

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

**PAR
MARTIN BERTRAND
B. Sc. (BIOLOGIE)**

**SUIVI DE L'ATP ET DES PROTÉINES DU BIOFILM DANS UN BIORÉACTEUR À
LIT FLUIDISÉ FERMENTANT UN PERMÉAT DE LACTOSÉRUM RECONSTITUÉ**

Mars 2002



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

La production de fromage entraîne le rejet d'énormes quantités de résidus. Le perméat de lactosérum est une solution riche en lactose et en minéraux convenable pour la fermentation. Les réacteurs anaérobies en continu sont très efficaces pour la production d'acide propionique par *Propionibacterium acidipropionici*; cependant, les paramètres permettant de mesurer l'activité de dégradation de la DCO et la production d'acides organiques volatils ne sont pas au point. Cette étude apporte une lumière nouvelle sur la relation entre la quantité de protéines et la concentration d'adénosine 5'-triphosphate (ATP) pour l'évaluation de l'activité d'un bioréacteur à lit fluidisé en continu. Il y est démontré que la concentration d'ATP dans le biofilm explique mieux l'activité de diminution de la teneur en lactose exprimée en équivalents glucose et la production d'acides gras volatils que la quantité de protéines du biofilm. Une méthode novatrice de coloration et de photographie du biofilm y est aussi explorée.

Mots clés: Culture mixte, valorisation, acides gras, anaérobie, perméat de lactosérum, ATP, protéines, *Propionibacterium acidipropionici*, microscopie en fluorescence.

ABSTRACT

Cheese production leads to massive residue production. Whey permeate is a lactose and minerals rich solution suitable for fermentation. Continuous flow anaerobic reactors are known to be effective for propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*, however, the control parameters for COD reduction and volatile fatty acids (VFA) are not well mastered. This study sheds new light on the relation between total proteins and ATP to predict a fluidized bed reactor's activity. It is shown that ATP concentration best explains the lactose concentration reduction shown in glucose-equivalents and VFA production than total biofilm protein content. A novel staining and photographic method is used to view the biofilm.

Key words : Mixed culture, valorisation, fatty acids, anaerobic, whey permeate, ATP, proteins, *Propionibacterium acidipropionici*, fluorescence microscopy.

REMERCIEMENTS

Ces remerciements sont d'abord dédiés à mes directeurs, le Dr Raynald Côté et le Dr Marcel Paquet pour avoir accepté de me superviser dans ce projet. Merci à ma conjointe, Marie-Josée Lépine, à mes parents et à mes amis pour m'avoir appuyé dans cette réorientation de carrière.

J'aimerais souligner l'aide reçue par les techniciens du département des sciences appliquées, M. Robert Forcier, du département des sciences fondamentales, M. Jean-Marc Gauthier et M. André Barette. Je remercie également le Dr André Pichette et le Dr Denis Bussières, professeurs au département des sciences fondamentales, sans oublier Mme Linda Grenon, s cr taire. Un énorme remerciement à Mme Nathalie Imbeault, M.Sc., pour m'avoir aidé à démarrer le projet et à MM. Patrick Lapointe, assistant de recherche,  ric Simard et Dominique Pilote pour leurs discussions. Merci au personnel du laboratoire de microbiologie du Centre hospitalier de la Sagamie pour la microscopie en fluorescence. Merci   Benoît Thériault, du département des sciences appliquées, pour l'édition des figures.

Merci au Dr Richard Villemur, à son équipe et à l'INRS-Institut-Armand-Frappier pour m'avoir accueilli pour la durée de mon stage. Merci aux organismes subventionnaires, FODAR, le Fonds FCAR, l'UQAC et la Région Laboratoire de Développement Durable pour leur support financier.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT.....	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES ENCADRÉS	X
LISTE DES ANNEXES	XI
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1.1 PROBLÉMATIQUE.....	1
1.2 LA VALORISATION	3
1.3 LA FERMENTATION	7
1.4 PRODUCTION DE L'ACIDE PROPIONIQUE	7
1.5 AJOUT D'AZOTE	9
1.6 LE RÉACTEUR À LIT FLUIDISÉ.....	9
1.7 L'ACTIVITÉ DU BIOFILM	10
1.8 LA CARACTÉRISATION DU BIOFILM	11
1.8.1 ATP	13
1.8.2 Protéines	14
1.8.3 Micro-photographies	15
1.9 OBJECTIF	15
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	16
2.1 BIORÉACTEUR	16
2.1.1 Milieu de culture.....	19
2.2 MESURES DE PARAMÈTRES DE BIOMASSE.....	20
2.2.1 Protéines	20
2.2.2 Dosage des protéines sur support solide.....	22
2.2.3 ATP	23
2.2.4 Micro-photographies	25
2.3 MICROBIOLOGIE	26
2.3.1 Souche bactérienne et inoculation.....	26
2.3.2 Identification des bactéries isolées	27
2.3.3 Comparaison avec une banque de données	28
2.4 EFFICACITÉ DE DÉGRADATION DES SUCRES	28
2.5 ACIDES ORGANIQUES.....	29
2.5.1 Extraction.....	30
2.5.2 L'étalonnage interne.....	30

2.6	TRAITEMENT STATISTIQUE	32
CHAPITRE III : RÉSULTATS.....		34
3.1	INVENTAIRE MICROBIOLOGIQUE	34
3.2	UTILISATION DU SUCRE	36
3.3	LE BIOFILM.....	39
3.3.1	<i>ATP</i>	39
3.3.2	<i>Protéines</i>	40
3.3.3	<i>Micro-photographies</i>	41
3.4	IMPACT DES ACCIDENTS SUR LA CONCENTRATION D'ATP ET DE PROTÉINES ATTACHÉES.....	42
3.5	ACIDES ORGANIQUES VOLATILS.....	44
3.5.1	<i>Acide acétique</i>	44
3.5.2	<i>Acide iso-butyrique</i>	45
3.5.3	<i>Acide propionique</i>	46
3.5.4	<i>Acide n-butyrique</i>	47
3.6	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	47
3.6.1	<i>Corrélations</i>	47
3.6.2	<i>Explication de la réduction des sucres</i>	49
3.6.3	<i>Explication de la production d'acides gras volatils</i>	50
3.6.4	<i>Relation ATP-Protéines</i>	54
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....		55
4.1	INVENTAIRE MICROBIOLOGIQUE	55
4.2	UTILISATION DU SUCRE	57
4.3	LE TAUX DE CONVERSION EN ACIDES GRAS	58
4.4	ACID ^L S ORGANIQUES.....	59
4.5	VARIABLES EXPLICATIVES	60
4.6	MICRO-PHOTOGRAPHIES.....	60
4.7	STÉRILITÉ ET ASEPSIE	61
4.8	IMPORTANCE DE L'ANAÉROBIOSE	62
4.9	AMÉLIORATION DU BIORÉACTEUR	63
CHAPITRE V : CONCLUSION		64
RÉFÉRENCES.....		65
ANNEXES		74

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Séquence de réactions de la fermentation du glucose chez <i>Propionibacterium</i> .	5
Figure 2.	Structure de l'acide citrique (a) et de l'acide lactique (b)	6
Figure 3.	Shéma du montage expérimental.	17
Figure 4.	Évolution temporelle de (a) réduction de la quantité de sucre entre l'alimentation et la sortie du réacteur. (b) concentration d'acides organiques à la sortie. (c) efficacité de réduction de la DCO calculée à partir des deux premières données. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus pendant l'expérience.	38
Figure 5.	Évolution temporelle des concentrations de protéines en suspension (Protéines _s) (a), de l'ATP en suspension (ATP _s) (b), des protéines du biofilm (protéines _b) (c) et de l'ATP du biofilm (ATP _b) (d) par m ⁻³ de charbon (support). Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience. Les échelles sont différentes d'un graphique à l'autre.	40
Figure 6.	Évolution temporelle de la concentration d'acide acétique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.	44
Figure 7.	Évolution temporelle de la concentration d'acide iso-butyrique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.	45
Figure 8.	Évolution temporelle de la concentration d'acide propionique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.	46
Figure 9.	Évolution temporelle de la concentration d'acide n-butyrique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.	47
Figure 10.	Relation existant entre la valeur réelle de réduction des sucres et la valeur prédite par le modèle explicatif (équation 8).	51
Figure 11.	Vecteur utilisé pour le clonage du gène ARNr 16S. (Tiré de la documentation de Promega Corp.)	79
Figure 12.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 11. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	82

Figure 13.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	83
Figure 14.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	84
Figure 15.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	85
Figure 16.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	86
Figure 17.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 48. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	87
Figure 18.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 48. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	88
Figure 19.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 48. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	89
Figure 20.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	90
Figure 21a.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	91
Figure 21b.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	92
Figure 22.	Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.	93
Figure 23.	Exemple de tracé de luminomètre pour la détermination de l'ATP. Vitesse de déroulement = $1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Composition générale du lactosérum et du perméat de lactosérum.	2
Tableau 2.	Concentrations maximales d'acide propionique obtenues par fermentation continue ou <i>fed-batch</i> de lactosérum ou de perméat par <i>P. acidipropionici</i>	5
Tableau 3.	La fermentation du glucose chez les propionibactéries.	6
Tableau 4.	Liste des taxons identifiés lors des inventaires microbiologiques du bioréacteur.	35
Tableau 5.	Équivalences pour le calcul de la DCO.....	37
Tableau 6.	Résultats d'analyse des composantes (RGB) des photos de biofilm.	42
Tableau 7.	Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre quelques variables étudiées.	48
Tableau 8.	Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre l'efficacité de réduction des sucres et les facteurs mesurés.....	50
Tableau 9.	Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre la somme massique des concentrations des 4 acides dosés et les variables explicatives à l'étude.....	51
Tableau 10.	Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre les différentes variables explicatives.....	52
Tableau 11.	Étalonnage pour le dosage d'acides gras. Calcul du coefficient $K_{i/e}$	81
Tableau 12.	Exemple de valeurs obtenues pour les calculs de concentrations d'acides gras.....	81
Tableau 13.	Données brutes de dosage de l'ATP en suspension.	94
Tableau 14.	Données brutes de dosage de l'ATP attaché au support de charbon.	96
Tableau 15.	Données brutes de dosage des protéines en suspension.	99
Tableau 16.	Données brutes de concentration de protéines totales attachées au support de charbon	101
Tableau 17.	Données brutes de concentration d'acides gras volatils dans les échantillons pris au point d'alimentation du bioréacteur.	103
Tableau 18.	Données brutes de concentration d'acides gras volatils dans les échantillons pris au point de mélange du bioréacteur.	105

Tableau 19. Données brutes de concentration d'acides gras volatils dans les échantillons pris au point de sortie du bioréacteur.	107
Tableau 20. Données brutes utilisées pour la figure 4a de la concentration d'équivalents glucose à l'alimentation du bioréacteur.	109
Tableau 21. Données brutes utilisées pour la figure 4a de la concentration d'équivalents glucose à la sortie du bioréacteur.	110
Tableau 22. Données brutes de réduction des sucres utilisées pour la figure 4a.....	111

LISTE DES ENCADRÉS

Encadré 1. Dosage des protéines totales dans les liquides (Protéines _s).	21
Encadré 2. Dosage des protéines sur support solide (Protéines _b).	22
Encadré 3. Extraction de l'ATP.	23
Encadré 4. Méthode de dosage de l'ATP tirée de Chung et Neethling (1988).	23
Encadré 5. Dosage des sucres par la méthode des équivalents glucose.	29
Encadré 6. Extraction des acides organiques.	30
Encadré 7. Extraction de l'ADN génomique.	77

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1	Solutions	75
Annexe 2	Méthodes de biologie moléculaire utilisées.....	76
Annexe 3	Exemple de calcul des concentrations d'acides gras.....	80
Annexe 4	Micro-photographies du biofilm.....	82
Annexe 5	Résultats expérimentaux et exemples de calcul relatifs à l'ATP, aux protéines et aux acides gras.	94
Annexe 6	Calcul du temps de résidence et du temps de contact.....	113
Annexe 7	Composition de la poudre de perméat de lactosérum (non-hygroscopique)	114

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Problématique

L'un des buts du traitement des eaux usées est d'en retirer les substances qui pourraient avoir un effet néfaste sur l'environnement aquatique. La présence de certains types de polluants en milieu aquatique cause une réduction de la concentration d'oxygène mettant ainsi en péril différentes formes de vie. Les composés organiques dissous et en suspension tels les glucides présents dans le lactosérum ont ce genre d'impact sur le milieu récepteur. Historiquement, le traitement des eaux usées a mis l'emphasis sur la réduction de ces polluants. Ces substances modifient l'équilibre des écosystèmes aquatiques en servant de nourriture aux micro-organismes qui utilisent l'oxygène dans leur métabolisme et qui peuvent survivre à des concentrations d'oxygène plus faibles que les animaux supérieurs.

Il est connu que les bioréacteurs anaérobies utilisés à des fins de protection de l'environnement sont très efficaces pour réduire la charge organique polluante des effluents mesurée par la demande biochimique en oxygène (DBO₅). Cette réduction peut atteindre plus de 90 % (Rockey et Forster, 1982; Bull *et al.*, 1984;

De Haast *et al.*, 1985; Jewel, 1990). De plus, ils font preuve d'un certain potentiel pour la valorisation des déchets puisqu'ils permettent la production de sous-produits ayant une certaine valeur comme les biogaz, les acides, certains métabolites ou les ferments (Bull *et al.*, 1984; Imbeault, 1997).

Les fromageries sont aux prises avec un problème de cette nature puisqu'elles produisent de grandes quantités de lactosérum. Ce résidu représente 90 % du volume original de lait utilisé en fromagerie et en est le principal sous-produit (tableau 1). Il est riche en protéines et en lactose, ce qui le rend dommageable aux écosystèmes aquatiques à cause de sa DBO₅ élevée.

Tableau 1. Composition générale du lactosérum et du perméat de lactosérum.

Constituants	Lactosérum (% p/p) (Jacques, 1993)	Lactosérum (% p/p) (Poirier, 1996)	Perméat de lactosérum (%p/p) (Jacques, 1993)	Poudre de perméat (% p/p) (1996; Pierre Audet, Agropur, comm. pers.)
Eau	Nd	93,0	Nd	5,0
Lactose	5,1	4,9	5,1	82,0
Protéines	0,8	0,8	0,3	2,0
Minéraux – cendres	0,6	0,5	4,2	8,0
Acides organiques	0,2	0,2	0,6	0,2
Matière grasse	0,02	0,2	0,07	1,0
Autres	Nd	0,4	Nd	1,8

Le pH du lactosérum obtenu lors de la fabrication de fromage cheddar varie entre 5,7 et 6,3. La teneur en charge organique est très élevée et sa DBO₅ oscille aux environs de 40 000 mg/L alors que la norme de rejet pour une entreprise traitant ses effluents de façon autonome est de 30 mg/L (Poirier, 1996). La réduction de la DBO₅ d'un effluent industriel de fromagerie peut se faire efficacement *via* la fermentation par des bactéries sélectionnées.

Par le procédé d'ultrafiltration, l'industrie arrive à retirer les protéines et à les valoriser par d'autres voies (Jacques, 1993). Le perméat de lactosérum représente le résidu de l'opération de concentration des protéines. Il est disponible commercialement sous forme de poudre obtenue par atomisation et séchage¹ (Jacques, 1993). Actuellement, les protéines et le lactose du lactosérum sont les deux types de substances qui suscitent le plus d'intérêt pour la valorisation et la bio-transformation.

La bio-transformation des résidus industriels en un produit valorisé constitue une avenue de recherche intéressante et la digestion anaérobie en offre la possibilité. Que le produit soit un gaz énergétique à haute teneur en méthane (biogaz), des ferments réutilisables (biomasse) ou encore des sous-produits à haute valeur (acides gras volatils), la valorisation permet la réduction des coûts d'opération du procédé de dépollution.

1.2 La valorisation

Le souci des gestionnaires industriels d'améliorer la rentabilité des entreprises et de diminuer la charge organique des eaux usées a entraîné un changement de perception vis-à-vis de ces sous-produits. Depuis 1965, on retrouve des séchoirs à lactosérum dans les plus grandes fromageries et depuis 1984, on s'intéresse à la concentration de ses protéines. La valorisation des protéines de lactosérum pose en revanche un autre problème : le perméat. Le

¹ Agropur Inc, Plessisville, Qc, Canada.

perméat produit par ultrafiltration est en fait une solution composée de lactose avec des sels minéraux, de l'acide lactique, des composés azotés solubles et des vitamines (De Haast *et al.*, 1985, tableau 1). Ce produit a actuellement des débouchés commerciaux limités. Les procédés d'extraction du lactose sont connus mais demeurent très coûteux, ce qui fait en sorte que cette avenue de valorisation n'est pas à la portée de tous les industriels (Jacques, 1993).

Le lactose, un dimère constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose, contenu dans le perméat de lactosérum peut également s'avérer un substrat énergétique à bon marché pour les bactéries fermentatives. Le lactose est ainsi transformé en un mélange d'acides gras, principalement l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique. Ces acides ont la propriété d'être utilisables par l'industrie alimentaire comme précurseur d'aromate (Morin *et al.*, 1994) ou comme agent de conservation (Jacques, 1993). L'addition d'acides gras volatils à un milieu de culture de *Pseudomonas fragi* favorise leur bio-transformation. Les esters d'acides propionique et butyrique ainsi obtenus, ont la propriété d'avoir une odeur fruitée (Cormier *et al.*, 1991).

Pour être utilisé pour la fermentation, le lactose doit d'abord être scindé en D-glucose et en D-galactose par la β -galactosidase. L'acide propionique, l'acide acétique et le CO₂ sont les principaux produits issus de la fermentation du glucose par *Propionibacterium* (Moat et Foster, 1995). Avec les propionibactéries, la

formation de propionate se produit *via* une séquence complexe de réactions telle que montrée à la figure 1.

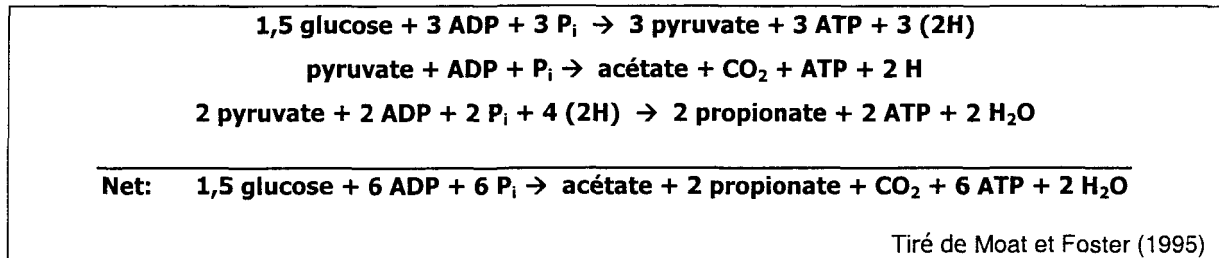


Figure 1. Séquence de réactions de la fermentation du glucose chez *Propionibacterium*.

Actuellement, les connaissances sur la valorisation du perméat par fermentation permettent de croire que la production d'acide propionique peut être très efficace et atteindre des concentrations appréciables dans le mélange comme le montre le tableau 2.

Tableau 2. Concentrations maximales d'acide propionique obtenues par fermentation continue ou *fed-batch* de lactosérum ou de perméat par *P. acidipropionici*.

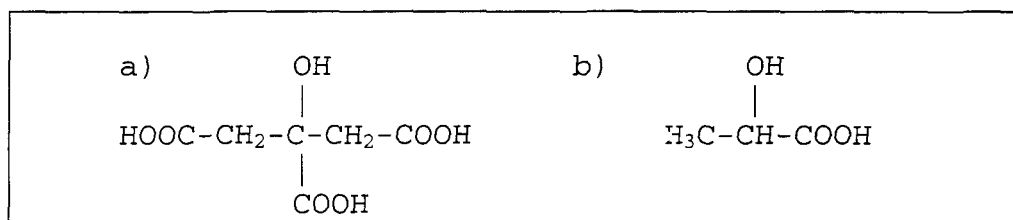
Concentration. (g/L)	Système	pH / Temp.	Référence
7	Fermentation à extraction	7,0 / 30	Jain <i>et al.</i> (1991)
19	Temps de rétention 35-45h	6,0 / 30	Yang <i>et al.</i> (1994)
25	Batch au début puis continu	7,0 / 30	Boyaval et Corre (1987)
17	Continu	6,6 / 35	Blanc et Goma (1989)
40	Fed-batch	6,5 / 30	Colomban <i>et al.</i> (1993)
20	Fed-batch	6,5 / 30	Goswami et Srivastava (2000)

Dans le cadre du développement d'une méthode de préparation de l'acide propionique, il a été observé que les propionibactéries produisaient préférentiellement de l'acide propionique. Comme le montre le tableau 3, cette préférence est nettement marquée chez *P. arabinosum*.

Tableau 3. La fermentation du glucose chez les propionibactéries.

Organisme	Propionate (mmoles)	Acetate (mmoles)	Rapport propionate : acetate	Référence
<i>P. freudenreichii</i>	134	52,6	2,6	Moat et Foster, 1995
<i>P. shermanii</i>	140	56,8	2,46	Moat et Foster, 1995
<i>P. petersonii</i>	114	54,0	2,1	Moat et Foster, 1995
<i>P. arabinosum</i>	148	10,0	14,8	Moat et Foster, 1995
<i>P. acidipropionici</i>	2	1	2	Choi et Mathews, 1994

D'autres acides organiques (lactique et citrique, figure 2) produits à partir de fermentations lactiques sont aussi utilisables comme agents de conservation pour l'alimentation (Jacques, 1993). Les acides gras à courte chaîne peuvent également être transformés par les bactéries lactiques en arômes fruités par une estérification (Morin *et al.*, 1994).

**Figure 2.** Structure de l'acide citrique (a) et de l'acide lactique (b)

La demande mondiale pour l'acide propionique se situait à 93 millions de kg en 1998 et sera de l'ordre de 112 millions de kg en 2001 avec une croissance estimée de 5% par an. L'acide propionique et ses sels sont utilisés dans plusieurs produits. Ses esters sont utilisés dans l'industrie de la parfumerie et le propionate de cellulose, dans les thermoplastiques (Playne, 1985). On l'utilise aussi comme agent de conservation pour la nourriture animale et le maïs (42 %), comme herbicide (21%), comme sels de calcium et de sodium (16 %), comme propionate de cellulose (14 %) et autres usages (7 %) (ChemExpo, 1997; 2000). En 2000, le

prix du marché était de 1,01-1,07\$ (US) le kg. La quasi-totalité de cet acide propionique est produite par des procédés pétrochimiques. Récemment, beaucoup d'intérêt a été porté à la production d'acide propionique à partir de perméat de lactosérum (Jain *et al.*, 1991; Colomban *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994; Imbeault, 1997; Imbeault *et al.*, 1998; Boyaval et Corre, 1987), spécialement par les bactéries du genre *Propionibacterium*.

1.3 La fermentation

La fermentation peut se faire selon trois modes principaux : en lot (*batch*), en continu ou en lot ré-alimenté (*fed-batch*) avec ou sans recirculation. Le choix du mode est guidé en partie par le type de produit recherché. Si le produit est issu du métabolisme actif du micro-organisme, on utilisera un système qui les maintient en phase de croissance active tandis que si on recherche un produit sécrété en phase stationnaire des organismes, on utilisera un système en lot. La croissance exponentielle d'une culture peut être prolongée par l'addition continue de milieu frais au réacteur et il est possible d'ajuster le taux de dilution à un rythme qui maintient la concentration de produit au maximum.

1.4 Production de l'acide propionique

En conditions anaérobies, *Propionibacterium acidipropionici* produit 2 moles d'acide propionique et une mole d'acide acétique (rapport de poids 2,47 :1) pour 1,5 moles de glucose utilisé (Choi et Mathews, 1994). D'après certains auteurs, la

concentration d'acide propionique à laquelle nous pouvons nous attendre en utilisant un système en continu à lit fluidisé se situe entre 5 et 20 g/L (tableau 2).

La fermentation du glucose par *P. acidipropionici* se fait majoritairement par la voie des acides tricarboxyliques (Choi et Mathews, 1994). Ces auteurs ont démontré que le pH optimal pour la fermentation du glucose en lot se situait entre 5,5 et 6,5 et que l'efficacité de la production est très sensible aux variations de pH. Quesada-Chanto *et al.* (1997b) ont également observé un rendement optimal de fermentation propionique à pH = 6,5 pour *P. shermanii*. Hsu et Yang (1991) ont trouvé que le pH optimal pour la croissance de *P. acidipropionici* est différent de l'optimum de pH pour la production d'acide propionique. En effet, ces auteurs ont trouvé un optimum de pH entre 6 et 7,1 pour la croissance et un optimum de production d'acide propionique à pH < 6,0. Ils ont recommandé d'utiliser un pH entre 5,0 et 5,5 pour la production d'acide propionique par *P. acidipropionici* en système *batch* et ont aussi suggéré que les fermentations continues à cellules immobilisées pourraient être efficaces avec du perméat de lactosérum à pH acide.

Le passage à l'étape de projet pilote pour la fabrication d'acide propionique est difficile parce que (i) l'obtention d'acide propionique par fermentation demande beaucoup de soins (vitesse de croissance de *P. acidipropionici* lente); (ii) la production d'acides organiques par cette bactérie est inhibée par les produits finaux (acide propionique et acide acétique) (Blanc et Goma, 1987); (iii) la

séparation et la concentration de l'acide est dispendieuse (Yang *et al.*, 1994; Colombari *et al.*, 1993).

1.5 Ajout d'azote

Yang *et al.* (1994) ont affirmé qu'un supplément d'azote était important pour la fermentation lorsqu'on veut obtenir une bonne croissance cellulaire. Lors de la digestion du lactosérum, le ratio C : N devrait se situer entre 20 :1 et 30:1 pour une efficacité maximale (Stafford *et al.* dans De Haast *et al.*, 1985). Le ratio C : N du lactosérum entier (lactosérum avant traitement) se situe dans la zone de ratio idéal. Cependant, le ratio C : N du lactosérum déprotéiné (perméat) doit être ajusté par un ajout d'azote pour que la digestion anaérobie s'effectue dans des conditions plus adéquates (De Haast *et al.*, 1985). D'autres auteurs (Quesada-Chanto *et al.*, 1997b) ont démontré que la source de vitamines et d'azote avait aussi une influence sur la croissance des propionibactéries. Ils ont obtenu les meilleurs résultats en ajoutant de la liqueur de macération de maïs (*corn-steep liquor*) à une concentration de $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ au mélange à fermenter.

1.6 Le réacteur à lit fluidisé

Le design du réacteur utilisé peut permettre de limiter les problèmes associés avec la lente croissance de certaines bactéries. Pour une faible vitesse de croissance, on peut choisir d'augmenter la quantité de biomasse en la fixant dans le réacteur afin qu'elle ne soit pas lessivée avec le substrat traité. Le

bioréacteur à lit fluidisé utilise un support granulaire fin sur lequel la biomasse se fixe. Les fermentations continues sont généralement plus productives en acides gras que les cultures en lot (*batch fermentations*), quoique les concentrations obtenues soient plus faibles (Paik et Glatz, 1994). Le principal avantage de l'immobilisation des cellules est l'accroissement de la productivité *via* l'opération continue et la réutilisation des cellules (Groboillot *et al.*, 1994).

