



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
BENI MELLAL



Département des Sciences de la Vie
Equipe de Bioprocédés et Bio-interfaces

THÈSE

Présentée à la Faculté des Sciences et Techniques BENI MELLAL pour obtenir
le grade de :

DOCTEUR

Etude des interactions de la surface bactérienne avec les surfaces des différents matériaux inertes pour rationaliser l'ingénierie du processus de méthanisation

Spécialité : Microbiologie et Environnement

Option : Bio-ingénierie environnementale

Réalisé par: Mr. Taoufik HAKIM

Encadré par:

Pr. Hassan LATRACHE

Co-encadré par:

Pr. Hafida ZAHIR

Soutenu le devant le Jury composé de :

Monsieur **Mostafa EL LOUALI**, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, **Président**

Monsieur **Khalid HABBARI**, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, **Rapporteur**

Madame **Fatima HAMADI**, Professeur Habilité, Faculté des Sciences, Agadir, **Rapporteur**

Madame **Najma LAAROUSSI**, Professeur, Ecole Supérieure de Technologie, Salé, **Rapporteur**

Madame **Hafida ZAHIR**, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, **Co-Encadrant**

Monsieur **Hassan LATRACHE**, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, **Encadrant**

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

Les travaux présentés ici ont été réalisés au laboratoire de l'équipe de Bioprocédés et Biointerfaces à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. Hassan LATRACHE directeur de l'EBB pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour la confiance qu'il m'a accordée en m'encadrant pour réaliser ce travail. Ainsi que mes plus profonds remerciements à Mme Hafida ZAHIR qui a co-encadré mon travail.

Merci infiniment à M. Mustafa ELLOUALI, Mme Souad Lekchiri et M. Abdeslam JAAFARI pour leur accompagnement, leur soutien et leurs conseils qui m'ont beaucoup apporté.

Un grand hommage à M. Mohamed El Amine AFILAL du laboratoire de biochimie et biotechnologie / Faculté des Sciences Université Mohamed Premier d'Oujda pour son aide inestimable durant mon séjour à son laboratoire ainsi pour son don de la souche bactérienne dont fait l'objet d'étude dans cette thèse.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble du personnel de laboratoire de bioprocédés et bio-interfaces et pour leur esprit d'ouverture, leur enthousiasme, leur disponibilité, leurs conseils et soutiens.

Je profite aussi pour remercier les membres du jury : Qui nous honorent en acceptant d'être membres de jury pour évaluer ce travail.

Un grand merci à ma mère et à ma famille qui m'ont soutenu durant toute ma carrière, et malgré la distance, ils étaient toujours à mes côtés.

Je ne saurai terminer sans remercier tous les doctorantes et les doctorants pour avoir partagé avec moi leurs connaissances et expériences dans le domaine scientifique, ainsi que tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé. À tous ceux qui ne se verront pas cités, cette place vous est réservée.....

Sommaire

Sommaire	2
ملخص.....	7
RESUME.....	8
ABSTRACT	9
Valorisation	10
Liste des abréviations	12
Liste des Figures.....	13
Liste des tableaux	14
Introduction générale.....	16
Objectifs du travail	18
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
Chapitre 1 : Généralité sur les déchets agroalimentaires	20
I. Les margines	20
II. Les effluents de l'industrie laitière	21
III. Méthanisation dans les bioréacteurs à biofilm	21
1. Introduction	21
2. Processus de La méthanisation	21
a) Principe.....	21
b) Processus anaérobies de la méthanisation	22
i. L'hydrolyse.....	22
ii. L'acidogenèse	23
iii. L'acétogenèse.....	23
iv. La méthanogenèse	23
c) Les conditions physicochimiques de la digestion anaérobie.....	24
i. Température.....	24
ii. pH et l'alcalinité.....	25
iii. Potentiel redox.....	25
iv. Humidité.....	25
v. Nutriments	25
3. Procédé industriel de la méthanisation : Procédé à biomasse fixée sur les supports. 26	
a) Bioréacteur à lit expansé ou fluidisé	26
b) Les supports mobiles.....	27

c) Démarrage des digesteurs anaérobies à biomasse fixée	28
Chapitre 2 : Formation d'un biofilm sur un support solide.....	30
I. Définition de biofilm.....	30
II. Domaines d'intervention des biofilms positifs.....	30
III. Constituants d'un biofilm	31
1. Les bactéries	31
2. Substances polymériques extracellulaires (EPS).....	31
3. Étapes de la formation du biofilm	32
a) Mise en place du film conditionnant initiateur.....	32
b) Transport des bactéries vers le support.....	32
c) Adhésion réversible.....	33
d) Adhésion irréversible.....	33
e) Développement précoce du biofilm.....	33
f) Maturation du biofilm	34
g) Détachement et dispersion des bactéries.....	34
IV. Visualisation des biofilms	34
1. Microscopie électronique à balayage (MEB)	34
2. Microscopie à force atomique (AFM).....	35
Chapitre 3 : Adhésion des microorganismes sur des supports solides.....	37
I. Introduction	37
II. Modèles théoriques prédictifs de l'adhésion	37
1. Approche thermodynamique	37
2. Approche de l'adhésion par la théorie classique DLVO	38
3. Théorie de DLVO développée par van Oss (XDLVO).....	39
III. Interactions physicochimiques responsables de l'adhésion.....	41
1. Interactions de van der Waals.....	41
vi. Interaction de Keesom entre dipôles (Forces d'orientation)	42
vii. Interaction de Debye entre dipôle et dipôle induit (Forces d'induction)	42
viii. Interaction de London entre dipôles induits (forces de dispersion)	42
2. Interactions électrostatiques	42
3. Interactions acido-basiques.....	42
IV. Facteurs influençant l'adhésion bactérienne sur un support solide	44
1. Facteurs liés à la surface du support solide	44
a) Géométrie.....	44

b) Rugosité	44
c) Hydrophobicité	45
d) Charge électrique	45
e) Présence d'un film conditionnant sur la surface	45
2. Facteurs physicochimiques liés aux propriétés du milieu de suspension	46
a) Température	46
b) pH	46
c) Composition du milieu	46
3. Facteurs liés aux caractéristiques de la surface bactérienne	47
a) Hydrophobicité	47
b) Charge	47
c) Présence d'appendices et de substances polymériques extracellulaires	47
V. Etude de l'adhésion bactérienne	48
1. Aspects physicochimiques : évaluation de l'interaction bactérie-support	48
2. Aspects microbiologiques ; évaluation du nombre de bactéries adhérentes	50
Conclusion	51
DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES	52
Chapitre 1 : Choix de la bactérie issue d'un digesteur anaérobie et caractérisation physicochimique de la surface bactérienne et des supports	53
I. Introduction	53
II. Matériels et méthodes	53
1. Choix de la souche bactérienne et son rôle dans le digesteur anaérobie	53
a) Tests biochimiques	53
b) Souche bactérienne et conditions de culture	54
c) Préparation d'une suspension bactérienne	54
2. Mesure de l'angle de contact	54
3. Choix des matériaux des supports	55
a) Protocole de nettoyage et de désinfection des supports	55
b) Mesure de l'angle de contact :	56
4. Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports	56
III. Résultats et discussion	56
1. Test biochimique de la bactérie	56
2. Caractérisation physicochimique de la surface bactérienne	57
3. Caractérisation physicochimique de la surface des supports	59

4.	Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports.....	59
IV.	Conclusion	60
Chapitre 2 : Effet des effluents des industries agroalimentaires sur les propriétés physicochimiques des supports et sur l'adhésion prédictive.....		
61		
I.	Introduction	61
II.	Matériels et méthodes	62
1.	Mesure de l'angle de contact des supports après traitement par les effluents des industries agroalimentaires	62
2.	Mesure de l'angle de contact des supports après traitement par les déchets liquides de l'usine de lait en fonction du temps de traitement	62
III.	Résultats et discussion	63
1.	Caractérisation physicochimique de la surface des supports traités par les déchets organiques	63
2.	Caractérisation physicochimique de la surface des supports traités par les déchets liquides de l'usine de lait en fonction du temps.....	68
3.	Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports traités et non traités	73
a)	Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports non traités et traités par les déchets liquides organiques	73
b)	Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports non traités et traités par les déchets du lait en fonction du temps	74
IV.	Conclusion	75
Chapitre 3 : Adhésion expérimentale de la bactérie sur les supports et rôle du film conditionnant		
77		
I.	Introduction	77
II.	Matériels et méthodes	78
1.	Souche bactérienne et conditions de culture.....	78
2.	Méthode de dénombrement des cellules adhérentes.....	78
III.	Résultats et discussion :	80
1.	Adhésion de la bactérie sur différents supports non traités :	80
2.	Adhésion expérimentale de la bactérie sur les supports traités par les matières organiques des déchets liquides agro-alimentaires	81
IV.	Conclusion	86
Chapitre 4 : Influence de la bactérie sur les polyphénols totaux des margines.....		
87		
I.	Introduction	87
II.	Matériels et méthodes	87
1.	Mode opératoire.....	87

a) Les margines M2018.....	87
b) Les margines M2019.....	87
2. Extraction des composés phénoliques des margines	88
3. Dosage des polyphénols totaux	88
III. Résultats et discussion	89
1. La gamme étalon	89
2. Dosage des polyphénols totaux	90
a) Les margines M2018.....	90
b) Les margines M2019.....	91
IV. Conclusion	92
Conclusion générale	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	96
Annexe	114

ملخص

الالتصاق البكتيري بالأسطح الخاملة هو العامل المحدد الذي يتحكم في سرعة بدء التشغيل والأداء النهائي لمفاعلات الهضم اللاهوائي المنتجة لغاز الميثان لهضم المواد العضوية. يشكل هذا العمل دراسة للأليات المشاركة في الالتصاق الأولي لبكتيريا معزولة من مفاعل الهضم اللاهوائي على أسطح المواد البلاستيكية. مع وضع ذلك في الاعتبار، قمنا بتمييز الأسطح البكتيرية وتلك الخاصة بالدعامات المستخدمة بشكل شائع في أجهزة الهضم الحيوية ودرسنا ظاهرة التصاق البكتيريا بهذه الدعامات المشروطة بالمادة العضوية.

لقد أظهرنا أن البكتيريا اللاهوائية الاختيارية لها طابع محب للماء، وخاصية مانحة للإلكترون مهمة للغاية خاصة متقبل إلكترون ضعيفة. الدعامات المدروسة (بولي إيثيلين تريفثاليت، بولي بروبيلين ومتعدد كلوريد الفينيل) تظهر جميعها طابع كاره للماء، خاصية مانح إلكترون ضعيفة وخاصية متقبل إلكترون ضعيفة للغاية. أدت معالجة الدعامات بمياه عصر الزيتون (المرجان أو الزيبار) عمرها سنتان إلى عكس طبيعة الكارهة للماء إلى محبة للماء وزادت بشكل كبير من الطابع المانح للإلكترون. لم تؤد المعالجة بالمرجان حديثة العهد ومخلفات مصنع الحليب إلى تعديل الطبيعة الكارهة للماء للدعامات، بينما زادت من خاصية مانح الإلكترون ويتأثر طابع متقبل الإلكترون للدعامات الثلاثة قليلاً بالمعالجة.

يتم تقييم إجمالي طاقة الالتصاق للسطح البكتيري بالدعامات المختلفة التي تم اختبارها على أساس النهج التنبئي المطور نظرياً، يكون التصاق البكتيريا مناسباً للدعامات الثلاثة غير المعالجة بالتصنيف التالي: بولي بروبيلين < متعدد كلوريد الفينيل < بولي إيثيلين تريفثاليت. لا تتصرف البكتيريا بنفس الطريقة تجاه الدعامات المعالجة تظهر البكتيريا التصاقاً كبيراً يبلغ حوالي 10^5 و.ت.م/سم² لا للدعامات الغير معالجة. أدت معالجة هذه الدعامات بالمرجان أو بمخلفات الحليب إلى زيادة معدل الالتصاق بنحو 10^{11} وحدة تشكيل مستعمرة / سم².

لوحظ وجود علاقة جيدة بين النظرية والخبرة للدعامات غير المعالجة، ومن ناحية أخرى فإن النظرية ليست كافية لشرح الالتصاق القوي للبكتيريا على الدعامات المعالجة بالمرجان أو بمخلفات الحليب.

يعد تعديل الخصائص الفيزيائية والكيميائية للدعامات الثلاثة المعالجة ومعدل الالتصاق البكتيري على هذه الدعامات نتيجة لخصائص المادة العضوية (العمر ومحتوى الدهون، البولي فينول للمرجان؛ محتوى الدهون، البروتين والسكر لمخلفات الحليب).

أظهر التفاعل بين البكتيريا والمرجان أنه في ظل الظروف الهوائية، تمتلك البكتيريا القدرة على تقليل محتوى البولي فينول الكلي في المرجان.

الكلمات الدالة: كره الماء، معطي/مستقبل الإلكترون، الطاقة الحرة لأسطح، التصاق، غشاء حيوي، معالجة الميثان، المرجان، دعامات، مخلفات الحليب السائلة، بدء تشغيل جهاز الهضم الحيوي، إجمالي البولي فينول

RESUME

L'adhésion bactérienne aux surfaces inertes représente le paramètre déterminant qui gouverne à la fois la vitesse de démarrage et les performances finales des digesteurs de méthanisation de la matière organique. Ce travail constitue une étude des mécanismes impliqués dans l'adhésion initiale d'une bactérie isolée du digesteur de méthanisation aux matériaux plastiques couramment utilisés dans les digesteurs. Dans cette optique, nous avons caractérisé les surfaces bactériennes et celles des supports et étudié le phénomène d'adhésion de la bactérie sur ces supports avant et après conditionnement par la matière organique.

Nous avons montré que la bactérie anaérobie facultative, a un caractère hydrophile, un caractère donneur d'électron très important et un caractère accepteur d'électron peu marqué. Les supports étudiés PET, PP et PVC, présentent tous un caractère hydrophobe, un caractère donneur d'électron faible et un caractère accepteur d'électron très faible. Le traitement des supports par les margines âgées de 2 ans a inversé le caractère hydrophobe en hydrophile et a augmenté significativement le caractère donneur d'électron des 3 supports. Le traitement par les margines fraîches et les déchets du lait, n'ont pas modifié le caractère hydrophobe des supports, tandis qu'il a augmenté le caractère donneur d'électron. Le caractère accepteur d'électron des 3 supports est peu influencé par le traitement.

L'énergie totale d'adhésion de la surface bactérienne aux différents supports testés est évaluée sur la base de l'approche prédictive développée XDLVO. Théoriquement, l'adhésion de la bactérie est favorable sur les 3 supports non traités avec le classement suivant : PP>PVC>PET. La bactérie ne se comporte pas de la même manière vis-à-vis des supports traités.

La bactérie manifeste une adhésion expérimentale importante de l'ordre de 10^5 UFC/cm² aux PET, PP et PVC non traités. Le traitement de ces supports par les margines et les déchets du lait a augmenté considérablement le taux d'adhésion de l'ordre de 10^{11} UFC/cm².

Une bonne corrélation entre la théorie et l'expérience est observée pour les supports non traités, par contre la théorie XDLVO ne suffit pas pour expliquer la forte adhésion de la bactérie sur les supports traités par les margines et les déchets du lait.

La modification des propriétés physicochimiques des trois supports traités et le taux de l'adhésion bactérienne sur ces supports est la conséquence des caractéristiques de la matière organique.

L'interaction entre la bactérie et les margines a montré que dans les conditions aérobies, la bactérie a la capacité de réduire la teneur en polyphénols totaux des margines.

Mots clés : Hydrophobicité, Caractère donneur/accepteur d'électron, Energies libres de surface, Adhésion, Biofilm, Méthanisation, Margines, Supports PET, PP et PVC, Déchets liquides de laitière, Démarrage du digesteur, Polyphénols totaux.

ABSTRACT

Bacterial adhesion to inert surfaces represents the main parameter that governs both the starting speed and final performance of olive-mill wastewater digesters. This work is a study of the mechanisms involved in the initial adhesion of a bacterium isolated from the digester of anaerobic digestion to plastics materials commonly used in digesters from this point of view, we have characterized the bacterial surfaces and those of the supports and studied the phenomenon of bacterial adhesion on these supports conditioned by organic matter.

We have shown that the facultative anaerobic bacterium has a hydrophilic character, a very important electron donor character and a weak electron acceptor character. The supports studied PET, PP and PVC; all have a hydrophobic character, a weak electron donor character and a very weak electron acceptor character. The treatment of the supports with 2-year-old olive-mill wastewater reversed the hydrophobic character to hydrophilic and significantly increased the electron donor character. The treatment with fresh olive-mill wastewater and dairy wastewater did not modify the hydrophobic character of the supports, while it increased the electron donor character. The electron-accepting character of the 3 supports is little influenced by the treatment.

The total energy of adhesion of the bacterium to the different substrates tested is evaluated on the basis of the extended predictive approach XDLVO. Theoretically, the adhesion of the bacterium is favorable on the 3 untreated supports with the following classification: PP>PVC>PET. The bacterium does not behave in the same way towards the treated supports.

The bacterium shows significant adhesion of around 10^5 CFU/cm² to untreated PET, PP and PVC. The treatment of these supports by olive-mill wastewater and dairy wastewater has considerably increased the adhesion rate in the order of 10^{11} CFU/cm².

A good correlation between theory and experience is observed for untreated supports. On the other hand, the XDLVO theory is not sufficient to explain the strong adhesion of the bacteria on supports treated by olive-mill wastewater and dairy wastewater.

The modification of the physicochemical properties of the three treated supports and the rate of bacterial adhesion on these supports is the consequence of organic matter characteristics.

The interaction between the bacterium and the olive-mill wastewater has shown that under aerobic conditions, the bacterium has the ability to reduce the total polyphenol content of the olive-mill wastewater.

Keywords: Hydrophobicity, Electron donor/acceptor character, Free surface energies, Adhesion, Biofilm, Methanization, Olive-mill wastewater, Supports PET, PP and PVC, Dairy wastewater, Start-up digester, Total polyphenol.

Valorisation

Ce travail a été valorisé par :

Publications Internationales

- **Taoufik Hakim**, Souad Lekchiri, Abdeslam Jaafari, Safae Tankiouine, Mohamed El Amine Afilal², Mostafa Ellouali¹, Hafida Zahir, Hassan Latrache (2020) *Advances in Bioscience and Biotechnology* “Study of initial adhesion of a bacterium to different support materials before and after conditioning film of olive oil-mill wastewater”.
- **Taoufik Hakim**, Souad Lekchiri, Mohamed El Amine Afilal, Mostafa Ellouali, Hafida Zahir and Hassan Latrache (2020) *Biosciences Biotechnology Research Asia* “Modifying supports surfaces by dairy wastewater conditioning film and relationship with initial bacterial adhesion”.
- Safae Tankiouine, Hafida Zahir, Mourad El goulli, Kaoutar El fazazi, Abdelwahid Assaidi, **Taoufik Hakim**, Mostafa El louali, Hassan Latrache (2020) *Food Nutrition Sciences* “Biocontamination risk of *Staphylococcus aureus* in dairy manufacturing presence of two types of UHT milk”.
- Souad Lekchiri, **Taoufik Hakim**, Abdeslam Jaafari, Hafida Zahir, Kaoutar El Fazazi, Redouane Benabess, Mostafa El Oualli, Hassan Latrache *IC-SEWEN 2019 Springer* “Biochemical and physicochemical mechanisms involved in Fusarium-Date palm Interaction”.

Communication

- **T. HAKIM**, H. ZAHIR, S. LEKCHIRI, M.E. AFILAL, H. LATRACHE, “Organic matter of dairy wastewater effects on the physicochemical properties of the plastic support’s surfaces and on the adhesion of a bacterium isolated from a digester” Fès 29 /02/2020
- **T. HAKIM**, H. ZAHIR, S. LEKCHIRI, M.E. AFILAL, H. LATRACHE, “The effect of conditioning film’s olive-mill wastewater on the physicochemical characteristics of plastic carriers and the adhesion of an insulated bacterium of the methanization digester” Ifrane 16-18/10/2019
- **T. HAKIM**, H. ZAHIR, S. LEKCHIRI, M.E. AFILAL, H. LATRACHE, « Effets de la température et la nature des déchets sur les caractères physico-chimiques des supports des digesteurs anaérobies (biocarriers) » Fès 21-23/02/2019

- **T. HAKIM**, S. LEKCHIRI, H. ZAHIR, M.E. AFILAL, H. LATRACHE, “Evaluation of the role of the physicochemical characteristics of the surfaces of plastic supports and bacteria involved in the biogasifier start-up phase” Salé 19-20/10/2018
- **T. HAKIM**, S. LEKCHIRI, H. ZAHIR, M.E. AFILAL, H. LATRACHE, “The impact of organic matter on the physicochemical characteristics of anaerobic digester biocarriers” Fès 13-14/02/2018
- **T. HAKIM**, S. LEKCHIRI, H. ZAHIR, H. LATRACHE, “Study of the adhesion phenomena between the agent of fire blight and the host *Malus spp.* (Apple)”, Mohammadia 26/10/2016

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribose nucléique.

AFM : microscope à force atomique.

AGV : acides gras volatiles

AI : Auto-inducteur

DBO : Demande biologique en oxygène

DCO : Demande chimique en oxygène

DLVO : Derjaguin et Landau et Verwey et Over Beek.

D : Diiodométhane

ESP : Exopolysaccharides

F : Formamide

LBL : Luria Bertani liquide

LBS : Luria Bertani solide

M : margines

MEB : Microscope Electronique à Balayage

PET : polyéthylène Téréphtalate

PP : polypropylène

PVC : polychlorure de vinyle

R_{max}: rugosité maximale.

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanked

UFC : unités formants colonies

w : Eau « *Water* ».

Liste des Figures

Figure 1: Les margines	20
Figure 2: Principaux flux métaboliques de la digestion anaérobie	22
Figure 3: Supports mobiles	27
Figure 4: Bioréacteur à lit fluidisé ..	27
Figure 5: Supports mobiles avant et après formation du biofilm (Moletta, 2002).....	28
Figure 6: Paramètres influençant le démarrage des réacteurs à forte charge (Zellner et al. 1991)	29
Figure 7: Observation microscopique d'un biofilm (Donlan CMR, 2002).....	30
Figure 8: Observation microscopique des bactéries d'un biofilm (Donlan CID, 2001)	31
Figure 9: Représentation schématique de la formation d'un biofilm	32
Figure 10: La microscopie électronique à balayage environnemental	35
Figure 11: Photographies de biofilm en microscopie électronique à balayage à différents temps de croissance. Fernandez et al ,2008	35
Figure 12: Schéma représentatif du microscope à force atomique	36
Figure 13: Approche thermodynamique d'adhésion. a) adhésion défavorable b) adhésion favorable (Bos et al,1999)	37
Figure 14: Profil d'une goutte déposée sur un substrat d'après YOUNG	40
Figure 15: les interactions physicochimiques possibles entre un microorganisme et un support solide	41
Figure 16: Technique de mesure des angles de contact (θ) au point triple entre le liquide (L), le support (S) et le vapeur (V). (Habouzit et al., 2010).....	48
Figure 17: Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de leurs affinités (Petrov, P.G et al. 1991)	48
Figure 18 : l'appareil de mesure de l'angle de contacte (le goniomètre)	49
Figure 19 : Etapes de préparation de la suspension à partir d'une culture bactérienne	54
Figure 20 : Protocole pour mesurer l'angle de contact d'un tapis bactérien ou les supports ...	55
Figure 21: Protocole de nettoyage et désinfection des supports	56
Figure 22 : Adhésion prédictive (ΔG_{Total}) de la bactérie sur les supports (PET, PP et PVC) 60	60
Figure 23: Protocole de mesure de l'angle de contact des supports et les supports traités par les déchets organiques liquides.....	63
Figure 24: Angle de contact de l'eau (θ_w) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L).....	64
Figure 25: Hydrophobicité quantitative (ΔG_{iwi}) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L)	65
Figure 26: Caractère donneur d'électrons (γ^-) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L)	66
Figure 27: Caractère accepteur d'électrons (γ^+) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L)	67

Figure 28: Hydrophobicité qualitative du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) en fonction du temps de traitement par les déchets du lait.....	68
Figure 29: Hydrophobicité quantitative du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) en fonction du temps de traitement par les déchets du lait.....	69
Figure 30: Effet du temps du traitement par les déchets du lait sur le caractère donneur d'électrons (γ^-) des supports (PET, PP, PVC).....	70
Figure 31: Caractère accepteur d'électrons (γ^+) des supports (PET, PP, PVC) non traités (0 h) et traités par les déchets du lait pendant 3h, 6h, 18h et 24h.....	71
Figure 32: Adhésion prédictive (ΔG^{Total}) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines 2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines 2018 stérilisées) et les déchets du lait L	74
Figure 33: Adhésion prédictive (ΔG^{Total}) des supports (PET, PP, PVC) non traités (0h) et traités par les déchets du lait en fonction du temps.....	75
Figure 34: Schéma des étapes de la méthode de dénombrement des cellules adhérentes sur les supports	79
Figure 35: L'adhésion de la bactérie sur les supports non traités	80
Figure 36 : Adhésion de la bactérie sur les supports traités par les margines MAS (margines 2016 stérilisées), MNS (margines 2018 stérilisées) et les déchets du lait L	81
Figure 37 : La gamme étalon en équivalent en acide gallique	89
Figure 38 : Taux de biodégradation des polyphénols totaux dans les mélanges B (margines 2018+ suspensions bactériennes) à 25°C et 37°C	90
Figure 39 : Taux de biodégradation des polyphénols totaux dans les mélanges B (margines 2019+ suspensions bactériennes) à 25°C et 37°C et le mélange F (margines 2019+ suspensions bactériennes+ supports PP)	91

Liste des tableaux

Tableau 1: Valeurs des différentes composantes de liquides utilisés dans la mesure de l'énergie de surface (Hadjiev D et al 2007).....	49
Tableau 2: Propriétés physiques u polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) (www.wikipédia.com)	55
Tableau 3 : Résultats des tests biochimiques de la bactérie	57
Tableau 4: Angle de contact et composantes de l'énergie de surface de la bactérie.....	58
Tableau 5: Angle de contact et composantes de l'énergie de surface du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC). L'écart-type est donné entre parenthèse	59
Tableau 6 : Corrélacion entre les caractères physicochimiques des surfaces des supports [non traités (NT), traités par les margines anciennes stérilisées (MAS), traités par les margines nouvelles stérilisées (MNS) et traités par les déchets du lait (L)] et l'adhésion bactérienne ...	83
Tableau 7 : Angle de contact et composantes de l'énergie de surface du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) traités par les	

différentes margines et les déchets liquide de l'usine du lait. L'écart-type est donné entre parenthèse ; MA (marges2016) ; MAS (marges 2016 stérilisées) ; MN (marges 2018) ; MNS (marges2018 stérilisées) ; L (déchet de l'usine du lait)..... 114

Tableau 8 : Angle de contact et composantes de l'énergie de surface du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) traités et non traités par les déchets liquides du lait en fonction du temps (0h, 3h, 6h, 18h et 24h) 115

Introduction générale

Le traitement des eaux usées est devenu une nécessité pour répondre à un double objectif : débarrasser l'environnement des matières organiques qui peuvent le nuire et réutiliser l'eau traitée pour l'irrigation surtout pour les pays qui connaissent un stress hydrique comme le Maroc. Dans la région de Béni Mellal est très connue pour ses atouts en activité agricole et industries agro-alimentaires. Les eaux usées générées par ces activités comme les margines et les effluents des laitières représentent un danger pour l'environnement en cas où elles ne sont pas traitées car elles sont très chargées en matières organiques (Dermeche et al. 2013 ; Lhanafi et al. 2014). Plusieurs méthodes sont utilisées pour réduire le risque de ces polluants, parmi elles : l'épandage (Cabrera et al., 1996 ; Healy et al. 2007), la coagulation-floculation (Mateus et al. 2017), l'oxydation électrochimique (Gotsi et al., 2005 ; Mohan et al. 2010), la filtration membranaire (Zagklis et al. 2015 ; Bortoluzzi et al. 2017), l'osmose inverse (Ochando-Pulido et al. 2012 ; Vourch et al. 2008) et le traitement biologique qu'il soit aérobie (Olivieri et al. 2006) ou anaérobie produisant du biogaz ((Rincón et al. 2009 ; Karadag et al. 2015). Bien que le traitement d'effluents des industries agroalimentaires par fermentation anaérobie ait subi un essor considérable depuis quelques années, les mécanismes impliqués dans la formation du biofilm sont encore mal connus. Dans le domaine du traitement d'effluents d'origine agro-industrielle, la période de démarrage des installations industrielles de méthanisation est une étape critique. En effet, l'ensemencement des réacteurs est souvent insuffisant quantitativement et mal équilibré par rapport à la composition de l'effluent à traiter, en particulier en ce qui concerne les populations microbiennes : acétogènes et méthanogènes dont le temps de doublement est très lent dans les conditions des réacteurs alimentés en continu. Il s'ensuit une période d'adaptation de l'inoculum d'autant plus longue que le maintien des bactéries au sein du réacteur est mal maîtrisé. C'est cet objectif d'optimisation de la rétention bactérienne au sein du bioréacteur à biofilm que poursuivent les procédés de traitement anaérobie des déchets organiques agro-industrielles. L'option la plus séduisante est la fixation des bactéries sur des supports inertes pour la formation du biofilm, ce qui permet une rétention optimale de la biomasse. Bien que la connaissance de l'ultrastructure, de la composition et des activités métaboliques des boues granuleuses permette de fournir des informations descriptives, elle ne renseigne en rien sur les mécanismes impliqués dans la colonisation initiale des supports plastiques par des bactéries anaérobies. L'adhésion de micro-organismes aux surfaces inertes ou d'autres organismes est un phénomène omniprésent dans de nombreux domaines (infection de tissus, formation de la plaque dentaire, bioréacteurs, ...). Le processus d'adhésion bactérienne aux surfaces solides est essentiellement déterminé par les propriétés de surface de la cellule bactérienne, du substratum et du liquide de suspension. De toute évidence, la compréhension des mécanismes d'adhésion bactérienne doit passer, étant donné la complexité des phénomènes impliqués, par une caractérisation des interfaces support/bactérie. Cette caractérisation nécessite une connaissance détaillée des propriétés physicochimiques des surfaces en interaction. L'approche physico-chimique de l'adhésion bactérienne est couramment basée sur les énergies libres de surface et le caractère donneur /accepteur d'électrons.

Notre travail portera plus précisément sur l'adhésion de bactéries aux supports d'intérêts utilisés dans les digesteurs anaérobiques appelés aussi méthaniseurs. Nous chercherons à caractériser l'interface solide/bactérie de manière à préciser les mécanismes qui interviennent lors de l'interaction. Pour ce faire, nous aurons recours à des techniques d'analyse de surface (angle de contact et la méthode de dénombrement des cellules). Dans le but de raccourcir la période de démarrage du procédé de la digestion anaérobie des margines et des déchets liquides de l'usine du lait, il est nécessaire d'acquérir une meilleure compréhension des interactions microbiennes et des facteurs physicochimiques impliqués dans l'adhésion des bactéries sur les supports en plastiques. Etant donné que les margines sont connues par leur teneur élevée des polyphénols toxiques, l'influence des interactions des bactéries avec les margines dans le prétraitement biologique de ces dernières est aussi étudié.

La réduction de la durée de démarrage d'un digesteur est un des paramètres clés pour augmenter la compétitivité des réacteurs anaérobies à fortes charges (Weiland et al. 1991). Depuis quelques années, il y a une tendance à utiliser des supports dans les digesteurs pour fixer la biomasse. La mise au point d'un protocole standard efficace de démarrage des réacteurs anaérobies à biomasse fixée faciliterait leur utilisation au niveau industriel.

Dans le but de raccourcir la période de démarrage des digesteurs anaérobies et ainsi d'augmenter les performances du procédé, il est nécessaire d'acquérir une meilleure compréhension des interactions microbiennes et des facteurs physico-chimiques impliqués dans l'adhésion bactérienne initial sur les supports et ainsi la formation des biofilms.

Cependant, si les concepts généraux qui permettent d'expliquer les phénomènes d'adhésion des micro-organismes sont relativement bien connus, leur application au domaine particulier du traitement anaérobie des effluents liquides par des procédés à culture fixée demeure inexplorée.

Objectifs du travail

La réduction de la durée de démarrage d'un digesteur est un des paramètres clés pour augmenter la compétitivité des réacteurs anaérobies à fortes charges (Weiland et al. 1991). Depuis quelques années, il y a une tendance à utiliser des supports dans les digesteurs pour fixer la biomasse. La mise au point d'un protocole standard efficace de démarrage des réacteurs anaérobies à biomasse fixée faciliterait leur utilisation au niveau industriel.

Dans le but de raccourcir la période de démarrage des digesteurs anaérobies et ainsi d'augmenter les performances du procédé, il est nécessaire d'acquérir une meilleure compréhension des interactions microbiennes et des facteurs physico-chimiques impliqués dans l'adhésion bactérienne initial sur les supports et ainsi la formation des biofilms.

Cependant, si les concepts généraux qui permettent d'expliquer les phénomènes d'adhésion des micro-organismes sont relativement bien connus, leur application au domaine particulier du traitement anaérobie des effluents liquides par des procédés à culture fixée demeure inexplorée.

Donc notre travail a pour objectifs de :

- Étudier les caractéristiques physicochimiques d'une bactérie utilisée ayant montré une capacité d'améliorer le processus de méthanisation.
 - Étudier les caractéristiques physicochimiques de 3 matériaux les plus utilisés dans les différents digesteurs (PVC, PP et PET) pour la fabrication des supports (biocarriers)
 - Étudier l'effet des margines et des déchets liquides de lait sur les caractéristiques physicochimiques des surfaces des supports.
 - Étudier l'adhésion de la bactérie sur les différents supports.
 - Étudier l'effet des déchets agroalimentaires (les margines et les effluents liquides de l'usine laitier) sur l'adhésion de la bactérie sur ces supports.
-
- Parallèlement à ces objectifs visant à fournir des outils d'aide au choix du matériau support (de la bactérie sujet de notre étude) pour le processus de méthanisation, une investigation a été menée pour valoriser cette bactérie dans le prétraitement des margines en recherchant son pouvoir de biodégrader des polyphénols

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Généralité sur les déchets agroalimentaires

Le Maroc a connu ces dernières années un stress hydrique. Cela a créé un manque pour subvenir aux besoins en eau potable, l'irrigation et l'industrie. Le changement climatique va aggraver cette situation dans les années à venir. Le traitement des eaux usées est devenu une nécessité, en particulier pour les pays souffrant de pénurie en eau. Il répond à un double objectif : premièrement, nettoyer l'environnement de l'excès de déchets organiques et deuxièmement pour réutiliser l'eau traitée à l'irrigation et l'industrie. La région de Béni Mellal est connue pour son activité agricole. Elle engendre par le biais de ces industries agroalimentaires d'énormes quantités en eaux usées, notamment les effluents de l'industrie laitière et les margines.

I. Les margines

Le procédé d'extraction de l'huile d'olive engendre la production d'effluents liquides, nommés margines. Quelques fois, on peut trouver le terme eaux de végétation. Les margines se présentent sous la forme d'un liquide visqueux ayant une coloration brune noirâtre et une odeur désagréable (Gaime-Perraud et al. 2009).



Figure 1: Les margines

Parallèlement à la production d'huile d'olive, les pays producteurs rejettent dans la nature des déchets liquides appelées margines. Ces dernières posent un vrai problème environnemental. Les margines sont extrêmement chargées en matières organiques particulièrement en composés phénoliques qui exercent une activité polluante très élevée. D'ailleurs, Ranalli et al 1991, rapporte qu'un mètre cube de margines provoque une pollution égale à celle de 1500 personnes en un jour. Le rejet de ces effluents dans les milieux aquatiques entraîne une diminution de la concentration en oxygène dissous. Les composés phénoliques s'oxydent facilement par l'oxygène du milieu, ce qui rend l'environnement irrespirable avec une asphyxie de toute vie aquatique (Khoufi et al 2007). Ce phénomène entraîne donc une dégradation de la qualité des eaux de surface en inhibant le développement des microorganismes spécialement les bactéries (Ben sassi et al 2006). Par conséquent, la capacité d'autoépuration naturelle serait limitée.

L'épandage direct des margines sur le sol est à l'origine de nuisances diverses (Yaakoubi et al. 2009). Leur pH acide, leur salinité élevée ainsi que leur abondance en composés phénoliques provoquent la destruction de la microflore du sol et induisent des effets toxiques aux cultures végétales (effets herbicides). Ceci entraîne la stérilisation du sol et le déséquilibre de la symbiose entre la microflore du sol et les plantes (Ben sassi A et al. 2006). Pour réduire les effets négatifs des margines sur l'environnement, La digestion anaérobie peut être utilisée comme un moyen de traitement et de valorisation des margines en bioénergie (Ergüder et al.

2000 ; Fountoulakis et al. 2002). En effet, la digestion anaérobie des margines offre des avantages significatifs en matière de réduction de la consommation d'énergie et de la production de boues de qualité agronomique. De plus, elle a révélé des performances élevées en comparaison avec le traitement anaérobie des autres rejets industriels agroalimentaires (Anderson et al. 1977). Parmi les avantages de ce type de traitement :

- les bactéries anaérobies ont la capacité de transformer en méthane la plupart des substances organiques présentes. La demande de nutriments est faible.
- les mauvaises odeurs ne sont pas émises.

II. Les effluents de l'industrie laitière

L'industrie laitière représente un intérêt économique et nutritionnel pour les sommes qu'elle génère et les produits laitiers sont très importants pour la nutrition humaine. Mais cette industrie génère beaucoup d'eaux usées. La quantité d'eaux usées varie entre 0,2 et 10 L pour un litre de lait traité, cette différence est due au produit laitier final et au processus industriel suivi (lait, yaourt, glace, lait en poudre, beurre, fromage, etc.) (Balannec et al. 2005). Les eaux résiduaires des laiteries sont fortement chargées en matières organiques (Lhanafi et al. 2014).

