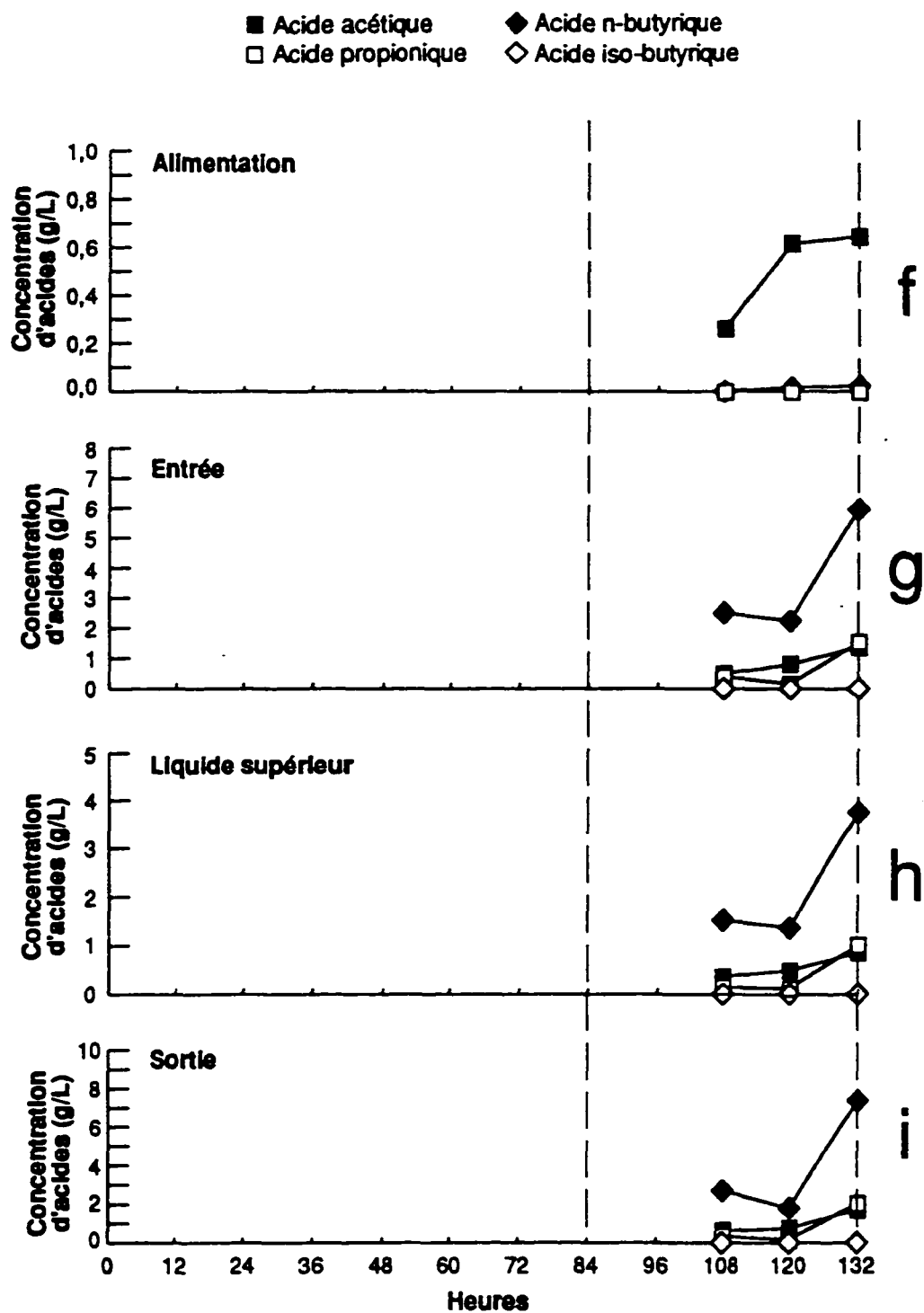


Figure 13 : Variation temporelle des concentrations d'acides gras pour une alimentation à une concentration de sucre de 30 g/L.

3.2 Comparaison des résultats obtenus à différentes concentrations en sucre

Pour chaque concentration d'alimentation étudiée, soit 5, 10, 20 et 30 g/L d'équivalents glucose, la comparaison des moyennes des concentrations en sucre, de l'efficacité de biodégradation, de la concentration en ATP, du débit de biogaz ainsi que de la hauteur du lit de charbon sont présentées (Tableau 8) de même que les concentrations d'acides gras (Tableau 9).

3.2.1 Concentration en sucre

La concentration en sucre retrouvée dans les échantillons de sortie augmentent proportionnellement avec les concentrations en sucre de l'entrée. L'efficacité du système est moins élevée à 20 g/L qu'à 5 g/L, en considérant l'entrée comme valeur de comparaison avec le point de sortie. On remarque que peu importe la concentration d'alimentation, il y a toujours au moins 3% d'efficacité de dégradation du sucre; les valeurs variant entre 21 et 3%.

3.2.2 Biofilm et ATP

La concentration d'ATP mesurée au niveau des grains de charbon est de 11,6, de 0,16, de 36,0 et de 19,4 moles ATP/m³ de support, respectivement à 5, 10, 20 et 30 g/L. Elle diminue donc considérablement de 5 à 10 g/L pour atteindre son plus haut niveau à 20 g/L et revenir à un niveau plus faible à 30 g/L.

Tableau 8: Comparaison des résultats observés aux différentes concentrations d'alimentation en sucre.

CONCENTRATION D'ALIMENTATION (g/L)	CONCENTRATION EN SUCRE*			% DE BIODÉGRADATION (efficacité) Entrée vs Sortie	CONCENTRATION EN ATP** (mole ATP/m ³)			BIOFILM (hauteur du lit en cm)	DÉBIT DE BIOGAZ (L/jour)
	A	E	S		Grains	L. grains	L. sup.		
5	5,5	2,1	1,9	10	11,6	1,2E-4	8,2E-5	48,8	56
10	8,8	3,4	2,7	21	0,16	4,8E-4	6,1E-4	55,6	52
20	18,1	9,4	9,1	3	36,0	2,2E-3	3,3E-3	50,0	68
30	38,1	25,4	20,0	21	19,4	1,5E-2	6,4E-3	51,4	67

Il est important de noter que ces moyennes proviennent des valeurs retrouvées dans la zone pointillée de chaque figure.

*
A = alimentation
E = entrée
S = sortie

**
Grains: signifie la quantité d'ATP prélevée au niveau des grains de charbon du lit
L. grains: signifie la quantité d'ATP prélevée au niveau du liquide contenant les grains de charbon
L. sup.: signifie la quantité d'ATP prélevée au niveau du liquide supérieur au lit de charbon

Pour ce qui est de la concentration d'ATP retrouvée au niveau du liquide (celui contenant les grains et celui supérieur au lit de charbon), elle augmente lorsque la concentration en sucre de l'alimentation passe de 5 à 30 g/L. Elle passe de $1,2E-4$ à $1,5E-2$ mole d'ATP/m³ dans le premier cas et de $8,2E-5$ à $6,4E-3$ mole d'ATP/m³ dans le deuxième cas.

La hauteur du lit de charbon ne varie presque pas tout au long de l'expérimentation et cela même en changeant la concentration en sucre; les valeurs varient entre 48,8 cm et 55,6 cm avec une moyenne de 52 cm. L'augmentation en hauteur du lit se fait au début, soit une hausse de 8 cm de 5 à 10 g/L et demeure constante aux environs de 50 cm de 10 g/L jusqu'à 30 g/L.

3.2.3 Biogaz

Le débit moyen de biogaz augmente avec une hausse de la concentration en sucre au point d'alimentation. Le volume moyen varie entre 52 et 68 L/jour. Après analyse, le biogaz a une composition chimique de 3% de méthane (CH₄) et de 97% de dioxyde de carbone (CO₂).

3.2.4 Acides gras

Au Tableau 9, on observe que l'acide le plus abondant au point de sortie est l'acide n-butyrique. À l'exception de la concentration d'alimentation de 10 g/L, les concentrations moyennes varient entre 4,02 et 5,31 g/L comparativement à des

Tableau 9: Comparaison des concentrations d'acides gras à différents points d'échantillonnage pour chaque concentration d'alimentation en sucre.

CONCENTRATION D'ALIMENTATION (g/L)	CONCENTRATION D'ACIDE* (Moyennes) (g/L)				PROPORTION DES ACIDES (%)			
	A	E	S	L.sup.	A	E	S	L. sup.
5	A=0,60	5,19	1,23	1,26	A=64	30	18	18
	P=0,10	1,48	0,30	0,28	P=11	8	4	4
	N=0,22	9,59	5,31	5,25	N=23	55	76	77
	I=0,02	1,17	0,11	0,07	I=2	7	2	1
10	A=0,31	0,65	0,70	0,93	A=97	44	45	56
	P=0	0,08	0,09	0,09	P=0	6	6	5
	N=0,009	0,74	0,75	0,65	N=3	50	49	39
	I=0	0	0	0	I=0	0	0	0
20	A=1,04	0,81	0,63	0,57	A=95	15	12	15
	P=0	0,35	0,35	0,25	P=0	7	7	7
	N=0,06	4,20	4,13	2,99	N=5	78	81	78
	I=0	0	0	0	I=0	0	0	0
30	A=0,51	0,90	0,96	0,58	A=98	18	16	17
	P=0	0,70	0,84	0,45	P=0	13	14	14
	N=0,01	3,60	4,02	2,29	N=2	69	69	69
	I=0	0	0,01	0	I=0	0	1	0

*
A= acide acétique
P= acide propionique
N= acide n-butyrique
I= acide iso-butyrique

teneurs inférieures à 1,23 g/L pour les autres acides. Le deuxième acide en importance est l'acide acétique. L'acide iso-butyrique est absent aux concentrations d'alimentation de 10 et de 20 g/L. Il semble y avoir une légère augmentation de la quantité d'acide gras de 10 à 30 g/L. En général, les plus faibles quantités ont été obtenues à 10 g/L.