Parmi les autres méthodes utilisées pour immobiliser la biomasse bactérienne dans les procédés continus de production d'acides gras avec *P. acidipropionici*, divers supports ont été utilisés : les billes d'alginate de calcium (Haddadin *et al.*, 1996), matrice fibreuse de coton (Lewis et Yang, 1992a; 1992b; Yang *et al.*, 1994), et l'ultrafiltration avec réutilisation de la biomasse (Crespo *et al.*, 1991; Boyaval et Corre, 1987). La présente expérience a été réalisée sur un réacteur à lit de charbon fluidisé à cause de sa faible tendance au « channeling » et à la bonne capacité d'adhésion du biofilm au charbon.

1.7 L'activité du biofilm

La proportion active de la biomasse présente dépend de l'épaisseur du film, de la façon dont les particules de support occupent l'espace liquide et des propriétés de diffusion des différentes substances formant le substrat. Évidemment, les organismes qui ne sont pas exposés au substrat parce qu'ils se retrouvent dans les couches profondes du film ne peuvent pas participer à sa transformation. Les limitations à la diffusion ou au transfert de masse dues à

l'accumulation de biofilm peuvent être réduites en augmentant la surface de contact film-liquide.

1.8 La caractérisation du biofilm

Les paramètres les plus utilisés pour la caractérisation des biofilms sont l'épaisseur, le poids sec et les décomptes cellulaires. Cependant, ces paramètres ne sont pas suffisants pour décrire l'activité ou l'état de viabilité du biofilm car ils ne considèrent pas l'état des cellules décrites. La culture peut être en phase de latence, de croissance active ou moribonde et inactive. D'autres approches de caractérisation ont été mises de l'avant pour remédier à cette carence. La détermination de composés présents exclusivement dans les cellules vivantes comme l'ATP est l'une d'elles.

Plusieurs paramètres peuvent être mesurés pour suivre l'efficacité de fermentation des systèmes à biomasse attachée. Une bonne revue de littérature a d'ailleurs été faite par Lazarova *et al.* (1994). Cependant, il n'est mentionné nulle part quel paramètre, l'ATP ou la concentration de protéines, prédit le mieux l'activité de dégradation prenant place dans le réacteur.

Les biofilms utilisés pour le traitement des eaux usées sont très complexes. Ils sont formés de cellules microbiennes et de colonies imprégnées dans une matrice de polymères dont la structure est dépendante des conditions environnementales parmi lesquelles on retrouve l'âge du biofilm, l'intensité des

forces de cisaillement et la charge nutritive. Ce biofilm est constitué d'une partie active qui contient les éléments nécessaires aux réactions métaboliques (enzymes, énergie métabolique) et d'une partie inactive représentant une barrière à la diffusion (matrice, bactéries mortes). La composition et l'activité du biofilm sont deux paramètres extrêmement importants dont l'évolution doit être suivie pour opérer avec succès un réacteur à biofilm. Le biofilm peut donc être décrit de trois façons : 1) décrire sa formation et sa structure; 2) décrire sa composition en termes de masse, d'abondance de composantes spécifiques ou 3) décrire son niveau de productivité, son dynamisme et son activité. L'activité du biofilm est un paramètre clé dans le traitement des effluents. Par contre, ce paramètre n'est pas toujours corrélé linéairement avec les descripteurs plus conventionnels du biofilm que sont le poids sec, l'épaisseur ou la demande chimique en oxygène (DCO) (Lazarova et Manem, 1995). Pour améliorer la prédiction de l'efficacité de dégradation, d'autres paramètres doivent être mesurés.

La quantité totale de biofilm peut être évaluée physiquement (masse, épaisseur, densité) ou physico-chimiquement (COT, DCO). L'activité du biofilm peut, quant à elle, être décrite plus en détail en dosant certains de ses constituants (protéines, exo-polysaccharides, densité cellulaire) ou certaines composantes cellulaires (peptidoglycanes, lipides, lipopolysaccharides) (Lazarova et Manem, 1995).

1.8.1 ATP

Les techniques communes pour estimer l'activité d'un biofilm consistent en des tests biochimiques qui mesurent soit l'activité d'une enzyme spécifique ou le dosage de produits issus du métabolisme bactérien. L'ATP, une composante énergétique universelle de la matière vivante, est impliquée dans les activités métaboliques et disparaît rapidement après la mort des cellules (White *et al.*, 1979; Atlas, 1983). Dans leur revue sur l'utilisation de l'ATP dans les systèmes à boues activées, Roe et Bhagat (1982) ont indiqué que les concentrations de cette molécule labile sont maintenues constantes par les mécanismes biochimiques cellulaires et ces auteurs ont suggéré d'utiliser la mesure de la concentration de cette substance pour évaluer la biomasse active. Il a aussi été démontré que les stress environnementaux comme les pH alcalins ou trop acides, les hautes températures et la présence de molécules toxiques pouvaient causer des variations à la quantité d'ATP par cellule.

L'ATP, comme indice de biomasse, permet donc de quantifier les cellules vivantes et seulement les vivantes sans égard à leur espèce (Stevenson *et al.*, 1979). Le stade de croissance de la culture pourrait influencer la concentration d'ATP mais il a été démontré que la croissance des bactéries ne semble pas affecter le ratio ATP/biomasse dans la liqueur mixte des lits bactériens (Roe et Bhagat, 1982). La concentration d'ATP est donc proportionnelle au taux d'activité cellulaire (White *et al.*, 1979; Lazarova et Manem, 1995) et cette mesure permet d'évaluer l'importance de la partie active de la biomasse dans l'échantillon.

1.8.2 Protéines

La concentration de protéines attachées (Protéines_b), représente la biomasse bactérienne vivante et morte. Les protéines constituent en fait 30-80% de la masse des cellules vivantes (Sperandio et Püchner, 1993 *cité par* Lazarova et Manem, 1995) ainsi que 10-15% des polymères extracellulaires (Ford *et al.*, 1991 *cité par* Lazarova et Manem, 1995). Lazarova *et al.* (1994) ont montré que la concentration de protéines totales dans le biofilm (Protéines_b) était bien corrélée avec le taux de consommation du substrat et l'activité de la chaîne de transport des électrons (cultures nitrifiantes). L'avantage de cette mesure par rapport à la masse sèche ou aux solides volatils attachés est d'être moins influencée par la présence de polymères extracellulaires dans le biofilm.

Lazarova et Manem (1995) ont recommandé d'utiliser la mesure des protéines totales (Protéines_t) ou des lipides comme paramètres pour mesurer l'activité du biofilm, en partie à cause de sa simplicité. En effet, la méthode de Lowry *et al.* (1951) avec la modification de Peterson (Lazarova et Manem, 1995) est beaucoup plus simple et moins coûteuse à utiliser que le dosage d'ATP qui nécessite des réactifs beaucoup plus sensibles et dispendieux. Il est connu que la quantité de Protéines_b fixées sur le support varie selon l'endroit dans la colonne, celle-ci présentant une valeur maximale tout en haut (Ehlinger *et al.*, 1989).

1.8.3 Micro-photographies

Pour arriver à déterminer l'état de santé du biofilm, la coloration par des molécules fluorescentes en fonction de caractéristiques de leur membrane peut être utilisée. Pour y arriver, un mélange de deux colorants est utilisé : le SYTO 9®² et l'iodure de propidium. Les caractéristiques spectrales et la capacité de pénétrer les membranes bactériennes de ces deux colorants diffèrent; utilisé seul, le SYTO 9® colore toutes les bactéries. Par contre, l'iodure de propidium ne pénètre que les bactéries dont la membrane est endommagée, causant une réduction de la fluorescence du SYTO 9® quand les 2 colorants sont présents. Le maximum d'émission lumineuse est à 500 nm (vert) pour le SYTO 9® et à 635 nm (rouge) pour l'iodure de propidium.

1.9 Objectif

Dans cette étude, l'objectif est d'évaluer la faisabilité technique de produire de l'acide propionique à partir de perméat de lactosérum et la capacité de deux paramètres, l'ATP et les protéines, à prédire l'activité du réacteur. Le suivi du biofilm sera fait en y dosant les protéines et l'ATP. Un réacteur anaérobie à lit fluidisé sera utilisé pour obtenir la réduction de la concentration du lactose d'un perméat de lactosérum reconstitué. L'inventaire des bactéries présentes dans le réacteur sera fait au début et à la fin du traitement pour s'assurer de la pertinence des résultats.

² Molecular Probes, Inc. OR, USA.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Bioréacteur

L'Université du Québec à Chicoutimi dispose d'un bioréacteur à lit fluidisé d'échelle expérimentale d'un volume de 4 L. La figure 3 montre l'ensemble des composantes du montage. La colonne principale est composée de sections de verre de diamètre intérieur de 5 cm liées entre elles par des tubes de Teflon™ dans lesquels sont vissés les robinets d'échantillonnage. Le volume de la colonne est de 2,4 L. Le réservoir de décantation est composé de 2 sections de verre de 7,5 cm de diamètre interne, liées entre elles par un tube de Teflon™. L'alimentation en perméat est faite par une pompe Watson-Marlow™ munie d'une tête programmable à piston Fluid-Metering inc.™. La recirculation du liquide dans le système est assurée par une pompe péristaltique Watson-Marlow modèle 503S. Le contrôleur de pH est une pompe à diaphragme Barnant™ modèle HD PH-P muni d'une électrode en verre dépoli située en haut de la colonne. Un agitateur hélicoidal est installé sur le dessus de la colonne et actionné par un moteur « Barnant™ Mixer » modèle 30.

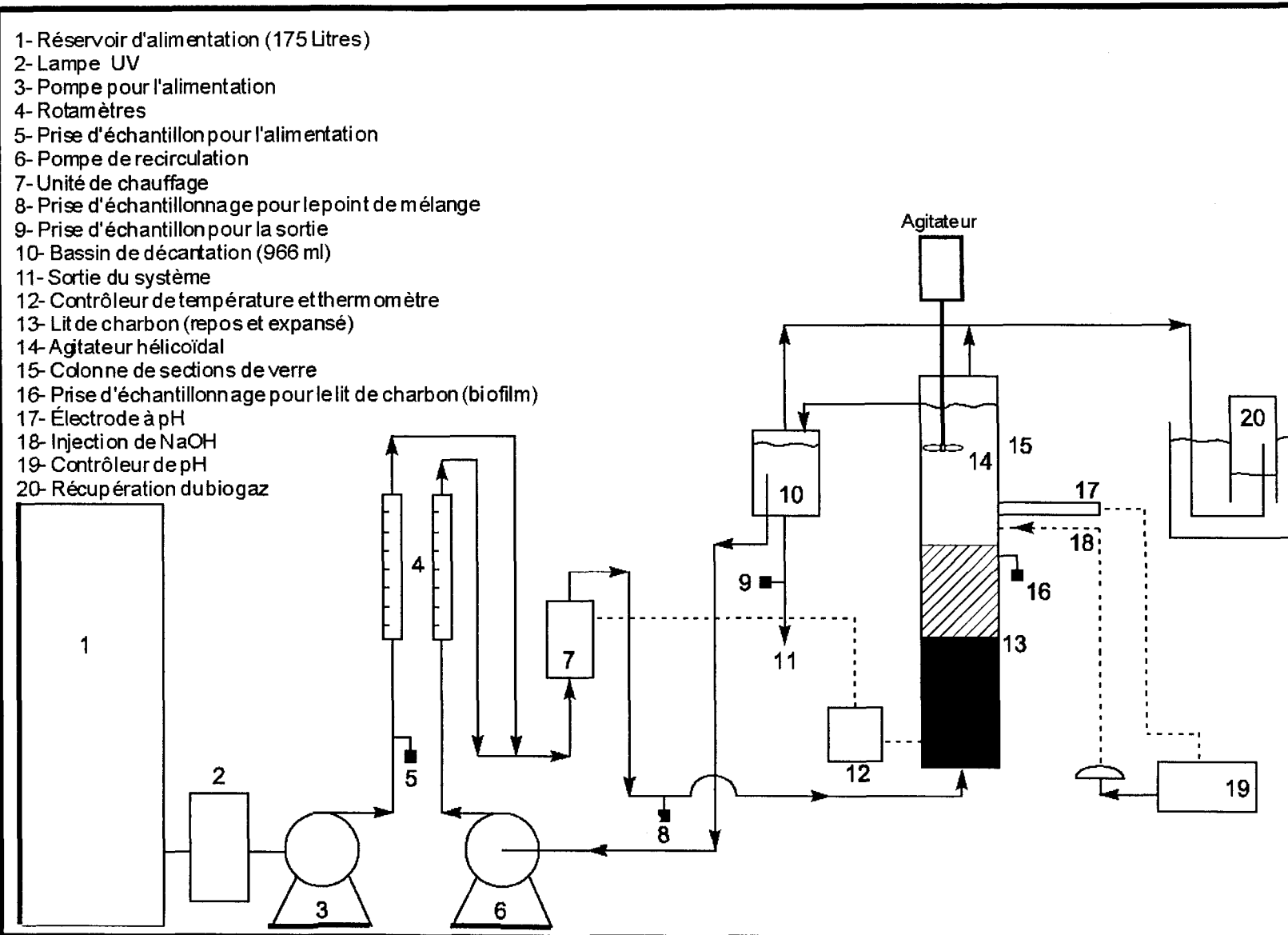


Figure 3. Schéma du montage expérimental.

Des canalisations sont en place pour récupérer les gaz produits dans le réacteur mais aucune mesure de volume ni de qualité des gaz n'a été prise. Un volume de 1296 mL de charbon de diamètre moyen égal à 0,86mm (14-25 mesh) (A.C. Carbon Canada™) a été placée dans la colonne de verre. Ce lit de charbon compte 63% de porosité et la hauteur du lit est d'environ 82,5 cm. La densité des grains de charbon est de $1,17\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La fermentation a été effectuée en mode continu. Le pH a été maintenu constant à 7,0 en injectant du NaOH 1,5N par un contrôleur de pH Barnant™ modèle HP PH-P. La température a été maintenue constante à 30°C par un contrôleur de température Omron™ E5CX.

Le réacteur a été alimenté au taux de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Cette vitesse a pu varier au cours de l'expérience à cause de l'accumulation de matière particulaire dans la canalisation. Le perméat reconstitué a été conservé entre 0 et 4°C dans de grands réservoirs de plastique ($\approx 175\text{ L}$) durant un maximum de 3 jours. La recirculation a été établie à $790\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et les débits ont été mesurés à l'aide de 2 rotamètres. Un rotamètre Labcrest™ modèle Mark III muni d'une bille de verre (*black CD glass*) pour l'alimentation et un rotamètre R-6-25-B muni d'une bille *float SS* (recirculation) sont installés après chacune des pompes. Le rapport recirculation / alimentation se situait à 15,8.

Le temps de résidence a été de 67,8 minutes. Il a été calculé à partir du volume du réacteur et du débit d'alimentation selon l'équation 1 (annexe 6). Le temps de contact du liquide avec le biofilm, selon l'équation 2, a été de 23,9 minutes. Celui-ci est plutôt relatif au volume du lit expansé. Une fois expansé par la circulation ascendante du fluide, le lit de charbon occupait un volume de 1 806 mL (hauteur = 115 cm), soit une expansion de 39% par rapport au lit statique sans écoulement.

$$t_s = \frac{V_t}{D_a} \quad (1)$$

où:

t_s = temps de résidence
 V_t = volume total du réacteur incluant le décanteur
 D_a = débit de l'alimentation

$$t_c = \frac{V_{lit}}{D_a} \quad (2)$$

où:

t_c = temps de contact
 V_{lit} = volume du lit de charbon expansé
 D_a = débit de l'alimentation

2.1.1 Milieu de culture

Il est proposé d'ajouter au perméat brut 100 g de liqueur de macération de maïs (« corn-steep liquor ») par litre de substrat comme source de vitamines, d'oligo-éléments et de protéines. Lors de tests préliminaires, cette concentration a causé des problèmes de mousse dans le réacteur. Nous avons donc réduit la concentration à 5 g·L⁻¹. La teneur moyenne en protéines totales du milieu de

culture (perméat additionné de liqueur de macération de maïs) était de $283,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, dont environ $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sont présents dans le perméat reconstitué (annexe 7).

2.2 Mesures de paramètres de biomasse

La biomasse accumulée (estimée par la concentration de protéines) et la biomasse active (estimée par la concentration d'ATP) attachée sur les grains de charbon étaient mesurées à intervalles de 3 jours à partir du démarrage (inoculation) jusqu'à l'atteinte d'une certaine stabilité des paramètres mesurés indiquant un équilibre du procédé.

2.2.1 Protéines

La méthode de dosage des protéines est présentée à l'encadré 1. Elle a été effectuée selon la méthode de Lowry *et al.* (1951), telle que modifiée par Peterson (Sigma Diagnostics, 1994; Lazarova et Manem, 1995). La première étape de cette procédure est de dissoudre les lipoprotéines insolubles par l'addition d'un détergent anionique, le sulfate de dodécyl, afin de réduire l'interférence causée par les lipides et dénaturer les protéines membranaires. Deuxièmement, une réaction de Biuret est provoquée. Le réactif alcalin, le tartrate cuprique, se lie au niveau des liens peptidiques. Ce complexe réagit avec les acides phosphomolybdien et phosphotungstenien du réactif au phénol de Folin-Ciocalteu pour former une couleur pourpre. Une courbe standard de

spectrophotométrie a été faite à chaque jour où des dosages ont été effectués. Le kit Sigma Diagnostics™³ P5656 contenait les réactifs nécessaires.

Les travaux de McKinley et Vestal (1991) cités par Lazarova et Manem, (1995) ont porté sur la comparaison des diverses méthodes d'analyse des protéines. Ils ont démontré que la méthode de Lowry *et al.* (1951) est la plus sensible et la plus reproductible pour le dosage des protéines totales dans les boues activées traitant les eaux usées.

Encadré 1. Dosage des protéines totales dans les liquides (Protéines_s).

- 1) Prélever 100 μ L d'échantillon.
- 2) Ajouter 900 μ L d'eau.
- 3) Ajouter 0,1 mL de solution de deoxycholate de sodium 1,5 mg/ml (solution DOC) et mélanger.
- 4) Attendre 10 min.
- 5) Ajouter 0,1 mL de solution d'acide trichloroacétique 72% p/v (solution TCA) et mélanger.
- 6) Centrifuger 10 min à vitesse maximale (V_{max}) dans une centrifugeuse de type clinique et jeter le surnageant.
- 7) Dissoudre le culot dans 1 mL de réactif de Lowry en agitant et transférer dans un tube à essai.
- 8) Rincer le tube à centrifuger avec 1 mL d'eau et ajouter dans le tube à essai.
- 9) Bien mélanger et attendre 20 min.
- 10) En agitant rapidement et immédiatement, ajouter 0,5 mL de réactif au phénol de Folin-Ciocalteu.
- 11) Attendre 30 min et mesurer la densité optique (DO) au maximum d'absorbance à 745 nm.

Adapté de Sigma Diagnostics, (1994).

³ P.O. box 14508, St-Louis, Mo, 63178, USA

2.2.2 Dosage des protéines sur support solide

La méthode pour le biofilm fixé sur le charbon a été adaptée de Herbert *et al.* (1971) qui ont proposé de faire d'abord une hydrolyse alcaline des protéines ce qui nous permet de récupérer ensuite les grains pour la pesée. Cette procédure est adaptée dans le cas où le biofilm est épais (Lazarova *et al.*, 1994). Cependant, afin de minimiser l'influence de la réaction de Maillard, qui donne une coloration jaune à la solution, la température et le temps de chauffage ont été modifiés comme proposé par Lowry *et al.* (1951) (encadré 2).

Encadré 2. Dosage des protéines sur support solide (Protéines_b).

- 1) Prélever une quantité connue de grains d'échantillon dans un tube à centrifuger conique.
- 2) Ajouter 500 μ L de NaOH 1N.
- 3) Chauffer 60 min à 80°C dans un bain-marie et refroidir dans l'eau froide.
- 4) Centrifuger 10 min à V_{\max} dans une centrifugeuse de type clinique.
- 5) Transférer le surnageant dans un tube à essai numéroté.
- 6) Récolter, sécher à 105 °C et peser les grains de charbon.
- 7) Ajouter 500 μ L d'eau distillée au tube à essai
- 8) Ajouter 1 mL de réactif de Lowry au tube à essai numéroté.
- 9) Bien mélanger et attendre 20 min.
- 10) En agitant rapidement et immédiatement, ajouter 0,5 mL de réactif au phénol de Folin-Ciocalteu.
- 11) Attendre 30 min et mesurer la DO au maximum d'absorbance à 745 nm.

Adapté de Sigma Diagnostics, (1994) et Lazarova *et al.*, (1994).

2.2.3 ATP

L'adénosine 5' triphosphate (ATP) est une molécule de masse égale à 507 g/mol (Sigma Chemical Co., 1988). La méthode d'extraction au tampon « Tris-ethylene diamine tetra-acetic acid » (Tris-EDTA, annexe 1), d'après Chung et Neethling (1988), a été utilisée telle que modifiée par Imbeault (1997) (encadré 3). La méthode de dosage de l'ATP par luminométrie est celle proposée par Chung et Neethling (1988, Encadré 4).

Encadré 3. Extraction de l'ATP.

- 1) Prélever 0,1 mL d'échantillon et ajouter 10 mL de tampon Tris-EDTA bouillant.
- 2) Couvrir de papier aluminium et chauffer 90-120 s sur la plaque chauffante.
- 3) Refroidir sur bain de glace.
- 4) Compléter le volume perdu à 10 mL avec de l'eau stérile.
- 5) Filtrer sur acétate de cellulose 0,45 μm et congeler le filtrat à -20°C jusqu'à la détermination.
- 6) Sécher les grains de charbon à 105°C et les peser le cas échéant.

Encadré 4. Méthode de dosage de l'ATP tirée de Chung et Neethling (1988).

- 1) Calibrer l'appareil tel qu'indiqué dans le guide de l'utilisateur.
- 2) Mesurer la lumière émise en millivolts pour un mélange de 50 μL d'échantillon de 50 μL de tampon Tris-EDTA (100 μL de « *assay mix* ») (L_t).
- 3) Mesurer la lumière émise en millivolts pour un mélange de 50 μL d'échantillon et de 50 μL de standard d'ATP (100 μL de « *assay mix* ») (L_s). Choisir le standard de façon à ce que la lumière émise soit le double de celle émise par l'échantillon.
- 4) Nettoyer la cuvette avec de l'éthanol 50 % et sécher bien entre chaque essai.
- 5) Calculer la concentration d'ATP en utilisant l'équation 3.

Deux méthodes pour calculer la quantité de lumière émise par la réaction lumineuse sont utilisées dans la littérature. Certains auteurs ont proposé d'utiliser

l'aire sous la courbe pour toute la réaction (Chung et Neethling, 1988; Kucknerowicz et Verstraete, 1979; Karl et LaRock, 1975; Roe et Bhagat, 1982; van der Kooij *et al.*, 1995) mais d'autres ont affirmé que le pic de lumière émise est une mesure plus juste de la concentration initiale d'ATP (Deming *et al.*, 1979). Comme l'intensité de la lumière émise par les réactions ne diminuait pas sensiblement au cours des 6-8 premières secondes de réaction, la valeur utilisée a donc été la hauteur de la courbe du potentiomètre, mesurée 1 seconde après l'injection de l'enzyme (« assay mix »). La concentration d'ATP dans un échantillon (encadré 4) a été calculée en utilisant les calculs de Chung et Neethling (1988) afin d'éliminer les effets d'atténuation de la lumière (« quenching ») (équation 3) :

$$C_u = \frac{V_s}{V_u} \left[\frac{C_s}{(L_s/L_t)^\alpha - 1} \right] \quad (3)$$

où :

- C_u = concentration d'ATP dans l'échantillon ($\mu\text{g/L}$)
- C_s = concentration d'ATP utilisée dans la solution standard ($\mu\text{g/L}$)
- V_u = volume de l'échantillon (μL)
- V_s = volume ajouté de standard additionné de tampon Tris-EDTA (μL)
- L_s = lumière émise par l'échantillon + standard (millivolts)
- L_t = lumière émise par l'échantillon + Tris-EDTA (millivolts)
- α = ordre de réaction (normalement $\alpha = 1$)

L'appareil utilisé est un luminomètre LKB™ modèle 1250 muni d'un agitateur et relié à un potentiomètre-enregistreur LKB™ 2210. Les réactifs (Standard ATP, « assay mix » et ATP « assay mix dilution buffer ») proviennent d'un ensemble disponible chez Sigma Chemical Co.® (kit FL-AA, Adénosine 5' –

Triphosphate (ATP) bioluminescent assay kit). Toutes les manipulations ont été faites en utilisant des embouts de pipettes stériles tel que recommandé par Stanley (1989).

2.2.4 Micro-photographies

Des photographies au microscope à fluorescence ont été faites sur des échantillons de grains de charbon provenant du bioréacteur (annexe 4). Le film utilisé était le Kodak™ Elite chrome 160T. Les grains prélevés à l'aide de pinces ont été placés délicatement dans une préparation composée d'une quantité égale de solution stock 2X de colorant SYTO 9 $6\mu\text{M}$ (vert) et d'iodure de propidium $30\mu\text{M}$ ⁴ (rouge). Après une incubation de 15 minutes, les grains étaient fixés sur une lame de microscope et photographiés en moins d'une heure.

La coloration verte indique que la bactérie est vivante et la couleur rouge que la membrane de la bactérie est altérée. Dans certaines conditions, des bactéries ayant une membrane altérée peuvent être capables de se réparer et de se reproduire; cependant, dans cette expérience, ces bactéries étaient considérées mortes ou inactives. La zone claire (au point, au focus) de chaque photo a été isolée et chaque pixel de cette zone (agrandissement 100X et digitalisée à 2000 pixels par pouce) s'est vu attribuer un indice de luminosité situé entre 0 et 255 pour chacune des composantes rouge, verte et bleue. Les indices en rouge et en vert ont été divisés par l'indice en bleu afin de corriger pour les

⁴ LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit. Molecular Probes, Inc. 97402-9144 Oregon, USA.

écarts d'exposition lors de la photographie; la luminosité en bleue ne pouvant résulter que de l'éclairage lui-même et non pas de la fluorescence. La moyenne de luminosité verte était ensuite comparée à la moyenne de luminosité rouge. Le logiciel utilisé pour ces opérations a été Corel PHOTO-PAINT™⁵

2.3 Microbiologie

2.3.1 Souche bactérienne et inoculation

Le bioréacteur n'a pas été opéré dans des conditions de stérilité. Une désinfection et un inventaire microbiologique ont été faits préalablement à l'inoculation de la bactérie désirée pour cette expérience. Le réacteur a été désinfecté par circulation d'eau de Javel concentrée (hypochlorite de sodium 3%) pendant 2 jours avant l'inoculation.

