

50376
1991
86

50376
1991
86

N° d'ordre: 709

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Florence FREGARD

Boursier C.I.F.R.E. - S.G.N

I.N.R.A. - Centre de Recherche de LILLE



ROLE DES INTERACTIONS HYDROPHOBES ET ELECTROSTATIQUES
DANS L'ADHESION DE BACTERIES METHANOGENES
AUX MATERIAUX DE FAIBLE ENERGIE DE SURFACE

Présentée le 28 Mars 1991 devant la Commission d'Examen:

Membres du jury: MM.

A. VERBERT
P.G. ROUXHET
R. TAILLIEZ
G. ALBAGNAC
C. VERNIN

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur

*"Si je désire une eau d'Europe, c'est la flèche
Noire et froide où, vers le crépuscule embaumé,
Un enfant accroupi, plein de tristesse, lâche
Un bateau frêle comme un papillon de mai."*

ARTHUR RIMBAUD

*Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Guy ALBAGNAC,
Directeur de la Station de Technologie Alimentaire de l'INSTITUT NATIONAL DE
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (LILLE), en collaboration avec la société S.G.N
(78182 Saint Quentin en Yvelines)*

A Monsieur le Professeur A. VERBERT (Université des Sciences et Techniques de LILLE I)

Vous m'avez transmis au cours de ma formation votre passion pour la recherche scientifique, vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous prie de croire en l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur G. ALBAGNAC (Directeur de la Station de Technologie Alimentaire, I.N.R.A., LILLE)

En m'intégrant à votre équipe, vous m'avez permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Pour m'avoir appris toutes les facettes du métier de chercheur, veuillez trouver ici mes plus vifs remerciements et le témoignage de mon attachement.

A Monsieur le Professeur P. ROUXHET (Université Catholique de LOUVAIN-LA-NEUVE, Belgique)

Votre compétence dans le domaine de l'adhésion microbienne rend très précieuse votre participation à ce jury de thèse. Pour cela et pour l'accueil que vous m'avez toujours réservé, je vous en remercie respectueusement. Puissent ces travaux contribuer à renforcer les relations privilégiées établies avec votre laboratoire.

A Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ (Université des Sciences et Techniques de LILLE I)

Pour l'intérêt que vous manifestez à ce travail en acceptant d'en être rapporteur, recevez mes remerciements sincères.

A Monsieur C. VERNIN (Société S.G.N., Saint Quentin en Yvelines)

Très sensible à votre participation dans ce jury et à l'intérêt que vous avez toujours témoigné pour mes recherches, je vous en remercie très sincèrement.

Les travaux qui ont fait l'objet de cette thèse ont été valorisés grâce à de nombreuses collaborations. Je leur exprime en cette occasion mes sincères remerciements:

A Madame N. MOZES (Université Catholique de LOUVAIN-LA-NEUVE, Belgique)

La disponibilité et la patience dont tu a toujours fait preuve à mon égard, malgré les événements d'actualité qui te touchaient directement, ont toujours été pour moi source de réconfort. Pour cela et pour les analyses X.P.S. que tu as réalisées, reçois l'expression de ma très vive amitié.

A Monsieur M. VAN LOOSDRECHT (Université d'Agriculture de WAGENINGEN, Netherlands)

Ta collaboration pour la mesure des mobilités électrophorétiques et les discussions qui ont suivi ont été pour moi très précieuses, je t'en remercie.

A Madame M.N. BELLON-FONTAINE (I.N.R.A., MASSY)

Pour l'accueil que tu m'as réservé lors de mes mesures de rugosité et pour l'esprit de complémentarité qui a toujours régné entre nous, je t'en remercie très sincèrement. Puisse l'avenir nous permettre de poursuivre notre collaboration.

A Monsieur J.F. MIGDAL (I.N.R.A., LILLE)

La qualité des photographies réalisées au cours de ce travail témoigne de ton souci de la perfection. Je t'en remercie profondément.

J'oublie sans aucun doute les signes d'amitié de mes collègues de tous les jours qui, je l'espère, ne seront pas humiliés de ne pas figurer de façon nominative dans ces remerciements. Je garde un excellent souvenir de tout le personnel de l'I.N.R.A. de LILLE pour ce que j'ai appris en sciences biologiques et sciences humaines, dans une ambiance chaleureuse et détendue, favorable au travail et à la recherche. Puisse l'avenir me permettre de poursuivre ces travaux.

ABREVIATIONS

A.G.V.	Acides Gras Volatiles
D.C.O.	Demande Chimique en Oxygène
D.O.	Densité Optique
EDTA	Ethylène Diamine Tetra Acétate
E.O.S.	Extrêmement Sensible à l'Oxygène
H.R.T. ou T.S.H.	Temps de Séjour Hydraulique
I.E.P.	Point Isoélectrique
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide Lipotéichoïque
M.V.	Matières Volatiles
M.V.A	Matières Volatiles Adsorbées
M.V.E.S.	Matières Volatiles en Suspension
O.H.P.A.	Acétogènes Productrices Obligées d'Hydrogène
PS	Polystyrène
PVC	Chlorure de Polyvinyle
SPS	Polystyrène Sulfoné
S.R.T.	Temps de Rétention des Solides
X.P.S.	Spectroscopie de Photoélectrons X

SOMMAIRE

INTRODUCTION	-1-
GENERALITES	-3-
1. FERMENTATION METHANIQUE	-3-
1.1. Rappels historiques de la méthanisation	-3-
1.2. Définition de la méthanogénèse	-3-
1.3. Aspects biologiques et biochimiques de la fermentation méthanique	-4-
1.3.1. Les trois étapes de la méthanisation	-4-
1.3.1.1. Hydrolyse et fermentation des polymères	-4-
1.3.1.2. Acétogénèse des acides organiques et de l'éthanol	-6-
1.3.1.3. Méthanogénèse	-8-
1.3.1.3.1. Microbiologie	-8-
1.3.1.3.2. Métabolisme et cinétique	-9-
1.3.1.3.2.1. Coenzymes spécifiques et synthèse du méthane	-9-
1.3.1.3.2.1.1. Méthanogénèse à partir d'H ₂ -CO ₂	-10-
1.3.1.3.2.1.2. Méthanogénèse à partir de composés méthylés	-10-
1.3.1.3.2.2. Croissance	-11-
1.3.2. Transfert interspécifique d'hydrogène	-13-
1.3.3. Conclusion	-14-
2. DIFFERENTS PROCEDES DE METHANISATION	-14-
2.1. Différentes configurations de réacteurs	-15-
2.1.1. Réacteurs à culture libre	-15-
2.1.1.1. Procédé contact	-15-
2.1.1.2. Réacteurs à lit de boues	-16-
2.1.2. Réacteurs à film fixé	-16-
2.1.2.1. Filtre anaérobie	-16-
2.1.2.2. Lit fluidisé	-17-
2.2. Influence de différents paramètres sur la conduite et les performances de la fermentation	-18-
2.2.1. Caractéristiques et implication du support	-18-
2.2.2. Importance de l'ensemencement des digesteurs	-19-
2.2.3. Influence de la composition de l'effluent sur la présence des populations bactériennes	-20-
2.2.4. Effet de paramètres environnementaux sur la production de méthane	-22-
2.2.4.1. Potentiel redox	-22-
2.2.4.2. pH	-22-
2.2.4.3. Température	-23-
2.2.4.4. Composés toxiques	-24-
2.2.5. Surcharges	-25-
2.2.5.1. Surcharge hydraulique	-25-
2.2.5.2. Surcharge massique	-25-
3. FORMATION DU BIOFILM	-26-
3.1. Adhésion initiale	-27-
3.1.1. Les interactions agissant à longue distance	-28-
3.1.2. Les interactions agissant à courte distance	-29-
3.1.3. Intervention des polymères dans l'adhésion initiale	-31-
3.2. Colonisation de la surface	-33-
3.3. Cas des populations méthanogènes	-35-
3.3.1. Ultrastructure des granules et des biofilms méthanogènes	-35-
3.3.1.1. Granules	-36-

3.3.1.2. Biofilms	-37-
4. CONCLUSION	-38-
MATERIELS ET METHODES	-39-
1. SOUCHES BACTERIENNES ET MILIEU DE CULTURE	-39-
1.1. Souches bactériennes	-39-
1.2. Conditions de culture	-39-
1.2.1. Milieu de culture	-39-
1.2.2. Inoculum et incubation	-39-
2. MATERIAUX ET TRAITEMENT DE SURFACE	-39-
2.1. Choix des matériaux	-39-
2.2. Protocole de nettoyage	-40-
2.3. Oxydation sulfurique	-41-
2.4. Traitement aux polyélectrolytes	-41-
2.5. Traitement aux cations trivalents	-41-
2.5.1. Protocole de traitement	-41-
2.5.2. Dosage des ions ferriques adsorbés	-41-
3. CARACTERISATION DES SURFACES	-42-
3.1. Surfaces bactériennes	-42-
3.1.1. Détermination de l'hydrophobicité	-42-
3.1.1.1. Test d'adhésion à l'interface eau-hydrocarbure	-42-
3.1.1.2. Mesure de l'angle de contact de l'eau sur tapis bactérien	-43-
3.1.1.3. Détermination des énergies de surface des bactéries	-43-
3.1.2. Mesure de la mobilité électrophorétique	-44-
3.1.3. Déterminations de la composition des surfaces bactériennes par X.P.S.	-44-
3.2. Supports solides	-45-
3.2.1. Détermination de l'hydrophobicité	-45-
3.2.1.1. Mesure des angles de contact	-45-
3.2.1.2. Mesure des énergies de surface	-45-
3.2.2. Mesure de la rugosité	-46-
4. TEST D'ADHESION DE CULTURES PURES	-46-
4.1. Quantification de l'adhésion	-46-
4.2. Numération des suspensions bactériennes	-47-
5. EFFETS DE TRAITEMENTS CELLULAIRES SUR L'HYDROPHOBICITE ET L'ADHESION BACTERIENNE	-47-
5.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	-48-
5.1.1. Traitement au lysozyme	-48-
5.1.2. Adhésion en présence de LTA exogène	-48-
5.2. <i>Desulfovibrio</i> sp., G11	-48-
5.2.1. Extraction des LPS	-48-
5.2.2. Adhésion en présence de LPS exogène	-49-
6. ADHESION DE POPULATIONS MIXTES AU PVC	-49-
7. ANALYSE STATISTIQUE	-50-

RESULTATS

	-51-
1. CARACTERISATION DES SURFACES	-51-
1.1. Surfaces bactériennes	-51-
1.1.1. Hydrophobicité	-51-
1.1.1.1. Test de partition eau-solvant apolaire et angle de contact	-51-
1.1.1.2. Energies de surface des bactéries	-53-
1.1.2. Mobilité électrophorétique	-54-
1.1.3. Composition élémentaire des surfaces bactériennes	-56-
1.1.3.1. Composition des surfaces bactériennes déterminée en XPS	-56-
1.1.3.2. Relation entre la composition de surface et les paramètres physico-chimiques	-59-
1.1.3.3. Discussion	-60-
1.1.3.3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	-61-
1.1.3.3.2. <i>Propionibacterium jensenii</i>	-62-
1.1.3.3.3. <i>Desulfovibrio</i> sp.	-62-
1.1.3.3.4. <i>Methanospirillum hungatei</i>	-63-
1.1.3.3.5. <i>Methanothrix soehngenii</i>	-64-
1.1.3.3.6. <i>Methanobrevibacter arboriphilicus</i>	-65-
1.2. Supports solides	-65-
1.2.1. Rugosité	-65-
1.2.2. Composition de surface déterminée par XPS	-66-
1.2.3. Caractéristiques énergétiques des supports non traités	-67-
1.2.4. Effets de traitements chimiques sur l'hydrophobicité des solides	-68-
1.2.4.1. Oxydation sulfurique	-69-
1.2.4.2. Effet des cations polyvalents sur les propriétés de surface	-69-
1.2.4.2.1. Traitement ferrique	-69-
1.2.4.2.1.1. Dosage du fer	-69-
1.2.4.2.1.2. Hydrophobicité relative des supports traités	-70-
1.2.4.2.2. Effet d'un polyélectrolyte cationique	-71-
2. ADHESION DE CULTURES PURES	-71-
2.1. Interventions des interactions physico-chimiques non spécifiques	-71-
2.1.1. Adhésion des bactéries aux supports non traités	-71-
2.1.2. Effet du prétraitement du PVC à la poly-L-Lysine	-72-
2.1.3. Adhésion bactérienne aux supports oxydés	-73-
2.1.4. Traitement au chlorure de fer	-74-
2.1.5. Corrélacion adhésion-propriétés physico-chimiques des surfaces	-74-
2.1.5.1. Adhésion-énergie de surface des solides	-74-
2.1.5.2. Adhésion-caractéristiques des surfaces bactériennes	-75-
2.1.5.2.1. Adhésion-énergie de surface des bactéries	-75-
2.1.5.2.2. Adhésion-charge des bactéries	-75-
2.1.5.3. Calcul de l'énergie libre d'adhésion de Gibbs	-76-
2.2. Intervention des polymères caractéristiques des surfaces bactériennes	-78-
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	-79-
2.2.1.1. Traitement des cellules de <i>Lactobacillus plantarum</i> au lysozyme	-79-
2.2.1.2. Test d'adhésion en présence de LTA exogène	-80-
2.2.2. <i>Desulfovibrio</i> sp., G11	-81-
2.2.2.1. Extraction du LPS de <i>Desulfovibrio</i>	-81-
2.2.2.1.1. Traitement des cellules bactériennes à l'EDTA	-81-

2.2.2.1.1.1. Effet du traitement sur l'hydrophobicité de <i>Desulfovibrio</i> sp.	-81-
2.2.2.1.1.2. Influence du traitement dans l'adhésion bactérienne au PVC	-82-
2.2.2.2. Incubation des cellules traitées à l'EDTA en présence de LPS exogène	-83-
2.2.2.2.1. Effet du LPS exogène sur l'hydrophobicité bactérienne	-83-
2.2.2.2.2. Intervention dans l'adhésion	-84-
2.2.2.3. Incubation simultanée du LPS exogène et des cellules non traitées	-85-
3. ADHESION DE POPULATIONS MIXTES AU PVC	-85-
3.1. Couple <i>Methanospirillum-Desulfovibrio</i>	-85-
3.1.1. Effet de l'attachement simultané sur l'adhésion des espèces individuelles	-85-
3.1.2. Effet de l'attachement séquentiel sur l'adhésion des espèces individuelles	-86-
3.2. Couple <i>Methanospirillum-Methanobrevibacter</i>	-87-
3.2.1. Attachement simultané	-87-
3.2.2. Attachement séquentiel	-88-
3.3. Discussion	-88-
CONCLUSION GENERALE	-92-
ANNEXES	-96-
BIBLIOGRAPHIE	-104-

INTRODUCTION

Bien que le traitement d'effluents par fermentation anaérobie ait subi un essor considérable depuis quelques années, les mécanismes impliqués dans la formation du biofilm sont encore mal connus. On comprend ainsi que dans le traitement d'effluents dilués, la période de démarrage des installations industrielles de méthanisation soit 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 acétogènes et méthanogènes dont les temps de doublement sont supérieurs à dix jours 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 que poursuivent les procédés de traitement anaérobie des eaux résiduaires. L'option la plus séduisante est la fixation des bactéries sur des supports inertes, elle permet une rétention optimale de la biomasse qui est fonction de la nature et de la composition du support.

Bien que la connaissance de l'ultrastructure (ROBINSON et *al.*, 1984), de la composition et des activités métaboliques des boues granuleuses (DUBOURGUIER et *al.*, 1988) 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 à d'autres organismes est un phénomène omniprésent dans de nombreux domaines (*e.g.*, 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 de la composition chimique et des propriétés physiques des surfaces interagissantes. L'approche physico-chimique de l'adhésion bactérienne est couramment basée sur les énergies libres de surface (ABSOLOM et *al.*, 1983; BUSSCHER et *al.*, 1984a) et les potentiels zeta (RUTTER et VINCENT, 1980).

Notre travail portera plus précisément sur l'adhésion de bactéries méthanogènes aux supports d'intérêt technologique en comparaison avec d'autres bactéries anaérobies et d'autres solides.

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 (spectroscopie de photoélectrons X, zétamétrie, analyse d'image, microscopie électronique, ...).

Avant de décrire les résultats de nos recherches, nous rappellerons les connaissances acquises dans les domaines de la méthanisation et de l'adhésion bactérienne en général. En dernier lieu, nous procéderons à une conclusion générale.

Une partie de nos travaux a fait l'objet du poster suivant, présenté en ANNEXE VI.

Poster:

F. FREGARD, G. ALBAGNAC and C. VERNIN.

Influence of Electrostatic and Hydrophobic Interactions on Initial Adhesion of Anaerobic Bacteria.

- BIOADHESION, GRONINGEN, Netherlands, November 6-9, 1990.

GENERALITES

1 . FERMENTATION METHANIQUE

1.1 Rappels historiques de la méthanisation

En 1776, Volta, observant le dégagement de gaz inflammables à la surface de marais, établissait pour la première fois une relation entre ce phénomène et la présence de matières organiques en décomposition. Ce n'est cependant qu'un siècle plus tard que BECHAMP (1868), attribua l'origine de ce "gaz des marais" à l'activité microbienne.

La première installation produisant du méthane, située à EXETER en Grande-Bretagne, date de 1895; le gaz produit servait à l'éclairage des rues de la ville. Les développements modernes de la méthanisation sont issus des travaux d'IMHOFF (1940-1941) sur des boues urbaines et des travaux de DUCELLIER sur les rejets d'élevage.

En Allemagne, l'utilisation du méthane provenant de la digestion des boues de stations d'épuration date de 1921. De 1921 à 1931, la récupération du gaz a été pratiquée dans 48 stations d'épuration représentant une capacité totale de 4,6 millions d'équivalents habitant. En 1938, la production totale de gaz sur 53 stations urbaines était d'environ 18 millions de m³. Par ailleurs, les travaux de DUCELLIER sur les rejets d'élevage sont toujours utilisés actuellement.

La méthanisation n'est donc pas une technique nouvelle; mais les applications réalisées jusqu'en 1950 ont été longtemps délaissées jusqu'à ce que l'augmentation du coût des énergies fossiles leur fasse bénéficier d'un regain d'intérêt.

1.2 Définition de la méthanogénèse

Le terme de méthanogénèse décrit un phénomène biologique complexe de dégradation de la matière organique ayant, dans des conditions d'anaérobiose stricte, le méthane et le gaz carbonique comme métabolites finaux.

Ce phénomène se produit naturellement dans des écosystèmes variés (sources chaudes, rumen, sédiments pauvres en sulfates) qui diffèrent essentiellement par les voies empruntées par le flux carbone (Figure 1).

Le bilan global de la réaction de méthanisation peut s'écrire:

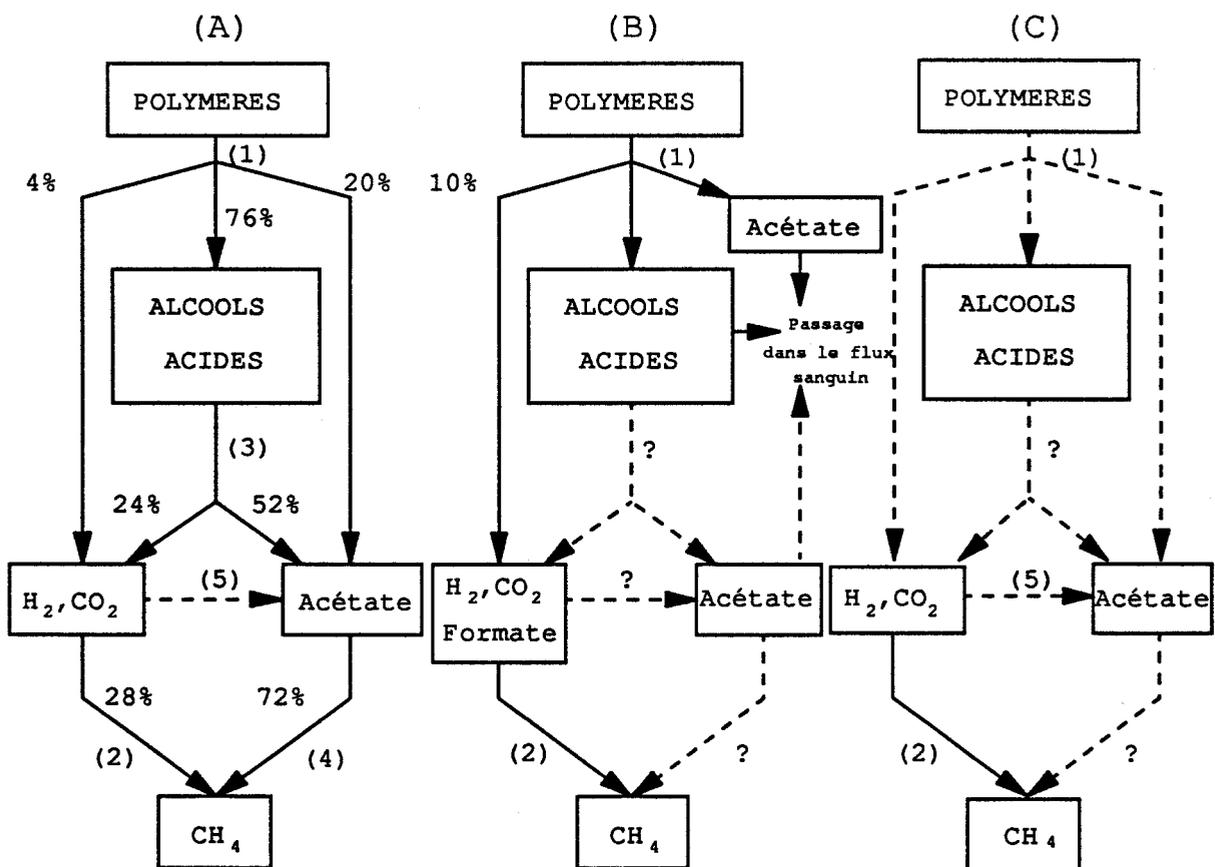


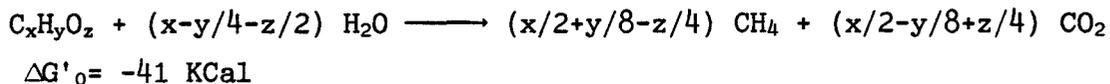
Figure 1. Flux carbone dans les écosystèmes anaérobies
(d'après ZEHNDER et al., 1982)

(A), Digesteurs, sédiments pauvres en sulfates

(B), Rumen, caecum

(C), Ecosystèmes des sources chaudes (65-75°C)

- (1) Bactéries hydrolytiques et fermentatives
- (2) Méthanogènes hydrogénophiles
- (3) Acétogènes productrices obligées d'hydrogène
- (4) Méthanogènes acétoclastes
- (5) Homoacétogènes



Une population microbienne très diversifiée est nécessaire pour couvrir l'ensemble du processus. On la subdivise généralement en trois groupes trophiques (bactéries hydrolytiques et acidogènes, bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène et bactéries méthanogènes) associés aux trois principales étapes de la dégradation du substrat.

1.3 Aspects biologiques et biochimiques de la fermentation méthanique

La fermentation méthanique nécessite la participation de trois groupes trophiques de bactéries anaérobies qui transforment, dans des conditions précises de température (35°C en mésophilie, 55 à 60°C en thermophilie), de pH (voisin de la neutralité), de potentiel rédox (inférieur à -350 mV), la matière organique complexe en méthane et gaz carbonique (Figure 1):

- les bactéries fermentatives hydrolysent les polymères en mono et oligomères par des enzymes extracellulaires. Les produits solubles sont alors adsorbés et fermentés par ces bactéries, conduisant à la formation de composés intermédiaires (lactate, éthanol, propionate, butyrate, ammoniac, acétate et CO₂ et H₂).

- ces acides, à l'exception de l'acétate, et ces produits neutres sont ensuite oxydés par des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (bactéries O.H.P.A) en acétate et H₂ et CO₂.