À la concentration d'alimentation de 5 g/L, la concentration des acides est dominée par l'acide acétique (64%) et l'acide n-butyrique (23%) à l'alimentation, tandis qu'aux points d'entrée, de sortie et dans le liquide supérieur, l'acide n-butyrique domine nettement avec des proportions de 55 à 77%.

À la concentration d'alimentation de 10 g/L d'équivalents glucose, l'acide acétique représente à lui seul, 97% au point d'alimentation, tandis qu'aux 3 autres points d'échantillonnage, la proportion de cet acide varie entre 44 et 56% et celle de l'acide n-butyrique, de 39 à 50%.

Aux concentrations d'alimentation de 20 et 30 g/L d'équivalents glucose, l'acide acétique domine à l'alimentation avec une proportion respective de 95 et de 98%, tandis qu'aux autres points d'échantillonnage, la dominance est assurée par l'acide n-butyrique avec des valeurs variant entre 69 et 81%.

3.2.5 Bactéries

On a consigné au Tableau 10, la liste des bactéries isolées du bioréacteur. Ces dernières ont été identifiées en 15 espèces différentes soit : *Pseudomonas maltophilia*, *P. paucimobilis*, *P. sp.*, *P. fluorescens*, *Salmonella sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffi*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Staphylococcus hominis*, *S. cohnii*, *S. aureus*, *S. simulans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter faecium*, *E. avium* et une espèce filamenteuse non identifiée. Une seule espèce bactérienne est retrouvée au niveau du perméat soit *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffi*. La bactérie *Pseudomonas sp.* est celle qui présente la plus grande fréquence; on la retrouve au niveau des grains, au niveau des liquides du bioréacteur et au niveau de l'inoculum. Certaines bactéries ne se retrouvent qu'à la concentration d'alimentation de 5 g/L, notamment *Pseudomonas maltophilia*, *Salmonella sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffi*, *Staphylococcus hominis*, *S. cohnii*, et *Escherichia coli*. À la concentration d'alimentation de 20 g/L, les bactéries les plus caractéristiques sont *Pseudomonas paucimobilis* et *P. fluorescens*. À la concentration d'alimentation de 30 g/L, *Staphylococcus simulans*, *Enterobacter faecium* et *E. avium* sont retrouvées.

On constate que les bactéries *Salmonella sp.* et *Enterobacter faecium* se retrouvent seulement au niveau des grains de charbon, tandis que *Pseudomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Staphylococcus cohnii*,

Tableau 10: Liste des bactéries (A: aérobies; B: anaérobies) retrouvées sur les grains du lit et dans les liquides du bioréacteur à différentes concentrations de sucre et dans l'inoculum et le perméat usés.

BACTÉRIES		Concentration (g/L)	Grains	Liquide des grains	Liquide supérieur au lit	Inoculum	Perméat
A	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	5			+		
		20					
		30					
	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	5				+	
		20	+	+	+		
		30					
	<i>Pseudomonas sp.</i>	5	+	+	+	+	
		20	+	+	+		
		30	+				
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5				+	
		20		+	+		
		30					
	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. Iwoffii</i>	5	+	+	+		+
		20					
		30					
	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	5				+	
		20					
		30			+		
B	<i>Salmonella sp.</i>	5	+				
		20					
		30					
	<i>Staphylococcus hominis</i>	5		+	+		
		20					
		30					
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	5			+		
		20					
		30					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5		+			
		20	+	+	+		
		30					
	<i>Staphylococcus simulans</i>	5					
		20					
		30	+	+	+		
	<i>Escherichia coli</i>	5	+	+	+	+	
		20					
		30					
	<i>Enterobacter faecium</i>	5				+	
		20					
		30	+				
	<i>Enterobacter avium</i>	5					
		20					
		30			+		
	Bactérie filamenteuse	5				+	
		20					
		30					

et *Enterobacter avium* se retrouvent seulement dans le liquide supérieur au lit de charbon. Il faut noter qu'à ce niveau, toutes les bactéries sont présentes, sauf *Salmonella* sp. et *Enterobacter fæcium*.

Dans l'inoculum, sont présentes : *Pseudomonas paucimobilis*, *P. fluorescens*, *P. sp.*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Enterobacter fæcium*, *Escherichia coli* et une bactérie filamenteuse non-identifiée. Il est quand même plausible de retrouver des bactéries aérobies facultatives (partie A) : comme *Pseudomonas maltophilia*, *P. paucimobilis*, *P. sp.*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffi* et *Aeromonas hydrophila/caviae*, même si le bioréacteur fonctionnait en anaérobiose.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Efficacité de la biodégradation du perméat

Le choix d'un bioréacteur anaérobie à lit fluidisé pour traiter le lactosérum de fromage est un bon choix pour la transformation du sucre en acides gras. Il a été démontré que le bioréacteur réussit à convertir jusqu'à 21% du sucre en produits finaux (comme le biogaz et les acides gras), ce qui rejoint l'objectif de départ. Ainsi, il est possible de valoriser le perméat avec un bioréacteur à lit fluidisé.

À la Figure 6, les concentrations en sucre au point d'alimentation montrent une grande variabilité. Comme mentionné à la section matériel et méthodes, la concentration en sucre du perméat brut est très variable d'une boîte à l'autre. Il était donc nécessaire de déterminer la teneur réelle en sucre à chaque nouvelle boîte de perméat, pour le calcul de la dilution, au lieu de prendre une valeur théorique. Avant de connaître ce fait, on devait calculer les concentrations en sucre en prenant 58 000 mg/L comme valeur théorique (valeur obtenue à partir de plusieurs mesures expérimentales). C'est pourquoi, même en étant rigoureux dans les manipulations, on obtenait constamment des variations et cette erreur expérimentale s'est maintenue jusqu'au T_{120} de fonctionnement du bioréacteur à 10 g/L. Par la suite, l'alimentation est devenue plus stable et s'est maintenue jusqu'à la fin des essais en raison du dosage du sucre à chaque nouvelle boîte de perméat. Cette grande variabilité a permis de constater que les fluctuations des concentrations en sucre aux points d'entrée et aux points de sortie sont similaires à celles de l'alimentation. Ceci démontre qu'il y a une bonne circulation du liquide

à travers le système et que la méthode colorimétrique de détermination du sucre est adéquate.

On observe parfois des concentrations en sucre plus élevées aux points d'entrée qu'aux points d'alimentation (Figure 12a). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la prise d'échantillons au point d'entrée avait tendance à accumuler des dépôts solides. Un nettoyage avant chaque échantillonnage aurait solutionné ce problème, mais parfois cette précaution était omise.

Les grandes variations observées au niveau de l'efficacité sont dues principalement à la variation de la concentration du sucre dans l'alimentation. En observant les données du Tableau 8, la meilleure efficacité est de 21%, correspondant à un temps de rétention hydraulique de 12 minutes et à une concentration en sucre à l'alimentation de 10 g/L ou de 30 g/L. L'efficacité obtenue dans ce projet est supérieure à celle apparaissant dans la littérature en considérant le faible TRH utilisé. Même si le TRH tendait vers l'infini, une efficacité de 100% d'enlèvement de la DCO ne pourrait être atteinte (Venkatraman *et al.*, 1989). Pour les mêmes concentrations en sucre à l'alimentation, certains auteurs obtiennent 62% de dégradation mais avec un support bactérien différent. Les valeurs du temps de rétention hydraulique sont les suivantes: 4 jours (avec des tubes de plastique); 3,2 jours (avec un lit d'argile); 1,3 jour (avec un lit d'argile) et 1 heure (avec aucun support bactérien) pour respectivement Lo et Liao (1986); Patel *et al.* (1995); Wildenauer et Winter (1985); Garcia *et al.* (1991).

À l'observation des Figures 6b, 8b, 10b et 12b, on constate que l'efficacité du système à dégrader le perméat est aussi bonne à une concentration en sucre d'alimentation de 30 g/L qu'à une concentration de 10 g/L (21%) avec une baisse drastique lorsque la concentration d'alimentation est de 20 g/L (3%). Cette diminution d'efficacité peut être expliquée par le fait qu'à la concentration en sucre de 20 g/L, les bactéries étaient à la fin d'une période d'acclimatation puisqu'il a fallu inoculer à nouveau vers le milieu de l'expérimentation à 10 g/L. À une concentration d'alimentation en sucre de 20 g/L, le bioréacteur était encore en phase de récupération, ce qui fait que l'efficacité était basse. En général, cela prend 10 semaines pour que les bioréacteurs puissent récupérer leur état initial après un choc (Viraraghavan et Kikkeri, 1990b).

Selon l'étude de Yan *et al.* (1988), il a été démontré que lorsque la concentration en sucre augmente à l'alimentation, l'efficacité de la biodégradation diminue; l'efficacité de leur système à enlever les sucres diminuait de 83 à 58% quand la concentration en sucre à l'alimentation augmentait de 5 à 20 g de DCO/L. Comme ces auteurs n'utilisaient pas de recirculation, il est possible de comparer leur alimentation avec l'entrée du projet actuel. Il est difficile de démontrer une diminution d'efficacité avec une augmentation de la concentration en sucre à l'alimentation par les valeurs d'efficacité présentées au tableau 8, car le biofilm était en constante croissance tout au long de l'expérimentation. Ce qui fait qu'en excluant l'efficacité de biodégradation à 20 g/L, résultant de l'accident de parcours, on observe tout de même un plateau (21% à 20 et 30 g/L) pour l'efficacité, qui aurait pu être suivi par une diminution si l'expérience s'était poursuivie.