III. Méthanisation dans les bioréacteurs à biofilm

1. Introduction

Les digesteurs anaérobies (DA) sont apparus depuis très longtemps, on trouve les premières utilisations pour la production du biogaz en Inde depuis le 19^{ème} siècle. Dès 1897, le gaz issu de la fermentation des effluents sanitaires d'une léproserie (Matinga Leper) fut utilisé pour l'éclairage alors qu'en 1896, le gaz issu des boues était utilisé pour l'éclairage des rues d'Exeter en Angleterre. La recherche appliquée relative à la digestion anaérobie commença avec Buswell en 1920. Ainsi, il identifia les principaux processus de dégradation anaérobie et établit la stœchiométrie associée et développa également les premières filières à l'échelle de la ferme.

2. Processus de La méthanisation

a) Principe

La méthanisation, aussi appelée digestion anaérobie, est une voie de dégradation naturelle de la matière organique, en absence d'oxygène, par un ensemble de flore microbienne. Ce processus biologique forme un résidu de digestion stabilisé et hygiéniste, appelé digestat, ainsi qu'un biogaz de composition variable contenant :

- entre 50 à 80 % de méthane (CH_4) ;
- entre 30 et 50 % de dioxyde de carbone (CO_2) ;
- de l'eau (H_2O) à saturation ;
- des composés traces (NH_3 , H_2S , N_2 , CO).

b) *Processus anaérobies de la méthanisation*

Le processus de biodégradation anaérobie peut être subdivisé en quatre étapes biochimiques (Moletta et Cansell, 2003) (Figure 2)

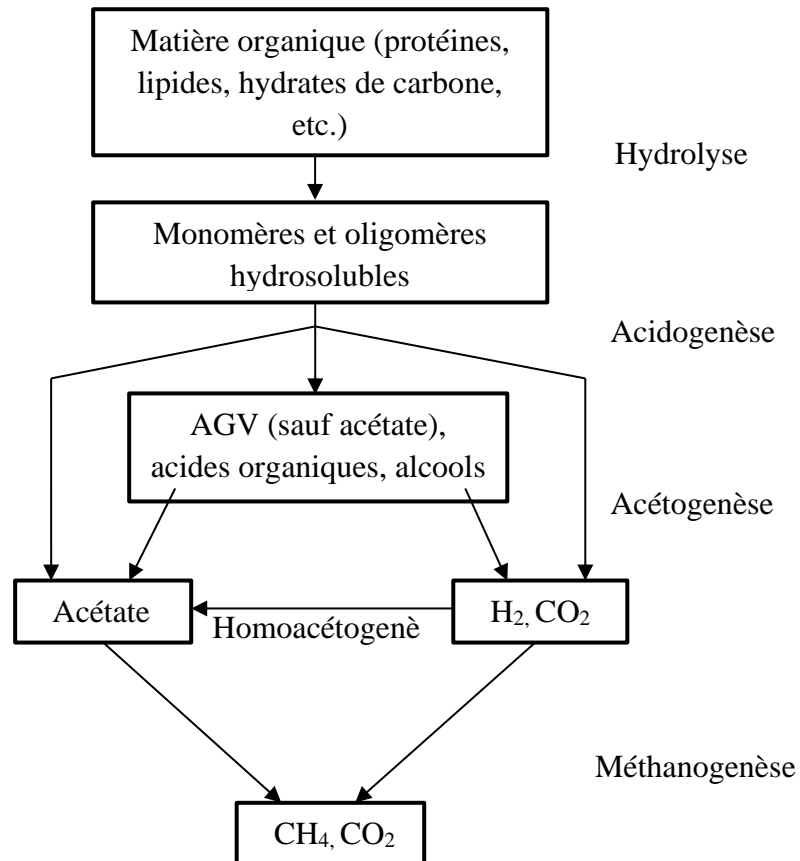


Figure 2: Principaux flux métaboliques de la digestion anaérobie

i. *L'hydrolyse*

L'hydrolyse durant laquelle les biopolymères (protéines, lipides, hydrates de carbone...) sont hydrolysés en monomères et oligomères hydrosolubles grâce à des enzymes extracellulaires excrétées par des microorganismes (Goel, et al. 1998 ; Siritwongrungron, et al. 2007). Les hydrates de carbone de type cellulose ou hémicellulose sont convertis en monosaccharides de types glucose, galactose, fructose (Tong, et al. 1990). Les protéines sont converties en acides aminés ainsi qu'en polypeptides et ammoniums (Sanders, 2001). Les lipides sont dissociés principalement en acides gras à longues chaînes libres et glycérol (Batstone et al. 2002 ; Cirne, et al. 2007). La phase d'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique est souvent considérée comme une étape limitant la digestion anaérobie dans le cas de composés difficilement hydrolysables tels que la cellulose, l'amidon ou les graisses (Vavilin 1996 ; Myint et al. 2007 ; Zhang et al. 2007).

Les bactéries entrant en jeu dans cette étape sont des bactéries ayant des actions hydrolytiques et fermentaires. En particulier, les polysaccharides sont dégradés par des bactéries du genre

Cellulomonas, les protéines par *Bacillus* et les lipides par *Mycobacterium*. Les bactéries principales intervenant dans la dégradation de la cellulose sont *Butyrivibrio fibrosolvens*, *Clostridium cellobioporus*, *Clostridium lochhadii*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Micromonospora bispora*. Les taux de croissance bactériens sont très élevés dans cette étape, de l'ordre de l'heure.

ii. L'acidogénèse

Les monomères issus de l'hydrolyse sont métabolisés en acides gras volatiles (AGV) comportant deux à cinq carbones (acétate, propionate, butyrate, etc...), en alcool (éthanol), en sulfure d'hydrogène, en hydrogène et en dioxyde de carbone. Les bactéries anaérobies impliquées dans cette phase ont une vitesse de réplication très rapide en comparaison aux autres phases dont les micro-organismes ont un temps de régénération plus long. L'acidogénèse est par exemple 30 à 40 fois plus rapide que l'hydrolyse (Godon, 2008). Les bactéries anaérobies strictes du genre *Clostridium* constituent souvent une fraction importante de la population anaérobie qui participe à l'étape d'acidogénèse. D'autres groupes bactériens comme la famille *Enterobacteriaceae* ou encore les genres *Bacteroides*, *Bacillus*, *Pelobacter*, *Acetobacterium* et *Ulyobacter* sont également présents (Cresson, 2006). Les bactéries anaérobies acidogènes ont la possibilité de se développer en cas d'enrichissement de leur alimentation (« surcharge organique ») et de produire rapidement plus d'acides gras volatiles (AGV) qui ont une action inhibitrice sur les micro-organismes acétogènes et méthanogènes et peuvent par conséquent provoquer l'arrêt de la méthanisation (Thiele, 1991). Plusieurs groupes bactériens tels que *Lactobacillus sp*, *Eschericia coli*, *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp* sont impliqués dans la mise en œuvre de l'acidogénèse (Amani et al. 2010).

iii. L'acétogénèse

Les métabolites intermédiaires générés lors de la phase d'acidogénèse sont transformés en précurseurs du méthane : l'acétate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone. Deux groupes de bactéries acétogènes se distinguent : Le premier groupe comprend les bactéries productrices obligées d'hydrogène. Elles sont des anaérobies stricts et elles utilisent les métabolites issus de l'acidogénèse tels que le propionate ou le butyrate pour produire l'acétate, H₂ et le CO₂. Le second groupe comprend les bactéries acétogènes non syntrophes dont le métabolisme est orienté vers la production d'acétate. Elles se développent dans un milieu riche en CO₂ et se divisent en deux groupes selon l'origine de l'acétate : Les homoacétogènes du groupe 1 qui produisent l'acétate par la réduction du H₂ et CO₂ et les homoacétogènes du groupe 2 qui utilisent les AGV et l'alcool pour produire l'acétate (Godon, 2008). Il s'agit des bactéries du genre *Desulfovibrio*, *Aminobacterium* et *Acidaminococcus*.

iv. La méthanogénèse

Dans cette dernière étape, l'acide acétique, l'hydrogène et le dioxyde de carbone sont transformés en méthane par des microorganismes méthanogéniques. Plus précisément, les microorganismes qui interviennent sont les Archées. Celles-ci sont composées à la fois de bactéries à Gram positif et négatif, et leur forme est très variée. Il peut s'agir par exemple de

cocci et de bacilles (Chen et al. 2014). Dans le cas de la méthanogenèse, elles sont classées en deux catégories, présentées ci-dessous.

- **Méthanogenèse acétoclaste :**

Cette étape est réalisée par les bactéries acétoclastes. Celles-ci auront comme action principale la transformation de l'acide acétique en dioxyde de carbone et en méthane. Généralement, environ 70% du méthane du biogaz obtenu par méthanisation est produit par cette étape. Les bactéries entrant en jeu sont principalement du genre *Methanothrix* (*M. soehn-genii*, *M. concilii*) ou encore *Methanosarcina* (*M. barkeri*, *M. mazei*, *M. acetivorans*).

- **Méthanogenèse hydrogénéophile :**

Ceci est réalisé par les bactéries hydrogénéophiles. Ces dernières vont produire du méthane et de l'eau, par l'intermédiaire d'un mécanisme de réduction du dioxyde de carbone par l'hydrogène. Dans tous les cas, ces transformations se produisent en milieu anaérobie strict uniquement, et du nickel est nécessaire à la croissance de ces populations bactériennes. Aussi, faudra-il être attentif à la composition du milieu réactionnel afin de ne pas inhiber cette dernière étape. Le principal genre bactérien impliqué dans cette étape est *Methanobacterium* (*M. formicicum*, *M. wolfei*, *M. alcaliphilum*, *M. voltae*).

c) Les conditions physicochimiques de la digestion anaérobie

Les différentes réactions enzymatiques de la digestion anaérobie nécessitent certaines conditions physico-chimiques. Les principales conditions sont :

i. Température

La température est un paramètre important pour les procédés biologiques car elle a un impact sur la cinétique des réactions mais aussi sur le transfert de matière et la thermodynamique. En effet, plus on monte en température, plus les réactions chimiques et enzymatiques s'accroissent et plus la croissance des micro-organismes augmente. La fermentation méthanique est optimale à deux températures : en mésophilie à 37°C ou en thermophilie à 55°C. Le régime mésophile est généralement le plus appliqué, il assure une stabilité de la digestion anaérobie. Le régime thermophile permet d'améliorer l'hydrolyse par rapport au régime mésophile mais également une élimination des agents pathogènes. Il assure aussi une meilleure cinétique de dégradation du substrat et de production de biogaz (Khemkhao et al. 2011). Cependant, la digestion anaérobie thermophile est réputée moins stable à cause des risques liés à la production d'acides gras volatiles (AGV) et d'hydrogène lors des phases d'hydrolyse et d'acidogénèse (Poh & Chong, 2009 ; Siles et al. 2010). Les changements des conditions mésophiles à thermophiles peuvent causer un arrêt temporaire des activités bactériennes. Ces chocs de température qui arrêtent la production de biogaz peuvent être exploités pour faciliter la séparation des solides du liquide (Henze et Harremoes, 1983).

ii. pH et l'alcalinité

Le pH optimum de la digestion anaérobie se situe autour de la neutralité (entre 6,5 et 7,3) (Zinder 1993). La structure des communautés bactériennes peut être affectée par des changements de conditions fermentaires de pH neutre à acide (Ueno et al. 2006 ; Ye et al. 2007). Cependant, dans certains milieux psychrophiles comme les tourbières et le permafrost, on y trouve une activité méthanogène à des pH inférieurs à 5 (Galand et al. 2005 ; Juottonen et al. 2005 ; Zinder 1993). Le pH optimal des bactéries hydrolytiques et acidogènes se situe entre 5,5 et 6,5 (Ward et al. 2008) tandis que celui des acétogènes est proche de la neutralité et que les méthanogènes ont une activité optimale dans une gamme de pH comprise entre 6 et 8 (Habouzit, 2010). En digestion anaérobie, l'alcalinité est principalement dépendante de la concentration en bicarbonate (HCO_3^-), en AGV, voire en ammonium (NH_4^+) dans le cas où l'effluent à traiter est riche en azote (Bernet & Buffière, 2008).

iii. Potentiel redox

Outre l'absence d'oxygène, les méthanogènes ont besoin de conditions d'oxydoréduction spécifiques pour leur développement. Un milieu est généralement considéré anaérobie lorsqu'il possède un potentiel redox compris entre 300 à 500 mV (Vogels et al. 1988). Des valeurs supérieures voire positives sont le signe d'un défaut de fermentation (Damien, 2008).

iv. Humidité

L'eau est considérée comme un facteur déterminant dans le processus biochimique de dégradation anaérobie. Tout d'abord, l'eau est essentielle pour la survie de tout organisme vivant et constitue le milieu de développement des microorganismes, à l'interface avec les substrats. Elle représente ainsi 80 % de leur masse cellulaire. De plus, elle constitue le vecteur de transport des matières solubles. Elle dissout les nutriments ainsi que les substrats et assure leur diffusion depuis les milieux poreux jusqu'aux cellules bactériennes (Lay et al. 1998 ; Mora-Naranjo et al. 2004 ; Pommier et al. 2007). Enfin, elle constitue un des réactifs de la dégradation de la matière organique et intervient dans toutes les étapes de la digestion anaérobie. D'une manière générale, il existe un seuil minimal d'humidité, seuil critique en-dessous duquel les activités biologiques sont très fortement ralenties. Ce seuil est de l'ordre de 15 à 50 % exprimé en masse d'eau par rapport à la masse sèche du matériau, correspondant à un taux d'humidité compris entre 13 et 33 % (masse d'eau sur la masse totale). Par ailleurs, il existe un paramètre appelé capacité de rétention d'eau, au-delà d'une certaine valeur, le taux d'humidité aurait une influence (Pommier et al. 2007).

v. Nutriments

Les micro-organismes ont besoin d'un apport suffisant de macroéléments (azote, phosphore, etc...), d'oligo-éléments (cobalt, fer, nickel, etc..), et de vitamines pour une croissance optimale (Angelidaki et al. 2009). Les besoins en macroéléments peuvent être estimés à partir de la composition moyenne et du rendement de croissance de la biomasse microbienne (Lettinga, 1995). Concernant les oligo-éléments, les besoins sont plus difficiles à évaluer car il est nécessaire de faire la différence entre leur présence et leur biodisponibilité réelle dans le

digesteur (Speece, 1996) car certains cations métalliques essentiels peuvent être rendus inaccessibles par précipitation, notamment en présence de sulfures (Percheron et al. 1997). La présence de cobalt, de nickel et de fer est primordiale pour les réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme des méthanogènes (Fermoso et al. 2009 ; Takashima et al. 2011). Sowers et Ferry (1985) ont par exemple montré qu'une concentration de moins de 5µM en Fe²⁺ et de 0,25 µM entraînait un ralentissement de la croissance des *Methanococoides methylutueus*. Une absence totale de Co et de biotine (vitamine B) provoquait une réduction de croissance de 94%. Plusieurs autres études ont démontré l'importance de ces éléments métalliques dans le métabolisme de méthanogènes tels que : *Methanosarcina barkeri*, *Methanospirillum hungatii*, *Methanocorpusculum parvum*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, etc.... (Demirel & Scherer, 2011).

3. Procédé industriel de la méthanisation : Procédé à biomasse fixée sur les supports

Le moyen d'obtenir des temps de rétention élevés (nécessaires pour le développement des méthanogènes) pour un faible temps de séjour hydraulique (intervenant dans l'économie du procédé) est de fixer les micro-organismes sur un support solide pour former un biofilm.

a) Bioréacteur à lit expansé ou fluidisé

Ce type de réacteur appartient à la dernière génération des digesteurs à biomasse fixée. Les microorganismes sont immobilisés sur un support constitué de fines particules granulaires inertes (1 à 10 mm de diamètre). Le support est mis en suspension (fluidisé) par un courant de liquide ascendant (lit fluidisé ascendant) ou descendant (lit fluidisé descendant) en fonction de la densité du support (van den Berg 1986 ; Iza et al. 1988 ; Wheatley 1990). Si le lit de particules n'est expansé que de 20 à 30% (vitesses proches du minimum de fluidisation), on parle de réacteur à lit expansé. Si le taux d'expansion est supérieur à 30%, on parle de lit fluidisé (Laguérie et al. 1991). L'avantage majeur des lits fluidisés provient de la mobilité des particules qui permet d'assurer un bon mélange du milieu réactionnel et réduit les possibilités de colmatage (Roustan et al. 1993). Les concentrations en biomasse dans le réacteur à support particulaire mobile se situent couramment entre 15 et 30 g/L (Elmaleh et al. 1984 ; Chen et al. 1988) et peuvent atteindre 50 g/L (Van Loosdrecht et al. 1993). Cette caractéristique laisse envisager la possibilité de traiter efficacement des charges organiques très élevées (Lettinga 2005). Les fortes vitesses ascensionnelles au sein du réacteur favorisent la turbulence à l'interface entre le liquide et le biofilm, ce qui améliore les transferts de masse. Une meilleure opérabilité de ce type de procédé est liée au développement de systèmes de contrôles automatiques qui permettent d'effectuer un suivi en temps réel de la fermentation et de répondre rapidement et de manière appropriée aux signes de déstabilisation (Steyer et al.1999).

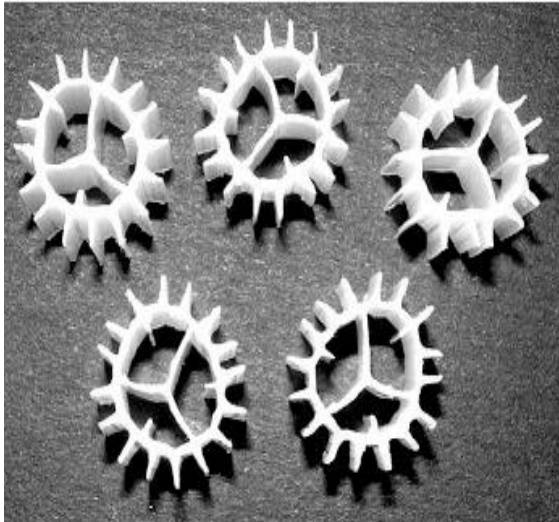


Figure 3: Supports mobiles



Figure 4: Bioréacteur à lit fluidisé

b) Les supports mobiles

Les supports utilisés sont soit naturels (sable, gravier, charbon...) (Fernandez et al. 2001), soit synthétiques (plastiques) (Wheatley 1990). Ces derniers semblent avoir la préférence à l'heure actuelle car leur faible densité les rend facilement mobilisables. Le diamètre faible des particules utilisées permet d'atteindre des surfaces spécifiques potentielles pour la colonisation très importante de l'ordre de 1 à 25 m².L⁻¹ (Henze et al. 1983 ; Switzenbaum 1983 ; Hall 1987 ; Michaud et al. 2003). Une surface de solide importante augmente les chances de fixation des bactéries sur le support et peut être considérée comme un critère de rapidité d'adhésion. De plus, dans le cas des lits fluidisés liquide-solide, un support de petite taille présente un autre avantage : les vitesses du liquide pour fluidiser un support diminuent avec sa taille, ce qui permet de réduire l'énergie de fluidisation et donc les coûts de fonctionnement (Jeris 1983). La densité du matériau peut aussi influencer le choix du support pour la même raison économique.

De plus, Heijnen (1992) rapporte que les supports de petite taille sont moins soumis aux frictions et génèrent donc moins de contraintes d'attrition lors de la formation du biofilm. Or, des études récentes sur des configurations de réacteurs à forte agitation (conditions turbulentes) montrent que l'adhésion des cellules est plus dominée par les conditions hydrodynamiques que par les caractéristiques physico-chimiques du solide (Gjaltema et al. 1997). La forte intensité des collisions entre particules a alors une forte influence négative sur l'adhésion et la formation du biofilm.



Figure 5: Supports mobiles avant et après formation du biofilm (Moletta, 2002)

c) *Démarrage des digesteurs anaérobies à biomasse fixée*

La phase de démarrage peut être définie comme le temps nécessaire à la sélection et à la structuration spatiale d'un consortium microbien efficace pour la dégradation des polluants (Weiland et al. 1991). D'un point de vue biologique, cette phase correspond à la mise en place d'un biofilm mature, soit la formation d'un écosystème par la sélection et l'arrangement spatial des différents groupes trophiques les uns par rapport aux autres et vis à vis de leur substrat (Heppner et al. 1992). Dans le domaine industriel, le démarrage correspond au temps nécessaire pour amener le réacteur à sa charge nominale avec une efficacité d'épuration conforme aux spécifications du rejet. La durée du démarrage d'un réacteur anaérobie à forte charge est longue et très variable, généralement entre 2 et 9 mois (Lauwers et al. 1989), voire 12 mois (Bull et al. 1983) ou plus encore pour les procédés thermophiles (Puñal et al. 2000). Elle dépend de nombreux paramètres biologiques, chimiques et physiques.

Le démarrage est influencé par la composition et la charge de l'effluent à traiter, l'activité et l'adaptation de l'inoculum, les paramètres environnementaux (pH, température, présence et concentration en nutriments et éléments traces), les paramètres opérationnels (temps de séjour hydraulique, mélanges des phases), le design du réacteur. Enfin la phase de démarrage est inextricablement liée aux différentes phases de formation du biofilm (conditionnement des surfaces, adhésion sur le support et agrégation des cellules en un biofilm), influencées par des paramètres physico-chimiques, les conditions hydrodynamiques et l'augmentation de la charge organique (Zellner et al. 1991). La montée en charge et la croissance du biofilm sont fortement liées.

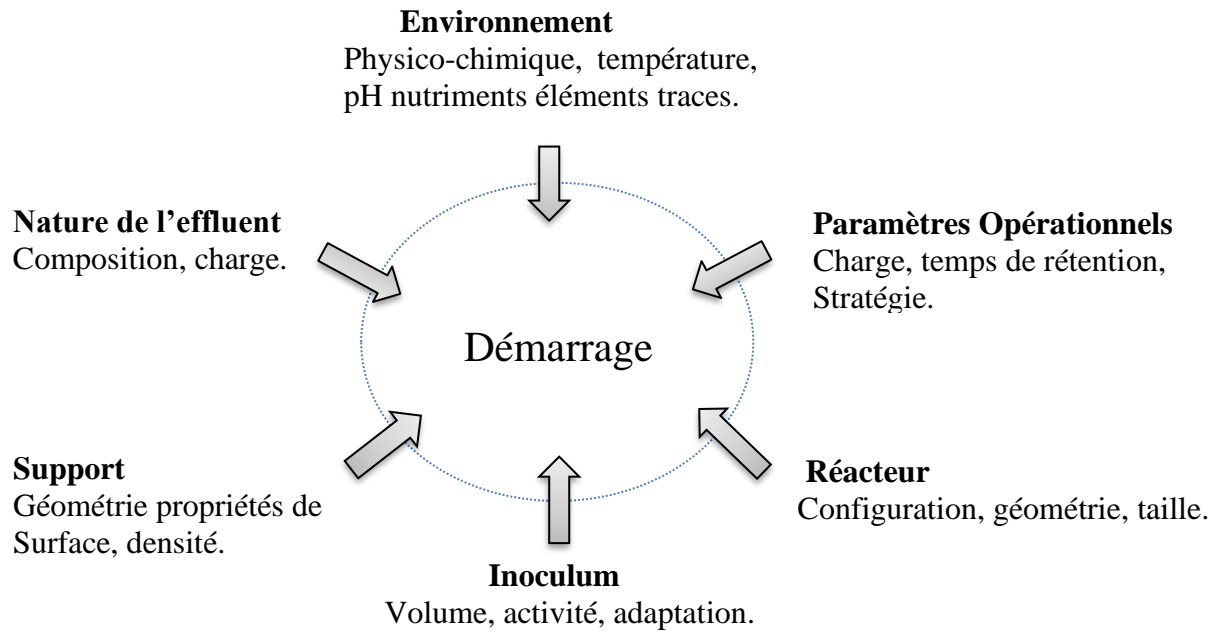


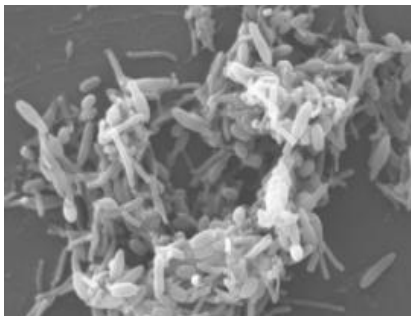
Figure 6: Paramètres influençant le démarrage des réacteurs à forte charge (Zellner et al. 1991)

Parmi les effluents de l'industrie agro-alimentaires qui posent un problème pour l'environnement et sont difficiles à éliminer à cause de leur charge très élevée en matière organique, on peut citer les margines.

Chapitre 2 : Formation d'un biofilm sur un support solide

I. Définition de biofilm

Un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à un substrat, une interface ou tout simplement entre elles, enrobées d'une matrice extracellulaire de substances polymériques en général d'exopolysaccharides qu'elles ont elles-mêmes produites et qui présentent un phénotype particulier en termes de taux de croissance et de transcription de gènes (Donlan et Costerton, 2002). Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (Espinasse et al. 2010).



Un biofilm bactérien peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de différentes espèces bactériennes ainsi que des champignons, algues, et protozoaires (O'Toole et al. 2000). Ils se développent virtuellement sur toutes les surfaces dans les environnements naturels aqueux qu'elles soient biologiques (plantes et animaux aquatiques) ou non (béton, métal, plastique et pierres).

Figure 7: Observation microscopique d'un biofilm (Donlan CMR, 2002)

II. Domaines d'intervention des biofilms positifs

Les biofilms jouent aussi un rôle positif pour notre santé. La surface de notre peau est recouverte d'un biofilm dont la présence engendre une compétition microbienne rendant plus difficile la colonisation par des organismes pathogènes (Percival et al. 2012). Les biofilms gastro-intestinaux assurent également un rôle de protection et participent au processus de digestion (Macfarlane et al. 2011).

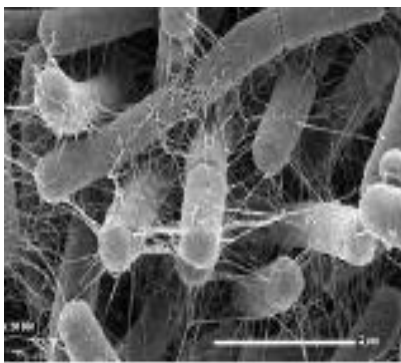
De plus, les biofilms peuvent s'avérer être des outils biotechnologiques d'un intérêt majeur. Leur usage est reconnu pour la restauration de sols pollués notamment par les hydrocarbures : on appelle cette technologie la bio remédiation. Ils sont aussi très couramment utilisés dans le traitement des eaux usées, que celui-ci se fasse en conditions aérobies, anoxiques ou encore dans le cadre d'un procédé de méthanisation (Derlon et al. 2012 ; Elenter et al. 2007 ; Habouzit et al. 2011 ; Martin and Nerenberg, 2012). De manière plus générale, les procédés à biofilms présentent de nombreux intérêts comparativement à des procédés de type boues activées (Lazarova and Manem, 1995 ; Nicoletta et al. 2000). Leur résistance aux composés toxiques et leur capacité à résister à des fluctuations en ressources en font une technologie robuste. De plus, le fait que les microorganismes soient fixés à un support solide permet de grandement faciliter le traitement aval de séparation entre le liquide et la flore épuratoire. Pour cette même raison, une rétention de biomasse est possible, les concentrations en biomasse bactérienne peuvent être largement augmentées et les micro-organismes à faibles taux de croissance (ex : Archées dans les procédés de digestion anaérobie) peuvent être retenus. De plus, comme évoque

précédemment, l'organisation de biofilms multi-espèces en plusieurs microhabitats va permettre de traiter plus efficacement différentes pollutions au sein du même réacteur.

III. Constituants d'un biofilm

1. Les bactéries

Les bactéries représentent un composant essentiel du biofilm, puisque celui-ci ne se développe que si l'adhésion d'un nombre (ou une couche) de bactéries capables de reconnaître « sentir » la surface, est réalisée (Costerton, 1999). En effet, en présence d'une surface solide, les bactéries planctoniques adhérant sur le support deviennent différentes de leurs homologues restées en suspension, par changement au niveau de leur génome, de la structure de leur enveloppe, leur taille et leur forme.



Bien que l'unité structurale des biofilms soit la bactérie, cette dernière ne représente environ que 15 à 25% de la composition totale du biofilm, le reste étant occupé par les exopolymères, les nutriments et l'eau. La nature des microorganismes dans un biofilm est très variée. Elle peut être homogène avec une seule espèce de bactéries, ou hétérogène, renfermant dans ce cas plusieurs espèces microbiennes.

Figure 8: Observation microscopique des bactéries d'un biofilm (Donlan CID, 2001)

2. Substances polymériques extracellulaires (EPS)

Dans le cas des systèmes qui nous intéressent, les EPS sont des biopolymères d'origine microbienne dans lesquels les micro-organismes du biofilm sont incorporés. Ces EPS sont soupçonnées de jouer un rôle important dans le développement du biofilm. Ils sont caractérisés par leur apparence gélatineuse. Ils sont responsables de la morphologie, la structure, la cohésion et l'intégrité fonctionnelle des biofilms. Leur composition détermine la plupart de leurs propriétés physicochimiques et biologiques (Wingender et al. 1999). Ils ont plusieurs fonctions dans le biofilm, comme la promulgation de l'adhérence des bactéries sur la surface et entre elles, la formation et la maintenance de la structure du biofilm, l'augmentation de la résistance du biofilm contre le stress environnemental et la protection du biofilm contre les prédateurs (Costerton et al. 1995).

Les substances polymériques extracellulaires comptent entre 50% et 90% de la matière organique totale des biofilms (Evans, 2003). En termes de composition, selon Flemming et al. (2007), contrairement à la connaissance commune, les EPS sont certainement plus que des polysaccharides. Ils comportent, entre autres, une grande variété de protéines, des glycoprotéines, des glycolipides et, dans certains cas, des quantités surprenantes d'ADN extracellulaire. Ainsi en ce qui concerne les biofilms environnementaux, les polysaccharides

représentent souvent uniquement un composant mineur du biopolymère. Cependant, les diverses fonctions de l'ADN des biofilms commencent seulement à émerger (Das et al. 2013).

3. Étapes de la formation du biofilm

Bien que le développement de biofilms soit un phénomène fréquent, voire systématique à l'interface solide/liquide en présence de bactéries, sa formation peut être décrite par une série d'étapes successives (figure 9), le biofilm peut se former très rapidement, en quelques heures.

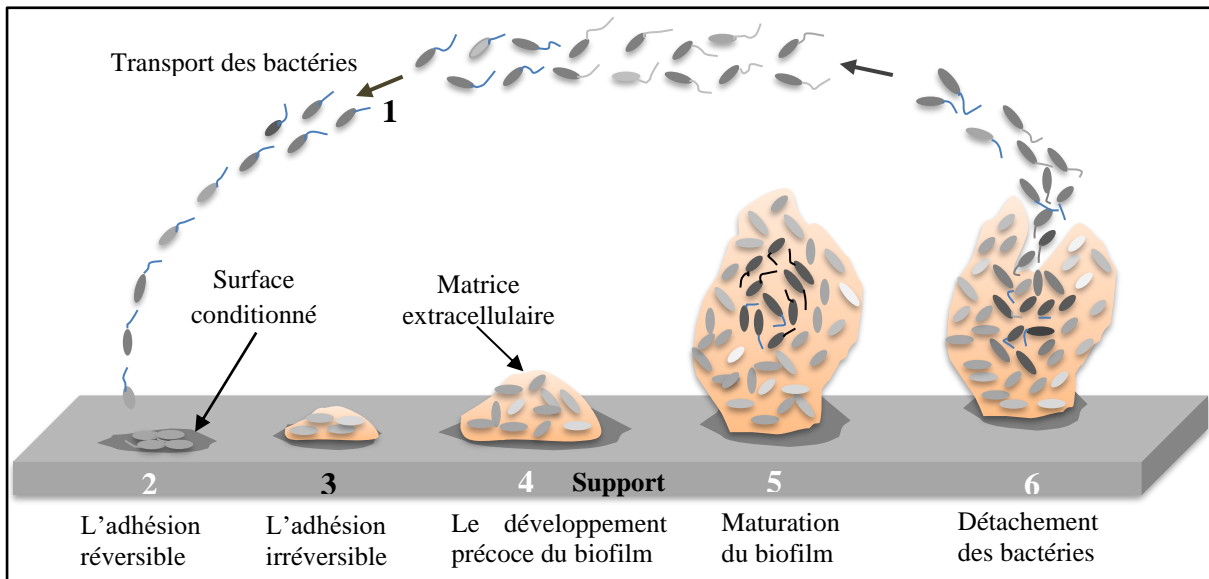


Figure 9: Représentation schématique de la formation d'un biofilm

a) Mise en place du film conditionnant initiateur

La formation d'un biofilm bactérien est généralement initiée lors de l'immersion d'un support dans un milieu aqueux. Lors de l'immersion du support, des ions et des macromolécules tels que des protéines, des lipides, des glucides et/ou des matières minérales vont être adsorbés spontanément sur la surface. Ce phénomène d'encrassement de la surface par des molécules permet la mise en place d'un film appelé film primaire ou film conditionnant (Branger, 2012). Ce film conditionnant conduit à une modification des propriétés physico-chimiques de la surface d'origine (rugosité, polarité, caractère hydrophile/hydrophobe...), ce qui a pour conséquence de favoriser ou d'inhiber l'adhésion bactérienne (Stoodley, et al., 2002 ; Lorite, et al., 2011). De plus, l'adsorption et l'accumulation de molécules organiques sur le support permettent une disponibilité en nutriment favorisant le chimiotaxisme et l'installation des micro-organismes sur la surface (Kumar et Anand, 1998 ; Garrett, et al., 2008).

b) Transport des bactéries vers le support

La première étape de formation d'un biofilm est le transport des bactéries vers le support. Les bactéries peuvent soit provenir du milieu planctonique dans lequel baigne la surface, soit d'un biofilm présent dans l'environnement et qui est en phase de dispersion. Cette approche des

bactéries sur la surface peut être divisée en 2 types : une approche dite « active » et une autre dite « passive » (Kumar et Anand, 1998).

L'approche active fait référence au mécanisme de mobilité des bactéries grâce à des flagelles. Il est connu que la mobilité bactérienne augmente l'adhésion. Cette mobilité semble permettre aux bactéries de surmonter les forces électrostatiques de répulsion entre la surface bactérienne et le support ainsi que de se déplacer lors du chimiotaxisme (Percival, et al., 2011).

L'approche passive, dépend plus du milieu dans lequel les bactéries évoluent (viscosité du milieu, force ionique) ainsi que le mouvement de ce dernier (écoulement, sédimentation flux brownien).

c) *Adhésion réversible*

La phase d'adhésion dite « réversible » de contact des bactéries sur le support implique que les cellules bactériennes se trouvent à une distance de moins de 50 nm par rapport à la surface (Percival, et al. 2011). Cette étape est caractérisée par une adsorption de faible intensité des cellules bactériennes par le support faisant intervenir des forces de type Van der Waals, électrostatiques (souvent répulsives car la plupart des bactéries et des surfaces inertes sont chargées négativement), hydrophobes/hydrophiles pouvant conduire à une attraction ou à une répulsion (Carpentier et Cerf, 1993). Durant cette étape préliminaire de la formation du biofilm, les bactéries subissent toujours des mouvements browniens et sont facilement détachables, « éloignables », par exemple par des forces de cisaillement induites par la circulation d'un fluide.

d) *Adhésion irréversible*

En phase d'adhésion irréversible, les forces nécessaires pour le détachement des cellules doivent être beaucoup plus importantes (grattage, ultrasons, force de cisaillement) (Kumar et Anand, 1998 ; Palmer, et al. 2007). Dans cette phase, l'encrage des bactéries se met en place sur de courtes distances (1 à 1,5 nm). Cette notion d'« irréversibilité » est liée aux multiples points d'interaction conduisant à une liaison de forte énergie. L'hydrophobicité de surface, les appendices protéiques comme les pilis, les flagelles, ou les fimbriaes, et la composition et la proportion des EPS, influencent à la fois la vitesse et l'importance de l'adhésion microbienne (Garrett, et al. 2008 ; Percival, et al. 2011). Le passage entre la phase d'adhésion réversible et la phase d'adhésion irréversible serait très rapide (de la seconde à la minute) (Compere, 1999, Palmer, et al. 2007).

e) *Développement précoce du biofilm*

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des substances polymériques extracellulaires. Elles s'agrègent entre elles et forment des micro-colonies, qui sont protégées par la matrice EPS (Jacobsen et al. 2008). Les microorganismes peuvent échanger des métabolites avec leurs voisins par des relations physiologiques (Blenkinsopp et al. 1991).

f) Maturation du biofilm

Une fois que les bactéries ont adhéré solidement au support, elles vont accélérer leur division cellulaire pour développer le biofilm et lui donner son architecture. Cette augmentation de la masse bactérienne va être accompagnée d'une production plus intense d'EPS qui vont interagir avec des molécules organiques et inorganiques du milieu environnant pour former la matrice extracellulaire (Dunne, 2002 ; Branger, 2012). La capacité des biofilms bactériens à croître reste limitée par la disponibilité et la bonne diffusion des nutriments à travers cette matrice extracellulaire (Lawrence, et al. 1991 ; Dunne, 2002 ; Roux et Ghigo, 2006). D'autres facteurs peuvent contrôler la maturation du biofilm notamment le pH interne, la disponibilité en oxygène, la disponibilité en source carbonée, et l'osmolarité (Carpentier et Cerf, 1993).

g) Détachement et dispersion des bactéries

Après un certain temps, le vieillissement, un stress environnemental ou une carence nutritive provoquent une déstructuration du biofilm durant laquelle les couches externes du biofilm se détachent pour libérer les micro-organismes dans le milieu environnant (Dunne, 2002 ; Gjermansen, et al., 2005). Comme pour les autres phases, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries (Joshi et al. 2010). Sous l'action du quorum sensing, des populations bactériennes vont exprimer, surexprimer ou réprimer des gènes facilitant la dispersion. Des bactéries vont ainsi produire des agents (protéase, DNase...) leur permettant de consommer la matrice extracellulaire qui les entourent afin de se procurer une source d'énergie et se séparer du biofilm (Stoodley, et al. 2002). Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Joshi et al. 2010).