- enfin, les bactéries méthanogènes utilisent l'acétate et l'H₂ produits précédemment et forment le méthane.

1.3.1 Les 3 étapes de la méthanisation

1.3.1.1 Hydrolyse et fermentation des polymères

Dans les écosystèmes anaérobies, la matière organique complexe, composée de macromolécules (polysaccharides, protéines, composés lipidiques) est dépolymérisée et ainsi solubilisée sous l'effet d'enzymes exocellulaires

Tableau I. Comparaison des substrats fermentés et des produits formés par les principales bactéries hydrolytiques anaérobies mésophiles et thermophiles, (d'après Le Ruyet, 1984)

		MICROORGANISMES MESOPHILES							MICROORGANISMES THERMOPHILES																				
CELLULOSE	XYLANE	AMIDON	PECTINE	DEXTRINE	CELULOSE	GLUCOSE	XYLOSE	ARABINOSE	BIOTOPE	MICROORGANISMES MESOPHILES							MICROORGANISMES THERMOPHILES												
										FORMATE	ACETATE	PROPIONATE	BUTYRATE	LACTATE	SUCCINATE	ETHANOL	H ₂	CO ₂	FORMATE	ACETATE	PROPIONATE	BUTYRATE	LACTATE	SUCCINATE	ETHANOL	H ₂	CO ₂		
+	-	+	+	+	+	+	-	-	rumen	<i>Bacteroides succinogenes</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	-	-	+	+	+	-	-	"	<i>Ruminococcus flavifaciens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+	-	"	<i>abus</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	"	<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	"	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	"	<i>Clostridium lachnospiraceae</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	"	<i>longisporum</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	"	<i>cellobioparum</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	sédiments	<i>papyrosolvens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	digesteurs	<i>Aceivibrio cellulyticus</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	-	-	rumen	<i>Succinomonas amylolytica</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	"	<i>Lachnospira multiparus</i>	++	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	"	<i>Butyrivibrio alactacidigenus</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	"	<i>Bacteroides rumenicola</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	"	<i>Selenomonas ruminantium</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	"	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	"	<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	"	<i>Streptococcus bovis</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	digesteurs	MICROORGANISMES THERMOPHILES							MICROORGANISMES THERMOPHILES												
+	-	-	-	-	-	-	-	-	compostes	<i>Clostridium thermoacellum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	compostes	<i>thermoacellum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	compostes	<i>stercorarium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	+	+	+	+	+	+	+	+	compostes	<i>thermosulfurogenus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Substrats fermentés (+), non fermentés (-), fermentés par quelques souches (+), par la majorité des souches (±).

(cellulases, protéases, ...) de bactéries hydrolytiques, mésophiles ou thermophiles, anaérobies strictes ou facultatives. Les métabolites formés sont des acides organiques (lactate, succinate, acides gras volatiles), des composés neutres (éthanol) et des gaz (CO₂, H₂).

Il est évident que la nature du substrat ainsi que la température déterminent, dans une certaine mesure, la présence de tel ou tel type d'organismes (Tableau I). De nombreuses espèces mésophiles et thermophiles ont été isolées, comme dans le rumen où les acides gras volatiles (A.G.V) sont les produits primaires de la fermentation des polysaccharides (ZINDER, 1984a). Dans les méthaniseurs traitant des glucides facilement fermentescibles, les A.G.V sont principalement produits à partir du lactate (URRIBELARREA et PAREILLEUX, 1981).

Durant l'hydrolyse et la fermentation, deux interactions bactériennes principales se produisent rendant ce processus plus complexe en cultures mixtes:

- La première conduit à un déplacement de la fermentation du sucre à une production exclusive d'acétate par transfert d'hydrogène interspèces aux méthanogènes ou acétogènes.

- La seconde est due à la complémentarité des activités entre bactéries hydrolytiques et fermentatives, cette interaction conduisant, dans des cultures en batch, à une augmentation des rendements de dégradation des hydrates de carbone complexes.

L'association entre *Clostridium thermocellum* et *Methanobacterium thermoautotrophicum* ou *Clostridium thermocellum* et *Acetogenium kivui* démontre le rôle du transfert d'hydrogène interspèces. Cette interaction ne modifie pas le rendement de dégradation mais augmente le gain d'énergie (ATP) de *Clostridium thermocellum* par changement en production d'acétate, l'éthanol n'étant plus produit. Ce déplacement métabolique joue un rôle important dans les réacteurs à une génération. De plus, il serait hasardeux de corréler les activités métaboliques des cultures pures à celles des populations mélangées.

La synergie entre les espèces hydrolytiques et fermentatives est illustrée par des cocultures de *Clostridium thermocellum* et de *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Ce dernier organisme augmente le rendement de la conversion de la cellulose en éthanol en utilisant les sucres produits par les cellulases de *Clostridium thermocellum*.

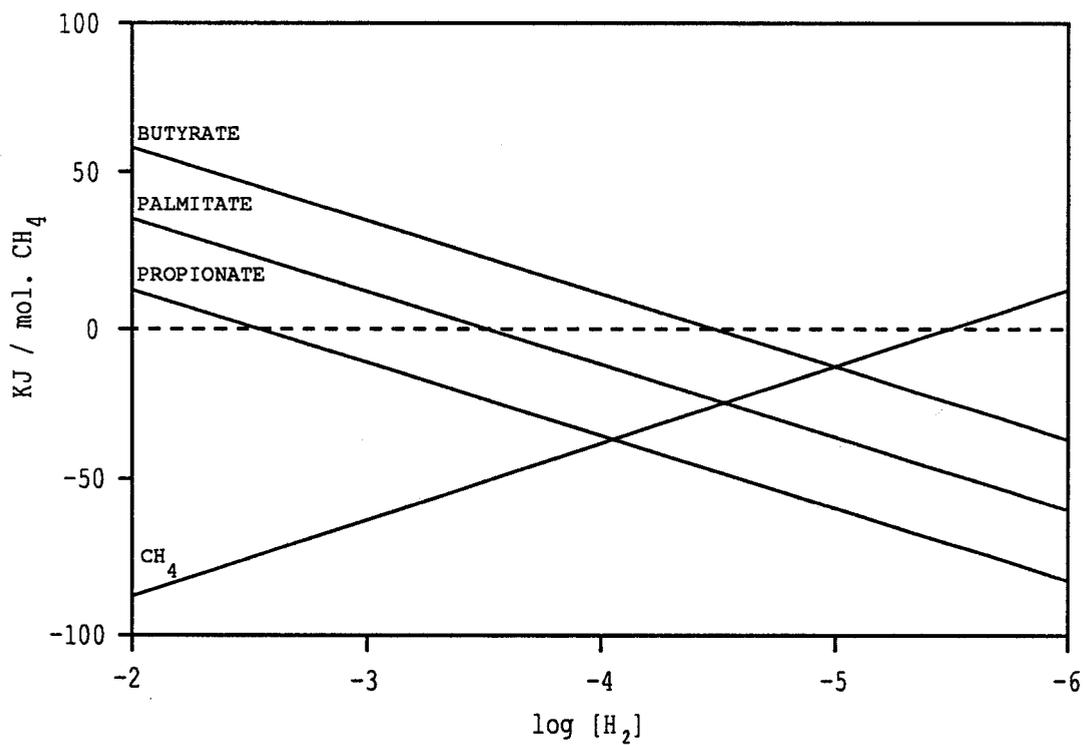


Figure 2. Influence de la pression partielle en hydrogène sur la variation d'énergie libre des réactions acétogènes à partir de butyrate, palmitate et propionate.

1.3.1.2 Acétogénèse des acides organiques et de l'éthanol

L'acétogénèse des acides gras volatiles (A.G.V) et des composés réduits comme le lactate ou l'éthanol est une étape clé de la méthanisation. L'acétogénèse est due à l'action de bactéries spécialisées que sont les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (O.H.P.A).

Tableau II. Thermodynamique des réactions de l'acétogénèse
(d'après THAUER et *al.*, 1977)

		Energie libre (kJ/réaction)	
		$\Delta G'^{\circ}$	$\Delta G' \text{ (a)}$
Lactate + 2 H ₂ O	→ Acétate + 2 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	- 4,2	-61,8
Ethanol + H ₂ O	→ Acétate + 2 H ₂ + H ⁺	+ 9,6	-37,9
Butyrate + 2H ₂ O	→ 2 Acétate + 2H ₂ + H ⁺	+ 48,1	-17,4
Propionate + 3 H ₂ O	→ Acétate + 3 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	+ 76,1	-5,4
Palmitate + 14 H ₂ O	→ 8 Acétate + 14 H ₂ + 7 H ⁺	+ 390,7	-66,7
Benzoate + 7 H ₂ O	→ 3 Acétate + 3 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	+ 89,7	-15,7

(a) $\Delta G'$ est calculé à 37°C, pH 7 grâce à l'équation de Nernst:

$$\Delta G' = \Delta G'^{\circ} + 5,94 \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \text{ pour } aA + bB \longrightarrow cC + dD$$

Les concentrations en produits et en réactants choisies sont:
benzoate: 10 µM; acétate, lactate, éthanol, butyrate, propionate, palmitate: 1 mM; HCO₃⁻: 20 mM; CH₄: 0,6 atm; H₂: 10⁻⁴ atm.

Les calculs thermodynamiques (Tableau II) montrent clairement que sous des conditions standards, la plupart de ces réactions, c'est-à-dire déshydrogénation du lactate, de l'éthanol et des A.G.V, sont endergoniques mais qu'elles deviennent favorables quand la pression partielle en hydrogène reste faible (de l'ordre de 10⁻⁴ atm). La figure 2 illustre la relation entre la pression partielle en hydrogène et l'énergie disponible pour les acétogènes et les méthanogènes hydrogénophiles. Dans les digesteurs, l'acétogénèse est obligatoirement associée à la production de méthane par réduction du CO₂. D'après les valeurs d'énergie libre sous des conditions standards, le propionate est l'A.G.V le plus difficile à cataboliser en méthane et il nécessite une

gamme étroite de pression partielle en hydrogène. De plus, la très faible quantité d'énergie disponible pour les organismes induit une croissance très faible de la culture mixte. Ceci a été confirmé par les données cinétiques de fonctionnement des digesteurs ou par des expériences avec des cultures d'enrichissement (BOONE et XUN, 1987).

Microbiologie

On peut distinguer deux types de bactéries O.H.P.A:

a. Celles qui peuvent se développer en culture pure mais dont la croissance sur certains substrats ou en absence d'accepteur exogène d'électrons n'est possible qu'en association avec une bactérie utilisatrice d' H_2 . C'est le cas des bactéries suivantes:

- l'organisme "S" qui fermente, en culture pure, le pyruvate en acétate et éthanol mais qui ne dégrade l'éthanol qu'en association syntrophique avec une méthanogène.

- les bactéries sulfatoréductrices possédant une hydrogénase, qui dégradent en coculture avec des méthanogènes hydrogénophiles le lactate et l'éthanol en acétate et méthane alors qu'elles n'utilisent ces composés qu'en présence de sulfate en culture pure (BRYANT et al., 1977). Des bactéries sulfatoréductrices, *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio sapovorans*, capables de produire de l'acétate à partir de propionate ou d'A.G.V plus longs, ont été isolées dans des digesteurs anaérobies (NANNINGA et GOTTSCHALL, 1987). Cependant, elles ne poussent qu'avec du sulfate comme accepteur final d'électrons et, dans les boues anaérobies, l'oxydation des A.G.V est principalement réalisée par les bactéries O.H.P.A.

b. Le second type de bactéries O.H.P.A comprend tous les organismes qui ne peuvent utiliser que les protons comme uniques accepteurs d'électrons et dont la croissance, quelque soit le substrat, n'est possible que lorsque la pression partielle d' H_2 est maintenue à un faible niveau. Ces organismes ne peuvent être isolés qu'en association syntrophique avec une bactérie utilisatrice d' H_2 :

- *Syntrophomonas wolfei* oxydant le butyrate (Mc INERNEY et al., 1981).

- *Syntrophomonas sapovorans* (ROY et al., 1986) et *Clostridium bryantii* (STIEB et SCHINCK, 1985), qui dégradent les A.G.V à longue chaîne.

- le genre *Pelobacter*, capable de cataboliser l'éthanol en acétate au sein d'une coculture.

Toutes les bactéries O.H.P.A sont des anaérobies strictes, extrêmement sensibles à l'oxygène. Leur temps de doublement est parfois très long (de 50 à 160 heures). Ainsi, l'acétogénèse à partir d'A.G.V est une étape particulièrement délicate de la fermentation méthanique. Elle peut même devenir limitante quand de grandes quantités de propionate sont produites par les bactéries fermentatives.

Finalement, l'acétate qui est le principal intermédiaire de la méthanogénèse dans les digesteurs est synthétisé selon deux principales voies métaboliques: co-production à partir de matières organiques avec des composés réduits (bactéries hydrolytiques et fermentatives) et homoacétogénèse avec production obligée d'hydrogène.

1.3.1.3 Méthanogénèse

Les réactions terminales au sein des réacteurs anaérobies, sont réalisées par les bactéries méthanogènes. Ces organismes jouent un rôle pivot puisqu'ils contrôlent l'ensemble du processus et qu'ils dirigent le flux de carbone et d'électrons en éliminant les intermédiaires inhibiteurs (H_2 et acétate).

1.3.1.3.1 Microbiologie

Les bactéries méthanogènes constituent un groupe bactérien très hétérogène dont les représentants possèdent un métabolisme énergétique obligatoirement lié à la réduction en méthane d'un nombre limité de substrats carbonés; en effet, le processus de croissance microbienne est endergonique et les besoins énergétiques des micro-organismes sont assurés par des réactions biochimiques d'oxydoréduction. Alors qu'en aérobiose les réactions de réduction aboutissent à faire réagir des équivalents réducteurs avec l'oxygène de l'air et ont pour résultat la production d'eau, en absence d'oxygène, les équivalents réducteurs sont transférés dans une molécule gazeuse, le méthane.

WOESE et FOX, (1977), ont souligné la position phylogénique tout à fait particulière des méthanogènes sur la base de séquences oligonucléotidiques de l'ARN ribosomal 16 S. Avec les bactéries halophiles et thermophiles, elles constituent la lignée des Archaeobactéries. Très schématiquement, une cellule

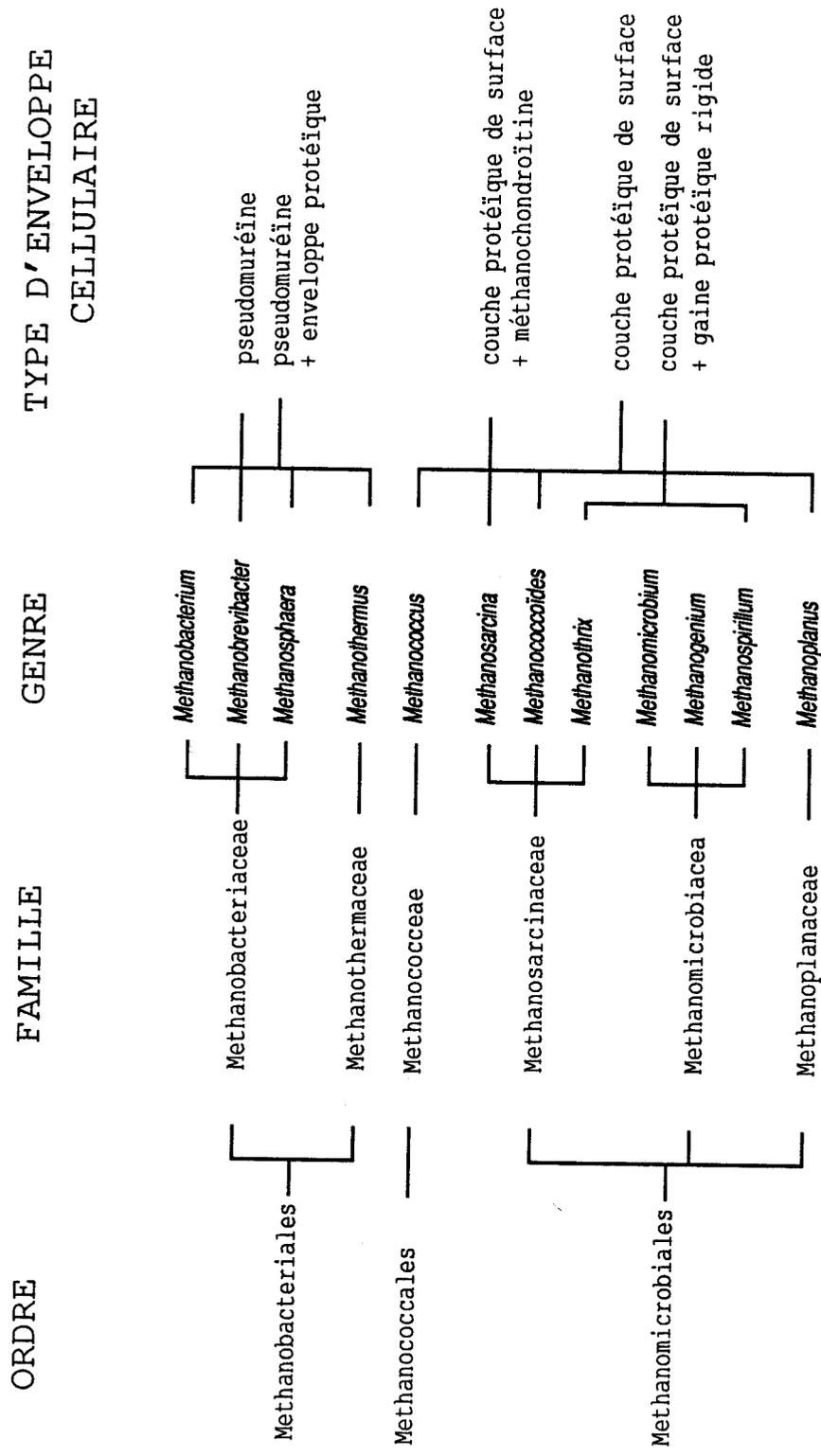


Figure 3. Relations entre les genres de méthano-gènes et les types d'enveloppes cellulaires (d'après KANDLER et KONIG, 1985)

d'Archaeobactérie présente des caractéristiques communes aux cellules eucaryotes et eubactériennes, ces trois lignées s'étant différenciées à partir d'un ancêtre commun: le Progénote.

Les méthanogènes sont classées selon les critères taxonomiques classiques complétés par la détermination des conditions optimales de croissance et du pourcentage de cytosine et guanine (G+C %) de l'ADN (Figure 3). Compte tenu du nombre limité de substrats utilisés et de la faible signification de la coloration de Gram, il est hautement recommandé de faire appel à des méthodes complémentaires qui incluent: l'ultrastructure, les propriétés sérologiques, l'analyse des lipides membranaires, l'électrophorèse des protéines cellulaires totales, l'hybridation et le séquençage des acides nucléiques.

- Caractéristiques cellulaires

Les bactéries méthanogènes présentent les caractéristiques suivantes:

* Leur paroi est dépourvue de peptidoglycane et d'acide muramique ce qui leur confère une résistance naturelle aux antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Cette paroi présente une très grande variété de structure et de composition chimique (Figure 3).

* Les lipides membranaires se distinguent par l'absence de liaison ester avec le glycérol et une prédominance de lipides insaponifiables (LANGWORTHY et *al.*, 1982).

* Les méthanogènes contiennent plusieurs coenzymes spécifiques le plus souvent impliqués dans la synthèse du méthane (Cf. paragraphe suivant).

1.3.1.3.2 Métabolisme et cinétique

1.3.1.3.2.1 Coenzymes spécifiques et synthèse du méthane

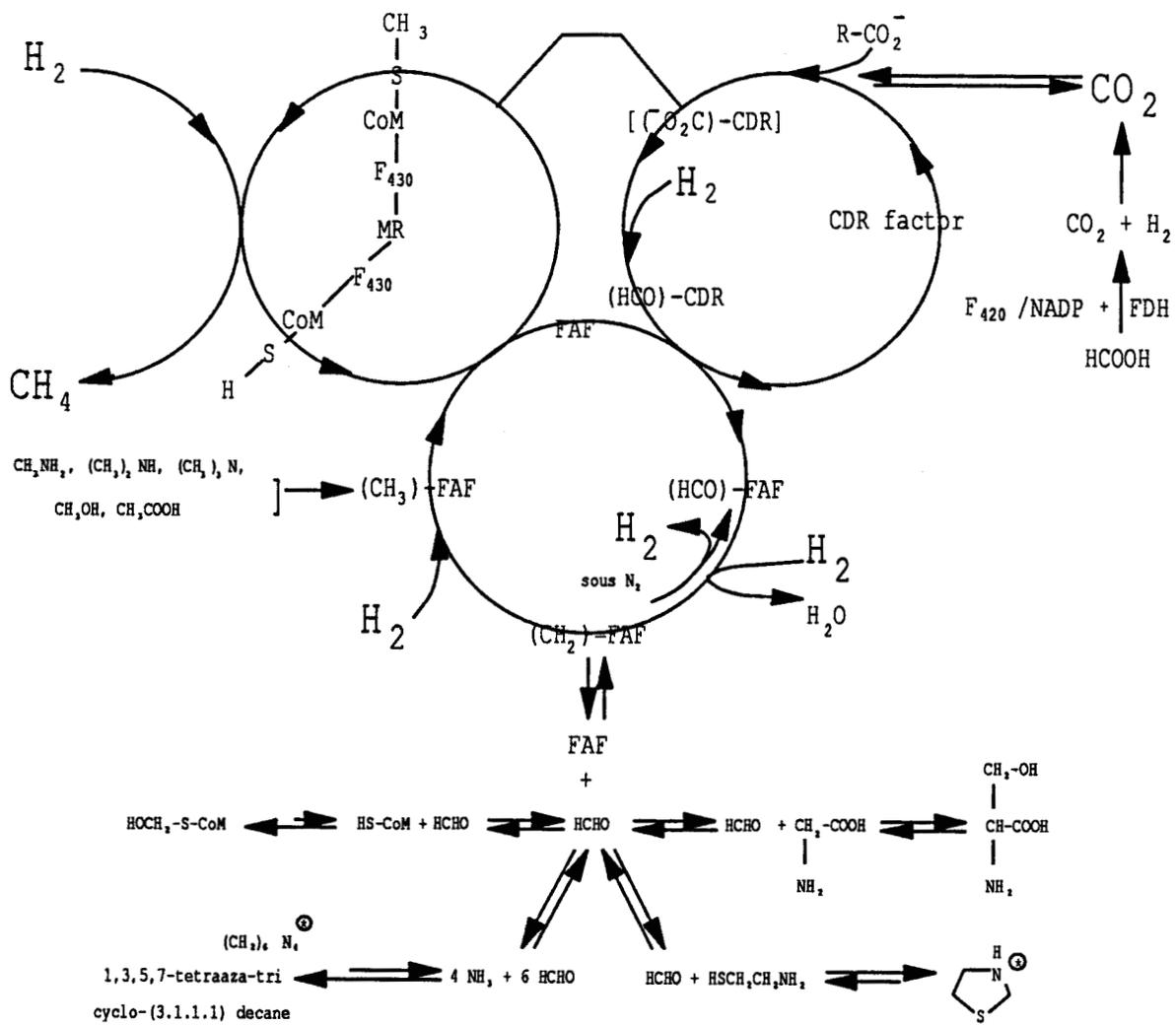
Les coenzymes spécifiques des méthanogènes peuvent être rangés en deux grandes catégories:

- Les transporteurs de groupements monocarbonés

* Le coenzyme M ou acide mercapto-2-éthane sulfonique.

* Le facteur CDR ("Carbon Dioxide Reduction") ou methanofurane.