4.2 Biogaz

Au Tableau 8, le débit moyen de biogaz varie entre 52 et 68 L/jour. En utilisant le débit à la concentration d'alimentation de 20 g/L (68 L/jour), cela correspond à un débit équivalent à 0,1 L de biogaz par g d'acide gras produit (Annexe 6).

Lorsque le pH diminue, la production de biogaz augmente apparemment en raison de l'expulsion du CO₂ provenant du liquide fermenté (Wildenauer et Winter, 1985). Étant donné que les essais se déroulaient à pH acide, l'expulsion théorique du CO₂ a dû se produire comme le stipulait la théorie, ce qui expliquerait les importants volumes de gaz au début et la forte proportion de CO₂ obtenu dans le biogaz.

Comme présenté dans la section 3.2.3, le biogaz était constitué de méthane (3%) et de dioxyde de carbone (97%), il n'y avait aucune trace d'autre gaz. Dans ce projet, la proportion du méthane étant déjà très faible, soit 3%, il est normal de ne pas retrouver de traces d'hydrogène. La production d'hydrogène est principalement obtenue par l'étape de la méthanogénèse. Cette dernière étape était non favorisée par le pH acide maintenue dans ce projet; ce qui peut également expliquer son absence. D'autant plus que selon Yang et Wang (1990), les bactéries suivantes produisent l'hydrogène à partir du glucose : *Clostridium butyricum*, *Rhodospirillum molischianum*, *R. rubrum* et *Rhodopseudomonas*

palustris et ces bactéries n'ont pas été retrouvées à l'inventaire du bioréacteur. La quantité de méthane, même faible, indique la présence des méthanogènes. La quantité théorique de méthane que l'on peut obtenir avec le glucose comme source de carbone est de 0,35 m³/kg de DCO enlevée (Strydom *et al.*, 1995). La quantité de méthane obtenue ici équivaut à 0,11 m³/kg de DCO enlevée. Cette valeur est trois fois inférieure, ce qui confirme que les méthanogènes n'avaient pas des conditions optimales de croissance (Valeur de pH imposée à 5).

Au cours de cette étude, le débit de biogaz augmente lorsque la concentration en sucre d'alimentation du système augmente de 5 à 30 g/L, avec une légère diminution à 10 g/L (Tableau 8). Selon Patoine *et al.* (1994), l'augmentation graduelle du volume de biogaz par jour indique une acclimatation des bactéries. Comme mentionné plus haut, à T₂₀₄ (Figure 8), le système a subi un arrêt accidentel, ce qui a provoqué la perte de la biomasse bactérienne. Cette perte de biomasse a provoqué une baisse du débit de biogaz à la concentration d'alimentation de 10 g/L. Au Tableau 8, on observe que le débit de biogaz augmente avec la concentration en sucre à l'alimentation, ce qui est proportionnel à la concentration d'ATP.

4.3 Biofilm et ATP

La hauteur du lit de charbon ne change presque pas pendant la durée de l'expérimentation. Elle augmente de 8 cm d'une concentration en sucre à l'alimentation de 5 g/L à une concentration de 10 g/L et varie que de 1 cm aux autres concentrations en sucre. Cette augmentation de la hauteur du lit au début représente une hausse de la fluidisation de 7% et peut correspondre à la formation du biofilm sur les grains.

Le biofilm présent correspond à plusieurs couches superposées de bactéries sur chaque grain de charbon même s'il n'est pas encore rendu à maturité. Ainsi, l'augmentation de 8 cm du lit de 5 à 10 g/L représente les grains de charbon qui ont augmenté en volume par la formation du biofilm. Selon Characklis et Marshall (1990), au fur et à mesure qu'un biofilm bactérien se forme sur un support inerte, celui-ci prend de l'expansion et devient moins dense. Ainsi, plus le biofilm sera développé, plus le support sera léger et la fluidisation n'en sera que plus forte. Par la suite, il s'agit plus de maintenance de la population que de croissance, ce qui fait qu'il n'y a plus d'augmentation en volume des granules. Il y a donc une hausse d'expansion du lit à un débit donné et fixe comme cité en théorie lors d'une importante formation de biofilm.

À l'examen des données du Tableau 8, on remarque qu'il y a toujours plus de bactéries au niveau des grains de charbon qu'au niveau des liquides du bioréacteur. Un tel résultat est dû au fait que le biofilm bactérien se forme sur les grains.

Par contre, il y a une augmentation de la concentration d'ATP au niveau des liquides du bioréacteur avec la hausse de la concentration en sucre à l'alimentation. Les valeurs passent de $1,2\text{E-}4$ à $1,5\text{E-}2$ mole ATP/m³ de liquide des grains et de $8,2\text{E-}5$ à $6,4\text{E-}3$ mole ATP/m³ de liquide supérieur au lit. Cette augmentation est attribuable au vieillissement du biofilm. À une concentration d'alimentation de 20 g/L, le biofilm est plus mature qu'au début; ainsi, les bactéries mortes situées dans les couches antérieures du biofilm se détachent et entraînent une partie de la biomasse vivante, ce qui fait que l'on retrouve de plus en plus d'ATP dans les liquides. De plus, lorsque le diamètre du bioréacteur est faible et qu'il y a une forte production de gaz, ce qui est le cas ici, cela entraîne un bris du lit produisant un faible contact entre les micro-organismes et l'eau usée (Gutiérrez *et al.*, 1991). Tout ceci entraîne une turbulence brisant le lit, aidant ainsi au lavage de la biomasse retrouvée sur les grains de charbon. Ce comportement peut limiter la formation d'un biofilm et entraîner une partie de la biomasse dans le liquide du système (Gutiérrez *et al.*, 1991). Ce phénomène peut également être responsable de la baisse de la concentration d'ATP de 36,0 à 19,4 moles ATP/m³ de support lorsque la concentration en sucre dans l'alimentation passe de 20 à 30 g/L. À la concentration en sucre de l'alimentation à 10g/L, cette diminution soudaine est attribuable à l'accident de parcours où une bonne partie du lit de charbon a été perdue. Normalement, on devrait retrouver des concentrations d'ATP plus fortes. On peut également remarquer qu'une augmentation d'ATP (Tableau 8) entraîne une hausse du débit de biogaz, conséquence directe de la hausse de la quantité de bactéries dans le biofilm. À l'instar de Chung et Neethling (1988), la présente

étude montre en effet une hausse de la quantité d'ATP avec l'augmentation de la concentration en sucre du substrat.

4.4 Acides gras

Selon Kisaalita *et al.* (1987), les produits de la fermentation des sucres à pH acide sont les acides gras suivants: acétique, propionique, iso-butyrique, valérique et caprique. Au Tableau 9, on observe que les quatre acides présents aux différents points d'échantillon sont l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide iso-butyrique et l'acide n-butyrique, ce qui correspond aux produits obtenus en fermentation acide.

Pour les essais effectués, on remarque que les concentrations d'acide n-butyrique sont toujours les plus importantes aux points de sortie, se retrouvant en proportion moyenne de 69% dans les échantillons de sortie. Habituellement l'acide formique est le produit le plus commun retrouvé lors de la fermentation des sucres à pH neutre. Mais à pH variant entre 4,0 et 6,5, ce qui est le cas de la présente étude, ce sont les acides acétique et n-butyrique qui sont favorisés, représentant respectivement 61 et 74% de l'effluent (Kisaalita *et al.*, 1987). Les quantités des deux produits majeurs retrouvés sont fortement dépendantes du pH. Le pH apporte un changement dans le métabolisme de la population bactérienne ou un changement dans la composition de la population ou une combinaison des deux. L'acide n-butyrique est obtenu comme principal produit (69%), tandis que les mineurs sont l'acide acétique (22,5%) suivi de l'acide propionique (7,7%) et de l'acide iso-butyrique (0,8%) (Les chiffres en parathèses correspondent à la

moyenne de chaque acide à la sortie). La quantité d'acide lactique et d'iso-butyrique est souvent négligeable selon Kisaalita *et al.* (1987).

En général, l'acide acétique domine à l'alimentation car c'est le principal acide retrouvé au niveau du perméat brut. Au point d'entrée les bactéries présentes dans le bioréacteur vont augmenter rapidement sa concentration. Toutefois, comme cet acide est le premier à être converti en gaz ou autres, sa proportion dans le mélange diminue rapidement du point d'alimentation aux autres points d'échantillonnage. Au Tableau 9, on observe ainsi des concentrations d'acide acétique plus importantes au point d'alimentation que les autres acides. À la figure 7a, il y a une augmentation de la concentration d'acide acétique dans le temps au point d'alimentation contrairement à une diminution de sa concentration aux autres concentrations d'alimentation. Cette hausse peut être expliquée par un changement de boîte de perméat pour constituer l'alimentation.