La bactérie utilisée était *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875. La souche utilisée a été fournie par le Dr Jean-Guy Bisaillon de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Elle était conservée dans un milieu à la viande hachée (Atlas, 1993)

Lors de l'inoculation, l'alimentation du réacteur était fermée de sorte que le système fonctionnait en mode de recirculation seulement. Un volume de 715 mL de culture pure de *P. acidipropionici* a été versé dans le réacteur en guise d'inoculum. L'alimentation du système a été arrêtée pendant 6 heures afin d'éviter

⁵ Corel Corporation, Version 7.373.

le lessivage de l'inoculat. L'alimentation a été ensuite redémarrée à son niveau normal ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

2.3.2 Identification des bactéries isolées

La culture des échantillons des liquides du bioréacteur et les isolements ont été faits sur milieu nutritif (Difco™, nutrient agar, 0001-01), milieu au lactate de sodium (Atlas, 1993), milieu MacConkey (Merck™, MacCONKEY agar, 1.05465) et milieu au sang (Difco™, Blood agar no.2, 0696-17-0). Le repiquage a été fait en fonction de l'aspect, de la couleur et de la taille des colonies sur chacun des milieux. Chaque repiquage était fait en double afin d'en incuber un, en aérobiose, et un autre en anaérobiose (jarre anaérobie et Gaz Pack BBL™).

Nous avons tenté d'identifier chaque isolat à partir du système API mis au point par la société bioMérieux sa™ (France). Puisque le résultat n'était pas satisfaisant, nous avons utilisé le système Crystal™ (BBL). Comme ces outils sont fabriqués pour l'identification des spécimens d'importance clinique et que nos échantillons s'apparentent surtout à la microbiologie environnementale, nous avons fait appel à la compétence des chercheurs de l'INRS-Institut-Armand-Frappier pour en faire l'identification. Une équipe, dirigée par le Dr Richard Villemur, utilise le séquençage du gène de l'ARN ribosomal (ARN_r)_{16S} pour identifier des bactéries d'échantillons environnementaux. Nous avons été invités à travailler dans son laboratoire. Les méthodes utilisées dans le laboratoire du Dr Villemur sont adaptées à partir de techniques standards utilisées en biologie

moléculaire (annexe 2). Les détails de la plupart de ces techniques se trouvent dans le Manuel de laboratoire de Sambrook *et al.* (1989).

2.3.3 Comparaison avec une banque de données

La comparaison des séquences obtenues a été faite à partir de bases de données disponibles sur le réseau Internet. Le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)⁶ met le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) à la disposition de la communauté à cette fin. Cet outil est un ensemble de programmes de recherche de similarité conçu pour explorer toutes les banques de données de séquences disponibles. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage de similarité ayant une signification statistique bien établie.

2.4 Efficacité de dégradation des sucres

La méthode de dosage des hydrates de carbone la plus utilisée dans le traitement des eaux usées est la méthode au phénol-acide sulfurique proposée par Dubois *et al.* (1956). Le mécanisme de cette méthode repose sur l'hydrolyse des polysaccharides qui sont déshydratés en un dérivé furfural⁷ réagissant avec un réactif coloré. Cette méthode est hautement spécifique aux hydrates de carbone et colore les différents sucres d'une intensité égale (Lazarova et Manem, 1995). La méthode détaillée est décrite à l'encadré 5. La méthode est dite des « équivalents glucose » car la courbe standard est mesurée à partir de solutions

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁷ Cycle furane avec fonction aldéhyde

de D-glucose. Un spectrophotomètre Baush & Lomb, Spectronic 21D™ a été utilisé pour les lectures de colorimétrie.

Encadré 5. Dosage des sucres par la méthode des équivalents glucose.

- 1) Prélever 10 mL de liquide.
- 2) Diluer l'échantillon 250 fois pour obtenir une concentration de 20 à 100 mg/L.
- 3) Pipetter 1 mL de solution diluée dans une éprouvette.
- 4) Ajouter 1 mL de phénol 5% sur la paroi de l'éprouvette puis agiter au vortex 30 secondes.
- 5) En agitant sur le vortex, ajouter 5 mL d'acide sulfurique concentré sur la paroi et agiter 30 secondes.
- 6) Attendre 30 minutes.
- 7) Lire l'absorbance à 488 nm.

La réduction de la concentration d'équivalent glucose a été calculée selon l'équation 4 :

$$\frac{(Eqgl_a - Eqgl_s)}{Eqgl_a} \cdot 100 \quad (4)$$

où

$Eqgl_s$ = concentration d'équivalent glucose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) au point de sortie

$Eqgl_a$ = concentration d'équivalent glucose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) au point d'alimentation

2.5 Acides organiques

Le dosage des acides organiques présents dans les échantillons de l'alimentation, au point de mélange et à la sortie du réacteur, a été effectué par chromatographie en phase gazeuse.

2.5.1 Extraction

L'extraction a été faite de façon discontinue en utilisant l'éther diéthylique comme solvant (encadré 6). Les acides suivants ont été recherchés : acide acétique, acide propionique, acide iso-butyrique et acide n-butyrique.

Encadré 6. Extraction des acides organiques.

- 1) Prélever 50 mL d'échantillon.
- 2) Acidifier à pH=2 avec du H_2SO_4 50%.
- 3) Placer dans une ampoule à décantation.
- 4) Ajouter 50 mL d'éther.
- 5) Agiter doucement au début pendant une minute en faisant sortir le gaz à chaque agitation.
- 6) Récupérer la phase organique avec une pipette de 25 mL et noter le volume récupéré.
- 7) Répéter les étapes 4 et 5, trois fois en agitant de plus en plus vigoureusement.
- 8) Ajouter du MgSO_4 jusqu'à ce que des particules solides soient en suspension. Ceci indique qu'il n'y a plus d'eau dans la phase organique. Un dépôt au fond indique qu'il y avait de l'eau dans la phase organique mais l'absence de particules en suspension indique qu'il reste des traces d'eau dans le mélange.

Lorsque la formation d'une émulsion était trop importante, nous ajoutions au mélange l'équivalent du bout d'une spatule de NaCl. Ceci augmente la force ionique du mélange et favorise la séparation des phases (A. Pichette, UQAC, comm. pers.).

2.5.2 L'étalonnage interne

La standardisation des calculs est basée sur la méthode d'étalonnage interne expliquée dans Tranchant *et al.* (1995). Cette méthode élimine les erreurs liées à l'introduction de l'échantillon (volume injecté, vitesse d'injection) et informe

sur la qualité de l'injection et sur le bon fonctionnement du chromatographe à chaque injection. La méthode nécessite l'introduction d'une tierce substance, de nature similaire aux produits que l'on veut doser. Cet étalon interne doit être introduit à la fois dans les solutions de calibrage et de dosage. Nous avons choisi d'utiliser l'acide iso-valérique (pentanoïque) pour les besoins de cette recherche. Dans la phase de calibrage, nous avons calculé les facteurs de réponse relatifs de chaque substance à doser (les 4 acides) par rapport à l'étalon (équation 5, Tranchant *et al.*, 1995). Nous avons pris soin de calculer les coefficients de réponse (K) pour des concentrations similaires à celles retrouvées dans les échantillons (annexe 3) et ce à chaque jour où étaient effectués des dosages chromatographiques.

$$K_{i/e} = \frac{m_i \cdot A_e}{m_e \cdot A_i} \quad (5)$$

où

$K_{i/e}$ = coefficient de réponse
 m_i = masse de substance pure contenue dans la solution de calibrage
 m_e = masse d'étalon interne contenue dans la solution de calibrage
 A_i et A_e = aires respectives du soluté et de l'étalon

Une programmation de température est nécessaire pour avoir une résolution maximale des pics d'un chromatogramme. Cette programmation a été fixée comme ceci : 4 minutes à 90°C, augmentation de 16°C • min⁻¹ jusqu'à 110°C. Un chromatographe Hewlett-Packard modèle 5700A avec injection "on-column" muni d'un détecteur à ionisation de flamme a été utilisé. La colonne utilisée était en Nickel GP10% SP-1200/1% H₃PO₄ on 80/100 Chromosorb W/AW

packing (Supelco™, Sigma-Aldrich ® Canada, Ltd). Les signaux étaient acheminés à un intégrateur Hewlett-Packard 3390-A. La seringue était préparée tel que recommandé dans le guide d'utilisation du chromatographe. La température du bloc d'injection était de 200°C et celle du détecteur de 150°C.

2.6 Traitement statistique

La statistique est un ensemble de méthodes mathématiques utilisées comme aide à la décision. Comparativement à l'observation simple des graphiques, la statistique a l'avantage d'être objective. L'utilisation de la statistique, en conjonction avec les connaissances biologiques, nous permet de déterminer si un traitement a un effet ou si la variabilité des résultats n'est que l'objet du hasard. Les techniques statistiques qui ont été privilégiées dans cette étude sont les analyses de corrélation simple et de régression multiple. A chaque analyse de corrélation on obtient un coefficient de corrélation (R) et un résultat de test statistique (P). Le premier indique l'importance de la relation (1=parfaitement linéaire, 0=aléatoire, son signe indique si la pente est positive ou négative) tandis que le deuxième nous informe sur le niveau de signification de cette relation (si $P > 0,05$, la relation n'est pas significative et si $P \leq 0,05$, elle l'est). Ces méthodes sont largement utilisées et bien adaptées aux problèmes rencontrés dans cette étude (Dr Pascal Sirois, UQAC, comm. pers.). Pour avoir le détail de ces méthodes, le lecteur est invité à consulter les ouvrages suivants : Sherrer (1984),

Sokal et Rohlf (1981) ou Steel *et al.* (1997). Le logiciel utilisé a été SPSS pour Windows^{TM8}.

⁸ SPSSTM Inc. Version 6.1.3.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Les données présentées sur les figures résultent de méthodes d'analyse décrites dans la section Matériel et méthodes et proviennent d'un seul échantillon. La plupart du temps, les analyses ont été répétées deux ou trois fois pour s'assurer de l'exactitude des résultats. Des exemples de calcul pour chacune des méthodes sont présentés à l'annexe 5.

3.1 Inventaire microbiologique

Nous avons tenté d'obtenir une culture pure de *P. acidipropionici* dans le bioréacteur. Des inoculations massives ont été effectuées (16% v/v approx.) à trois reprises (jours 0, 3 et 12). À la suite des inoculations, les inventaires microbiologiques de contrôle de qualité effectués aux jours 15, 51 et 84, n'ont pas permis d'isoler à nouveau *P. acidipropionici* dans les liquides du réacteur ou dans le biofilm. Les taxons isolés et identifiés lors des quatres inventaires sont présentés au tableau 4.

Tableau 4. Liste des taxons identifiés lors des inventaires microbiologiques du bioréacteur.

Taxon	Jour 0	Jour 15	Jour 51	Jour 84	Méthode
Actinomycète			X		ARN _r 16S
<i>Bacillus</i> sp.			X		ARN _r 16S
<i>Burkholderia</i> sp.		X			ARN _r 16S
<i>Citrobacter freundii</i>		X			API TM (bioMérieux)
<i>Enterobacter amnigenus</i>	X				ARN _r 16S
<i>Enterococcus</i> sp.		X	X		ARN _r 16S
<i>Enterococcus casseliflavus/galinarum</i>			X		Crystal TM (BBL)
<i>Enterococcus faecium</i>			X		API (bioMérieux), Crystal TM (BBL)
<i>Klebsiella oxytoca</i>		X	X	X	API (bioMérieux), Crystal TM (BBL)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		X	X	X	API (bioMérieux), Crystal TM (BBL)
<i>Lactobacillus</i> sp.	X	X		X	ARN _r 16S
<i>Leuconostoc</i> sp.				X	ARN _r 16S
<i>Pseudomonas</i> sp.	X				ARN _r 16S
<i>Streptococcus</i> sp.		X			ARN _r 16S
<i>Streptococcus uberis</i>		X			Crystal TM (BBL)

Trois taxons ont été retrouvés avant l'inoculation du réacteur avec *P. acidipropionici*, neuf taxons au jour 15, sept au jour 51 et quatre au jour 84, suivant l'inoculation. À la suite de plusieurs échecs d'identification des spécimens isolés du réacteur par les méthodes largement utilisées en laboratoire médical, APITM (BioMérieux) et CrystalTM (BBL), nous avons tenté de les identifier par le séquençage du gène de l'ARN_r 16S. Cette méthode s'est avérée être une méthode beaucoup plus efficace pour l'identification d'échantillons de provenance inconnue ou de l'environnement. Par ailleurs, aucun organisme eucaryote (mycète, protozoaire) n'a été observé ou isolé du bioréacteur.

3.2 Utilisation du sucre

La donnée du jour 9 a été supprimée pour l'analyse à cause de la trop grande incertitude quant à la méthode (annexe 5). Dans chacune des figures de cette section, les zones ombragées verticales représentent le moment où des accidents sont survenus dans le déroulement de l'expérience (voir section 3.4). Le taux d'utilisation des sucres par le biofilm a été calculé comme suit :

Taux de réduction des sucres = Débit massique de sucre entrant - Débit massique de sucre sortant.

$$\partial r = F(S_{\text{alim}} - S_{\text{sortie}}) \quad (6)$$

où

$\partial r =$ Taux de réduction des sucres, $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$
 $F =$ Débit d'alimentation, $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$
 S_{alim} et $S_{\text{sortie}} =$ Concentrations de sucres à l'alimentation et à la sortie, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Sur la période relativement stable d'opération du réacteur, soit du jour 31 au jour 60, la valeur moyenne de ∂r était de $43,9 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$. Cette valeur peut aussi être exprimée en fonction de la quantité de charbon où ∂r était de $3,39\text{E-}8 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ de support, mais ces valeurs ne sont pas corrélées à aucune autre.

La moyenne de réduction de la concentration d'équivalents glucose sur toute la durée de l'expérience (moins la donnée du jour 9, section 3.2) est de 78% (figure 4a). Par contre, après seulement quelques jours de fonctionnement ou quelques jours après un accident, nous avons obtenu une efficacité de

dégradation des sucres de plus de 90 % (jours 12, 36 et 73). Les périodes de moindre efficacité suivent des événements de perturbation du réacteur soit l'arrêt des pompes au jour 21 et l'introduction d'air dans le réacteur au jour 63. Par contre, nous avons pu remarquer que la capacité de dégradation des sucres par le réacteur s'était rétablie rapidement à la suite de ces événements.

La production d'acides gras volatils du réacteur est marquée par une concentration importante d'acide acétique (figure 4b) et d'acide iso-butyrique. L'acide propionique est aussi produit mais en faible quantité.

La charge de DCO appliquée au réacteur a été estimée d'après les calculs d'équivalents glucose du milieu de culture dont la concentration moyenne (S_{Alim} moyen) était de $17,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. En utilisant le facteur d'équivalence 1,067 proposé par Yu et Pinder (1993) (tableau 5), nous avons estimé cette charge⁹ à $1,321 \text{ kg DCO} \cdot \text{d}^{-1}$. Le réacteur a eu une efficacité moyenne de réduction de cette DCO de $50 \pm 11\%$ à partir du jour 30 (figure 4c).

Tableau 5. Équivalences pour le calcul de la DCO.

Produit	Equivalent DCO
Lactose	1,067 (Yu et Pinder, 1993)
Acide acétique	1,066 (Yilmazer et Yenigün, 1999)
Acide propionique	1,512 (Yilmazer et Yenigün, 1999)
Acide butyrique	1,816 (Yilmazer et Yenigün, 1999)

⁹ Le milieu de culture contenait d'autres sources de DCO que le lactose telle la liqueur de macération de maïs. Cette valeur est une ESTIMATION de la DCO.

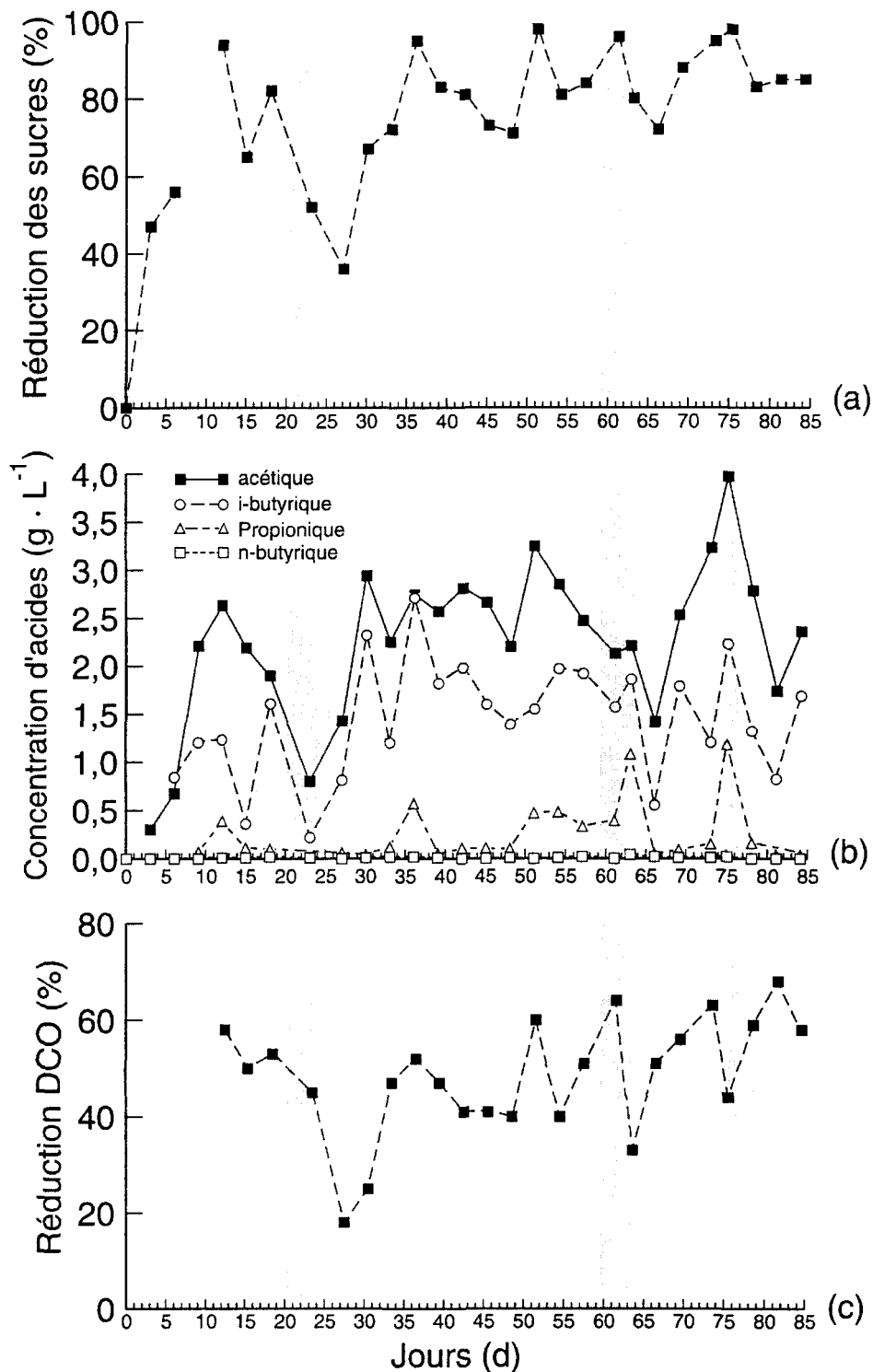


Figure 4. Évolution temporelle de (a) réduction de la quantité de sucre entre l'alimentation et la sortie du réacteur. (b) concentration d'acides organiques à la sortie. (c) efficacité de réduction de la DCO calculée à partir des deux premières données. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus pendant l'expérience.

3.3 Le biofilm

Le lit de charbon, mis en expansion par le passage du perméat de bas en haut dans la colonne, avait une hauteur variable selon l'épaisseur du biofilm. Une quantité variable de matière blanchâtre de composition indéterminée formait des flocons dans le liquide au-dessus du lit de charbon et autour des grains de charbon. L'accumulation de cette matière donnait du volume au lit de charbon. Cette boue apparaissait lors des périodes de réduction maximale des sucres. Certains des taxons retrouvés dans le réacteur (tableau 4) qui sont reconnus pour synthétiser d'importantes quantités de polymères extracellulaires (ex. *Klebsiella*) auraient pu causer cette accumulation.

3.3.1 ATP

La concentration d'ATP est considérée comme étant une mesure de la viabilité des cellules bactériennes. La figure 5 montre que l'ATP est concentrée en majeure partie dans le biofilm (ATP_b ; $0,01-0,1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) tandis qu'une partie se trouve dans les bactéries en suspension, non attachées au support de charbon (ATP_s ; $0,002-0,01 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$).

3.3.2 Protéines

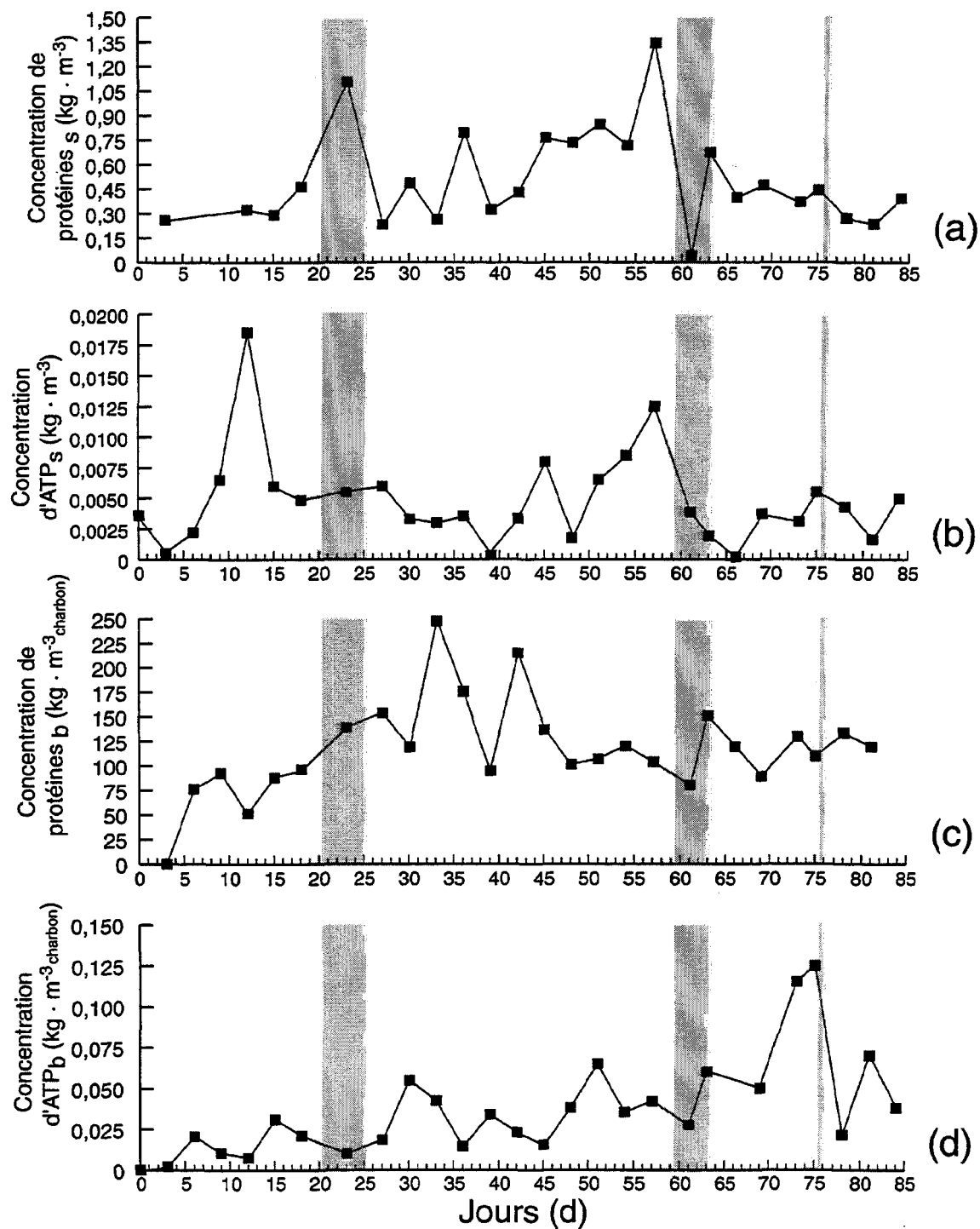


Figure 5. Évolution temporelle des concentrations de protéines en suspension (Protéines_s) (a), de l'ATP en suspension (ATP_s) (b), des protéines du biofilm (protéines_b) (c) et de l'ATP du biofilm (ATP_b) (d) par m^{-3} de charbon (support). Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience. Les échelles sont différentes d'un graphique à l'autre.

Une quantité importante de protéines se trouve attachée au support de charbon. Le biofilm contient donc la grande majorité des protéines (Protéines_b ; 50-250 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$). La valeur de Protéines_s (0,2-1,3 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) ne représente pas seulement les bactéries présentes en suspension. Le substrat de fermentation est additionné d'un supplément d'azote (liqueur de macération de maïs) qui peut se trouver sous forme protéique et venir faussement augmenter l'estimation de la biomasse en suspension.

3.3.3 Micro-photographies

Le biofilm présent sur les grains de charbon a été photographié. Quatorze photos ont été analysées pour leur luminance en chaque composante rouge, verte et bleue (RGB) (tableau 6). Les deux composantes qui nous intéressent sont les indices de dominance rouge (IDR) et de dominance verte (IDV). Ils sont issus de la division de la luminance rouge/verte par la luminance bleue pour corriger pour les différences de luminosité. Une division de l'un par l'autre nous donne une valeur de dominance du rouge sur le vert. Une valeur supérieure à 1 indique que le rouge est plus présent que le vert pour les 4 journées analysées. Les valeurs de la figure 5, à partir desquelles on a établi un rapport simple (équation 7), sont comparées au rapport IDR/IDV par un test de Student. Le résultat de ce test ne nous permet pas d'établir une relation entre les deux séries de données, mais il semble que l'augmentation graduelle de la concentration d' ATP_b soit en relation avec l'augmentation graduelle de la quantité de vert dans les images.

$$\text{Rapport } \frac{\text{Protéines}_b}{\text{ATP}_b} = [\text{Protéines}_b] \cdot [\text{ATP}_b]^{-1} \quad (7)$$

Tableau 6. Résultats d'analyse des composantes (RGB) des photos de biofilm.

Jour	Luminance rouge (moyenne)	Luminance verte (moyenne)	Luminance bleue (moyenne)	Indice de dominance rouge	Indice de dominance verte	Rapport IDR/IDV	Rapport $\frac{\text{Protéines}_b}{\text{ATP}_b}$	Nombre de photos	Nombre de pixels analysés
11	76,0	52,0	28,5	2,67	1,82	1,46	8750	2	4,75 E5
37	84,8	66,3	31,5	2,69	2,10	1,28	7619	4	1,00 E6
48	66,5	39,4	27,0	2,45	1,46	1,68	2500	4	2,82 E6
66	79,0	59,5	30,5	2,48	1,82	1,32	2000	4	1,02 E6

3.4 Impact des accidents sur la concentration d'ATP et de protéines attachées.

Trois accidents de fonctionnement ont eu lieu lors de l'expérience. Aux jours 20, 21 et 26, les pompes d'alimentation et de recirculation ont arrêté de fonctionner pour des durées inconnues, mais inférieures à 24h, à cause de coupures d'électricité hors de notre contrôle. Aux jours 60 et 63, un volume indéterminé d'air a été introduit dans le réacteur par la pompe d'alimentation. Au jour 76, une panne d'électricité, d'une durée de 12 heures, a aussi affecté le fonctionnement du montage.