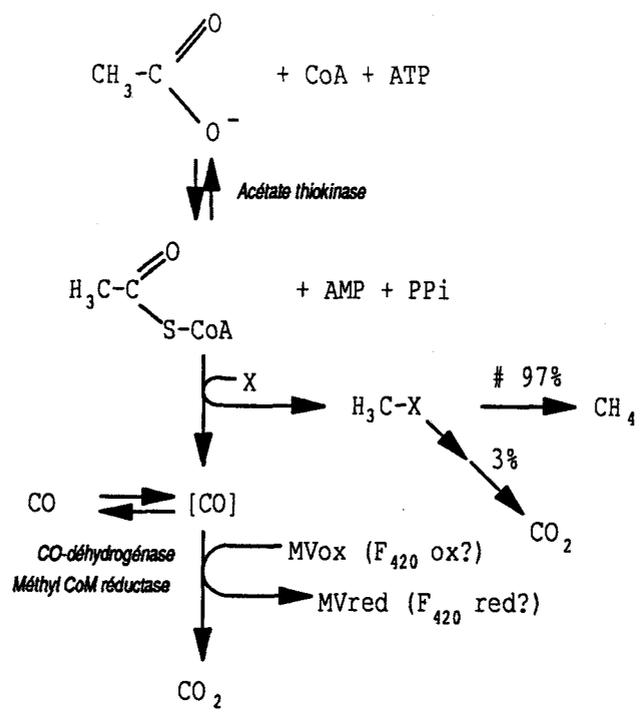
* La méthanoptérine et ses dérivés, *e.g.*, le F.A.F ("Formaldehyde Activating Factor") ou tétraméthanoptérine.



③ NON-PHYSIOLOGICAL

La méthyl-réductase nécessite: $ATP, Mg^{2+}, A_1, A_2, A_3, FAD, B_2, B_{12}, F_{420}$?

Figure 4. Schéma métabolique de la méthanogénèse à partir de H_2 et CO_2
(d'après ESCALANTE-SEMERANA et al., 1984)



MV: Méthylviologène

X: Transporteur de groupements méthyl non identifié

Figure 5. Schéma métabolique de la réaction acéticlastique (d'après KOHLER et ZEHNDER, 1984)

- Les transporteurs d'électrons

* Le F 420 qui est une déazoflavine qui, sous forme oxydée, absorbe à 420 nm et émet une fluorescence caractéristique permettant de repérer spécifiquement les méthanogènes présentes dans une population mixte par microscopie à épifluorescence.

* Le F 430, dérivé tétrahydrogéné de la corphine, contenant du nickel associé au coenzyme M.

Depuis le schéma proposé par BARKER (1956), reposant sur l'existence d'un intermédiaire méthylé, précurseur immédiat du méthane et commun aux voies de production à partir de H_2/CO_2 , du méthanol et de l'acétate, on ne connaît actuellement que le mécanisme de réduction du CO_2 en méthane.

1.3.1.3.2.1.1 Méthanogénèse à partir d' H_2-CO_2

Le CO_2 est tout d'abord fixé au CDR, puis réduit. Le groupement formyl résultant est transporté par le FAF et subit deux réductions successives qui l'amènent au stade méthyl (Figure 4).

La dernière étape consiste en une transméthylation avec du HS-Coenzyme M conduisant au méthyl-CoM qui subit une diméthylation réductive sous l'action du système méthyl-CoM réductase. Il s'agit d'un complexe multienzymatique qui a été fractionné en trois sous-unités (GUNSALUS et WOLFE, 1980), le composant A constitué de trois unités et de FAD qui contient une hydrogénase dépendante du F 420; le composant B de faible poids moléculaire dont le rôle est inconnu et le composant C, identifié à la méthyl-CoM réductase contenant deux moles de F 430.

1.3.1.3.2.1.2 Méthanogénèse à partir de composés méthylés

Elle implique un rôle essentiel d'enzymes à corrinoïdes mais les différentes étapes métaboliques restent inconnues (VOGELS et *al.*, 1984). Le groupement méthyl est transféré presque intégralement dans le méthane, le groupement carboxyl étant converti en CO_2 (Figure 5). L'acétate est supposé entrer dans le cycle décrit par ESCALANTE et *al.*, (1984), au niveau de la fonction du CH_3 -FAF, mais on ne dispose actuellement d'aucun renseignement concernant les étapes intermédiaires.

Dans les fermenteurs, le méthane généré provient pour 70% de la décarboxylation de l'acétate et pour 30% de la réduction du CO₂ par l'H₂.

1.3.1.3.2.2 Croissance

D'un point de vue métabolique, on distingue deux types bien distincts de méthanogènes (Tableau III).

Tableau III. Substrats de croissance des bactéries méthanogènes
(d'après BALCH et al., 1979)

Souches bactériennes		Substrats de croissance
<i>Methanobacterium</i>	<i>formicicum</i>	H ₂ , formate
	<i>bryantii</i>	H ₂
	<i>thermoautotrophicum</i>	H ₂
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>ruminatum</i>	H ₂ , formate
	<i>arboriphilicus</i>	H ₂
	<i>smithii</i>	H ₂ , formate
<i>Methanococcus</i>	<i>vannielli</i>	H ₂ , formate
	<i>voltae</i>	H ₂ , formate
<i>Methanomicrobium</i>	<i>cariaci</i>	H ₂ , formate
	<i>marisnigri</i>	H ₂ , formate
<i>Methanospirillum</i>	<i>hungatei</i>	H ₂ , formate
<i>Methanosarcina</i>	<i>barkeri</i>	H ₂ , méthanol, méthylamines, acétate
	<i>mazei</i>	Acétate, méthanol
	<i>thermophila</i>	Acétate, méthanol
<i>Methanotherix</i>	<i>soehngenii</i>	Acétate

- Les acétoclastes qui clivent l'acétate sont hétérotrophes et poussent sur un nombre limité de substrats à un ou deux atomes de carbone: méthanol, méthylamines, acétate.

- Les hydrogénophiles sont autotrophes et forment du méthane par réduction du CO₂ avec l'H₂ comme source d'électrons. Certaines hydrogénophiles utilisent également l'acide formique.

Leurs propriétés cinétiques respectives sont partiellement dues aux changements d'énergie libre différents des réactions de méthanogénèse (Tableau IV).

Tableau IV. Paramètres cinétiques des bactéries méthanogènes

Espèces	Temps de doublement (h)	K _s (μM) ^(a)	Substrat
<i>M. arboriphilicus</i> ⁽¹⁾	5-17	7	H ₂ /CO ₂
<i>M. barkeri</i> ⁽²⁾	11-14	13	H ₂ /CO ₂
<i>M. thermoautotrophicum</i> ⁽³⁾	1-3	80	H ₂ /CO ₂
<i>M. thermoformicicum</i> ⁽⁴⁾	1-2	9000	Formate
<i>M. mazei</i> MC ₃ ⁽⁵⁾	35	1500	Acétate
<i>M. soehngenii</i> ⁽⁶⁾	50-80	500	Acétate
<i>M. thermophila</i> CHTI ₅ ⁽⁷⁾	8-15	5000-9000	Acétate
<i>M. hungatei</i> JF ₁ ⁽²⁾	13-17	5,8-7,3	H ₂ /CO ₂
⁽⁸⁾	9	2-3	Formate

(a) K_s: constante d'affinité apparente

(1) KRISTJANSON et *al.*, (1982)

(2) ROBINSON et TIEDGE, (1984)

(3) SCHOENHEIT et *al.*, (1982)

(4) TOUZEL et *al.*, (1988)

(5) TOUZEL et ALBAGNAC, (1983)

(6) ZEHNDER et *al.*, (1980)

(7) TOUZEL et *al.*, (1985)

(8) VERDIER, (1989)

Dans des conditions standards, l'énergie libre $\Delta G'_0$ de la décarboxylation de l'acétate est de -28,2 kJ. mole⁻¹ alors que $\Delta G'_0$ de la réduction du CO₂ est de -139,2 kJ. mole⁻¹ (Tableau V). Ainsi, la dernière réaction est plus favorable à la croissance bactérienne.

Tableau V. Energétique des réactions méthanogènes

Réactions	$\Delta G'^\circ$ à pH7 (kJ/CH ₄)
4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2 H ₂ O	- 139,2
4 HCOO ⁻ + 2 H ⁺ → CH ₄ + CO ₂ + 2 HCO ₃ ⁻	- 126,8
HCOO ⁻ + 3 H ₂ + H ⁺ → CH ₄ + 2 H ₂ O	- 134,3
4 CO + 2 H ₂ O → CH ₄ + 3 CO ₂	- 185,1
4 CH ₃ OH → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ O	- 102,5
CH ₃ OH + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O	- 121,1
4 CH ₃ NH ₂ + 2 H ₂ O + 4 H ⁺ → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ ⁺	- 101,6
2 (CH ₃) ₂ NH + 2 H ₂ O + 2 H ⁺ → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 NH ₄ ⁺	- 86,3
4 (CH ₃) ₃ N + 6 H ₂ O + 4 H ⁺ → 9 CH ₄ + 3 CO ₂ + 4 NH ₄ ⁺	- 80,2
2 CH ₃ CH ₂ -N(CH ₃) ₂ + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 CH ₃ CH ₂ NH ₂	- 70,0
CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O → CH ₄ + HCO ₃ ⁻	- 28,2

1.3.2 Transfert interspécifique d'hydrogène

La transformation de l'hydrogène est une réaction biochimique importante, réalisée par des groupes trophiques bactériens pendant la décomposition anaérobie de la matière organique. Les micro-organismes consommant l'hydrogène sont d'une grande importance puisqu'ils maintiennent une faible pression partielle en hydrogène et permettent ainsi le fonctionnement de réactions biologiques qui ne se produiraient pas ou sinon en raison des conditions thermodynamiques défavorables. Les relations syntrophiques entre les utilisatrices d'hydrogène, *e.g.*, les méthanogènes, et les productrices d'hydrogène, *e.g.* les bactéries O.H.P.A, déplacent toute la balance de fermentation d'un substrat primaire vers un meilleur usage de son contenu énergétique (THAUER et *al.*, 1977).

Le terme transfert interespèces d'hydrogène est habituellement utilisé pour des systèmes dans lesquels la présence d'une ou plusieurs espèces consommant l'hydrogène, altère de façon significative le métabolisme d'un organisme fermentatif vers la production de composés plus oxydés.

LOVLEY et KLUG, (1983), ont montré que les bactéries sulfato-réductrices concurrençaient les bactéries méthanogènes en présence de sulfate. L'inhibition apparente de la méthanogénèse par les bactéries sulfato-réductrices a été attribuée à la toxicité des sulfures, à des principes thermodynamiques ou à une compétition cinétique pour les substrats (KRISTJANSSON et *al.*, 1982). Ils ont montré que les bactéries sulfato-réductrices présentaient en général des constantes d'affinité apparente (K_s) pour les substrats (H_2 et acétate) plus faibles que les méthanogènes. Ainsi, ces organismes peuvent exister en coculture en présence d'un excès d'hydrogène et, quand l'hydrogène est limitant, la sulfato-réductrice est capable de concurrencer la méthanogène grâce à son affinité plus forte pour le substrat. Ceci pourrait expliquer pourquoi la formation de méthane est apparemment inhibée par l'activité des bactéries sulfato-réductrices dans des habitats riches en sulfate où les concentrations en H_2 et acétate sont faibles.

RONBINSON et TIEDJE (1984) ont suggéré que les sulfato-réductrices entraînent en compétition avec les méthanogènes pour l'hydrogène limitant à cause d'une plus forte affinité et d'un turn-over pour l'hydrogène.

PHELPS et *al.*, (1985), ont démontré que pendant la croissance d'une coculture de *Methanosarcina barkeri*, *Desulfovibrio vulgaris* diminuait la méthanogénèse à cause du transfert d'hydrogène lié à la réduction du sulfate. Les sulfato-réductrices croissent, via le transfert interespèces d'hydrogène,

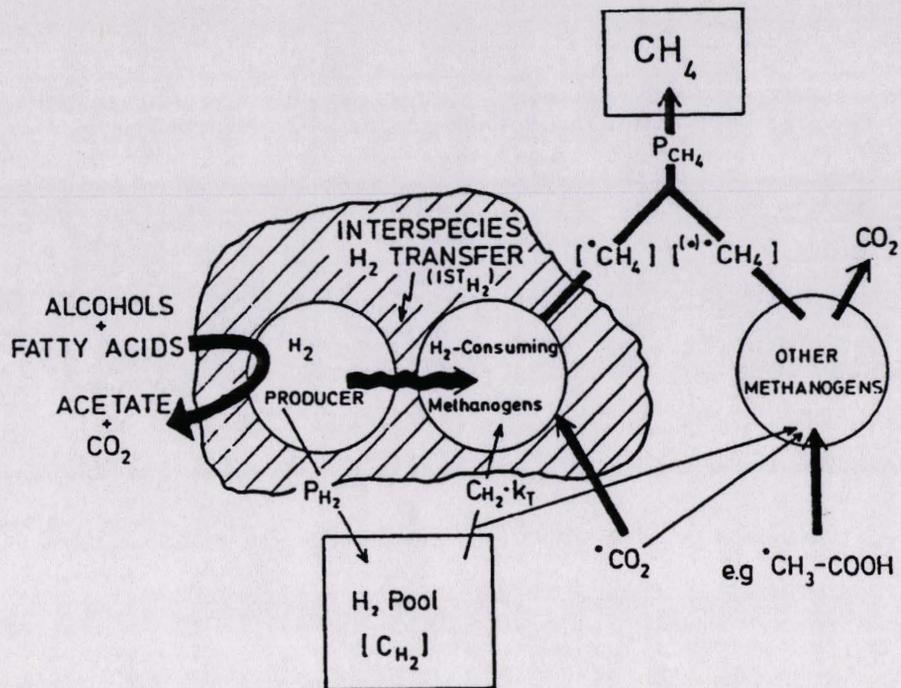


Figure 6. Diagramme du flux carbone et du flux d'électrons montrant l'importance de la juxtaposition des productrices d'H et des méthanogènes dans la nature.
(d'après CONRAD et al., 1985)

en utilisant les équivalents réducteurs produits par les méthanogènes poussant sur substrats organiques. Leurs résultats ne décrivent pas une interaction métabolique synergique mais plutôt un comportement antagoniste ou compétitif basé sur la perte du donneur d'électrons potentiel, l'hydrogène, pour la méthanogène. Ainsi, en coculture, *D. vulgaris* semble maintenir la pression partielle en hydrogène assez basse pour déplacer la constante d'équilibre apparente du système rédox de la méthanogène, de sorte que des quantités considérables d'hydrogène soient produites et que plus de substrat soit oxydé en CO₂ au lieu de méthane.

CONRAD et *al.*, (1985), ont émis l'hypothèse d'une association physique, une juxtaposition, des bactéries O.H.P.A et des méthanogènes utilisatrices d'hydrogène dans les flocs ou les boues (Figure 6). Ainsi, la plupart de l'hydrogène produit est directement consommé par les méthanogènes adjacentes avant qu'il ne diffuse en dehors de la matrice du flocc (pool commun d'hydrogène), créant des microenvironnements dans lesquels la pression partielle en hydrogène est plus faible que celle mesurée en phase liquide.

1.3.3 Conclusion

La fermentation méthanique est réalisée par un consortium de micro-organismes à l'intérieur duquel se créent des interactions multiples qui permettent à chaque organisme de valoriser au mieux, dans des conditions anaérobies, l'énergie disponible dans la matière organique. Parmi cette communauté, les bactéries méthanogènes apparaissent comme les partenaires essentiels associés à tous les organismes (hydrolytiques, acidogènes, acétogènes) et jouent un rôle fondamental dans l'écologie du système en contrôlant toute la dynamique des réactions et dans sa finalité de procédé producteur d'énergie.

2 . DIFFERENTS PROCEDES DE METHANISATION

Au sein de populations mixtes, les méthanogènes sont mises en oeuvre industriellement pour la conversion de la matière organique résiduaire en un mélange de méthane et de gaz carbonique appelé communément le biogaz. Dans le procédé anaérobie, contrairement à l'épuration aérobie, la balance énergétique n'est pas favorable à la croissance de la communauté microbienne. A peine 10

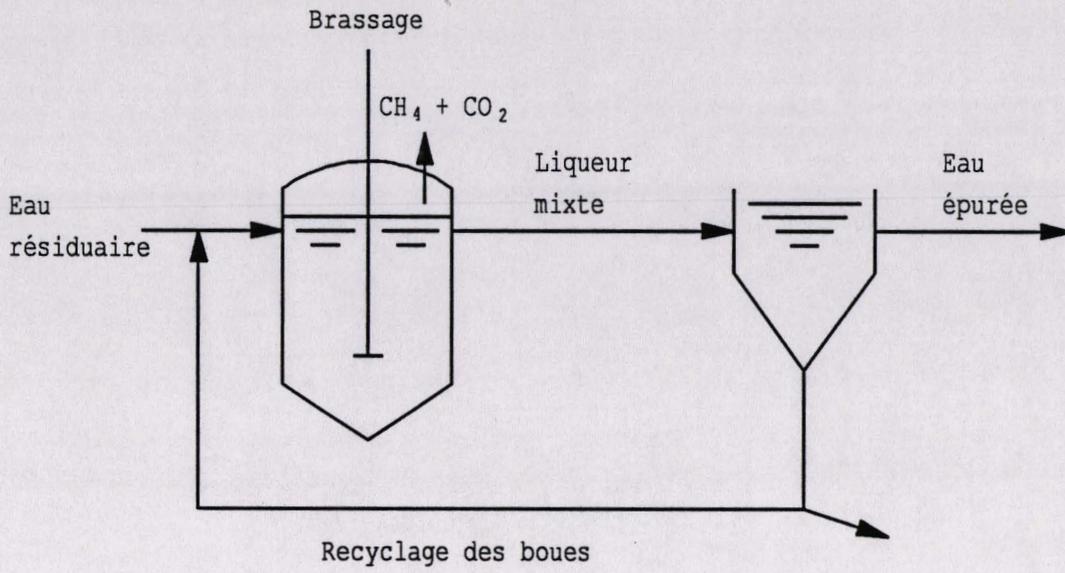


Figure 7. Procédé contact

à 20% de l'énergie libre de la charge polluante éliminée sont utilisés par les micro-organismes pour leurs besoins vitaux. En revanche, c'est cette balance énergétique défavorable qui justifie l'intérêt industriel du traitement anaérobie:

- le méthane produit conserve jusqu'à 80% de l'énergie libre de la charge polluante.

- la production de boues peut être jusqu'à 5 fois inférieure à celle du procédé aérobie.

Le but principal du réacteur biologique est d'amener le substrat et les enzymes en contact étroit pendant une durée suffisante pour permettre aux réactions de se produire. Dans les procédés de fermentation anaérobie méthanique, des temps de rétention microbienne longs sont nécessaires à cause de la lenteur de croissance des méthanogènes.

2.1 Différentes configurations de réacteurs

Les réacteurs anaérobies ont été spécialement conçus pour le traitement d'eaux résiduaires concentrées, tous ces réacteurs peuvent traiter des charges volumiques inférieures à 10 kg de DCO. $m^{-3}. j^{-1}$, pour le procédé contact et atteignant 35 kg de DCO. $m^{-3}. j^{-1}$, pour le filtre anaérobie. D'après le mécanisme de rétention de la biomasse, on peut les classer en réacteurs à culture libre et réacteurs à film fixé.

2.1.1 Réacteurs à culture libre

2.1.1.1 Procédé contact

Développé dans les années 1950, le procédé contact peut être décrit comme un réacteur infiniment mélangé avec une recirculation des solides biologiques pour obtenir une biomasse plus importante pendant des temps de rétention longs (Figure 7). Ce procédé est adapté au traitement soit d'effluents concentrés à teneur élevée en matières en suspension dégradables, soit d'eaux résiduaires naturellement chaudes.

La principale limite du système est occasionnée par les difficultés d'obtenir une bonne décantation des boues, notamment quand un brassage intense est nécessaire pour l'hydrolyse des solides.

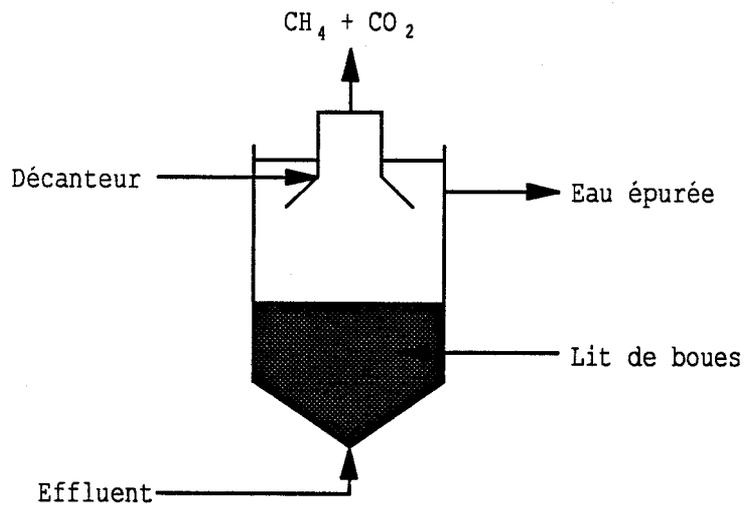


Figure 8. Fermenteur à lit de boues, type U.A.S.B

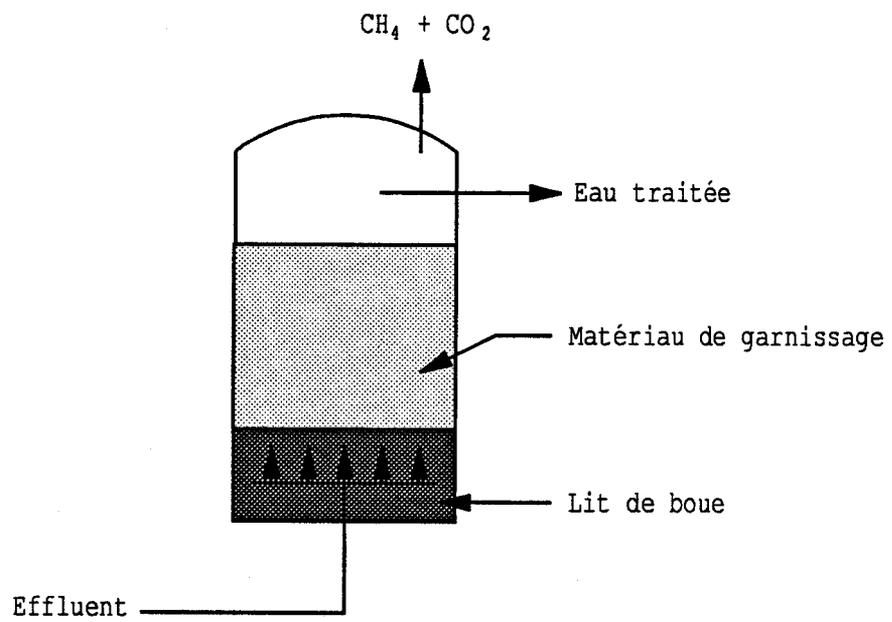


Figure 9. Filtre anaérobie, type upflow

2.1.1.2 Réacteurs à lit de boues

Il a été développé en Europe sous la dénomination U.A.S.B (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (LETTINGA, 1980). L'effluent passe de bas en haut à travers une zone dense de boues granuleuses puis dans une zone moins dense de boues particulaires flocculées.

Le réacteur est équipé d'un séparateur gaz-solides, ou décanteur, situé à la partie supérieure permettant la séparation du gaz des boues et le retour des particules dispersées dans un compartiment de décantation (Figure 8). Ainsi, la biomasse active est maintenue dans le réacteur avec des valeurs élevées de SRT (temps de rétention des solides) indépendamment du HRT (temps de séjour hydraulique).

Ce procédé est mondialement appliqué au traitement d'effluents de Brasserie, Distillerie, Sucrierie et des Industries de transformation de la pomme de terre (MAAT et HABETS, 1987).

Le développement des boues granuleuses dépend des caractéristiques de l'effluent et de l'inoculum utilisé pour le démarrage (DE ZEEUW et LETTINGA, 1981). Les temps de séjour hydrauliques sont de 4 à 24 heures pour des charges organiques de 5 à 15 kg de DCO. m⁻³. j⁻¹.