On obtient en moyenne 5 963 mg/L d'acides gras à la sortie du système. Les concentrations d'acides obtenues pour ce projet sont respectivement 880, 395, 30 et 3 553 mg/L pour les acides acétique, propionique, iso-butyrique et n-butyrique. Dans les travaux de Yan *et al.* (1993), la concentration d'acides gras volatils est élevée et elle n'est jamais inférieure à 900 mg/L d'acide acétique pour une concentration en sucre à l'alimentation de 20 g/L. Dans le présent projet, pour la même concentration en sucre à l'alimentation, on a en moyenne 630 mg/L d'acide acétique au point d'échantillon de la sortie, ce qui est inférieur au résultat obtenu par ces auteurs. Les acides étant utilisés par les méthanogènes, peuvent indiquer un mauvais fonctionnement du système si leur quantité est trop élevée

(Venkatraman *et al.*, 1989). Par contre, on se rappelle que le but de ce projet est bien la production d'acides gras et non la transformation des acides en biogaz. Ce qui diffère avec la présente étude, est le fait d'obtenir l'acide n-butyrique comme principal acide avec l'acide propionique comme produit mineur, excluant l'acide iso-butyrique. Les acides butyrique et propionique sont formés par des espèces bactériennes différentes et la prédominance d'un acide plus qu'un autre est dépendante des conditions de culture (Yu et Pinder, 1993), ce qui peut expliquer leur différent taux métabolique ou vitesse de biodégradation. L'acide propionique est celui qui est dégradé en dernier, car la décomposition de cet acide est une réaction thermodynamique non favorable (Tanaka et Matsuo, 1986). Ce phénomène explique les plus grandes quantités obtenues à la sortie du système. La vitesse de biodégradation des autres acides gras volatils varie dans l'ordre suivant: acétique = butyrique > propionique (Tanaka et Matsuo, 1986), c'est-à-dire que l'acide acétique et l'acide n- ou iso-butyrique sont dégradés par les bactéries environ à la même vitesse, tandis que la conversion de l'acide propionique en acide acétique est la plus lente.

En considérant le bris du système qui a entraîné une baisse d'efficacité de la biodégradation, on observe à la Figure 9, l'écart entre la concentration d'acide acétique et la concentration d'acide n-butyrique est beaucoup moins important qu'aux autres concentrations d'alimentation. Cette diminution d'efficacité est reliée à la perte de la biomasse bactérienne directement responsable de la biodégradation. Cette même réduction de la biomasse a apporté une production moindre d'acide n-butyrique, qui ne devient jamais le principal produit dans les

mélanges, contrairement aux autres concentrations d'alimentation où il domine nettement.

4.5 Bactéries

Les espèces bactériennes identifiées dans le bioréacteur sont au nombre de 15 représentant au total 8 genres bactériens. De Haast et Britz (1986), ont obtenu 13 espèces bactériennes dont 10 genres différents en effectuant l'inventaire bactérien d'un réacteur à lit fixe traitant le lactosérum de fromage. Leurs espèces sont : *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus durans*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter zerosis* et *Acinetobacter calcoaceticus*. Dans ces 10 genres, 5 ont également été observés dans cette étude : *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* et *Aeromonas* sp.

La bactérie filamenteuse non identifiée est retrouvée uniquement au niveau des boues utilisées comme inoculum. Les acidogènes consistent en des cocci et des bâtonnets tandis que les méthanogènes sont filamenteuses (Schröder et De Haast, 1988). On peut donc supposer que l'espèce non identifiée correspond au genre *Methanothrix* (Bitton, 1994). La présence de ce genre expliquerait la production de méthane, si faible soit elle. Le fait de la retrouver seulement dans les boues n'indique pas qu'elle n'est pas présente dans le bioréacteur. Elle n'a peut-être pas été isolée sur les milieux de culture utilisés. Les méthanogènes sont

retrouvées dans les pores du support (Streicher *et al.*, 1990) et cela peut expliquer pourquoi elles n'ont pas été retrouvées lors de l'examen des grains de charbon. Il aurait probablement fallu scinder les grains en plus petits morceaux. Wildenauer et Winter (1985), ont également isolé des bactéries coccoïdes, des bâtonnets et des méthanogènes mais en petites quantités.

À l'observation des données du Tableau 10, on constate que plusieurs bactéries présentes dans le bioréacteur ne se retrouvent pas dans l'inoculum. On peut expliquer ce fait par une contamination possible du bioréacteur pendant les essais soit par l'eau utilisée pour la dilution, le perméat ou l'air ambiant. C'est possible également que ce soit une question de concentration. C'est-à-dire que dans l'inoculum, les bactéries sont en concentration faible alors que les conditions utilisées dans le réacteur seraient favorables à leur croissance.

Certaines espèces de bactéries s'attachent plus facilement sur la surface du support que d'autres. À l'examen des données du Tableau 10, on constate que la croissance bactérienne du biofilm est plus associée aux bacilles qu'aux cocci puisque 6 espèces bactériennes sur 8 sont des bacilles.

En prenant comme référence, la concentration d'alimentation précédente, on retrouve 9 espèces bactériennes lorsque le bioréacteur fonctionne à 5 g/L, 4 (dont deux nouvelles) à 20 g/L, et 5 (dont 3 nouvelles) à 30 g/L. La composition bactérienne change donc avec les différentes concentrations en sucre. Comme une incubation de 48 heures était effectuée pour l'inventaire bactérien, seules les bactéries à croissance rapide ont pu être décelées. Il est donc également possible

d'expliquer le changement dans la composition bactérienne à partir de ce fait. Ainsi au début de l'expérience, les bactéries à croissance rapide ont été identifiées et plus tard celles à croissance lente sont apparues. D'après Pretorius (1994), les espèces bactériennes dominantes changent; on observe des cocci pendant la phase d'acclimatation et pendant la phase opérationnelle on observait plus des bactéries du type filamenteux. Ainsi, à une concentration en sucre à l'alimentation de 5 g/L, on possède 3 espèces de cocci et à une alimentation de 20 et 30 g/L, on en observe seulement une. Le changement observé dans la composition des micro-organismes explique aussi les variations des quantités d'acides gras obtenus. Selon Stronach et al. (1986), les genres bactériens suivants produisent l'acide acétique lors de la dégradation du glucose ou lactose : *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp. et *Escherichia coli*. Il est donc possible de supposer que les autres genres bactériens peuvent produire les acides n- ou iso-butyrique et propionique.

D'un autre côté, selon Streicher et al. (1990), la biomasse suspendue dans le bioréacteur a une activité acidogène et peu ou pas d'activité méthanogène. Il est donc normal de retrouver les bactéries qui s'acclimatent facilement à un pH acide dans les liquides du système: *Pseudomonas* sp., *P. paucimobilis*, *P. maltophilia*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Staphylococcus cohnii*, *S. hominis*, *S. aureus*, *S. simulans*, *E. coli* et *Enterobacter avium* (Tableau 10).

Même si le système utilisé est anaérobie, on retrouve 6 espèces bactériennes sur 15 qui sont des aérobies facultatives (*Pseudomonas* sp.,

Acinetobacter sp., *Aeromonas sp.*) (Tableau 10, partie A). Les auteurs Wildenauer et Winter (1985) supposent qu'un biofilm bactérien épais sur les grains de charbon peut contenir quelques bactéries aérobies facultatives sur le dessus qui peuvent utiliser l'oxygène présent, tandis que les bactéries anaérobies strictes se retrouvent directement sur la surface du grain. Le fait de ne pas retrouver de bactéries anaérobies strictes n'exclut pas leur présence. En effet, comme les méthanogènes, elles devaient se situer dans les pores des grains de charbon, là où il n'y avait pas de contact direct avec l'oxygène qui aurait pu se retrouver dans le système. En scindant les grains en plus petits morceaux, il aurait peut-être été possible à ce moment-là de les isoler.

CHAPITRE V
CONCLUSION

Les résultats obtenus concernant les différents paramètres étudiés indiquent que le bioréacteur anaérobie à lit fluidisé fonctionne bien et il est un bon choix pour la production d'acides gras à partir de perméat de lactosérum. C'est l'acide n-butyrique qui est favorisé lors de la biodégradation : sa concentration est toujours au moins quatre fois supérieure à celle de l'acide suivant (sauf pour la période suivant le choc). On constate également qu'avec ce type de bioréacteur, il est possible de redémarrer relativement vite après un choc comme on a pu l'observer au cours de cette étude. On peut conclure en mentionnant que les taux de biodégradation des sucres sont élevés malgré le jeune âge du biofilm sur les grains et le faible TRH utilisé.

Il est recommandé, pour des études ultérieures, la possibilité d'utiliser le perméat brut (sans dilution). Malgré l'augmentation de la concentration en sucre de l'alimentation, il est possible en ajustant le TRH, de favoriser la croissance du biofilm. Il serait également intéressant de suivre l'évolution temporelle des acides gras et de l'ATP sur une plus grande échelle.

RÉFÉRENCES

- Aminoff, D., Binkley, W.W., Schaffer, R. et Mowry, W.** 1970. Analytical methods for carbohydrates. Dans Chemistry and Biochemistry. Pigman, W. et Horton, D. Academic Press, pp. 739-796.
- Barnett, J.W., Kerridge, G.J. et Russel, J.M.** 1994. Effluent treatment systems for the dairy industry. Australian Biotechnology, 4:26-30.
- Bitton, G.** 1994. Wastewater microbiology. Wiley-Liss publication. New York. 478 p.
- Bolte, J.P. et Hill, D.T.** 1990. A monod-based model of attached-growth anaerobic fermenters. Biological Wastes, 31:275-289.
- Bu'lock, J. et Kristiansen, B.** 1987. Basic Biotechnology. Academic Press. Londres, 561 p.
- Chappelle, E.W., Picciolo, G. et Deming, J.W.** 1978. Determination of bacterial content in fluids. Bioluminescence, LVII. DeLuca, M.A. Academic Press, pp. 65-73.
- Characklis, W.G. et Marshall, K.C.** 1990. Biofilms. John Wiley & Sons Ed. New York, 796 p.
- Chung, Y.-C. et Neethling, J.B.** 1988. ATP as a measure of anaerobic sludge activity. Journal WPCF, 60:107-112.
- Chung, Y.-C. et Neethling, J.B.** 1989. Microbial activity measurements for anaerobic sludge digestion. Journal WPCF, 61:343-349.