IV. Visualisation des biofilms

1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La Microscopie électronique à balayage est basée sur les interactions électrons-matière et consiste à envoyer un faisceau d'électrons et à balayer la surface de l'échantillon sur un diamètre très faible de l'ordre de 0,1 nm sur les MEB les plus sophistiqués (Figure 9). La réponse est la réémission de certaines particules (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés) qui seront analysées par un détecteur permettant de reconstruire une image en haute résolution en trois dimensions (Woldringh et al. 1977 ; Chang et al. 1986) (Figure 10). Cette technique est réalisée en plusieurs étapes : la fixation, la déshydratation et la métallisation par recouvrement de l'échantillon d'une couche conductrice puis enfin la visualisation de l'échantillon sous vide. En effet, cette technique déshydrate le biofilm par un gradient de solvants (alcool, acétone ou xylène) avant toute observation ce qui peut apporter un artefact car les EPS sont composées d'environ 95% d'eau. Afin de pallier à ce problème, des auteurs ont mis en avant l'utilisation du colorant rouge de ruthénium afin d'améliorer la résolution de l'image pour visualiser les EPS (Priester, et al. 2007).



Figure 10: La microscopie électronique à balayage environnemental

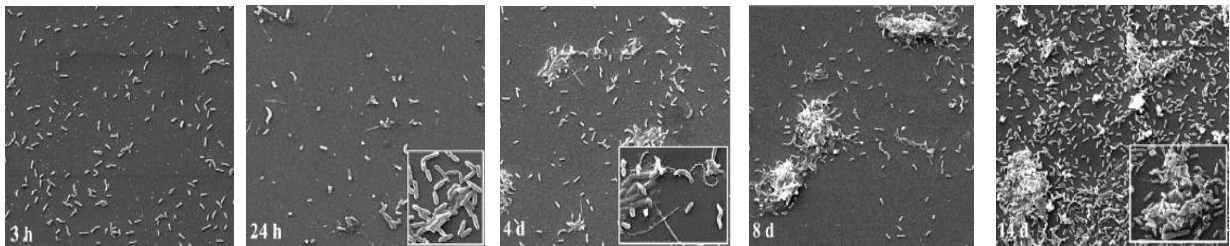


Figure 11: Photographies de biofilm en microscopie électronique à balayage à différents temps de croissance. Fernandez et al ,2008

2. Microscopie à force atomique (AFM)

Actuellement, la microscopie à force atomique est peut-être la technique la plus précise utilisée pour étudier les premières étapes de la formation du biofilm. L'un des avantages de l'AFM est la possibilité de travailler sur des échantillons en milieu liquide. C'est une forme de scanner utilisant une sonde fine (« pointe » de 10 nanomètres) pour suivre la topographie d'un échantillon et retranscrire les profils de la surface étudiée au niveau de l'atome (Goddard et al, 1993). La pointe produit soit une attraction causée par la force de Van des Waals, soit une répulsion. Ces forces provoquent des déplacements de la pointe, entraînant des déviations du levier qui sont enregistrées et traitées par ordinateur pour donner le relief à la surface. Il n'est pas limité en résolution comme le microscope optique (Hyde et al.1997).

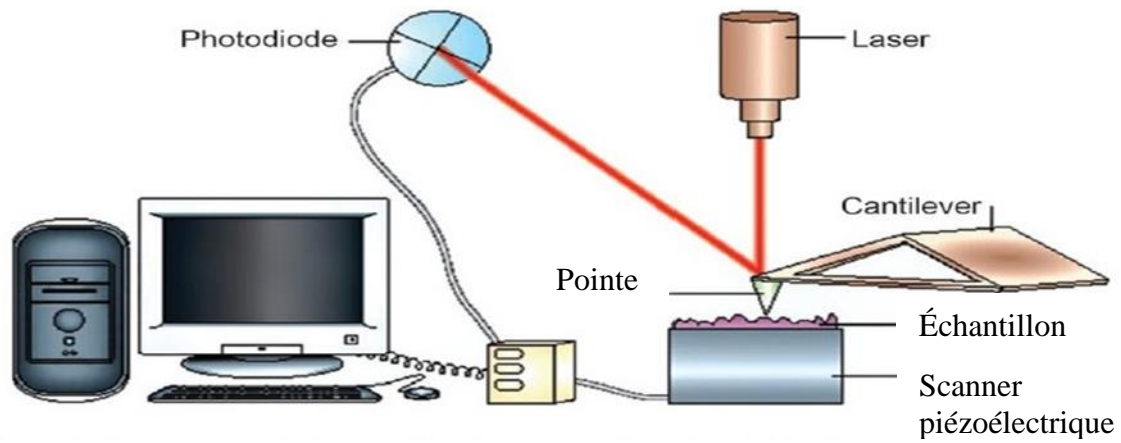


Figure 12: Schéma représentatif du microscope à force atomique

La pointe est fixée sur un cantilever déformable qui agit comme un ressort. Sa déformation -ou déflexion- est mesurée à l'aide d'un laser focalisé sur la partie libre du cantilever, le rayon réfléchi étant détecté par une photodiode. Une forte déflexion du cantilever révèle une force d'attraction globale importante entre la pointe et l'échantillon.

Chapitre 3 : Adhésion des microorganismes sur des supports solides

I. Introduction

Avant la formation d'un biofilm mature, les microorganismes, en état végétatif, baignent dans le liquide en recherche de sources d'énergie et nutriments. Puisque les nutriments s'adsorbent sur les surfaces, ces microorganismes guidés par le chimiotactisme tendent à s'adhérer sur les surfaces et forment des colonies qui se développent et forment un biofilm. Le phénomène d'adhésion a été abordé par plusieurs modèles théoriques pour l'expliquer

II. Modèles théoriques prédictifs de l'adhésion

1. Approche thermodynamique

Cette approche considère l'adhésion bactérienne comme un état d'équilibre prenant en compte le point de contact et en négligeant les interactions électrostatiques (Bos et al. 1999). Cette théorie, qui ne prend en compte que les interactions non électrostatiques (i.e. Lifshitzvan der Waals et acide-base de Lewis), est basée sur l'équation de Dupré (Dupré, 1869) appliquée à un système microorganisme-solide-liquide (milieu de suspension), L'adhésion du microorganisme sur le support solide correspond à un état d'équilibre. Elle se traduit par la création d'une interface microorganisme-solide et, conjointement, par la destruction des interfaces microorganisme-liquide et solide-liquide (Absolom et al. 1983).

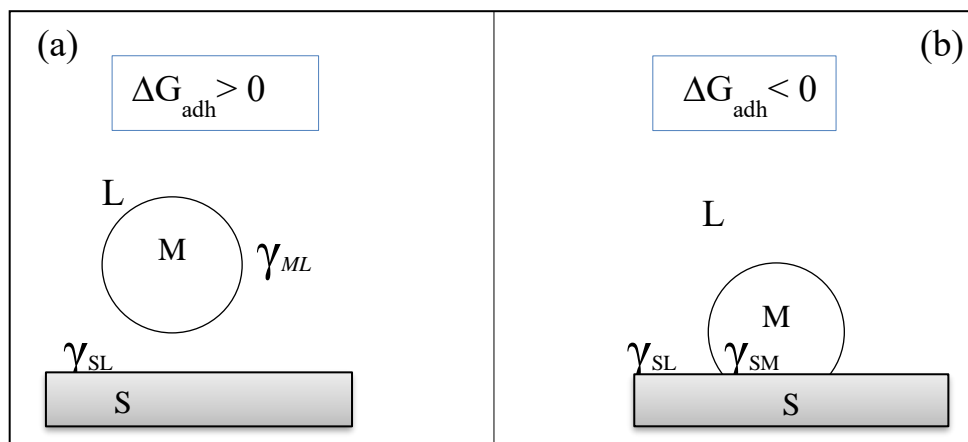


Figure 13: Approche thermodynamique d'adhésion. a) adhésion défavorable b) adhésion favorable (Bos et al,1999)

La tendance pour qu'il y ait une association des deux surfaces est exprimée comme un équilibre de l'énergie libre interfaciale (γ) : $\Delta G_{adh} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{SL}$ (1)

Où γ représente la tension superficielle (énergie libre interfaciale) et les indices S, M, L sont relatifs à la surface réceptrice, microorganisme et liquide de suspension (Absolom et al. 1983 ; Weerkamp et al. 1985 ; Van Oss, 1996).

Les énergies libres interfaciales intervenant dans l'équation (1) ne sont pas directement mesurables. Plusieurs approches théoriques ont été proposées pour déterminer ces énergies interfaciales. Toutes ces approches sont basées sur les mesures de l'angle de contact entre la surface solide ou tapis d'un microorganisme et le liquide de tension superficielle connue (Bellon Fontaine et al. 1990 ; Busscher et al. 1990 ; Van Oss, 1996). L'angle de contact avec le liquide peut être simplement mesurée en posant des μl de gouttelettes de liquide sur la surface.

2. Approche de l'adhésion par la théorie classique DLVO

Ce premier modèle fut développé par Derjaguin & Landau (1941) et par Verwey & Overbeek (1948), c'est la première théorie concernant la stabilité de l'état colloïdal.

Selon cette théorie, l'adhésion microbienne était décrite comme un équilibre entre les forces de van der Waals et les forces électrostatiques. L'énergie libre d'interaction totale, ΔG_T (2) entre le microorganisme et le support, séparés d'une distance d , est la somme des énergies libres liées aux interactions attractives de van der Waals, G_{LW} , et aux interactions électrostatiques répulsives ou attractives, G_{EL} .

$$\Delta G_T = G_{LW} + G_{EL} \quad (2)$$

Cette théorie est très largement utilisée pour rendre compte des phénomènes de floculation, d'agglomération ou de coagulation des systèmes colloïdaux. Elle permet donc de prévoir la probabilité qu'a la particule de se situer à une certaine distance de la surface considérée.

Il est possible de distinguer deux types d'adhésion :

- l'adhésion de minimum secondaire, c'est-à-dire une adhésion réversible qui laisse à la particule un mouvement brownien dans un plan ;
- l'adhésion de minimum primaire, irréversible. Dans ce cas, il n'y a plus aucun degré de liberté.

L'énergie d'attraction de Van der Waals n'est pas influencée par la force ionique, par contre les interactions électrostatiques diminuent avec l'augmentation de la force ionique (Bos et al., 1999), Par conséquent l'énergie d'interaction totale est influencée par la force ionique.

La force ionique du milieu a deux effets souvent couplés :

- une diminution du potentiel dans la couche de Stern, d'autant plus importante que la force ionique du milieu est forte et que la valence des ions est élevée ;
- une diminution de l'épaisseur de la double couche. Les interactions électrostatiques diminuent donc fortement quand la force ionique du milieu augmente.

Généralement les microorganismes et les surfaces solides immergées sont chargés négativement (Van Loosdrecht et al. 1987c ; Busscher et al. 1990). Dans ce cas, quel que soit la concentration en électrolyte du milieu de suspension, les microorganismes ayant une taille

importante rencontrent une barrière d'énergie répulsive élevée à faible (5nm) distance de la surface qui les empêchera d'adhérer dans le minimum primaire situé à moins de 3 nm de la surface, mais ils peuvent se positionner dans la zone de minimum secondaire. Lorsque les cellules ont adhéré réversiblement, elles peuvent encore être affectées par le mouvement brownien (Marshall et al.1971). Par contre l'adhésion irréversible diminue ce mouvement et les cellules paraissent immobiles. L'énergie qui pousse les microorganismes du minimum secondaire au minimum primaire peut être fournie par le mouvement brownien ou bien les cellules peuvent posséder une énergie thermique suffisante pour traverser la barrière (Marshall et al.1971 ; Van Loosdrecht et al.1989).

3. Théorie de DLVO développée par van Oss (XDLVO)

Plus récemment, la théorie DLVO étendue a été développée (VanOss et al., 1986). Plus complète que les 2 premières théories, elle prend en compte les interactions de Lifshitz-van der Waals, des interactions électrostatiques, des interactions acides-bases de Lewis, et du mouvement brownien. Cette théorie peut être considérée comme une combinaison des théories thermodynamique et DLVO classique. D'autres interactions, comme les interactions stériques, peuvent également être prises en compte pour modéliser l'adhésion des cellules à une surface.

La variation de l'énergie libre d'interaction totale ΔG_T (3) entre deux particules colloïdales est alors la somme des énergies libres liées aux forces électrostatiques ΔG^{EL} et non électrostatiques ΔG^{nonEI} , ces dernières comprenant une composante polaire ΔG^{AB} et une composante apolaire ΔG^{LW} (interaction de Lifshitz van der Waals). Elle sera fonction des propriétés de surface des colloïdes (charge, caractère hydrophobe/hydrophile) et de leur géométrie ainsi que des propriétés du milieu (pH, force ionique).

$$\Delta G_T = \Delta G_{EI} + \Delta G_{nonEI} = \Delta G_{EI} + \Delta G_{LW} + \Delta G_{AB} \quad (3)$$

Le second principe de la thermodynamique prévoit que l'adhésion aura lieu si la variation d'énergie libre ΔG du système est négative.

D'après van Oss (1996), l'énergie interfaciale non électrostatique est la somme des énergies interfaciales liées aux forces de Lifshitz-van der Waals et des énergies interfaciales polaires (acide/base de Lewis), ces dernières pouvant être décomposées en 2 termes non additifs : une composante donneuse d'électrons et une composante accepteuse d'électrons. Ainsi l'énergie libre non électrostatique (4) s'écrit :

$$\Delta G_{ij}^{non EI} = \Delta G_{ij}^{LW} + \Delta G_{ij}^{AB} \quad (4)$$

$$\text{Avec } \Delta G_{ij}^{AB} = -2 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \cdot \gamma_j^-} + \sqrt{\gamma_i^- \cdot \gamma_j^+} \right)$$

$$\text{et } \Delta G_{ij}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_j^{LW}} \right)^2$$

L'énergie libre de surface d'un liquide correspond à sa tension de vapeur superficielle et est facilement mesurable (Bellon-Fontaine & Vernhet, 1999), contrairement à celle des solides et des microorganismes. Des méthodes de mesure d'angle de contact (θ) formé par une goutte de

liquide (L) de tension superficielle connue, déposée sur une surface solide (S) ou un tapis de microorganismes (M), permettent de l'approcher (Busscher et al., 1990 ; van Oss, 1996 ; Bellon-Fontaine & Vernhet, 1999 ; Bos et al., 1999) grâce à l'équation de Young (Young, 1805).

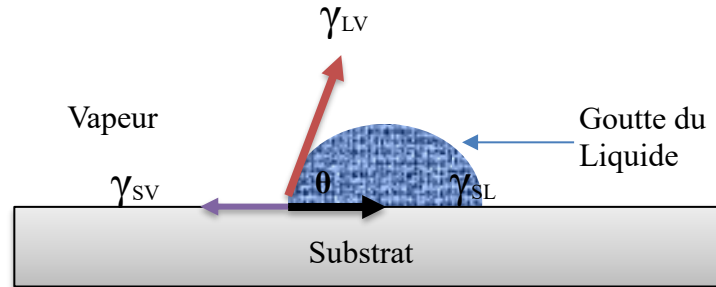


Figure 14: Profil d'une goutte déposée sur un substrat d'après YOUNG

La goutte en état d'équilibre avec sa vapeur saturante sur une surface lisse, va prendre spontanément la forme d'une calotte sphérique et formera un angle θ avec ce substrat.

γ_{sv} : La tension superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide, peut être réduite à l'énergie de surface du solide γ_s dans le vide (ou l'air) suite à l'adsorption de vapeur du liquide selon van Oss ; γ_{sl} : L'énergie libre interfaciale entre le solide et le liquide ; γ_{lv} : La tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur, elle peut être réduite à γ_L ; θ : L'angle de contact.

L'équation de Young (5) permet de relier l'angle de contact θ avec les différentes composantes :

$$\gamma_{SL} = \gamma_S - \gamma_L \cos \theta \quad (5)$$

Le travail d'adhésion réversible entre le solide et le liquide correspond au travail qu'il faut fournir pour séparer une unité d'aire de l'interface solide/liquide en interface solide vapeur et liquide/vapeur. Cette valeur est donnée par la relation de Dupré (6) :

$$G_{SL} = \gamma_S + \gamma_L + \gamma_{SL} \quad (6)$$

En combinant les équations (5) et (6), l'équation de Young-Dupré est obtenue (7), qui permet de déterminer les propriétés de surface d'un solide (ou d'un microorganisme) (γ_S^+ , γ_S^- et γ_S^{LW}) à partir de la mesure d'angles de contact de 3 liquides dont on connaît les caractéristiques polaire (γ_L^+ et γ_L^-), et apolaire (γ_L^{LW}) avec ce solide :

$$W_{SL} = \gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \cdot \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+} \right) \quad (7)$$

Dans le cas d'un microorganisme (M) en présence d'une surface (S) dans un liquide (L), l'équation (8) de Dupré devient :

$$\Delta G_{MLS} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{SL} \quad (8)$$

Il est alors possible d'exprimer l'interaction entre le microorganisme et la surface solide immergée dans un liquide, en tenant compte des interactions de Lifshitz-van der Waals et des interactions polaires dans l'équation (9) :

$$\Delta G_{MSL}^{non\ EL} = \Delta G_{MSL}^{LW} + \Delta G_{MSL}^{AB} \quad (9)$$

Où

$$\Delta G_{MSL}^{AB} = 2[\sqrt{\gamma_L^+}(\sqrt{\gamma_M^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) + \sqrt{\gamma_L^-}(\sqrt{\gamma_M^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}] \quad (10)$$

$$\Delta G_{MSL}^{LW} = 2(\sqrt{\gamma_L^{LW}} - \sqrt{\gamma_M^{LW}})(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}) \quad (11)$$

Selon la composante de l'énergie totale considérée, le second principe de la thermodynamique prévoit que l'adhésion sera favorisée dans le cas où elle est négative et défavorisée dans le cas contraire.

III. Interactions physicochimiques responsables de l'adhésion

Une fois les microorganismes arrivés à proximité des surfaces par les mécanismes de transport cités auparavant, les microorganismes adhèrent initialement par l'intermédiaire des interactions physico-chimiques. Ces interactions comprennent essentiellement (Van Oss, 1996) les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions acido-basiques (donneur - accepteur d'électrons au sens de Lewis). La figure 3 présente ces différentes interactions possibles entre un microorganisme et un support solide et les distances pour lesquelles ces forces sont significatives.

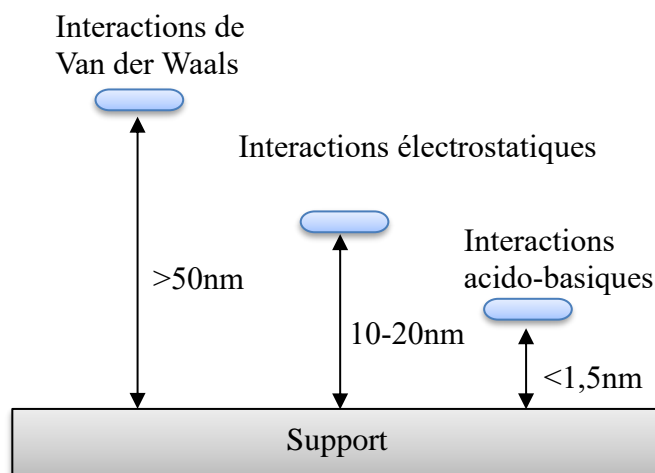


Figure 15: les interactions physicochimiques possibles entre un microorganisme et un support solide

1. Interactions de van der Waals

Les forces de van der Waals ont été ainsi nommées en l'honneur du physicien hollandais Johannes Diderik van der Waals (1873-1923). Ces forces impliquent l'existence d'une interaction d'attraction entre deux atomes neutres. Il a été démontré que les interactions de van der Waals comprennent trois types de forces :

vi. Interaction de Keesom entre dipôles (Forces d'orientation)

Ces forces, décrites par Willem Hendrik Keesom en 1915, Il s'agit d'une attraction entre deux molécules polaires, c'est-à-dire d'une interaction dipôle-dipôle (Keesom, 1921). Le champ d'un dipôle tend à orienter les autres. Cet effet d'orientation se traduit par l'existence d'une énergie potentielle entre molécules.

vii. Interaction de Debye entre dipôle et dipôle induit (Forces d'induction)

Une molécule non polaire, placée dans un champ électrique créé par une molécule polaire, se polarise et acquiert un moment dipolaire induit (Debye, 1920). Ce moment dipolaire est proportionnel d'une part au champ électrique créé par la molécule polaire, et d'autre part à une grandeur caractéristique de la molécule non polaire, sa « polarisabilité ». La « polarisabilité » d'une molécule croît avec les dimensions de celle-ci.

viii. Interaction de London entre dipôles induits (forces de dispersion)

Même en l'absence de molécules polaires, il subsiste des interactions moléculaires très faibles appelées forces de London. Par suite des fluctuations de la position de ses électrons, la configuration électronique d'une molécule change continuellement. Une molécule quelconque présente donc, à certains instants, un moment dipolaire instantané, capable de créer un champ électrique et faire apparaître des dipôles induits en phase dans les molécules voisines (London, 1930).

2. Interactions électrostatiques

Une particule, bactérie, surface plane immergée dans un fluide acquiert une charge de surface provoquée par l'adsorption ou l'ionisation des groupements présents à sa surface (James, 1991). Cette adsorption et cette ionisation dépendent de pH du milieu. Pour un pH neutre, la plupart des corps solides (microorganismes) portent une charge négative.

La surface chargée qui est immergée dans un milieu aqueux facilite la redistribution des ions. Les ions de même signe (co-ions) doivent être repoussés de la surface tandis que les ions chargés positivement (counter-ions) doivent être attirés. Cet effet crée une double couche électrique à la proximité de la surface.

Les interactions électrostatiques qui apparaissent entre la surface des microorganismes et la surface réceptrice sont dues au recouvrement des couches associées aux groupes chargés présents à la surface de la cellule microbienne et à ceux de la surface réceptrice (Rutter, 1980). Cette interaction est répulsive lorsque les deux corps portent des groupes chargés de même signe et attractive dans le cas contraire.

3. Interactions acido-basiques

Dans un milieu aqueux, les interactions polaires comprennent principalement l'interaction entre donneur d'hydrogène et accepteur d'hydrogène (ou entre acide et base de Bronsted). D'après Van Oss (1996) ce concept doit être élargi aux interactions donneuses d'électrons / accepteur d'électrons ou interactions acido-basiques au sens de Lewis. Les forces d'interactions polaires

sont essentielles en milieux aqueux et décroissent de façon exponentielle en fonction de la distance.

❖ **Liaisons hydrogène**

La liaison hydrogène est une interaction de nature électrique entre atomes électronégatifs (O, Cl, F, N...) et atomes d'hydrogène liés à un atome électronégatif. Un composé donné peut être hydrophile, c'est-à-dire capable d'intervenir avec des liaisons hydrogène. Il existe différents degrés dans ce caractère, ce qui se traduit par l'existence d'interactions hydrophiles et hydrophobes plus ou moins importantes (Vergnault, 2004).

❖ **Répulsion hydrophile**

Dans le cas de surfaces polaires ou chargées, les groupements fonctionnels de la surface deviennent hydratés : ils s'associent avec les molécules d'eau par des liaisons hydrogène.

L'interaction entre deux surfaces hydratées est une interaction répulsive. En effet, l'affinité de chacune de ces surfaces pour l'eau se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau. Or, pour parvenir à un contact rapproché des deux surfaces, il est nécessaire que celles-ci libèrent les molécules d'eau associées en fournissant de l'énergie.

Il en résulte une énergie de répulsion hydrophile, ΔG^{AB} , positive. Cette répulsion hydrophile est fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation d . Elle varie avec d , selon une loi exponentielle et est effective à des distances de l'ordre de 3 à 5 nm.

Selon la théorie développée par van Oss (1996), dans le cas de particules hydrophiles, il est possible de distinguer celles qui ont des propriétés de surface acides (c'est-à-dire accepteurs d'électrons) ou basiques (donneurs d'électrons) au sens de Lewis. Une répulsion hydrophile aura lieu entre deux corps de « nature » identique au sens de Lewis.

❖ **Attraction hydrophobe :**

Dans le cas où une surface solide ne porte pas de groupements fonctionnels ioniques ou polaires, ni de sites adéquats pour la formation de liaisons hydrogène, cette surface est inerte vis-à-vis de l'eau et est donc hydrophobe. Les molécules d'eau se trouvant à proximité de cette surface ont tendance à s'en éloigner pour s'entourer d'autres molécules d'eau. Dans le cas où ces molécules sont confinées entre deux surfaces hydrophobes, leur mouvement moyen en direction de la solution aqueuse favorise le rapprochement des surfaces. L'énergie d'attraction hydrophobe qui en résulte, ΔG^{AB} , est négative. Cette attraction hydrophobe est également fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation d . Elle varie avec d selon une loi exponentielle et est effective à partir de distances de l'ordre de 10 nm.

IV. Facteurs influençant l'adhésion bactérienne sur un support solide

1. Facteurs liés à la surface du support solide

a) Géométrie

La géométrie de la surface externe du biomatériau, à savoir sa forme tridimensionnelle, sa porosité, ses irrégularités de surface, détermine la localisation de l'adhésion bactérienne. Les bactéries colonisent préférentiellement les matériaux poreux et se regroupent en général au niveau des aspérités, des ruptures de courbure, des coins. L'accumulation des biofilms à la surface des matériaux se réalise de fait dans les zones où la circulation des fluides environnants est freinée par les frottements sur les parois (Campanac 2002).

b) Rugosité

La rugosité de la surface du biomatériau est une autre propriété pertinente pour le processus d'adhésion des bactéries. La rugosité de ces matériaux de la surface favorise généralement l'adhésion bactérienne et la formation par conséquent biofilm. Selon certaines irrégularités de surface des auteurs causés par la rugosité de surface accrue fournissent des cellules bactériennes d'abri en induisant leur attachement (Al-Radha ASD et al 2012 ; Amoroso PF et al 2006). En effet, les forces de cisaillement sont réduites, et la surface est plus élevée sur des surfaces plus rugueuses (M. Donlan R 2002 ; Katsikogianni M, Y Missirlis F 2004). Néanmoins, la croissance de ces micro-organismes dépend aussi de leur taille, la morphologie des cellules et leur reproduction (Katainen J et al. 2006 ; Messing RA et al. 1979). Il existe de nombreux paramètres de rugosité de mesure de rugosité de surface, tels que Ra (moyenne arithmétique de la rugosité de surface de chaque mesure à l'intérieur de la distance totale de rugosité moyenne $\frac{1}{2}$), Rmax (rugosité maximale à l'intérieur de la distance mesurée), (Racine rms rugosité moyenne carré), entre autres (Truong VK et al. 2010). Ra est le paramètre de rugosité plus universellement utilisé car il est facile de définir et de mesurer, fournir une bonne description générale des variations de hauteur (Gadelmawla ES et al. 2002). Cependant, ce paramètre ne suffit pas pour décrire la topographie ensemble d'une surface, donc, les autres paramètres de rugosité doit toujours être utilisé en même temps. Ces paramètres peuvent être mesurés par microscopie à force atomique, l'une des techniques de mesure de la rugosité de surface. Plusieurs études montrent que les forces d'adhérence bactérienne augmentent avec l'augmentation de la rugosité des surfaces substratum (Mei L, et al. 2011 ; Zhao Q et al. 2008). Toutefois, selon d'autres auteurs, l'influence de la rugosité de surface sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms n'est pas significative (Mei L, et al. 2011 ; Grossner-Schreiber B et al. 2001 ; Hilbert LR et al. 2003). Des études in vivo suggèrent une rugosité de surface de seuil pour la rétention bactérienne ($Ra = 0.2 \mu m$) en dessous duquel aucune réduction supplémentaire de l'accumulation bactérienne pourrait s'attendre. Cependant, une augmentation de la rugosité de surface au-dessus de cette rugosité de seuil, a donné lieu à une augmentation simultanée de l'accumulation de plaque (Bollen CM et al. 1997).

c) *Hydrophobicité*

Si la porosité joue un rôle clé, la mouillabilité de la surface (propriété qui permet aux liquides de s'étaler plutôt que de perler) semble aussi revêtir une importance primordiale. L'hydrophobicité est considérée comme la force d'interaction de courte distance, jouant un rôle déterminant dans l'adhérence bactérienne (Simões M et al. 2007). En effet les matériaux hydrophobes, peu chargés (téflon, polyéthylène, polystyrène, etc.) fixeraient plus facilement les bactéries que ceux de nature hydrophile, comme le verre. De façon générale, il est admis que les micro-organismes hydrophobes adhèrent fortement sur des matériaux hydrophobes alors que les microorganismes hydrophiles adhèrent plus fortement sur des matériaux hydrophiles (Massicotte et al. 2007).

d) *Charge électrique*

La force d'attachement dépendra aussi de la charge de la surface et de la durée du contact. En outre, la présence de certaines molécules organiques ou de certains ions dans le milieu d'immersion peut modifier considérablement les propriétés d'adhésion. Ainsi, dans la plupart des cas, les ions monovalents (Na^+ et K^+), bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ou trivalents (Al^{3+}) augmentent les chances de voir une bactérie adhérer à la surface, alors que l'absence de ces éléments peut empêcher l'adhésion de se produire. La plupart des bactéries en milieu aqueux acquièrent une charge négative (Katsikogianni et al 2004 ; Jucker et al 1996 ; Gottenbos et al. 2001). L'adhésion bactérienne sur une surface chargée négativement serait donc découragée tandis qu'une surface chargée positivement aurait un effet attractif (Gottenbos et al. 200 ; Hrkcs et al. 1991 ; Van der meihc, 1991). En effet entre une surface chargée positivement et une bactérie chargée négativement, les forces électrostatiques répulsives sont inexistantes. (Gottenbos et al. 2001) ont observés que la phase d'adhésion bactérienne était facilitée si le biomatériau était chargé positivement (PMMA/TMAEMA-C1 : +12mV).

e) *Présence d'un film conditionnant sur la surface*

Dans la plupart des environnements, les propriétés de surface des matériaux évoluent rapidement en fonction de l'environnement : un film conditionnant (ou film primaire) plus ou moins homogène peut se former sur la surface des matériaux dès que ceux-ci entrent en contact avec des composés en solution, qu'ils soient organiques ou non. En effet, la plupart des molécules sont capables de s'adsorber spontanément sur des surfaces inertes. Tous les matériaux, hydrophobes ou hydrophiles, sont sujets à ce phénomène. Ce dernier débute extrêmement rapidement, quelques secondes seraient suffisantes pour observer l'apparition de molécules adsorbées, mais il peut se poursuivre sur des durées beaucoup plus longues (Jullien et al.2008).

La présence de polymères sur un support modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation des biofilms (Nobbs, 2009).

2. Facteurs physicochimiques liés aux propriétés du milieu de suspension

a) *Température*

Elle est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes (Dumas C, 2007).

L'augmentation de la température favorise la multiplication bactérienne. Elle semble stimuler l'adhésion des microorganismes (Fletcher, 1988 ; Orstavik D, 1977) et modifier la sécrétion de slime (Gelasia et al. 2001). En effet, l'expression phénotypique de certaines souches bactériennes. Généralement quand la température se rapproche de 35°C, l'expression de certaines adhésines intervenant dans la phase d'adhésion irréversible ainsi que la production de slime augmentent (Gelasia et al. 2001).

b) *pH*

Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (Hamadi et al, 2004 ; Boutaleb, 2007).

L'adhésion bactérienne au support est fortement influencée par le pH (Gordon et al. 1981). Plusieurs essais en laboratoire ont prouvé que la majorité des bactéries se développent mieux à pH neutre ou légèrement alcalin (Bornert, 1989). Stanley (1983) avait montré que la fixation des bactéries peut varier selon le pH et qu'elle est généralement maximale à l'optimum métabolique. Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (Wu et al. 1994 ; Hamadi et al, 2004 ; Gaboriaud et al. 2006) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion.

c) *Composition du milieu*

La composition du milieu nutritif, tant au niveau qualitatif que quantitatif, est capable de moduler l'adhésion bactérienne (Bellifa, 2014). Ainsi la présence de calcium et de magnésium semble faciliter l'adhésion réversible de la bactérie à un support. La synthèse du slime est favorisée par un excès de carbone, une addition de glucose, ou une déplétion en nitrogène, potassium et phosphate (Baillif et al. 2010).

La concentration en nutriments joue un rôle majeur : un milieu riche en substrats favorise l'adhésion et la croissance bactériennes. En cas d'appauvrissement du milieu environnant les bactéries encore planctoniques auront tendance à être attirées par le biofilm qui représente alors une réserve en substrats (Bellifa, 2014).

3. Facteurs liés aux caractéristiques de la surface bactérienne

a) *Hydrophobicité*

L'hydrophobicité d'une bactérie peut être obtenue par diverses méthodes (Busscher et al, 1984). Elle varie suivant les espèces bactériennes et selon les souches d'une même espèce. Elle est influencée par le milieu environnant, l'âge de la bactérie, ainsi que par sa structure (Dankert et al. 1986 ; Krekelen et al. 1989).

Les bactéries hydrophobes paraissent avoir une capacité d'adhésion supérieure par rapport aux bactéries hydrophiles (Van loosdrech MCM et al. 1987). Habituellement, les bactéries hydrophobes préfèrent des surfaces hydrophobes et les bactéries hydrophiles, les surfaces hydrophiles (Hogt AH et al. 1983 ; Vacheethasane K et al. 1998).

b) *Charge*

Une bactérie dont la charge de surface est élevée est presque toujours hydrophile (Hogt et al ,1985). Cette charge varie en fonction de l'espèce bactérienne est influencée par le milieu de culture (pH, force ionique), par l'âge de la bactérie ainsi que la structure de sa surface (Dankert et al. 1986).

Le rôle de la charge dans le phénomène d'adhésion est étudié par plusieurs auteurs (Mozes et al.1988 ; Van der Mei et al.1993 ; Van der Mei et al. 1995 ; Van der Mei et al. 1997). La corrélation entre la charge de la surface et l'adhésion n'est pas linéaire, ainsi l'effet de la charge paraît plus important pour l'adhésion des cellules hydrophiles que les cellules hydrophobes (Van Loosdrechet et al.1989). Une bactérie dont la charge de surface est élevée est presque toujours hydrophile (Hogt AH et al. 1985).

c) *Présence d'appendices et de substances polymériques extracellulaires*

La présence des appendices (flagelles, pilis, *fimbriae*) à la surface des cellules peut également avoir un effet sur l'adhésion des microorganismes. En effet la présence des flagelles peut influencer l'étape de transport et les interactions physico-chimiques et par conséquent le processus d'adhésion. Corpe (1980) a montré que les *fimbriaes* jouent un rôle dans l'adhésion en recouvrant les répulsions électrostatiques qui existent entre les microorganismes et le substrat. Les flagelles et les pili peuvent avoir des longueurs 15-20µm et 1-2µm respectivement, pour La des diamètres de 5 à 25nm. Ces structures sont donc capables d'accéder au support et d'initier une adsorption réversible.

La présence de EPS a la surface du microorganisme engendre des interactions avec le support conditionné, des liaisons de type pont polymérique, (Azeredo et al.1999). On retrouve le même type de ponts polymériques dans les processus de floculation biologique. Ces EPS peuvent être des longues chaînes carbonées qui vont permettre d'établir un contact avec le support à des distances plus grandes, de la même manière que les appendices. Cependant, les EPS ne jouent pas un rôle clé seulement dans l'absorption réversible. Ils permettent le franchissement de la barrière énergétique et l'établissement d'une adhésion irréversible.

V. Etude de l'adhésion bactérienne

1. Aspects physicochimiques : évaluation de l'interaction bactérie-support

Comme présentées précédemment, les caractéristiques physicochimiques des surfaces, de la cellule et du support, sont déterminantes dans les processus d'adhésion. La mesure de l'hydrophobicité d'un matériau se fait généralement par la technique des angles de contact. Une goutte de liquide est déposée sur le matériau. La forme qu'elle adopte (plus ou moins étalée sur le matériau) témoigne du caractère hydrophobe du matériau (Figure 4).

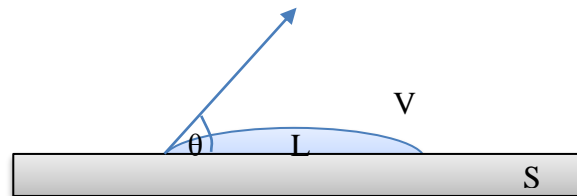


Figure 16: Technique de mesure des angles de contact (θ) au point triple entre le liquide (L), le support (S) et le vapor (V). (Habouzit et al., 2010)

La mesure de cet angle nous donne trois types d'information :

Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.

Si on utilise plusieurs liquides de référence différents (Eau, formamide, diiodométhane), on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss ou celui d'Owens Wendt.