2.1.2 Réacteurs à film fixé

Un autre 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.

2.1.2.1 Filtre anaérobie

L'effluent à traiter traverse, soit selon un flux ascendant (type "upflow"), soit selon un flux descendant (type "downflow") le digesteur rempli de matériau de garnissage (graviers, brique, anneaux plastiques, mousse de polyuréthane,...)(Figure 9). Le milieu solide sert à la fois de surface d'attachement des micro-organismes et de piégeage dans l'espace interstitiel des floccs non

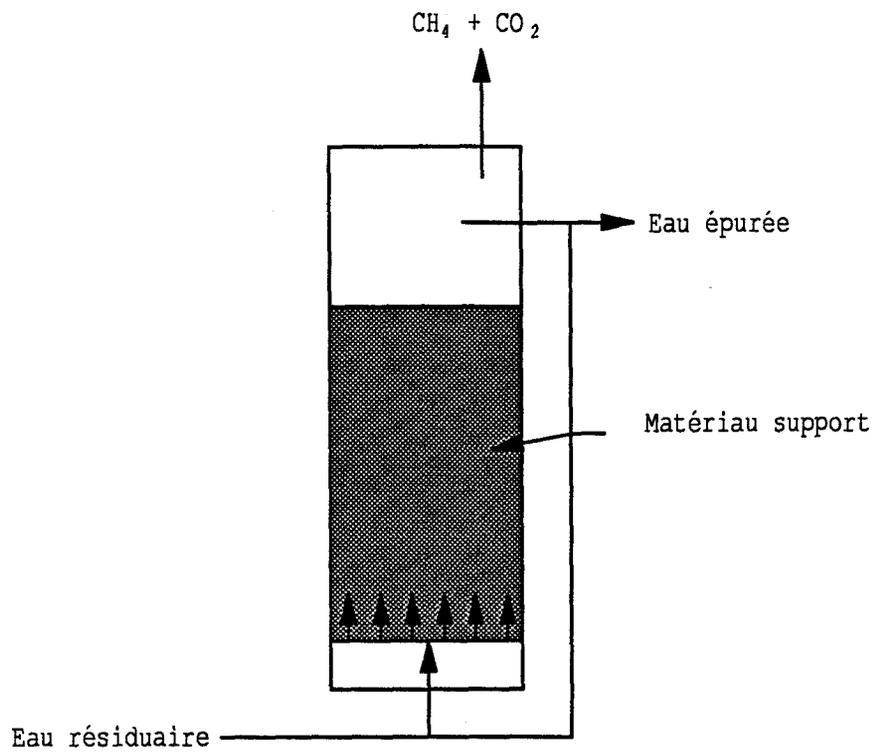


Figure 10. Lit expansé/fluidisé.

Tableau VI. Installations industrielles

Procédé	Type d'effluent	Charge volumique (kg DCO.m ⁻³ .j ⁻¹)	HRT (h) ^(a) (j) ^(b)	Support	Elimination de la DCO (%)
U.A.S.B	Brasserie	14,1	4,9 ^(a)	-	86
	Amidon	11	47 ^(a)	-	85
	Sucre	13,3	24 ^(a)	-	94
	Pomme de Terre	8	2,4 ^(a)	-	85
Filtre	Gluten d'amidon	3,8	0,9 ^(b)	Graviers calibrés (2,5 à 7,6 cm)	64
Anaérobie	Distillerie de rhum	8,9	7-8 ^(b)	Milieu synthétique vinylique	75
Upflow	Chimique	10,4	1,5 ^(b)	Anneaux plastiques	90
Lit	Industrie du soja	13	<24 ^(a)	Sable (0,4 mm)	-
Fluidisé	Embouteillage	9,6	6 ^(a)	Sable (0,6 mm)	77

fixés. La biomasse anaérobie retenue convertit à la fois la matière organique soluble et les matières en suspension de l'eau résiduaire en CH_4 et H_2 quand le flux passe à travers la colonne.

Le matériau support sélectionné doit présenter un rapport surface/volume élevé pour fournir une grande surface d'attachement du biofilm tout en maintenant un volume interstitiel suffisant pour empêcher le colmatage soit par les solides en suspension non dégradés, les précipités minéraux de l'effluent, soit par la biomasse qui se développe au sein du réacteur. Cependant, la sélection du matériau dépend surtout des caractéristiques de l'effluent, des concentrations en matières en suspension et de la composition organique.

2.1.2.2 Lit fluidisé

Dans le réacteur à lit fluidisé, la biomasse active est présente sous forme d'une biocouche recouvrant des particules de matériau inerte (sable, argile, charbon actif,...) maintenues dans un état fluidisé par un recyclage contrôlé de l'eau résiduaire épurée (Figure 10). Il diffère du filtre anaérobie par le fait que la rétention bactérienne n'est réalisée que par attachement des micro-organismes aux particules et non par piégeage.

Le lit fluidisé modèle doit utiliser des petites particules légères, faciles à fluidiser et présentant un rapport surface/volume élevé. Il existe cependant une taille et/ou une densité minimale pour éviter le lessivage qui se produit si la densité de l'ensemble support-biomasse devient trop faible; de plus, les particules plus légères peuvent être fluidisées avec des vitesses de flux faibles, induisant une réduction de la vitesse de recyclage nécessaire pour atteindre un temps de séjour hydraulique donné.

Ce type de réacteur a été utilisé pour le traitement des eaux ne contenant pas ou peu de solides en suspension (Brasserie, Industries de production de levures, d'extraction des protéines du soja).

Le tableau VI donne quelques exemples des performances obtenues en réacteurs à culture libre et film fixé à l'échelle industrielle.

Tableau VII. Caractéristiques des supports utilisés en procédés à film fixé

Type de réacteur	Nature du support	Taille (mm)	Surface spécifique (m ² /m ³)	Porosité (%)	Référence
Filtre	Anneaux de verre fritté (SIRAN)	15-30	21000-32000	95	BREITENBUCHER et <i>al.</i> , (1989)
	Graviers-Pierres	6-40	100	40	HENZE et HARREMOES (1983)
Anaérobie	Anneaux plastiques FLOCOR	30x30	230	95	BORIES et <i>al.</i> , (1982)
	Mousse de polyuréthane	pores: 2,5		95	
Lit	Sable	0,1-0,7	2500-4000	40	HENZE et HARREMOES (1983)
Fluidisé	Charbon actif	0,55-0,65		60	

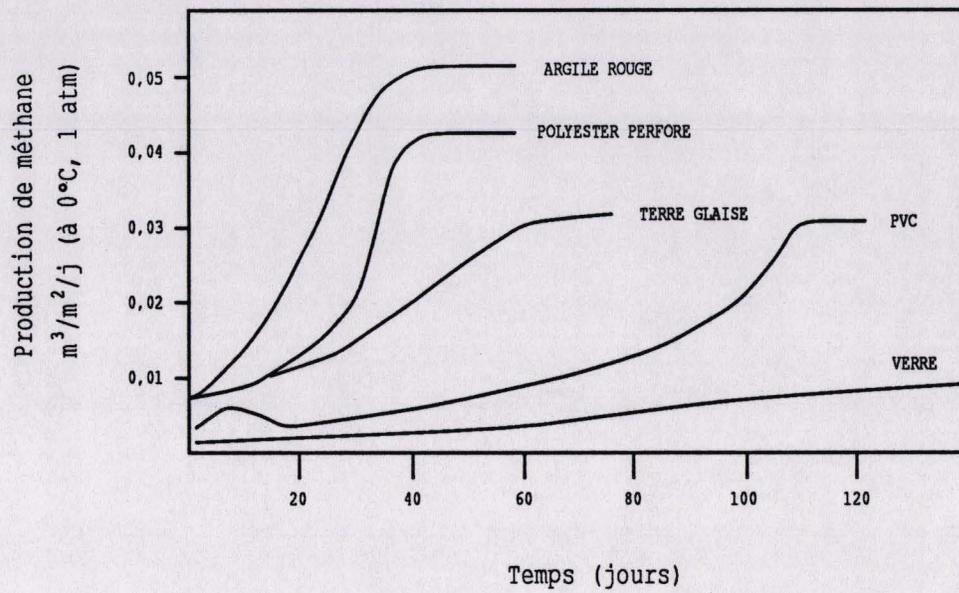


Figure 11. Démarrage d'un réacteur à film fixe sur eaux de blanchiment de pois
 (à 35°C; 10g DCO/l; volume du réacteur 0,8 à 1,2l; Surface/Volume=100 à 150 m²/m³)
 (d'après VAN DEN BERG et KENNEDY, 1982)

2.2 Influence de différents paramètres sur la conduite et les performances de la fermentation

2.2.1 Caractéristiques et implication du support

Le choix du support est d'une grande importance dans les procédés à culture fixée. Les supports interviennent principalement par leur surface spécifique de contact (Surface/Volume), leur porosité (% vide), mais aussi leur nature physique et chimique (Tableau VII).

- Un rapport surface/volume élevé est favorable à la rétention d'une grande quantité de bactéries dans le réacteur.

- La rugosité de la surface joue un rôle primordial, ainsi que la capacité de relargage de minéraux par un matériau comme l'argile (VAN DEN BERG et KENNEDY, 1980). Les micropores présents à la surface de certains matériaux supports (charbon actif, brique,...) sont autant de sites favorables à l'adsorption.

- La porosité des supports concerne deux points distincts:

- le % de vide que laisse le support dans le digesteur
- la taille des orifices du support.

Les matériaux offrant un volume mort réduit, d'où un volume efficace pour la fermentation maximal, semblent préférables. Les matériaux de garnissage (anneaux plastiques, supports minéraux) présentent des indices de vide de l'ordre de 60 à 95% et des surfaces spécifiques élevées.

Les caractéristiques du support bactérien agissent sur:

- les vitesses de démarrage de la méthanisation. VAN DEN BERG et KENNEDY (1982) ont observé que les réacteurs de verre étaient plus lents à démarrer, probablement à cause de la difficulté des bactéries à s'adsorber sur une surface inerte lisse. Ils ont également montré que le PVC, support très utilisé dans le traitement biologique des eaux résiduaires, était meilleur que le verre en tant que support mais nettement moins bon que l'argile et le polyester perforé (Figure 11). Dans le cas de l'argile et du polyester perforé, la rugosité et la porosité de surface du support jouent un rôle primordial dans la rétention de la biomasse, alors qu'il n'existe pas de piégeage interstitiel avec le support tubulaire en PVC pour lequel l'attachement bactérien est directement lié aux interactions bactéries-support (MURRAY et VAN DEN BERG, 1981).

- les performances de méthanisation et leur temps d'obtention. VAN DEN BERG et LENTZ (1980) ont montré que les réacteurs d'argile cuite atteignaient une performance maximum en 1 à 3 mois par rapport à 7 mois pour le PVC et 10 à 14 mois pour le verre. Ils ont observé la formation d'un film plus uniforme sur l'argile que sur le verre; de plus, le film sur l'argile ne se dégarnit pas aussi facilement que sur le verre entraînant une stabilité plus grande du procédé (Tableau VIII).

Tableau VIII. Effet du support sur la performance des réacteurs à film fixe (d'après VAN DEN BERG et LENTZ, 1980)

	Support du film		
	Argile	Verre	PVC
Diamètre du tube (m)	0,028	0,016-0,075	0,025
Rapport Surface/Volume (m ² /m ³)	140	105-250	160
Temps d'obtention de la charge maximale (j)	30-90	300-400	200
Charge maximale (kg DCO/m ³ .j)	12-18,1	8-26,5	11,5
DCO de l'effluent (g/m ³)			
a) Totale	800-1200	1050-1600	650
b) Soluble	300-400	400-600	250
c) En suspension	500-800	650-1000	400
Efficacité d'élimination de la DCO (%)	88-92	85-90	94
Production de méthane (m ³ /m ² .j)	0,028-0,031	0,021-0,027	0,021
(m ³ /m ³ .j)	3,9-4,3	2,8-5,3	3,4

2.2.2 Importance de l'ensemencement des digesteurs

Le démarrage des réacteurs anaérobies peut être attribué à trois principaux facteurs:

- la qualité de l'inoculum en terme de quantité de micro-organismes adaptables à l'effluent.
- la vitesse d'adaptation de ces micro-organismes à l'effluent.

- la vitesse de croissance des micro-organismes pendant et après la période d'adaptation, en relation avec la perte de bactéries en sortie (VAN DEN BERG et KENNEDY, 1982); la vitesse de développement après la période d'adaptation est fonction de la vitesse de croissance nette/taux total dépendant de la composition de l'effluent pour une température donnée moins la fraction de bactéries perdues en sortie.

La quantité totale de bactéries adaptables à l'effluent est un paramètre important:

- un apport équilibré en nutriments est essentiel pour obtenir une adaptation rapide et des taux de croissance des micro-organismes élevés.

- plus les micro-organismes d'ensemencement sont sélectionnés selon leur aptitude de dégradation d'un substrat donné, plus le temps d'adaptation des boues sera court.

Cependant, GORRIS et *al.*, (1988) ont étudié l'influence de différents types d'inocula bactériens sur le développement du biofilm dans un lit fluidisé et ils ont observé une formation et une composition du biofilm similaires quelque soit l'inoculum appliqué.

2.2.3 Influence de la composition de l'effluent sur la présence des populations bactériennes

- ZELLNER et WINTER (1987a) étudiant la dégradation du lactosérum ont observé la présence d'organismes différents en plus des quatre souches théoriquement suffisantes (Tableau IX). Quand le digesteur était alimenté par du lactosérum, le biofilm recouvrant les billes d'argile était constitué exclusivement de bactéries filamenteuses type *Methanothrix soehngeni* et occasionnellement de bâtonnets de *Methanobrevibacter arboriphilicus*. Le remplacement du lactosérum d'alimentation par le perméat de lactosérum a fait disparaître la couche de *Methanothrix soehngeni*, remplacée par *Methanosarcina* sp., probablement à cause du pH plus faible (ZELLNER et *al.*, 1987b). Cependant, *Methanosarcina* sp ont été retrouvées en suspension et occasionnellement piégées dans les pores du support, aucune adhésion significative des autres bactéries ne s'est par ailleurs produite.

Tableau IX. Populations de bactéries fermentatives, acétogènes et méthanogènes dans un digesteur à lactosérum

		ZELLNER et <i>al.</i> , 1987a	CHARTRAIN et ZEIKUS, 1986
Type de digesteur		Filtre anaérobie upflow Support: billes d'argile	Réacteur infiniment mélangé
	Espèces utilisant le lactose	<i>Lactobacillus</i> Isolat non identifié	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Clostridium butyricum</i>
Groupes trophiques	Dégradation du lactate	<i>Desulfovibrio</i> <i>Eubacterium limosum</i>	Organismes O.H.P.A: <i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>Clostridium propionicum</i>
	Méthanogènes acétoclastes	<i>Methanothrix soehngenii</i>	<i>Methanothrix soehngenii</i> <i>Methanosarcina barkeri</i>
	Méthanogènes hydrogénophiles		<i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanosarcina</i> <i>Methanospirillum</i>

- GORRIS et *al.*, (1988) qui ont étudié la dégradation de plusieurs acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate) ou d'un cocktail de ces acides en lit fluidisé, ont remarqué dans tous les cas une prédominance de *Methanothrix soehngenii* avec parfois des microcolonies de divers types bactériens piégés dans les filaments (Tableau X).

Tableau X. Quantités relatives de méthanogènes et de non méthanogènes dans les boues de lits fluidisés à l'équilibre en fonction de la composition de l'effluent (d'après GORRIS et *al.*, 1988)

Source de Carbone	Proportion relative (% de biomasse totale)			
	<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanothrix</i>	<i>Methanosarcina</i>	Non méthanogènes
Mélange d'A.G.V:				
Acétate 8,4 mM				
Propionate 2,3 mM	5,1	94	0,9	-
Butyrate 1,9 mM				
Acétate 17,8 mM	0,2	98	1,8	-
Butyrate 6,4 mM	11,2	62,5	6,7	19,6
Propionate 9,6 mM	43,6	41,9	2,7	11,8

- Dans un méthaniseur thermophile d'effluent lignocellulosique, *Methanosarcina sp.* étaient initialement les méthanogènes acétoclastes dominantes dans les conditions de démarrage car elles sont capables de se développer rapidement si d'autres substrats comme le méthanol ou les méthanolamines sont présents (ZINDER et *al.*, 1984b). Quand le digesteur a été alimenté en semi-continu (Temps de rétention de 10 jours), *Methanosarcina sp.* ont été déplacées par *Methanotherix sp.*, la compétition étant alors basée sur les Km pour le substrat.

2.2.4 Effet de paramètres environnementaux sur la production de méthane

L'acétogénèse à partir d'acides gras volatils (AGV) et la production de méthane à partir d'acétate sont les étapes les plus sensibles aux conditions environnementales.

2.2.4.1 Potentiel redox

Les acétogènes et les méthanogènes sont des bactéries anaérobies strictes extrêmement sensibles à l'oxygène (E.O.S). En général, elles ne croissent que quand le potentiel redox du milieu est maintenu à une valeur inférieure à - 350mV. L'introduction d'oxygène, mais aussi d'ions minéraux hautement oxydés (nitrites, nitrates, sulfates) peut inhiber la méthanogénèse. Dans les digesteurs, les conditions anaérobies sont maintenues par des bactéries fermentatives et hydrolytiques microaérophiles.

2.2.4.2 pH

Les bactéries méthanogènes et acétogènes sont également très sensibles au pH. La formation de méthane se produit uniquement si le pH est maintenu entre 6,5 et 7,5, avec un optimum à des valeurs comprises entre 7 et 7,2.

Dans un filtre anaérobie, les bactéries à l'intérieur du biofilm ne sont pas soumises au même pH que l'effluent ce qui permet d'expliquer la sensibilité moindre aux variations de pH.

BOONE et XUN, (1987), ont observé pour des cultures adaptées à pH 7,2, qu'à des valeurs de pH supérieures à 8,4 ou inférieures à 6, la dégradation du propionate était plus rapide que celle de l'acétate, ce dernier s'accumulant alors.

HUSER et *al.*, (1982), ont affirmé que la chute d'un réacteur de type U.A.S.B était souvent occasionnée par une diminution du pH, notamment en ce qui concerne la dégradation du propionate. En effet, l'oxydation de cet acide est considérablement inhibée pendant une longue période après un choc de pH, bien qu'une adaptation des boues soit possible. On suppose que la principale raison de cette inhibition à faible pH est la haute toxicité des acides gras non dissociés qui deviennent abondants pour des valeurs de pH inférieures à 6 (BUHR et ANDREWS, 1977).

La population méthanogène présente dans un digesteur U.A.S.B alimenté par un mélange d'acides acétique et propionique peut varier en fonction du pH (TEN BRUMMELER et *al.*, 1985); à pH 7,5 on retrouve principalement au sein du réacteur *Methanosarcina sp.* alors qu'à pH 6, 50% de la biomasse, essentiellement représentée par *Methanotherix soehngeni* adhéraient aux parois du réacteur. Un pH inférieur à 6 affecte la formation de méthane sans empêcher la production d'acides, certaines bactéries acidogènes étant encore actives à pH 4-4,5. L'accumulation d'acides simultanée à une baisse de pH a un effet léthal sur les bactéries acétogènes et méthanogènes.

2.2.4.3 Température

La méthanogénèse se produit dans une large gamme de température comprise entre 0 et 95°C. Cependant, aucune méthanogène acétoclaste capable de se développer au dessus de 65°C n'a jamais été décrite, la production de méthane est due seulement à la réduction du CO₂ à ces températures.

En pratique, la fermentation des effluents est réalisée dans deux gammes de température:

- la gamme mésophile (30 à 40°C) utilisée dans les installations industrielles (Température optimale de 35°C).

- la zone thermophile dont l'optimum admis pour la méthanogénèse est de 55°C, cette limite étant imposée par les bactéries acétoclastes très sensibles à la température. VAN DEN BERG et KENNEDY (1982) ont étudié les effets de la température sur les performances des réacteurs à cellules fixées et ils ont observé que la performance de ces réacteurs augmentait linéairement avec la

température dans une gamme de 10 à 35°C. Dans la nature l'effet de la température sur les micro-organismes suit une loi exponentielle, l'effet linéaire observé peut être le résultats de facteurs divers:

- * le film de biomasse peut augmenter avec la réduction de température
- * la résistance de diffusion dans le film peut décroître davantage avec l'activité microbienne qu'avec la température
- * les bactéries méthanogènes qui ne sont pas en phase exponentielle de croissance ont des activités qui augmentent à peu près linéairement avec la température.

2.2.4.4 Composés toxiques

La fermentation méthanique est sensible à de nombreux composés, on peut citer le formaldéhyde, le furfural, le phénol et ses dérivés, les sulfites, l'ammonium, le cyanure (HENZE et HARREMOES, 1983). L'utilisation de procédés à cellules fixées s'est avéré un moyen efficace pour limiter les effets toxiques ou inhibiteurs de ces composés. Ils tolèrent des concentrations transitoires de composés tels que cyanure, formaldéhyde, ammonium, sulfites, beaucoup plus importantes que les réacteurs à cellules libres (PARKIN et SPEECE, 1983).

- Exemple des sulfites

Dans les sédiments et les digesteurs, les sulfates inhibent la méthanogénèse (LOVLEY et KLUG, 1983). L'hydrogène fourni par l'oxydation de la matière organique est le plus souvent utilisé exclusivement par la réduction de sulfate puisque cette réaction est thermodynamiquement plus favorable que la formation de méthane. Dans ce cas, seule la réduction du CO₂ sera affectée et la décarboxylation de l'acétate se produira encore. Mais, dans certains cas la réduction du sulfate peut se produire simultanément à la réduction du CO₂. Des concentrations totales en sulfures supérieures à 3 mM inhibent la formation de méthane en cultures mixtes et pures. Aucune explication n'est encore disponible, le sulfite formé par réduction du sulfate pourrait précipiter des éléments essentiels à l'état de traces comme le fer, le nickel, le cobalt ou le manganèse, rendant ces ions difficilement accessibles aux bactéries et notamment aux méthanogènes.

2.2.5 Surcharges

2.2.5.1 Surcharge hydraulique

Toute variation du débit d'entrée engendre une variation du temps de séjour. Si le débit augmente brutalement, le temps de séjour chute ce qui peut entraîner un lessivage des boues et donc le déséquilibre du système, la charge volumique n'étant alors plus en accord avec la quantité de boues dans le réacteur. Suite à ces fuites de boues, à même charge volumique entrante, le système se retrouve alors en surcharge massique.

2.2.5.2 Surcharge massique

Une alimentation trop concentrée en matières organiques par rapport à l'activité et à la quantité de bactéries présentes provoque une accumulation d'AGV dans le digesteur. En pratique, cette surcharge peut être causée par:

- une brutale augmentation de la charge d'alimentation (en débit et/ou en concentration de D.C.O)
- un démarrage trop rapide
- une variation de la composition du substrat entraînant des problèmes d'adaptation des boues
- un lessivage de la biomasse
- une chute du pH dans le milieu.

En cas de surcharge, les bactéries acidogènes possédant une vitesse de croissance élevée vont s'adapter très rapidement, produisant un excès d'AGV. Par contre, comme les bactéries acétoclastes se développent très lentement, on assiste à une accumulation d'acide acétique, premier symptôme de la surcharge du digesteur, avec parfois apparition simultanée de propionate résiduel.

En effet, la dégradation du propionate nécessite à la fois une pression partielle d'hydrogène très faible et l'absence d'acétate. Ultérieurement, on observe l'accumulation d'acides gras à plus longue chaîne (butyrate, valérate, caproate) puis une chute du pH, le pouvoir tampon du digesteur étant alors insuffisant ce qui entraîne des perturbations du processus fermentaire. A ce stade, la restauration du fermenteur est souvent longue et difficile (HUGHES, 1979).