L'arrêt des pompes a eu un effet sur la concentration d'acides retrouvée dans l'effluent. Des baisses remarquables sont visibles sur la figure 4b pour les acide acétique et iso-butyrique. Cet accident a aussi eu un effet sur le taux de

dégradation des sucres (figure 4a). L'introduction d'air dans le réacteur aux jours 60 et 63 semble aussi avoir eu un effet important sur le fonctionnement général du réacteur. La dégradation des sucres a diminué de façon importante, la production d'acides a aussi diminué de 70-75% (figure 4). La panne d'électricité survenue au jour 76 ne semble avoir affecté négativement que la production d'acides. Le temps de rétablissement du réacteur à des valeurs ayant cours avant ces accidents est de l'ordre de 5 jours mais la période entre deux échantillons étant de 3 jours, seule une approximation peut en être faite.

3.5 Acides organiques volatils

3.5.1 Acide acétique

Cet acide est celui qui a été produit en plus grande quantité dans le réacteur. La concentration d'acide acétique a augmenté rapidement dès la mise en fonction du réacteur (figure 6) et s'est maintenue autour de $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Des baisses de concentration suivent chacun des accidents.

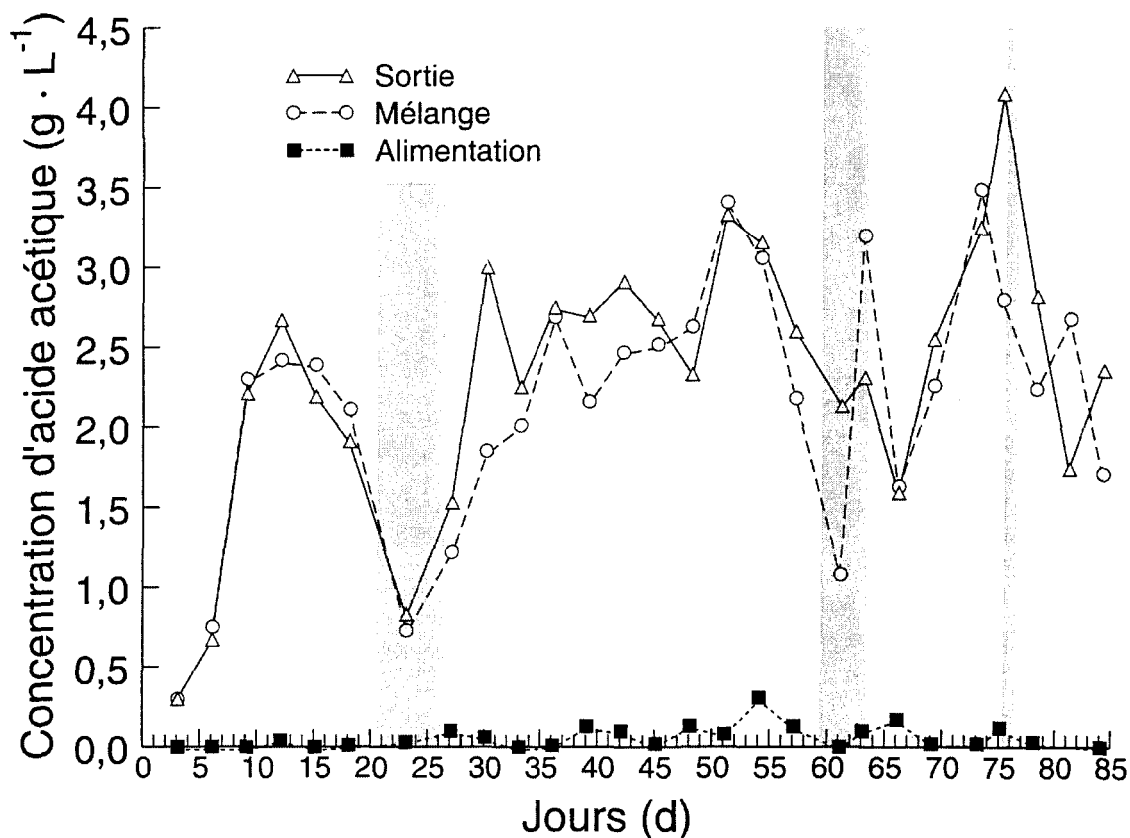


Figure 6. Évolution temporelle de la concentration d'acide acétique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.

3.5.2 Acide iso-butyrique

L'acide iso-butyrique est le deuxième en abondance dans le réacteur (figure 7). Sa concentration semble être affectée négativement par chacun des accidents survenus au cours de l'expérience.

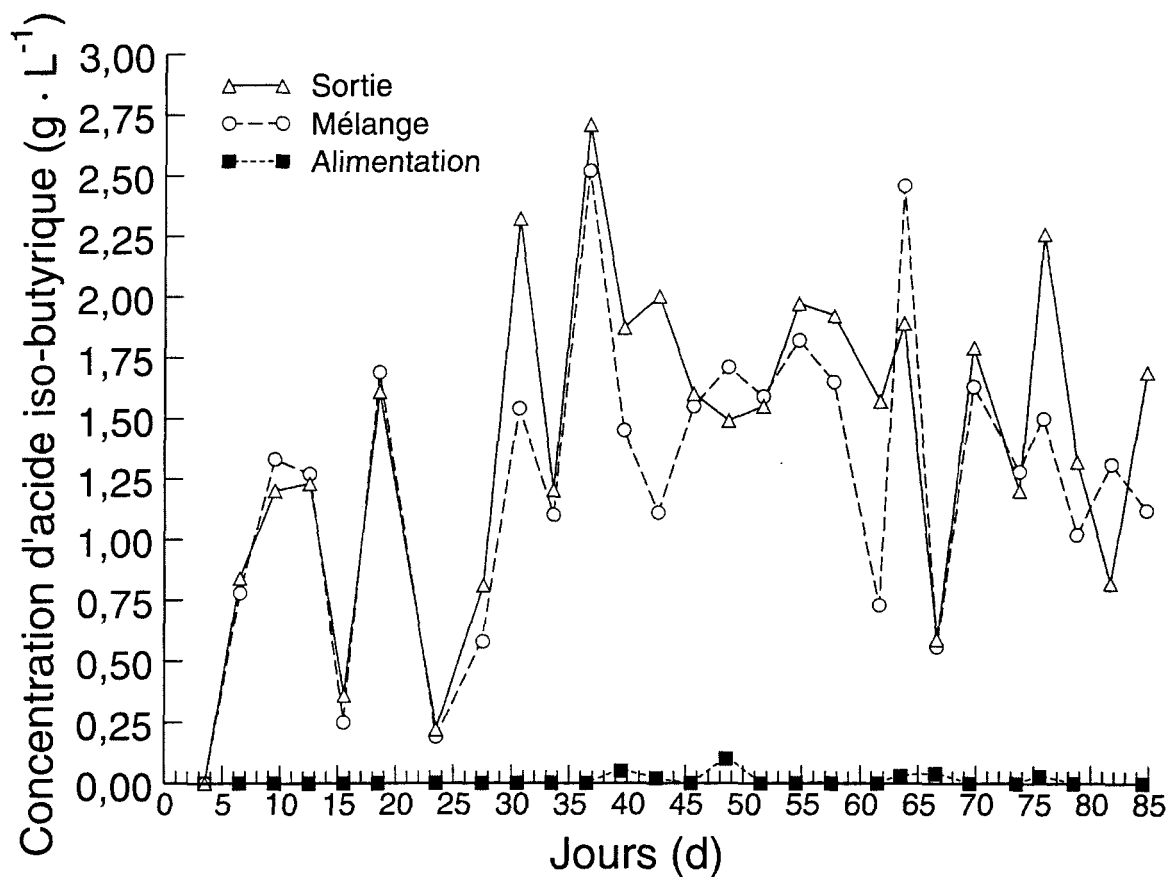


Figure 7. Évolution temporelle de la concentration d'acide iso-butyrique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.

3.5.3 Acide propionique

L'acide propionique n'est présent qu'en faible quantité dans le réacteur (figure 8). Cette faible concentration est un indice nous permettant de croire que *P. acidipropionici* ne s'est pas implanté dans le réacteur puisque cet acide est le principal produit de la fermentation par cette bactérie. L'introduction d'air dans le réacteur entre les jours 60 et 63 a eu pour effet d'augmenter sensiblement la présence de cet acide. Sa concentration ne s'est pas stabilisée et s'est presque éteinte à la fin de l'expérience.

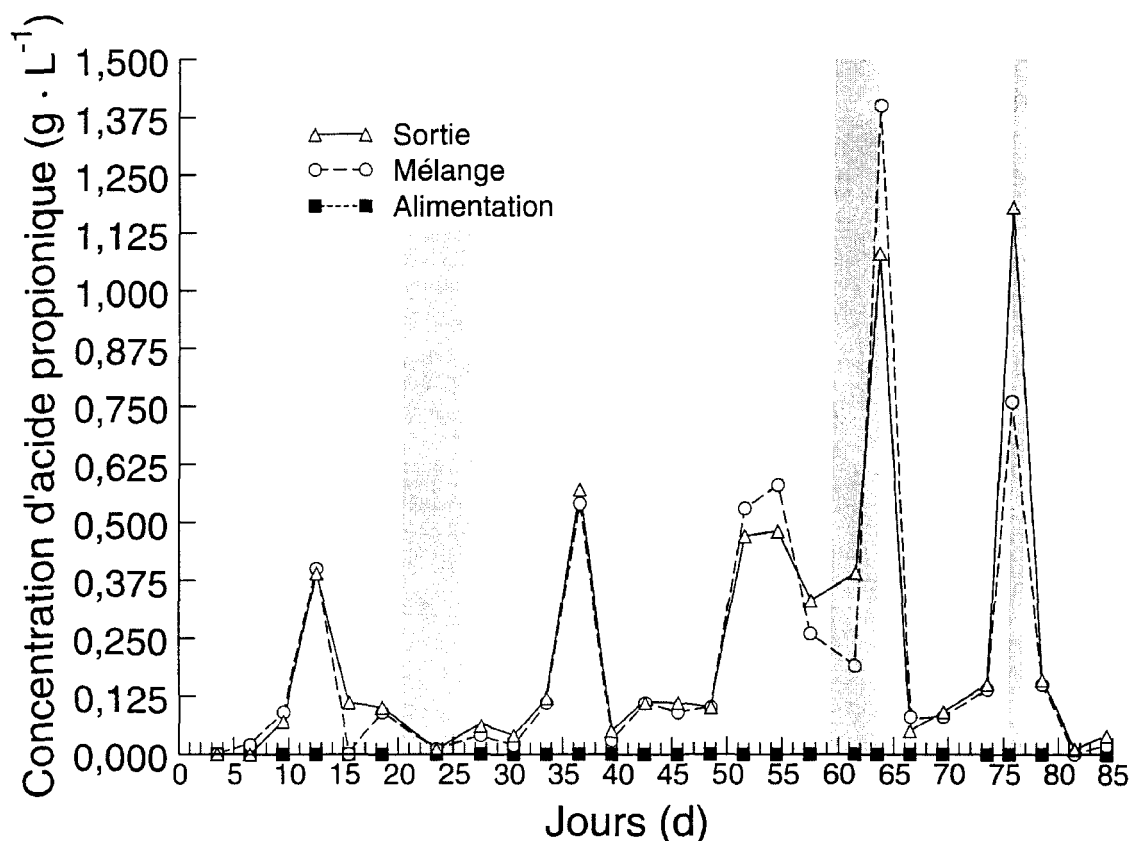


Figure 8. Évolution temporelle de la concentration d'acide propionique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.

3.5.4 Acide n-butyrique

L'acide n-butyrique est présent dans le bioréacteur de façon irrégulière (figure 9). Il est le moins abondant des quatre acides dosés.

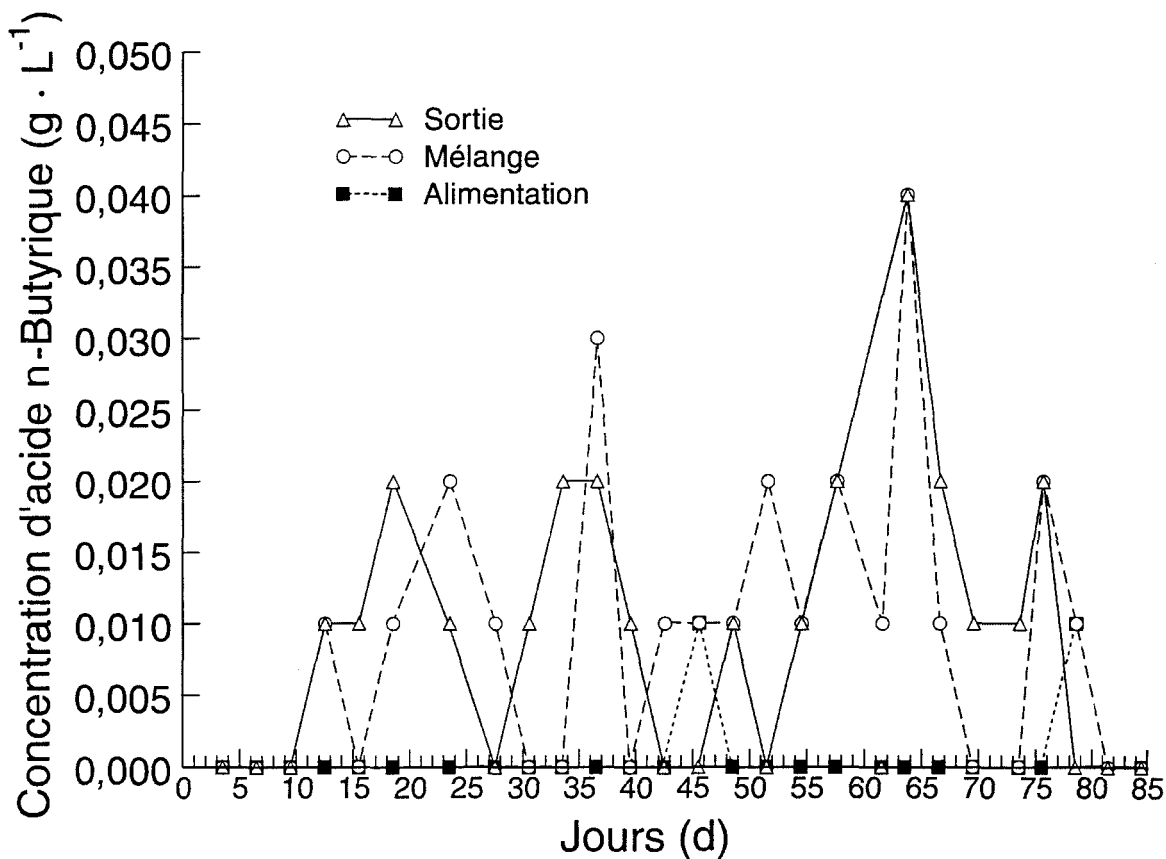


Figure 9. Évolution temporelle de la concentration d'acide n-butyrique à trois points d'échantillonnage dans le réacteur. Les zones ombragées verticales représentent les accidents survenus au cours de l'expérience.

3.6 Interprétation des résultats

3.6.1 Corrélations

Afin de déterminer lequel ou lesquels des facteurs suivants, ATP_s , ATP_b , $Protéines_s$, ou $Protéines_b$, expliquent le mieux la dégradation des sucres et la

production d'acides gras volatils, nous avons comparé les données en utilisant la méthode du coefficient de corrélation de Pearson¹⁰ (tableaux 7 à 10). La régression multiple a ensuite été appliquée aux relations afin d'en déterminer les paramètres (équations 7 à 12). Rappelons que, pour les analyses utilisant la concentration d'équivalents glucose, la donnée du jour 9 a été retirée du modèle à cause de sa valeur trop improbable (annexe 5).

Tableau 7. Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre quelques variables étudiées.

	Concentration d'acide acétique	Concentration d'acide propionique	Concentration d'acide iso-butyrique	Concentration d'acide n-butyrique
ATP _b	0,614***	0,494**	0,357	0,340
ATP _s	0,281	0,206	0,147	-0,015
Protéines _b	0,433*	0,149	0,434*	0,306
Protéines _s	0,080	0,197	0,244	0,313

* P≤0,05

** P≤0,01

***P≤0,001

Les acides acétique et propionique sont corrélés avec la quantité d'ATP du biofilm (R=0,614 et R=0,494). De plus, la concentration d'acide acétique est aussi corrélée avec la quantité de protéines du biofilm (Protéines_b) (R=0,433). La concentration d'acide iso-butyrique n'est corrélée qu'avec la quantité de Protéines_b (R=0,434). Cette analyse ne montre aucune relation pouvant expliquer la concentration d'acide n-butyrique (le moins abondant). Les bactéries qui composent le biofilm (concentration d'ATP et de protéines) sont donc en relation

¹⁰ Le coefficient de corrélation de Pearson (R), est une mesure de l'association linéaire entre 2 variables. La valeur peut varier de -1 (relation parfaite à pente négative) et +1 (relation parfaite à pente positive). Une valeur de 0 indique qu'il n'y a pas de relation entre les variables.

avec la production des acides acétique et propionique. La relation entre la concentration d'acide propionique et le biofilm ne s'exprime que par l'ATP_b.

La possibilité de délai dans la réponse entre deux paramètres a aussi été abordée. Nous avons testé l'hypothèse que les paramètres explicatifs (ATP_b, ATP_s et Protéines_b) puissent avoir un délai dans leur effet sur la production d'acides ou de réduction des sucres. Des délais de plus ou moins 3 et 6 jours ont été testés mais dans tous les cas, les corrélations étaient moins bonnes ou tout simplement absentes par rapport à celles exprimées dans le tableau 7.

3.6.2 Explication de la réduction des sucres

Le perméat de lactosérum contient 80 à 84% de lactose (annexe 7). Ce sucre sert de substrat énergétique pour la fermentation par les bactéries. Nous avons cherché le paramètre le plus corrélé au pourcentage de réduction des sucres afin de trouver lequel des facteurs mesurés serait la plus susceptible de d'en expliquer la variation. Les résultats du tableau 8 montrent que le seul facteur variant de façon similaire à la réduction des sucres est l'ATP_b. Le coefficient de corrélation entre les données prédites par le modèle explicatif de régression linéaire (équation 7) et les valeurs observées est de $R = 0,509$ (figure 10).

Tableau 8. Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre l'efficacité de réduction des sucres et les facteurs mesurés.

	Réduction des sucres	ATP _b	ATP _s	Proteines _b	Protéines _s
Réduction des sucres	1	0,509**	0,203	0,328	0,026

* P≤0,05

** P≤0,01

***P≤0,001

L'équation de prédiction obtenue à partir du calcul de régression entre la réduction des sucres et la concentration d'ATP du biofilm est montrée à l'équation 8.

$$\text{Réduction des sucres (\%)} = (1,848 \cdot [\text{ATP}_b]) + 60,9\% \quad R=0.509; R^2=0.259^{11} \quad (8)$$

où

[ATP_b] = concentration d'ATP du biofilm (moles•m⁻³ de support)

3.6.3 Explication de la production d'acides gras volatils

Pour les fins de modélisation, nous avons tenté de trouver la variable la plus susceptible d'expliquer la production d'acides organiques à courte chaîne. Le tableau 9 contient les valeurs de corrélation entre la somme massique des concentrations des quatre acides dosés avec les quatre variables explicatives. Ces valeurs révèlent que les deux facteurs relatifs au biofilm (ATP_b; Protéines_b) sont corrélés avec la somme des concentrations des quatre acides. Cette relation est intéressante puisque les deux variables explicatives sont indépendantes l'une de l'autre, c'est-à-dire que la concentration d'ATP_b et de Protéines_b expliquent

ensemble la variable (équation 9) mais qu'elles ne sont pas corrélées entre elle (tableau 10).

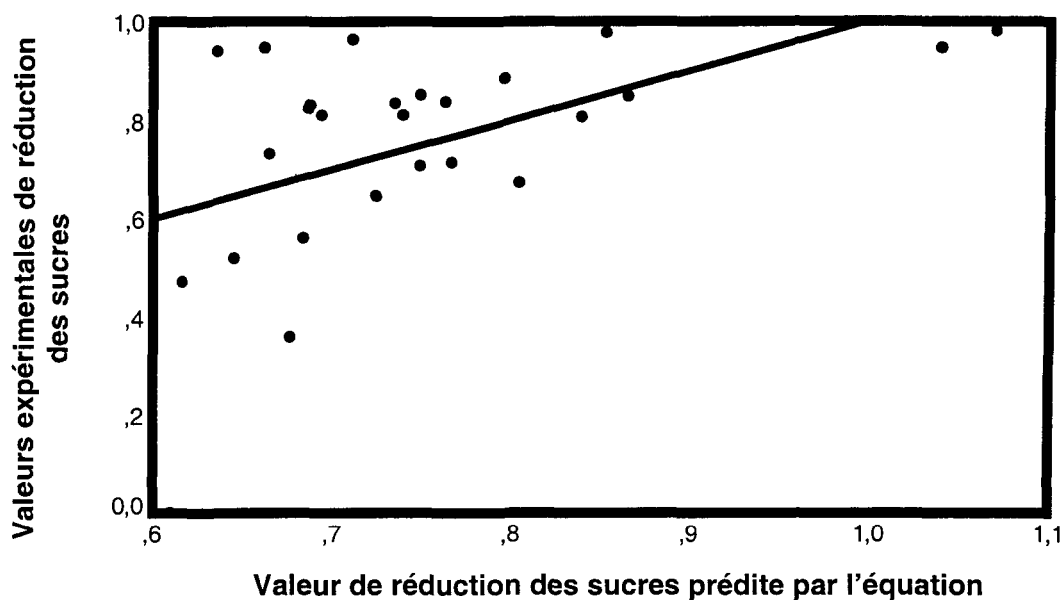


Figure 10. Relation existant entre la valeur réelle de réduction des sucres et la valeur prédite par le modèle explicatif (équation 8).

Tableau 9. Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre la somme massique des concentrations des 4 acides dosés et les variables explicatives à l'étude.

	Somme des concentrations des 4 acides dosés	ATP _b	ATP _s	Proteines _b	Protéines _s
Somme des concentrations des 4 acides dosés	1	0,564**	0,246	0,434*	0,187

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

*** $P \leq 0,001$

¹¹ R² représente le pourcentage de la variation totale expliquée par la ligne de régression. (somme des carrés des écarts à la courbe + somme des carrés des écarts à la moyenne). Pour plus d'information sur la signification de cette valeur le lecteur est invité à consulter les ouvrages de statistique cités à la section 2.6.

Tableau 10. Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre les différentes variables explicatives.

	ATP _b	ATP _s	Protéines _b	Protéines _s
ATP _b	1	-0,154	0,220	-0,034
ATP _s		1	-0,111	0,323
Protéines _b			1	0,108
Protéines _s				1

* P≤0,05

** P≤0,01

***P≤0,001

Le modèle obtenu par analyse de régression multiple (équation 9) indique que le coefficient de corrélation entre les données prédites par l'équation 9 et les données réelles est de R=0,654, ce qui est relativement élevé.

$$\sum [acides] = 13,670 \cdot [ATP_b] + 0,011 \cdot [Protéines_b] + 1,57 \quad R^2=0,429^{**12} \quad (9)$$

Où

[] = concentration de l'espèce

3.6.3.1 Acide propionique

Séparément, la variation sur une seule variable, ATP_b, explique la variation de la concentration d'acide propionique à 24% (équation 10).

$$[Acide\ propionique] = 2,486 \cdot [ATP_b] + 0,047 \quad R^2=0,244^{**12} \quad (10)$$

¹² *P≤0,05 **P≤0,01 ***P≤0,001

3.6.3.2 Acide iso-butyrique

Le facteur ayant expliqué le mieux la variation de concentration d'acide iso-butyrique est la concentration de Protéines_b contenues dans le biofilm (équation 11).

$$[Acide\ iso-butyrique] = 5,85E-3 \cdot [Protéines_b] + 0,676 \quad R^2=0,189^* \quad (11)$$

3.6.3.3 Acide acétique

Parmi les quatre acides organiques dosés, l'acide acétique est le plus adéquatement prévisible par les équations de régression ($R^2=0,619$). Le modèle contenant les variables « ATP_b », « Protéines_b » et « ATP_s » est celui qui prédit le mieux sa concentration (équation 12). Par contre, un modèle plus simple et comprenant seulement deux facteurs « ATP_b » et « d'ATP_s », atteint $R^2=0,501$ (équation 13).

$$[Acide\ acétique] = 8,894 \cdot [ATP_b] + 46,612 \cdot [ATP_s] + 0,006 \cdot [Protéines_b] + 0,404 \quad R^2=0,619^{***} (12)$$

$$[Acide\ acétique] = 9,996 \cdot [ATP_b] + 43,354 \cdot [ATP_s] + 1,051 \quad R^2=0,501^{***} (13)$$

3.6.3.4 Acide n-butyrique

Aucune relation entre la production d'acide n-butyrique et les facteurs mesurés n'a pu être établie (tableau 7).

3.6.4 Relation ATP-Protéines

La relation entre les concentrations d'ATP (ATP_b et ATP_s) et de protéines ($Protéines_b$ et $Protéines_s$) est étudiée par les calculs de corrélation rapportés au tableau 10. Cette analyse démontre qu'aucun lien significatif ($P > 0,05$) n'existe entre les quantités d'ATP et de protéines totales, qu'elles soient attachées au support ou en suspension dans le mélange. Les quatre variables explicatives utilisées dans cette étude sont donc indépendantes les unes des autres.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Inventaire microbiologique

L'absence de *P. acidipropionici* dans les différents inventaires est surprenante et la faible quantité d'acide propionique confirme son absence du système. Les résultats démontrent que le consortium présent à la fin de la fermentation était surtout composé de *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, de *Leuconostoc* sp et de *Lactobacillus* sp. Ces bactéries ont comme propriété commune de pouvoir faire des agrégats. *Leuconostoc* et certaines espèces de *Lactobacillus* ont aussi un métabolisme hétéro-fermentatif donnant, lors de la fermentation du glucose, de l'éthanol en majorité, de l'acide lactique et du CO₂; la présence de ces produits n'a pas été mesurée. Deux hypothèses sont donc émises pour expliquer l'absence de *P. acidipropionici* : **1-** la bactérie ne s'est pas attachée au support et a été délogée du système; **2-** la bactérie ne croît pas assez vite sous les conditions de culture utilisées et a été exclue par des espèces compétitrices.

Bien que cette bactérie ait été utilisée dans d'autres bioréacteurs en circulation continue (Paik et Glatz, 1994; Yang et Huang, 1995; Lewis et Yang, 1992a; 1992b) nous avons pris des mesures pour éviter que l'inoculat ne soit

évacué avant que l'attachement ne puisse se faire. C'est pourquoi l'alimentation en perméat du bioréacteur a été arrêtée lors des trois inoculations pendant six heures afin de favoriser le contact prolongé entre le charbon et les bactéries. Pendant cette période, le réacteur fonctionnait en recirculation seulement, ce qui devait favoriser l'attachement des bactéries aux grains de charbon.