Si on mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

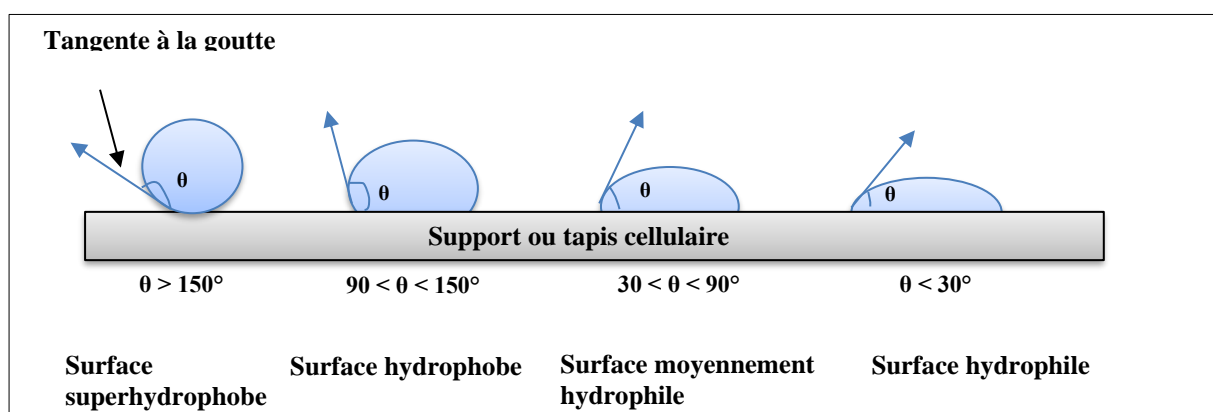


Figure 17: Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de leurs affinités (Petrov, P.G et al. 1991)

La formule suivante (12) est ensuite utilisée pour déterminer les propriétés du support (S) en fonction du liquide (L) :

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \cdot \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+} \right) \quad (12)$$

Cette équation à trois inconnues (γ_{LW} , γ_+ , γ_-) sur le solide peut être résolue en utilisant trois liquides avec des énergies de surface γ_L connues (Tableau 1) (Van Oss et al. 1986 ; van Oss, 1995). De cette façon l'ensemble des propriétés liées à l'énergie de surface du matériau (γ , γ_{LW} , γ_+ , γ_- et γ_{AB}) peut être déterminé.

Tableau 1: Valeurs des différentes composantes de liquides utilisés dans la mesure de l'énergie de surface (Hadjiev D et al 2007)

Liquide	γ_L (mJ/m ²)	γ_L^d (mJ/m ²)	γ_L^p (mJ/m ²)	γ_L^{p+} (mJ/m ²)	γ_L^{p-} (mJ/m ²)
Eau	72.8	21.8	51	25.5	25.5
Formamide	58	39	19	2.28	39.6
Diiodométhane	50.8	50.8	0	0	0

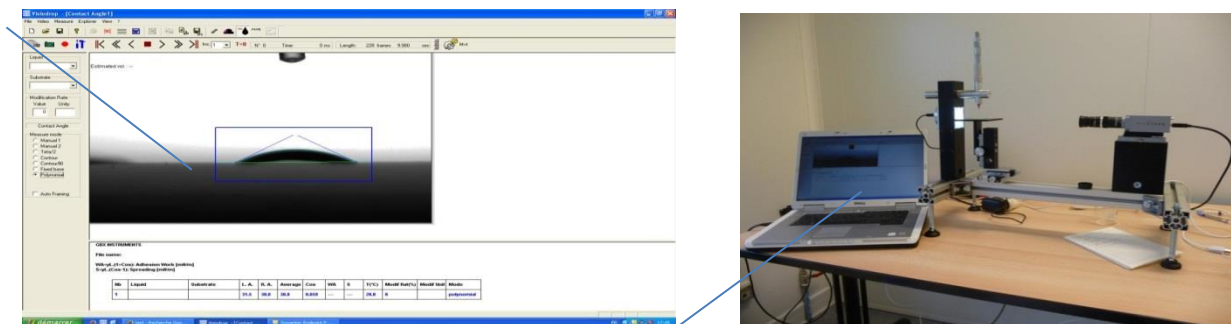


Figure 18 : l'appareil de mesure de l'angle de contact (le goniomètre)

La procédure de mesure de la tension de surface est effectuée par un goniomètre.

La mesure de l'angle se fait à partir d'images capturées par un PC via une caméra. Le logiciel WINGOUTTE permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images. Il détermine ensuite l'angle de contact grâce à des méthodes d'interpolation. Le logiciel WINGOUTTE utilise les méthodes d'interpolation par polynôme ou par arcs de cercles pour déterminer l'angle de contact. À l'issue des mesures, le logiciel WINCALC calcule les différentes composantes associées aux modèles de GOOD VAN OSS et OWENS WENDT pour les mesures utilisant deux à trois liquides différents. Un système motorisé permet de faire des mesures d'angles à l'avancée et au retrait de la goutte, l'aiguille de la seringue étant alors maintenue dans la goutte. Une enceinte en plexiglas permet d'isoler le système goutte – échantillon de l'air et des contaminations extérieures.

2. Aspects microbiologiques ; évaluation du nombre de bactéries adhérentes

Cette appellation regroupe l'ensemble des essais pour lesquels la suspension cellulaire est mise en contact avec la surface inerte dans des conditions statiques ou des conditions d'agitation peu maîtrisées. À l'issue d'un temps de contact variable (de quelques minutes à plusieurs jours), le support est la plupart du temps rincé et les microorganismes restants adhérents sont comptés sous microscope optique, avec ou sans marquage préalable. Les microorganismes peuvent également être dénombrés après avoir été détachés du support par sonication.

Alors le nombre des bactéries adhérentes par un ml est calculé par la formule suivante :

Avec :

N_{UFC} : nombre d'unité formant colonie.

$$N_{UFC} = \frac{n}{V} \times Fd$$

n : nombre de colonies compté.

Fd : facteur de dilution de l'échantillon.

V : volume de l'inoculum ensemencé.

Cette technique présente des limites :

Les procédures de rinçage sont le plus souvent non standardisées (par exemple, un rinçage « doux », préconisé sans autre précision, est effectué) et vont dépendre de l'opérateur, rendant ainsi impossible toute comparaison entre des résultats provenant de différents laboratoires.

Par ailleurs, pendant le rinçage, les microorganismes adhérents sont soumis à des forces de détachement relativement importantes. Ainsi, un rinçage « doux » soumet le microorganisme à une force de l'ordre de 10^{-9} - 10^{-10} N (*Visser, 1976*). Mais le simple fait de sortir la lame de la suspension cellulaire se révèle de loin le plus drastique. En effet, cette dernière étape correspond à l'établissement d'une interface eau-air, ce qui se traduit par des forces de détachement de l'ordre de 10^{-7} N (*Leenars, 1988 ; Leenars et O'Brien, 1989*). Ces forces, le plus souvent appliquées de manière non intentionnelle, conduisent en fait à évaluer la rétention du microorganisme sur le support plutôt que sa réelle adhésion.

Conclusion

Le traitement des effluents des industries agroalimentaires par la digestion anaérobie semble être un choix indispensable pour limiter leurs effets néfastes sur l'environnement. L'utilisation des supports pour la fixation de la biomasse est devenue importante pour la technologie des digesteurs à biomasses fixes. Les supports (ou biocarriers en anglais) ont comme rôles de fixer la biomasse pour accélérer la formation du biofilm des microorganismes et par la suite accélérer le démarrage du digesteur, stabiliser la biomasse au sein de digesteur anaérobie afin d'éviter la perte de la biomasse à la sortie et d'augmenter la surface de contact entre la biomasse et la matière organique à traiter.

Des études se sont intéressées à l'étude de l'utilisation de différents supports au sein des digesteurs, par contre leurs objectifs étaient concentrés uniquement sur le rendement en biogaz des digesteurs sans qu'elles soient intéressées par la formation du biofilm. Le peu des études, qui ont consacré leurs travaux pour la compréhension du phénomène de l'adhésion des microorganismes sur les supports et l'effet de la nature du support sur l'adhésion, se sont focalisées sur des archées méthanogènes.

D'après ce qu'on a vu précédemment, l'adhésion microbienne est influencée par plusieurs paramètres. Parmi eux, le milieu environnant où la bactérie adhère sur le support. Des études ont montré l'effet du dépôt du film conditionnant des matières du milieu environnant sur l'adhésion bactérienne. Mais peu des études sont consacrées à évaluer l'effet du film conditionnant de la nature des matières organiques à traiter dans le digesteur sur l'adhésion microbienne aux supports.

Pour cela, ce travail a essayé d'étudier l'adhésion bactérienne d'une bactérie issue d'un digesteur anaérobie qui intervient dans les phases initiales du processus de la digestion. D'abord par l'études de l'adhésion de cette bactérie sur différents supports et ensuite étudier l'effet du film conditionnant de deux types de déchets organiques sur l'adhésion bactérienne.

DEUXIEME PARTIE :
ETUDES EXPERIMENTALES

Chapitre 1 : Choix de la bactérie issue d'un digesteur anaérobie et caractérisation physicochimique de la surface bactérienne et des supports

I. Introduction

Toutes les bactéries ne se fixent pas sur tous les supports de la même façon. Plusieurs études ont montré que les caractéristiques physicochimiques (hydrophobicité, caractère donneurs/accepteurs d'électron) de la surface bactérienne et de la surface du support interviennent fortement dans la fixation des cellules bactériennes sur un support. Pour cette raison, nous allons nous intéresser dans ce chapitre à la détermination de toutes les caractéristiques physicochimiques de la bactérie et des supports pour ensuite, ultérieurement, prédire la possibilité de la bactérie à s'adhérer sur les surfaces des supports étudiés.

II. Matériels et méthodes

1. Choix de la souche bactérienne et son rôle dans le digesteur anaérobie

Dans le cadre de la coopération entre l'équipe de Bioprocédés et Biointerfaces de la faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal et le laboratoire de biochimie et biotechnologie de la faculté des Sciences Université Mohamed Premier, une bactérie isolée d'un digesteur de laboratoire d'Oujda a été fournie pour étudier ses caractéristiques physicochimiques et son adhésion sur différents supports. La souche bactérienne avait prouvé une grande amélioration de la productivité des méthaniseurs lorsqu'elle est ajoutée dans le digesteur anaérobie comme auxiliaire de l'inoculum (Afilal et al. 2013). Le but de cette étude était de faire un choix du support le mieux adapté à la nature des déchets organique et sur lequel la bactérie peut adhérer en grand nombre. Cette étape devrait contribuer à l'amélioration du processus de méthanisation.

a) Tests biochimiques

La bactérie est utilisée par l'équipe du laboratoire d'Oujda car ils pensent que cette bactérie intervient au début du processus de la dégradation de la matière organique, ce qui explique le meilleur rendement du digesteur anaérobie.

Cette bactérie a été ramenée à Béni Mellal afin d'étudier ses caractéristiques physicochimiques.

Avant cela, la bactérie a subi une batterie de tests biochimiques, dans le but de l'identifier.

b) Souche bactérienne et conditions de culture

Cette souche est cultivée dans un milieu Luria Bertani liquide (LBL) à 37 °C pendant 24h. La composition du milieu LBL est : 10g de tryptone, 5g de l'extrait de levure, 10g de NaCl, et 1 litre d'eau distillé, le pH est 7.

c) Préparation d'une suspension bactérienne

Après 24 h de culture en milieu LBL, les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation (15 min à 5000 g), lavées deux fois par une solution de KNO₃ à une force ionique de 0,1 M et finalement diluées de manière à obtenir une DO_{600nm} comprise entre 0,7 et 0,8 (Figure 19).

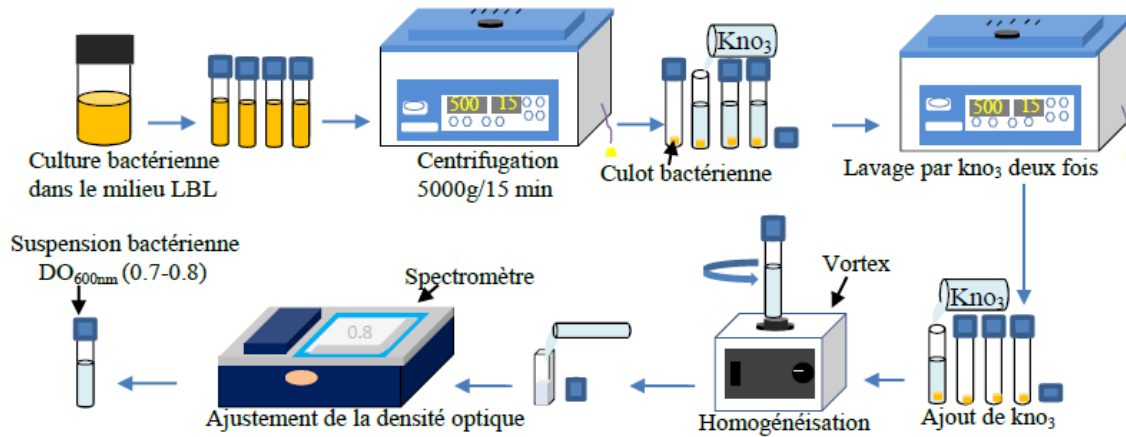


Figure 19 : Etapes de préparation de la suspension à partir d'une culture bactérienne

2. Mesure de l'angle de contact

La suspension bactérienne préparée est déposée sur un filtre d'acétate de cellulose (0,45 µm), en utilisant une rampe de filtration, pour produire un tapis bactérien dont l'épaisseur représente probablement de 50 à 100 cellules. Ce film est déposé sur un support métallique et laissé à évaporer. L'angle de contact est ensuite mesuré. L'eau (W), le formamide (F) et le diiodométhane (DM) ont été utilisés comme solvants de référence. Une goutte de 2 µl est formée à l'extrémité d'une seringue pour être déposée automatiquement à la surface de l'échantillon. Une séquence d'images numériques est aussitôt acquise (Windrop) à l'aide d'une caméra CCD disposée sur un goniomètre (GBX Instruments, France). Neuf mesures sont effectuées pour chaque échantillon. De la valeur moyenne calculée des mesures de l'angle de contact, on a pu par l'utilisation de l'équation (12) de Van OSS (1989 ; 1995) déterminer la tension de surface de Van der Waals γ^{LW} , le caractère accepteur d'électrons γ^+ et le caractère donneur d'électrons γ^- . L'énergies libres d'interaction ΔG_{iwi} a été calculé à l'aide de l'équation (13).

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \cdot (\sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+}) \quad (12)$$

$$\Delta G_{iwi} = -2 \left[\left((\gamma_i^{LW})^{\frac{1}{2}} - (\gamma_w^{LW})^{\frac{1}{2}} \right)^2 + 2 \left((\gamma_i^+ \gamma_i^-)^{\frac{1}{2}} + (\gamma_w^+ \gamma_w^-)^{\frac{1}{2}} - (\gamma_i^+ \gamma_w^-)^{\frac{1}{2}} - (\gamma_w^+ \gamma_i^-)^{\frac{1}{2}} \right) \right] \quad (13)$$

Les mesures sont effectuées en température ambiante (Figure 20).

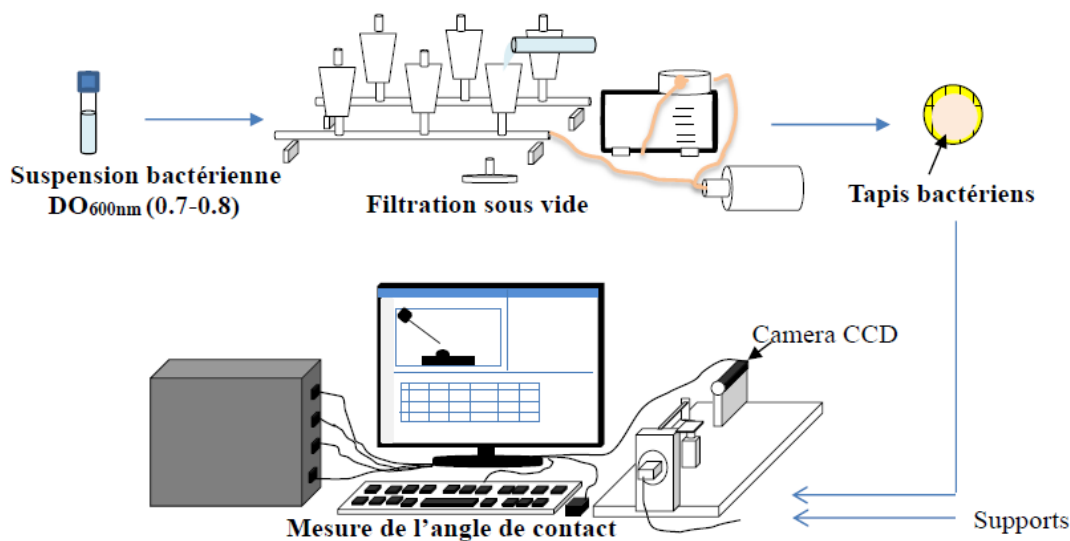


Figure 20 : Protocole pour mesurer l'angle de contact d'un tapis bactérien ou les supports

3. Choix des matériaux des supports

Trois différents matériaux de support ont été utilisés, comprenant des plastiques techniques ordinaires choisis pour leur faible coût, de durabilité et de la disponibilité et parce qu'ils sont couramment utilisés comme des matériaux des supports mobiles dans les digesteurs anaérobies ; ces trois matériaux sont le polytéréphtalate d'éthylène (PET), le polypropylène (PP), et le chlorure de polyvinyle (PVC) (Tableau 4). Chaque matière plastique a été découpée en coupons carrés 1,5 cm² pour les expériences des mesures de l'angle de contact, et 1cm² pour les tests d'adhésion.

Tableau 2: Propriétés physiques u polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) (www.wikipédia.com)

Supports	T° de fusion	Masse volumique	Formule brute
Polytéréphtalate d'éthylène (PET)	245 °C	1,38 g·cm ⁻³	(C ₁₀ H ₈ O ₄) _n
Polypropylène (PP)	145 à 175 °C	0,9 g·cm ⁻³	(C ₃ H ₆) _n
Chlorure de polyvinyle (PVC)	180 °C	1,38 g·cm ⁻³	(C ₂ H ₃ Cl) _n

a) Protocole de nettoyage et de désinfection des supports

Les supports en plastique ont été immergés dans l'éthanol pendant 15 min pour les désinfecter et éliminer la graisse sur leur surface. Ensuite, ils sont soumis à un bain de sonication (ultra son 15 kHz) dans l'eau distillé stérile pendant 10 min. Les coupons ont été rincés plusieurs fois avec

de l'eau distillée stérile. Puis ils ont été séchés avant d'être stockés dans des boîtes stériles pour une utilisation ultérieure (Figure 21).

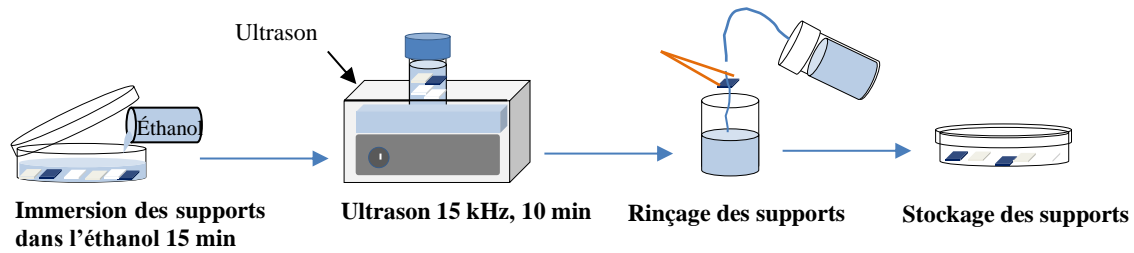


Figure 21: Protocole de nettoyage et désinfection des supports

b) Mesure de l'angle de contact :

La mesure de l'angle de contact des supports se fait après nettoyage et désinfection des supports. La procédure est la même que pour la bactérie, sauf qu'on remplace le tapis bactérien par le support (§1. II. 3 ; Figure20).

4. Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports

La connaissance des caractères physicochimiques des surfaces des bactéries et celles des supports nous permet de prédire les comportements adhésifs des bactéries sur les supports en utilisant la théorie XDVLO de Van Oss et al (1988). Selon cette théorie, l'énergie d'interaction ΔG^{Total} entre un microorganisme (M) et la surface d'un support (S) dans un liquide (L) est la somme de la composante de Van der Waals (ΔG^{LW}), de la composante acide-base (ΔG^{AB}) et de la composante électrostatique (ΔG^{EL}). L'adhésion d'un micro-organisme n'est énergétiquement favorisée que lorsque ΔG^{Total} est négative.

La composante électrostatique (ΔG^{EL}) est négligée à cause du fait que les expériences sur les bactéries sont réalisées avec des forces ioniques très élevées (Gallardo- Moreno et al 2004).

$$\Delta G_{\text{MSL}}^{\text{Total}} = \Delta G_{\text{MSL}}^{\text{LW}} + \Delta G_{\text{MSL}}^{\text{AB}}$$

Où

$$\Delta G_{\text{MSL}}^{\text{AB}} = 2[\sqrt{\gamma_L^+}(\sqrt{\gamma_M^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) + \sqrt{\gamma_L^-}(\sqrt{\gamma_M^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}]$$

$$\text{Et } \Delta G_{\text{MSL}}^{\text{LW}} = 2 \left(\sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_M^{\text{LW}}} \right) \left(\sqrt{\gamma_S^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}} \right)$$

M : Microorganisme

S : Support

III. Résultats et discussion

1. Test biochimique de la bactérie

On a les résultats de ces tests dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Résultats des tests biochimiques de la bactérie

Test biochimique	Résultat
Forme	Bacile
Gram	+
Oxydase	+
Catalase	+
Nitrate réductase	+
HUGH et LEIFSON	Bactérie fermentative
Type de respiration	Aérobic-anaérobic
Mobilité	Immobile
Citrate	-
Mannitol	-
Indole	-
Glucose	+
Galactose	-

Le profil des tests de la bactérie n'a pas permis de déterminer le genre ou la famille pour l'identifier. Pour cette raison, il est prévu d'utiliser la biologie moléculaire pour aider à donner une idée sur le genre et la famille de la bactérie.

2. Caractérisation physicochimique de la surface bactérienne

Après les mesures de l'angle de contact de différents liquides sur la surface bactérienne, on a utilisé l'équation (12) de Van OSS (1989 ; 1995) pour déterminer la tension de surface de Van der Waals γ^{LW} , le caractère accepteur d'électrons γ^+ et le caractère donneur d'électrons γ^- . L'énergies libres d'interaction ΔG_{iwi} a été calculé à l'aide de l'équation (13).

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \cdot (\sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+}) \quad (12)$$

$$\Delta G_{iwi} = -2 \left[\left((\gamma_i^{LW})^{\frac{1}{2}} - (\gamma_w^{LW})^{\frac{1}{2}} \right)^2 + 2 \left((\gamma_i^+ \gamma_i^-)^{\frac{1}{2}} + (\gamma_w^+ \gamma_w^-)^{\frac{1}{2}} - (\gamma_i^+ \gamma_w^-)^{\frac{1}{2}} - (\gamma_w^+ \gamma_i^-)^{\frac{1}{2}} \right) \right] \quad (13)$$

Tableau 4: Angle de contact et composantes de l'énergie de surface de la bactérie

Échantillon	Angle de contact (°)			Énergie de surface (mJ/m ²)			ΔG _{iwi} (mJ/m ²)
	θ _a	θ _f	θ _w	γ ^{LW}	γ ⁺	γ ⁻	
La bactérie	43,53	38,57	33,8	37,5	0,59	50,62	31,1
	(1,58)	(2)	(1,4)	(0,8)	(0,1)	(4,5)	(4,18)

L'écart-type est donné entre parenthèse

L'analyse qualitative de l'hydrophobicité montre que l'angle de contact entre la surface bactérienne et l'eau est $\theta_w = 33,8^\circ$, cela signifie que la bactérie testée possède un caractère hydrophile. Par ailleurs, on note que cette souche présente un fort caractère donneur d'électrons ($\gamma^- = 50,62 \text{ mJ/m}^2$), par contre, le caractère d'accepteur des électrons est très faible ($\gamma^+ = 0,59 \text{ mJ/m}^2$). L'approche quantitative affirme que la surface est encore hydrophile, car on constate que la souche testée à une énergie libre de surface positive ($\Delta G_{iwi} = 31,1 \text{ mJ/m}^2$) (Tableau 3).

Les résultats obtenus par la méthode d'angle de contact montrent d'une part, que la surface de la souche bactérienne présente un caractère hydrophile ($\theta_w = 33,8^\circ$, $\Delta G_{iwi} > 0$), et un caractère donneur d'électrons très remarquable ($\gamma^- = 50.62 \text{ mJ/m}^2$) contrairement à celui appelé accepteur d'électrons où on remarque qu'il est plus faible ($\gamma^+ = 0.59 \text{ mJ/m}^2$). Le même résultat été prouvé par les travaux de Nguyen et al (2016) qui ont travaillé sur la souche *Methanosarcina barkeri* (gram positive, anaérobie). A la lumière de ces résultats, plusieurs auteurs ont montré que l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact est directement corrélée avec le rapport élevé des concentrations de N/C et inversement corrélée avec celui des concentrations de O/C (Latrache et al. 1994 ; Dufrêne et al. 1996 ; Boonaert et Rouxhet 2000 ; Latrache et al 2002). Ces résultats indiquent que l'origine de l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact est les groupements contenant l'azote et l'origine de l'hydrophilicité est les groupements contenant l'oxygène. Dufêrne et al. (1997) ont montré que l'hydrophilicité des bactéries est liée à la présence de polysaccharide et l'hydrophobicité est liée à la présence des hydrocarbonés. Latrache et al (2002) ont montré également que l'hydrophilicité d'*E.coli* est liée à la présence des polysaccharides, alors que l'hydrophobicité est liée à la présence des protéines. Comme pour l'hydrophobicité de la surface des micro-organismes, plusieurs études sont consacrées à l'étude des éléments chimiques qui sont à l'origine du caractère donneur-accepteur. Plusieurs études (Cowan et al. 1992 ; Van der Mei et al. 1993 ; Latrache et al. 1994) ont étudié également la relation entre la charge de la surface cellulaire (bactérie, levure) et la composition chimique de cette surface. En effet, l'importance du caractère donneur d'électron a été attribuée à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire, comme les groupements carboxyles (COO⁻), phosphates (PO₄) des phospholipides, lipoprotéines et lipopolysaccharides, amines (NH₂) (Briandet et al. 1999) ou les groupements sulfates (SO₃) (pelletier et al. 1997). Ainsi, l'importance du caractère accepteur d'électrons a été attribuée à la présence des groupements acides exposés à la surface cellulaire, comme R-NH ou R-OH. Les travaux de

Hamadi et al. (2012) ont corrélée le caractère donneur d'électrons de la surface d'*E.coli* à une combinaison du groupe carboxyle et du groupe amine et aussi à une combinaison des protéines et des polysaccharides.

3. Caractérisation physicochimique de la surface des supports

L'angle de contact permet d'avoir les informations sur les caractères physicochimiques des surfaces facilement et avec une précision importante.

Tableau 5: Angle de contact et composantes de l'énergie de surface du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC). L'écart-type est donné entre parenthèse

Echantillon	Angle de contact (°)			Energie de surface (mJ/ m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/ m ²)
	θ_a	θ_f	θ_w	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
PET	36,8(1,5)	57,3(0,3)	80,9(3)	41,2(0,7)	0(0)	4,9(0,2)	-63,2(0,6)
PP	57,6(3)	50,1(1,4)	77,8(5,5)	30(2,3)	2,7(0,1)	4,1(1,7)	-42,3(2,5)
PVC	44,5(9)	49,8(1,6)	76,3(3,1)	37,3(0,4)	1(0,6)	5,3(1,7)	-48,5(11,4)

Les supports ont un caractère hydrophobe très remarquable (θ_w (PET)=80,9°, θ_w (PP)= 77,8°, θ_w (PVC)= 76,3°). Basé sur l'approche de Van Oss (1988,1996), la surface peut être classée hydrophile quand le ΔG_{iwi} est positif et hydrophobe quand le ΔG_{iwi} est négatif. L'approche quantitative (ΔG_{iwi}) nous donne les mêmes constatations que l'approche qualitative (θ_w). Les surfaces des trois supports présentent naturellement un caractère donneur d'électrons faible (γ^- (PET) = 4,9 mJ/m², γ^- (PP) = 4,1 mJ/m², γ^- (PVC) = 5,3 mJ/m²). Le caractère accepteur d'électron est très faible pour les 3 supports (γ^+ (PET) = 0 mJ/m², γ^+ (PP) = 2,7 mJ/m², γ^+ (PVC) = 1 mJ/m²)

De point de vue qualitatif et quantitatif, tous les matériaux polymères testés présentent un caractère nettement hydrophobe. De plus, tous ces matériaux présentent un faible caractère donneur /accepteur d'électron. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Nguyen et al, 2016 ; Noroa, 1987 ; Habouzit et al 2011 ; Assaidi et al 2018).

4. Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports

En appliquant l'équation de la théorie XVLDO avec les données des caractéristiques physicochimiques de la bactérie et des surfaces des supports non traités d'une part et celles de la bactérie et des surfaces des supports traités par la margines d'autre part, nous avons pu prédire la possibilité de l'adhésion bactérienne sur ces supports

D'après les résultats obtenus (Figure 22), il est à remarquer que la variabilité de l'énergie totale de l'adhésion entre les différents supports de plastique dépend essentiellement à la fois de la souche bactérienne et de la variété des matériaux. L'adhésion est favorable pour les supports non traités ($\Delta G_{PET}^{Total} = -8,54 \text{ mj/m}^2$, $\Delta G_{PP}^{Total} = -14,19 \text{ mj/m}^2$, $\Delta G_{PVC}^{Total} = -11, \text{mj/m}^2$)

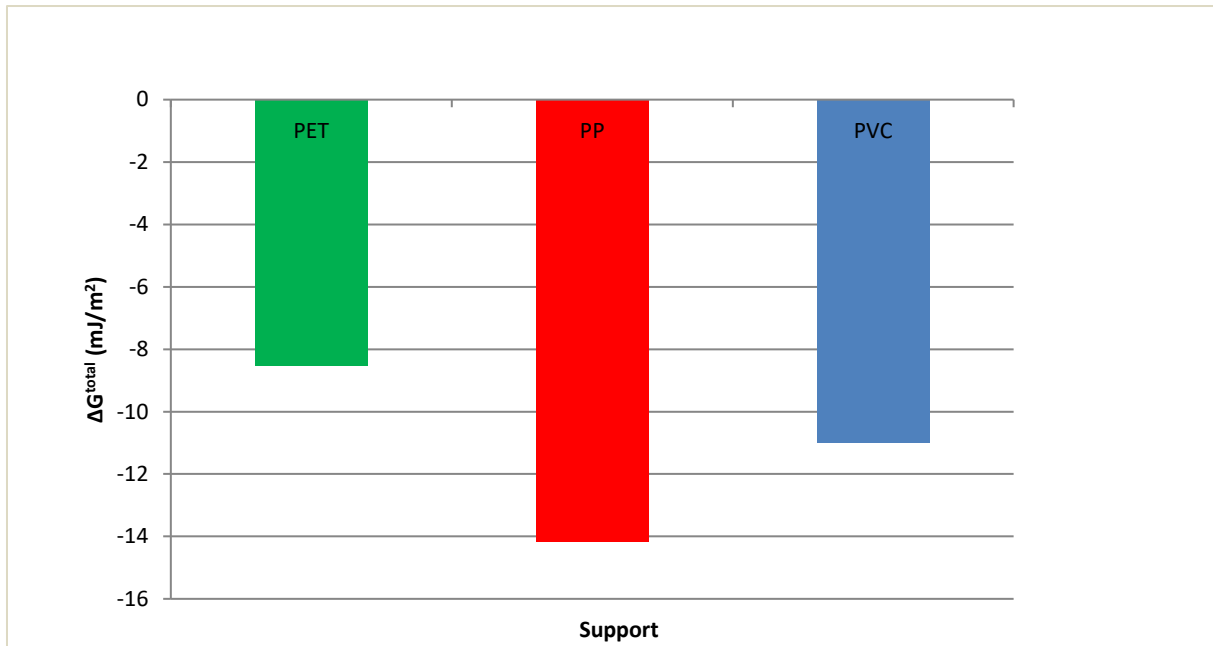


Figure 22 : Adhésion prédictive (ΔG_{Total}) de la bactérie sur les supports (PET, PP et PVC)

On peut constater que :

-La classification des supports, en fonction de l'adhésion théorique favorable est comme suit PP>PVC>PET.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu déterminer les caractères physicochimiques de la surface de la bactérie et des supports, à l'aide de la technique de l'angle de contact.

- La bactérie est qualitativement (θ_w) et quantitativement (ΔG_{iwi}) hydrophile ($\theta_w = 33,8^\circ$; $\Delta G_{iwi} = 31,1 \text{ mJ/m}^2$)
- La bactérie a un caractère donneur d'électrons (γ^-) très fort ($\gamma^- = 50,62 \text{ mJ/m}^2$) et un caractère accepteur d'électrons (γ^+) très faible ($\gamma^+ = 0,59 \text{ mJ/m}^2$)
- Les 3 supports étudiés (PET, PP et PVC) sont hydrophobes qualitativement et quantitativement ($90^\circ > \theta_w > 70^\circ$; $\Delta G_{iwi} < 0$)
- Ces matériaux présentent un faible caractère donneur /accepteur d'électrons
- L'adhésion est théoriquement favorable pour les supports ($\Delta G^{Total} < 0$)
- L'adhésion décroît selon cet ordre PP>PVC>PET

Chapitre 2 : Effet des effluents des industries agroalimentaires sur les propriétés physicochimiques des supports et sur l'adhésion prédictive

I. Introduction

Dans l'environnement, quand les matériaux sont immergés dans un milieu liquide, les nutriments en solution forment un dépôt sur la surface des matériaux. C'est ce qu'on appelle un film conditionnant (ou film primaire). En effet, la plupart des molécules sont capables de s'adsorber spontanément sur des surfaces inertes. Tous les matériaux, hydrophobes ou hydrophiles, sont sujets à ce phénomène. Ce dernier débute extrêmement rapidement, quelques secondes seraient suffisantes pour observer l'apparition de molécules adsorbées, mais il peut se poursuivre sur des durées beaucoup plus longues (Jullien et al.2008).

La présence de film conditionnant sur un support modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière (Nobbs, 2009 ; Kanematsu et al. 2015).

Dans ce chapitre on s'intéressera à étudier l'effet du film de conditionnement des effluents des industries agroalimentaires sur les caractéristiques physicochimiques des supports, donc il a fallu étudier les caractéristiques physicochimiques de ces matériaux plastiques avant et après leurs contacts avec les effluents des industries agroalimentaires. Cette caractérisation va nous servir à expliquer par la suite l'aptitude de la souche bactérienne étudiée à s'adhérer aux supports testés, car il est très connu que l'adhésion des microorganismes aux surfaces solides est un phénomène physico-chimique, qui fait intervenir trois éléments : la cellule microbienne, le support solide et le liquide de suspension.

On a choisi deux types des effluents des industries agroalimentaires, à s'avoir les margines de la région de Béni Mellal et les déchets liquides de l'usine de lait (Jibal). Le choix s'est porté sur ces deux-là car ils sont les plus importants déchets générés dans la région en termes de volume.

La connaissance des caractères physicochimiques des surfaces des bactéries et celles des supports nous permet de prédire les comportements adhésifs des bactéries sur les supports en utilisant la théorie XDVLO de Van Oss et al (1988). Selon cette théorie, l'énergie d'interaction ΔG^{Total} entre un microorganisme (M) et la surface d'un support (S) dans un liquide (L) est la somme de la composante de Van der Waals (ΔG^{LW}), de la composante acide-base (ΔG^{AB}) et de la composante électrostatique (ΔG^{EL}). L'adhésion d'un micro-organisme n'est énergétiquement favorisée que lorsque ΔG^{Total} est négative.

La composante électrostatique (ΔG^{EL}) est négligée à cause du fait que les expériences sur les bactéries sont réalisées avec des forces ioniques très élevées (Gallardo- Moreno et al 2004).

$$\Delta G_{\text{MSL}}^{\text{Total}} = \Delta G_{\text{MSL}}^{\text{LW}} + \Delta G_{\text{MSL}}^{\text{AB}}$$

Où

$$\Delta G_{MSL}^{AB} = 2[\sqrt{\gamma_L^+}(\sqrt{\gamma_M^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) + \sqrt{\gamma_L^-}(\sqrt{\gamma_M^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}]$$

$$\text{Et } \Delta G_{MSL}^{LW} = 2\left(\sqrt{\gamma_L^{LW}} - \sqrt{\gamma_M^{LW}}\right)\left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}\right)$$

M : Microorganisme

S : Support

L : Liquide

II. Matériels et méthodes

1. Mesure de l'angle de contact des supports après traitement par les effluents des industries agroalimentaires

La caractérisation physicochimique des supports non traités a été déterminé par la technique de l'angle de contact suite à leurs nettoyage, désinfection et séchage. Alors que pour les supports traités par les effluents des industries agroalimentaires, les 3 types des supports sont immergés dans les margines ou les déchets liquides de l'usine de lait à 37°C pendant 3h, puis séchées à l'air libre. Les angles de contact des 3 types de support ont été mesurés en utilisant la technique de la goutte sessile avec les trois liquides de polarité différente et avec une énergie superficielle connue. Nous avons utilisé deux types des effluents des industries agroalimentaires : Les margines et les déchets liquide de l'usine du lait. On a utilisé des margines qui diffèrent par leurs âges et le traitement thermiques (stérilisation) pour voir s'il y a des effets sur les propriétés physicochimiques des supports (Figure 23). Les déchets organiques liquides utilisées pour traiter les supports sont :

MA : Margines anciennes brutes de la région de Béni Mellal de la saison 2016-2017

MAS : Margines anciennes stérilisées brutes de la région de Béni Mellal de la saison 2016-2017

MN : Margines nouvelles brutes de la région de Béni Mellal de la saison 2018-2019

MNS : Margines nouvelles stérilisées brutes de la région de Béni Mellal de la saison 2018-2019

L : déchets liquides de l'usine de Lait

2. Mesure de l'angle de contact des supports après traitement par les déchets liquides de l'usine de lait en fonction du temps de traitement

Pour les supports traités par les déchets liquides de l'usine de lait, les mesures de l'angle de contact ont été réalisées après le séchage des supports mis en contact dans un bain rempli avec les déchets pendant 3 h, 6h, 18h et 24h à 37°C (Figure 23). Les déchets de l'usine de lait sont récoltés auprès de l'usine de traitement du lait Jibal près de Fkih Ben Saleh.