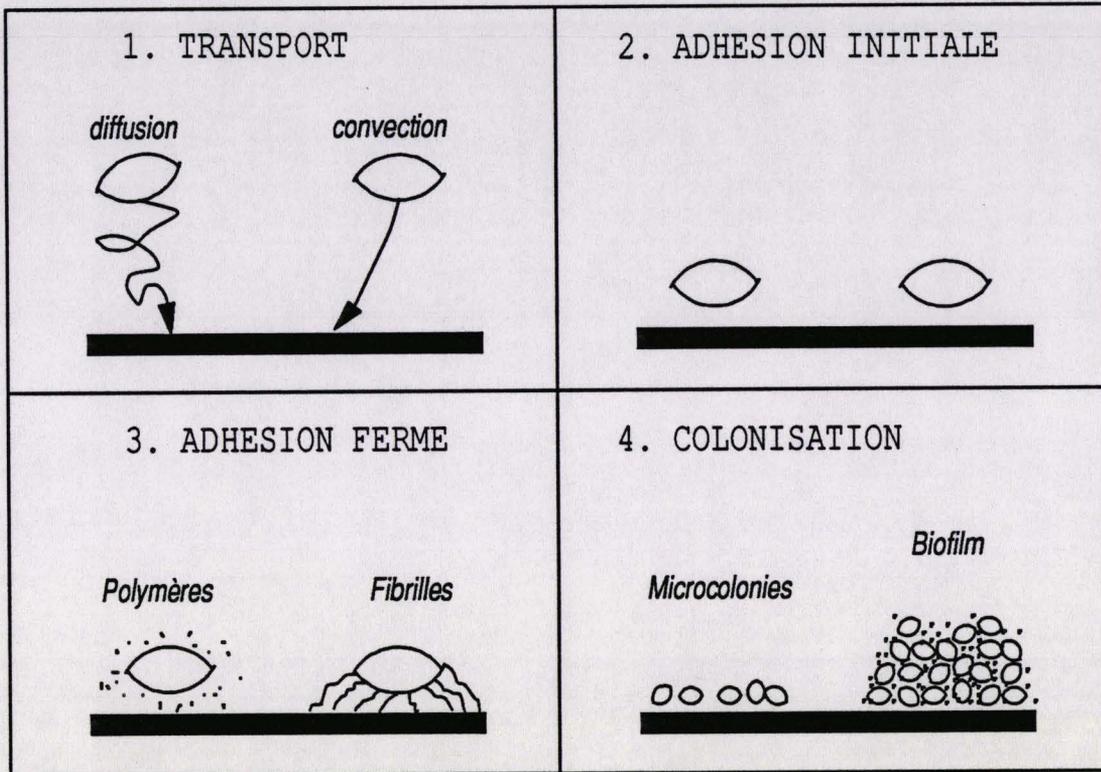


Figure 12. Etapes de la colonisation des surfaces par les micro-organismes
(d'après VAN LOOSDRECHT, 1988)

Ainsi, les méthaniseurs à bactéries fixées ont prouvé leur efficacité "à l'équilibre", c'est-à-dire lorsque la fixation de la population bactérienne sur le matériau support est terminée. Par contre, cet état d'équilibre n'est atteint qu'après une période assez longue d'adaptation, de multiplication et de fixation dans le réacteur d'un ensemencement bactérien. Ce dernier, pour des raisons pratiques, est souvent apporté en faible quantité et sous forme d'une population mixte méthanogène qui n'est pas adaptée à la dégradation des polluants organiques présents dans l'eau résiduaire à épurer. On peut donc raisonnablement espérer raccourcir la durée de mise en service des installations industrielles en maximisant la rétention de ces micro-organismes dans les réacteurs, ces derniers sont en effet alimentés en continu et leurs performances sont directement proportionnelles à la densité de bactéries que l'on peut y confiner.

3 . FORMATION DU BIOFILM

L'adhésion bactérienne à un interface solide-liquide peut-être décrite comme un phénomène à quatre étapes (Figure 12):

- Tout d'abord, les cellules doivent approcher de la surface par différents mécanismes de transport de masse:

* par diffusion, les bactéries exhibant un mouvement Brownien qui expliquerait les contacts au hasard des bactéries avec la surface.

* par convection; ce transport est assuré par le flux liquide.

* par sédimentation; la sédimentation n'est significative que pour des bactéries relativement grandes ou formant des agrégats (MARSHALL, 1986).

* par chimiotactisme.

- Les interactions physicochimiques conduisent alors à la rétention des cellules par la surface, c'est l'adhésion initiale divisée en deux étapes:

* tout d'abord, l'adhésion réversible qui assure le maintien du mouvement Brownien bidimensionnel des bactéries qui peuvent encore être détachées par les forces de cisaillement du courant liquide.

* suivie d'une adhésion irréversible où les cellules ont perdu leur mouvement Brownien et ne peuvent plus être entraînées par un cisaillement modéré (MARSHALL et *al.*, 1971).

- Les structures extracellulaires (fibrilles ou polymères) peuvent renforcer l'adhésion en formant un pontage entre les deux surfaces, c'est l'attachement ferme. Cependant, ALLISON et SUTHERLAND (1987) ont montré que bien que les polysaccharides soient essentiels pour le développement du film en surface, ils ne le sont pas pour l'adhésion initiale.

- La formation du biofilm; quand les cellules sont fermement attachées, elles se multiplient et les cellules filles restent liées les unes aux autres entraînant la colonisation du support. Si les bactéries sont faiblement attachées, c'est-à-dire de façon réversible, les cellules nouvellement formées seront partiellement libérées dans le milieu.

3.1 Adhesion initiale

Si on considère les bactéries comme des particules colloïdales, leur adhésion peut-être étudiée en tant que phénomène physico-chimique en appliquant les principes de la chimie des colloïdes (ABSOLOM et *al.*, 1983; BUSSCHER et *al.*, 1984a). Comme la plupart des surfaces naturelles, les surfaces cellulaires sont chargées négativement et présentent des degrés d'hydrophobicité variables (LORDER et LISS, 1985). Cependant, les bactéries ne sont pas des particules colloïdales inertes, leur surface pouvant changer selon les conditions environnementales.

Pour décrire l'adhésion comme un phénomène physico-chimique, l'étude des interfaces est essentielle et l'énergie libre d'adhésion de Gibbs ($\Delta_{adh} G^o$) peut être obtenue à partir de:

$$\Delta_{adh} G^o = G_{BS}^o - G_{BL}^o - G_{SL}^o \quad (1)$$

où: G_{BS} représente l'énergie libre de Gibbs de l'interface Bactérie-Solide
 G_{BL} représente l'énergie libre de Gibbs de l'interface Bactérie-Liquide
 G_{SL} représente l'énergie libre de Gibbs de l'interface Solide-Liquide
 G^o est l'excès d'énergie libre de Gibbs par unité de surface (exprimée en mJ. m⁻²).

Différents modèles ont été réalisés pour calculer l'énergie d'adhésion de Gibbs et pour comprendre les interactions qui existent entre deux surfaces approchant l'une de l'autre. Une distinction est faite entre les forces agissant à longue distance de séparation (> 1nm) et les forces agissant à courte distance (RUTTER et VINCENT, 1980; TADROS, 1980). On dispose ainsi de deux types d'approches pour décrire l'adhésion initiale:

- la théorie D.L.V.0 des interactions agissant à longue distance

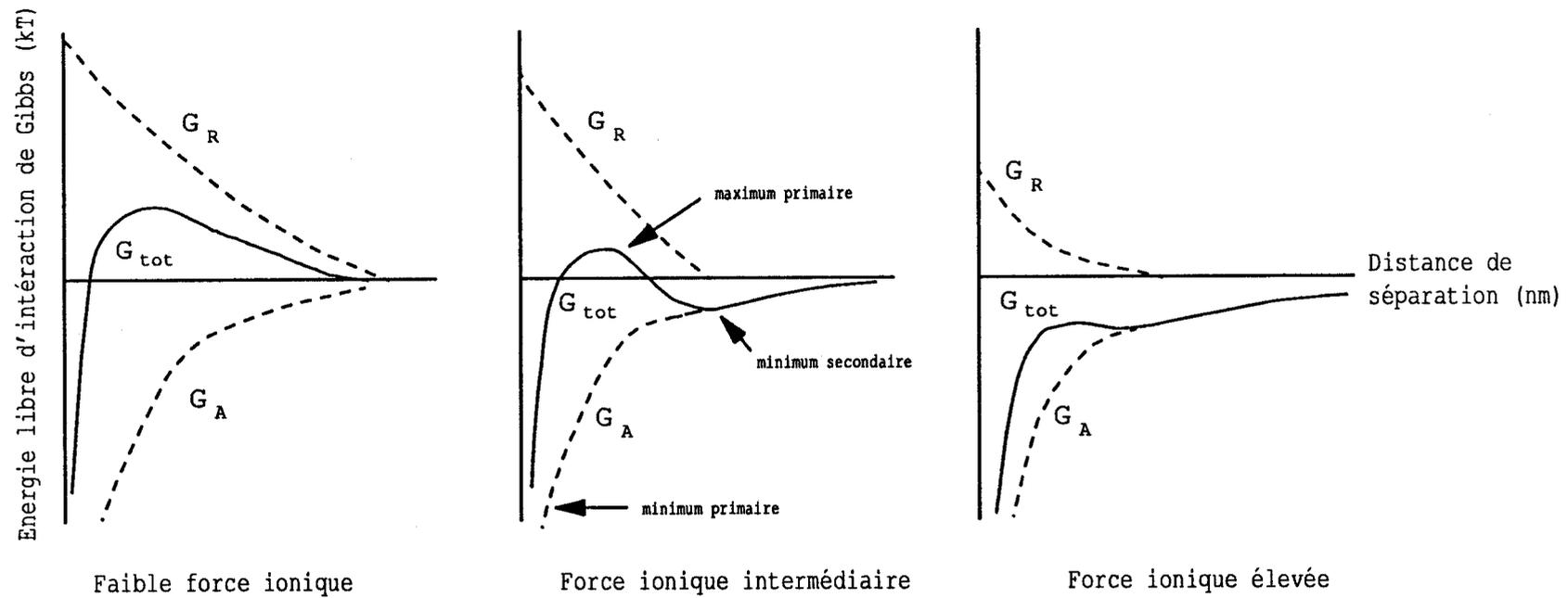


Figure 13. Variation de l'énergie libre d'interaction entre deux surfaces portant une charge de même signe en fonction de la distance de séparation (d'après RUTTER et VINCENT, 1980)

- l'approche thermodynamique qui tient compte des interactions agissant à courte distance.

3.1.1 Les interactions agissant à longue distance

La théorie D.L.V.O de la stabilité colloïdale (DERJAGUIN et LANDAU, 1941; VERWEY et OVERBEEK, 1948) peut être utilisée pour calculer l'énergie d'interaction d'une particule sphérique approchant d'une surface plate en fonction de la distance de séparation (H). L'énergie libre d'interaction G_{tot} est déterminée par la somme de deux termes: un terme attractif (G_A) dû aux interactions de Van der Waals et un terme, répulsif (G_R) pour des surfaces portant une charge de même signe ou pour des distances inférieures à 1 nm, dû aux interactions électrostatiques.

Quand la particule approche de la surface, elle subit une attraction de van der Waals induite par la fluctuation des dipôles dans les molécules des deux surfaces en présence. Cette attraction augmente quand la particule vient au contact du support. Cependant, dans la plupart des systèmes aqueux, les particules et les surfaces solides sont chargées négativement et le maintien de l'électronégativité globale est assuré grâce à un équilibre entre les charges des deux surfaces et les contre-ions du liquide environnant, l'ensemble constituant la double couche électrique. Quand les deux surfaces approchent l'une de l'autre, une force répulsive apparaît à cause du chevauchement des doubles couches électriques. L'amplitude de la répulsion dépend des potentiels de surface, de la force ionique, de la constante diélectrique du milieu environnant et de la distance de séparation entre la particule et le support (Figure 13):

- A faible force ionique, $G_{tot}(H)$ atteint un maximum positif, le maximum primaire qui constitue une barrière énergétique repoussant la particule de la surface et empêchant ainsi un dépôt dans le minimum primaire.

- Cette barrière d'énergie s'efface avec l'augmentation de la force ionique à cause de la contribution réduite de G_R et il existe une forte attraction entre la surface et la particule. A forte force ionique, les bactéries peuvent atteindre le minimum primaire entraînant un attachement ferme et irréversible.

- A force ionique intermédiaire, la barrière énergétique est nettement plus faible (<10 kT) permettant aux particules qui contiennent une énergie

thermique suffisante de passer ce maximum d'énergie et de se déposer dans le minimum primaire, les autres particules s'adsorbent à une distance de séparation supérieure dans le minimum secondaire ($< 5 \text{ kT}$).

Les bactéries adsorbées dans ce faible minimum secondaire sont en équilibre avec les bactéries en suspension dans la phase liquide, l'attachement dans ce minimum est réversible et conserve la mobilité des cellules (MARSHALL, 1985). Le nombre de cellules capturées dépend de la concentration en bactéries dans la suspension et de la profondeur du minimum secondaire. Si les bactéries sont petites et si la suspension bactérienne est peu concentrée, la profondeur du minimum secondaire peut être insuffisante pour entraîner un dépôt significatif; au contraire, si les bactéries sont relativement grandes ($1 \mu\text{m}$ de diamètre) et si les charges de surface sont faibles, on peut s'attendre à ce que les interactions du minimum secondaire soient assez fortes pour provoquer l'attachement (VAN LOOSDRECHT, 1988). Cependant, selon RUTTER et VINCENT (1980), les particules ne resteraient que temporairement dans ce minimum secondaire, moins profond que le minimum primaire, le temps de résidence de la particule dépend alors de la profondeur du minimum. De plus, les longues extensions hydrophiles de certaines cellules bactériennes comme les fibres de glycocalyx, les pili, ..., peuvent créer un pontage entre la bactérie et la surface, permettant ainsi le passage de la barrière énergétique et l'action des forces d'attraction (COSTERTON et IRVIN, 1981).

Puisque le calcul de G_R ne considère que les interactions de la double couche électrique, il ne peut être appliqué qu'à des distances supérieures à 1 nm (ROUXHET et MOZES, 1990); en dessous de ce seuil, les interactions agissant à courte distance entrent en jeu.

3.1.2 Les interactions agissant à courte distance.

Pour de faibles distances de séparation ($< 1 \text{ nm}$), l'adhésion d'une particule peut être décrite par les lois thermodynamiques. Selon l'approche thermodynamique, on considère que l'adhésion crée un nouvel interface Bactérie-Support (BS), par rupture des deux interfaces préexistants, c'est-à-dire Bactérie-Liquide (BL) et Solide-Liquide (SL), ce qui implique un contact moléculaire entre les deux surfaces adhérentes.

Le paramètre thermodynamique qui gouverne l'adhésion est le changement de l'énergie libre de Gibbs qui peut être calculé en remplaçant les G° de l'équation (1), par les énergies interfaciales (γ) à températures et pression constantes:

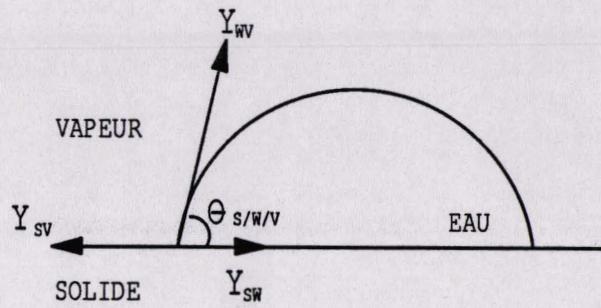


Figure 14. Modèle de YOUNG utilisé pour la détermination des angles de contact et le calcul de l'énergie libre de surface des solides.

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{BS} - \gamma_{BL} - \gamma_{SL} \quad (2)$$

où γ_{BS} représente l'énergie de l'interface Bactérie-Solide
 γ_{BL} représente l'énergie de l'interface Bactérie-Liquide
 γ_{SL} représente l'énergie de l'interface Solide-Liquide.

Les valeurs de ces tensions interfaciales sont dérivées de l'équation de YOUNG (Figure 14):

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_S - \pi_e - \gamma_{SL} \quad (3)$$

où: θ est l'angle de contact à l'interface Solide-Liquide
 γ_{LV} est l'énergie libre de surface du liquide (tension de surface)
 γ_{SL} est l'énergie libre à l'interface Solide-Liquide
 γ_{SV} est l'énergie libre de surface du solide en présence de la vapeur du liquide
 γ_S est l'énergie libre de surface du solide dans le vide
 π_e est la pression d'étalement du liquide sur le solide qui représente la diminution d'énergie libre de surface consécutive à l'adsorption de la vapeur.

Cependant, seules les déterminations de γ_{LV} et θ sont possibles expérimentalement, γ_{SV} et γ_{SL} sont calculées selon deux approches différentes:

- L'approche de l'équation d'état d'après la théorie de NEUMANN et al., (1974):

$$\cos \theta = \frac{[0,015 \gamma_{SV} - 2] (\gamma_{SV} \gamma_{LV})^{1/2} + \gamma_{LV}}{\gamma_{LV} [0,015 (\gamma_{SV} \gamma_{LV})^{1/2} - 1]}$$

- L'approche des composantes polaire (γ^p) et de dispersion (γ^d) selon la théorie de OWENS et WENDT (1969):

$$\cos \theta = -1 + 2 \frac{(\gamma_s^d \gamma_l^d)^{1/2}}{\gamma_{LV}} + 2 \frac{(\gamma_s^p \gamma_l^p)^{1/2}}{\gamma_{LV}}$$

Les interactions de dispersion résultent des forces de dispersion de LONDON, créées par l'existence de dipôles instantanés, qui agissent à plus longue distance que les autres forces intermoléculaires (FOWKES, 1967). Les interactions autres que de dispersion, ou polaires, regroupent toutes les autres interactions: dipôle-dipôle (KEESOM), dipôle-dipôle induit (DEBYE), ion-dipôle induit, liaison hydrogène, acide-base au sens de Brönsted ou Lewis,.... Dans les cas faisant intervenir des liquides ou des solides, FOWKES (1983), a montré que les interactions dipolaires étaient négligeables et que les interactions polaires étaient essentiellement de type acide-base.

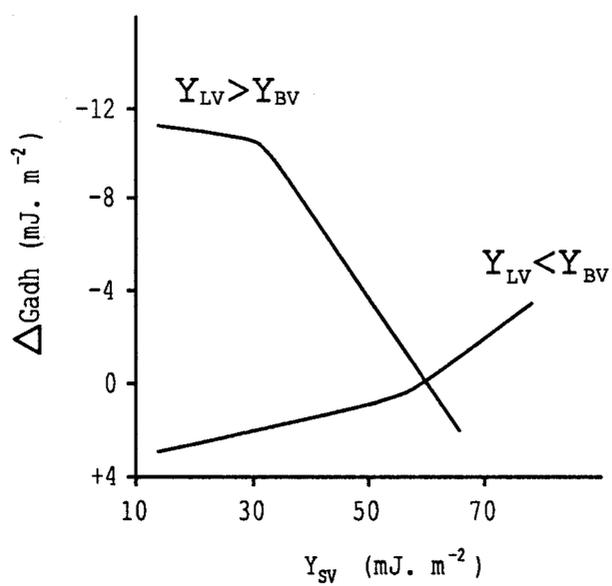


Figure 15. Energie libre d'adhésion d'E. Coli en fonction de la tension de surface du support (Y_{sv}) (d'après ABSOLOM et al., 1983).

Quelque soit l'approche utilisée, il est nécessaire de mesurer l'angle de contact à l'interface solide-liquide. Pour que ces mesures aient une signification thermodynamique, il est impératif que les surfaces soient homogènes et lisses, c'est-à-dire qu'elles possèdent une rugosité moyenne inférieure à 0,1 μm . La rugosité et l'hétérogénéité des surfaces entraînent une augmentation ou une diminution de l'angle de contact et donc, une sur-estimation ou une sous-estimation de l'énergie de surface du solide étudié (BUSSCHER et al., 1984b).

Les calculs théoriques de la variation de l'énergie libre d'adhésion (ΔG_{adh}) pour l'attachement de bactéries à divers substrata en fonction de γ_{SV} sont illustrés dans la Figure 15.

Trois situations sont possibles:

- Quand $\gamma_{LV} < \gamma_{BV}$, ΔG_{adh} diminue avec l'augmentation de γ_{SV} , indiquant une augmentation de l'adhésion bactérienne concomitante à l'accroissement de γ_{SV} .
- Si $\gamma_{LV} > \gamma_{BV}$, le comportement opposé se produit.
- Si $\gamma_{LV} = \gamma_{BV}$, $\Delta G_{adh} = 0$ indépendamment de la valeur de γ_{SV} . Cette condition limite implique que dans ce cas, l'adhésion bactérienne ne dépend pas de la tension de surface du substratum et doit être nulle si aucun autre effet comme les interactions électrostatiques entrent en jeu.

Cependant, le calcul de l'énergie libre n'inclut pas la contribution des interactions électriques entre les deux surfaces bien que leur importance ait été démontrée (ROUXHET et al., 1987). D'autre part, la théorie D.L.V.O ne peut pas prédire l'adhésion à courte distance de séparation, négligeant ainsi les interactions impliquées.

Les deux approches, D.L.V.O et thermodynamique, fournissent des indications afin d'expliquer l'adhésion des micro-organismes à un support; on doit tenir compte, en particulier de la charge de surface et de l'énergie de surface ou l'hydrophobicité qui reflètent les forces agissant à longue distance et à courte distance respectivement.

3.1.3 Intervention des polymères dans l'adhésion initiale

Les forces impliquées dans l'attachement ferme de micro-organismes aux surfaces solides sont des forces agissant à courte distance. Pour que ces interactions se produisent, la bactérie doit être en contact étroit avec la surface; l'approche vers la surface est influencée par les interactions agissant à longue distance comme les interactions électrostatiques ou la répulsion des

doubles couches électriques déterminées par les charges de surface. Les polymères extracellulaires (soit sous forme de fibrilles, soit sous forme de matrice extracellulaire) ou les polymères adsorbés influencent l'adhésion des bactéries de différentes manières:

- Intéractions non spécifiques

Les polymères extracellulaires, notamment les fibrilles, pili, ..., réalisent un pontage à travers la barrière de répulsion et assurent ainsi l'ancrage de la cellule à la surface (GEESEY, 1982; CORPE, 1980; COSTERTON, 1980).

Le polymère peut soit s'adsorber en totalité et combler l'espace entre la bactérie et la surface solide, soit recouvrir partiellement les deux surfaces.

Dans ces deux cas, la présence du polymère intervient dans l'énergie libre de Gibbs à cause de sa charge et de son hydrophobicité de surface.

ROSENBERG et al., (1982), ont ainsi montré que le mutant non adhérent aux surfaces hydrophobes d'*Acinetobacter calcoaceticus* était dépourvu de fimbriae, contrairement à la souche sauvage adhérente dont les protéines des fimbriae étaient constituées de nombreux acides aminés hydrophobes.

D'autres auteurs (REYNOLDS et WONG, 1983; LAMBERTS et al., 1985) ont émis l'hypothèse que l'adsorption de protéines basiques créait une charge de surface positive qui favorise l'approche de streptocoques à la surface de l'hydroxyapatite et ainsi leur adhésion.