- Cohen, A.; Thiele, J.H. et Zeikus, J.G.** 1994. Pilot-scale anaerobic treatment of cheese whey by the substrate shuttle process. *Water Science Technology*, 30:433-442.
- Cordoba, P.R., Riera et F. Sineriz.** 1988. Temperature effects on upflow anaerobic filter performance. *Environmental Technology*, 9:769-774.
- De Haast, J et Britz, T.J.** 1986. Characterization of aerobic and facultative anaerobic bacteria from the liquid phase of an anaerobic fixed-bed digester treating a cheese whey substrate. *Microbial Ecology*, 12:173-179.
- De Haast, J.; Britz, T.J.; Novello, J.C. et Verwey, E.W.** 1985. Anaerobic digestion of deproteinated cheese whey. *Journal of Dairy Research*, 52:457-467.
- Desai, M., Patel, V. et Madamwar, D.** 1994. Effect of temperature and retention time on biomethanation of cheese whey-poultry waste-cattle dung. *Environmental Pollution*, 83:311-315.
- Diaz-Burgos, M.A., Ceccanti, B. et Polo, A.** 1993. Monitoring biochemical activity during sewage sludge composting. *Biol. Fertil. Soils*, 16:145-150.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. et Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.
- Environnement Canada.** 1986. Le traitement anaérobie des effluents de laiterie. Ministère des Approvisionnements et Services Canada. Ottawa, 168 p.
- Garcia, P.A., Rico, J.L. et Fdz-Polanco, F.** 1991. Anaerobic treatment of cheese whey in a two-phase UASB reactor. *Environmental Technology*, 12:355-362.

- GC Bulletin 856A.** 1990. Analyzing fatty acids by packed column gas chromatography. Supelco. Oakville. 12p.
- Ghaly, A.E. et Ben-Hassan, R.M.** 1989. Continuous production of biogas from dairy manure using an innovative no-mix reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20/21:541-559.
- Guiot, S.R., Safi, B., Frigon, J.C., Mercier, P., Mulligan, C., Tremblay, R. et Samson, R.** 1995. Performances of a full-scale novel multiplate anaerobic reactor treating cheese whey effluent. *Biotechnology and Bioengineering*, 45:398-405.
- Gutiérrez, R.J.L., Garcia, P.A. et Fdz-Polanco, F.** 1991. Anaerobic treatment of cheese-production wastewater using a UASB reactor. *Bioresource Technology*, 37:271-276.
- Hwang, S.H. et Hansen, C.L.** 1992. Performance of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating whey permeate. *American Society of Agricultural Engineers*, 35:1665-1671.
- Jacques, D.** 1993. Valorisation des sous-produits de l'industrie de transformation du lait. Centre québécois de valorisation de la biomasse. Sainte-Foy, 16 p.
- Jewell, W.J.** 1990. Fundamentals and advances in expanded bed reactors for wastewater treatment. Dans *Wastewater treatment by immobilized cells*. Tyagi, R.D. et Vembu, K. CRC Press. Floride, pp. 223-252.
- Karl, D.M. et Larock, P.A.** 1975. Adenosine triphosphate measurements in soil and marine sediments. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32:599-607.

- Kisaalita, W.S. , Pinder, K.L. et Lo, K.V. 1987. Acidogenic fermentation of lactose. Biotechnology and Bioengineering, 30:88-95.**
- Kucknerowicz, F. et Verstraete, W. 1979. Direct measurement of microbial ATP in activated sludge samples. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 29:707-712.**
- Kunii, D. et Levenspiel, O. 1991. Fluidization Engineering. 2ème Ed. Butterworth-Heinemann Ed. Boston, 491 p.**
- Lefèbvre, Y., Couture, P. et Couillard, D. 1988. An analytical procedure for the measurement of ATP extracted from activated sludge. Canadian Journal of Microbiology, 34:1275-1279.**
- Lemasters, J.J et Hackenbrock, C.R. 1978. Firefly luciferase assay for ATP production by mitochondria. Dans Bioluminescence and Chemiluminescence, LVII. DeLuca, M.A. Academic Press, pp. 36-50.**
- Lo, K.V.; Liao, P.H. et Chiu, C. 1988. Mesophilic anaerobic digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. Biomass, 15:45-53.**
- Lo, K.V. et Liao, P.H. 1986. Digestion of cheese whey with anaerobic rotating biological contact reactors. Biomass, 10:243-252.**
- Matsumoto, A., Sakamoto, M. et Noike, T. 1992. A new operation of carbohydrate-containing wastewater treatment in an anaerobic fluidized bed system. Water Science and Technology, 26:2453-2456.**
- Mendez, R., Blazquez, R. Lorenzo, F. et Lema, J.M. 1989. Anaerobic treatment of cheese whey: start-up and operation. Water Science Technology, 21:1857-1860.**

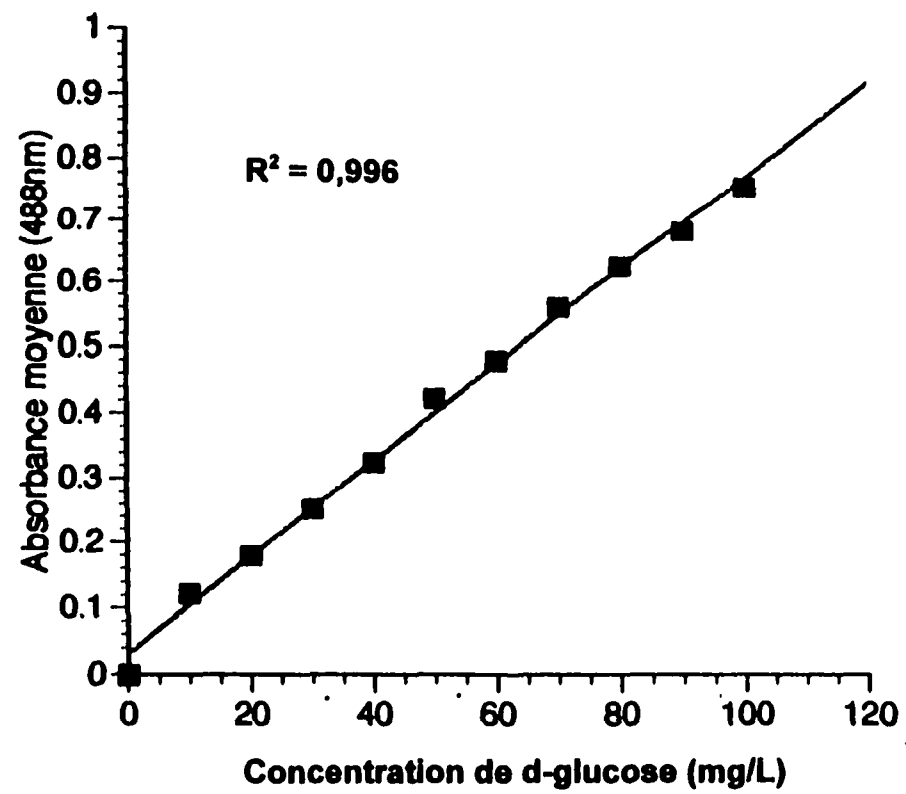
- Motta-Marques, D.M.L., Cayless, S.M. et Lester, J.N.** 1990. Start-up regimes for anaerobic fluidised systems treating dairy wastewater. *Biological Wastes*, 34:191-202.
- Mulligan, C., Bechara, F.S., Meunier, J. et Chebib, J.** 1993. Anaerobic treatment of cheese dairy wastewater using the SNC bioreactor. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 28:597-619.
- Ozturk, I., Eroglu, V., Ubay, G. et Demir, I.** 1993. Hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor (HUASBR) treatment of dairy effluents. *Water Science Technology*, 28:77-85.
- Patel, P., Desai, M. et Madamwar, D.** 1995. Biomethanation of cheese whey using anaerobic upflow fixed film reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79:398-399.
- Patoine, A., Côté, R. et Paquet, M.** 1994. Anaerobic detoxification of a chemi-thermomechanical pulp effluent by two acclimating sludges. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 29:471-486.
- Petrozzi, S.; Kut, O.M. et Dunn, I.J.** 1992. Protection of biofilms against toxic shocks by the adsorption and desorption capacity of carriers in anaerobic fluidized bed reactors. *Bioprocess Engineering*, 9:47-59.
- Pretorius, W.A.** 1994. pH-controlled feed-on-demand for high-rate anaerobic systems. *Water Science Technology*, 30:1-8.
- Rahman, M.D. et Richards, G.N.** 1987. Interference by flavonoids in the phenol-sulfuric acid analysis of carbohydrates. *Carbohydrates Research*, 170:112-115.
- Roe, P.C. et Bhagat, S.K.** 1982. Adenosine triphosphate as a control parameter for activated sludge processes. *Journal WPCF*, 54:244-254.