La deuxième hypothèse est supportée par les travaux de Piveteau *et al.* (2000) et de Magdoub *et al.* (1992) qui démontrent que *P. acidipropionici* croît lentement dans le perméat de lactosérum. La quantité d'inoculum ajouté au réacteur était peut-être aussi trop faible. En effet, Piveteau *et al.* (2000) ont récemment montré que les propionibactéries pouvaient présenter une incapacité à croître dans un milieu de culture à base de lactosérum à partir de faibles inoculums. Ils ont affirmé qu'un composé inhibiteur thermostable de faible masse moléculaire présent dans le lait pourrait en être responsable.

Pour réussir la fermentation d'un substrat par une culture de microorganismes, certaines conditions d'asepsie doivent être respectées. Si la culture est envahie par un ou des organismes étrangers moins performants dans la biotransformation du produit désiré, l'efficacité de la bio-transformation sera affectée négativement.

La première conséquence de travailler avec une culture mixte est une moins grande production d'acides gras volatiles. Le substrat énergétique limité est en effet partagé entre diverses espèces produisant moins d'acides gras à courte

chaîne pendant la fermentation. Les éléments énergétiques n'ont donc pas été fermentés et/ou utilisés par *P. acidipropionici* mais plutôt par d'autres variétés de bactéries. Malgré cela, Yang *et al.* (1994) ont déjà rapporté que leur réacteur avait été contaminé par des bactéries lactiques présentes dans le perméat de lactosérum (frais) mais que la contamination s'était résorbée à la suite de la croissance de *P. acidipropionici*. Ils ont alors supposé que l'action bactériostatique de l'acide propionique pourrait avoir nui à la prolifération de ces bactéries lactiques. Malheureusement, en aucun moment de la fermentation, la concentration d'acide propionique n'a été assez élevée.

Dans un tel système continu, les souches contaminantes peuvent exclure l'organisme désirable d'un consortium bactérien par compétition. L'organisme ciblé pour la fermentation et introduit dans le réacteur à trois reprises n'a pu être isolé de nouveau à partir d'échantillons du réacteur. Dès lors, il est probable qu'il ne s'y est pas développé.

4.2 Utilisation du sucre

La moyenne de réduction des sucres dans le réacteur se situe à 78% et est conforme au modèle exposé par Jewel (1990) pour un temps de résidence comparable. Nos résultats suggèrent que le meilleur paramètre explicatif pour estimer l'activité du bioréacteur est la quantité d'ATP associée au biofilm (ATP_b). Une des variables utilisées pour exprimer cette « activité » est la réduction de la concentration des sucres, exprimés en équivalents glucose. Le facteur « ATP_b »,

si utilisé seul, explique 25,9% (R^2) de la variabilité de l'efficacité de dégradation des sucres (équation 7). Malgré que Lazarova *et al.* (1994) ont décelé une relation entre l'activité du biofilm (ATP_b) et la quantité de protéines attachées, nous n'avons pas détecté de relation entre ces deux facteurs ($P>0,05$; tableau 10).

4.3 Le taux de conversion en acides gras

À la lecture de la section des résultats, il devient évident que les liens entre les paramètres utilisés comme descripteurs de l'activité (ATP et Protéines) et les indicateurs d'activité utilisés (concentration d'acides, réduction des sucres) sont assez faibles. Une des raisons que nous évoquons pour expliquer cette faiblesse est que les composés dosés ne sont pas les principaux produits de la chaîne de réactions.

Si on considère que les 50 derniers jours de l'expérience représentent une période d'une certaine stabilité ou maturité du biofilm, le bilan molaire de l'utilisation du carbone injecté dans le système, calculé selon l'équation 14, montre que la quantité de carbone retrouvée dans les produits dosés est de $30 \pm 8 \%$. Ce résultat est basé sur des valeurs moyennes des concentrations des quatre acides dosés durant cette période et démontre que la majorité du carbone utilisé par le consortium bactérien n'est effectivement pas retracé dans les produits dosés. Parmi les autres voies que le carbone aurait pu emprunter, on compte son intégration dans la biomasse, dans l'acide lactique, dans les esters d'acides gras, dans le gaz carbonique ou dans le méthane.

$$C = \frac{\frac{[Ac]}{60} \cdot 2 + \frac{[Pr]}{74} \cdot 3 + \frac{[ib + nb]}{89} \cdot 4}{\left[\frac{Eq_{alim}}{180} \right] \cdot 6} \quad (14)$$

où

C = Fraction du carbone entrant retrouvé dans les produits dosés (base molaire)
 [Ac] = Concentration d'acide acétique (g·L⁻¹)
 [Pr] = Concentration d'acide propionique (g·L⁻¹)
 [ib] = Concentration d'acide iso-butyrique (g·L⁻¹)
 [nb] = Concentration d'acide n-butyrique (g·L⁻¹)
 Eq_{alim} = Concentration d'équivalent glucose dans l'alimentation (g·L⁻¹)

4.4 Acides organiques

Les concentrations obtenues et la production d'acides gras volatils dans cette expérience sont relativement faibles compte tenu des valeurs attendues (tableau 3). Il faut tenir compte du fait que ce système était alimenté en continu et que le biofilm actif n'était pas composé d'une seule souche bactérienne. La faible quantité d'acide propionique retrouvée dans le mélange confirme l'absence de *P. acidipropionici* et la dominance d'espèces supposées hétérofermentatives, qui produisaient des substances qui n'ont pas toutes été dosées.

Le ou les organismes contaminants présents ont pu utiliser l'acide propionique comme source de carbone, ce qui ne se serait pas produit dans une culture pure. Ce phénomène est bien connu (Caunt et Hester, 1989; Gourdon *et al.*, 1989; Lens *et al.*, 1996; Omil *et al.*, 1996) et peut avoir eu un impact important sur la concentration des acides dosés. Cependant, l'importance réelle de dégradation des acides présents dans le milieu par les souches contaminantes identifiées est inconnue. Il est aussi difficile de connaître la proportion de la

contamination par chaque espèce. Il est fort probable que des interactions complexes entre les diverses sources de carbone (acides et sucres) et les métabolites excrétés (acides et gaz) par certaines espèces aient eu lieu dans le réacteur.

4.5 Variables explicatives

Il a été démontré que le facteur expliquant le mieux l'activité du bioréacteur en termes de dégradation des sucres, production d'acides gras, de production d'acide acétique et de production d'acide propionique est la concentration d'ATP_b. Cette variable est donc proposée comme seule indicatrice ou en combinaison avec les Protéines_b pour prédire l'activité d'un biofilm fixé de ce type. Ce résultat peut être considéré surprenant puisque l'utilisation d'un marqueur de biomasse totale comme les protéines totales ou les solides volatiles (VS) est généralement admis comme un bon paramètre de prédiction de l'activité du biofilm (Lazarova et Manem, 1995; Furumai *et al.*, 1991). Dans notre étude, seule la production d'acide i-butyrique, a été mieux expliquée par la concentration de Protéines_b ce qui est plus conforme à ce que la littérature nous propose.

4.6 Micro-photographies

La technique de coloration et de photographie du biofilm étant nouvelle, les résultats obtenus n'ont pas permis de tirer des conclusions définitives. Il s'agit cependant d'une technique qu'il vaudrait la peine de pousser un peu plus loin.

Malgré que les intensités de chaque couleur n'a pas été relié statistiquement aux paramètres d'ATP_b et de Protéines_b, il semble y avoir une tendance vers l'augmentation de l'intensité verte (SYTO 9 TM) concomitante à une augmentation graduelle de la concentration d'ATP_b. Il existe sûrement des possibilités de développement dans cette voie.

4.7 Stérilité et asepsie

Diverses précautions auraient pu assurer le contrôle des organismes présents dans le réacteur. La stérilisation du milieu avant l'utilisation était par contre difficile à appliquer. Stériliser un volume de 75 L par jour représente une tâche importante et la conservation du milieu stérile est complexe. De plus, dans un contexte industriel, la stérilisation du déchet (perméat) est une dépense appréciable. Nous étions conscients de la difficulté et nous avons tenté de la contrôler en installant un filtre à lampe UV sur la ligne d'alimentation du réacteur.

La contamination de l'inoculum par un bactériophage pourrait aussi avoir tué ou ralenti la culture. Aucune tentative de détermination de la présence de phages dans le réacteur n'a été faite; nous ne possédions pas l'expertise nécessaire.

La stérilisation du réacteur avant son utilisation aurait assuré son asepsie au départ, mais la façon dont il était fabriqué rendait la tâche impossible. Parmi les éléments qui rendaient la stérilisation difficile on note l'utilisation d'une pompe à

piston programmable, l'utilisation d'une tubulure trop longue et non-autoclavable, la circulation du milieu de culture directement dans le chauffe-eau et la construction en plusieurs modules de verre et teflon du réacteur. La méthode que nous avons utilisée pour la stérilisation était sans doute inadéquate. Nous avons pu le démontrer par la culture d'organismes présents dans le réacteur avant l'inoculation. L'impossibilité de stériliser le réacteur en entier et la présence de micro-organismes dans le milieu de culture peuvent donc expliquer la présence de ces contaminants préalablement à l'inoculation de *P. acidipropionici*.

L'utilisation d'outils et de contenants stériles tout au long de l'opération aurait aussi pu réduire le risque de contamination du réacteur. Nous devons préciser que nous avons toujours en tête de garder l'opération du fermenteur le plus simple et convivial possible pour une possible application industrielle.

4.8 Importance de l'anaérobiose

P. acidipropionici peut croître en conditions totalement anaérobies et peut être considéré aérotolérante. Quesada-Chanto *et al.* (1994, 1997a) ont toutefois démontré que la production d'acides gras volatils pouvait être grandement affectée par la présence d'oxygène, à la fois chez *P. acidipropionici* et chez *P. shermanii*. Chez ces deux espèces, en condition aérobie, le rapport acide propionique / acide acétique devient nul. Le procédé de production d'acide propionique par fermentation à l'aide de propionibactéries devient donc dépendant d'une bonne anaérobiose. Or, les réservoirs de perméat reconstitué étaient en contact avec

l'air qui pouvait s'y dissoudre et il est arrivé à 2 reprises que la pompe injecte directement de l'air dans le réacteur. Ceci constitue donc une des causes plausibles de la faible quantité d'acide propionique produite dans le réacteur.

4.9 Amélioration du bioréacteur

Certaines modifications au design du réacteur aideraient à réduire le nombre de fissures dans le système. Le contrôle de la température du réacteur pourrait être fait de façon externe par une gaine d'eau à température contrôlée circulant autour de la colonne. Cette façon de faire éliminerait le besoin de stériliser l'intérieur du chauffe-eau. La pompe à piston utilisée pour l'alimentation (figure 3) serait avantageusement remplacée par une pompe péristaltique pour les mêmes raisons.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Ce travail a été effectué avec, comme idée générale, la réduction de la pollution et la valorisation d'un déchet. Cette opération devait se faire en laboratoire tout en étant assez simple. Dans le cas précis de la production d'acide propionique par fermentation du perméat de lactosérum, les résultats que nous avons obtenus ne permettent pas de croire que ce procédé peut être utilisé de façon efficace. Par contre, le procédé montre une efficacité certaine à réduire la teneur en lactose et par conséquent la DCO de l'effluent de façon efficace tout en nécessitant peu d'entretien.

Le suivi des paramètres d'ATP_b et de Protéines_b du biofilm fixé sur le support montre que, comme prévu, ces deux paramètres sont liés à l'activité du biofilm. Cependant, ces deux variables ne sont pas corrélées entre elles. La présente étude suggère donc que l'ATP_b explique mieux l'activité de dégradation du lactose et la production d'acides que la concentration de Protéines_b. Ces résultats remettent en question l'utilisation de dosages de protéines du biofilm comme paramètre de contrôle de l'activité d'un bioréacteur anaérobie.

RÉFÉRENCES

- Atlas, R.M. 1983. *Enumeration and estimation of microbial biomass*. Dans *Experimental microbial ecology*. eds. Burns, R.G. et Slater, J.H. Blackwell Scientific Publications, Boston, USA. pp. 84-102.
- Atlas, R.M. 1993. *Handbook of microbiological media*. Ed: Parks, L.C. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 1079 p.
- Blanc, P. et Goma, G. 1987. *Kinetics of inhibition in propionic fermentation*. Bioprocess Engineering, 2:175-179.
- Blanc, P. et Goma, G. 1989. *Propionic acid and biomass production using continuous ultrafiltration fermentation of whey*. Biotechnology Letters, 11:189-194.
- Boyaval, P. et Corre, C. 1987. *Continuous fermentation of sweet whey permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle*. Biotechnology Letters, 9:801-806.
- Bull, M.A., Sterritt, R.M. et Lester, J.N. 1984. *An evaluation of single- and separated- phase anaerobic industrial wastewater treatment in fluidized bed reactors*. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 26:1054-1065.

- Caunt. P. et Hester. K.W. 1989. *A kinetic model for volatile fatty acid biodegradation during aerobic treatment of piggery wastes*. Biotechnology and Bioengineering, 34:126-130.
- ChemExpo. 1997. ChemExpo Chemical Profile : Propionic acid. <http://www.chemexpo.com/news/profile22497.cfm>. Page consultée le 21 octobre 1999
- ChemExpo. 2000. ChemExpo Chemical Profile : Propionic acid. <http://www.chemexpo.com/news/profile000207.cfm>. Page consultée le 11 avril 2001.
- Choi, C.H. et Mathews, A.P. 1994. *Fermentation metabolism and production of organic acids by Propionibacterium acidipropionici*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 44:271-285.
- Chung, Y.C. et Neethling, J.B. 1988. *ATP as a measure of anaerobic sludge digester activity*. Journal of Water Pollution Control Federation, 60:107-112.
- Colomban, A., Roger, L. et Boyaval, P. 1993. *Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration and cell recycling*. Biotechnology and Bioengineering, 42:1091-1098.
- Cormier, F., Raymond, Y., Champagne, C.P. et Morin. A. 1991. *Analysis of odor-active volatiles from Pseudomonas fragi grown in milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39:159-161.
- Crespo, J.P.S.G., Mourra, M.J., Almeida, J.S. et Carrondo, M.J.T. 1991. *Ultrafiltration membrane cell recycle for continuous culture of Propionibacterium*. Journal of Membrane Science, 61:303-314.

- 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.
- Deming, J.W., Picciolo, G.L. et Chappelle. E.W. 1979. *Important factors in adenosine triphosphate determinations using firefly luciferase: Applicability of the assay to studies of native aquatic bacteria*. Dans: *Native aquatic bacteria: Enumeration, activity and ecology*. ASTM STP 695 eds. Costerton. J.W., Colwell. R.R. American Society for Testing and Material. Philadelphia, USA. pp. 89-98.
- 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.
- Ehlinger, F., Audic, J.M. et Faup, G.M. 1989. *Influences of seeding conditions on Initial biofilm development during the start-up of anaerobic fluidized bed reactors*. Water Science and Technology, 21:157-165.
- Furumai, H., Kuba, T., Imai, T. et Kusuda, T. 1991. *Transient responses of wastewater treatment and biomass development in a methanogenic fluidized bed*. Water Science and Technology, 23:1327-1336.
- Gourdon, R., Comel, C., Vermande, P. et Véron, J. 1989. *Kinetics of acetate, propionate and butyrate removal in the treatment of a semi-synthetic landfill leachate on anaerobic filter*. Biotechnology and Bioengineering, 33:1167-1181.
- Goswami, V., et Srivastava, A.K. 2000. *Fed-batch propionic acid production by Propionibacterium acidipropionici*. Biochemical Engineering Journal, 4:1212-128.

- Groboillot, A., Boadi, D.K., Poncelet, D. et Neufeld, R.J. 1994. *Immobilization of cells for application in the food industry*. Critical Reviews in Biotechnology, 14:75-107.
- Haddadin, M.S., Al-Muhirat, S.R., Batayneh, N. et Robinson, R.K. 1996. *Production of acetic and propionic acids from labneh whey by fermentation with propionibacteria*. Journal of the Society of Dairy Technology, 49:79-81.
- Herbert, D., Phipps, P.J. et Strange, R.E. 1971. *Chemical analysis of microbial cells*. Dans: *Methods in microbiology* 5B eds. Norris, J.R., Ribbons, D.W. Academic Press. London, England. pp. 209-265.
- Hsu, S.-T. et Yang, S.-T. 1991. *Propionic acid fermentation of lactose by Propionibacterium acidipropionici: Effects of pH*. Biotechnology and Bioengineering, 38:571-578.
- Imbeault, N. 1997. *Production d'acides gras par biodégradation anaérobie du perméat de lactosérum dans un bioréacteur en continu*. Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Canada. 110p.
- Imbeault, N., Paquet, M. et Côté, R. 1998. *Volatile fatty acids production by anaerobic whey permeate biodegradation in continuous bioreactor*. Water Quality Research Journal of Canada, 33:551-563.
- Jacques, D. 1993. *Valorisation des sous-produits de l'industrie de transformation du lait*. Cahier technique réalisé pour le Centre québécois de valorisation de la biomasse, Ste-Foy, Canada.
- Jain, D.K., Tyagi, R.D., Kluepfel, D. et Agbebavi, T.J. 1991. *Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cells of*

- Propionibacterium shermanii* in batch process. *Process Biochemistry*, 26:217-223.
- Jewel, 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, Boca Raton, Florida, USA. pp. 223-252.
- Karl, D.M. et LaRock, P.A. 1975. *Adenosine triphosphate measurements in soil and marine sediments*. *Journal of Fisheries Resources Board of Canada*, 32:599-607.
- Kucknerowicz, F. et Verstraete, W. 1979. *Direct measurement of microbial ATP in activated sludge samples*. *Journal of Chemistry Techniques and Biotechnology*, 29:707-712.
- Lazarova, V. et Manem, J. 1995. *Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment*. *Water Research*, 29:2227-2245.
- Lazarova, V., Pierzo, V., Fontvielle, D. et Manem, J. 1994. *Integrated approach for biofilm characterisation and biomass activity control*. *Water Science and Technology*, 29:345-354.
- Lens, P.N.L., O'Flaherty, V., Dijkema, C., Colleran, E. et Stams, A.J.M. 1996. *Propionate degradation by mesophilic anaerobic sludge: Degradation pathways and effects of other volatile fatty acids*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82:387-391.
- Lewis, V.P. et Yang, S.-T. 1992a. *Continuous propionic acid fermentation by immobilized Propionibacterium acidipropionici in a novel packed-bed bioreactor*. *Biotechnology and Bioengineering*, 40:465-474.

- Lewis, V.P. et Yang, S.-T. 1992b. *A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose*. Biotechnology Progress, 8:104-110.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. 1951. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 193:265-275.
- Magdoub, M.N.I., Sultan, N.E., Fayed, E.O. et Elta, O.A.A. 1992. *Growth characteristics and productivity of Propionibacterium strains in whey permeate*. Annals of Agricultural Science, 37:131-137.
- Moat, A.G. et Foster, J.W. 1995. *Microbial Physiology*. Wiley-Liss. New-York, USA. 580p.
- Morin, A., Raymond, Y. et Cormier, F. 1994. *Production of fatty-acid ethyl-esters by Pseudomonas fragi under conditions of gas stripping*. Process Biochemistry, 29:437-441.
- Omil, F., Lens, P., Hulshoff Pol, L. et Lettinga, G. 1996. *Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor*. Process Biochemistry, 31:699-710.
- Paik, H.-D. et Glatz, B.A. 1994. *Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of Propionibacterium acidipropionici*. Applied Microbiology and Biotechnology, 42:22-27.
- Piveteau, P., Condon, S. et Cogan, T.M. 2000. *Inability of dairy propionibacteria to grow in milk from low inocula*. Journal of Dairy Research, 67:65-71.

- Playne, M. J. 1985. *Propionic and butyric acids*. Dans: *Comprehensive biotechnology*. Vol. 3. Moo-Young, M. Pergamon Press, New-York, USA. pp. 731-759.
- Poirier, Micheline. 1996. *Industrie de transformation du lait et environnement: Guide technique sectoriel*. Gouvernement du Québec. Ministère de l'Environnement et de la Faune. Direction des politiques du secteur industriel.
- Quesada-Chanto, A., Afschar, A.S. et Wagner, F. 1994. *Optimization of a Propionibacterium acidipropionici continuous culture utilizing sucrose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 42:16-21.
- Quesada-Chanto, A., Schmid-Meyer, A.C., Shroeder, A.G., Silveira, M.M., Carvalho-Jonas, M.F., Artolozaga, M.J. et Jonas R. 1997a. *Effect of aeration on organic acid production by Propionibacterium shermanii*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 52c:705-708.
- Quesada-Chanto, A., Schoeroeder, A.G., Schmid-Meyer, A.C., Lopez, J.A., Sliveira, M.M. et Jonas, R. 1997b. *Organic acid Production by Propionibacterium shermanii: Effect of pH, temperature and vitamin-nitrogen source*. Zeitschrift fur naturforshung C-A: Journal of Bioscience, 52:193-196.
- Rockey, J.S. et Forster, C.F. 1982. *The use of an anaerobic expanded bed reactor for the treatment of domestic sewage*. Environmental Technology Letters, 3:487-496.
- Roe, P.C. Jr et Bhagat, S.K. 1982. *Adenosine triphosphate as a control parameter for activated sludge processes*. Journal of Water Pollution Control Federation, 54:244-254.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sherrer, B. 1984. *Biostatistique*. Gaëtan Morin éditeur. Chicoutimi, Canada, 850 p.
- Sigma Chemical Co. 1988. *Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent assay kit*. Technical bulletin no. BAAB-1. P.O. box 14508, St-Louis, Mo, 63178, USA.
- Sigma Diagnostics. 1994. *Protein Assay Kit, Procedure No. P 5656*. P.O. Box 14508, St-Louis, Mo 63178, USA.
- Sokal, R.R. et Rohlf, F.J. 1981. *Biometry : The principles and practice of statistics in biological research*. 2nd ed. W.H. Freeman and company, New-York, USA. 860 p.
- Stanley, P.E. 1989. *A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology*. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 4:375-380.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. et Dickey, D.A. 1997. *Principles and procedures of statistics : a biometrical approach*. 3rd ed. McGraw-Hill, New-York, USA.
- Stevenson, L.H., Chrzanowski, T.H. et Erkenbrecher, C.W. 1979. *The adenosine triphosphate assay: Conceptions and misconceptions*. Dans: *Native aquatic bacteria: Enumeration, activity and ecology*. ASTM STP 695 eds. Costerton. J.W., Colwell. R.R. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, USA. pp. 99-116.
- Tranchant, J., Prévôt, A., Serpinet, J., Arpino, P., Vergnol, A. et Witier, P. 1995. *Manuel pratique de chromatographie gazeuse*. Masson. Paris. 700p.

- van der Kooij, D., Veenendaal, H.R., Baars-Lorist, C., van der Klift, D.W. et Drost, Y.C. 1995. *Biofilm formation on surfaces of glass and teflon exposed to treated water*. Water Research, 29:1655-1662.
- White, D.C., Bobbie, R.J., Herron, J.S., King, J.D. et Morrisson, S.J. 1979. *Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples*. Dans: *Native aquatic bacteria: Enumeration, activity and ecology*. ASTM STP 695, eds. Costerton, J.W., Colwell, R.R. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, USA. pp. 69-81.
- Yang, S.-T., Zhu, H., Li, Y. et Hong, G. 1994. *Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed reactor*. Biotechnology and Bioengineering, 43:1124-1130.
- Yang, S.-T. et Huang, Y. 1995. *A novel recycle batch immobilized cell bioractor for propionate production from whey lactose*. Biotechnology and Bioengineering, 45:379-386.
- Yilmazer, G. et Yenigün, O. 1999. *Two-phase anaerobic treatment of cheese whey*. Water Science and Technology, 40:289-295.
- Yu, J. et Pinder, K.L. 1993. *Intrinsic fermentation kinetics of lactose in acidogenic biofilms*. Biotechnology and Bioengineering, 41:479-488.

ANNEXES

ANNEXE 1

SOLUTIONS

Tampon Tris pour l'extraction de l'ATP

Tris : 2,4272 \pm 0,0001 g

EDTA di-sodique : 0,7445 \pm 0,0001 g

Ajuster le pH à 7,75 avec HCl concentré

Compléter à 1L avec H₂O

Phénol : Chloroforme : alcool isoamyl (50 : 49 : 1)

Phénol 50 mL

Chloroforme 49 mL

Isoamyl alcool 1 mL

Chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1)

Chloroforme 96 mL

alcool Isoamylique 4 mL
(alcool isopentylique)

ANNEXE 2

MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE UTILISÉES

Voici la description des méthodes utilisées pour le séquençage du gène de l'ARN ribosomal (ARN_r) 16S afin d'identifier les contaminants bactériens du bioréacteur.

Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique se fait avec de grandes précautions en portant une attention particulière à la contamination croisée d'un échantillon à l'autre. La procédure est présentée à l'encadré 7.

Amplification du gène de l'ARNr 16S

Afin de pouvoir travailler spécifiquement sur un gène ou une partie de gène contenu dans une grande quantité d'ADN, on doit l'amplifier, c'est-à-dire augmenter sa concentration dans le mélange de façon à ce que l'ADN qui ne contient pas le gène désiré soit en concentration négligeable par rapport au gène désiré. La technique d'amplification par polymérisation en réaction de chaîne ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est utilisée à cet effet.

Encadré 7. Extraction de l'ADN génomique

- 1) Obtenir un culot de cellules par centrifugation d'une culture à 4000 RPM pendant 10 minutes.
- 2) Resuspendre le culot dans 5 mL de TEN additionné de Lysozyme ($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (bien défaire les grumeaux) et incubé 30 minutes à 37°C .
- 3) Ajouter $500\text{ }\mu\text{L}$ de SDS 20% (concentration finale 2%).
- 4) Ajouter $50\text{ }\mu\text{L}$ de β -mercaptoéthanol (concentration finale 1%).
- 5) Faire 1 à 3 chocs thermiques comme suit : 10 min sur un bain de glace sèche-éthanol 95% suivi de 5 minutes dans un bain-marie à 65°C .
- 6) Ajouter 250 à $500\text{ }\mu\text{g}$ de protéinase K dissoute dans $50\text{ }\mu\text{L}$ de TEN (concentration finale $50\text{-}100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- 7) Incuber 2-3 heures à 45°C
- 8) Faire 1-2 extractions au phénol équilibré (50-50 vol) et centrifuger 10 min à 13 200 RPM (V_{max}).
- 9) Faire 1-2 extractions au phénol / chloroforme / alcool isoamylique et centrifuger 2 min à V_{max} .
- 10) Faire une extraction au chloroforme / alcool isoamylique et centrifuger 1 min à V_{max} .
- 11) Ajouter $2\text{ }\mu\text{L}$ de RNase A et incubé 15 min à 37°C .
- 12) Ajouter 2 volumes d'éthanol 95% et agiter doucement.
- 13) Incuber au moins 30 min à -20°C et idéalement toute la nuit
- 14) Centrifuger 10 min à 7 500 RPM à 4°C
- 15) Resuspendre le culot dans 100 à $500\text{ }\mu\text{L}$ H_2O .