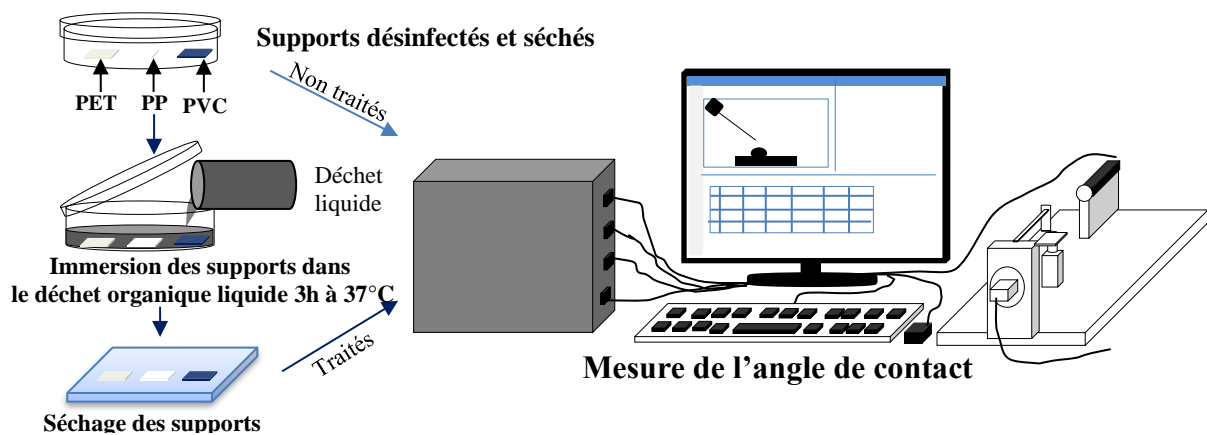


Figure 23: Protocole de mesure de l'angle de contact des supports et les supports traités par les déchets organiques liquides

III. Résultats et discussion

1. Caractérisation physicochimique de la surface des supports traités par les déchets organiques

Les résultats des mesures de l'angle de contact de la surface des supports sont mentionnés dans le tableau 7 dans l'annexe.

Pour mieux visualiser les données concernant les caractères physicochimiques, nous avons opté pour la présentation sous forme d'histogramme.

En se basant sur l'approche qualitative (θ_w), l'angle de contact relatif à l'eau nous renseigne sur l'hydrophobicité des trois supports qui change complètement lors du traitement de ces supports par les margines anciennes MA (2016) ou les margines anciennes stérilisées MAS (2016 stérile) (Figure 24). Les supports ont en premier lieu des caractères hydrophobe très remarquables (θ_w (PET)=80,9°, θ_w (PP)= 77,8°, θ_w (PVC)= 76,3°), mais une fois ils sont mis en contact avec les margines (MA) pendant un certain temps (3 heures), leurs hydrophobicités s'inversent complètement et elles deviennent hydrophiles (θ_w (PET)=28,3°, θ_w (PP)= 42,6°, θ_w (PVC)= 34,2°). Ça d'une part, d'autre part, quand on met les surfaces des trois supports (PET, PP, PVC) en contact avec les margines MAS, pendant 3 heures, on remarque qu'il n'y a pas un grand changement du caractère hydrophile des surfaces des supports, à l'exception du PET qui devient moins hydrophile (θ_w (PET)=44,9°, θ_w (PP)= 48,3°, θ_w (PVC)= 33,8°). Par ailleurs, on constate que les surfaces des supports non traités ont naturellement des caractères hydrophobes. Mais après les avoir mis en contact avec les margines nouvelles MN (2018) pendant 3 heures, et contrairement aux margines MA, les surfaces des supports gardent leur caractère hydrophobe (θ_w (PET)=70°, θ_w (PP)= 69,5°, θ_w (PVC)= 75,4°). En plus, on remarque qu'il n'y a pas un grand changement du caractère hydrophobe de ces matériaux lorsque on les traite par les margines nouvelles stérilisées MNS (2018) (θ_w (PET)=63,8°, θ_w (PP)= 68,9°, θ_w (PVC)= 65,2°). Après traitement avec les déchets du lait, tous les supports présentent une augmentation de leur hydrophobicité qualitative (θ_w), sauf pour le PET qui a vu son hydrophobicité rester presque stable (θ_w (PET)=79°, θ_w (PP)= 100,8°, θ_w (PVC)= 93,9°)

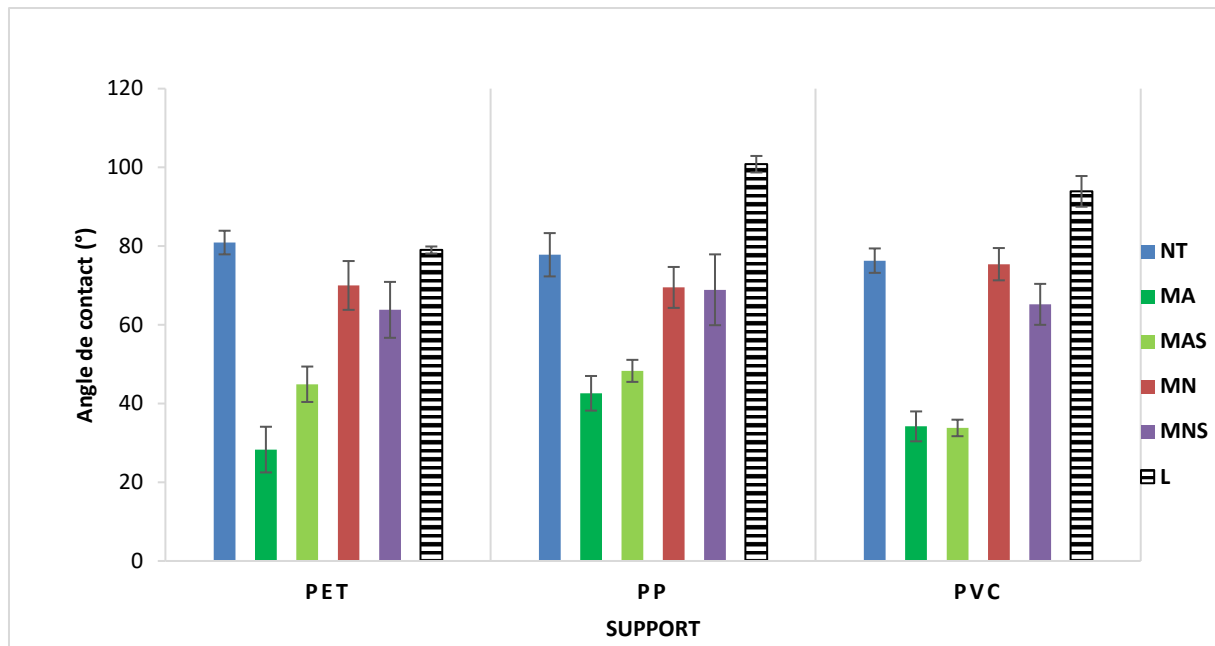


Figure 24: Angle de contact de l'eau (θ_w) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L)

Basé sur l'approche de Van Oss (1988,1996), la surface peut être classée hydrophile quand le ΔG_{iwi} est positif et hydrophobe quand le ΔG_{iwi} est négatif. L'approche quantitative (ΔG_{iwi}) nous donne les mêmes constatations que l'approche qualitative (θ_w) à l'exception du support PVC traité par les margines MAS : ($\theta_w(\text{PVC})= 33,8^\circ$ « hydrophile », $\Delta G_{iwi}(\text{PVC})= -2.7 \text{ mJ/m}^2$ « hydrophobe ») (Figure 25).

Mais autrement, du fait que ce raisonnement est basé sur les forces à courte distance (ΔG_{iwi}) générées par les surfaces des trois supports, l'hydrophobicité selon cette approche est traduite par le signe de la valeur de ΔG_{iwi} , respectivement positive (hydrophile) et négative (hydrophobe). Le traitement des supports par les margines MA (2016) ou les margines MAS (2016 stérile), inverse les valeurs de ΔG_{iwi} initiales des supports non traités qui sont négatifs et deviennent positifs. D'autre part, le traitement de ces supports par les margines MN (2018) ou les margines MNS (2018 stérile), gardent les caractères naturels des trois supports avec un changement non remarquable des valeurs de ΔG_{iwi} par rapport aux valeurs de ΔG_{iwi} initiales des supports non traités. Après le traitement avec les déchets du lait pendant 3h, nous avons remarqué une augmentation de l'hydrophobicité quantitative des supports PVC et PP sauf pour PET où elle a diminué après le traitement.

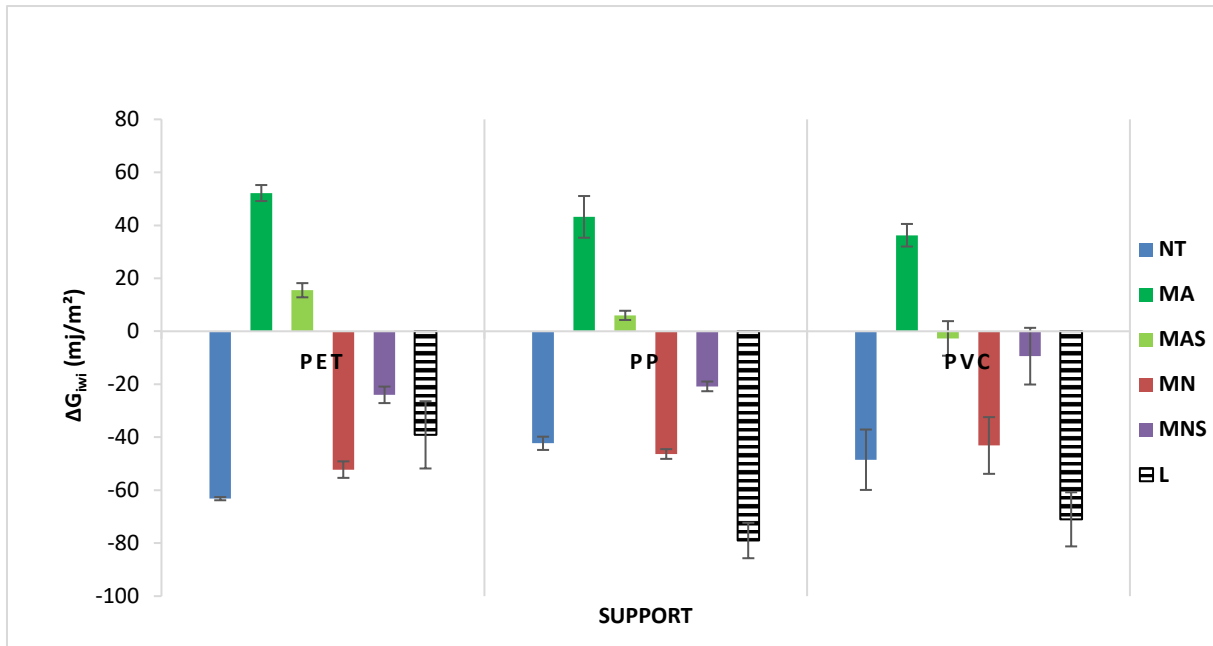


Figure 25: Hydrophobicité quantitative (ΔG_{iwi}) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L)

En ce qui concerne les caractères donneurs d'électrons (γ^-) (Figure 26), les surfaces des trois supports NT présentent naturellement un caractère γ^- faible ($\gamma^-(\text{PET}) = 4,9 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PP}) = 4,1 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PVC}) = 5,3 \text{ mJ/m}^2$). Le traitement de ces trois supports par les margines MA a donné des résultats complètement différents de l'état naturel des supports, où on a remarqué que γ^- à augmenter brutalement ($\gamma^-(\text{PET}) = 70,2 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PP}) = 57,1 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PVC}) = 99 \text{ mJ/m}^2$), même chose lorsqu'on les traite par les margines MAS ($\gamma^-(\text{PET}) = 37,8 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PP}) = 31,7 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PVC}) = 25 \text{ mJ/m}^2$). En parallèle, on constate que le caractère γ^- est plus important pour les supports traités par les margines MA (deux fois pour PET et PP et jusqu'à 4 fois pour le PVC) comparé avec les supports traités par les margines MAS. Par contre, lorsque le traitement des supports se fait par les margines MN on remarque que les valeurs du caractère γ^- ont doublé pour le PP et PVC et reste le même pour le PET par rapports aux valeurs initiales des supports non traités ($\gamma^-(\text{PET}) = 5,7 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PP}) = 7,9 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PVC}) = 10 \text{ mJ/m}^2$). En plus, on observe une augmentation de ces valeurs lorsque les supports sont traités par les margines MNS ($\gamma^-(\text{PET}) = 18,3 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PP}) = 18,9 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PVC}) = 24,7 \text{ mJ/m}^2$) par rapport aux valeurs du caractère γ^- des supports non traités et traités par les margines MN. Le traitement des 3 supports par les déchets du lait L a aussi modifié le caractère γ^- , sa valeur à augmenter de 2,7 fois pour le PET et diminuer de 6 et 2 fois pour le PP et PVC respectivement par rapport aux supports non traités ($\gamma^-(\text{PET}) = 13,3 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PP}) = 0,6 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^-(\text{PVC}) = 2,3 \text{ mJ/m}^2$).

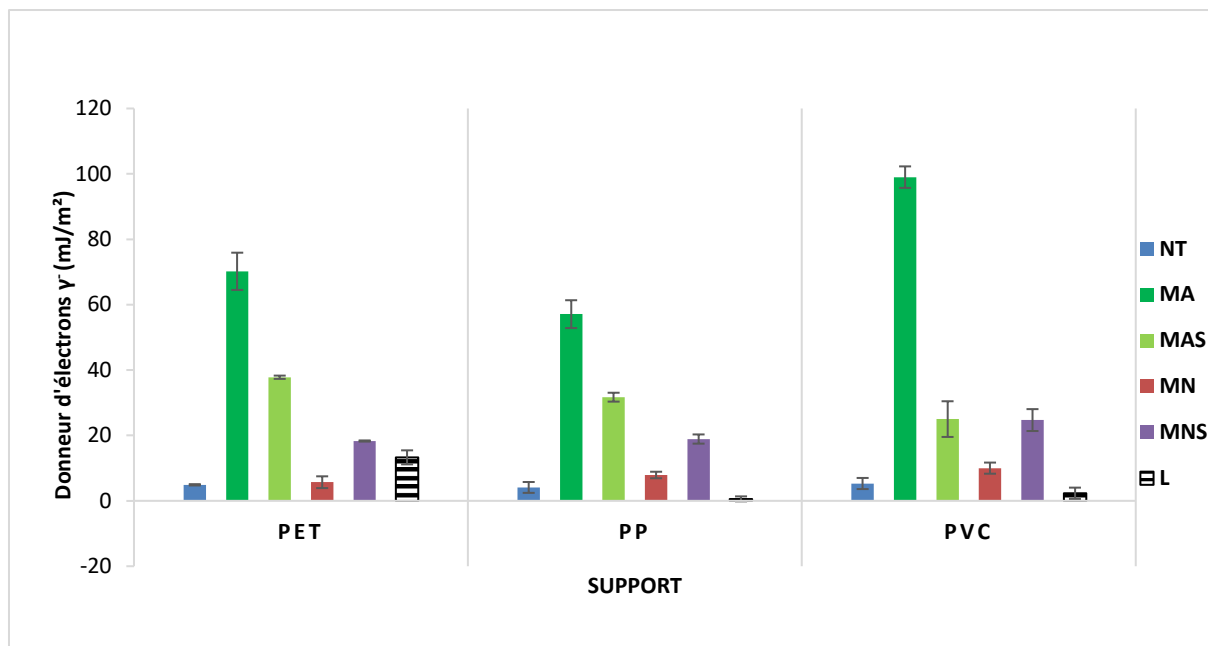


Figure 26: Caractère donneur d'électrons (γ^+) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L)

Le caractère accepteur des électrons (γ^+) des surfaces des supports présentent naturellement un caractère γ^+ très faible, voire même nul pour le support de PET ($\gamma^+(\text{PET}) = 0 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PP}) = 2,7 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PVC}) = 1 \text{ mJ/m}^2$) (Figure 27). Le traitement de ces supports par différents types de déchets organiques a donné des résultats voisines de l'état naturel des supports, à l'exception de PP traité par les margines MA où le caractère γ^+ a chuté légèrement ($\gamma^+(\text{PP}) = 0,2 \text{ mJ/m}^2$), alors que celui du PVC augmente significativement ($\gamma^+(\text{PVC}) = 8 \text{ mJ/m}^2$).

La méthode d'angle de contact nous a donné des résultats très détaillés en matière d'hydrophobicité et du caractère donneur/accepteur des électrons pour les trois supports (PET, PP, PVC), non traités et traités par les effluents des industries agroalimentaires. De point de vue qualitatif et quantitatif, tous les matériaux polymères testés non traités présentent un caractère nettement hydrophobe. De plus, tous ces matériaux présentent un faible caractère donneur /accepteur des électrons. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Nguyen et al (2016), Noroa (1987) et Habouzit et al (2011). Mais une fois, les supports sont mis en contact avec les margines MA (2016) ou MAS (2016 stérile), leurs hydrophobicités s'inversent complètement et elles deviennent hydrophiles, leurs caractères donneur/accepteur des électrons ont aussi augmenté à cause du traitement par les margines anciennes.

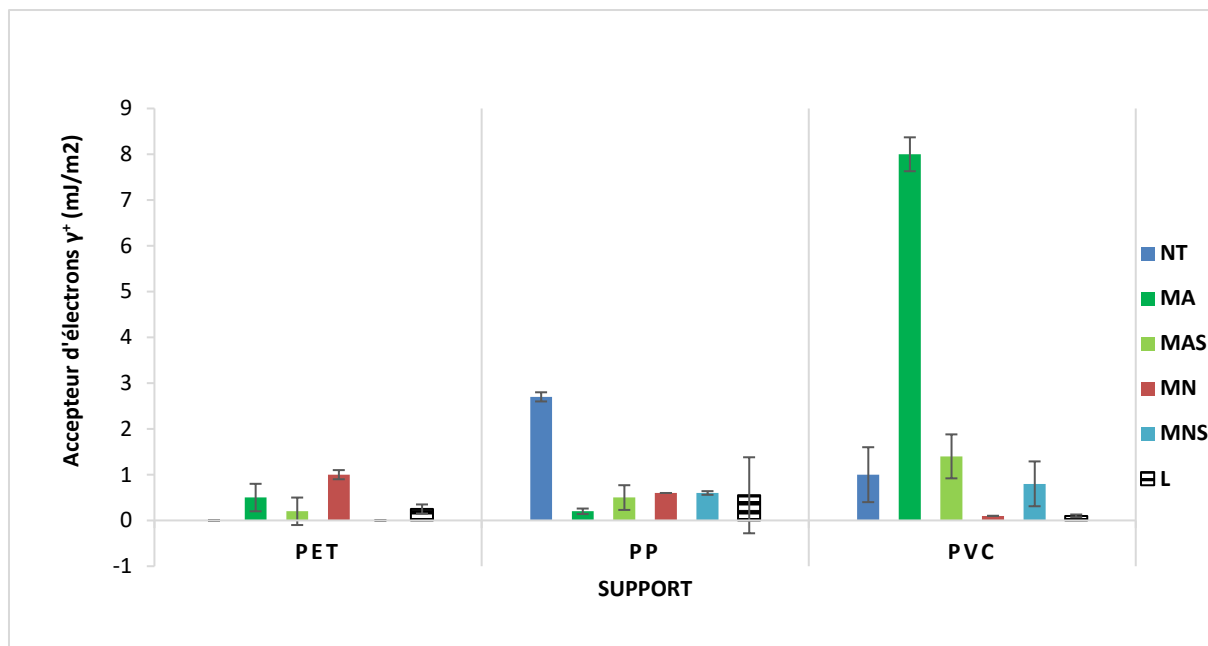


Figure 27: Caractère accepteur d'électrons (γ^+) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stérilisées) et les déchets du lait (L)

Les études sur les supports en plastiques traités par les margines et les déchets liquides de l'usine de lait sont très rares. Par simple raisonnement, le caractère hydrophile des supports traités par les margines anciennes est probablement due à la faible teneur des matières grasses, qui a probablement diminué au cours du temps à cause de leur dégradation par la charge microbienne présente naturellement dans le margine (surtout les champignons). Ce raisonnement est en accord avec les travaux de Hamadi et al (2014) qui ont rapportés que l'augmentation du caractère donneur des électrons et la diminution de l'hydrophobicité de l'acier inoxydable est due à la faible teneur en matière grasse, aussi ils ont affirmé qu'une importante quantité de lipides dans le lait peut provoquer une augmentation du caractère accepteur d'électrons.

Il est à noter que la concentration et le type des molécules adsorbées sur la surface du matériau sont conditionnés par la nature de ce matériau (ΔG_{Iwi} , hydrophobicité, caractère donneur/accepteur d'électrons, charges électrostatiques...) (Rosmaninho et al. 2007 ; Rubio et al. 2002), ça pourrait être une explication convainquant pour les différences observées dans les résultats de l'hydrophobicité et du caractère donneur/accepteur d'électrons entre les trois supports.

On peut affirmer que dans notre cas la modification des caractéristiques physicochimiques (hydrophobicité et caractères donneurs et accepteur des électrons) des trois supports, sont la conséquence des propriétés du margine et déchet du lait (l'âge et la teneur en matière grasse), et des propriétés des supports (ΔG_{Iwi} , hydrophobicité, caractère donneur/accepteur d'électrons, charges électrostatiques...). Par contre le traitement thermique des margines n'a pas un grand effet sur les caractéristiques physicochimiques des supports.

2. Caractérisation physicochimique de la surface des supports traités par les déchets liquides de l'usine de lait en fonction du temps

On a déterminé les caractères physicochimiques des supports non traités et ceux des supports traités aux déchets liquides du lait en suivant leurs évolutions selon le temps du contact des supports avec les déchets du lait (Tableau 8 Annexe).

Pour mieux visualiser les données concernant les caractères physicochimiques, nous avons opté pour la présentation sous forme d'histogramme.

Après traitement avec les déchets du lait, tous les supports présentent une augmentation de leur hydrophobicité qualitative (θ_w) (Figure 28), sauf pour le PET qui a vu son hydrophobicité rester presque stable puis diminuer après 24h. Selon les supports, nous remarquons une nette variation observable de l'hydrophobicité qualitative en fonction du temps de traitement avec les déchets du lait. En effet, au bout de 24h, le support PET montre une chute de l'hydrophobicité. Celle de PP a tendance à prendre de l'allure et le PVC voit son hydrophobicité augmentée après traitement mais reste presque la même après traitement. Nous voyons aussi que les supports montrent tous une hydrophobicité plus grande surtout pour le PVC et le PP au bout de 3h jusqu'à 24h.

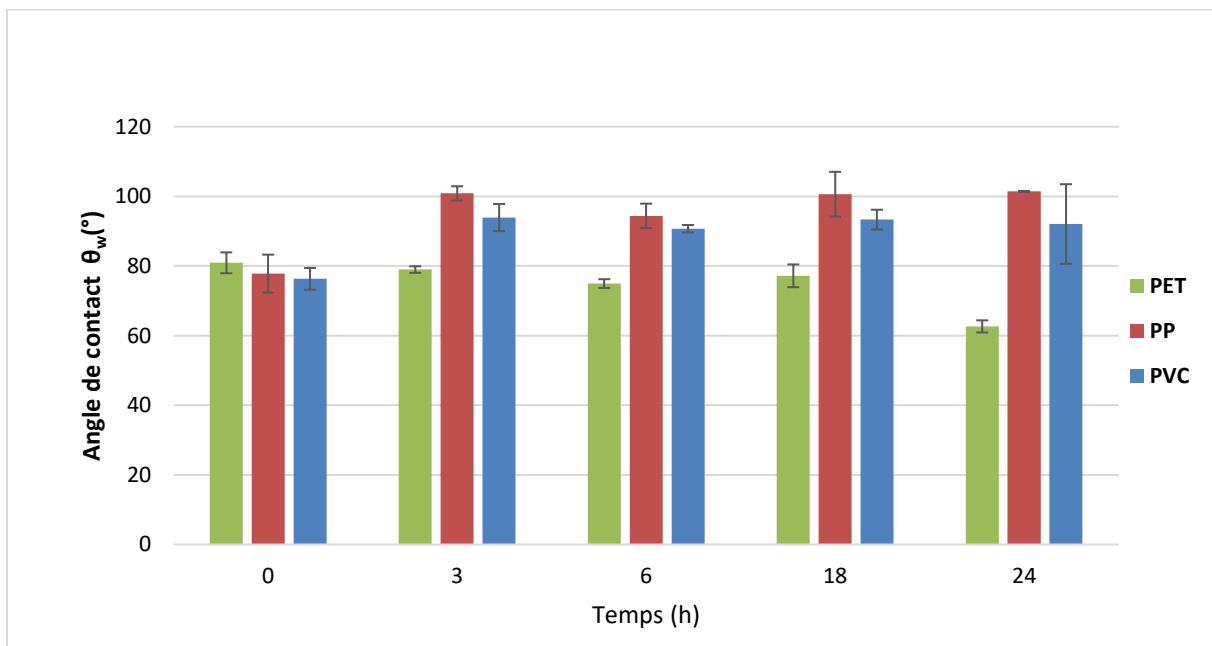


Figure 28: Hydrophobicité qualitative du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) en fonction du temps de traitement par les déchets du lait

Cependant, selon les valeurs relevées de l'hydrophobicité qualitative, les supports ont tous un angle de contact élevé, donc ils sont tous hydrophobes.

On peut déduire que le traitement fait augmenter l'hydrophobicité qualitative du PVC et PP avec le temps. Par contre elle reste presque stable pour le PET aux premières heures puis elle diminue par la suite mais reste relativement hydrophobe.

Le déchet du lait a une influence remarquable sur l'hydrophobicité des supports. Cette influence est cependant positive ou négative en fonction du support. Tous les supports PVC, PP et PET seraient hydrophobes. Mais il faut admettre que ces études de valeurs restent qualitatives. Pour mieux rectifier ces valeurs, il faut les compléter avec des valeurs quantitatives.

Comme il a été déjà mentionné, le traitement aux déchets du lait garde un effet observable sur nos supports, précisément sur leur caractère d'hydrophobicité quantitative.

L'hydrophobicité quantitative notée ΔG_{iwi} pour tous les supports est négative (Figure 29), ce qui implique qu'ils sont tous hydrophobes. Ces études ont déjà été prouvées par notre expérience sur l'hydrophobicité qualitative. C'est après le traitement avec les déchets du lait pendant 3h et 6h que nous avons remarqué la plus grande hydrophobicité quantitative des supports PVC et PP sauf pour PET où elle diminue tout au long du temps du traitement. Après 6h, ΔG_{iwi} de PVC et PP entame une diminution de sa valeur et se stabilise vers 24h au tour des valeurs avant traitement.

On peut déduire que le traitement fait augmenter l'hydrophobicité quantitative du PVC et PP avec le temps, par contre elle reste presque stable pour le PET aux premières heures puis elle diminue par la suite mais reste relativement hydrophobe.

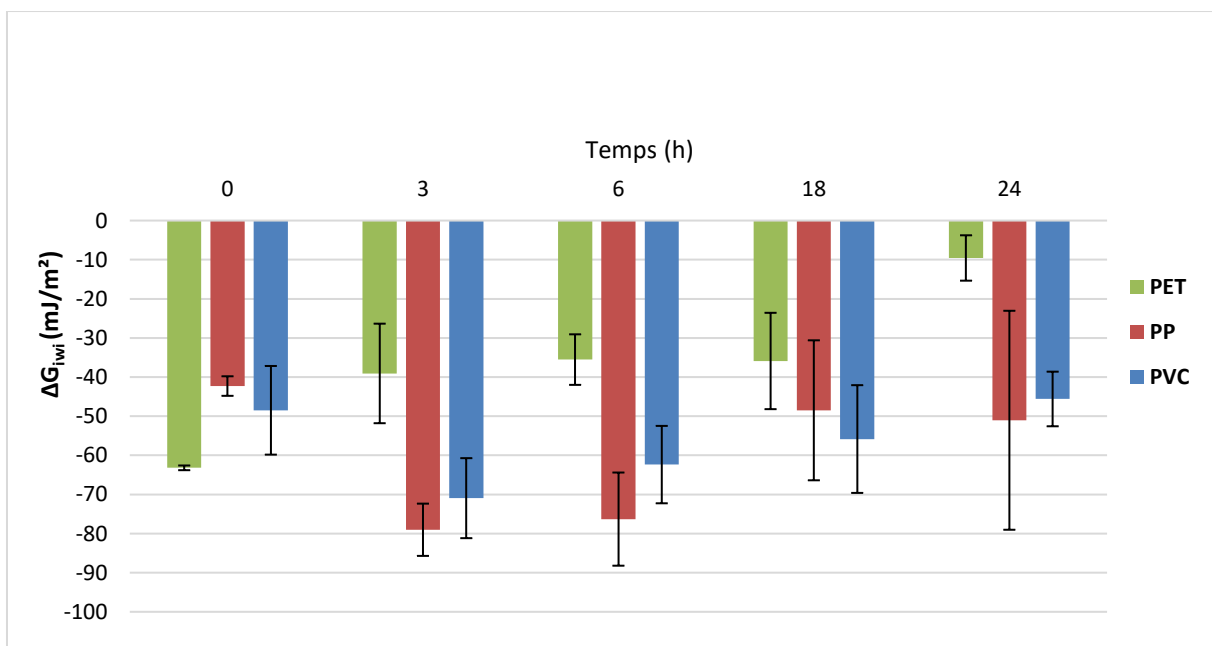


Figure 29: Hydrophobicité quantitative du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) en fonction du temps de traitement par les déchets du lait

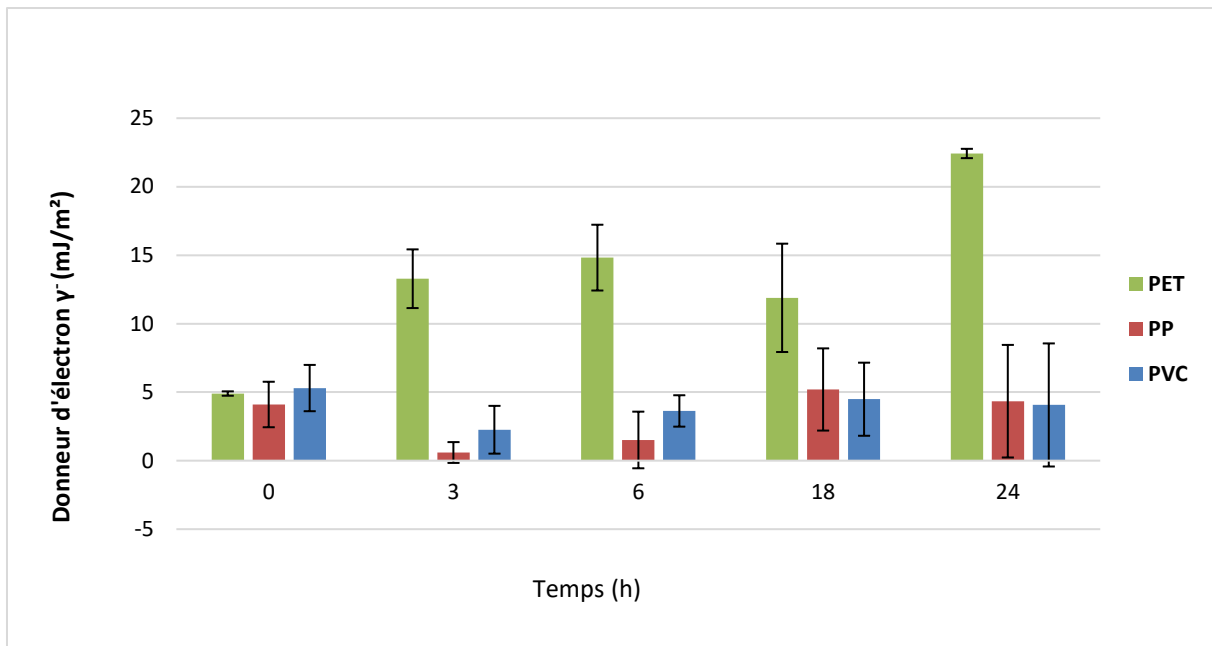


Figure 30: Effet du temps du traitement par les déchets du lait sur le caractère donneur d'électrons (γ) des supports (PET, PP, PVC)

On remarque (Figure 30) pour les trois supports non traités ont un caractère donneur d'électrons (γ) compris entre 4,10 et 5,3 mJ/m² avec celui de PVC supérieur suivi de PET (γ (PET) = 4,9 mJ/m², γ (PP) = 4,1 mJ/m², γ (PVC) = 5,3 mJ/m²). Après traitement de 3h le caractère γ pour le PET a augmenté, ceux de PP et PVC ont diminué par rapport aux supports non traités (γ (PET) = 13,28 mJ/m², γ (PP) = 0,6 mJ/m², γ (PVC) = 2,26 mJ/m²). Mais la valeur du caractère γ du support de PET reste la plus grande comparée aux autres, suivie de celle du caractère γ du support de PVC. Après le traitement de 6h, la valeur de γ pour le PP est inférieure aux autres alors que celle du PET reste la plus grande. On peut remarquer que le caractère γ pour le PET a augmenté par rapport au PET non traité et ceux de PP et PVC ont augmenté aussi mais restent inférieurs comparés à ceux des supports non traités (γ (PET) = 14,82 mJ/m², γ (PP) = 1,51 mJ/m², γ (PVC) = 3,63 mJ/m²). Après le traitement de 18h, la valeur du caractère γ pour le PVC est inférieure aux autres alors que celle du PET reste la plus grande. On remarque que les caractères γ pour les supports PVC reste en dessous de celui du support non traité. Mais celui du PET reste constant. Après le traitement de 24h, la valeur de γ pour le PET reste toujours plus grande. La valeur de γ a augmenté pour le PET, celles pour PP et PVC ont diminué, comparées aux valeurs des supports non traités. Pour le PVC la valeur du caractère γ est inférieure pour le support non traité support suivie de celle de support après traitement de 18h puis après traitement de 24h, 6h et 3h respectivement. Pour le support de PP, la valeur du caractère γ est supérieure pour le support non traité suivie respectivement des valeurs des supports de 6h et 18h de traitement. Alors que celle du caractère γ pour le support après 3h de traitement est nettement inférieure aux autres. Pour le support de PET, les valeurs de γ augmentent respectivement pour le support après 24h de traitement, 6h, 3h, sans traitement, et 18h de traitement.

Pour les trois supports traités ou non traités (Figure 31), les valeurs du caractère accepteur d'électrons (γ^+) sont très faibles et sont comprises entre 0 et 2,7 mJ/m² ($\gamma^+(\text{PET}) = 0 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PP}) = 2,7 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PVC}) = 1 \text{ mJ/m}^2$). Avant traitement, la valeur de γ^+ pour le PP est supérieure à celle des autres, alors que celle du PET est nettement inférieure.

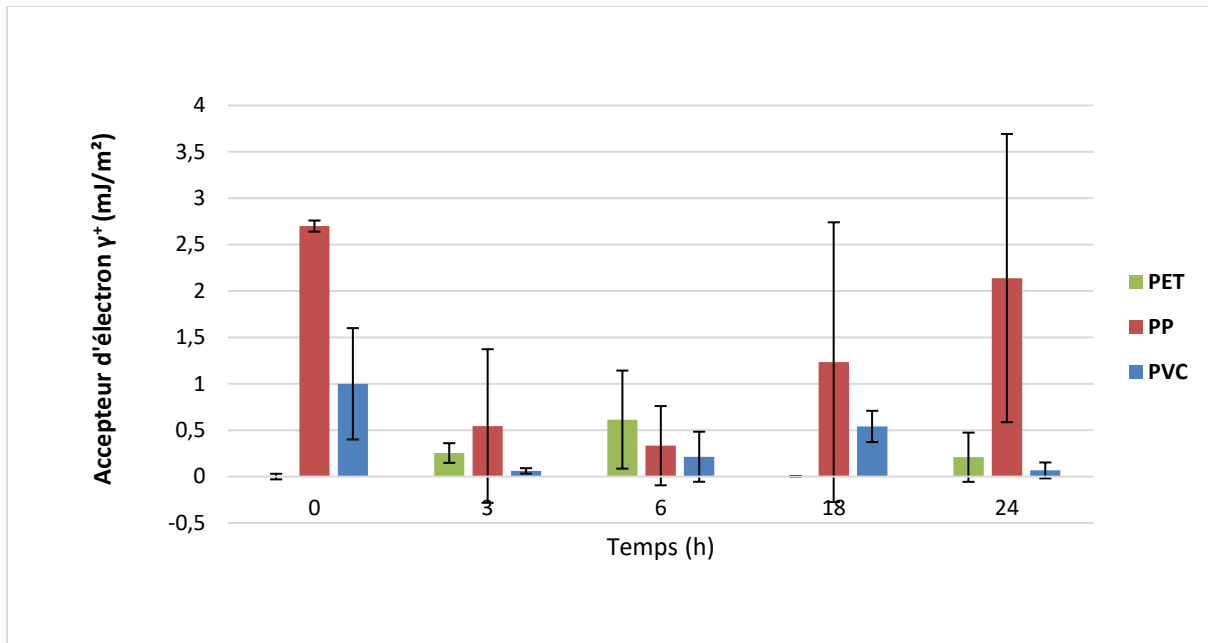


Figure 31: Caractère accepteur d'électrons (γ^+) des supports (PET, PP, PVC) non traités (0 h) et traités par les déchets du lait pendant 3h, 6h, 18h et 24h

Après de traitement de 3h on observe une diminution de la valeur du caractère γ^+ pour PVC et PP alors que celle du PET a augmenté par rapport aux supports non traités ($\gamma^+(\text{PVC}) = 0,06 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PP}) = 0,55 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PET}) = 0,25 \text{ mJ/m}^2$). La valeur du caractère γ^+ du PP reste supérieure aux autres. Après le traitement de 6h, la valeur de caractère γ^+ pour le support PET est la plus grande suivie de celle de PP ($\gamma^+(\text{PET}) = 0,61 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PP}) = 0,33 \text{ mJ/m}^2$). Les valeurs restent en dessous des valeurs du γ^+ pour les supports non traités. Après le traitement de 18h, on peut remarquer que la valeur du caractère γ^+ pour le support PP est la plus grande suivie de celle de PVC. La valeur a diminué pour le PET et a augmenté pour le support PP et PVC ($\gamma^+(\text{PET}) = 0 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PP}) = 1,23 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PVC}) = 0,54 \text{ mJ/m}^2$), mais elles restent en dessous des valeurs du caractère γ^+ pour les supports non traités. Après le traitement de 24h, la valeur du caractère γ^+ pour le support de PP est toujours la plus grande suivie de celle de PET. La valeur a diminué pour les supports PVC et PET ($\gamma^+(\text{PET}) = 0,21 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PP}) = 2,14 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PVC}) = 0,1 \text{ mJ/m}^2$). La valeur a augmenté pour le support PP et se compare à celle du caractère γ^+ pour le support PP non traité.