- Safley, L.M. et Westerman, P.W.** 1994. Low-temperature digestion of dairy and swine manure. *Bioresource Technology*, 47:165-171.
- Samson, R., Pauss, A. et Guiot, S.R.** 1990. Immobilized cell systems in anaerobic digestion processes. Dans *Wastewater treatment by immobilized cells*. Tyagi,R.D. et Vembu,K. CRC press. Floride, pp. 153-190.
- Schroder, E et De Haast, J.** 1989. Anaerobic digestion of deproteinated cheese whey in an upflow sludge blanket reactor. *Journal of Dairy Research*, 56:129-140.
- Senthilnathan, P.R. et Ganczarczyk, J.J.** 1990. Application of biomass carriers in activated sludge process. Dans *Wastewater treatment by immobilized cells*. Tyagi,R.D. et Vembu,K. CRC Press. Floride, pp. 103-141.
- Sreekrishan, T.R., Ramachandran, K.B. et Ghosh, P.** 1990. Effect of operating variables on biofilm formation and performance of an anaerobic fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 37: 557-566.
- Streicher, C., Milande, N., Capdeville, B. et Roques, H.** 1990. Improvement of the anaerobic digestion of diluted whey in a fluidized bed by nutrient additions. *Environmental Technology*, 12:333-341.
- Stronach, S.M., Rudd, T. et Lester, J.N.** 1986. Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment. Springer-Verlag Ed. Berlin, 184 p.
- Strydom, J.P., Mostert, J.F. et Britz, T.J.** 1995. Anaerobic treatment of a synthetic dairy effluent using a hybrid digester. *Water SA*, 21:125-130.

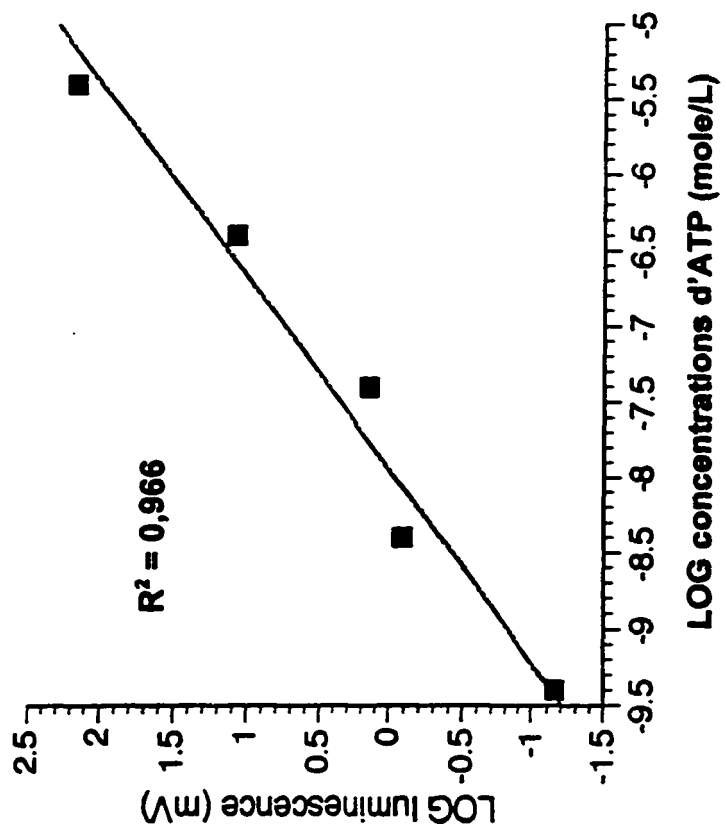
- Tanaka, S. et Matsuo, T.** 1986. Treatment characteristics of the two phase anaerobic digestion system using an upflow filter. *Water Science Technology*, 18:217-224.
- Toldra, F., Flors, A., Lequerica, J.L. et Vallés, S.** 1987. Fluidized bed anaerobic biodegradation of food industry wastewaters. *Biological Wastes*, 21:55-61.
- Vembu, K. et Tyagi, R.D.** 1990. Fluidized bed reactor in wastewater treatment. Dans *Wastewater treatment by immobilized cells*. Tyagi, R. D. et Vembu, K. CRC press. Floride, pp. 253-265.
- Venkatraman, J; Satyanarayan, S et Kaul, S.N.** 1989. Attached film fixed bed reactor for treatment of dairy wastewater. *CEW*, 24:54-63.
- Viraraghavan, T. et Kikkeri, S.R.** 1990a. Effect of temperature on anaerobic filter treatment of dairy wastewater. *Water Science and Technology*, 22:191-198.
- Viraraghavan, T. et Kikkeri, S.R.** 1990b. Dairy wastewater treatment using anaerobic filters. *Canadian Agricultural Engineering*, 33:133-149.
- Wildenauer, F.X. et Winter, J.** 1985. Anaerobic digestion of high-strength acidic whey in a pH-controlled up-flow fixed film loop reactor. *Applied Microbial Biotechnology*, 22:367-372.
- Yan, J.Q., Liao, P.H. et Lo, K.V.** 1988. Methane production from cheese whey. *Biomass*, 17:185-202.
- Yan, J.Q., Lo, K.V. et Liao, P.H.** 1989. Anaerobic digestion of cheese whey using up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Biological Wastes*, 27:289-305.

- Yan, J.Q., Lo, K.V. et Liao, P.H.** 1990. Anaerobic digestion of cheese whey using an upflow anaerobic sludge blanket reactor: III. Sludge and substrate profiles. *Biomass*, 21:257-271.
- Yan, J.Q., Lo, K.V. et Pinder, K.L.** 1993. Instability caused by high strength of cheese whey in a UASB reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:700-706.
- Yang, P.Y. et Wang, M. L.** 1990. Entrapment of microbial cells for wastewater treatment. Dans *Wastewater treatment by immobilized cells*. Tyagi, R.D. et Vembu, K. CRC Press. Floride, pp. 45-78.
- Yu, J. et Pinder, K.L.** 1993. Intrinsic fermentation kinetics of lactose in acidogenic biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:479-488.

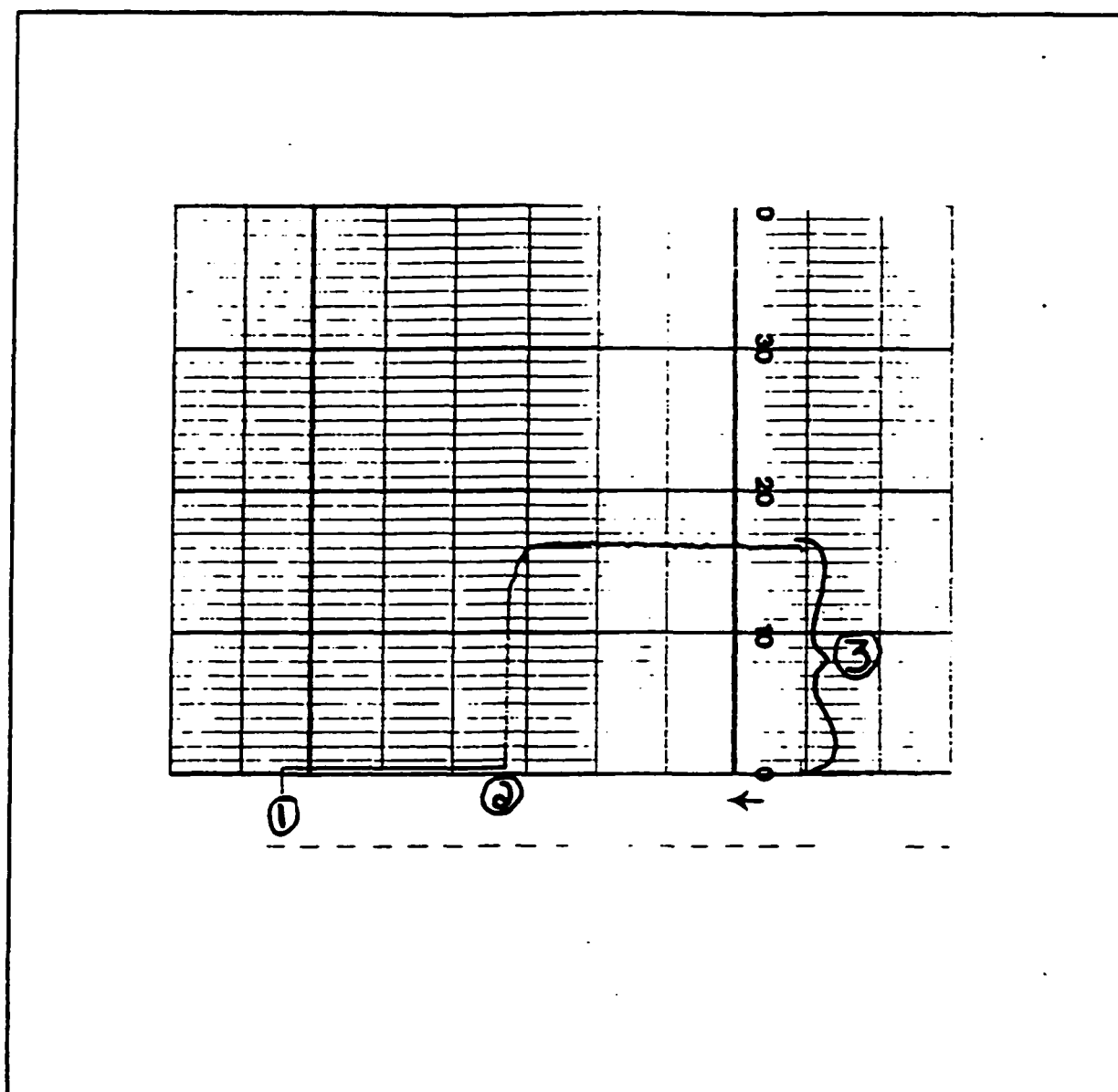
ANNEXE 1
COURBE ÉTALON POUR LA DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS DE
SUCRE



ANNEXE 2
COURBE ÉTALON POUR LA DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS
D'ATP



ANNEXE 3
EXEMPLE D'UN TRACÉ DE LUMINOMÉTRIE (ATP)



1. Mise sous tension de l'enregistreur
2. Injection de l'échantillon (Standard de $4E-7$ mole/L)
3. Plateau correspondant à $4E-7$ mole ATP/L à 100 millivolts

ANNEXE 4
AIRES D'INTÉGRATION DES STANDARDS D'ACIDES GRAS

Plusieurs mélanges ont été préparés afin de construire les courbes standards pour les acides gras recherchés. Ainsi, 1 mL de chacun des acides (acétique, propionique, n-butyrique et iso-butyrique) a été placé dans 50 mL d'eau distillée, constituant le mélange standard 1. Par la suite, c'est un mélange de 2 mL de chaque acide dans 50 mL pour le standard 2. Et ainsi de suite, pour le standard 5, un volume de 5 mL de chaque acide (50 mL) et le standard 7 (7 mL de chaque acide/50 mL). Par contre, seul le standard 1 était représentatif de la concentration d'acides gras retrouvée dans les échantillons. C'est celui-là qui a été utilisé pour calculer les concentrations des échantillons.