Cette technique utilise les propriétés d'une ADN-polymérase issue d'un invertébré vivant dans les sources hydrothermales marines : *Thermus aquaticus*. On introduit deux amorces spécifiques et complémentaires de séquences flanquant le gène visé dans le mélange à PCR et la polymérase comble l'espace entre les deux. Le processus d'amplification se déroule en 3 étapes. La première est la dénaturation thermique de la double hélice d'ADN. La seconde étape est l'hybridation des amorces avec l'ADN monocaténaire et la troisième étape est la polymérisation. A cette étape, la polymérase complète les séquences entre les

deux amorces. En répétant ce cycle 30 à 35 fois, on retrouve de 2^{30} à 2^{35} copies de la séquence d'ADN située entre les amorces.

Comparaison des patrons de digestion par Rsa I

La comparaison des patrons de restriction ajoutée aux données morphologiques et physiologiques des différents isolats, peut permettre de faire des associations et d'affirmer que certains sont semblables entre eux. L'enzyme de restriction Rsa I est utilisée. Cette enzyme coupe 2 à 6 fois dans l'ADNr 16S bactérien.

Ligation du gène dans le vecteur T

Le ligation dans le vecteur T (figure 11) se fait en suivant les instructions du fabricant du vecteur (pGEM™-T Easy, Promega Corp.). Il est appelé vecteur T parce qu'il possède des bases thymine à chaque extrémité 5', ce qui rend la ligation de produits d'amplification par la Taq polymérase très facile. En effet, cette enzyme ajoute une déoxy-adénosine à chaque extrémité 3' lors de la polymérisation, rendant cohésives les extrémités de l'insert et du vecteur.

Ce vecteur possède un site de clonage multiple (MCS) à l'intérieur de la région codant pour l' α -peptide de la β -galactosidase. L'insertion d'un fragment d'ADN dans ce site inactive l' α -peptide et permet d'identifier rapidement les clones

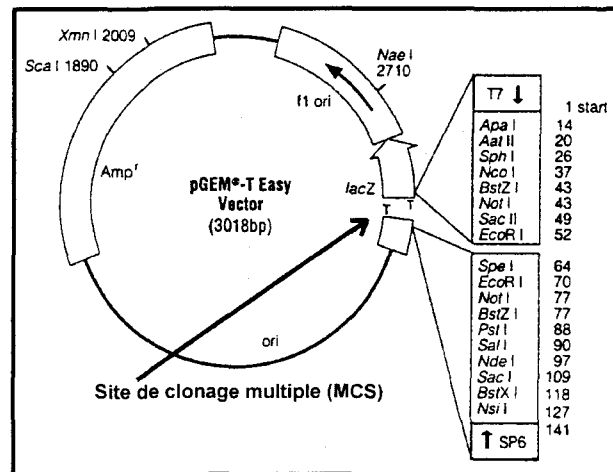


Figure 11. Vecteur utilisé pour le clonage du gène ARNr 16S. (Tiré de la documentation de Promega Corp.)

recombinants par la sélection des colonies blanches sur un milieu indicateur (SOB-Xgal-IPTG-Ampicilline). Il présente aussi de multiples sites de restriction dont 1 site *Not* de chaque côté du MCS, soit à 43 pb du côté 3' et à 77 pb du côté 5'.

Séquençage

Le séquençage est fait par la méthode de l'amplification en présence de di-déoxy-nucléotides marqués qui bloquent l'allongement de la chaîne selon un mode d'incorporation aléatoire. La migration se fait sur un gel d'acrylamide capillaire.

ANNEXE 3

EXEMPLE DE CALCUL DES CONCENTRATIONS D'ACIDES GRAS

La standardisation des calculs est basée sur la méthode d'étalonnage interne expliquée dans Tranchant *et al.* (1995). Cette méthode nécessite l'introduction d'un tiers corps (l'étalon interne utilisé est l'acide iso-valérique) dans les solutions de calibrage et de dosage. Dans la phase de calibrage, les facteurs de réponse relatifs de chaque substance à doser (les 4 acides gras) par rapport à l'étalon sont calculés.

$$K_{i/e} = \frac{m_i \bullet A_e}{m_e \bullet A_i} \quad (5)$$

où

$K_{i/e}$ = coefficient de réponse de la substance pure par rapport à l'étalon.

m_i = masse de substance pure contenue dans la solution de calibrage (mg).

m_e = masse d'étalon interne contenue dans la solution de calibrage (mg).

A_i et A_e = aires respectives du soluté et de l'étalon.

On prend soin de calculer les coefficients de réponse ($K_{i/e}$) pour des concentrations similaires à celles retrouvées dans les échantillons.

Tableau 11. Étalonnage pour le dosage d'acides gras. Calcul du coefficient $K_{i/e}$.

Acide	m_i (mg)	A_i	$K_{i/e}$
Acétique	42,12	2407	2,974730253
Propionique	39,74	4557	1,482613204
iso-Butyrique	38,36	6112	1,066916842
n-Butyrique	38,36	5796	1,125085531
Valérique	37,56	6385	1

Dosage

Les coefficients ($K_{i/e}$) sont appliqués aux dosages pour calculer les teneurs de chaque soluté.

$$m_i = \frac{A_i}{A_e} \cdot m_e \cdot K_{i/e} \quad (14)$$

Tableau 12. Exemple de valeurs obtenues pour les calculs de concentrations d'acides gras.

Acide	A_i	$K_{i/e}$	m_i (mg)
Acétique	3247	2,974730253	23,64
Propionique	228	1,482613204	0,83
iso-Butyrique	81	1,066916842	0,21
n-Butyrique	3921	1,125085531	10,80
Valérique	3836	1	9,39

ANNEXE 4
MICRO-PHOTOGRAPHIES DU BIOFILM

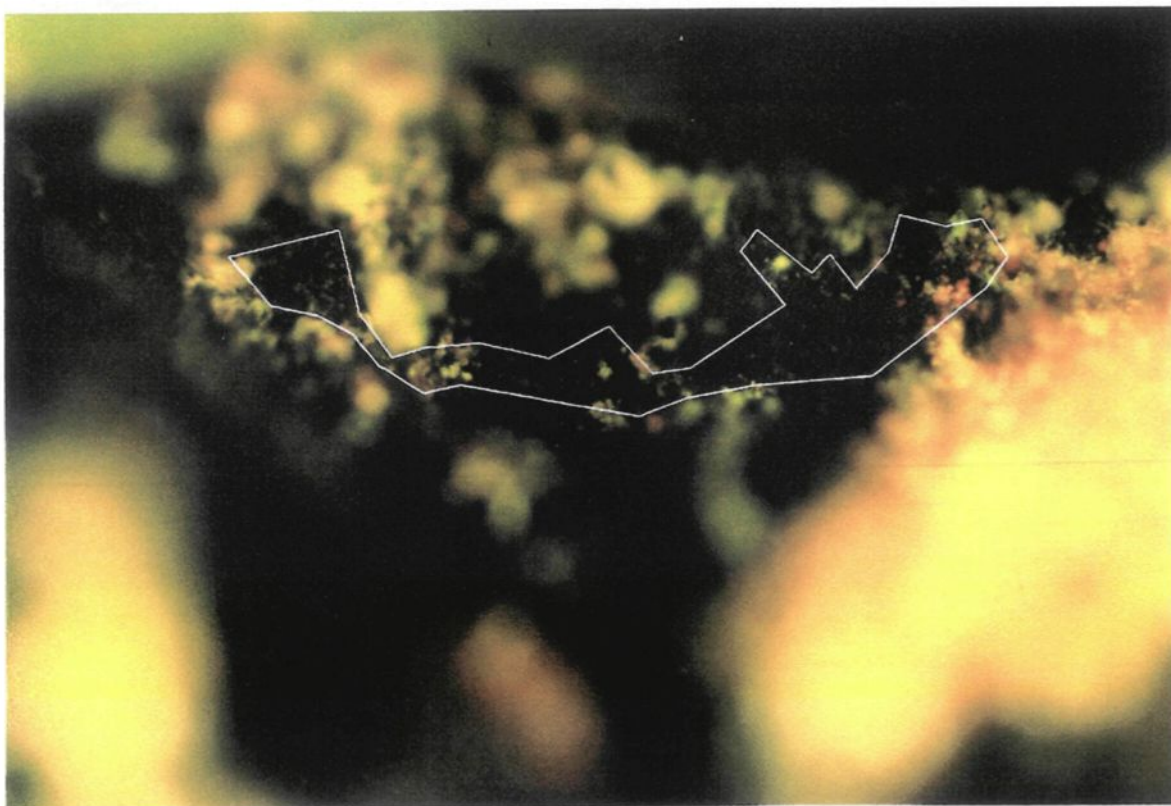


Figure 12. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 11. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

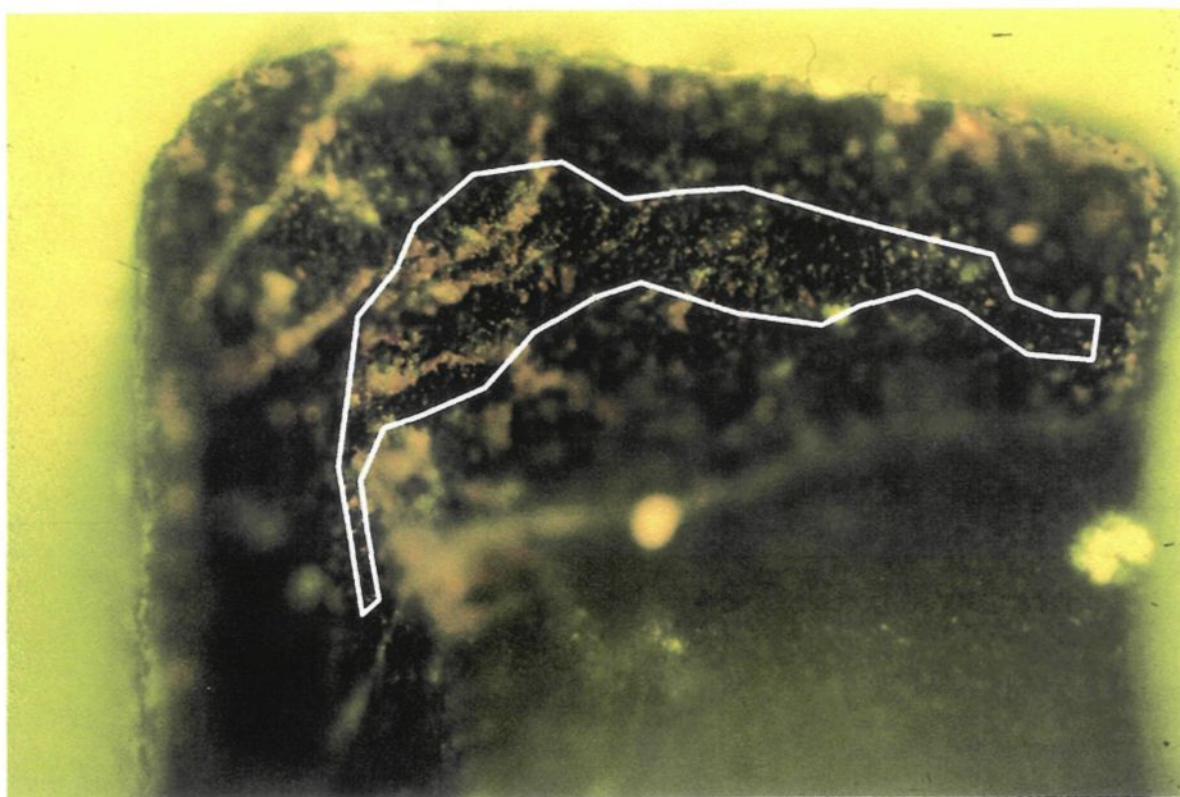


Figure 13. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

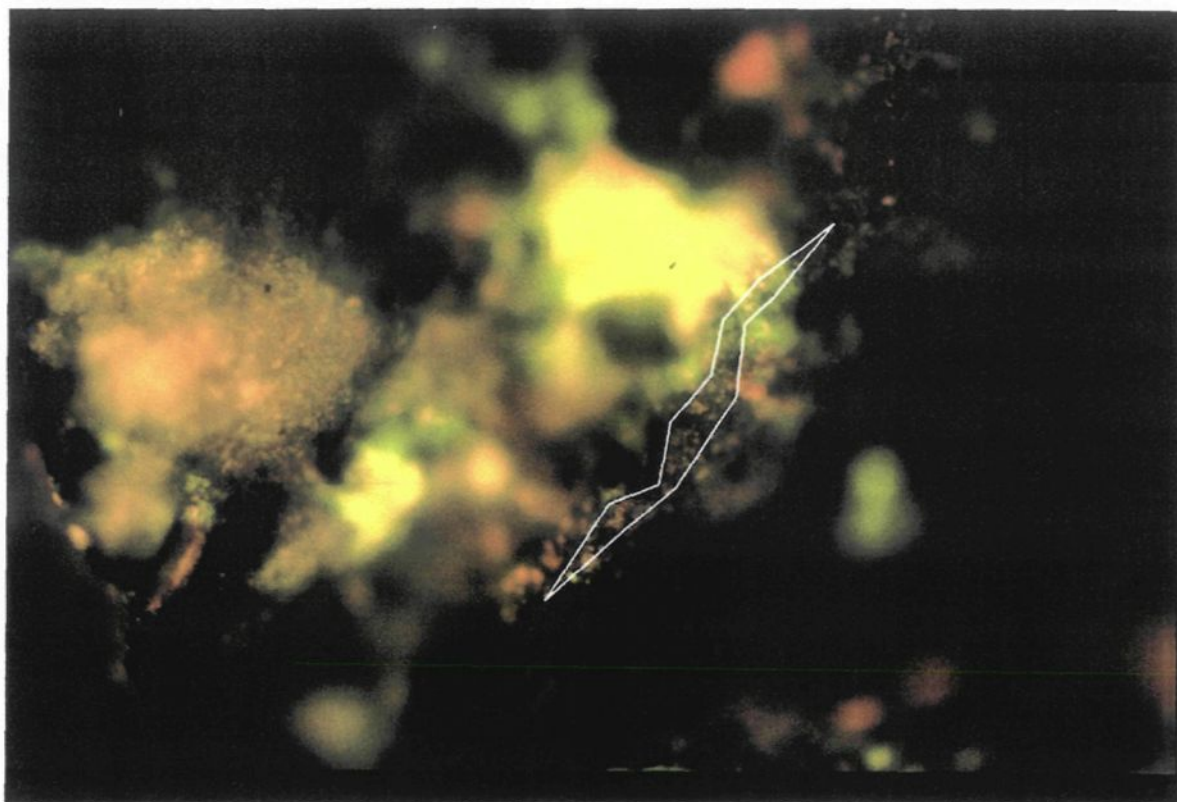


Figure 14. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

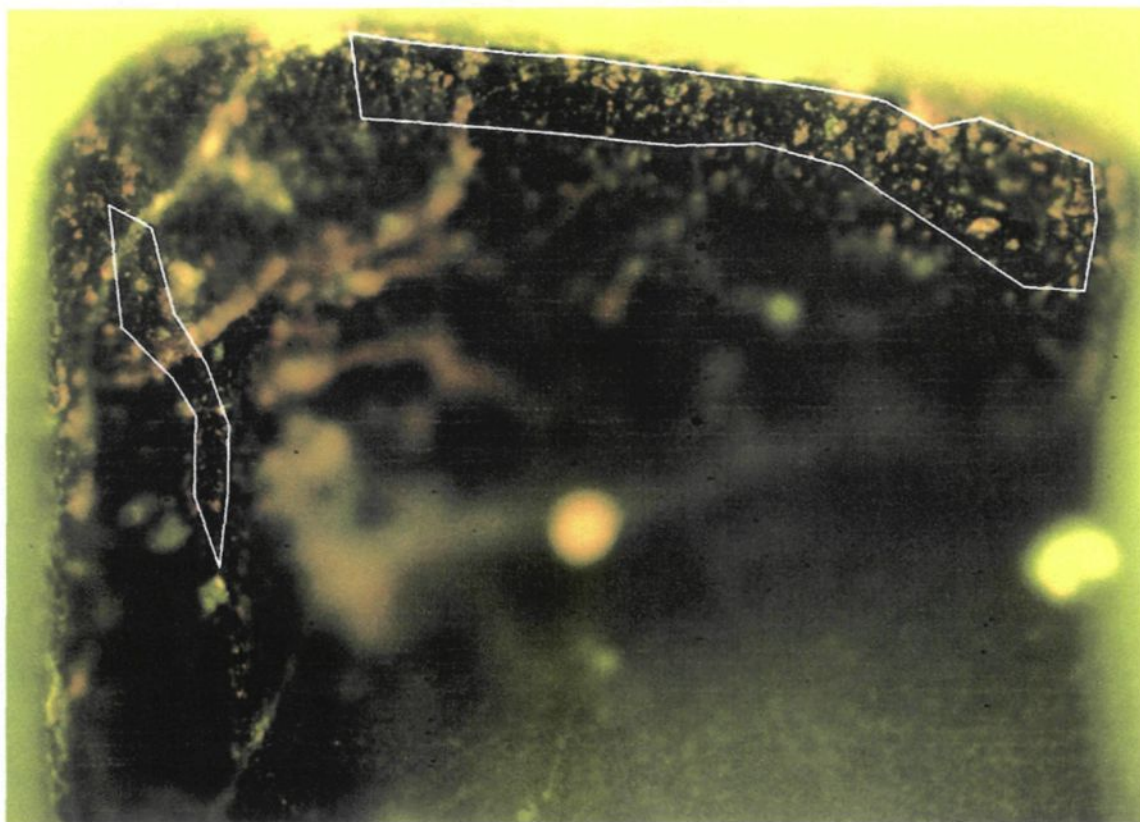


Figure 15. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

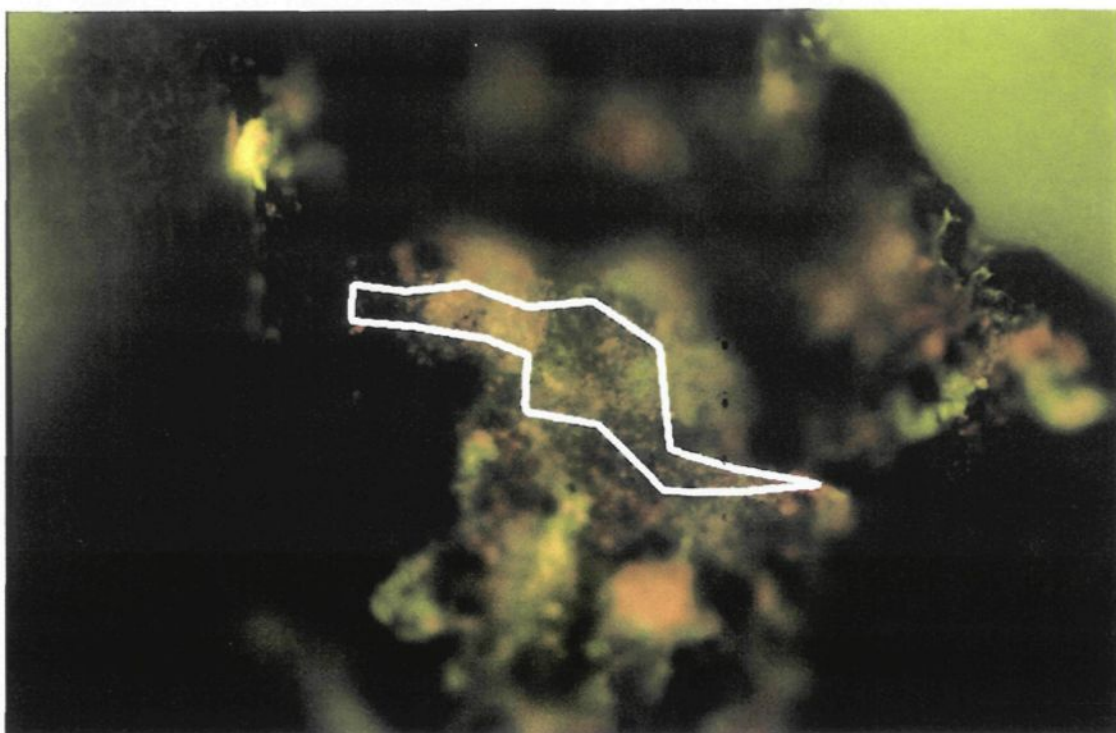


Figure 16. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 37. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

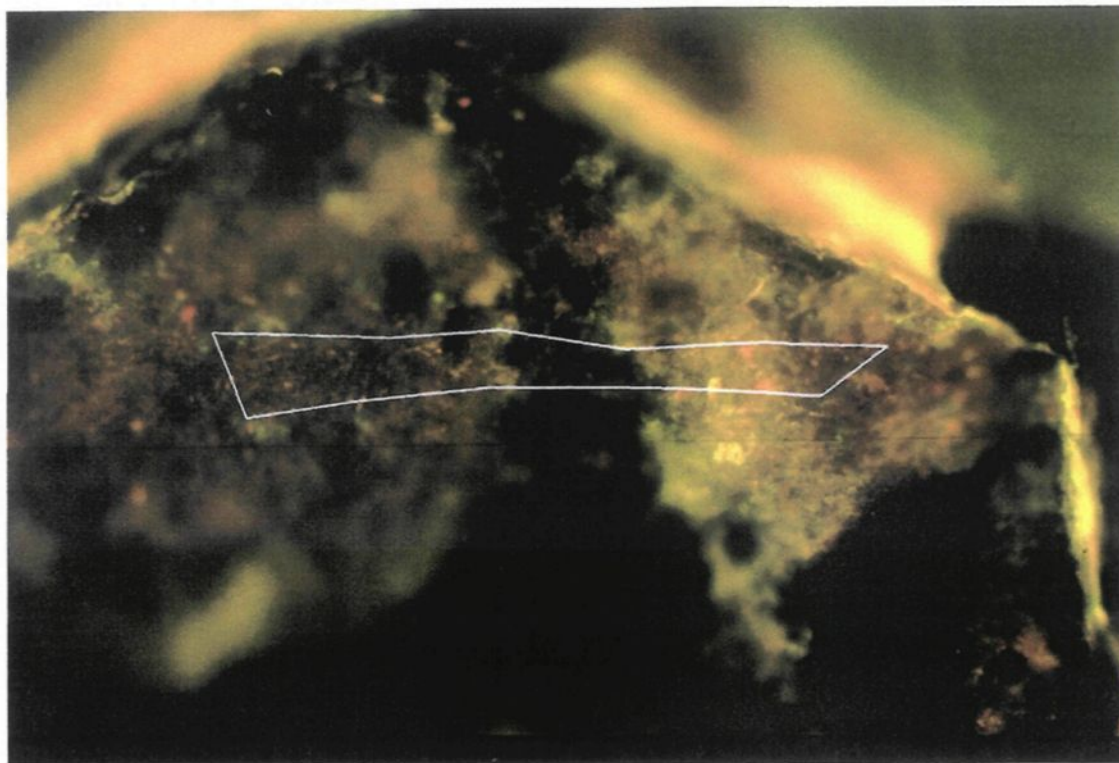


Figure 17. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 48. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

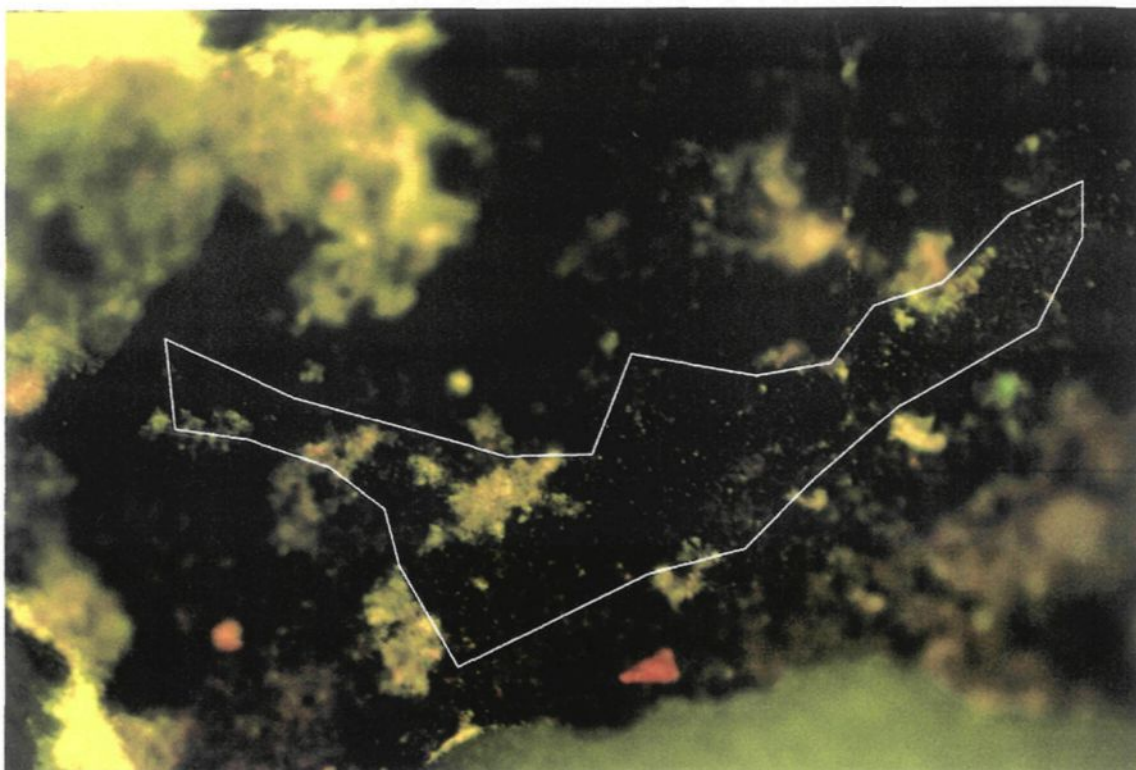


Figure 18. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 48. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

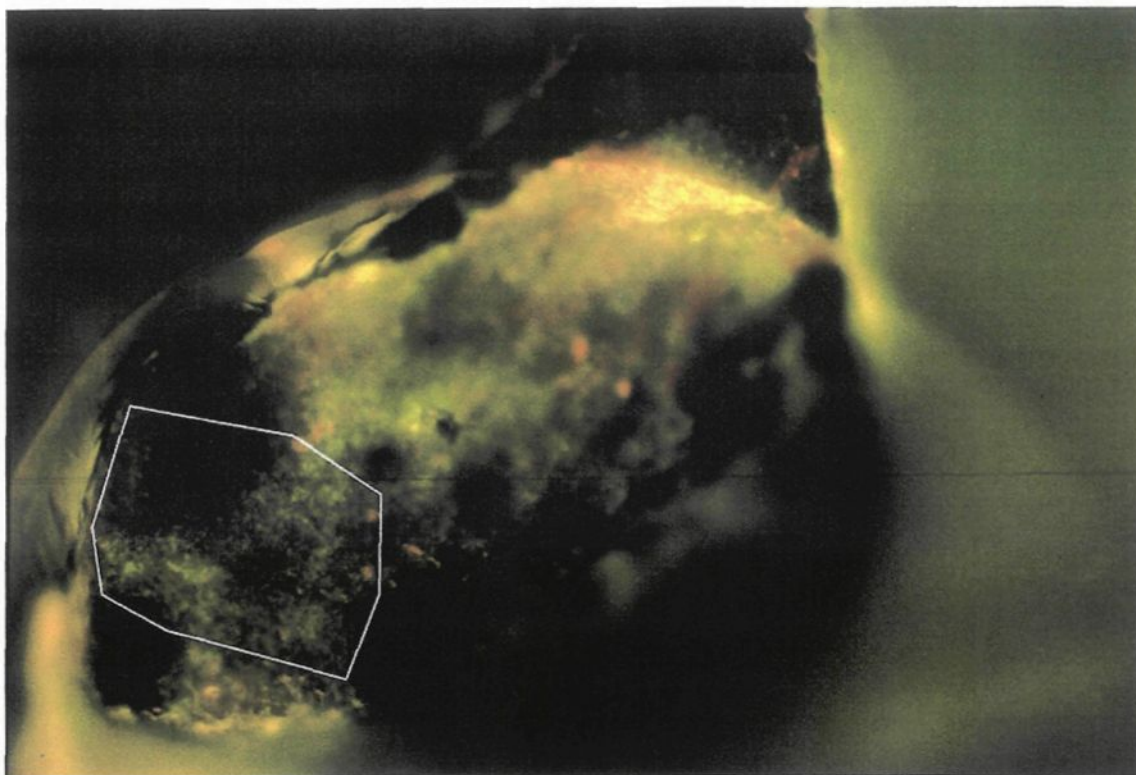


Figure 19. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 48. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