Pour les supports PVC traités, la valeur du caractère accepteur d'électrons γ^+ est inférieure à celle du support non traité. Pour les supports PP traités, les valeurs du caractère γ^+ est inférieure à celle du support non traité mais augmente respectivement, après 3h du traitement. Pour les supports PET traités, la valeur du caractère γ^+ est supérieure à celle du support non traité et augmente après 3h du traitement respectivement.

L'adhésion microbienne sur une surface est assez complexe car elle met en jeu les composants électrostatiques, de Van der Waals et acido-basique. Notre étude consistait à déterminer les caractéristiques physico-chimiques de trois supports d'adhésion traités et non traités avec les déchets du lait.

Les résultats montrent que l'hydrophobicité, qualitativement et quantitativement, augmente après le traitement avec les déchets du lait pour les supports de PVC et PP. Ces résultats concordent avec ceux de Hamadi et al (2013) qui ont travaillé sur l'acier inoxydable et ont trouvé que l'acier recouvert du lait est plus hydrophobe que celui non recouvert. Il est connu que le lait est un fluide biologique complexe et il est constitué de plusieurs composants comprenant des protéines, des graisses et du phosphate de calcium. Selon Mittelman et al (1998) l'adsorption du lait et de ses composants sur la surface du substrat se produit à moins de 5 à 10s.

L'effet des protéines hydrophobes de surface solide est rapporté par certains travaux (YANG et al., 2016) qui ont constaté que l'adsorption de β lactoglobuline sur la surface du substrat peut rendre les surfaces les plus hydrophobes en surfaces hydrophiles et augmenter l'hydrophilicité des surfaces hydrophiles. Barnes et al (1999) ont rapporté que les composants de graisse sont susceptibles d'interagir avec la surface hydrophobe en acier inoxydable. Dans notre cas l'augmentation de l'hydrophobicité de PVC et PP peut s'expliquer par l'adsorption des constituants du reste du lait sur les supports. Dans les trois premières heures, nous pourrions suggérer un éventuel dépôt des composants (protéines, minéraux etc.) du déchet du lait suivi après 6h de l'adhésion des bactéries qui existent dans les déchets. Ces résultats sont en désaccord avec le PET qui voit son hydrophobicité stagner, des fois elle diminue. Harnett et al. (2007) ont calculé l'énergie de surface de divers matériaux de revêtement d'une série de protéines de collagène et fibronectine et ils ont constaté que ces protéines affectent de manière significative le donneur et l'accepteur d'électrons de certaines surfaces du substrat. Dans notre cas, on trouve que le PP et PET non revêtus des déchets du lait présentent un caractère accepteur d'électrons plus faible que celui des supports revêtus des déchets du lait alors qu'on note le contraire pour PVC.

Les caractères donneurs électrons pour le PP et PVC sont plus forts pour les supports non revêtus que pour les supports revêtus par les déchets du lait. Ces résultats sont contradictoires à ceux qu'a trouvés Hamadi et al. (2013) pour l'acier oxydable. Pour le PET c'est le contraire.

Le caractère donneur d'électrons pour le PET s'améliore de façon exponentielle, pour le PP il diminue avec le traitement mais augmente au fil du temps puis stagne. Même chose pour le PVC. Sans traitement le PP présente le fort caractère donneur d'électrons.

Tous les supports présentent un faible caractère accepteur d'électron. Les caractères accepteurs d'électron pour les trois supports augmentent avec le traitement mais on remarque une chute de caractère accepteur pour le PET qu'on peut traduire comme une erreur de manipulation (Adhésion d'une souche étrangère sur le support).

3. Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports traités et non traités

a) Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports non traités et traités par les déchets liquides organiques

En appliquant l'équation de la théorie XVLDO avec les données des caractéristiques physicochimiques de la bactérie et des surfaces des supports non traités d'une part et celles de la bactérie et des surfaces des supports traités par les margines d'autre part, nous avons pu prédire la possibilité de l'adhésion bactérienne sur ces supports.

La figure 32 représente l'énergie d'interaction totale entre notre bactérie et les supports (PVC, PP et PET) non traités (NT) et traités par les différentes margines (MA (margines2016), MAS (margines 2016 stériles), MN (margines 2018) et MNS (margines2018 stériles)) et les déchets du lait L.

D'après les résultats obtenus, il est à remarquer que la variabilité de l'énergie totale de l'adhésion entre les différents supports de plastique dépend essentiellement à la fois de la souche bactérienne et de la variété des matériaux. L'adhésion est favorable pour les supports non traités ($\Delta G_{PET}^{Total} = -8,54 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PP}^{Total} = -14,19 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PVC}^{Total} = -11, \text{ mJ/m}^2$) et traités par les margines MN(2018) : ($\Delta G_{PET}^{Total} = -12,32 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PP}^{Total} = -7,40 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PVC}^{Total} = -2,26 \text{ mJ/m}^2$), l'adhésion est défavorable pour les supports traités par les margines MA(2016) ($\Delta G_{PET}^{Total} = 41,59 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PP}^{Total} = 36,93 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PVC}^{Total} = 45,67 \text{ mJ/m}^2$) même chose pour les supports traités par les margines MAS (2016 stérilisées) : ($\Delta G_{PET}^{Total} = 23,91 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PP}^{Total} = 18,71 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PVC}^{Total} = 12,61 \text{ mJ/m}^2$) et pour les matériaux traités par les margine MNS (2018 stérilisées) : ($\Delta G_{PET}^{Total} = 8,25 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PP}^{Total} = 5,52 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PVC}^{Total} = 10,62 \text{ mJ/m}^2$). L'adhésion est défavorable pour le PET traité par les déchets du lait et favorable pour le PP et PVC après traitement par les déchets du lait L : ($\Delta G_{PET}^{Total} = 2,16 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PP}^{Total} = -20,51 \text{ mJ/m}^2$, $\Delta G_{PVC}^{Total} = -12,96 \text{ mJ/m}^2$).

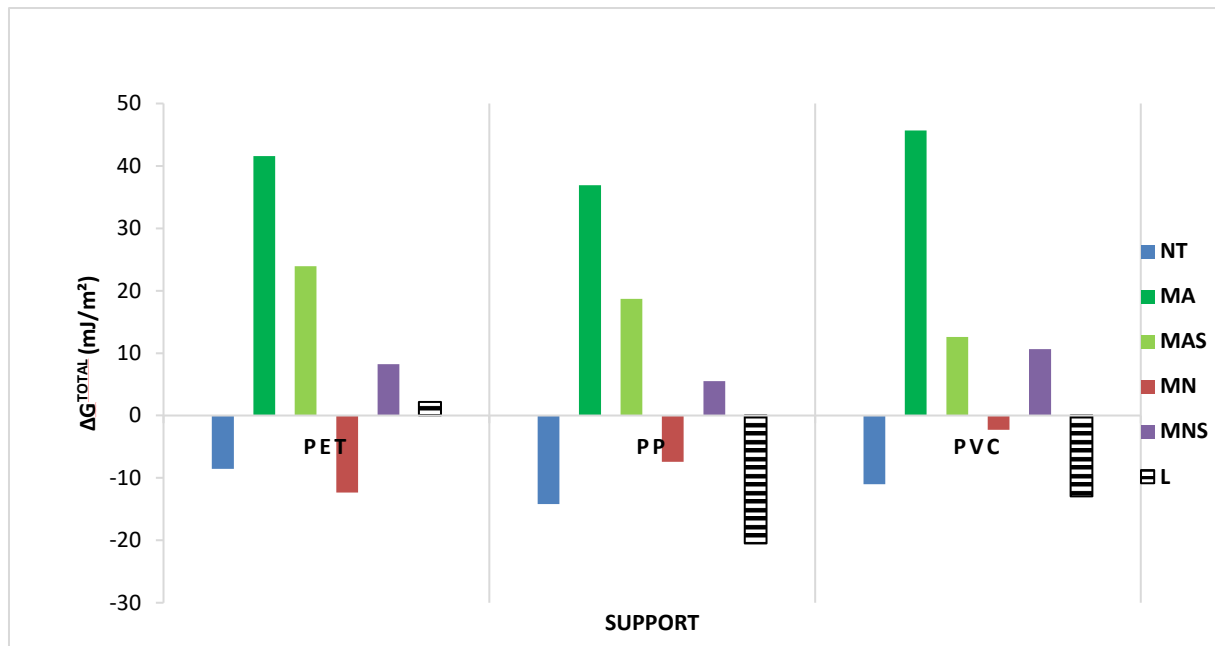


Figure 32: Adhésion prédictive (ΔG^{Total}) des supports (PET, PP, PVC) non traités (NT) et traités par les margines MA (margines 2016), MAS (margines 2016 stérilisées), MN (margines 2018) et MNS (margines 2018 stérilisées) et les déchets du lait L

On peut constater que :

- La classification des supports non traités par les margines, en fonction de l'adhésion théorique favorable est comme suit $PP > PVC > PET$.
 - La classification des supports traités par les margines M3, en fonction de l'adhésion théorique favorable est comme suit $(PET > PP > PVC)$.
 - La classification des supports traités par les déchets du lait est comme suit $PP > PVC > PET$
- Selon cette théorie, l'âge des margines (2 ans, MA et MAS) ainsi que le traitement thermique des margines (MNS) rendent l'adhésion de la bactérie sur les supports traités par ces margines énergétiquement défavorable.

b) Adhésion prédictive de la bactérie sur les supports non traités et traités par les déchets du lait en fonction du temps

Dans cette partie, on a utilisé la théorie XDVLO pour prédire l'adhésion de la bactérie sur les supports traités par les déchets du lait en fonction du temps du traitement (Figure 33).

Pour les trois supports, qu'ils soient traités ou non les valeurs de ΔG^{Total} sont comprises entre -20,51 mJ/m² (pour PP après 3h de traitement) et 12,26 mJ/m² (pour le PET après 24h de traitement). Après 3h de traitement, les valeurs de ΔG^{Total} deviennent plus favorables (<0) pour les supports de PP et PVC, mais la valeur ΔG^{Total} devient défavorable (>0) pour le PET par rapport au support PET non traité tout au long du temps du traitement. Le cas après traitement de 6h, 18h et 24h est identique au précédent.

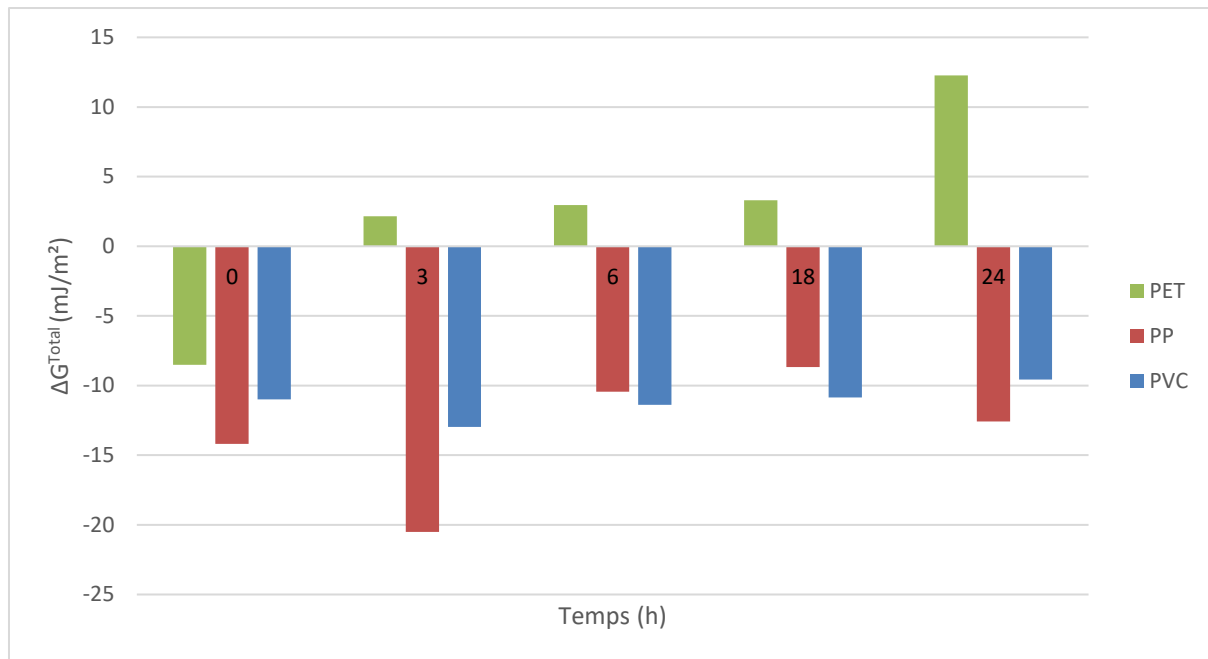


Figure 33: Adhésion prédictive (ΔG^{Total}) des supports (PET, PP, PVC) non traités (0h) et traités par les déchets du lait en fonction du temps

Notre support de PET sans traitement avait une valeur de $\Delta G^{\text{Total}} = -8,52 \text{ mJ/m}^2$ et après 3h à 24h de traitement, cette valeur augmente jusqu'à $\Delta G^{\text{Total}} = 12,26 \text{ mJ/m}^2$.

On peut déduire que la possibilité d'adhésion bactérienne persiste après 3h de traitement pour le PVC et PP, mais elle diminue avec le temps en restant au-dessus des valeurs des supports non traités. Par contre pour le PET, la possibilité d'adhésion est favorable avant traitement et devient défavorable après traitement.

On peut dire que théoriquement le PP est meilleur pour l'adhésion de notre bactérie suivie par le PVC et en fin de façon moindre le PET. $\text{PP} > \text{PVC} > \text{PET}$.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré :

- Le film conditionnant des matières organiques modifie les caractères physicochimiques des supports étudiés
- L'âge (vieillesse) des margines influence leurs effets sur les caractères physicochimiques des supports
- Pas d'effet important du traitement par la température des margines sur les caractères physicochimiques
- L'encrassement des supports par les déchets du lait a modifié leurs caractères physicochimiques, notamment dans les 6 premières heures de traitement

L'adhésion est favorable théoriquement pour les supports :

- Non traités $\text{PP} > \text{PVC} > \text{PET}$
- Traités par Les margines (2018) $\text{PET} > \text{PP} > \text{PVC}$

- Traités par les déchets du lait PP> PVC> PET

Le film conditionnant de la matière organique sur les supports permet :

- Modification des caractères physicochimiques des surfaces
- Impact l'adhésion prédictive bactérienne

Le choix du matériau des supports pour favoriser l'adhésion bactérienne dépendrait :

- Effet du matériau
- Effet du traitement
- Effet de la nature du déchet

Chapitre 3 : Adhésion expérimentale de la bactérie sur les supports et rôle du film conditionnant

I. Introduction

Plusieurs auteurs ont étudié le phénomène d'adhésion dans le but de le comprendre et de l'expliquer et enfin de le contrôler. Des auteurs se sont intéressés à étudier les paramètres physico-chimiques des surfaces des microorganismes (Van Loosdercht et al. 1987 ; Dickson et al. 1989 ; Vanhaecke et al. 1990 ; Van der Mei et al. 1997 ; Braindet et al. 1999b ; Faille et al. 2002), d'autres ont consacré leurs études aux propriétés physico-chimiques de la surface du support pour comprendre et percer ce phénomène (Boulangé- Petermann et al. 1993 ; Boulangé- Petermann et al. 1997 ; Scheuerman et al. 1998 ; Ong et al. 1999). Bien que les mécanismes fondamentaux qui régissent l'adhérence bactérienne soient encore mal compris et n'aient donc pas été complètement définis, il est admis que les propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne et celles des supports d'adhésion sont des facteurs déterminant de l'adhésion initiale (van Oss et al. 1986 ; Bellon-Fontaine et al.1990 ; Bos et al. 1999 ; Hamadi et al. 2004 ; Gallardo Moreno et al. 2002 ; Bayoudh et al. 2006). Plusieurs modèles théoriques ont été proposés pour prédire le phénomène d'adhésion de particules colloïdales aux surfaces, dont l'approche de XDLVO développée par van Oss qui considère trois types d'interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion initiale : van der Waals, acido-basiques et électrostatiques. L'étude des caractéristiques du milieu environnant a aussi pris une grande importance (Stanley, 1983 ; Jana et al. 2000 ; Gallardo- Moreno et al. 2002 ; Hamadi et al. 2004). Ce chapitre traite la capacité de l'adhésion d'une bactérie isolée du digesteur de méthanisation sur différents supports utilisés en biodigesteur. Ceci peut constituer un outil d'aide à la prise de décision pour la sélection de matériaux très propices à la colonisation des bactéries. Ce chapitre constitue également une contribution à la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'adhésion bactérienne aux supports qui peuvent être utilisés pour favoriser la formation du biofilm microbien au sein du digesteur, à travers l'évaluation du pouvoir d'adhésion de la souche bactérienne étudiée sur plusieurs supports différents par leur nature chimique et par le conditionnement des supports soit par les margines (âgées ou non) ou par les déchets de l'usine du lait.

L'évaluation de l'effet des matières organiques des eaux usées (les margines et les déchets du lait), sur l'adhésion bactérienne et la comparaison de l'aptitude de la souche bactérienne testée à se fixer sur les supports non traités et traités, ont été réalisés en utilisant la méthode classique PCA de dénombrement des cellules sur milieu solide.

L'étude expérimentale de l'adhésion bactérienne sur le support permet de

- Vérifier le rôle de chaque caractère physicochimique
- Comprendre des mécanismes impliqués dans le processus d'adhésion bactérienne sur le support

II. Matériels et méthodes

1. Souche bactérienne et conditions de culture

La souche bactérienne utilisée comme modèle biologique est une bactérie Gram positive anaérobie facultative, isolée d'un digesteur de laboratoire d'Oujda. Cette souche est cultivée dans un milieu Luria Bertani liquide (LBL) à 37 °C pendant 24h.

Après 24 h de culture en milieu LBL, les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation (15 min à 5000 g), lavées deux fois par une solution de KNO_3 à une force ionique 0,1 M et finalement diluées de manière à obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ comprise entre 0,7 et 0,8.

2. Méthode de dénombrement des cellules adhérentes

Plusieurs méthodes existent permettant de quantifier le nombre des cellules bactériennes adhérentes sur surface. Parmi elles, une méthode qu'on a utilisé dans ce travail, dont le principe est de détacher les cellules adhérentes sur la surface d'un support par l'ultrason dans une solution initiale de volume connue. Ces cellules sont dénombrées par rapport au volume initiale de la suspension bactérienne où le support a été mis en contact avec la bactérie (Braindet et al. 1999).

Pour les supports non traités, dix millimètres de suspension bactérienne contenant environ 108 CFU/ml (préparée selon le protocole décrit précédemment) a été mis en incubation dans une boîte de Pétri contenant des coupons de 1 cm² de PET, PP et PVC (nettoyés et désinfectés selon le protocole décrit précédemment) pendant 3 h à 37 °C. Après 3 h d'incubation, les coupons ont ensuite été rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries non adhérentes. Les coupons en plastique ont été immergés dans des tubes à essai contenant l'eau physiologique (10 ml/tube). Les cellules bactériennes ont été détachées des supports inertes en utilisant un bain de sonication (ultrason) pendant 5 min (Fatima Hamadi et al 2013). Les unités formants colonies (UFC) ont été comptées en utilisant la technique de dilution en série de la suspension bactérienne obtenue après sonication (dilution jusqu'à 10^{-3} dans le cas des supports non traités). Le dénombrement sur le milieu Luria Burtani solide (LBS) après incubation pendant 24 h à 37 °C. Chaque expérience a été répété 3 fois et en triple exemplaire pour chaque support (Figure 34).

Pour les supports traités par les déchets organiques, après qu'ils ont subi le nettoyage et la désinfection et avant l'incubation la bactérie en présences de ces supports dans une boîte de Pétri, ils sont traités pendant 3h à 37°C soit par les margines anciennes stérilisées MAS, soit par les margines nouvelles stérilisées MNS soit pat les déchets du lait stérilisés L (Figure 34).

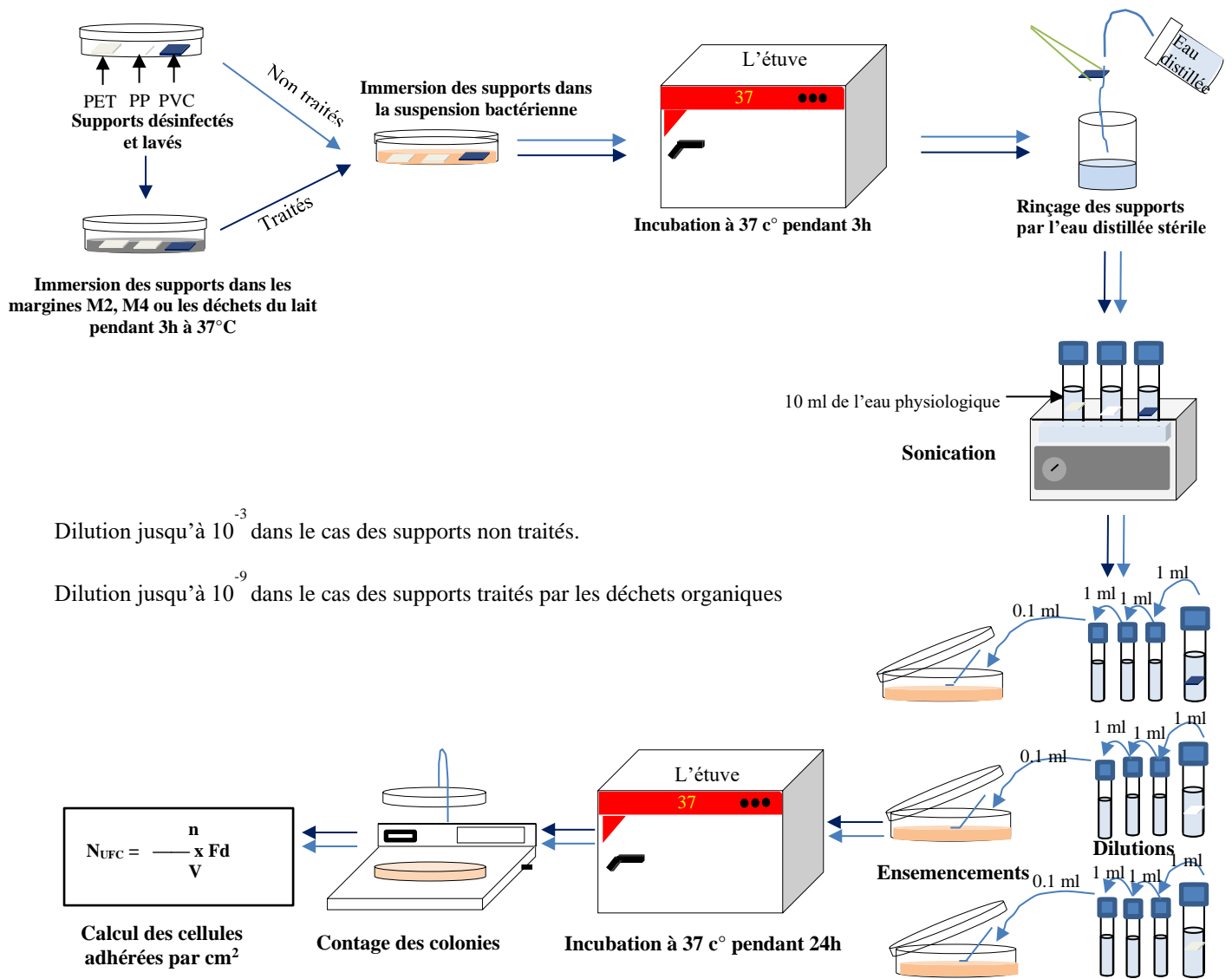


Figure 34: Schéma des étapes de la méthode de dénombrement des cellules adhérentes sur les supports

III. Résultats et discussion :

1. Adhésion de la bactérie sur différents supports non traités :

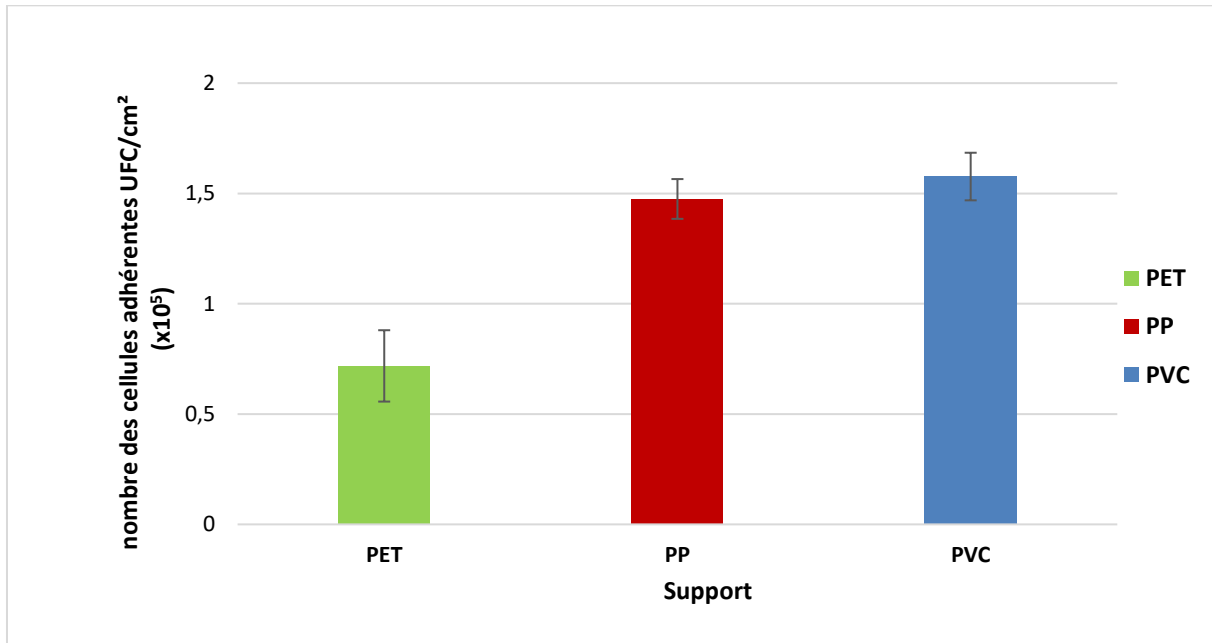


Figure 35: L'adhésion de la bactérie sur les supports non traités

Les résultats des tests d'adhésion montrent, qu'il y avait une différence marquée entre les matériaux de support (PET, PP et PVC non traités) dans leur capacité à favoriser l'adhésion initiale de la bactérie (Figure 35). On peut remarquer que le PET est le support le moins colonisé par la souche bactérienne étudiée, alors que le PVC contient le nombre le plus élevé de bactéries adhérentes, suivi par le support PP. En plus, le nombre de cellule adhérentes sur les supports PVC et PP est 2 fois supérieur à celui sur le support PET ($N_{PET}^{adh} = 0,72 \cdot 10^5 \text{ UFC/cm}^2$, $N_{PP}^{adh} = 1,47 \cdot 10^5 \text{ UFC/cm}^2$, $N_{PVC}^{adh} = 1,58 \cdot 10^5 \text{ UFC/cm}^2$).

L'adhésion bactérienne sur ces supports décroît selon cet ordre PVC>PP>PET.

2. Adhésion expérimentale de la bactérie sur les supports traités par les matières organiques des déchets liquides agro-alimentaires

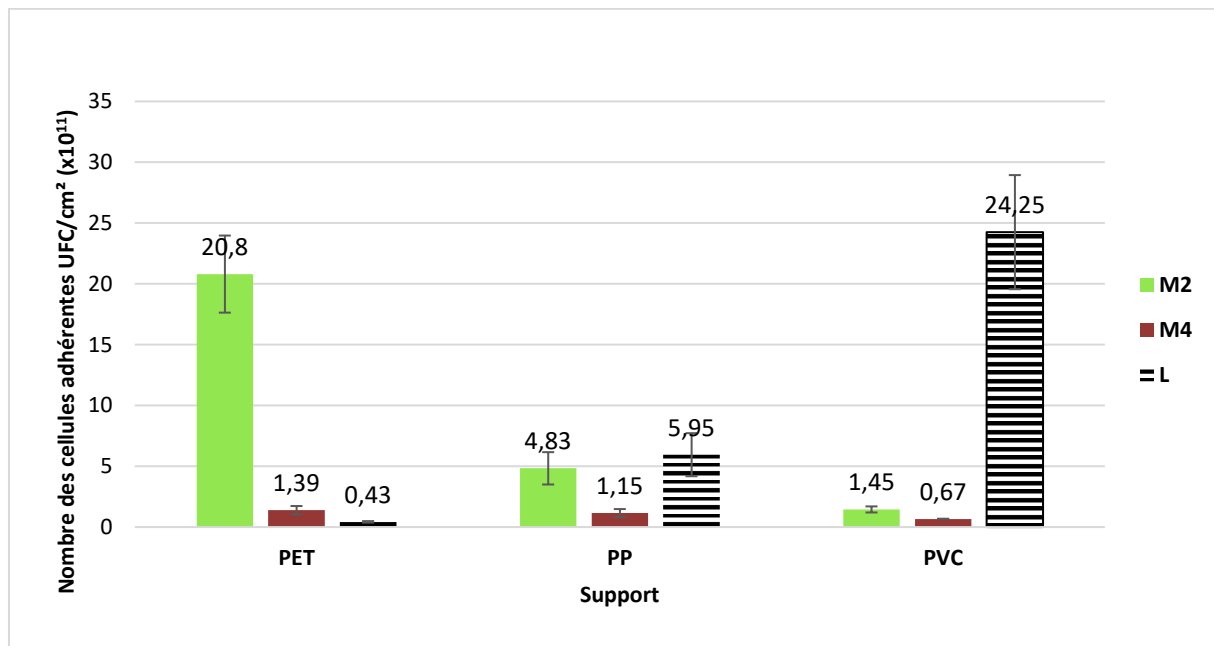


Figure 36 : Adhésion de la bactérie sur les supports traités par les margines MAS (margines 2016 stérilisées), MNS (margines 2018 stérilisées) et les déchets du lait L

Selon l'âge des margines (Figure 36), l'adhésion des micro-organismes est quantitativement différente, on remarque que les margines anciennes MAS (2016 stérilisées) favorisent plus l'adhésion des bactéries : ($N_{PET}^{adh} = 20,8 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$, $N_{PP}^{adh} = 4,83 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$, $N_{PVC}^{adh} = 1,45 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$), que les margines nouvelles MNS (2018 stérilisées) : ($N_{PET}^{adh} = 1,39 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$, $N_{PP}^{adh} = 1,15 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$, $N_{PVC}^{adh} = 0,67 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$).

Pour les margines MAS (2016 stérilisées), l'adhésion bactérienne sur ces supports décroît selon cet ordre PET>PP>PVC.

Pour les margines MNS (2018 stérilisées), l'adhésion bactérienne sur ces supports décroît selon cet ordre PET>PP>PVC.

L'adhésion bactérienne sur les supports traités par les déchets du lait L ($N_{PET}^{adh} = 0,43 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$, $N_{PP}^{adh} = 5,95 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$, $N_{PVC}^{adh} = 24,25 \cdot 10^{11} \text{UFC/cm}^2$) présente un ordre inverse à celui des supports traités par les margines. L'ordre décroît selon cet ordre PVC>PP>PET.

L'adhésion des micro-organismes aux surfaces est comme pour toute particule inerte et colloïdale, largement gouvernée par des interactions physicochimiques. Ces interactions, dont la résultante peut être attractive ou répulsive, comprennent essentiellement les interactions électrostatiques, Lifshitz-Van der Waals et acides-bases de Lewis. Ces interactions dépendent des propriétés physico-chimiques de la surface des microorganismes, de la surface du substrat et des caractéristiques du milieu de suspension. Ces propriétés physico-chimiques comprennent l'hydrophobicité, la charge électrostatique et le caractère donneur d'électrons / accepteur

d'électrons. Tous les facteurs susceptibles de modifier les propriétés physico-chimiques de surface de l'un des éléments mis en jeu dans le phénomène d'adhésion peuvent ainsi favoriser, ou au contraire limiter, la fixation des microorganismes.

La théorie de l'adhésion prédictive a montré que notre bactérie pourrait adhérer sur les 3 supports non traités, ce qui a été confirmé par l'expérience d'adhésion.

Il est accepté que les cellules hydrophiles s'attachent sur des surfaces hydrophiles et le contraire est vrai. Mais dans notre cas où la bactérie est hydrophile et les supports sont hydrophobes, cette approche ne peut expliquer l'adhésion de la bactérie sur les supports. Plusieurs auteurs (McEldowney and Fletcher 1986 ; Pratt-Terpstra et al. 1988 ; Sjollema et al. 1990) ont rapporté que l'hydrophobicité à elle seule ne peut expliquer le résultat de l'adhésion bactérienne sur un support. D'autres auteurs ont montré que les interactions acide-base jouent un rôle très important dans le phénomène de l'adhésion (Henriques et al. 2004 ; Hamadi et al. 2005, 2008).

La bactérie qui possède un caractère donneur d'électrons très fort ($\gamma_B = 50,62 \text{ mJ/m}^2$) pourrait réagir avec les supports dont le caractère accepteur d'électrons faible ce qui pourrait expliquer l'adhésion dans notre cas avec 2 fois de cellules sur PVC et PP que sur PET ($\gamma^+(\text{PET}) = 0 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PP}) = 2,7 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+(\text{PVC}) = 1 \text{ mJ/m}^2$).

Il faut mentionner que l'expérience de l'adhésion se fait dans une solution avec une force ionique importante (KNO_3 0,1 M). Certains auteurs (Jucker et al. 1996 ; Rijnaarts et al. 1996 ; Rijnaarts et al. 1999 ; Barnes et al. 1999 ; Braindet et al. 1999 b) ont prouvé qu'une forte force ionique favorise l'adhésion bactérienne sur le support par l'effet de la réduction de la barrière énergétique séparant la cellule du support, ce qui pourrait expliquer le nombre important de cellules adhérentes sur les supports (au tour 10^5 UFC/cm^2).

Durant cette étude, les tests d'adhésion de la souche bactérienne ont été réalisés sur le polytéréphtalate d'éthylène (PET), le polypropylène (PP), et le chlorure de polyvinyle (PVC), non traités et traités par les margines MAS (marges 2016 stérilisées), MNS (marges 2018 stérilisées) et les déchets du lait L, où on a observé une différence au niveau des résultats de l'adhésion. Dans le cas où les supports sont traités par les margines MAS et L, l'adhésion était très forte (jusqu'à 10^{12} UFC/cm^2).

On a déjà montré que la souche bactérienne a un caractère hydrophile, aussi, les résultats précédents nous informent sur le caractère hydrophile des surfaces des supports traités par les margines MAS (2016 stérilisées). De plus, les bases de la chimie affirment qu'une entité hydrophile s'attire naturellement vers un autre hydrophile (Massicotte, 2007). Cela peut expliquer la forte adhésion de la souche testée sur les coupons en plastique traités par les margines MAS (2016 stérilisées), et explique aussi la faible adhésion de la bactérie testée sur les surfaces des supports non traités qui sont initialement hydrophobes (l'adhésion de 10^5 UFC/cm^2). Mais ceci ne peut pas expliquer la forte adhésion sur les supports traités par les margines MNS (2018 stérilisées) et les déchets L où elles sont aussi hydrophobes (l'adhésion jusqu'à 10^{12} UFC/cm^2). On peut dire que l'hydrophobicité a un effet sur l'adhésion mais aussi le film conditionnant des margines et des déchets du lait qui influence ce phénomène en

augmentant le nombre de bactéries adhérentes (de 10^5 UFC/cm² à 10^{11} UFC/cm² ou 10^{12} UFC/cm²).

Le tableau 8 montre que l'adhésion de la bactérie sur les surfaces des supports non traités est bien corrélée avec l'hydrophobicité qualitative (θ_w) ($R^2 = 0,95$). Plus l'hydrophobicité diminue plus l'adhésion bactérienne augmente. Nos résultats sont en ligne avec les travaux de Pringle et Fletcher (1983) qui ont démontré une relation entre l'angle de contact par rapport à l'eau (varie de 0° à 110°) et l'adhésion de différentes bactéries sur quatre surfaces différentes. Absolom et al (1983) ont rapporté aussi une relation linéaire entre l'angle de contact par rapport à l'eau de différentes variétés de polymères (varie de 58° à 110°) et l'adhésion bactérienne.