AIRES D'INTÉGRATION DU STANDARD 1

(Proportion de chaque acide dans le mélange = 2%)

ACIDES GRAS	TEMPS DE RÉTENTION (minutes)	AIRES (unités) (quantité injectée)	RAPPORT (g d'acide gras/unité d'aire)
Acétique	1,73	30 440 (0,8µL) (ou 45 660 (1,2µL))	$5,085 \times 10^{-10}$
	1,71	46 301 (1,2µL)	
Propionique	3,24	71 217 (0,8µL) (ou 106 826(1,2µL))	$2,06 \times 10^{-10}$
	3,23	107 680 (1,2µL)	
N-butyrique	4,75	87 876 (0,8µL) (ou 131 814(1,2µL))	$1,785 \times 10^{-10}$
	4,76	132 770 (1,2µL)	
Iso-butyrique	6,23	79 477 (0,8µL) (ou 119 216(1,2µL))	$1,595 \times 10^{-10}$
	6,25	119 810 (1,2µL)	

ANNEXE 5

**EXEMPLE DE CALCUL DE LA CONCENTRATION D'UN ACIDE GRAS À
PARTIR DES AIRES D'INTÉGRATION**

Exemple de calcul de la concentration d'un acide gras (acide acétique) à partir des aires d'intégration.

$$1,2 \times 10^{-3} \text{ mL} \times \frac{1 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1,053 \text{ g}}{53,952 \text{ g}} = 2,340 \times 10^{-5} \text{ g d'acide acétique}$$

où $1,2 \times 10^{-3} \text{ mL}$ correspond au volume d'acide acétique standard injecté;
 1 g/1 mL correspond à la densité de la solution;
 $1,053 \text{ g}$ correspond à la densité de l'acide acétique
 $53,952 \text{ g}$ correspond au poids total de l'échantillon (50 mL d'eau + 1 mL des 4 acides gras utilisés comme standard).

La valeur obtenue équivaut donc au poids de l'acide acétique dans le standard. Cette quantité est équivalente à l'aire correspondant au standard de l'acide acétique (Annexe 4). On poursuit avec:

$$\frac{\text{Aire de l'inconnu}}{0,926} \times 5,085 \times 10^{-10} = \frac{x \text{ g}}{1,2 \times 10^{-3} \text{ mL}}$$

où $0,926$ correspond au facteur de dilution soit 50/54;
 $5,085 \times 10^{-10}$ est égal au rapport de la quantité d'acide acétique sur l'aire correspondant au standard d'acide acétique (Annexe 4).

La donnée obtenue est présentée en g/mL et il faut la multiplier par 1 000 pour obtenir la quantité en g/L de l'acide à la sortie du bioréacteur.

ANNEXE 6
EXEMPLE DE CALCUL DU DÉBIT DE BIOGAZ PRODUIT PAR GRAMME
D'ACIDES GRAS

Exemple de calcul à partir du débit de biogaz à une concentration d'alimentation de 20 g/L; lorsque le bioréacteur est en conditions optimales.

D'après le Tableau 9, il y a au total 5,11 g/L d'acides gras de produit au point de sortie, à une concentration d'alimentation de 20 g/L et d'après le Tableau 8, un débit de 68 L/jour de biogaz est produit pour la même concentration d'alimentation. Avec un débit moyen de 112 L/jour de liquide traité, on effectue le calcul de la façon suivante:

$$5,11 \text{ g/L d'acides gras} * 112 \text{ L/jour de liquide traité} = 572,32 \text{ g d'acides gras/jour}$$

Donc, pour 68 L de biogaz de produit par jour, on a 572,32 g d'acides gras; il suffit de faire une "règle de trois" pour trouver la quantité de biogaz produit par gramme d'acides gras:

$$\frac{1 \text{ g}}{572,32 \text{ g}} * 68 \text{ L} = 0,1 \text{ L de biogaz/ g d'acides gras}$$

ANNEXE 7
VALEURS NUMÉRIQUES CORRESPONDANTS AUX FIGURES 6 À 13

Temps	Concentrations en sucre (g/L)			Efficacité	Débit de biogaz	ATP	Biofilm
(heure)	Alimen- tation	Entrée	Sortie	(%)	(L/jour)	(mole d'ATP/m ³ support)	(cm)
0	5	6	5,6	7	7,6		
12	5,2	2,4	2,9	-21	192		
24	3,6	5,4	2,7	50			
36	2,1	0,3	0,6	-100	192		47,52
48	3,6	0,4	0,6	-50			47,52
60	3	0,8	0,6	25	192		47,52
72	3	1,4	1,3	7			47,52
84	5	0,7	0,5	29	96		47,52
96	5,4	2,6	1,9	27			47,52
108	6,4	2	1,5	25	24		47,52
120	7,4	3,9	3,3	15			47,52
132	2,2	0,9	0,6	33	48		47,52
144	5,7	2,8	2,7	4			48,82
156	5,1	2,9	2,5	14	48		49,68
168	5,8	2,9	2,6	10			48,82
180	6,5	3,3	3,3	0	62,4		49,5
192	3,2	0,9	0,8	11		14,7	48,5
204	4,4	1,8	1,4	22	40,8	4,47	48
216	5,9	0,9	0,8	11		15,6	48
228	7,4	1,6	0,9	44	72		

		Concentrations d'acides gras en g/L			
Heures	Acides	Alimen- tation	Entrée	Liquide supérieur	Sortie
192	Acétique	0,112	13,04	2,346	1,706
	Propionique	0,036	3,838	0,475	0,372
	n-butyrique	0,088	18,421	9,296	6,84
	iso-butyrique	0,040	3,350	0,182	0,195
204	Acétique	0,744	1,400	1,071	1,10
	Propionique	0,133	0,276	0,259	0,281
	n-butyrique	0,372	5,003	5,025	4,756
	iso-butyrique	0,019	0,068	0	0,077
216	Acétique	0,958	1,117	0,367	0,887
	Propionique	0,136	0,311	0,101	0,243
	n-butyrique	0,190	5,356	1,415	4,347
	iso-butyrique	0	0,087	0,029	0,070

Temps	Concentrations en sucre (g/L)			Efficacité	Débit de biogaz	ATP	Biofilm
(heure)	Alimen- tation	Entrée	Sortie	(%)	(L/jour)	(mole d'ATP/m ³ support)	(cm)
0	7,7	6,1	5,9	3	72		
12	4,9	0,8	0,5	38			48,5
24	10	2,2	1,5	32			48,5
36	2,7	2,9	2,5	14	85,95		48
48	9,6	4,9	4,1	16			48,2
60	4,8	1,4	0,6	57	53,8		49
72	8,3	6,5	5,5	15			50
84	4,9	5,9	5,9	0			49
96	4,8	3	2,9	3			48,5
108	6,1	2,5	1,1	56	73		47,5
120	10	3,6	1	72			48
132	10	0,3	0,3	0	40,3		48,5
144	7,8	3,9	3,5	10			48,5
156	8,4	4,9	4,6	6	103,7		48,5
168	6,6	4,3	4,6	-7			48
180	5,1	2,3	1,5	35	48		49,5
192	10,1	5,3	5,5	-4			47,5
204	5,5	7,4	7,4	100		5,21	49,5
216	8,4	1,7	1	41	126,7		62
228	8,9	6,6	6,4	3	62,4		50
240	9,9	4,5	4,3	4	48		58
252	7,8	4,7	4,9	-4	54,7		54,5
264	7,9	3,6	2,4	33			55
276	9,6	1,2	0,2	83	60,5	41,4E-2	59
288	9,1	1,7	0,8	53		4,65E-2	51,5
300	8,3	4,4	3,8	14	44,6	3,6E-2	

		Concentrations d'acides gras en g/L			
Heures	Acides	Alimen- tation	Entrée	Liquide supérieur	Sortie
276	Acétique	0,394	0,642	1,66	1,10
	Propionique	0	0,025	0,075	0,041
	n-butyrique	0,016	0,243	0,467	0,294
	iso-butyrique	0	0	0	0
288	Acétique	0,220	0,558	0,566	0,567
	Propionique	0	0,026	0,042	0,029
	n-butyrique	0,010	0,321	0,291	0,353
	iso-butyrique	0	0	0	0
300	Acétique	0,324	0,736	0,574	0,425
	Propionique	0	0,196	0,144	0,206
	n-butyrique	0,002	1,670	1,202	1,603
	iso-butyrique	0	0	0	0