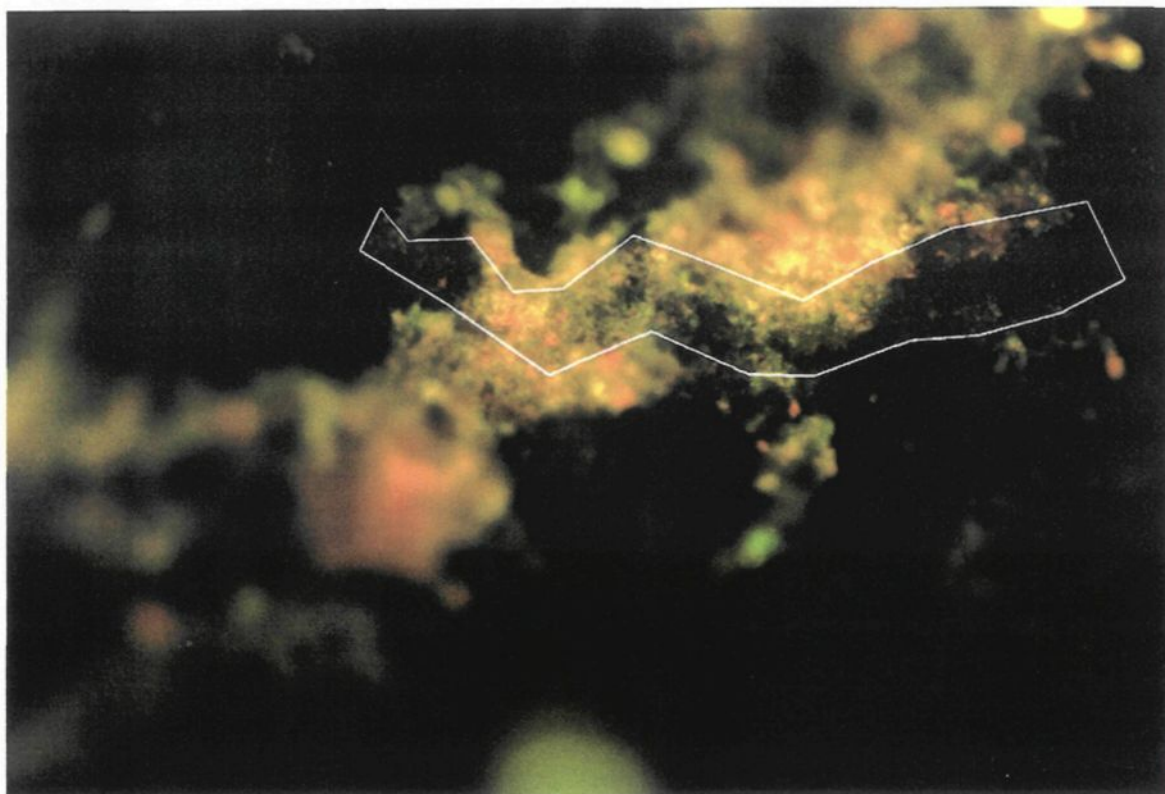


Figure 20. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

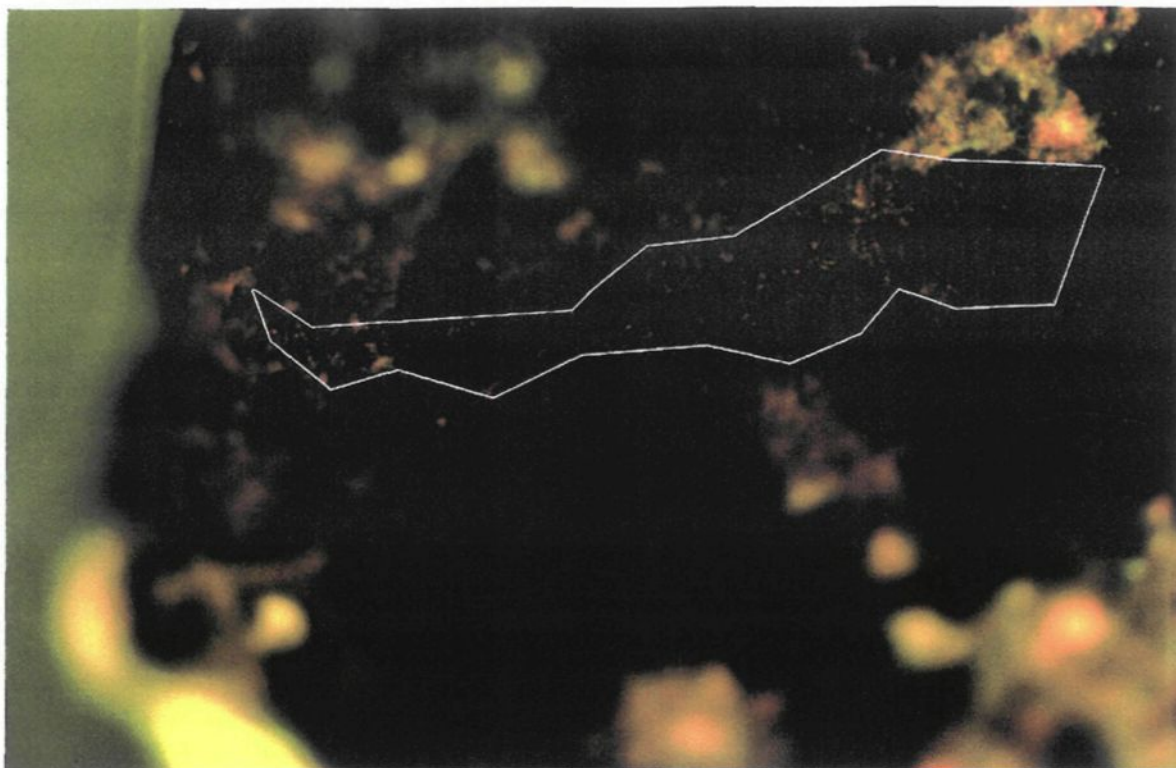


Figure 21a. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

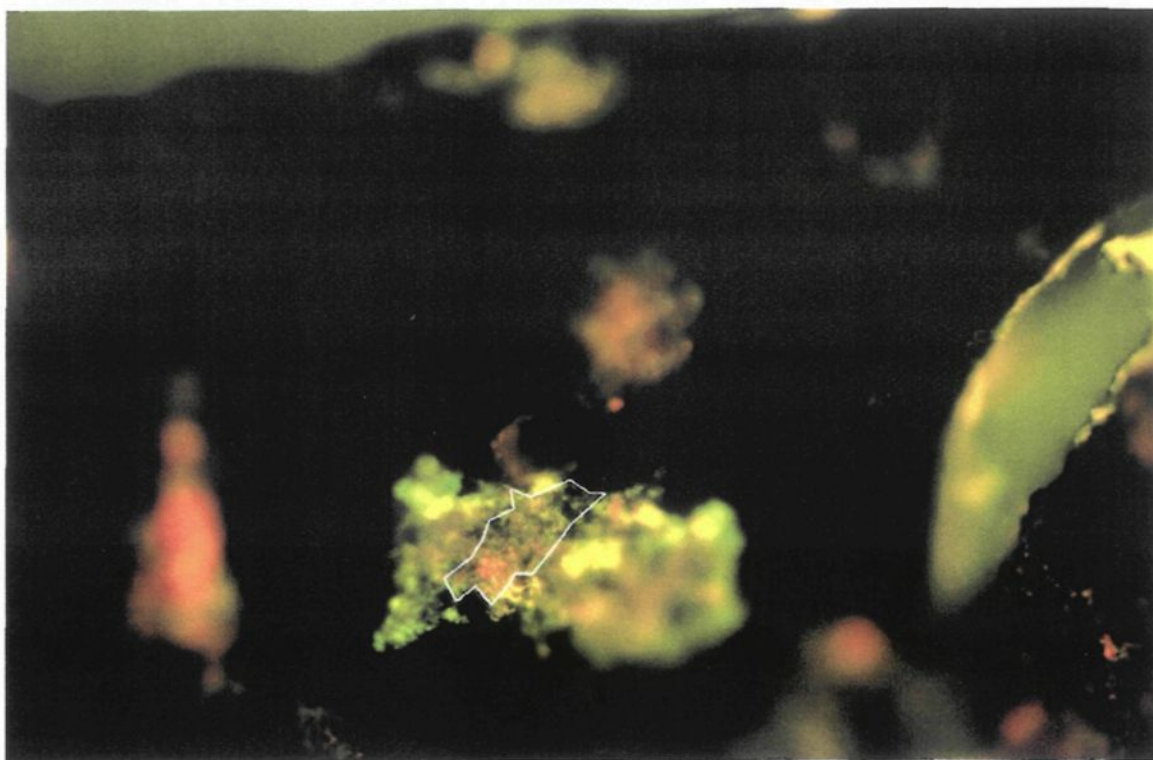


Figure 21b. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

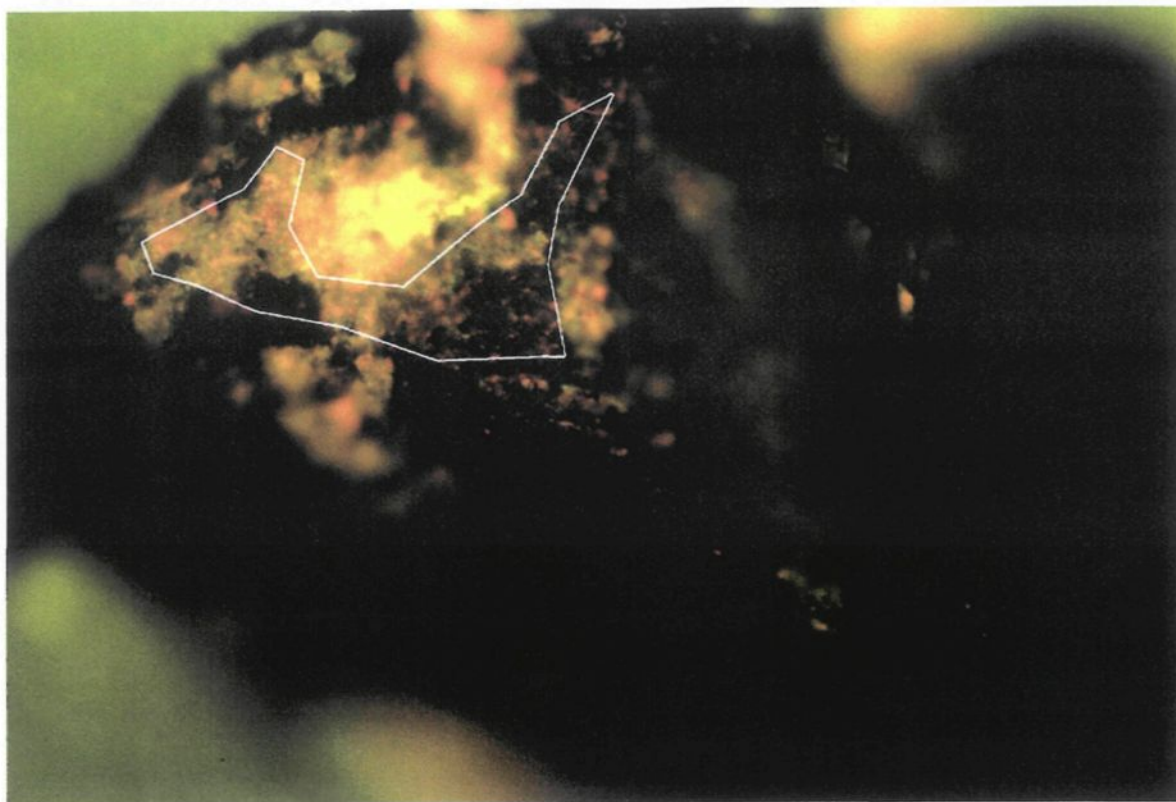


Figure 22. Photographie en fluorescence d'un grain de charbon activé prélevé au jour 66. La zone claire a été isolée et chaque pixel de cette zone a été échantillonné.

ANNEXE 5

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET EXEMPLES DE CALCUL RELATIFS À L'ATP, AUX PROTÉINES ET AUX ACIDES GRAS.

ATP en suspension (ATP_s)

Tableau 13. Données brutes de dosage de l'ATP en suspension.¹³

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
d	Hauteur du pic (mm) (ech+Témoin)	Echelle Pour B (mm)	Hauteur du pic (ech+std) (mm)	Echelle Pour D (mm)	Std d'ATP utilisé (M•L ⁻¹)	millivolts témoin	millivolts Std	Cu équation 3 (M•L ⁻¹)	ATP ds fiole ¹⁴	ATP en suspension (M•m ⁻³)	Donnée de la figure 5b (kg•m ⁻³)
						(B/200 mm)*D	(D/200mm)* E	F / ((H/G)-1)	I / 100	J*10 ⁷	K*(500g/M)* (1kg/1000g)
0	199	100	143	200	3,14E-08	99,50	143,00	7,17315E-08	7,17315E-10	7,17E-03	3,59E-03
3	176,5	10	142	20	6,27E-09	8,83	14,20	1,02945E-08	1,02945E-10	1,03E-03	5,15E-04
6	153	50	137	100	3,14E-08	38,25	68,50	3,96536E-08	3,96536E-10	3,97E-03	2,21E-03
6	57	200	114,5	500	1,96E-07	57,00	286,25	4,87328E-08	4,87328E-10	4,87E-03	
9	114	200	101,5	500	1,57E-07	114,00	253,75	1,27908E-07	1,27908E-09	1,28E-02	6,40E-03
12	164	500	117	1000	1,57E-07	410,00	585,00	3,6736E-07	3,6736E-09	3,67E-02	1,84E-02
15	134	20	144	50	1,96E-07	13,40	36,00	1,16212E-07	1,16212E-09	1,16E-02	5,81E-03
18	85	200	45	500	3,14E-08	85,00	112,50	9,69309E-08	9,69309E-10	9,69E-03	4,85E-03
23	144	100	112	200	3,14E-08	72,00	112,00	5,6448E-08	5,6448E-10	5,64E-03	5,66E-03
23	124	200	120,5	500	1,57E-07	124,00	301,25	1,09694E-07	1,09694E-09	1,10E-02	
23	119,5	200	127	500	1,57E-07	119,50	317,50	9,46343E-08	9,46343E-10	9,46E-03	
23	122	200	124,5	500	1,57E-07	122,00	311,25	1,01081E-07	1,01081E-09	1,01E-02	
23	179	10	78	50	1,57E-07	8,95	19,50	1,3302E-07	1,3302E-09	1,33E-02	
23	190	10	79	50	1,57E-07	9,50	19,75	1,45327E-07	1,45327E-09	1,45E-02	
23	188,5	10	76,5	50	1,57E-07	9,43	19,13	1,52355E-07	1,52355E-09	1,52E-02	
27	113,5	200	121	500	1,96E-07	113,50	302,50	1,17704E-07	1,17704E-09	1,18E-02	5,89E-03

¹³ La troisième ligne du tableau représente les opérations mathématiques appliquées pour générer les résultats de chaque colonne.

¹⁴ L'ATP dosée était extraite de 100 µL de liquide du bioréacteur dans 10 mL de Tampon TRIS et la concentration du standard est en Moles•L⁻¹.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	I
d	Valeur sur courbe (mm) (ech+Témoin)	Echelle (1) (mm)	Valeur sur courbe (mm) (ech+std)	Echelle (2) (mm)	Std d'ATP utilisé (M•L ⁻¹)	MVolts témoin	MVolts Std	Cu(M•L ⁻¹)	ATP ds fiole ¹⁵	ATP en suspension (M•m ⁻³)	Donnée de la figure 5b (kg•m ⁻³)
30	142	100	105	200	3,14E-08	71,00	105,00	6,54871E-08	6,54871E-10	6,55E-03	3,27E-03
32	102,5	100	156	100	3,14E-08	51,25	78,00	6,00822E-08	6,00822E-10	6,01E-03	3,00E-03
36	103	100	167	100	3,14E-08	51,50	83,50	5,047E-08	5,047E-10	5,05E-03	3,57E-03
36	140	100	87,5	500	1,96E-07	70,00	218,75	9,22353E-08	9,22353E-10	9,22E-03	
39	173	20	132,5	50	6,27E-09	17,30	33,13	6,85441E-09	6,85441E-11	6,85E-04	3,43E-04
42	99	200	158	200	3,14E-08	99,00	158,00	5,2621E-08	5,2621E-10	5,26E-03	3,36E-03
42	133	100	194	200	1,57E-07	66,50	194,00	8,1782E-08	8,1782E-10	8,18E-03	
45	143	100	117	200	3,14E-08	71,50	117,00	4,928E-08	4,928E-10	4,93E-03	8,11E-03
45	114	200	179	200	1,57E-07	114,00	179,00	2,75003E-07	2,75003E-09	2,75E-02	
48	193	50	108	200	3,14E-08	48,25	108,00	2,53242E-08	2,53242E-10	2,53E-03	1,76E-03
48	159	50	135	100	3,14E-08	39,75	67,50	4,49211E-08	4,49211E-10	4,49E-03	
51	141	200	125,5	500	1,57E-07	141,00	313,75	1,27981E-07	1,27981E-09	1,28E-02	6,40E-03
54	92	500	91	1000	1,57E-07	230,00	455,00	1,60284E-07	1,60284E-09	1,60E-02	8,42E-03
54	157	200	124	500	1,57E-07	157,00	310,00	1,60899E-07	1,60899E-09	1,61E-02	
54	195	200	161	500	1,96E-07	195,00	402,50	1,84193E-07	1,84193E-09	1,84E-02	
57	102,5	500	152	500	1,57E-07	256,25	380,00	3,24687E-07	3,24687E-09	3,25E-02	1,26E-02
57	186	200	140	500	1,57E-07	186,00	350,00	1,77834E-07	1,77834E-09	1,78E-02	
61	162	100	114	200	3,14E-08	81,00	114,00	7,69745E-08	7,69745E-10	7,70E-03	3,85E-03
63	98	100	99	200	3,14E-08	49,00	99,00	3,07328E-08	3,07328E-10	3,07E-03	1,88E-03
63	155	50	132	100	3,14E-08	38,75	66,00	4,45945E-08	4,45945E-10	4,46E-03	
69	163	100	116	200	3,14E-08	81,50	116,00	7,40823E-08	7,40823E-10	7,41E-03	3,70E-03
73	125,5	100	115	200	3,14E-08	62,75	115,00	3,7662E-08	3,7662E-10	3,77E-03	3,08E-03
73	120	100	164	100	3,14E-08	60,00	82,00	8,55273E-08	8,55273E-10	8,55E-03	
75	167,5	200	87,5	500	3,14E-08	167,50	218,75	1,02494E-07	1,02494E-09	1,02E-02	5,69E-03
75	112	200	101	500	1,57E-07	112,00	252,50	1,24994E-07	1,24994E-09	1,25E-02	
78	127	200	73,5	500	3,14E-08	127,00	183,75	7,01801E-08	7,01801E-10	7,02E-03	4,32E-03
78	182	100	92	500	1,57E-07	91,00	230,00	1,02653E-07	1,02653E-09	1,03E-02	
79	154	100	150	200	3,14E-08	77,00	150,00	3,30784E-08	3,30784E-10	3,31E-03	1,65E-03
84	108,5	20	142	20	3,14E-08	10,85	14,20	1,01569E-07	1,01569E-09	1,02E-02	5,08E-03

¹⁵ L'ATP dosée était extraite de 100 µL de liquide du bioréacteur dans 10 mL de Tampon TRIS et la concentration du standard est en Moles•L⁻¹.

ATP du biofilm (ATP_b)

Tableau 14. Données brutes de dosage de l'ATP attaché au support de charbon.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
d	Masse grains (g)	Valeur sur courbe (mm) (Ech+Témoin)	Échelle	Valeur sur courbe (mm) (ech+std)	Échelle	Concentration du standard d'ATP (M.L ⁻¹)	MV témoin (milli-volts)	MV std (milli-volts)	[ATP] ech (M.L ⁻¹)	[ATP] (M.g ⁻¹ charbon)	Données de la figure 5d (kg.m ⁻³ de charbon)
							$(C \cdot D)/200$	$(E \cdot F)/200$	$G/((K/J)-1)$	$((L/100)/B)^{16}$	$K \cdot 1.17 \cdot 5000$
0	2,53E-01	16	10	136	20	1,57E-07	0,80	13,60	9,800E-09	3,877E-10	1,80E-04
0	2,53E-01	114	10	116	20	6,27E-09	5,70	11,60	6,059E-09	2,397E-10	
3	1,19E+00	100	100	102	500	1,96E-06	50,00	255,00	4,780E-07	4,022E-09	2,10E-03
3	1,19E+00	114	100	172	100	1,96E-07	57,00	86,00	3,852E-07	3,241E-09	
6	2,01E-01	186	200	158	500	7,84E-07	186,00	395,00	6,977E-07	3,470E-08	2,05E-02
6	2,01E-01	187,5	100	137	500	1,96E-06	93,75	342,50	7,387E-07	3,673E-08	
9	9,89E-02	91,5	50	96	500	1,96E-06	22,88	240,00	2,065E-07	2,088E-08	
9	9,89E-02	152	200	123	500	1,57E-07	152,00	307,50	1,533E-07	1,550E-08	1,05E-02
12	7,30E-01	92	500	133	500	7,84E-07	230,00	332,50	1,759E-06	2,411E-08	7,50E-03
12	7,30E-01	178	50	158	1000	1,96E-06	44,50	790,00	1,170E-07	1,603E-09	
15	2,74E-01	113	1000	155	1000	7,84E-07	565,00	775,00	2,109E-06	7,687E-08	3,10E-02
15	2,74E-01	115	500	107	1000	1,96E-06	287,50	535,00	2,277E-06	8,297E-08	
15	2,74E-01	152	20	165	50	1,57E-07	15,20	41,25	9,149E-08	3,334E-09	
18	1,90E-01	34,5	10	75	10	7,84E-07	1,73	3,75	6,679E-07	3,509E-08	2,10E-02
18	1,90E-01	105	200	155	500	1,96E-06	105,00	387,50	7,285E-07	3,828E-08	
23	3,19E-01	109,5	100	108,5	200	7,84E-07	54,75	108,50	7,986E-07	2,501E-08	1,00E-02
23	3,19E-01	146	100	109	200	1,57E-07	73,00	109,00	3,180E-07	9,958E-09	
27	3,91E-01	171	200	117	500	7,84E-07	171,00	292,50	1,103E-06	2,823E-08	1,85E-02
27	3,91E-01	192	200	185	500	1,96E-06	192,00	462,50	1,391E-06	3,560E-08	
30	1,22E-01	157	200	107	500	7,84E-07	157,00	267,50	1,114E-06	9,101E-08	5,50E-02
30	1,22E-01	168	200	113	500	7,84E-07	168,00	282,50	1,150E-06	9,398E-08	
32	2,06E-01	84,5	500	123	500	7,84E-07	211,25	307,50	1,721E-06	8,361E-08	4,25E-02
32	2,06E-01	159	500	126	1000	7,84E-07	397,50	630,00	1,340E-06	6,513E-08	
36	4,93E-01	107	200	176	200	7,84E-07	107,00	176,00	1,216E-06	2,468E-08	1,45E-02
36	4,93E-01	85	500	138	500	7,84E-07	212,50	345,00	1,257E-06	2,552E-08	
39	6,33E-02	139	50	190	50	1,57E-07	34,75	47,50	4,274E-07	6,751E-08	3,40E-02
39	6,33E-02	127	100	102	200	1,96E-07	63,50	102,00	3,233E-07	5,107E-08	
42	1,53E-01	112	100	152	200	7,84E-07	56,00	152,00	4,573E-07	2,995E-08	2,30E-02
42	1,53E-01	117	200	94	500	7,84E-07	117,00	235,00	7,774E-07	5,091E-08	
45	3,23E-01	146	100	139	200	7,84E-07	73,00	139,00	8,672E-07	2,682E-08	1,55E-02
48	2,75E-02	185,5	20	112	50	1,57E-07	18,55	28,00	3,078E-07	1,119E-07	3,80E-02
48	2,75E-02	176	20	133	100	1,57E-07	17,60	66,50	5,644E-08	2,052E-08	
51	2,00E-01	190	200	102	500	7,84E-07	190,00	255,00	2,292E-06	1,145E-07	6,50E-02
51	2,00E-01	135	500	181	500	7,84E-07	337,50	452,50	2,301E-06	1,150E-07	
54	1,37E-01	131,5	200	153	500	1,96E-06	131,50	382,50	1,027E-06	7,490E-08	3,55E-02
54	1,37E-01	162	200	84	500	1,96E-07	162,00	210,00	6,615E-07	4,825E-08	
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L

¹⁶ L'ATP attaché sur les grains était extrait dans 10 mL de tampon TRIS.

d	Masse grains (g)	Valeur sur courbe (mm) (Ech+Témoin)	Echelle	Valeur sur courbe (mm) (ech+std)	Echelle	Concentration du standard d'ATP (M•L ⁻¹)	millivolts témoin	millivolts std	[ATP] ech (M•L ⁻¹)	[ATP] (M•g ⁻¹ charbon)	Données de la figure 5d (kg•m ⁻³ de charbon)
57	1,03E-01	192	100	192	200	7,84E-07	96,00	192,00	7,840E-07	7,626E-08	4,20E-02
57	1,03E-01	173	100	120	500	1,96E-06	86,50	300,00	7,941E-07	7,725E-08	
57	7,73E-02	176	100	145	500	1,96E-06	88,00	362,50	6,283E-07	8,129E-08	
57	7,73E-02	184	100	133	200	1,96E-07	92,00	133,00	4,398E-07	5,690E-08	
61	3,35E-01	84,5	500	136,5	500	7,84E-07	211,25	341,25	1,274E-06	3,800E-08	2,75E-02
61	3,35E-01	120	500	120	1000	1,96E-06	300,00	600,00	1,960E-06	5,846E-08	
63	4,48E-02	63	100	122	100	7,84E-07	31,50	61,00	8,372E-07	1,869E-07	6,00E-02
63	4,48E-02	90	50	191	50	1,57E-07	22,50	47,75	1,397E-07	3,119E-08	
69	2,39E-01	125	1000	162	1000	7,84E-07	625,00	810,00	2,649E-06	1,109E-07	5,00E-02
69	2,39E-01	191	200	84	500	1,57E-07	191,00	210,00	1,576E-06	6,598E-08	
73	8,10E-02	125,5	200	168	200	7,84E-07	125,50	168,00	2,315E-06	2,858E-07	1,15E-01
73	8,10E-02	126	500	114	1000	7,84E-07	315,00	570,00	9,685E-07	1,196E-07	
75	9,35E-02	144	500	118	1000	7,84E-07	360,00	590,00	1,227E-06	1,312E-07	1,25E-01
75	9,35E-02	136,5	200	92,5	500	1,96E-06	136,50	231,25	2,824E-06	3,020E-07	
78	2,50E-01	91	500	182	500	7,84E-07	227,50	455,00	7,840E-07	3,137E-08	2,15E-02
78	2,50E-01	121	200	136	500	1,96E-06	121,00	340,00	1,083E-06	4,333E-08	
81	1,66E-01	104	1000	146	1000	7,84E-07	520,00	730,00	1,941E-06	1,173E-07	7,00E-02
81	1,66E-01	96	500	187	500	1,96E-06	240,00	467,50	2,068E-06	1,249E-07	
84	2,39E-01	94	500	139,5	500	7,84E-07	235,00	348,75	1,620E-06	6,777E-08	3,80E-02
84	2,39E-01	97	500	110	1000	1,96E-06	242,50	550,00	1,546E-06	6,467E-08	

Exemple de calcul pour l'ATP

D'une valeur d'ATP_b exprimée en M•g⁻¹ de charbon on transforme par le calcul suivant en kg•m⁻³ de charbon.