- Intéractions spécifiques

Bien que certains auteurs aient observé des interactions spécifiques de type lectine, notamment dans la formation de la plaque dentaire (LILJEMARK et al., 1989; GIBBONS, 1980) et la présence nécessaire d'une protéine de la surface cellulaire pour l'adhésion de streptocoques à l'hydroxyapatite (DOYLE et al., 1982), peu d'études ont été réalisées pour déterminer en détail la structure et la composition des polymères extracellulaires impliqués dans le pontage. Dans les habitats naturels, la majorité des exopolymères impliqués dans l'adhésion sont des polysaccharides (SUTHERLAND, 1980). Cependant, les essais de digestion enzymatique tendent à montrer que les protéases sont plus efficaces que les enzymes dégradant les polysaccharides dans l'extraction des bactéries adhérentes (FLETCHER et MARSHALL, 1982; Mc ELDFORNEY et FLETCHER, 1986) ce qui suppose que les protéines peuvent intervenir non pas en tant que substances adhésives mais peut-être en stabilisant les interactions adhésives adjacentes

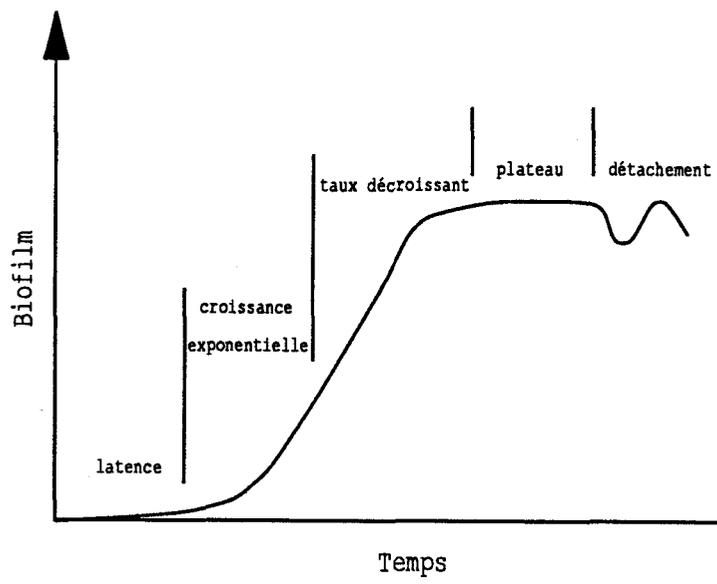


Figure 16. Développement du biofilm (d'après BRYERS et CHARACKLIS, 1982)

(FLETCHER, 1987). La présence des polymères extracellulaires adhésifs des populations mixtes naturelles disparaît en cultures pures (COSTERTON et al., 1978).

3.2 Colonisation de la surface

Pendant la phase initiale réversible, les bactéries sont amenées à la surface par de faibles attractions. L'attachement ferme se produit quand les forces physiques et chimiques se combinent pour maintenir les cellules irréversiblement à la surface. BRYERS et CHARACKLIS (1982) ont observé un développement sigmoïdal de biofilm aérobie sous des conditions de flux turbulent (Figure 16). La formation du biofilm est le résultat des étapes suivantes:

- Adsorption de molécules organiques à la surface

Cette étape très rapide entraîne la formation d'un "film conditionnant" à la surface du substratum (CHARACKLIS, 1984).

- Transport des cellules microbiennes à la surface

- Attachement des micro-organismes au substratum

- Développement du biofilm

Le biofilm se développe par accumulation de matériel bactérien due à la division cellulaire et à l'excrétion de polymères extracellulaires, *e.g.*, le glycocalyx, qui forment une matrice dans laquelle les cellules sont engluées.

Ces polymères non indispensables à l'adhésion initiale ont un rôle primordial dans le développement et le maintien de la cohésion du biofilm (PRINGLE et al., 1983). En effet, ces polymères extracellulaires en maintenant les cellules en contact dans le biofilm assurent une juxtaposition des micro-organismes et ainsi un échange des métabolites permettant la croissance cellulaire et l'élimination des toxines mortelles pour certains organismes. Ils encouragent d'autre part la combinaison des activités enzymatiques dans un consortium qui dégrade le substrat de croissance.

A l'aide de techniques microscopiques permettant d'étudier spécifiquement les polymères impliqués dans l'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* au verre, FLETCHER et al., (1990), ont montré une différence de composition du polymère de l'adhésion initiale et du polymère du biofilm, estimés respectivement par IRM ("Interference Reflection Microscopy") et LSM ("Light Section Microscopy").

- Détachement du biofilm

Pendant la formation du biofilm, des portions se détachent de la surface et sont entraînées dans le flux liquide. Cependant, ce phénomène de détachement est négligeable sous des conditions statiques (FLETCHER, 1977), ce qui suppose que le taux de détachement est proportionnel aux forces de cisaillement (POWEL et SLATER, 1983).

En accord avec ceci, WOLLERSHEIM (1989) a montré qu'alors que l'adhésion initiale était un phénomène passif dépendant des propriétés physico-chimiques, le développement du biofilm est un processus actif qui dépend de la croissance des micro-organismes. En absence de substrat de croissance, les bactéries adhèrent jusqu'à un seuil de saturation au delà duquel l'attachement n'est plus possible. Au contraire, le développement du biofilm ne débute qu'en présence du substrat de croissance adéquat et est accompagné de l'excrétion d'exopolymères.

D'autre part, la colonisation des surfaces dépend des mélanges bactériens présents dans la phase liquide. Même dans le cas le plus simple où une seule espèce bactérienne est au contact d'une surface uniforme, l'adhésion introduit une hétérogénéité puisque les cellules peuvent soit adhérer à des zones nues de la surface, soit rejoindre des zones colonisées (COSTERTON et LAPPIN-SCOTT, 1989) impliquant dans certains cas un phénomène de coopérativité positive (NESBITT et *al.*, 1982).

Quand plusieurs espèces bactériennes sont présentes, les modèles de colonisation diffèrent puisque chaque souche peut réagir différemment à la surface; le succès de la première souche colonisatrice dépend de ses caractéristiques adhésives (Mc ELDOWNEY et FLETCHER, 1986) et de son affinité pour le substratum (FLETCHER et MARSHALL, 1982; Mc ELDOWNEY et FLETCHER, 1986). Cependant, la plupart des études ont été réalisées sur des cultures pures et l'attachement compétitif entre plusieurs espèces est très mal connu.

L'attachement d'une espèce bactérienne peut être influencé par la présence d'une seconde espèce, soit par compétition pour les sites de fixation, soit par encombrement stérique, soit par interactions des cellules entre elles entraînant parfois la formation de floccs dans la suspension (KUENEN et HARDER, 1982). D'autre part, la présence de macromolécules adsorbées sur le substratum conditionne la surface et altère les propriétés de la surface (FLETCHER et MARSHALL, 1982). Les bactéries elles-mêmes peuvent conditionner la surface soit en recouvrant les sites de fixation, soit par l'intermédiaire de leurs exopolymères ou en empêchant toute adhésion ultérieure par répulsion électrostatique

(RUTTER et VINCENT, 1984); en effet, la formation de monocouches bactériennes a rarement été observée ce qui suggère un nombre limité de sites de fixation (Mc ELDFOWNEY et FLETCHER, 1987).

Ainsi, la présence d'une première souche adhérente peut soit inhiber l'adhésion ultérieure (BIBEL et al., 1983), soit l'augmenter par stabilisation du biofilm selon un mécanisme de coopérativité inter-espèces (BRANTING et al., 1989; WILLCOX et al., 1990) ou ne pas l'affecter (Mc ELDFOWNEY et FLETCHER, 1987).

3.3 Cas des populations méthanogènes

3.3.1 Ultrastructure des granules et des biofilms méthanogènes

Les floccs sont des agrégats anaérobies qui possèdent une structure lâche et forment , après sédimentation, un surnageant trouble. Au contraire, les granules d'apparence bien définie donnent, après sédimentation, un surnageant clair et des agrégats qui sont encore visibles en tant qu'entités séparées (DOLFING, 1987).

L'attachement et l'agrégation peuvent être considérés comme une stratégie utilisée pour compenser les faibles taux de croissance pour des concentrations en substrats limitantes ou pour favoriser les transferts interespèces des métabolites grâce à la juxtaposition de groupes trophiques, notamment au sein des granules (CONRAD et al., 1985). Dans les environnements anaérobies, la teneur en hydrogène est maintenue à de faibles concentrations, l'attachement permet alors aux bactéries possédant une faible affinité pour l'hydrogène de concurrencer celles de plus forte affinité (TOMEI et al., 1985). En accord avec ceci, ISA et al., (1986), ont montré que les bactéries méthanogènes, grâce à leur capacité d'adhésion peuvent concurrencer les bactéries sulfato-réductrices de croissance plus rapide.

3.3.1.1 Granules

Ultrastructure des granules

DOLFING et *al.*, (1985) ont montré que les granules des boues méthanogènes étaient constitués de plusieurs morphotypes bactériens enrobés dans une matrice de matériel extracellulaire. BOCHEM et *al.*, (1982), ont étudié la répartition des populations microbiennes présentes dans les granules méthanogènes thermophiles et ont distingué trois couches:

- une couche externe constituée de "macrocytes" et de cellules coccoïdes type *Methanosarcina*,
- une couche médiane constituée de cellules ovoïdes non compactes,
- les cavités internes contenant des bâtonnets sont les sites exclusifs de la formation des gaz.

Les bactéries actives ne sont pas distribuées au hasard dans les granules, mais les micro-colonies sont bien définies dans une matrice (PRENSIER et *al.*, 1988). DUBOURGUIER et *al.*, (1985), ont montré que ces micro-colonies sont constituées de *Methanothrix* et d'organismes syntrophes (*Syntrophomonas* et/ou *Syntrophobacter*) associés à *Methanobrevibacter*, méthanogène hydrogénéophile la plus répandue dans les boues granuleuses.

Selon les observations microscopiques, les bactéries acétogènes et méthanogènes ne sont pas localisées en micro-colonies séparées mais elles sont juxtaposées dans un arrangement en réseau (THIELE et *al.*, 1988).

Dans des granules cultivés sur des effluents à forte teneur en sucres, HARADA et *al.*, (1988), ont observé une localisation distincte des différents groupes spécifiques d'organismes (organismes hydrolytiques et acidogènes) à la périphérie de ces granules et les organismes de type *Methanothrix* dominant au centre.

Formation des granules

HULSHOFF POL (1989) a émis l'hypothèse de granulation suivante: lors du démarrage du réacteur, la croissance des micro-organismes débute à la fois sous forme de biomasse dispersée et attachée (organismes attachés les uns aux autres ou aux particules organiques et inorganiques présentes). En appliquant graduellement une pression de sélection provenant de la charge hydraulique, les organismes qui poussent en culture dispersée et les floccs peu volumineux sont lessivés alors que les agrégats plus conséquents sont retenus dans le

digesteur. La sélection est basée sur les différences de propriétés de sédimentation des cellules isolées et des agglomérats bactériens. L'agrégation est donc tout d'abord gouvernée par la croissance bactérienne et on peut favoriser ce phénomène par:

- la présence de tous les nutriments essentiels, l'absence de concentrations inhibitrices de composés toxiques et un équilibre correct entre les cations mono et divalents dans l'eau résiduaire

- la température

- le pH (dans une gamme de 6,5 à 7,8)

- le type et la quantité de boues d'ensemencement utilisées

- le lessivage des boues présentant de faibles propriétés de décantabilité

- l'augmentation contrôlée de la charge organique quand plus de 80% des A.G.V sont dégradés (LETTINGA et *al.*, 1984).

De plus, la production de boues granuleuses est augmentée de façon significative par addition de supports spécifiques, *e.g.*, anthracite (WIEGANT et DE MAN, 1986).

3.3.1.2 Biofilms

Ultrastructure des biofilms

Contrairement aux boues granuleuses, on ne dispose que de quelques études concernant la composition et l'ultrastructure des biofilms anaérobies (HARVEY et *al.*, 1984; ROBINSON et *al.*, 1984). Il est clair que la nature du substrat dégradé va induire le développement préférentiel de telles ou telles espèces bactériennes mais il peut aussi influencer sur les structures de l'attachement.

Ainsi, certains auteurs ont indiqué l'intervention d'une matrice exopolysaccharidique dans la formation du biofilm (ROBINSON et *al.*, 1984; WOLLERSHEIM, 1989) alors que d'autres études n'ont fait apparaître aucune structure exocellulaire (FYNN et WHITMORE, 1982).

Lorsque le substrat est principalement composé d'A.G.V, *Methanosarcina* sp. est la bactérie méthanogène acétoclaste dominante pour des concentrations en acétate de 200 à 500 mg/l; aux concentrations inférieures, les cellules de *Methanosarcina* sont presque entièrement remplacées par *Methanothrix soehngenii* à cause de son affinité pour le substrat ($K_s = 0,7\text{mM}$ comparée à 5mM pour *Methanosarcina*) (GORRIS et *al.*, 1989).

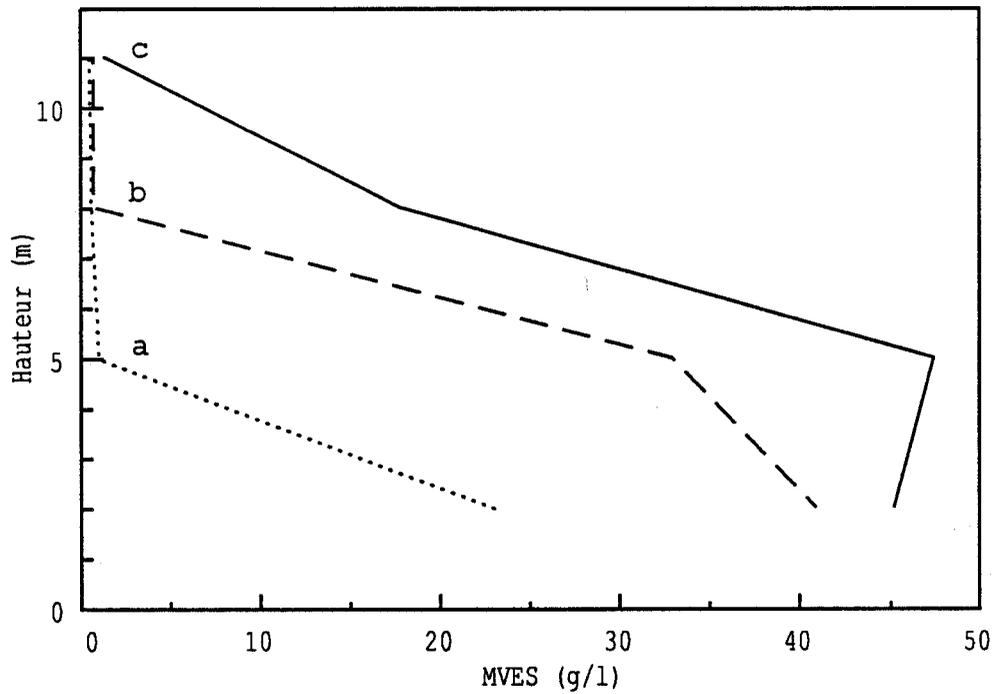


Figure 17. Accumulation de la biomasse dans un filtre anaérobie de type upflow garni de polypropylène; les échantillons ont été prélevés à: (a), 2 mois, (b), 6 mois, (c), 1 an.

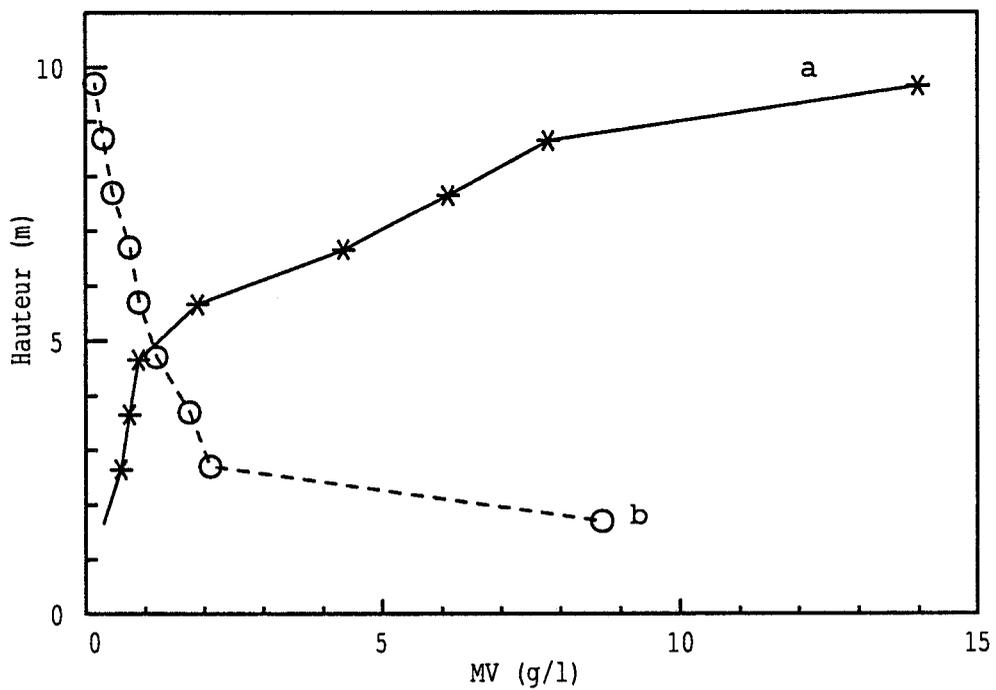


Figure 18. Accumulation de la biomasse dans un filtre anaérobie de type downflow garni d'anneaux PVC; (a), MVA, (b), MVES.

Formation des biofilms méthanogènes

En accord avec BRYERS et CHARACKLIS (1982), JIMENO et *al.*, (1990), ont observé un mode de croissance sigmoïde du biofilm (cf paragraphe 3.2) dans lequel l'attachement initial des bactéries méthanogènes se produit relativement rapidement (VERRIER et *al.*, 1988). JIMENO et *al.*, (1990), ont noté un décalage entre la production de gaz et l'accumulation du biofilm indiquant que le développement lent des biofilms anaérobies est une étape à vitesse limitante liée à la croissance des bactéries méthanogènes. Ces différences indiquent que la production de méthane n'est pas strictement couplée à la croissance de la biomasse (BHATIA et *al.*, 1985). En effet, l'addition de flocculants synthétiques facilite l'attachement bactérien mais ne permet pas nécessairement l'évolution d'une population stable et bien adaptée (STRONACH et *al.*, 1987).

En général, les biofilms méthanogènes sont faiblement liés aux matériaux plastiques et sont facilement érodés par le flux liquide (HUYSMAN et *al.*, 1983). C'est pourquoi la rugosité de surface, la porosité totale et la taille des pores du support sont des caractéristiques importantes qui affectent la colonisation. Des études microscopiques ont en effet montré que les bactéries colonisent préférentiellement les crevasses de grains de sable qui constituent des niches abritées (GORRIS et *al.*, 1988).

Dans les réacteurs garnis de matériaux non poreux, *i.e.* anneaux plastiques, l'accumulation et la rétention de la biomasse semblent principalement liées aux propriétés des surfaces (Figures 17 et 18) et au développement de boues possédant de bonnes propriétés de décantation.

4 . CONCLUSION

Il ressort que, 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 eaux résiduaires par des procédés à culture fixée demeure inexplorée.

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 la formation des biofilms anaérobies.

MATERIELS ET METHODES

1 . SOUCHES BACTERIENNES ET MILIEU DE CULTURE

1.1 Souches bactériennes

Le choix des bactéries étudiées a été dicté soit en raison de leur présence au sein des digesteurs industriels (*Methanospirillum hungatei*, *Methanotherrix soehngenii*, *Methanobrevibacter arboriphilicus*), soit en tant que souches témoins retenues en fonction de leur propriétés de surface (*Propionibacterium jensenii*, *Lactobacillus plantarum*, *Desulfovibrio sp.*) (Tableau XI).

1.2 Conditions de culture

1.2.1 Milieu de culture

Les souches bactériennes ont été cultivées à pH 7 sur milieu BCYT (Basal Carbonate Yeast extract Trypticase) décrit par TOUZEL et ALBAGNAC (1983), (composition en ANNEXE I). Les cultures ont été réalisées en batch, en anaérobiose.

1.2.2 Inoculum et incubation

Après réduction à la cystéine-HCl (2% v/v) et addition des substrats de croissance adéquats, les milieux ont étéensemencés par 5% (v/v) d'inoculum et les cultures incubées à 37°C.

Pour toutes les analyses, les cellules ont été recueillies en début de phase stationnaire de croissance par centrifugation (19800 g, 20 mn), et, dans la majorité des cas rincées deux fois au tampon BC7 (composition en ANNEXE I) et les culots ont été remis en suspension dans le même tampon.

2 . MATERIAUX ET TRAITEMENT DE SURFACE

2.1 Choix des matériaux

Trois supports solides ont été sélectionnés soit en raison de leur "intérêt technologique" (Chlorure de polyvinyle, PVC qui nous a servi de support

référence), soit à cause de leurs propriétés de surface très différentes (Polystyrène, PS et VERRE) (Tableau XII). Ces trois solides ont été découpés en lames de 40 x 20 x 1 mm.

Tableau XII. Propriétés physiques des matériaux utilisés

Supports	Origine	Densité	Formule
Chlorure de polyvinyle (PVC)	Société des Plastiques Nobles (Bobigny)	1,38	$\left\{ -CH_2 - \underset{\text{Cl}}{\underset{ }{C}} H - \right\}_n$
Polystyrène (PS)	Boîtes de Pétri	1,05	$\left\{ -CH_2 - \underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\underset{ }{C}} H - \right\}_n$
Verre	Lames de microscope	2,2	SiO ₂

2.2 Protocole de nettoyage

Dans le but d'éviter tout risque de contamination, un protocole de nettoyage des solides a été mis au point. Le protocole standardisé retenu est le suivant:

- Immersion des lames de matériaux dans une solution de détergent, le RBS 35 (Société des Traitements chimiques de surfaces, FRELINGHIEN) à 2% (v/v) pendant 10 mn.

- Rinçages: 5 rinçages à l'eau chaude (3 mn par bain) ont été suivis de 5 rinçages à l'eau distillée (1 mn par béccher).

- Rinçage au méthanol (3 mn).

- Séchage à l'abri de la poussière.

Les surfaces ont été lavées avant chaque test pour éviter un stockage prolongé.

2.3 Oxydation sulfurique

Le polystyrène sulfoné (SPS) et le chlorure de polyvinyl sulfoné (SPVC) ont été préparés selon la méthode décrite par PRINGLE et FLETCHER (1986). Les lames de PS et de PVC ont été immergées dans l'acide sulfurique concentré pendant 24 h à température ambiante, abondamment rincées à l'eau distillée et séchées.

2.4 Traitement aux polyélectrolytes

L'influence des polycations a été étudiée par traitement du PVC à la poly-L-Lysine (SIGMA): une solution de poly-L-Lysine (7,5 µg/cm² en concentration finale) a été déposée sur les lames de PVC, pendant 20 mn à température ambiante (LAMBERTS et al., 1985). Après un rinçage extensif à l'eau distillée, les lames ont été séchées.

2.5 Traitement aux cations trivalents

2.5.1 Protocole de traitement

La méthode décrite par MOZES et al., (1987) a été légèrement modifiée: les différents matériaux (PS, PVC, VERRE, SPS, SPVC) ont été traitées par immersion dans une solution de FeCl₃ 2mM pendant une nuit à température ambiante, puis abondamment rincés à l'eau distillée. Les lames destinées aux test d'adhésion ont été utilisées telles quelles sans séchage; celles destinées aux analyses de caractérisation des surfaces ont été séchées.

2.5.2 Dosage des ions ferriques adsorbés

- Extraction du fer

Les ions ferriques ont été extraits de la surface en introduisant les lames des différents substrata (30 x 10 x 1 mm) dans des tubes contenant 5 ml d'HCl à 10% (v/v). Les tubes ont été maintenus à 100°C pendant 2 h et le

fer a été dosé dans la solution d'HCl. Parallèlement des lames non traitées ont subi le même procédé d'extraction; le fer a également été dosé dans l'HCl utilisé pour l'extraction.

- Dosage du fer

Différentes méthodes de dosage peuvent être utilisées pour le dosage du fer dans les échantillons (Tableau XIII).

Tableau XIII. Méthodes de dosage du fer utilisées en analyse des sols

Seuil de détection (mg/l)	Technique de dosage
0,05	Spectrométrie d'absorption atomique à flamme
0,002	Dosage colorimétrique à l'orthophénanthroline

Nos échantillons ont été analysés par dosage colorimétrique à l'orthophénanthroline à l'aide d'un spectrocolorimètre PYE UNICAM SP 8.100 équipé d'une microcuve à circulation au Laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'ARRAS.

La description de la méthode est détaillée en ANNEXE II.