Tableau 6 : Corrélation entre les caractères physicochimiques des surfaces des supports [non traités (NT), traités par les margines anciennes stérilisées (MAS), traités par les margines nouvelles stérilisées (MNS) et traités par les déchets du lait (L)] et l'adhésion bactérienne

Type de traitement	Corrélation	Caractère physicochimique			
		θ_w	ΔG_{iwi}	γ	γ^+
Non traités NT	r	-0,98	0,92	-0,08	0,71
	R ²	0,95	0,85	0,01	0,50
MAS	r	0,45	0,94	0,93	-0,80
	R ²	0,20	0,89	0,86	0,64
MNS	r	-0,08	-0,99	-0,97	-0,89
	R ²	0,01	0,98	0,94	0,79
L	r	0,42	-0,53	-0,58	-0,65
	R ²	0,18	0,28	0,34	0,42

L'adhésion de la bactérie sur les surfaces des supports traités et non traités est faiblement corrélée avec l'hydrophobicité qualitative (θ_w) ($R^2 = 0,0034$). Ce résultat est en accord avec plusieurs travaux mentionnant qu'il n'y a aucune corrélation entre l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact par rapport à l'eau et l'adhésion (Busscher 1985, Harkes et al 1990). Mais nos résultats sont en contradiction avec les travaux de Pringle et Fletcher (1983) qui ont rapporté une relation entre l'angle de contact par rapport à l'eau (varie de 0 à 110°) et l'adhésion de différentes bactéries sur quatre surfaces différentes. Et aussi avec Absolom et al (1983) qui ont rapporté une relation linéaire entre l'angle de contact par rapport à l'eau de différentes variétés de polymères (varie de 58 à 110°) et l'adhésion bactérienne. Cette contradiction pour les supports non traités et les supports traités pourrait être expliquée par le fait que pour les premiers, l'adhésion bactérienne est dépendante du caractère de l'hydrophobicité, alors que pour les seconds, le film de conditionnement (ou l'encrassement) des matières organiques a modifié les paramètres physicochimiques des surfaces de telle sorte que l'adhésion ne dépend plus que du caractère de l'hydrophobicité.

En se basant sur l'énergie de surfaces ΔG_{iwi} , l'adhésion expérimentale de la bactérie sur les surfaces des supports est bien corrélée avec l'hydrophobicité quantitative (ΔG_{iwi}) des différents supports, où on remarque une bonne corrélation entre l'adhésion expérimentale et

l'hydrophobicité quantitative des supports non traités ($R^2=0,85$), même chose dans le cas des supports traités par les margines MAS ($R^2=0,89$). Une corrélation bien exprimée entre l'adhésion expérimentale et l'hydrophobicité quantitative des supports traités par les margines MNS ($R^2=0,98$). L'adhésion augmente avec l'augmentation de l'hydrophobicité. Pour les supports traités par les déchets du lait L, la corrélation est très faible ($R^2=0,28$).

L'adhésion de la bactérie aux surfaces des supports traités et non traités est faiblement corrélée avec l'hydrophobicité quantitative (ΔG_{Iwi}) ($R^2=0,0000013$). Ces résultats indiquent que les interactions hydrophobes sont impliquées dans l'adhésion de la souche testée aux surfaces des supports non traités et traités par MAS et MNS et pas pour les supports traités par L. Certaines études ont montré que l'adhésion des bactéries tend à accroître lors de l'augmentation de l'énergie de surface des substrats (Dexter, 1979 ; Hamza et al. 1997 ; Bakker et al. 2003) ce qui est en accord avec nos résultats. D'après Liu & Zhao (2005), l'adhésion bactérienne peut diminuer ou augmenter avec l'augmentation de l'énergie de surface des substrats. Cela dépend de la nature de la matière organique.

Des travaux précédents (McEldowney et Fletcher, 1986 ; Partt-terpstra et al. 1988 ; Sjollem et al. 1990) ont rapporté que l'hydrophobicité ne peut pas expliquer systématiquement les résultats de l'adhésion microbienne sur un support, et que les interactions acides-bases jouent un rôle très important dans le phénomène d'adhésion (Henriques et al. 2004 ; Hamadi et al. 2005 ; Hamadi et al. 2008). Par contre, peu d'études ont montré l'implication des propriétés acido-basiques au phénomène d'adhésion (Braindet et al. 1999). L'adhésion de la bactérie sur les surfaces des supports non traités n'est pas corrélée avec le caractère donneur d'électrons ($R^2 = 0,08$). On observe une bonne corrélation entre le caractère donneur d'électrons et l'adhésion réelle sur les supports traités par les margines MAS ($R^2 = 0,86$), où l'adhésion augmente avec l'augmentation du caractère donneur d'électrons des supports. On remarque une corrélation bien exprimée dans le cas des supports traités par les margines MNS ($R^2 = 0,94$), où l'adhésion augmente avec la diminution du caractère donneur d'électrons des supports. Les supports traités par les déchets du lait L ont une faible corrélation avec l'adhésion bactérienne ($R^2=0,34$). L'adhésion de la bactérie sur les surfaces des supports non traités et traités par MAS, MNS et L est faiblement corrélée avec le caractère donneur d'électrons ($R^2 = 0,018$). Suivant ces affirmations, l'adhésion de la bactérie étudiée sur les surfaces des supports traités par les margines MAS et MNS peut être due en partie aux interactions acide-base entre le fort caractère donneur des électrons des coupons et le faible caractère accepteur d'électrons de la bactérie, cela pourrait expliquer le pouvoir adhésif de cette bactérie sur les supports traités et non traités par les margines.

Le rôle du caractère accepteur d'électrons peut aussi intervenir dans l'adhésion bactérienne. Le tableau 6 montre que l'adhésion de la bactérie aux surfaces des supports non traités est moyennement corrélée avec le caractère accepteur d'électrons ($R^2 = 0,5$). On observe une corrélation moyenne entre le caractère accepteur d'électrons et l'adhésion réelle dans le cas des supports traités par les margines MAS ($R^2 = 0,64$), où l'adhésion bactérienne augmente avec la diminution du caractère accepteur d'électrons. Lorsque les supports sont traités par les margines MNS, on constate une corrélation ($R^2 = 0,79$), où l'adhésion bactérienne augmente avec l'augmentation du caractère accepteur d'électrons. On observe que les supports traités par les

déchets du lait L ont une faible corrélation avec l'adhésion bactérienne ($R^2=0,42$). D'après l'étude, on remarque une corrélation très faible entre le caractère accepteur d'électrons et l'adhésion expérimentale sur l'ensemble des supports non traités et traités ($R^2 = 0,13$). Ces résultats indiquent que l'adhésion de la bactérie aux surfaces est encore gouvernée par le caractère accepteur d'électrons dans le cas des supports non traités et dans le cas des supports traités par les margines anciennes et nouvelles stériles, mais l'adhésion n'est pas conditionnée par le caractère accepteur d'électrons de l'ensemble des supports non traités et traités.

On vient de voir que les caractères physico-chimiques ne peuvent à eux seuls expliquer parfaitement le processus complexe d'adhésion sans prise en compte de la contribution potentielle des interactions spécifiques vu que l'approche XDLVO a été développée à l'origine pour étudier l'adhésion des particules colloïdales, sphériques, micrométriques, homogènes et à l'équilibre. Or, les cellules bactériennes présentent des formes plus complexes et leur surface n'est généralement pas homogène ; de plus elles sont motiles et hors d'équilibre. Finalement, les bactéries sont capables de modifier leurs propriétés en fonction de leur environnement en adaptant leur métabolisme et leur composition membranaire, et par conséquent leurs propriétés physico-chimiques de surface prises en compte dans l'approche prédictive.

Durant cette étude on a trouvé que l'adhésion de la bactérie est favorisée considérablement lorsque les surfaces sont traitées par les margines MAS, MNS et les déchets du lait L en comparaison avec les supports non traités. En plus, les caractéristiques physico-chimiques d'un support traité sont facilement liées à la nature et la composition de la matière organique (polyphénols, protéines et matière grasse, glucides). Des travaux de (Flint et al. 1997 ; Oliveira et al. 2006 ; Teixeira et al. 2007) ont rapporté qu'il n'y a pas de relation entre les caractéristiques physico-chimiques et l'adhésion alors que d'autres travaux (Hamadi et al. 2013, 2014) affirment qu'il y a une bonne relation entre l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons d'une part, et l'adhésion d'autre part.

IV. Conclusion

- Avant le traitement des supports, les tests d'adhésion expérimentale ont montré la capacité de la bactérie à s'adhérer sur les supports.
- L'adhésion bactérienne décroît sur ces supports non traités selon cet ordre PVC>PP>PET
- Après traitement des supports, l'adhésion bactérienne a augmenté de façon très importante en comparaison avec les supports non traités (on passe de l'ordre 10^5 à 10^{11} UFC/cm²)
- Pour les margines, indépendamment de l'âge, (2016 et 2018), l'adhésion bactérienne sur ces supports décroît selon cet ordre PET>PP>PVC
- L'adhésion bactérienne sur les supports traités par les déchets du lait L présente un ordre inverse à celui des supports traités par les margines. L'ordre décroît selon cet ordre PVC>PP>PET

- L'ordre de l'adhésion pour les supports

- Non traités :

-Théorique PP>PVC>PET

-Expérimental PVC>PP>PET



En termes d'ingénierie, le PET semble être le mauvais choix

- Traités par les margines

-Théorique PET>PP>PVC

(un seul MN 2018)

-Expérimental PET>PP>PVC



En termes d'ingénierie, le PET semble être le bon choix

- Traité par les déchets du lait

-Théorique PP>PVC>PET

-Expérimental PVC>PP>PET



En termes d'ingénierie, le PET semble à éviter

L'adhésion microbienne est un phénomène assez compliqué pour le confiner dans deux ou trois types d'interactions, mais que l'ensemble des interactions spécifiques et non spécifiques entrent en jeu dans ce phénomène. Le rôle du film conditionnant apparaît très important

Chapitre 4 : Influence de la bactérie sur les polyphénols totaux des margines

I. Introduction

Les margines sont les sous-produits de la production de l'huile d'olive et représentent un risque pour l'environnement. Il y a plusieurs moyens pour éliminer et traiter les margines. Les traitements biologiques des margines seraient d'un point de vue environnementale les mieux adaptés, mais une dilution des margines avec de l'eau pour pouvoir les traiter est souvent nécessaire. Ceci va engendrer des volumes d'effluents encore plus grands. Par ailleurs, les margines contiennent une grande quantité des matières organiques et des phénols toxiques (1-8 g/l) (D'Annibale et al. 1998 ; Bisignano et al. 1999 ; Borja et al. 1997), rendant le traitement biologique très difficile (Aktas et al. 2001 ; Vlyssides et al. 2004 ; Cereti et al. 2004). Plus de 98% des phénols des olives passent dans les rejets (53% dans les margines) durant le processus de la production des huiles d'olive (Rodis et al. 2002), ce qui pourrait perturber l'activité des microorganismes dans les réacteurs biologiques. Afin de réduire l'effet néfaste des margines sur le travail des réacteurs des traitements des eaux usées, il faudra prétraiter les margines pour réduire la quantité des phénols toxiques avant de poursuivre les traitements biologiques. Dans ce but, nous avons mené une expérience de prétraitement des margines par la même bactérie faisant l'objet des études précédentes. L'objectif est donc de savoir si cette bactérie a aussi la capacité de réduire le taux des substances phénoliques dans les margines. Il est à souligner que ce processus de traitement qui se fait en aérobie est indépendant de celui de la méthanisation qui se fait en anaérobie. La souche étudiée, étant aérobie anaérobie facultative, est proposée alors pour valorisation dans ces deux processus indépendamment.

II. Matériels et méthodes

1. Mode opératoire

a) *Les margines M2018*

80 ml des margines M2018 (2018-2019) sont mis dans un erlenmeyer, puis on ajoute 20 ml de la suspension bactérienne dont la densité optique à 600 nm est égale de 0,7 à 0,8. Le contenu est bien mélangé puis mis dans une étuve à 37°C pendant 8 jours. Le même protocole est reproduit dans autre erlenmeyer, mais il est mis dans une autre étuve à 25°C pendant 8 jours. Après 24 h, le temps que la bactérie s'adapte à son nouvel environnement, on prend de chaque erlenmeyer 10 ml du mélange (margines + bactérie) comme échantillon et on fait des mesures du pH et de la quantité des polyphénols totaux. La même manipulation est répétée un jour sur deux durant les 8 jours de l'expérience.

b) *Les margines M2019*

Dans cette expérience on a voulu connaître l'effet de la formation de biofilm de la bactérie sur un support mis dans les margines. L'expérience a été menée comme décrit au-dessus. En premier lieu on a réalisé l'expérience comme au-dessus pour voir s'il y a une reproductibilité

du même résultat sur d'autres margines (marges M2019 : 2019-2020). En deuxième lieu, on a ajouté un 3^{ème} erlenmeyer qui contient un volume final de 100 ml avec la suspension bactérienne et les supports PP. Le premier erlenmeyer contient 80 ml des margines M2019 et 20 ml de milieu liquide LB stérile, puis l'erlenmeyer a été mis dans l'étuve à 37°C. Le deuxième et troisième erlenmeyer contiennent 80 ml des margines et 20 ml de la suspension bactérienne dont la densité optique à 600 nm est égale de 0,7 à 0,8 après 24h d'incubation. Puis les 2 erlenmeyer ont été mis dans l'étuve à 25°C et 37°C respectivement. Le dernier erlenmeyer est comme le 3^{ème} mais en plus on a ajouté des supports de PP en morceaux de 1 à 2 cm² (une quinzaine avec un volume de 21ml) au sein de l'erlenmeyer, puis il est mis dans l'étuve à 37°C. L'expérience a duré 13 jours.

2. Extraction des composés phénoliques des margines

Les échantillons vont être utilisés pour l'extraction des polyphénols totaux selon le protocole modifié de De Marco et al. (2007).

10 ml de l'échantillon sont acidifiés jusqu'à pH= 2 avec quelques gouttes de l'acide chlorhydrique HCl (2N), puis mélangés avec 15 ml d'hexane, le mélange mixé vigoureusement et centrifugé 3000t/min pendant 5min dans le but d'éliminer la fraction lipidique. La phase hexanique est séparée et l'opération est répétée deux fois successivement.

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée avec de l'acétate d'éthyle. L'échantillon des margines préalablement délipidé est mixé avec 10 ml de l'acétate d'éthyle, le mélange est secoué vigoureusement et centrifugé pendant 5 min à 3000 t/min. les phases sont séparées et l'extraction est répétée 4 fois successivement. Les phases contenant l'acétate d'éthyle sont mélangées, puis l'acétate d'éthyle est éliminé dans un évaporateur sous vide. Le résidu sec a été dissous dans 3 ml de méthanol et cette solution a été utilisée pour mesurer les polyphénols totaux.

3. Dosage des polyphénols totaux

La quantité des polyphénols totaux dans les échantillons a été déterminée par une méthode colorimétrique à 725 nm, en utilisant le réactif du Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927). En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique du réactif, ce qui produit une coloration bleue. La lecture de la densité optique se fait à 725 nm et permet de déduire la concentration des polyphénols, en utilisant une courbe réalisée à l'aide de standards avec différentes concentrations de l'acide gallique traité au réactif Folin-Ciocalteu (0,6 ; 1,2 ; 1,8 ; 3 et 6 EAG/l).

La quantité en polyphénols est exprimée comme équivalent acide gallique par litre (EAG/l).

Diluer 0,5 ml de l'extrait méthanolique dans 20 ml d'eau distillée.

Introduire 0,3 ml de l'extrait méthanolique dilué, 20 ml d'eau distillée et 0,625 du réactif Folin-Ciocalteu dans une fiole de 25 ml.

Après 3 min, ajouter 2,5 ml de la solution saturée de carbonate de sodium (Na₂CO₃) 35%.

Agiter le contenu et diluer le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Préparer un blanc, dans les mêmes conditions en éliminant l'extrait.

Maintenir les fioles à l'obscurité pendant une heure.

Lire les densités optiques à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Pour le même extrait méthanolique, on fait 3 mesures

La gamme étalon a été préparée suivant le même protocole précédent et les mêmes conditions en remplaçant l'extrait méthanolique par une solution de concentration en acide gallique connue (50, 100, 150, 250 et 500 mg/l).

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par 1 litre des margines (mg EAG/l).

III. Résultats et discussion

1. La gamme étalon

La gamme d'étalon a été réalisée selon le protocole en haut.

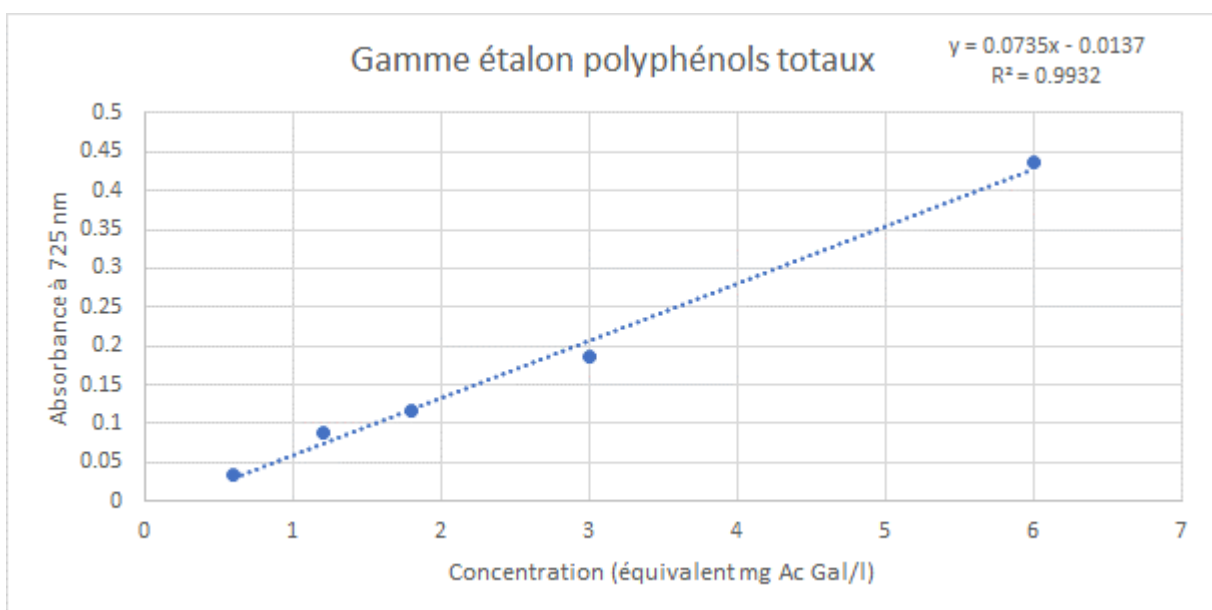


Figure 37 : La gamme étalon en équivalent en acide gallique

La courbe ci-dessus, représente une courbe référence qui exprime l'absorbance à 725nm en fonction de la concentration de l'acide gallique exprimée en équivalent mg Ac Gal/l.

2. Dosage des polyphénols totaux

a) *Les margines M2018*

Les résultats des mesures des polyphénols totaux des margines avec la bactérie incubée à 25°C (B 25°C) et des margines avec la bactérie incubée à 37°C (B 37°C) sont présentés sur la figure 38.

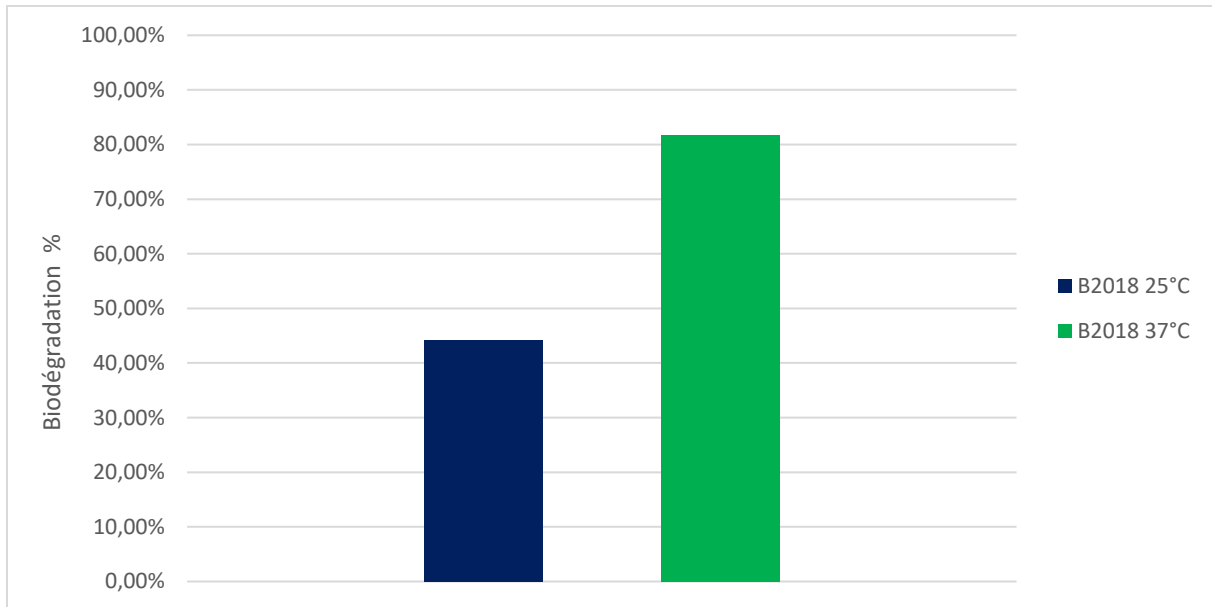


Figure 38 : Taux de biodégradation des polyphénols totaux dans les mélanges B (margines 2018+ suspensions bactériennes) à 25°C et 37°C

On remarque qu'après 8 jours du traitement des margines en présence de la bactérie qu'il y a une diminution très nette surtout pour le mélange B à 37°C avec une chute des polyphénols totaux de 6,247 mg Ac Gal/l pour le témoin (M 37°C) à 1,18 mg Ac Gal/l pour le mélange (B 37°C). Donc, on a une biodégradation des polyphénols totaux de l'ordre de 81,71%.

La même chose est constatée pour le mélange B 25°C, mais de façon moindre que pour le mélange B 37°C. On a une diminution de 6,247 à 3,61 mg Ac Gal/l pour le mélange (B 25°C), soit une biodégradation de l'ordre de 42,21%.

Il est apparent que la bactérie a un pouvoir de réduire la concentration des polyphénols totaux monomériques des margines comme ça été constater sur d'autres travaux avec des bactéries et champignons (Ammar et al., 2005). Cette bactérie, après une phase d'adaptation de 2 jours pour le mélange B 37°C et 3 à 4 jours pour le mélange B 25°C, aurait pu mettre en place l'enzyme laccase (une oxydase) responsable de la dégradation des phénols monomériques qui se trouvent en grandes quantités dans les margines. Le traitement à 37°C semble le mieux adapté pour éliminer le plus de polyphénols totaux comparativement au traitement à 25°C car la bactérie est mésophile et la température idéale pour elle pour se développer est à 37°C.

b) *Les margines M2019*

Les résultats des mesures des polyphénols totaux des margines avec la bactérie incubée à 25°C (B 25°C), des margines avec la bactérie incubée à 37°C (B 37°C) et les margines avec la bactérie incubée à 37°C en plus des supports PP (F 37°C) sont présentés sur la figure 39.

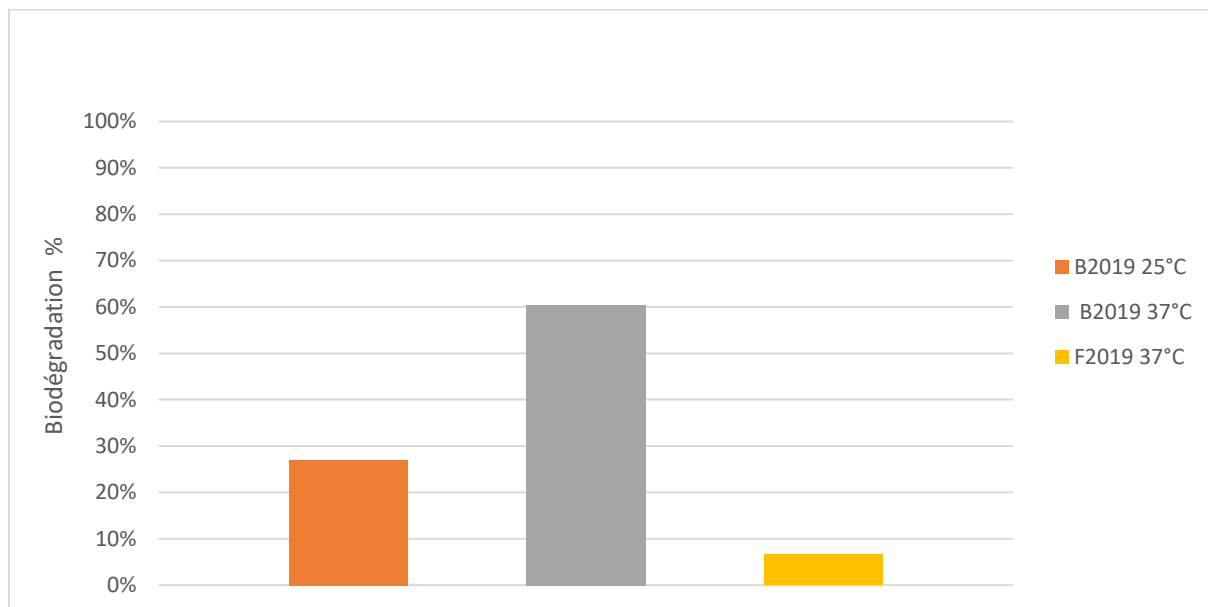


Figure 39 : Taux de biodégradation des polyphénols totaux dans les mélanges B (margines 2019+ suspensions bactériennes) à 25°C et 37°C et le mélange F (margines 2019+ suspensions bactériennes+ supports PP)

On a constaté que la concentration des polyphénols totaux dans les margines M2018 (6,47 équivalents mg Ac Gal/l) est plus importante que celle dans les margines M2019 (1,57 équivalents mg Ac Gal/l). Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons : les conditions météorologiques, la nature du sol, les techniques de culture, la variété des olives, le temps de stockage des olives et la nature de la technique d'extraction de l'huile d'olive (Dermeche et al., 2013).

Les margines B 25°C (margines M2019 ; suspension bactérienne) à 25°C ont connu une baisse (1,57 à 1,146 mg Ac Gal/l). Donc, on a une biodégradation des polyphénols totaux de l'ordre de 27%.

Les margines B 37°C (margines M2019 ; suspension bactérienne) à 37°C ont connu une baisse très importante (de 1,57 à 0,622 mg Ac Gal/l). Donc, depuis le début jusqu'au 13ème jour, on a une biodégradation des polyphénols totaux de l'ordre de 60,38%.

Pour les margines F (margines M2019+suspension bactérienne +supports PP) à 37°C on remarque une légère baisse. On passe de 1,57 mg Ac Gal/l (0 jour) à 1,465 mg Ac Gal/l au 13ème jour, soit une biodégradation de 6%.

En comparant le mélange B 37°C et le mélange F 37°C, tous les deux contiennent les bactéries, on constate que les margines B 37°C qui contiennent les bactéries sous forme végétative (libres) ont une réduction plus importante (60,38%) que les margines F 37°C qui contiennent les

bactéries sous forme de biofilm fixé sur les supports (6%). Cela pourrait être expliqué par le fait que les bactéries qui produisent l'enzyme (laccase ou E.C. 1. 10.3.2 para-diphénol : oxygène oxydoréductase) ont besoin d'oxygène. La laccase est capable de catalyser l'oxydation d'un électron des phénols simultanément avec la réduction de l'oxygène dans l'eau (Thurston et al.1994 ; Xu et al. 1996). De ce fait, le mélange B 37°C qui a les bactéries libres au contact de la surface a plus de chance de voir son taux de polyphénols totaux diminuer plus que le mélange F 37°C avec des bactéries fixées sur les supports enfoncés et loin de la surface.

Ainsi, on a pu déterminer l'importance de la bactérie ajoutée dans le traitement des margines et de la température du traitement 37°C pour réduire le taux des polyphénols totaux dans les margines.

IV. Conclusion

La bactérie est capable de réduire la teneur en polyphénols totaux dans les margines jusqu'à 81,71% à 37°C

La bactérie est capable de réduire la teneur en polyphénols totaux dans les margines jusqu'à 42,21% à 25°C

Cette capacité à biodégrader les phénols pourrait être utilisée comme un moyen de prétraitement des margines avant de les mettre dans un digesteur anaérobie pour ne pas nuire à l'équilibre des microorganismes responsable de la dégradation des matières organiques et de ses transformations en biogaz.

Ce prétraitement pourrait aussi réduire le besoin eau pour diluer les margines avant de les mettre dans le méthaniser.

La fixation de la bactérie sur les supports pour former un biofilm prévu pour contribuer à l'amélioration de la méthanisation ne semble pas utile pour le prétraitement. Si fixation est nécessaire, le prétraitement des margines devrait s'accompagner d'une aération depuis le fond. Cela permettrait aux biofilms formés d'accéder à l'oxygène et améliorer le rendement du prétraitement. Cette aération devrait s'arrêter pendant le traitement

Conclusion générale

L'analyse bibliographique a en effet montré que les connaissances sur les biofilms dans les bioréacteurs sont encore à leurs débuts et que ceux-ci suscitent un intérêt grandissant. L'essentiel des travaux actuellement menés s'attache à déchiffrer les mécanismes d'adhésion des bactéries méthanogènes aux surfaces des supports. Cependant, on peut noter qu'aucune étude n'a été réalisée sur les interactions des micro-organismes aux supports conditionnés par les matières organiques de différentes natures. C'est pourquoi, les travaux que nous avons réalisés ont été consacrés à la caractérisation des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne et des supports solides. Pour cela, on fait le choix d'une bactérie anaérobie facultative issue d'un digesteur anaérobie d'Oujda, car elle a montré une amélioration du processus de la digestion et du rendement en biogaz. Ensuite, on a cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la colonisation initiale de différents supports par la bactérie et d'étudier l'effet des margines et des déchets liquides du lait sur les caractéristiques physicochimiques de ces supports, couramment utilisés dans le processus de méthanisation, et sur l'adhésion bactérienne. L'augmentation du nombre des bactéries adhérentes et de la vitesse d'accumulation de la biomasse pourraient raccourcir la phase de latence du développement du biofilm, étape primordiale dans les conditions de démarrage des réacteurs à biofilm.

Dans la première partie, nous avons déterminé les caractères physicochimiques de la surface de la bactérie par la méthode d'angle de contact. Cette bactérie a un caractère hydrophile bien exprimé, un fort caractère donneur d'électrons et un caractère accepteur d'électrons très faible. De plus, on a étudié l'influence du contact des margines [MA (2016), MAS (2016 stérilisées), MN (2018) et MNS (2018 stérilisées)] et des déchets du lait (L) sur les trois supports (PET, PP et PVC) pendant 3 heures. À travers cette étude, nous avons montré que leurs propriétés physicochimiques (l'hydrophobicité, le caractère donneur et accepteur des électrons) changent par l'adsorption des constituants des margines et des déchets du lait (essentiellement les polyphénols et la matière grasse, protéines, et glucides). Les supports non traités ont initialement un caractère hydrophobe bien exprimé, et un faible caractère donneur d'électrons. Le traitement des supports par les margines MAS a engendré une diminution significative de l'hydrophobicité des supports et une augmentation du caractère donneur et accepteur d'électrons.

Nous avons abordé l'adhésion de la bactérie selon l'approche XDLVO qui prend en considération les trois interactions ; les interactions électrostatiques, les forces de dispersion de van der Waals et les interactions acide-bases. Ce phénomène d'adhésion fait intervenir : le support solide, la cellule bactérienne, le milieu liquide et le film conditionnant. Notre étude s'est focalisée essentiellement sur la compréhension du phénomène d'adhésion de la bactérie sur les surfaces des polytéréphtalate d'éthylène (PET), le polypropylène (PP) et le chlorure de polyvinyle (PVC), vu qu'ils sont des matériaux de base des supports souvent les plus utilisés en bioréacteur industriel.

L'interaction bactérie-supports a été déterminée théoriquement en calculant l'énergie libre totale d'adhésion pour la totalité des supports. ΔG^{Total} devient positive pour les matériaux traités par les margines MA, MAS et MNS. Cette valeur positive décrivant une adhésion défavorable ce qui est en contradiction avec l'adhésion expérimentale. Cette théorie ne suffit pas à expliquer la forte adhésion de la bactérie sur les supports traités par les margines. Par contre l'adhésion théorique semble aller dans le même sens que l'adhésion expérimentale dans le cas des supports non traités et les supports modifiés par les déchets du lait.

Nous avons réalisé des essais d'adhésion sur les supports non traités et traités par les margines et par les déchets du lait où nous avons observé une forte adhésion sur tous les supports traités par les margines et les déchets du lait (jusqu'à 10^{11} UFC/cm²) par rapport à une adhésion assez importante mais reste très faible (jusqu'à 10^5 UFC/cm²) de la bactérie testée sur les supports non traités. Pour les supports non traités, l'adhésion bactérienne a été plus importante sur les supports PP et PVC (2 fois plus que PET). Les supports modifiés par les margines ont un ordre de l'adhésion bactérienne inverse à ceux non traités, car c'est sur les supports PET que l'adhésion a été la plus forte suivie par les supports PP et en dernier lieu les supports PVC (Pour les margines MAS (marges 2016 stériles). PET a 4 fois et 14 fois plus de bactéries adhérentes que sur PP et PVC respectivement. Pour les margines MNS (marges 2018 stériles), PET a 1,2 fois et 2 fois plus de bactéries adhérentes que PP et PVC respectivement. En plus, les supports modifiés par les margines MAS (âgées 2 ans) ont plus de bactéries fixées que les supports modifiés par les margines MNS (0 an), mais tous les supports ont le même ordre PET>PP>PVC. Donc, il faut choisir le support PET pour le traitement des margines par la bactérie.

En ce qui concerne les supports modifiés par les effluents de l'usine du lait, l'adhésion bactérienne a été plus importante sur les supports PVC suivie par les supports PP et au dernier rang les supports PET (PVC a 14 fois et 56 fois plus de bactéries adhérentes que PP et PET respectivement). Donc, il faut choisir le support PVC pour le traitement des effluents de l'usine du lait par la bactérie.

La recherche d'une relation entre les caractéristiques des surfaces et l'adhésion bactérienne a tout d'abord été centrée sur la relation entre l'hydrophobicité qualitative des supports et le nombre de bactéries adhérentes, les résultats ont montré qu'un nombre élevé de bactéries adhéraient aux matériaux les moins hydrophobes pour les supports non traités. On avait aussi tiré comme conclusion que l'adhésion de la bactérie étudiée sur les supports non traités et traités par les margines est gouvernée par les interactions hydrophile-hydrophile et par les interactions acide-base, dont on a observé une corrélation bien exprimée entre ces caractéristiques physicochimiques et l'adhésion expérimentale. Pour les supports modifiés par les déchets du lait, on n'a pas constaté une bonne corrélation entre les propriétés des surfaces des supports et l'adhésion bactérienne.

Au niveau du méthanisation industrielle, l'utilisation des supports PVC aurait un effet sur l'efficacité, car on a constaté que l'adhésion augmente de manière importante favorisant la formation d'un biofilm stable pour le traitement des effluents des usines du lait.

Nos résultats montrent que polytéréphtalate d'éthylène (PET) a la capacité de fixer plus de cellules bactériennes que le polypropylène (PP) et le chlorure de polyvinyle (PVC) dans le cas des supports traités par les margines. On suggère que pour les industries de la méthanisation des margines ayant le problème de durée prolongée du démarrage du bioréacteur, l'utilisation du polytéréphtalate d'éthylène (PET) comme matériau des supports pourrait réduire cette durée.

De plus, nos résultats montrent que les traitements thermiques (stérilisation) des margines n'ont pas un effet significatif sur les caractéristiques physicochimiques des supports, tandis que l'âge des margines a un effet positif sur l'adhésion bactérienne.

Nous avons pu démontrer un autre aspect de la bactérie. Il s'agit de sa capacité de biodégrader les polyphénols totaux. La bactérie est capable de réduire la teneur en polyphénols totaux dans les margines de 81,71% à 37°C et de 42,21% à 25°C.

Pour améliorer le traitement des margines, une étape de prétraitement de ces dernières dans des bassins d'accumulation semble nécessaire. La réduction du taux des polyphénols totaux des margines semble possible, si on les traite avec la bactérie étudiée à une température de 37°C en aérobie. La fixation de la bactérie sur les supports pour former un biofilm prévu pour contribuer à l'amélioration de la méthanisation ne semble pas utile pour le prétraitement. Si fixation est nécessaire, le prétraitement des margines devrait s'accompagner d'une aération depuis le fond. Cela permettrait aux biofilms formés d'accéder à l'oxygène et améliorer le rendement du prétraitement. Cette aération devrait s'arrêter pendant le traitement.

Pour passer des études théoriques aux applications industrielles, d'autres études seront nécessaires pour l'installation des réacteurs à biofilm pour le prétraitement et la production du biogaz et leur adaptation aux margines. Ces études doivent s'intéresser à l'étude des différents paramètres environnementaux qui influencent la production de biogaz tel que la température, la force ionique, le pH, et la salinité d'eau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Absolom, D. R., Lamberti, F. V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C. J., & Neumann, A. W. (1983). Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and environmental microbiology*, 46(1), 90-97.

Afilal, M. E., Belkhadir, N., Daoudi, H., & Elasri, O. (2013). Fermentation méthanique des différents substrats organiques (Methanic fermentation of different organic substrates). *J. Mater. Environ. Sci*, 4(1), 11-16.

Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., & Mehranian, M. (2006). Empirical modeling of olive oil mill wastewater treatment using loofa-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, 41(5), 1148-1154.

Al-Radha ASD, Dymock D, C Younes, O'Sullivan D. (2012). Les propriétés de surface de titane et de matériaux d'implant dentaire à base de zircone et leur effet sur l'adhésion bactérienne. *Journal de la médecine dentaire* ; 40 : 146-153.

Amani, T., Nosrati, M. & Sreekrishnan, T. R. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - a review. *Environmental Reviews*, 18, 255-278.

Ammar, E., Nasri, M., & Medhioub, K. (2005). Isolation of Enterobacteria able to degrade simple aromatic compounds from the wastewater from olive oil extraction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 253-259.

Amoroso PF, Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters MGJ, Williams D W. (2006). Modification de surface en titane et ses effets sur la *Porphyromonas gingivalis* adhérence : une étude in vitro. *La recherche sur les implants dentaires cliniques*. 17 : 633-637.