Les équivalences sont les suivantes :

Densité du charbon = 1,17g•mL⁻¹

Masse molaire de l'ATP = 500g•M⁻¹

Exemple de calcul pour la dernière colonne de valeurs du tableau 13.

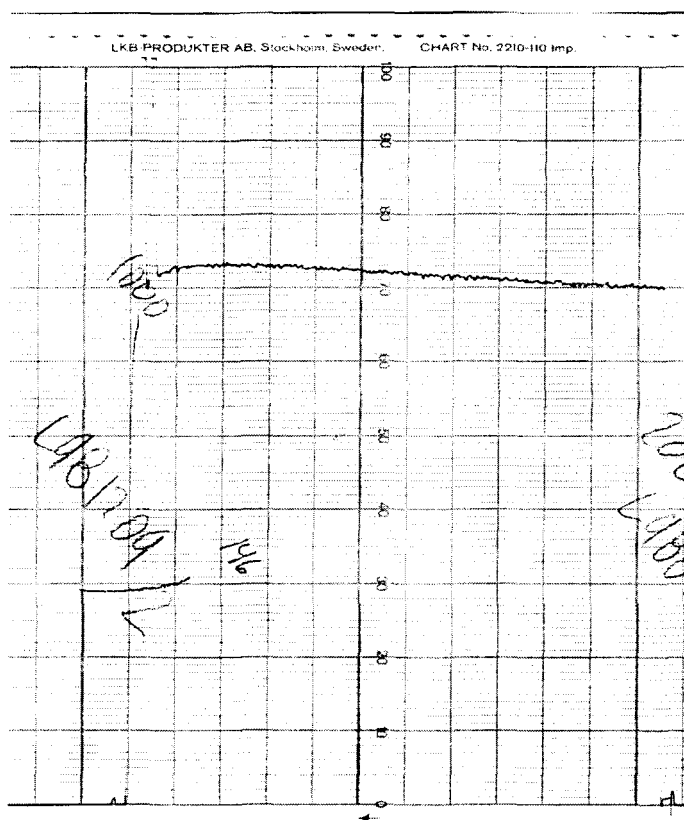
$$6,467E-8 \text{ M} \cdot \text{g}^{-1} \text{ d'ATP} \times 1,17 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} = 7,567E-8 \text{ M} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$7,567E-8 \text{ M} \cdot \text{mL}^{-1} \times 500 \text{ g} \cdot \text{M}^{-1} = 3,783E-5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$3,783E-5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \times 1000 \text{ g} \cdot 1 \text{ kg}^{-1} = 3,783 \text{ E-8 kg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$3,783 \text{ E-8 kg} \cdot \text{mL}^{-1} \times 1\,000\,000 \text{ mL} \cdot 1 \text{ m}^{-3} = \mathbf{3,783E-2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}}$$

Figure 23. Exemple de tracé de luminomètre pour la détermination de l'ATP. Vitesse de déroulement = $1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$



Erreur sur la détermination de l'ATP

Voici le résultat de sept dosages d'ATP en suspension sur un même échantillon du jour 23.

5,6448E-08		
1,0969E-07		
9,4634E-08		
1,0108E-07	Moyenne	1,13E-07
1,3302E-07	Écart type	3,34E-08
1,4533E-07	Coefficient de variation(%)	29,5
1,5235E-07		

Les protéines en suspension (Protéines_s)

Tableau 15. Données brutes de dosage des protéines en suspension.

d	Protéines totales ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Protéines totales ($\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ de solution)	Valeur moyenne protéines totales ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) figure 5a
3	260,1	260,1	0,2601
12	162,4	162,4	0,3239
12	485,3	485,3	
15	106,4	106,4	0,2918
15	477,2	477,2	
18	211,8	211,8	0,4637
18	220,4	220,4	
18	958,9	958,9	
23	439,9	439,9	1,1058
23	1771,6	1771,6	
27	231,6	231,6	0,2316
30	485,7	485,7	0,4857
32	198,2	198,2	0,2618
32	259,4	259,4	
32	327,9	327,9	
36	762,8	762,8	0,7941
36	825,4	825,4	
39	323,2	323,2	0,3232
42	388,9	388,9	0,429
42	469,1	469,1	
45	759,7	759,7	0,7625
45	765,2	765,2	
48	678,2	678,2	0,7327
48	787,1	787,1	
51	832,0	832,0	0,8463
51	860,6	860,6	
54	695,0	695,0	0,7178
54	740,6	740,6	
57	1344,7	1344,7	1,3447
61	40,8	40,8	0,0413
61	41,8	41,8	
63	399,3	399,3	0,6729
63	776,1	776,1	
63	843,3	843,3	
66	396,6	396,6	0,3966
69	453,5	453,5	0,471
69	488,4	488,4	
73	344,3	344,3	0,3691
73	393,9	393,9	

d	Protéines totales ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Protéines totales ($\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ de solution)	Données de la figure 5a
75	231,1	231,1	0,4431
75	543,3	543,3	
75	554,8	554,8	
78	240,4	240,4	0,2711
78	301,8	301,8	
81	223,8	223,8	0,2357
81	247,6	247,6	
84	323,6	323,6	0,393
84	462,4	462,4	

Erreur due à la méthode de dosage

Voici les résultats de 3 dosages sur le même échantillon ($\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) du jour 32 :

198,2
259,4
327,9

Moyenne = 261,8

Écart-type = 64,9

Coefficient de variation = 24,8 %

Protéines attachées au biofilm (Protéines_b)

Tableau 16. Données brutes de concentration de protéines totales attachées au support de charbon

A	B	C	D	E	F
d	Protéine ($\mu\text{g/mL}$)	Poids grains(g)	Conc. sur grains $\left(\frac{\text{grammes protéines}}{\text{grammes charbon}}\right)$	Protéines _b ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ charbon)	Valeurs moy. protéines totales figure 5c
			(B/C)/1 000 000	D•1,17•1 000*	
6	130,5	0,001 8	0,072 5	84,8	76,2
6	225,2	0,003 9	0,057 8	67,6	
9	286,0	0,004 6	0,062 2	72,7	92,8
9	115,6	0,001 2	0,096 4	112,7	
12	242,4	0,007 7	0,031 5	36,8	51,4
12	265,1	0,004 7	0,056 4	66,0	
15	375,9	0,005 0	0,075 2	88,0	88,0
18	271,2	0,003 2	0,084 8	99,2	96,2
18	358,8	0,004 5	0,079 7	93,3	
23	225,9	0,001 9	0,118 9	139,1	139,1
27	339,1	0,003 2	0,106 0	124,0	153,6
27	188,0	0,001 2	0,156 7	183,3	
30	321,8	0,003 2	0,100 6	117,7	118,8
30	400,1	0,003 9	0,102 6	120,0	
32	190,3	0,000 9	0,211 5	247,4	247,4
36	150,1	0,001 0	0,150 1	175,6	175,6
39	381,1	0,004 4	0,086 6	101,3	94,7
39	376,6	0,005 0	0,075 3	88,1	
42	218,0	0,001 2	0,181 7	212,6	214,6
42	166,6	0,000 9	0,185 1	216,5	
45	210,7	0,001 8	0,117 1	137,0	137,0
48	298,6	0,004 3	0,069 4	81,2	101,4
48	394,8	0,003 8	0,103 9	121,6	
51	347,8	0,004 6	0,075 6	88,5	106,7
51	266,8	0,002 5	0,106 7	124,9	
54	358,8	0,003 9	0,092 0	107,6	119,7
54	270,1	0,002 4	0,112 6	131,7	
57	311,2	0,002 7	0,115 3	134,9	104,0
57	373,0	0,005 5	0,067 8	79,3	
57	383,1	0,004 4	0,087 1	101,9	
57	383,7	0,004 5	0,085 3	99,8	
61	278,8	0,003 3	0,084 5	98,8	80,3
61	369,8	0,007 0	0,052 8	61,8	
63	321,9	0,002 5	0,128 8	150,7	150,7

* Densité du charbon = $1,17\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

A	B	C	D	E	F
d	Protéine ($\mu\text{g/mL}$)	Poids grains(g)	Concentration sur grains (g.g de charbon)	Protéines _b ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ charbon)	Valeurs moy. protéines totales figure 5c
66	388,4	0,003 9	0,099 6	116,5	119,2
66	281,2	0,002 7	0,104 2	121,9	
69	353,3	0,004 8	0,073 6	86,1	89,0
69	314,2	0,004 0	0,078 5	91,9	
73	229,4	0,001 4	0,163 8	191,7	129,6
73	391,8	0,006 8	0,057 6	67,4	
75	355,9	0,003 8	0,093 7	109,6	109,6
78	418,8	0,005 3	0,079 0	92,4	133,4
78	268,2	0,001 8	0,149 0	174,4	
81	285,4	0,002 8	0,101 9	119,3	119,3

Acides gras volatils

Tableau 17. Données brutes de concentration d'acides gras volatils dans les échantillons pris au point d'alimentation du bioréacteur.

d	Acide acétique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 6	Acide propionique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 8	Acide iso-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 9	Acide n-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 7
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00		0,00		0,00		0,00	
18	0,00		0,00		0,00		0,00	
23	0,05	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,03		0,00		0,00		0,00	
23	0,00		0,00		0,00		0,00	
27	0,04	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,14		0,00		0,00		0,00	
27	0,11		0,00		0,00		0,00	
30	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,05		0,00		0,00		0,00	
30	0,11		0,00		0,00		0,00	
30	0,07		0,00		0,00		0,00	
33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33	0,00		0,00		0,00		0,00	
33	0,00		0,00		0,00		0,00	
36	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
36	0,05		0,00		0,00		0,00	
36	0,00		0,00		0,00		0,00	
36	0,00		0,00		0,00		0,00	
36	0,00		0,00		0,00		0,00	
36	0,00		0,00		0,00		0,00	
39	0,12	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,05
39	0,13		0,00		0,00		0,03	
42	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02
45	0,04	0,02	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00
45	0,00		0,00		0,01		0,00	
45	0,01		0,00		0,01		0,00	
48	0,14	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
48	0,12		0,00		0,00		0,20	
51	0,08	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
54	0,29	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
54	0,31		0,00		0,00		0,00	
54	0,34		0,00		0,00		0,00	

d	Acide acétique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 6	Acide propionique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 8	Acide iso-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 9	Acide n-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 7
57	0,14	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
57	0,11		0,00		0,00		0,00	
57	0,14		0,00		0,01		0,00	
61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
61	0,00		0,00		0,00		0,00	
63	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03
66	0,25	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,04
66	0,09		0,00		0,00		0,01	
69	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
69	0,05		0,00		0,00		0,00	
69	0,00		0,00		0,00		0,00	
73	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
73	0,05		0,00		0,00		0,00	
73	0,01		0,00		0,00		0,00	
75	0,14	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,03
75	0,09		0,00		0,00		0,00	
78	0,08	0,03	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00
78	0,00		0,00		0,00		0,00	
78	0,00		0,00		0,00		0,00	
84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
84	0,00		0,00		0,00		0,00	
84	0,00		0,00		0,00		0,00	

Tableau 18. Données brutes de concentration d'acides gras volatils dans les échantillons pris au point de mélange du bioréacteur.

d	Acide acétique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 6	Acide propionique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 8	Acide iso-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 9	Acide n-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 7
3	0,30	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,29		0,00		0,00		0,00	
6	0,70	0,75	0,01	0,02	0,00	0,00	0,78	0,78
6	0,77		0,02		0,00		0,73	
6	0,77		0,02		0,00		0,83	
9	2,35	2,30	0,09	0,09	0,00	0,00	1,35	1,33
9	2,25		0,09		0,00		1,31	
12	2,28	2,42	0,40	0,40	0,02	0,01	1,26	1,27
12	2,45		0,42		0,01		1,29	
12	2,52		0,39		0,01		1,27	
15	2,39	2,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,25
15	2,39		0,00		0,00		0,25	
18	2,09	2,11	0,11	0,09	0,01	0,01	1,68	1,69
18	2,19		0,05		0,02		1,77	
18	2,06		0,11		0,01		1,62	
23	0,71	0,73	0,01	0,01	0,02	0,02	0,23	0,19
23	0,78		0,01		0,02		0,19	
23	0,71		0,00		0,01		0,16	
27	1,68	1,22	0,04	0,04	0,01	0,01	0,59	0,58
27	0,98		0,03		0,00		0,59	
27	1,03		0,04		0,00		0,57	
27	1,19		0,05		0,01		0,56	
30	1,75	1,85	0,02	0,02	0,00	0,00	1,50	1,54
30	1,95		0,03		0,00		1,54	
30	1,86		0,02		0,00		1,57	
33	2,11	2,01	0,12	0,11	0,00	0,00	1,13	1,10
33	2,08		0,11		0,00		1,10	
33	1,84		0,10		0,00		1,06	
36	2,75	2,69	0,58	0,54	0,03	0,03	2,62	2,52
36	2,70		0,52		0,03		2,44	
36	2,62		0,53		0,03		2,51	
39	2,21	2,16	0,04	0,03	0,01	0,00	1,46	1,45
39	2,08		0,01		0,00		1,45	
39	2,18		0,03		0,00		1,44	
42	2,58	2,47	0,11	0,11	0,01	0,01	1,62	1,11
42	2,45		0,11		0,01		0,15	
42	2,38		0,11		0,00		1,55	
45	2,60	2,52	0,11	0,09	0,01	0,01	1,59	1,55
45	2,49		0,06		0,01		1,56	
45	2,47		0,11		0,01		1,49	
48	2,65	2,63	0,10	0,10	0,02	0,01	1,74	1,71
48	2,60		0,10		0,00		1,68	

d	Acide acétique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 6	Acide propionique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 8	Acide iso-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 9	Acide n-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figure 7
51	3,39	3,41	0,61	0,53	0,01	0,02	1,59	1,59
51	3,28		0,45		0,01		1,53	
51	3,52		0,60		0,05		1,62	
51	3,43		0,47		0,02		1,60	
54	2,88	3,06	0,55	0,58	0,01	0,01	1,76	1,82
54	3,18		0,62		0,02		1,89	
54	3,11		0,58		0,01		1,81	
57	2,20	2,18	0,26	0,26	0,01	0,02	1,68	1,65
57	2,13		0,25		0,03		1,60	
57	2,22		0,28		0,02		1,68	
61	1,11	1,08	0,19	0,19	0,01	0,01	0,75	0,73
61	1,07		0,18		0,01		0,69	
61	1,06		0,19		0,01		0,74	
63	3,23	3,20	1,33	1,40	0,04	0,04	2,45	2,46
63	3,21		1,45		0,05		2,48	
63	3,16		1,42		0,02		2,45	
66	1,62	1,63	0,08	0,08	0,01	0,01	0,61	0,56
66	1,63		0,07		0,00		0,52	
69	2,25	2,26	0,09	0,08	0,01	0,00	1,59	1,63
69	2,18		0,08		0,00		1,66	
69	2,34		0,08		0,00		1,63	
73	3,56	3,49	0,15	0,14	0,00	0,00	1,30	1,28
73	3,42		0,13		0,00		1,26	
75	2,62	2,80	0,70	0,76	0,02	0,02	1,39	1,50
75	2,67		0,72		0,02		1,43	
75	3,12		0,85		0,01		1,69	
78	2,30	2,24	0,16	0,15	0,01	0,01	1,04	1,02
78	2,17		0,13		0,00		1,01	
78	2,24		0,15		0,01		1,02	
81	2,57	2,68	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	1,31
81	2,80		0,00		0,00		1,27	
81	2,68		0,00		0,00		1,20	
84	1,66	1,71	0,00	0,02	0,00	0,00	1,14	1,12
84	1,76		0,04		0,00		1,09	

Tableau 19. Données brutes de concentration d'acides gras volatils dans les échantillons pris au point de sortie du bioréacteur.

d	Acide acétique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 6 et 4b	Acide propionique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 8 et 4b	Acide iso-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 9 et 4b	Acide n-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 7 et 4b
3	0,32	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,28		0,00		0,00		0,00	
6	0,59	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,92	0,84
6	0,60		0,00		0,00		0,75	
6	0,82		0,01		0,00		0,86	
9	2,13	2,21	0,07	0,07	0,00	0,00	1,06	1,20
9	2,43		0,05		0,00		1,44	
9	2,08		0,08		0,00		1,11	
12	2,61	2,67	0,39	0,39	0,00	0,01	1,22	1,23
12	2,80		0,38		0,01		1,24	
12	2,59		0,39		0,01		1,22	
15	2,12	2,19	0,10	0,11	0,01	0,01	0,37	0,36
15	2,22		0,11		0,00		0,38	
15	2,22		0,11		0,01		0,34	
18	1,84	1,91	0,11	0,10	0,03	0,02	1,62	1,61
18	1,99		0,09		0,02		1,65	
18	1,90		0,09		0,00		1,56	
23	0,85	0,83	0,00	0,01	0,01	0,01	0,17	0,22
23	0,81		0,01		0,01		0,26	
23	0,83		0,01		0,01		0,24	
27	1,62	1,53	0,06	0,06	0,01	0,00	0,77	0,81
27	1,44		0,06		0,00		0,76	
27	1,52		0,05		0,00		0,89	
30	3,04	3,00	0,05	0,04	0,02	0,01	2,34	2,32
30	2,95		0,03		0,01		2,27	
30	3,02		0,04		0,00		2,34	
33	2,16	2,25	0,11	0,12	0,03	0,02	1,17	1,20
33	2,28		0,12		0,00		1,15	
33	2,32		0,12		0,02		1,27	
36	2,87	2,75	0,60	0,57	0,02	0,02	2,81	2,71
36	2,66		0,54		0,02		2,66	
36	2,72		0,57		0,03		2,67	
39	2,59	2,70	0,05	0,05	0,02	0,01	1,83	1,87
39	2,73		0,04		0,01		1,88	
39	2,79		0,05		0,01		1,90	
42	3,50	2,91	0,13	0,11	0,00	0,00	2,33	2,00
42	2,33		0,10		0,00		1,76	
42	2,90		0,09		0,00		1,90	
45	2,64	2,68	0,11	0,11	0,01	0,00	1,60	1,60
45	2,66		0,11		0,00		1,59	
45	2,73		0,11		0,00		1,62	

d	Acide acétique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 6 et 4b	Acide propionique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 8 et 4b	Acide iso-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 9 et 4b	Acide n-butyrique (g•L ⁻¹)	Conc. moyenne figures 7 et 4b
48	2,14	2,33	0,11	0,10	0,02	0,01	1,66	1,49
48	2,27		0,09		0,01		1,43	
48	2,59		0,09		0,01		1,38	
51	3,30	3,33	0,48	0,47	0,00	0,00	1,56	1,55
51	3,26		0,45		0,00		1,52	
51	3,42		0,47		0,00		1,56	
54	3,16	3,16	0,49	0,48	0,01	0,01	1,93	1,97
54	3,13		0,44		0,01		1,94	
54	3,20		0,51		0,02		2,04	
57	2,53	2,60	0,36	0,33	0,02	0,02	1,99	1,92
57	2,60		0,31		0,01		1,88	
57	2,67		0,31		0,02		1,88	
61	2,04	2,13	0,37	0,39	0,00	0,00	1,54	1,57
61	2,00		0,41		0,00		1,59	
61	2,36		0,39		0,00		1,59	
63	2,84	2,31	1,32	1,08	0,04	0,04	2,28	1,89
63	2,71		1,28		0,07		2,20	
63	1,39		0,63		0,01		1,20	
66	1,57	1,59	0,03	0,05	0,01	0,02	0,60	0,59
66	1,60		0,06		0,02		0,57	
69	2,46	2,55	0,08	0,09	0,01	0,01	1,66	1,79
69	2,81		0,11		0,01		2,02	
69	2,39		0,09		0,01		1,69	
73	3,25	3,25	0,15	0,15	0,01	0,01	1,20	1,20
73	3,25		0,15		0,01		1,21	
73	3,26		0,14		0,01		1,20	
75	4,06	4,09	1,23	1,18	0,02	0,02	2,25	2,26
75	4,09		1,15		0,01		2,24	
75	4,13		1,17		0,02		2,29	
78	2,92	2,82	0,17	0,16	0,00	0,00	1,36	1,32
78	2,72		0,15		0,00		1,28	
81	1,77	1,74	0,02	0,01	0,00	0,00	0,82	0,82
81	1,74		0,00		0,00		0,83	
81	1,72		0,00		0,00		0,81	
84	2,38	2,36	0,05	0,04	0,00	0,00	1,64	1,69
84	2,43		0,03		0,00		1,75	
84	2,27		0,04		0,00		1,69	

Tableau 20. Données brutes utilisées pour la figure 4a de la concentration d'équivalents glucose à l'alimentation du bioréacteur.

d	Équivalents glucose (g.L⁻¹)	Valeur moyenne éq. glucose (g.L⁻¹) figure 4a
3	26,57	26,57
6	23,80	23,80
9	23,23	23,23
12	14,57	14,57
15	19,83	19,83
18	16,43	16,43
23	18,34	18,34
27	16,28	16,24
27	16,20	
30	16,48	16,48
32	18,44	18,44
36	18,92	18,92
39	15,87	15,87
42	16,05	16,05
45	18,63	17,43
45	16,23	
48	15,49	15,49
51	15,98	17,28
51	18,57	
54	16,73	16,73
57	18,68	18,68
61	16,45	16,45
63	14,81	14,81
66	11,60	11,60
69	17,47	17,47
73	17,49	17,49
75	17,52	17,52
78	21,96	21,96
81	19,21	19,21
84	19,54	19,54

Tableau 21. Données brutes utilisées pour la figure 4a de la concentration d'équivalents glucose à la sortie du bioréacteur.

d	Équivalents glucose (g·L ⁻¹)	Valeur moyenne éq. glucose (g·L ⁻¹) figure 4a
3	14,02	14,02
6	10,44	10,44
9	35,62	35,62
12	0,86	0,86
15	7,32	7,02
15	6,72	
18	2,92	2,92
23	8,81	8,81
27	10,41	10,41
30	5,40	5,40
32	5,25	5,25
36	0,98	0,98
39	2,65	2,65
42	3,07	3,07
45	4,67	4,67
48	4,52	4,52
51	0,40	0,40
54	3,19	3,19
57	3,01	3,01
61	0,62	0,62
63	2,89	2,89
66	3,22	3,20
66	3,19	
69	2,02	2,02
73	0,95	0,95
75	0,31	0,31
78	3,69	3,69
81	2,95	2,95
84	2,80	2,89
84	2,98	

Tableau 22. Données brutes de réduction des sucres utilisées pour la figure 4a.

d	Pourcentage de réduction des sucres
3	47,2%
6	56,1%
9	-53,4%
12	94,1%
15	64,7%
18	82,2%
23	52,0%
27	35,7%
30	67,3%
32	71,5%
36	94,8%
39	83,3%
42	80,9%
45	73,2%
48	70,8%
51	97,7%
54	80,9%
57	83,3%
61	96,3%
63	80,5%
66	72,3%
69	88,5%
73	94,6%
75	98,2%
78	83,2%
81	84,7%
84	85,2%

ANNEXE 6

CALCUL DU TEMPS DE RÉSIDENCE ET DU TEMPS DE CONTACT

Temps de résidence, selon l'équation 1.

$$t_s = \frac{V_t}{D_a} \quad (1)$$

où:

t_s = temps de résidence
 V_t = volume total du réacteur
 D_a = débit de l'alimentation

$$\begin{aligned} V_t &= 4000\text{mL} - 1296 \text{ mL de charbon (lit avec 53\% de porosité)} \\ &= 4000 \text{ mL} - 609 \text{ mL} = 3391 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$D_a = 50 \text{ mL/min}$$

$$t_s = \underline{67,8 \text{ min}}$$

Temps de contact, selon l'équation 2.

$$t_c = \frac{V_{lit}}{D_a} \quad (2)$$

où:

t_c = temps de contact
 V_{lit} = volume du lit de charbon expansé
 D_a = débit de l'alimentation

$$V_{lit} = 1806\text{mL} - 609 \text{ mL} = 1197\text{mL}$$

$$D_a = 50 \text{ mL/min}$$

$$t_c = \underline{23,9 \text{ min}}$$

ANNEXE 7

COMPOSITION DE LA POUDRE DE PERMÉAT DE LACTOSÉRUM (NON-HYGROSCOPIQUE)

Perméat sous forme de poudre obtenue par procédé de pulvérisation, ayant une composition et une couleur uniformes, exempte de grumeaux durs et de particules noires ou brunes visibles à l'œil nu, de couleur blanche ou crème et ayant une saveur et une odeur typiques après reconstitution.

Composition:	Protéines:	2,0% minimum
	Matières grasses:	1,0% maximum
	Humidité:	5,0% maximum
	Acidité titrable:	16% maximum
	Sédiments:	Disque 2 maximum
	Indice de solubilité:	1,25 ml maximum
	Cendres:	8,0% maximum
	Lactose:	82% minimum
	Sel:	2,5% maximum
Normes	Numération sur plaque:	50 000/g maximum
microbiologiques:	Coliformes:	10/g maximum
	Antibiotiques:	non détection
	Bactéries pathogènes:	non détection

Conditionnement: En sacs de 25 kg (55 lb) composés de 4 plis de papier et d'un sac intérieur indépendant, en polyéthylène de 3 mil. d'épaisseur et attachés avec de la corde et "col de cygne".

Entreposage: Conserver dans un endroit sec et frais, éloignés des murs extérieurs et du plancher.