3 . CARACTERISATION DES SURFACES

Pour comprendre les phénomènes interfaciaux (cellule-support, cellule-cellule) impliqués dans l'adhésion cellulaire, il est important de disposer d'informations sur la composition chimique et les propriétés physico-chimiques des surfaces considérées.

3.1 Surfaces bactériennes

3.1.1 Détermination de l'hydrophobicité

3.1.1.1 Test d'adhésion à l'interface eau-hydrocarbure

La méthode de partition eau-solvant apolaire décrite par ROSENBERG (1980) a été adaptée à nos essais: différents volumes d'hexadécane (100; 250; 500

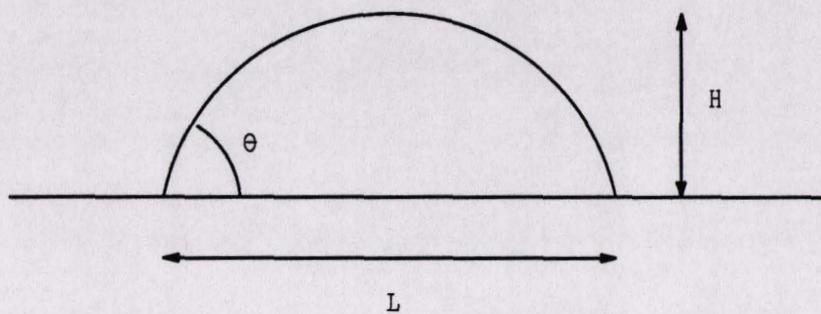


Figure 19. Mesure de l'angle de contact θ

µl) ont été ajoutés à 1 ml de suspension bactérienne ($DO_{400\text{ nm}} = 0,5$ au minimum). Les tubes ont été préincubés 10 mn à 37°C puis agités pendant 2 mn. Après 30 mn de séparation de phases, la densité optique (DO) de la phase aqueuse prélevée a été mesurée à 400 nm. Le pourcentage de cellules liées à l'interface eau-hexadécane est calculé par l'équation:

$$\% \text{ cellules à l'interface} = \frac{(DO_{\text{initiale}} - DO_{\text{phase aqueuse}})}{DO_{\text{initiale}}} \times 100$$

Chaque essai a été réalisé en triple sur au moins deux cultures différentes.

3.1.1.2 Mesure des angles de contact de l'eau sur tapis bactérien

Les tapis bactériens ont été préparés par filtration sous vide des suspensions bactériennes sur filtre Millipore (Membrane en ester de cellulose de type HAWP, porosité $0,45\text{ }\mu\text{m}$). Les filtres portant une couche bactérienne homogène ont alors été montés sur lame de verre et séchés en dessiccateur pendant 30 mn. L'angle de contact à l'équilibre que forme une goutte ($0,05\text{ }\mu\text{l}$) d'eau bidistillée (eau milliQ, Millipore) ou d'un autre liquide de avec la surface a été mesuré. Cette technique décrite par ABSOLOM et *al.*, (1983) a été rigoureusement standardisée; en effet, la goutte déposée pénètre rapidement dans le tapis bactérien (2 à 10 s) rendant impossible l'estimation de l'angle à l'équilibre, nous avons donc complété le banc de mesure par un système d'enregistrement vidéo et d'un timer (MITSUBICHI Co.) qui ont permis de suivre, avec un pas de 40 ms, l'évolution en fonction du temps de l'angle de contact θ . L'angle de contact est calculé à partir des mesures de la largeur et de la hauteur de la goutte en supposant la goutte sphérique (BARTELL et ZUIDEMA, 1936) selon l'équation (Figure 19):

$$\theta = 2 \text{ Arc tan } \left(2 \frac{h}{l} \right)$$

Chaque test a été dupliqué et répété sur trois cultures indépendantes pour chaque souche.

3.1.1.3 Détermination des énergies de surface des bactéries

Les mesures d'angle de contact ont également été utilisées pour déterminer les énergies de surface des bactéries (γ_B) à partir des composantes polaire (γ_B^p) et de dispersion γ_B^d : $\gamma_B = \gamma_B^p + \gamma_B^d$

Des séries de mesure d'angle de contact de mélange eau/ n-propanol ont été utilisées pour le calcul des énergies libres des surfaces bactériennes (BUSSCHER et al., 1984a). Les méthodes de mesure et de calcul sont détaillées en Annexe III.

3.1.2 Mesure de la mobilité électrophorétique

Ces mesures ont été réalisées au Laboratoire de Physico-chimie de l'Université d'Agriculture de Wageningen, Pays-Bas.

Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 13000 g, 15 mn et rincées à l'eau bidistillée. Avant chaque mesure, les culots ont été remis en suspension dans des solutions ajustées à différents pH (eau bidistillée ajustée à pH2 ou pH12, NaCl 10 mM amenée à pH3, pH4 ou 10 et tampon PBS 10mM pH7).

La mobilité électrophorétique a été mesurée à l'aide d'un vélocimètre à laser Doppler, type APC 602, équipé d'un zetasizer II (Malvern Instruments, Royaume Uni). La cellule de microélectrophorèse était un capillaire en quartz. Par cette technique, on mesure en fait la fréquence de la lumière réfractée par les particules sous l'effet du laser et de la vitesse, c'est l'effet Doppler.

3.1.3 Détermination de la composition des surfaces bactériennes par X.P.S

Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de Chimie des Interfaces de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgique.

La composition de surface étant très sensible à la contamination par adsorption, il était impératif de suivre avec précaution le protocole établi par AMORY et al., (1988):

Les cellules ont été recueillies par centrifugation (19800 g, 20 mn) et rincées trois fois à l'eau distillée glacée. Le dernier culot a immédiatement été transféré dans un pilulier et congelé dans l'azote liquide pendant 15 mn et enfin lyophilisé sous vide (Lyovac GT4, Leybold Heraeus). La poudre de cellules lyophilisées a ensuite été pressée pour obtenir une pastille de surface lisse.

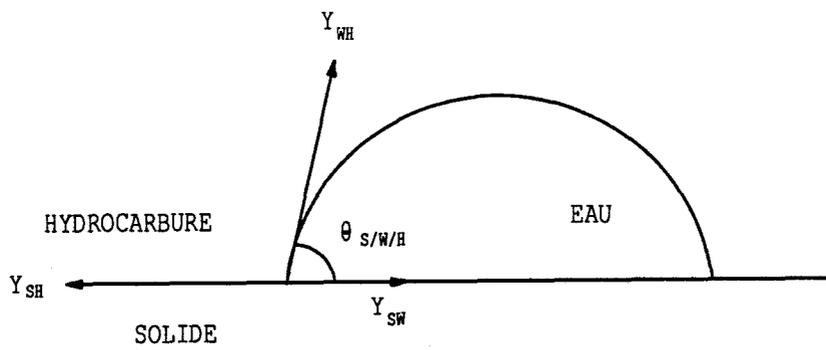


Figure 20. Modèle de YOUNG dans un système à deux liquides

Les analyses en X.P.S ont été réalisées à température ambiante à l'aide d'un spectromètre à photoélectrons X (SSX100 modèle 206, Surface Science Instruments, SSI). Une anode d'aluminium ($Al_{K\alpha}$), accompagnée d'un monochromateur, a été utilisée comme source de rayons X. Après un balayage de l'ensemble du spectre, l'ordre d'enregistrement des pics est le suivant: C_{1s} (5 mn), O_{1s} (5 mn), N_{1s} (15 mn), K_{2s} (25 mn), P_{2p} (25 mn) et de nouveau C_{1s} (5 mn). Le calcul des intensités de pic a été réalisé à partir de l'aire sous chaque pic. Pour chaque série de mesures, un échantillon de silice a servi de témoin permettant de déterminer les concentrations absolues et de déceler une contamination inattendue. La méthode spectrométrique est détaillée en ANNEXE IV.

Ces essais ont tous été réalisés à partir de deux cultures indépendantes pour vérifier la reproductibilité des résultats.

3.2 Supports solides

3.2.1 Détermination de l'hydrophobicité

3.2.1.1 Mesure des angles de contact

Le principe de base est le même que pour les bactéries. Cependant, aucun problème de capillarité n'a été observé, l'angle de contact se stabilisait au bout d'une à deux secondes ce qui nous a permis de réaliser les mesures par projection des gouttes sur un écran sans avoir recours au système d'enregistrement vidéo. Les résultats reportés représentent la moyenne de 20 mesures par plaque. Chaque essai a été réalisé en triple.

3.2.1.2 Mesure des énergies de surface

Les énergies de surface des supports solides ont été déterminées par la méthode à deux liquides (TAMAI et al., 1967).

La méthode consiste à remplacer la phase vapeur par un deuxième liquide non miscible au premier (Figure 20). Dans un système à deux liquides, l'équation de YOUNG s'écrit à l'équilibre:

$$\gamma_{SH} = \gamma_{SW} + \gamma_{HW} \cos \theta + \pi_e$$

où: γ_{SH} : Energie de l'interface Solide-Hydrocarbure
 γ_{SW} : Energie de l'interface Solide-Eau

γ_{HW} : Energie de l'interface Hydrocarbure- Eau

θ : Angle de contact solide-eau-hydrocarbure

π_* : Pression d'étalement due à l'adsorption de la phase vapeur.

Cette technique qui permet de s'affranchir de la pression d'étalement, est détaillée en Annexe V.

En pratique, les lames de supports ont été immergées dans un alcane (Octane, hexane, décane, pentane ou hexadécane) et on a déposé une goutte d'eau milliQ (Millipore).

Chaque essai a été réalisé en triple et 20 mesures ont été effectuées par lame.

3.2.2 Mesure de la rugosité

Les mesures de rugosité des supports solides traités ou non ont été réalisées au Laboratoire de Génie de l'Hygiène et des Procédés Alimentaires, INRA, Massy Palaiseau, par la technique du stylet à l'aide d'un rugosimètre à palpeur à pointe de diamant (rayon de 5 μm) DIAVITE DT 100 (Société ASMETO).

Les valeurs mesurées sont:

- la rugosité moyenne R_a : c'est la somme arithmétique de tous les écarts du profil de rugosité à la ligne moyenne pour une longueur d'évaluation l_t :

$$R_a = \frac{1}{l_t} \int_0^{l_t} |y| \cdot dx$$

- la rugosité maximale R_t : c'est l'écart vertical maximal entre le point le plus haut et le point le plus bas du profil de rugosité, sur la longueur l_t divisée en 5 segments. Deux longueurs de mesure ont été utilisées (4 mm et 1,25 mm) nous permettant d'obtenir deux échantillonnages différents dont un grossier (4 mm) et un plus fin (1,25 mm).

Les résultats présentés sont la moyenne d'au moins 10 mesures par plaque et chaque essai a été renouvelé trois fois.

4 . TEST D'ADHESION DES CULTURES PURES

4.1 Quantification de l'adhésion

Ces tests ont été réalisés par dépôt d'une suspension bactérienne (2 ml) sur les lames supports disposées dans des boîtes de Pétri stériles. Après 2

h d'incubation statique à 35°C, les lames ont été rincées par trempage dans du tampon BC7 stérile afin d'éliminer les cellules libres et les cellules faiblement attachées. Les lames ont ensuite été colorées par une solution d'Acridine Orange 0,01% pendant 15 mn, rincées à nouveau et séchées. Les plaques de support ont alors été montées sur lames de microscope et observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (OLYMPUS BH-2). De 25 à 50 champs par lame ont été dénombrés à l'aide d'un analyseur d'images (QUANTIMET Q10, Cambridge Instruments) connecté au microscope par une caméra équipée d'un tube Newicon. Chaque essai a été dupliqué.

Par ce procédé, l'adhésion a pu être quantifiée par le nombre de bactéries adhérentes au mm² de support et/ou par le pourcentage de recouvrement qu'occupaient les cellules attachées.

4.2 Numération des suspensions bactériennes

La coloration à l'Acridine Orange décrite par HOBBIÉ et al., (1977), a été utilisée: 2 ml de suspension bactérienne diluée ont été colorés par une solution d'Acridine Orange 0,01% pendant 5 mn puis filtré sur membrane Nucléopore (membrane en polycarbonate, porosité 0,2µm). A partir du comptage de l'analyseur d'images (25 champs par filtre), le nombre de bactéries présentes dans la suspension a été calculé par l'équation suivante:

$$N \text{ (Bactéries/ml)} = \left(\frac{x}{s}\right) \left(\frac{Sf}{v}\right)$$

où

- x: nombre moyen de bactéries par champ
- s: surface de comptage de l'analyseur
- S: surface du filtre
- f: facteur de dilution de la suspension bactérienne
- v: volume filtré.

5 . EFFETS DE TRAITEMENTS CELLULAIRES SUR L'HYDROPHOBICITE ET L'ADHESION

Dans le but d'étudier l'intervention des polymères extracellulaires dans l'adhésion au PVC, nous avons effectué des traitements des cellules de *Lactobacillus plantarum* et de *Desulfovibrio sp.*, souches choisies en fonction de leur propriétés de surface particulières et par la présence d'acide lipotéichoïque (LTA) et de lipopolysaccharide (LPS) respectivement, dans la couche externe de ces deux bactéries.

Dans les deux cas, les bactéries ont été recueillies par centrifugation (19800 g, 20 mn), suivie de deux rinçages au tampon PBS 1 mM, pH 7,1. Les culots ont été remis en suspension dans ce même tampon.

5.1 *Lactobacillus plantarum*

5.1.1 Traitement au lysozyme

Le protocole décrit par KANATANI et *al.*, (1989), a été légèrement modifié. Les suspensions de *Lactobacillus plantarum* ont été préincubées, sous agitation douce, en présence de lysozyme (40 µg/ml) (SIGMA), 3h à 37°C. Après centrifugation et rinçage des cellules, l'angle de contact de l'eau sur les cellules a été mesuré ainsi que l'adhésion.

5.1.2 Adhésion en présence de LTA exogène

L'intervention de l'acide lipotéichoïque (LTA) dans l'adhésion de *Lactobacillus plantarum* au PVC a été recherchée en incubant simultanément la suspension bactérienne et le LTA (2 mg/ml) de *Staphylococcus aureus* (SIGMA) 2h à 37°C en présence du PVC.

Dans ces deux expériences, les résultats ont été comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec des cellules non traitées.

5.2 *Desulfovibrio sp.*, G11

5.2.1 Extraction des LPS

BRADLEY et GAYLARDE (1988) ont montré que le LPS des *Desulfovibrio* pouvait interagir avec différents cations métalliques et être libérés, en totalité ou en partie, par un chélatant comme l'EDTA (Ethylène Diamine Tetra Acétate ou Tritriplex III) (MERCK).

La suspension bactérienne a été préincubée en présence d'EDTA (1 mM) 3mn à 37°C puis centrifugée et rincée au PBS 1 mM. Une fraction de la suspension bactérienne traitée a été utilisée pour la mesure de l'angle de contact de l'eau et pour le test d'adhésion au PVC. L'autre partie a subi une préincubation

en présence de LPS commercial d'*Escherichia coli* (SIGMA) (2 mg/ml) 1h à 37°C, suivie d'une centrifugation et de rinçages avant la mesure de angle de contact de l'eau et le test d'adhésion.

5.2.2 Adhésion en présence de LPS exogène

Le test d'adhésion a été réalisé en incubant simultanément la suspension bactérienne et des solutions de LPS commercial d'*Escherichia coli* (SIGMA) à différentes concentrations: 0,5; 1; 2; 4 mg/ml pendant 2h à 37°C en présence du PVC.

6 . ADHESION DE POPULATIONS MIXTES AU PVC

Après croissance en culture pure, les cellules de deux couples bactériens (*Methanospirillum* et *Methanobrevibacter*; *Methanospirillum* et *Desulfovibrio*) ont été resuspendues dans du tampon BC7, soit seules, soit en mélange binaire à des concentrations de 10⁹ bactéries/ml. Les essais d'attachement suivants ont été réalisés (le protocole d'adhésion a été décrit au paragraphe 4):

- Témoin attachement

Test d'adhésion de suspensions ne contenant qu'une seule espèce bactérienne.

- Attachement simultané

Deux espèces bactériennes (soit *Methanospirillum* et *Methanobrevibacter*, soit *Methanospirillum* et *Desulfovibrio*) ont été mélangées en suspension et le test d'adhésion a été réalisé à partir de ce mélange binaire.

- Attachement séquentiel ou détachement

Ce test a été effectué pour étudier l'éventualité du déplacement d'une première souche colonisante par l'apport d'une seconde espèce. Après le test d'adhésion de suspensions pures, nous avons réalisé un second test d'adhésion qui consistait à déposer des concentrations croissantes de la seconde espèce du couple bactérien (2h à 37°C).

- Témoin détachement

Pour vérifier qu'une partie des cellules de la première souche colonisante n'était pas déplacée par le liquide, nous avons réalisé le test suivant: la

première partie de ce test est la même que pour le témoin attachement. Après cette première étape, nous avons déposé du tampon BC7 et incubé de nouveau 2h à 37°C avant le rinçage final et la coloration.

7 . ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats reportés ci-dessous représentent la moyenne de différents essais réalisés dans les mêmes conditions (*e.g.*, mesures des angles de contact, tests d'adhésion,...).

Il était donc nécessaire de comparer les moyennes des analyses prises séparément pour vérifier la reproductibilité des résultats et leur signification.

Les moyennes des expériences faisant intervenir un traitement de surface ont également été analysées statistiquement pour s'assurer de l'efficacité du traitement, c'est-à-dire de vérifier que les moyennes sont différentes de façon significative.

La comparaison des moyennes a été traitée par la loi de t de Student. Cette loi de t converge vers la loi normale centrée-réduite quand le nombre de degrés de liberté augmente ($n > 30$); de même, quand les effectifs des deux échantillons sont identiques, il n'est pas nécessaire de vérifier l'hypothèse d'égalité des variances qui, dans le cas contraire, a été étudiée par les tests de Barlett et de Hartley (GOUET, 1974).

RESULTATS

1 . CARACTERISATION DES SURFACES

1.1 Surfaces bactériennes

Quelque soit le mécanisme d'adhésion bactérienne, c'est-à-dire impliquant soit des interactions stéréochimiques spécifiques (DOYLE et NESBITT, 1982), soit des interactions physico-chimiques macroscopiques comme les interactions électrostatiques et hydrophobes ou les deux, il est important de disposer de méthodes adéquates pour mesurer les propriétés des surfaces bactériennes.

1.1.1 Hydrophobicité

1.1.1.1 Test d'adhésion à l'interface eau-solvant apolaire et angles de contact

Les résultats du test d'adhésion à l'interface eau-hexadécane et les valeurs moyennes de l'angle de contact de l'eau pour les différentes souches testées sont présentés dans le tableau XIV.

Tableau XIV. Détermination de l'hydrophobicité relative des bactéries

Micro-organisme	Angle de contact de l'eau θ_{eau} (°)	Bactéries à l'interface (%)
<i>Propionibacterium</i>	26,6 ± 0,9 (a)	16,0
<i>Lactobacillus</i>	27,3 ± 0,1	17,0
<i>Methanospirillum</i>	31,4 ± 1,7	22,0
<i>Methanothrix</i>	37,2 ± 0,3	27,0
<i>Methanobrevibacter</i>	39,9 ± 0,1	30,0
<i>Desulfovibrio</i>	41,8 ± 0,3	32,4

(a): Déviation standard sur la moyenne

La déviation standard des angles de contact est relativement faible ($\pm 1^\circ$), indiquant que la surface du film bactérien est plutôt homogène.

Bien que les deux tests ne soient pas basés sur les mêmes propriétés (le test eau-hexadécane mesure la liaison à l'hexadécane hydrophobe et la mesure des angles de contact donne des estimations des propriétés de surface dans son ensemble), les résultats obtenus par ces deux techniques vont dans le même sens (Figure 21) et montrent que les bactéries testées peuvent être classées dans une gamme de bactéries hydrophiles (*Propionibacterium*) à moyennement hydrophobes (*Desulfovibrio*).

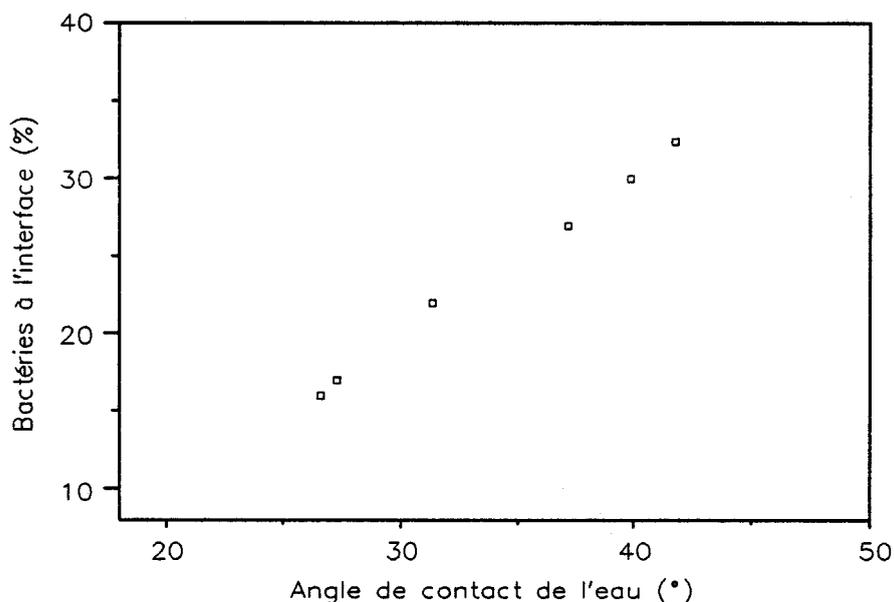


Figure 21. Corrélation entre les techniques de détermination de l'hydrophobicité bactérienne.

La corrélation observée dans ces expériences ($r^2= 0,99$) est en désaccord avec les résultats de Van Loosdrecht et *al.*, (1987a) qui n'ont observé aucune adhésion des bactéries hydrophiles ($\theta < 30$) à l'hexadécane. Bien que le test de partition ait fourni des résultats concordants avec ceux des mesures des angles de contact, cette méthode est peu résolutive et peu reproductible et ne permet de différencier exactement que des souches d'hydrophobicité très différente.

Nous avons conservé dans la suite des travaux comme méthode de référence de détermination de l'hydrophobicité relative des bactéries, la mesure des angles de contact de l'eau. De plus, le système d'enregistrement vidéo a permis d'améliorer, par rapport à la technique classique, la reproductibilité et la précision des déterminations sur les tapis bactériens et également de distinguer les phases d'évolution de l'angle: étalement de la goutte, stabilisation et mesure puis diminution de l'angle sous l'action de la capillarité.

1.1.1.2 Energies de surface des bactéries

Dans le but de déterminer l'hydrophobicité nette des bactéries, nous avons calculé leur énergie libre de surface par la technique décrite par BUSSCHER et al., (1984a). Les valeurs des énergies de surface (γ_B) des différentes souches bactériennes étudiées, décomposées en composante polaire (γ_B^p) qui représente les interactions électrostatiques, dipolaires et les liaisons hydrogène et en composante de dispersion (γ_B^d) qui reflète les interactions de London entre deux molécules apolaires et la pression d'étalement de la goutte, sont présentées dans le tableau XV.

Tableau XV. Composantes polaire et de dispersion des énergies de surface des bactéries et pression d'étalement

Micro-organisme	Energie de surface (mJ. m ⁻²)				Pression d'étalement (mJ. m ⁻²)
	γ_B	γ_B^p	γ_B^d	$\gamma_{BV}^{(a)}$	
<i>Methanospirillum</i>	146,2	119,9	26,3	74,3	71,9
<i>Propionibacterium</i>	125,1	98	27,1	69,5	55,6
<i>Lactobacillus</i>	121,2	94,1	27,1	66,3	54,9
<i>Methanothrix</i>	110,3	83,7	26,6	56,6	53,7
<i>Methanobrevibacter</i>	101	74	27	49,5	51,5
<i>Desulfovibrio</i>	96,5	71,4	25,1	51,3	45,2

(a) Energie de surface bactérienne en présence de vapeur ($\gamma_{BV} = \gamma_B - \pi_e$)

La différence observée dans l'énergie de surface des bactéries est principalement causée par la composante polaire (γ_B^p) qui varie de 71,4 à 119,9 mJ. m⁻², en accord avec les résultats décrits par BUSSCHER et al., (1984a) et VAN PELT et al., (1984), alors que la composante de dispersion est comprise dans une gamme étroite allant de 25,1 à 27,1 mJ. m⁻² pour toutes les souches testées.