Anderson G., Donnelly T., Rippon G.M. (1977) Digestion anaerobia de aguas residuales industriales. *Actas I. Congreso nacional de Química, Vigo.*, 549-565.

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P. & van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59(5), 927-934.

Assaidi, A., Ellouali, M., Latrache, H., Mabrouki, M., Timinouni, M., Zahir, H., ... & Mliji, E. M. (2018). Adhesion of *Legionella pneumophila* on glass and plumbing materials commonly used in domestic water systems. *International journal of environmental health research*, 28(2), 125-133.

Azeredo, J., Visser, J., Oliveira, R., 1999. Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 141–148.

Baillif S., Hartmann D., Freney J., Kodjikian L. (2010). Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du matériau. *Journal La.* 33: 210-221.

Bakker, D.P., Huijs, F.M., de Vries, J., Klijnstra, J.W., Busscher, H.J. et van der Mei, H.C., (2003), Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Colloids Surf., B* 32, 179 –19.

Balanec, B., Vourch, M., Rabiller-Baudry, M., & Chaufer, B. (2005). Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration. *Separation and Purification Technology*, 42(2), 195-200.

Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H. et Vavilin, V.A., (2002), The iwa anaerobic digestion model n°1 (adm1). *Water Science and Technology* 45 (10) : 65-73.

Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen.

Bellon – Fontaine MN, Mozes N, Van der Mei HC, Sjollem J, Cerf O, Rouxhet PG, Busscher HJ. (1990). A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrates. *Cell. Biophys.*, 17 : 93 – 106.

Bellon-Fontaine, M. N., & Vernhet, A. (1999). Adhésion de particules et de microorganismes aux surfaces solides. *Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bioindustries*. Leveau J.-Y. and Bouix M, 25.

Bernet, N. & Buffière, P. (2008). Caractérisation de la mise en œuvre de la méthanisation. In *La méthanisation*, ed. T. e. Toc. Paris, pp. 87-113.

Blenkinsopp, S. A., & Costerton, J. W. (1991). Understanding bacterial biofilms. *Trends in Biotechnology*, 9(1), 138-143.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. (1997). Comparaison de la rugosité de surface de matériaux durs par voie orale à la surface de seuil rugosité pour la rétention de la plaque bactérienne : une revue de la littérature. *Les matériaux dentaires : publication officielle de l'Académie des matériaux dentaires*. 13:258-269.

Boonaert CJ, Rouxhet PG. (2000). Surface of lactic acid bacteria: Relationship between chemical composition and physicochemical properties. *App. Environ. Microbiol.*, 66: 2548-2554.

- Borja, R., Alba, J., & Banks, C. J. (1997). Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewaters (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. *Process Biochemistry*, 32, 121–133.
- Bornert, H., (1989). Contribution à l'étude des biofilms dans réseaux de distribution d'eau d'alimentation. Thèse de doctorat de l'Université de Nancy.
- Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions –its mechanisms and methods for study. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 23: 179-230.
- Boutaleb, N. (2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable (Doctoral dissertation, Lorient).
- Braindet R, Leriche V, Carpentier B, Bellon Fontaine MN. (1999a). Effects of the growth procedures on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cell and their adhesion to stainless steel. *Food. Protection.*, 62: 994-998.
- Braindet R, Meylheuc T, Maher C, Bellon-Fontaine MN. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 65 : 5328-5333.
- Branger, A. (2012). "Chapitre 7 : Quelques systèmes microbiens." *Microbiochimie Et Alimentation*. Educagri Editions.
- Bull, M. A., R. M. Sterritt et J. N. Lester (1983). " An evaluation of four start-up regimes for anaerobic fluidized bed reactors." *Biotechnology Letters* 5 (5): 333-338.
- Busscher HJ, Bellon – Fontaine MN, Mozes N, Van der Mei HC, Sjollema J, Cerf O, Rouxhet PG. 1990. Deposition of *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus thermophilus* to solid substrata in a parallel plate flow cell. *Biofouling.*, 2: 55-63.
- Busscher HJ, Weerkamp AH, Van der Mei HC, Van Pelt AW, De Jong HP, Arends J. (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol.*, 48 : 980-983.
- Campanac C. (2002). Biofilms bactériens : intérêts dans l'évaluation de l'activité détergente. Approche des facteurs impliqués dans la formation et la résistance finale. Thèse de l'université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of applied bacteriology*, 75(6), 499-511.
- Chang, H. T., & Rittmann, B. E. (1986). Biofilm loss during sample preparation for scanning electron microscopy. *Water Research*, 20(11), 1451-1456.

Chen, S. J., C. T. Li et W. K. Shieh (1988). " Anaerobic fluidized bed treatment of an industrial wastewater." *Journal of Water Pollution Control Federation* 60 (10): 1826-1832.

Cirne, D.G., Paloumet, X., Bjornsson, L., Alves, M.M. et Mattiasson, B., (2007), Anaerobic digestion of lipid-rich waste - effects of lipid concentration. *Renewable Energy* 32 : 965-975.

Compere, C. (1999). *Biofilms en milieu marin. Techniques sciences méthodes*, (11), 48-54.

Corpe, W. A. (1980). *Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. Adsorption of microorganisms to surfaces.* New York: John Wiley & Sons, 1980, 105-144.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). *Microbial biofilms. Annual review of microbiology*, 49(1), 711-745.

Costerton.J.W. (1999) Discussion: Introduction to biofilm. *International Journal of antimicrobial agents*, 11: 217-221.

Cowan MN, Van der Mei HC, Rouxhet PG, Busscher HJ. (1992). Physico-chemical and structural properties of the surfaces of *Peptostreptococcus micros* and *Streptococcus mitis* as compared to those of mutant's streptococci, *streptococcus sanguis* and *streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.*, 138 : 2707-2714.

Cresson, R. (2006). *Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm*, Vol. PhD, Université de Montpellier II, pp. 272.

D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., & Giovannozzi Sermanni, G. (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a whit-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, 61, 209–218.

Damien, A. (2008). *La biomasse énergie : définitions, ressources, usages.* Dunod.

Dankert, J. (1986). *Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization and infection.* CRC Crit Rev Biocompat, 2, 219-301.

Das, T., Sehar, S., & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental microbiology reports*, 5(6), 778-786.

Debye, P. (1920). Die van der Waalsschen Kohasion-skrafte. *Phys. Zs.*, 21, 178-187.

Demirel, B. & Scherer, P. (2011). Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass & Bioenergy*, 35(3), 992-998.

Derjaguin BV, Landan LD. 1941. Cité par van Oss (1996). *Acta physica chimica USSR*, 14, 63.

Derlon, N., Peter-Varbanets, M., Scheidegger, A., Pronk, W., & Morgenroth, E. (2012). Predation influences the structure of biofilm developed on ultrafiltration membranes. *Water research*, 46(10), 3323-3333.

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532-1552.

Dexter, S.C., (1979), influence of substratum critical surface tension on bacteria adhesion – in situ studies. *J. Colloid Interface Sci.*, 70, 346 – 354.

Di Gioia D., Fava F., Bertin L., Marchetti L. (2001) Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill Wastewaters by two aerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 55 (5), 619-26.

Donlan, R. M. et J. W. Costerton, (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.

Dufrêne YF, Boonaert CJP, Rouxhet PG. (1996). Adhesion of *Azospirillum brasilense*: role of proteins at the cell-support interface. *Colloids Surf. B Biointerfaces.*, 7 : 113-128.

Dumas C. (2007). Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155-166.

Dupré A. (1869). *Théorie mécanique de la chaleur*. Gauthier – Villars. Paris, 367-370.

Elenter, D., Milferstedt, K., Zhang, W., Hausner, M., Morgenroth, E., (2007). Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. *Water research* 41, 4657–71.

Elmaleh, S., A. Grasmick et A. Guitonas (1984). Epuration par cellules anaérobies immobilisées sur un support fluidisé. 37th Int. Conf. Cebedeau, Liege (Belgium).

Ergüder T.H., Guven E., Demirer G.N. (2000) anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. *Process Biochem.*, 36 (3) ,243-248.

Espinasse F., Page B. et Cottard-Bouelle B. (2010). Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires* .426,51-63.

- Evans, L. V. (Ed.). (2003). *Biofilms: recent advances in their study and control*.
- Fermoso, F. G., Bartacek, J., Jansen, S. & Lens, P. N. L. (2009). Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. *Science of the Total Environment*, 407(12), 3652-3667.
- Fernández, N., Díaz, E. E., Amils, R., & Sanz, J. L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology*, 56(1), 121-132.
- Fernandez, N., F. Fdz-Polanco, S. J. Montalvo et D. Toledano (2001). " Use of activated carbon and natural zeolite as support materials, in an anaerobic fluidized bed reactor, for vinasse treatment." *Water Science and Technology* 44 (4): 1-6.
- Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
- Fletcher, M. A. D. I. L. Y. N. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*, 170(5), 2027-2030.
- Flint, S. H., Bremer, P. J., & Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant description current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11, 81e97.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophan determination in protein. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627–650.
- Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G. (2002) Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, 36 (19), 4735-44.
- Gaboriaud, F., E. Dague, S. Bailet, F. Jorand, J. Duval, et F. Thomas. 2006. Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrifaciens* as response to pH change, *Colloids and surfaces B*. 52:108-116.
- Gadelmawla ES, Koura mm, Maksoud TMA. (2002). Les paramètres Soliman H détermine rugosités. *Journal Materials Technology Process*. 123 : 133-145.
- Gaime- Perraud I., Labrousse Y. et Roussos, S. (2009). Conservation des résidus de l'agro-industrie oléicole par ensilage : de l'isolement de bactéries lactiques endogènes à l'étude de faisabilité. Sfax : Institut de l'Olivier. 308-312.
- Galand, P. E., Juottonen, H., Fritze, H. & Yrjala, K. (2005). Methanogen communities in a drained bog: Effect of ash fertilization. *Microbial Ecology*. 49(2), 209-217.

Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, Bruque JM, Perez-giraldo C, Gomez-Garcia AC. (2002). Temperature influence on the physicochemical surface properties and adhesion behavior of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *J. Adhesion. Sci. Technol.* 16 : 1215-1223.

Garcia, J. L., Patel, B. K. C. & Ollivier, B. (2000). Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6(4), 205-226.

Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049-1056.

Gelosia, A., Baldassarri, L., Deighton, M., & Van Nguyen, T. (2001). Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clinical microbiology and infection*, 7(4), 193-199.

Gjaltema, A., N. v. d. Marel, M. C. M. v. Loosdrecht et J. J. Heijnen (1997). " Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: hydrodynamics conditions versus surface characteristics." *Biotechnology and Bioengineering*, 55 (6):881-889.

Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental microbiology*, 7(6), 894-904.

Goddard D T. (1993). Imaging soft and delicate materials, *Mat. World*, 1 : 616.

Godon, J. J. (2008). Aspects biochimiques et microbiologiques de la méthanisation. In *La méthanisation*, Editions Tec et Doc, pp. 61-86.

Goel, R., Mino, T., Satoh, H. et Matsuo, T., (1998). Comparison of hydrolytic enzyme systems in pure culture and activated sludge under different electron acceptor conditions. *Water Science and Technology* 37 (4/5): 335-343.

Gordon, A. S., S. M. Gerchakov, et L. R. Udey. (1981). The effect of polarization on the attachment of marine bacteria to copper and platinum surfaces. *Can. J. Microbiol.*, 27:698-703.

Gottenbos B., Grijpma D.W., van der Mei H.C., Feijen J., Busscher H.J. (2001). Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering gram-positive and Gram-negative bacteria *J Antimicrobial Chemother*; 48: 7-13.

Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Gobel U B. (2001). La formation de plaque sur surface modifiée implants dentaires. *La recherche sur les implants dentaires cliniques* ; 12 : 543-551.

Habouzit, F. (2010). Rôle des matériaux-supports sur la mise en place du biofilm : Application au démarrage d'un procédé de méthanisation (Doctoral dissertation, Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques)).

Habouzit, F., Gévaudan, G., Hamelin, J., Steyer, J. P., & Bernet, N. (2011). Influence of support material properties on the potential selection of Archaea during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource technology*, 102(5), 4054-4060.

Hadjiev, D., Dimitrov, D., Martinov, M., & Sire, O. (2007). Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme and microbial technology*, 40(4), 840-848.

Hall, E. R. (1987). Biofilm reactors in anaerobic wastewater treatment. *Biotechnology advances*, 5(2), 257-269.

Hamadi, F., & Latrache, H. (2008). Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 134-139.

Hamadi, F., Asserne, F., Elabed, S., Bensouda, S., Mabrouki, M., & Latrache, H. (2014). Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control*, 38, 104-108.

Hamadi, F., Latrache, H., El Ghmari, A., Ellouali, M., Mabrouki, M., & Kouider, N. (2004). Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *ANNALS OF MICROBIOLOGY.*, 54, 213-226.

Hamza, A., Pham, V.A., Matsuura, T. et Santerre, J.P. (1997), Development of membranes with low surface energy to reduce the fouling in ultrafiltration applications. *J. Memb. Sci.*, 131,217-27.

Harkes G., Feijen J., Dankert J. (1991). Adhesion of *Escherichia coli* on to a series of poly(methacrylate) differing in charge and hydrophobicity *Biomaterials*; 12: 853-860.

Henriques M., Azeredo J. et Oliveira R. (2004). Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids surf B.* 33, 235-241.

Henze, M., & Harremoës, P. (1983). Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors—a literature review. *Water science and technology*, 15(8-9), 1-101.

Heppner, B., G. Zellner et H. Diekmann (1992). " Start-up and operation of a propionate degrading fluidized-bed reactor." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 810-816.

Hilbert LR, Bagge-Ravn D, J Kold, Gram L. (2003). Influence de la rugosité de surface en acier inoxydable sur l'adhésion microbienne et résistance à la corrosion. *Biodeterioration International & Biodegradation*. 52: 175-185.

Hogt A.H., Dankert J., de Vries J.A., Feijen J. (1983). Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials *J Gen Microbiol*, 129: 1959-1968.

Hyde FW, Alberg M and Smith K. (1997). Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 19(2) : 142.

Iza, J., P. A. Garcia, I. Sanz, S. Hernando et F. Fdz-Polanco (1988). Anaerobic fluidized bed reactors (AFBR): performance and hydraulic behavior. 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, E. R. Hallet N. Hobson, Pergamon, Bologna (Italy).

Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley M.L. et Shilliff M.E. (2008). Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Escherichia coli* and *Proteus Escherichia* *Microbiol Rev* .21,26-59.

James, A. M. (1991). In *Microbial Cell Surface Analyses. Structural and physico-chemical Methods*, ed by N. Mozes, P. S. Handley, H. J. Busscher and P. G. Rouxhet, p223, VCH Publishers, New York.

Jeris, J. S. (1983). " Industrial wastewater treatment using anaerobic fluidized bed reactors. «*Water Science and Technology* 15: 169-176.

Joshi P., Wadhvani T., Bahale P. and Kothari V. (2010). Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing, *The IUP Journal of Life Sciences*. Vol. 4 No. 1, pp. 59-72.

Jucker BA., Harms H. et Zehnder AJB. (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Bacteriol*. 178, 5472-5479.

Juottonen, H., Galand, P. E., Tuittila, E. S., Laine, J., Fritze, H. & Yrjala, K. (2005). Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environmental Microbiology*, 7(10), 1547-1557.

Kanematsu, H., & Barry, D. M. (2015). Conditioning films. In *Biofilm and Materials Science* (pp. 9-15). Springer, Cham.

Kara Terki I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

Katainen J, Paajanen M, Ahtola E, Pore V, Lahtinen J. (2006). Adhésion comme une interaction entre la taille des particules et la rugosité de surface *Journal of Colloid and Interface Science*. 304 : 524-529.

Katsikogianni M, Y Missirlis F. (2004). Examen Concise des mécanismes de l'adhérence bactérienne aux biomatériaux et des techniques utilisées dans bactéries matériau d'estimation des interactions. *Cellules européennes et matériaux*. 8 : 37-57.

Keesom, W. M. (1921). Van der Waals attractive force. *Physikalische Zeitschrift*, 22, 129-141.
Khemkhao, M., Nuntakumjorn, B., Techkarnjanaruk, S. & Phalakornkule, C. (2011). Effect of chitosan on UASB treating POME during a transition from mesophilic to thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 102(7), 4674-4681.

Khoufi S., Feki F., Sayadi S., (2007). Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials* 142, 58-67.
Krekeler C., Ziehr H., Klien J. (1989). Physical methods for characterization of microbial cell surfaces. *Experientia*, 45: 1047-1054.

Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 9-27.

Laguérie, C. et P. Guigon (1991). *La fluidisation. Technique et Documentation - Lavoisier, Toulouse, Récents progrès en génie des procédés*, 416.

Latrache H, El Ghmari A, Karroua M, Hakkou A, Ait Mousse H, El Bouadili A, Bourlioux P. (2002). Relations between hydrophobicity tested by three methods and surface chemical composition of *Escherichia coli*. *Microbiologica*, 25: 75-82.

Latrache, H., Mozes, N., Pelletier, C., & Bourlioux, P. (1994). Chemical and physicochemical properties of *Escherichia coli*: variations among three strains and influence of culture conditions. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2(1-3), 47-56.

Lauwers, A. M., W. Heinen, L. G. M. Gorris et C. Van der Drift (1989). " Variation of parameters affecting the start-up of methanogenic fluidized bed reactors." *Biotechnology Letters* 11 (12): 907-912.

Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., & Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology*, 173(20), 6558-6567.

Lay, J.J., Li, Y.Y. et Noike, T., (1998), The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion process. *Water Environment Research* 70 (5): 1075-1082.

Lazarova, V., & Manem, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water research*, 29(10), 2227-2245.

Leenars, A.F.M. (1988). A new approach to the removal of sub-micron particles on surfaces, detection, adhesion and removal, K.L. Mittal, ed (New York: Plenum press), pp.

Leenars, A.F.M., and O'Brien, S.B.G. (1989). Particle removal from silicon substrates using surface tension force. *Philips J Res* 44, 183-209.

Lettinga, G. (1995). Anaerobic-digestion and waste-water treatment systems. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 67(1), 3-28.

Lettinga, G. (2005). Personal communication. Montevideo, Uruguay.

Lhanafi S, Aba-AakiZ R, Et-Taleb S, Elhaouti R, Abbaz M, Ez-Zahery M, et al. (2014). Caractérisation des effluents laitiers en vue de leur valorisation : Cas de lactosérum. *J Mater Environ Sci.*; 5:2489–94.

Liu, Y. et Zhao, Q. (2005), Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophysical Chemistry*, 117, 39 – 45.

London, F. (1930). Zur theorie und systematik der molekularkräfte. *Zeitschrift für Physik*, 63(3-4), 245-279.

Lorite, G. S., Rodrigues, C. M., De Souza, A. A., Kranz, C., Mizaikoff, B., & Cotta, M. A. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *Journal of colloid and interface science*, 359(1), 289-295.

M. Donlan R. (2002). Biofilms : la vie microbienne sur les surfaces. *Les maladies infectieuses émergentes* ; 8 : 881-890.

Macfarlane, S., Bahrami, B., Macfarlane, G.T., (2011). Mucosal biofilm communities in the human intestinal tract. *Advances in applied microbiology* 75, 111–43.

Marshall KC, Stout R, Mitchell R. (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.*, 68 : 337-348.

Martin A., Borja R., Garcia I., Fiestas J.A. (1991). Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process. Biochem.*, 26, 101-107.

Martin, K.J., Nerenberg, R., (2012). The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: principles, applications, and recent developments. *Bioresource technology* 122, 83–94.

Massicotte, R., Bédard, S., Boudreault, S., Dupuis, N., Castonguay, Y., Dumont, MC Eldowney S, Fletcher M. (2007). Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 460 – 465.

McEldowney, S. and Fletcher, M. (1986) Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appt. Environ. Microbiol.* 52, 460-465.

Mei L, Busscher HJ, Van der Mei HC, Ren Y. (2011). Influence de la rugosité de surface sur les forces d'adhésion streptococcique à composite résines. Les matériaux dentaires : publication officielle de l'Académie des matériaux dentaires ; 27 : 770-778.

Mei, H. V. D., Brokke, P., Dankert, J., Feijen, J., & Busscher, H. J. (1992). Influence of electrostatic interactions on the deposition efficiencies of coagulase-negative staphylococci to collector surfaces in a parallel plate flow chamber. *Journal of dispersion science and technology*, 13(4), 447-458.

Messing RA, Oppermann R A. (1979). Dimensions des pores d'accumulation de la biomasse. I. Microbes qui se reproduisent par fission ou par bourgeonnant. *Biotechnology and Bioengineering*; 21: 49-58.

Michaud, S., N. Bernet, J. P. Delgenès et M. Roustan (2003). " Influence of hydrodynamic conditions on biofilm behavior in a methanogenic inverse turbulent bed reactor." *Biotechnology Progress* 19 (3) : 858-863.

Moletta, R. (2002). Technologies du traitement des effluents par méthanisation. Moletta-Methanisation. fr.

Moletta, R. et Cansell, F., (2003). Méthanisation des déchets organiques : Etude bibliographique, RECORD : 193.

Mora-Naranjo, N., Meima, J., Haarstick, A. et Hempel, D.C., (2004), Modelling and experimental investigation of environmental influences on the acetate and methane formation in solid waste. *Waste Management* 24: 763-773.

Mozes N, Léonard AJ, Rouxhet PG. (1988). on the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta*. 945: 324-334.

Myint, M., Nirmalakhandan, N. et Speece, R.E., (2007), Anaerobic fermentation of cattle manure: Modelling of hydrolysis and acidogenesis. *Water Research*, 41 : 323-332.

Nefzaoui A. (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis.

Nguyen, V., Karunakaran, E., Collins, G., & Biggs, C. A. (2016). Physicochemical analysis of initial adhesion and biofilm formation of *Methanosarcina barkeri* on polymer support material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 518-525.

Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* 80, 1–33.

Nobbs A. H., Lamount R. J. and Jenkinson H. (2009), Streptococcus adherence and colonization, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 73 No. 3, pp.407-505.

Noroa, I. (1987). Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers.

Oliveria, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., Henriques, M., & Oliveira, R. (2006). Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella Enteritidis* serotypes to materials used in kitchens. *Journal of Food Protection*, 69, 2352e2356.

Orstavik D. (1977). Sorption of streptococcus faecium to glass. *Acta pathol microbial scand*; 858:38-46.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

Palmer, J., S. Flint, et J. Brooks. (2007). Bacterial Cell Attachment, the Beginning of a Biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34, no. 9: 577-88.

Partt – Terpstra IH., Weerkamp AH. et Busscher HJ. (1988). On a relation between interfacial free energy dependent and non – interfacial free energy dependent adherence of oral streptococci to solid substrata. *Curr. Microbiol.* 16, 311 – 313.

Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bellon-Fontaine MN. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus caesi* subsp. *casei*. *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *App. Environ. Microbiol.*, 63 : 1725-1731.

Percheron, G., Bernet, N. & Moletta, R. (1997). Start-up of anaerobic digestion of sulfate waste water. *Bioresource Technology*, 61(1), 21-27.

Percival, S. L., Emanuel, C., Cutting, K. F., & Williams, D. W. (2012). Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *International wound journal*, 9(1), 14-32.

Percival, S., S. Malic, H. Cruz, et D. Williams. (2011). Introduction to Biofilms. Chap. 2 In *Biofilms and Veterinary Medicine*: 41-68.

Petrov, P.G., Petrov, J.G. (1991). Comparison of the static and dynamic contact angle hysteresis at low velocities of the three-phase contact line. *Colloid Surf.:* 61. 227-240.

Poh, P. E. & Chong, M. F. (2009). Development of anaerobic digestion methods for palm oil mill effluent (POME) treatment. *Bioresource Technology*, 100(1), 1-9.

- Pommier, S., Chenu, D., Quintard, M. et Lefebvre, X. (2007). A logistic model for the prediction of the influence of water on the solid waste methanization in landfills. *Biotechnology and Bioengineering* 97 (3): 473-482.
- Priester, J. H., Horst, A. M., Van De Werfhorst, L. C., Saleta, J. L., Mertes, L. A., & Holden, P. A. (2007). Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of microbiological methods*, 68(3), 577-587.
- Punal, A., Trevisan, M., Rozzi, A., & Lema, J. M. (2000). Influence of C: N ratio on the start-up of up-flow anaerobic filter reactors. *Water research*, 34(9), 2614-2619.
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., & Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 596–601.
- Rosmaninho, R., Santos, O., Nylander, T., Paulsson, M., Beuf, M., Benezech, T., et al. (2007). Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling-evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering*, 80, 1176e1187.
- Roustan, M., Capdeville, B., & Bastoul, D. (1993). Influence of the hydrodynamic behaviour of a three-phase fluidized bed used for effluent treatment. 3rd Int. In Conference on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics, Cambridge (UK).
- Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Rubio, C., Costa, D., Bellon-Fontaine, M. N., Relkin, P., Pradier, C. M., & Marcus, P. (2002). Characterization of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the *Pseudomonas Fragi* K1 adhesion. *Colloids and Surfaces B*, 24, 193e205.
- Rutter, P. R., & Vincent, B. (1980). *Microbial adhesion to surfaces*. Chichester, Ellis.
- Sanders, W., (2001). *Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates*. Wageningen, Wageningen University: 101.
- Sassi, A. B., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G., & Boussaid, A. (2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, 41(1), 74-78.
- Simões, M., Sillankorva, S., Pereira, M. O., Azeredo, J., & Vieira, M.J. (2007). The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, 24, 249–258.

Siriwongrungson, V., Zeng, R. J., & Angelidaki, I. (2007). Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water research*, 41(18), 4204-4210.

Sjollema J., Van der Mei HC., Wugen HM. Et Busscher HJ. (1990) The influence of collector and bacterial cell surface properties on the deposition of oral streptococci in a parallel plate flow cell. *J. Adhesion. Sci. Technol.*, 4, 765- 777.

Speece, R. E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Pr, Nashville, TN, USA.

Stanley, P. M. (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian journal of microbiology*, 29(11), 1493-1499.

Steyer, J. P., P. Buffiere, D. Rolland et R. Moletta (1999). Advanced control of anaerobic digestion processes through disturbances monitoring. *Water Research*, 33 (9): 2059.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.

Switzenbaum, M. S. (1983). A comparison of the anaerobic filter and the anaerobic expanded/fluidized bed processes. *Water Science and Technology*, 15(8-9), 345-358.

Takashima, M., Shimada, K. & Speece, R. E. (2011). Minimum requirements for trace metals (Iron, Nickel, Cobalt, and Zinc) in thermophilic and mesophilic methane fermentation from glucose. *Water Environment Research*, 83(4), 339-346.

Teixeira, P., Silva, S., Araújo, F., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2007). Bacterial adhesion to food contacting surfaces. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 13e20.

Thiele, J. H. (1991). Mixed-culture interactions in methanogenesis. *Mixed cultures in biotechnology*, 1, 260-292.

Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19-26.

Tong, X., Smith, L.H. et McCarthy, P.L., (1990), Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass* 21: 239-255.

Truong, V. K., Lapovok, R., Estrin, Y. S., Rundell, S., Wang, J. Y., Fluke, C. J., ... & Ivanova, E. P. (2010). The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials*, 31(13), 3674-3683.

Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006). Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 331-343.

Vacheethasanee, K., Temenoff, J. S., Higashi, J. M., Gary, A., Anderson, J. M., Bayston, R., & Marchant, R. E. (1998). Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 42(3), 425-432.

Van den Berg, L. (1986). High-rate reactors for methane production. *Biotechnology and Renewable Energy*. M. Moo-Young, S. Hasnainet J. Lamptey, Elsevier Applied Science: 268-275.

Van der Mei HC, De Vries J, Busscher HJ. (1993). Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *App. Environ. Microbiol.*, 59: 4305-4312.

Van der Mei, H. C., de Vries, J., & Busscher, H. J. (1993). Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *Applied and environmental microbiology*, 59(12), 4305-4312.

Van der Mei, H. C., Van de Belt-Gritter, B., & Busscher, H. J. (1995). Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5(3-4), 117-126.

van der Mei, H. C., van de Belt-Gritter, B., Reid, G., Bialkowska-Hobrzanska, H., & Busscher, H. J. (1997). Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties. *Microbiology*, 143(12), 3861-3870.

Van Loosdrecht, M. C., & Heijnen, S. J. (1993). Biofilm bioreactors for waste-water treatment. *Trends in biotechnology*, 11(4), 117-121.

van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1989). Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial ecology*, 17(1), 1-15.

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., & Zehnder, A. J. (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(8), 1898-1901.

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., & Zehnder, A. J. (1987). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and environmental microbiology*, 53(8), 1893-1897.

Van Oss, C. J., & Good, B. J. (1991). Surface enthalpy and entropy and the physico-chemical nature of hydrophobic and hydrophilic interactions. *Journal of dispersion science and technology*, 12(3-4), 273-287.

Van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. (1986). The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *J. colloid. Interf.Sci.*, 111: 378-390.

Van Oss, C. J. (1995). Hydrophobicity of biosurfaces—origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5(3-4), 91-110.

Van Oss, C. J. (1996). *Forces interfaciales en milieux aqueux*. Masson.

Van Oss, C. J., Good, R. J., & Chaudhury, M. K. (1986). The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of colloid and Interface Science*, 111(2), 378-390.

Vavilin, V. A., Rytov, S. V., & Lokshina, L. Y. (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource technology*, 56(2-3), 229-237.

Vergnault, H. (2004). *Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé* (Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).

Verrier, D., Mortier, B., & Albagnac, G. (1987). Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnology Letters*, 9(10), 735-740.

Verwey, E. J. W., & Overbeek, J. T. G. (1948). *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier, Amsterdam.

Visser, J. (1976). Adhesion of colloidal particles. In *Surface Marijevic*, ed (New York: John Wiley and Sons), pp. 3-84.

Vogels, G. D., Keltens, J. T. & Vander Drift, C. (1988). Biochemistry of methane production. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*, ed. A. J. B. Zender, John Wiley & Sons. New York, pp. 707-770.

Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J. & Jones, D. L. (2008). Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99(17), 7928-7940.

Weerkamp, A. H., Van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1985). The surface free energy of oral streptococci after being coated with saliva and its relation to adhesion in the mouth. *Journal of Dental Research*, 64(10), 1204-1210.

Weiland, P., & Rozzi, A. (1991). The start-up, operation and monitoring of high-rate anaerobic treatment systems: discussor's report. *Water Science and Technology*, 24(8), 257-277.

Wheatley, A. (1990). *Anaerobic digestion: a waste treatment technology*. Elsevier applied science, London, Critical reports on Applied Chemistry Vol.31, 229.

Wingender, Jost, Neu, Thomas R., & Flemming, Hans-Curt. (1999). *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function*. Springer.

Woldring C L, de Jong M A, van den Berg, W and Koppes L. (1977). Morphological analysis of the division cycle of two *Escherichia coli* substrains during slow growth, *Bacteriol.*, 131: 270.

Wu, W., Giese Jr, R. F., & Van Oss, C. J. (1994). Linkage between ζ -potential and electron donicity of charged polar surfaces 1. Implications for the mechanism of flocculation of particle suspensions with plurivalent counterions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 89(2-3), 241-252.

Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 35(23), 7608-7614.

Yaakoubi, A., Chahlaoui, A., Rahmani, M., Elyachioui, M., & Oulhote, Y. (2009). Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*, 20(1), 35-43.

Ye, N. F., Lu, F., Shao, L. M., Godon, J. J. & He, P. J. (2007). Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1055-1065.

Young, T. (1805). TR, An assay on the cohesion of fluids, *Philos. In Soc. Lond* (Vol. 95, pp. 65-87).

Zellner, G., Geveke, M., & Diekmann, H. (1991). Start-up and operation of a fluidized-bed reactor oxidizing butyrate by a defined syntrophic population. *Biotechnology letters*, 13(9), 687-691.

Zhang, B., He, P.-J., Lü, F., Shao, L.-M. et Wang, P., (2007), Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic waste. *Water Research* 41 :4468-4478.

Zhao, Q., Liu, Y., Wang, C., Wang, S., Peng, N., & Jeynes, C. (2008). Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless-steel surfaces. *Medical engineering & physics*, 30(3), 341-349.

Zinder, S. H. (1993). Physiological ecology of methanogens. In *Methanogenesis* (pp. 128-206). Springer, Boston, MA.

Annexe

Tableau 7 : Angle de contact et composantes de l'énergie de surface du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) traités par les différentes margines et les déchets liquide de l'usine du lait. L'écart-type est donné entre parenthèse ; MA (marges2016) ; MAS (marges 2016 stérilisées) ; MN (marges 2018) ; MNS (marges2018 stérilisées) ; L (déchet de l'usine du lait)

Echantillon	Angle de contact (°)			Energie de surface (mJ/ m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/ m ²)
	θ_a	θ_f	θ_w	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
PET MA	39(3,7)	49,3(2,5)	28,3(5,8)	40,1(0,18)	0,5(0,3)	70,2(5,7)	52,2(3,02)
PP MA	49,5(2,1)	56,3(3,8)	42,6 (4,4)	34,6(3,55)	0,2(0,06)	57,1(4,26)	43,2(7,88)
PVC MA	33,4(4,5)	71,8(3,2)	34,2(3,8)	42,8(5,6)	8(0,37)	99(3,29)	36,3(4,26)
PET MAS	42(2,8)	41,5(3)	44,9(4,5)	38,6(0,52)	0,2(0,3)	37,8(0,5)	15,5(2,68)
PP MAS	44,5(1,9)	40,1(0,9)	48,3(2,8)	37,3(0,27)	0,5(0,19)	31,7(1,36)	6(1,74)
PVC MAS	53,7(3,9)	42,5(1)	33,8(2,1)	32,2(3,29)	1,4(0,48)	25(5,46)	-2,7(6,52)
PET MN	24,4(4,6)	36,3(2,7)	70(1,4)	46,4(0,8)	1(0,1)	5,7(1,8)	-52,2(3,12)
PP MN	28,9(1,7)	41,7(2,1)	69,5(5,2)	44,7(0,8)	0,6(0)	7,9(1)	-46,3(1,83)
PVC MN	31,5(5,1)	57,7(2,5)	75,4(4,1)	43,6(1,4)	0,1(0)	10(1,7)	-43,1(10,7)
PET MNS	27,5(0,8)	49,5(3,6)	63,8(7,1)	45,2(0,4)	0(0)	18,3(0,17)	-24(0,9)
PP MNS	26(4,2)	59,4(5,2)	68,9(9)	45,8(0,36)	0,6(0,04)	18,9(1,41)	-20,8(2,64)
PVC MNS	29(2,7)	60,1(1,8)	65,2(5,2)	44,6(1,29)	0,8(0,49)	24,7(3,35)	-9,4(7,93)
PET L	40,9(5,3)	65,7(3,7)	79(0,9)	39(2,8)	0,25(0,1)	13,3(2,14)	-39,1(12,7)
PP L	61,8(8,8)	74,1(11)	100,8(2,1)	27,5(5)	0,55(0,83)	0,6(0,76)	-79(6,68)
PVC L	57(5,1)	72,2(3,2)	93,9(3,9)	30,3(3)	0,1(0,03)	2,3(1,74)	-71(10,22)

Tableau 8 : Angle de contact et composantes de l'énergie de surface du polytéréphtalate d'éthylène (PET), polypropylène (PP), et du chlorure de polyvinyle (PVC) traités et non traités par les déchets liquides du lait en fonction du temps (0h, 3h, 6h, 18h et 24h)

Echantillon	Angle de contact (°)			Energie de surface (mJ/ m ²)			$\Delta Giwi$ (mJ/ m ²)
	θ_d	θ_f	θ_w	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
PET 0	36,8(1,5)	57,3(0,3)	80,9(3)	41,2(0,7)	0(0,03)	4,9(0,2)	-63,2(0,6)
PET 3	40,9(5,3)	65,7(3,7)	79(0,9)	39(2,8)	0,25(0,1)	13,3(2,14)	-39,1(12,7)
PET 6	42,6(1,2)	59,6(6,9)	75(1,2)	38,2(0,62)	0,61(0,53)	14,8(2,4)	-35,6(6,5)
PET 18	48,5(4,3)	64,0(0,7)	77,2(3,3)	35(2,35)	0,0(0)	11,9(3,95)	-35,9(12,3)
PET 24	45,6(0,3)	53,3(7)	62,6(1,7)	36,6(0,18)	0,21(0,27)	22,4(0,34)	-9,6(5,8)
PP 0	57,6(3)	50,1(1,4)	77,8(5,5)	30(2,3)	2,7(0,06)	4,1(1,66)	-42,3(2,5)
PP 3	61,8(8,8)	74,1(11)	100,8(2,1)	27,5(5)	0,55(0,83)	0,6(0,76)	-79(6,68)
PP 6	49,9(1,5)	74,9(4,9)	93,3(3,5)	33,5(0,84)	0,33(0,44)	1,5(2)	-76,3(11,91)
PP 18	64,8(13,2)	90,6(9,5)	100,6(6,4)	25,9(7,36)	1,23(1,51)	5,2(3)	-48,5(17,89)
PP 24	59,8(0,03)	86,2(0,3)	101,4(0,1)	28,6(0,18)	2,14(1,55)	4,3(4,11)	-51(27,99)
PVC 0	44,5(9)	49,8(1,6)	76,3(3,1)	37,3(0,4)	1(0,6)	5,3(1,7)	-48,5(11,4)
PVC 3	57(5,1)	72,2(3,2)	93,9(3,9)	30,3(3)	0,1(0,03)	2,3(1,74)	-71(10,22)
PVC 6	50,1(5,8)	71,1(4,6)	90,7(1,1)	34,1(3,3)	0,2(0,27)	3,6(1,15)	-62,4(9,89)
PVC 18	48,9(2,2)	77(1,2)	93,3(2,8)	34,8(1,2)	0,54(0,5)	4,5(2,64)	-55,8(13,8)
PVC 24	50,4(0,4)	72,6(6,4)	92,1(11,2)	34,0(0,22)	0,1(0,09)	4,1(4,49)	-45,6(21 ;34)

L'écart-type est donné entre parenthèse ; 0 non traité; 3h; 6h ;18h ;24h