Temps	Concentrations en sucre (g/L)			Efficacité	Débit de biogaz	ATP	Biofilm
(heure)	Alimen- tation	Entrée	Sortie	(%)	(L/jour)	(mole d'ATP/m ³ support)	(cm)
0	13	6,6	5,5	17	41,3		54
12	18	10,2	9,1	11			54
24	18	9,1	4,7	48			54
36	17	16,1	14,2	12	67,7		58,5
48	15	9,3	8,8	5			56
60	12,5	6,8	6,6	3	126,7		54,5
72	11	6,8	7,4	-9			51
84	11,5	5	4,1	18			49,5
96	12	5,6	4,6	18			50
108	17,5	10,3	9,6	7	132,5		51,4
120	18	3,6	2,8	22			50
132	18	5,5	7,1	-29			49,5
144	18	2,2	2,3	-5			48
156	17,5	8,4	9,1	-8	34,6		49
168	17,5	9,1	8,9	2			53
180	17,5	13,9	10,5	24	39,5		50
192	18,5	6,8	6	12			51
204	15,5	12,6	13,7	-9			50
216	19,5	7,7	10	-30	50,4		50,5
228	18	16,2	14,7	9	115,2	25,6	49,5
240	19,5	9,4	6,6	30	105,4	22,3	49
252	19,5	11,1	11,5	-4	47,5	60,3	50

		Concentrations d'acides gras en g/L			
Heures	Acides	Alimen- tation	Entrée	Liquide supérieur	Sortie
228	Acétique	1,211	1,054	0,653	0,747
	Propionique	0	0,164	0,113	0,127
	n-butyrique	0,137	3,302	2,310	2,809
	iso-butyrique	0	0	0,011	0
240	Acétique	1,275	0,788	0,594	0,642
	Propionique	0	0,547	0,368	0,593
	n-butyrique	0,008	5,671	3,739	6,274
	iso-butyrique	0,003	0	0	0
252	Acétique	0,629	0,588	0,475	0,490
	Propionique	0	0,348	0,276	0,327
	n-butyrique	0,038	3,631	2,911	3,303
	iso-butyrique	0	0	0	0

Résultats observés à 30 g/L

Temps	Concentrations en sucre (g/L)			Efficacité	Débit de biogaz	ATP	Biofilm
(heure)	Alimen- tation	Entrée	Sortie	(%)	(L/jour)	(mole d'ATP/m ³ support)	(cm)
0	27						
12	34,5	17,4	15,9	9	32,6		47
24	27,5	25	22,2	11			49
36	25,5	51,5	18,5	64	57,6		48
48	26	20,5	18,6	9			49
60	28	26,5	16	40	21,6		49,5
72	30	32	22	31			52,5
84	35	24,5	18,5	24	54,8		52
96	38	42	24	43			51
108	43	25	21	16	53,3	5,61	48
120	38	25	22,2	11		22,6	56,5
132	36,5	10,5	14,1	-34	92,2	30,1	49,5

		Concentrations d'acides gras en g/L			
Heures	Acides	Alimen- tation	Entrée	Liquide supérieur	Sortie
108	Acétique	0,273	0,448	0,343	0,474
	Propionique	0	0,345	0,192	0,384
	n-butyrique	0	2,633	1,613	2,841
	iso-butyrique	0	0	0	0
120	Acétique	0,622	0,819	0,450	0,675
	Propionique	0	0,146	0,092	0,117
	n-butyrique	0,012	2,246	1,482	1,884
	iso-butyrique	0	0	0	0
132	Acétique	0,646	1,440	0,897	1,733
	Propionique	0	1,613	1,079	2,017
	n-butyrique	0,018	5,922	3,777	7,325
	iso-butyrique	0	0	0	0,041

ANNEXE 8**PRÉCISION SUR LES MÉTHODES DE DOSAGE DES SUCRES, DES ACIDES
GRAS ET DE L'ATP**

INCERTITUDES SUR LES MÉTHODES

Pour l'ATP bactérien : l'erreur maximale est de $\pm 20\%$

$$\begin{array}{cccc} \text{(A)} & \text{(B)} & \text{(C)} & \text{(D)} \\ \frac{0,005 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}} + \frac{0,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} + \frac{5 \text{ } \mu\text{L}}{100 \text{ } \mu\text{L}} + \frac{5 \text{ } \mu\text{L}}{100 \text{ } \mu\text{L}} & = & 0,2 \end{array}$$

Prélèvement de 0,1 mL d'échantillon brut (A), ajouté à 10 mL de tampon bouillant (B). Prélèvement de 100 μL de ce mélange (C); ajout de 100 μL de réactif enzymatique à ce mélange.

Pour les sucres : l'erreur maximale est de $\pm 22\%$

$$\begin{array}{cccccc} \text{(A)} & \text{(B)} & \text{(C)} & \text{(D)} & \text{(E)} & \text{(F)} \\ \frac{0,05 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} + \frac{25 \text{ mL}}{1\,000 \text{ mL}} + \frac{0,05 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} + \frac{0,05 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} + \frac{0,05 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} + \frac{0,001}{0,027} & = & 0,222 \end{array}$$

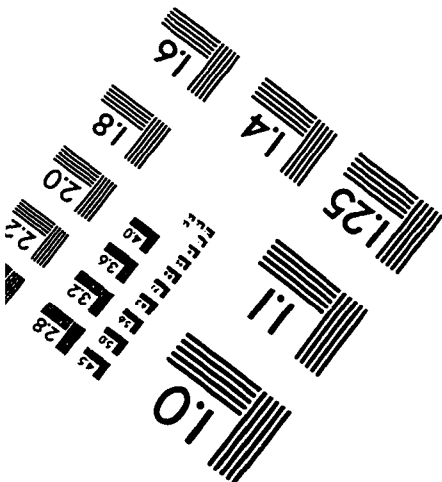
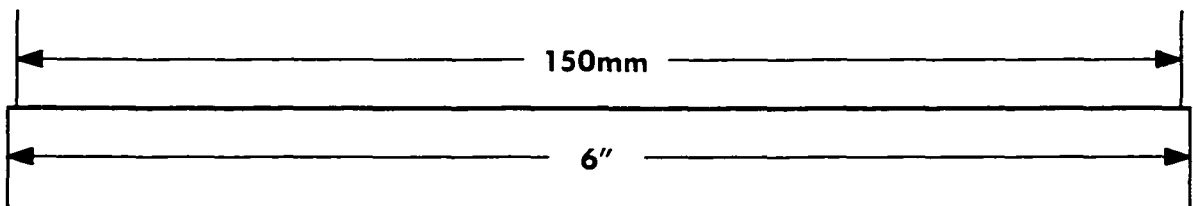
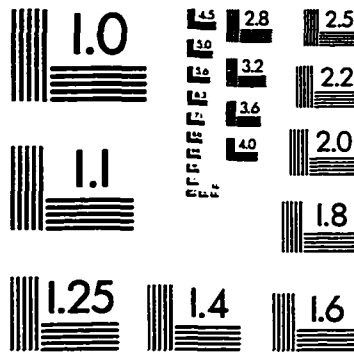
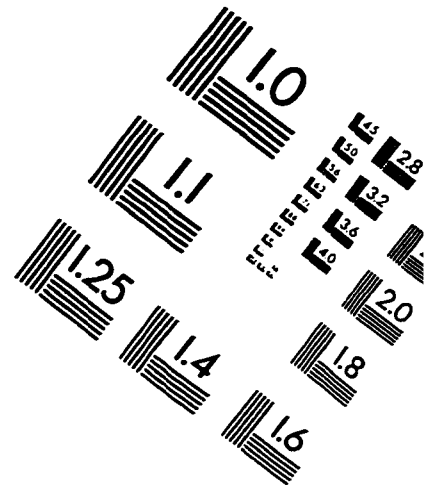
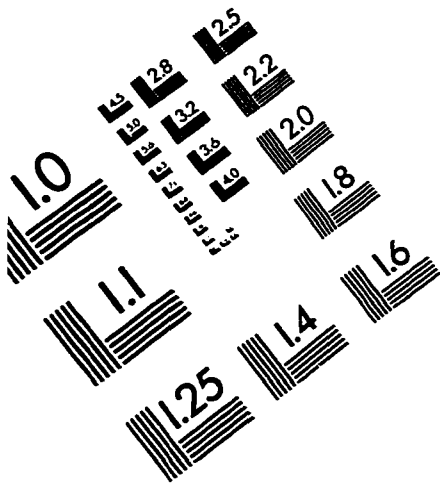
Prélèvement de 1 mL d'échantillon brut (A) placé dans 1 000 mL d'eau distillée (B). Prélèvement de 1 mL de ce mélange (C), 1 mL de phénol 5% y est ajouté (D) et 5 mL d'acide sulphurique (E) est ajouté aux 2 mL précédents. La valeur 0,027 est la plus petite valeur mesurée au spectrophotomètre lors de ce projet.

Pour les acides gras : l'erreur maximale est de $\pm 8\%$

$$\begin{array}{ccccc} \text{(A)} & \text{(B)} & \text{(C)} & \text{(D)} & \text{(E)} \\ \frac{0,5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} + \frac{0,5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} + \frac{0,5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} + \frac{0,5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} + \frac{0,05 \text{ } \mu\text{L}}{1,2 \text{ } \mu\text{L}} & = & 0,082 \end{array}$$

Prélèvement de 50 mL d'échantillon brut (A). Trois extractions successives avec 50 mL d'éther (B, C et D) sont effectuées avec le 50 mL d'échantillon brut. Prélèvement de 1,2 μL du liquide extrait contenant les acides gras pour injection dans le chromatographe.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc.
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