D'autre part, les résultats montrent que la pression d'étalement de la goutte (π_e), comprise entre 45 et 72 mJ. m⁻², n'est pas négligeable.

Ces mesures ont permis de classer les bactéries en terme d'hydrophobicité nette: la bactérie la plus hydrophile dans ces mesures est représentée par *Methanospirillum* et la plus hydrophobe par *Desulfovibrio*. Il faut toutefois noter que *Methanospirillum* ne représentait pas la bactérie la plus hydrophile lors des mesures des angles de contact de l'eau. Mis à part cette exception, l'ordre d'hydrophobicité croissante est conservé dans les deux tests.

Une corrélation entre la pression d'étalement et l'énergie de surface a été observée ($r^2= 0,9$), c'est-à-dire que la bactérie la plus hydrophile (γ_B plus élevé) présente une pression d'étalement plus élevée (Figure 22).

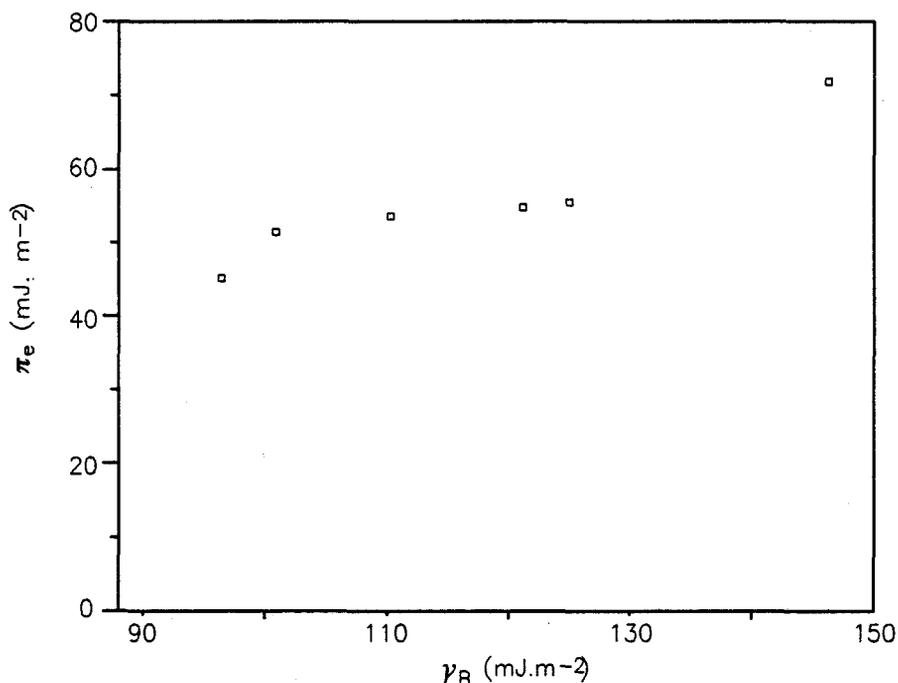


Figure 22. Importance de la pression d'étalement dans la mesure des énergies de surface des bactéries.

1.1.2 Mobilité électrophorétique

La microélectrophorèse cellulaire a été utilisée pour déterminer le comportement électrocinétique des cellules bactériennes. Cette technique permet de mesurer la charge nette globale des cellules intactes sans aucune forme de dénaturation.

La mobilité électrophorétique est déterminée par la nature et le nombre de groupements ionisables sur la surface bactérienne et par les propriétés des

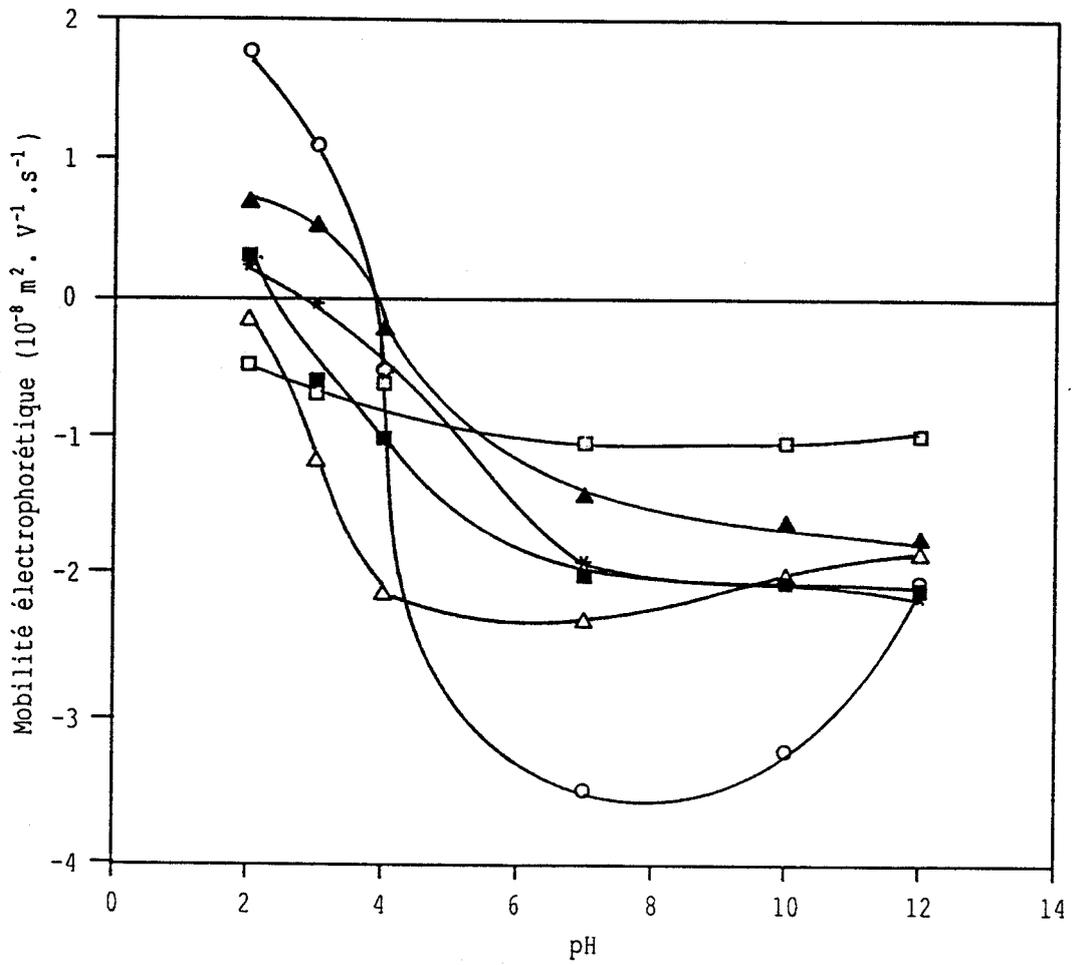


Figure 23. Comportement électrophorétique des bactéries en fonction du pH
 (▲), *Methanotherix*; (■), *Methanobrevibacter*; (*), *Methanospirillum*;
 (□), *Lactobacillus*; (△), *Propionibacterium*; (○), *Desulfovibrio*.

électrolytes en suspension (*e.g.*, pH, force ionique ou présence de surfactants). Pour identifier ces groupements ionisables en détail, nous avons mesurer les mobilités dans une gamme de pH de 2 à 12 (Figure 23).

Toutes les souches testées sont négativement chargées pour la plupart des valeurs de pH. *Desulfovibrio* montre la charge la plus négative et *Lactobacillus* représente la bactérie la moins chargée négativement. Les autres souches présentent des comportements électrophorétiques typiques de la surface des micro-organismes (SMALL et MOORE, 1987). Les différences reproductibles des profils électrophorétiques observées reflètent des différences de composition de la surface cellulaire. Il est cependant nécessaire de rappeler que cette mesure est une estimation de la charge de l'ensemble de la surface bactérienne, dépendant de l'exposition à l'extérieur des groupements ionisables. En effet, SONNENFELD et *al.*, (1985) ont montré que les sites électronégatifs étaient localisés dans des régions bien précises de *Bacillus subtilis*.

La mobilité positive généralement observée à faible pH, à l'exception de *Lactobacillus*, est probablement occasionnée par un excès de charges positives des groupements amine de la surface en rapport avec les groupements phosphate partiellement protonés et les groupements carboxyle complètement protonés. La charge toujours négative de *Lactobacillus* pourrait être attribuée aux groupements phosphate de faible constante de dissociation. Aux valeurs de pH plus élevées, la mobilité diminue à cause de la dissociation croissante des groupements carboxyle et phosphate (VAN DER MEI et *al.*, 1988). La ressemblance des profils de *Methanospirillum* et de *Methanotherix* suggère des compositions de surface similaires. Pour des valeurs de pH inférieures à 4, l'ionisation des groupements carboxyle est supprimée alors que les groupements phosphate d'acidité plus forte ($pK_a = 2,1$), restent chargés (ARCHIBALD, 1988).

Ces courbes ont d'autre part permis une détermination exacte des points isoélectriques (IEP) de l'ensemble des bactéries à l'exception de *Lactobacillus* toujours chargée négativement pour laquelle le point isoélectrique a été déterminé par extrapolation. Le tableau XVI représente les points isoélectriques et les mobilités électrophorétiques à pH 7 des bactéries étudiées.

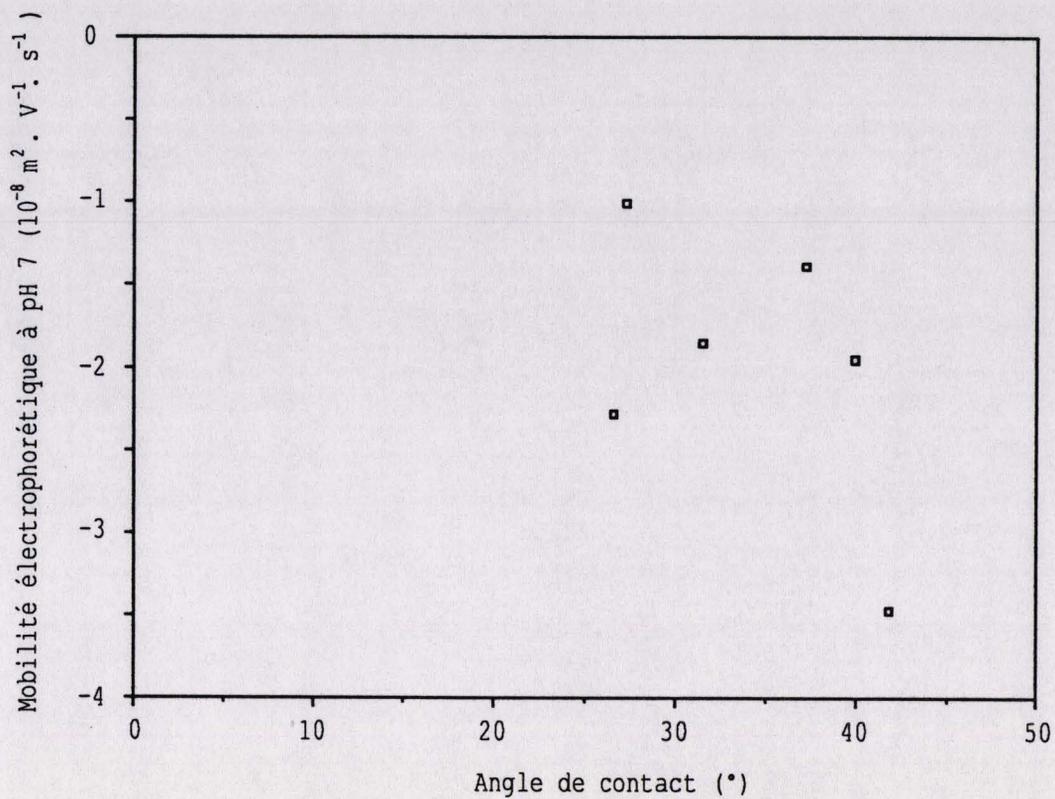


Figure 24. Relation entre les propriétés des surfaces bactériennes

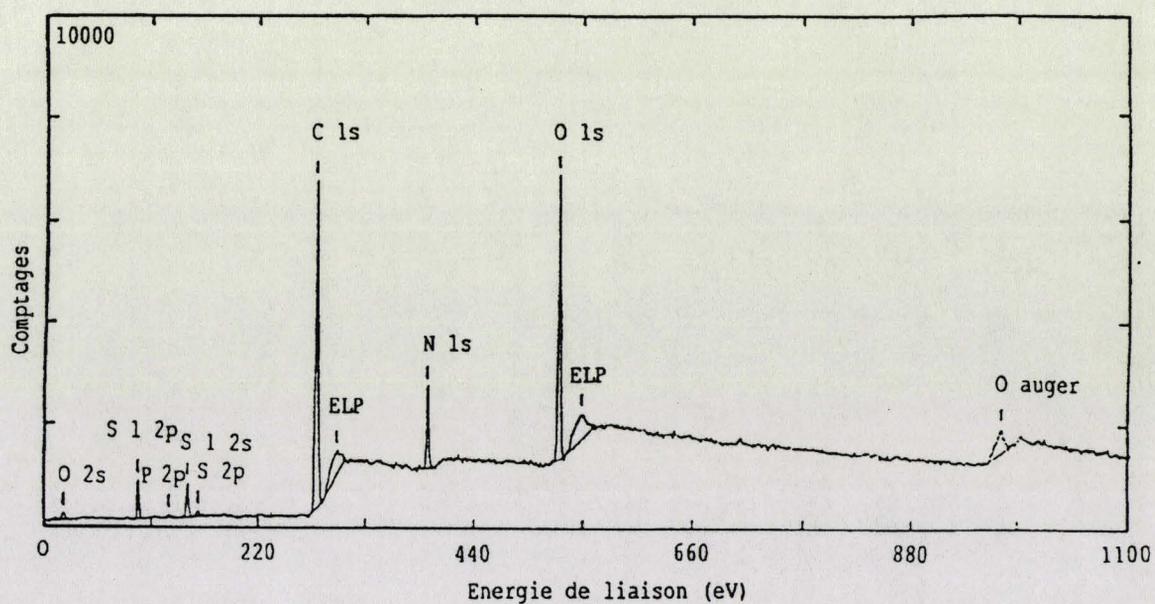


Figure 25. Spectre XPS général typique, exemple de *Methanotherix*.
(ELP): Energy Loss Peak

Tableau XVI. Caractéristiques électrocinétiques des micro-organismes

Micro-organisme	Mobilité électrophorétique à pH 7 ($10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Point isoélectrique (IEP)
<i>Desulfovibrio</i>	-3,47	3,7
<i>Propionibacterium</i>	-2,28	1,9
<i>Methanobrevibacter</i>	-1,95	2,4
<i>Methanospirillum</i>	-1,85	3,0
<i>Methanothrix</i>	-1,39	3,7
<i>Lactobacillus</i>	-1,01	0,8

Les IEP sont rangés dans une gamme de 2 à 4, gamme classique pour le monde bactérien (VAN LOOSDRECHT et *al.*, 1987b; VAN DER MEI et *al.*, 1988).

Il ressort de ces analyses que les cellules moyennement hydrophobes possèdent des potentiels électrocinétiques négatifs élevés (Figure 24), ce qui paraît contradictoire mais en accord avec STENSTROM, (1989), ceci étant dû au fait que les groupements chargés occupent seulement une petite fraction de la surface totale. Le potentiel de surface résulte seulement partiellement des groupements chargés de la surface externe, mais aussi des groupements chargés situés dans des couches plus profondes de la paroi cellulaire (VAN LOOSDRECHT et *al.*, 1987b).

1.1.3 Composition élémentaire des surfaces bactériennes

1.1.3.1 Composition des surfaces bactériennes déterminée en XPS

La figure 25 montre un exemple de spectre XPS de *Methanothrix*. L'ordre des pics du spectre général est le suivant: C_{1s} , O_{1s} , N_{1s} , P_{2p} , K_{2p3} , Na_{1s} , S_{2p} et C_{1s} ; C, O et N constituent les éléments principaux des surfaces cellulaires et P, K, Na et S les éléments mineurs.

L'intensité des pics des différents éléments a été convertie en concentration en utilisant les facteurs de sensibilité publiés (WAGNER et *al.*, 1981). Les concentrations ont été calculées en fractions atomiques (%) et exprimées

alors en termes de concentrations relatives (O/C, N/C, P/C, K/C, Na/C). Les résultats des cultures dupliquées sont reproductibles jusqu'à 10% pour les éléments majeurs; la reproductibilité des éléments mineurs (P, K, Na) présents en très faibles concentrations (< 1%) à la limite de la détection est beaucoup plus faible (20 à 30%). Les valeurs moyennes sont représentées dans le tableau XVII.

Tableau XVII. Composition élémentaire déterminée en XPS
(exprimée en rapport atomique)

Micro-organisme	O/C	N/C	P/C	K/C	Na/C
<i>Methanobrevibacter</i>	0,34 (0,04) ^(a)	0,143 (0,008)	0,0029 (0,0006)	0,0036 (0,0001)	0,0014 (0,0008)
<i>Methanospirillum</i>	0,51 (0,12)	0,16 (0,028)	0,0186 (0,0162)	0,0008 (0,0008)	0,01 (0,0067)
<i>Methanotherix</i>	0,35 (0)	0,12 (0)	0,0065 (0,0003)	0,0007 (0,0007)	0,003 (0,0005)
<i>Desulfovibrio</i>	0,4 (0,01)	0,138 (0,003)	0,0091 (0,0001)	0,0005 (0,0005)	0,0033 (0)
<i>Propionibacterium</i>	0,39 (0)	0,094 (0,001)	0,0036 (0)	0,0075 (0,0006)	0,0024 (0,0005)
<i>Lactobacillus</i>	0,71 (0,02)	0,083 (0,004)	0,0244 (0,0006)	0,0114 (0,0001)	0,0074 (0)

(a) écart type

Le rapport de concentrations O/C varie de 0,34 à 0,71. L'azote est présent en concentrations inférieures (0,083 à 0,16); le phosphore a été détecté en concentrations nettement inférieures (0,0029 à 0,0244) et on a trouvé des traces de potassium (0,0005 à 0,0114), de sodium (0,0014 à 0,01) et de soufre (0,005 à 0,0175) ce dernier élément pouvant provenir en partie de la cystéine-sulfure utilisée pour réduire les milieux de culture.

Les fractions atomiques peuvent être calculées de deux façons:

- soit en considérant le spectre général, ce qui fournit des informations sur tous les éléments présents en surface à des concentrations détectables, mais ce calcul peu précis ne permet pas une analyse fonctionnelle;

- soit en considérant le spectre détaillé enregistré pour des pics individuels présélectionnés qui sont décomposés en supposant une forme 85%

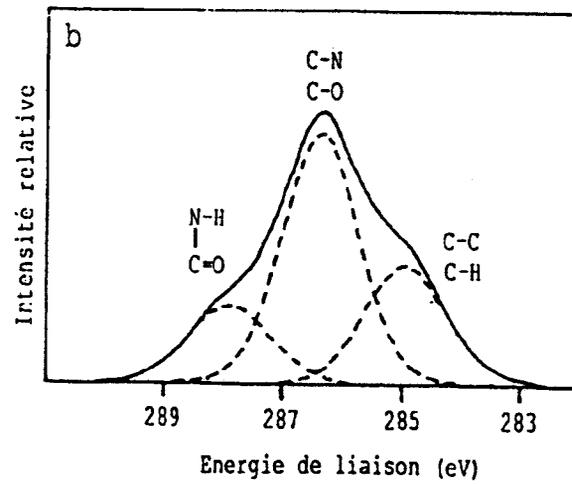
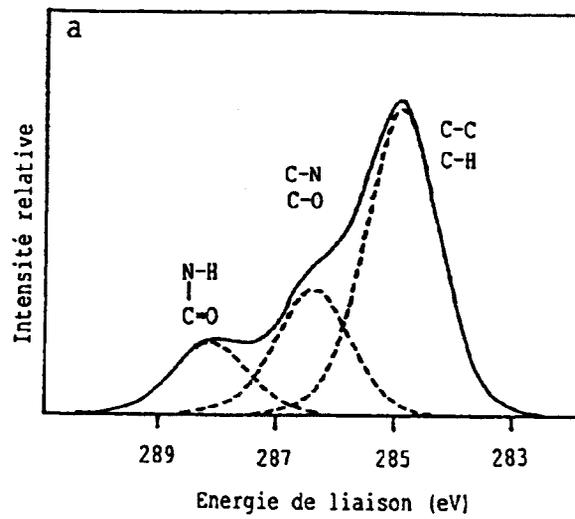


Figure 26. Exemples représentatifs de forme de pics C1s des souches bactériennes étudiées

- a. *Methanotherix* (O= 23,1%; O/C= 0,34)
- b. *Lactobacillus* (O= 39,54%; O/C= 0,73)

gaussienne et 15% lorentzienne (AMORY et *al.*, 1988); cette étude permet l'analyse fonctionnelle, c'est-à-dire les proportions relatives des différentes formes d'éléments majeurs.

Le pic C_{1s} a une forme typique pour la plupart des échantillons bactériens avec le composant le plus élevé à 284,8 eV (Figure 26a). La forme du pic de carbone des échantillons qui contiennent des proportions élevées en oxygène est différente de celle des autres échantillons et le composant à 286,2 eV devient prédominant (Figure 26b).

Le pic C_{1s} est ainsi divisé en trois composantes d'énergie de liaison 284,8 eV (correspondant aux liaisons C-H et C-C), 286,2 eV (liaisons C-O et C-N) et 288,4 eV ($-(C=O)-NH-$) (MOZES et *al.*, 1988); le même procédé de décomposition a été utilisé pour l'oxygène et l'azote permettant de calculer les pourcentages des différents éléments impliqués dans des fonctions diverses (Tableau XVIII).

Tableau XVIII. Analyse fonctionnelle obtenue par décomposition des spectres (exprimée en pourcentage)

Souche bactérienne	C sous forme			O sousforme		N sousforme	
	C-H	C-O; C-N	C=O	C=O	OH	NH ₂	NH ₃ ⁺
<i>Methanobrevibacter</i>	57,9	24,8	17,4	60,3	39,7	84,6	15,4
<i>Methanospirillum</i>	42,6	38,5	18,8	46,4	53,6	97,9	2,1
<i>Methanotherix</i>	61,5	24,5	14	42,7	57,3	100	0
<i>Desulfovibrio</i>	51,9	32	16,1	35,6	64,4	89,1	10,9
<i>Propionibacterium</i>	50,9	33,3	15,8	33,2	66,8	100	0
<i>Lactobacillus</i>	28,8	53,8	17,4	27,9	72,1	92,9	7,1

Pour les surfaces de *Methanobrevibacter*, *Desulfovibrio*, *Methanotherix* et *Propionibacterium*, le carbone est principalement sous forme C-H, alors qu'il est préférentiellement sous forme C-O, C-N en surface de *Lactobacillus* et qu'il existe en équilibre C-H et C-O, C-N pour *Methanospirillum*. L'oxygène est principalement sous forme O-H ou O-P (à l'exception de *Methanobrevibacter*) et l'azote sous forme NH₂.

La figure 27 présente la corrélation entre les composants du pic C_{1s} qui sont dues au carbone lié à l'oxygène ou l'azote et la somme des rapports de concentrations atomiques O/C et N/C. La bonne corrélation ($r^2 = 0,87$), la valeur

faible de l'ordonnée à l'origine et la pente proche de l'unité confirme la validité des facteurs de décomposition et la cohérence de la décomposition du pics C_{1s} .

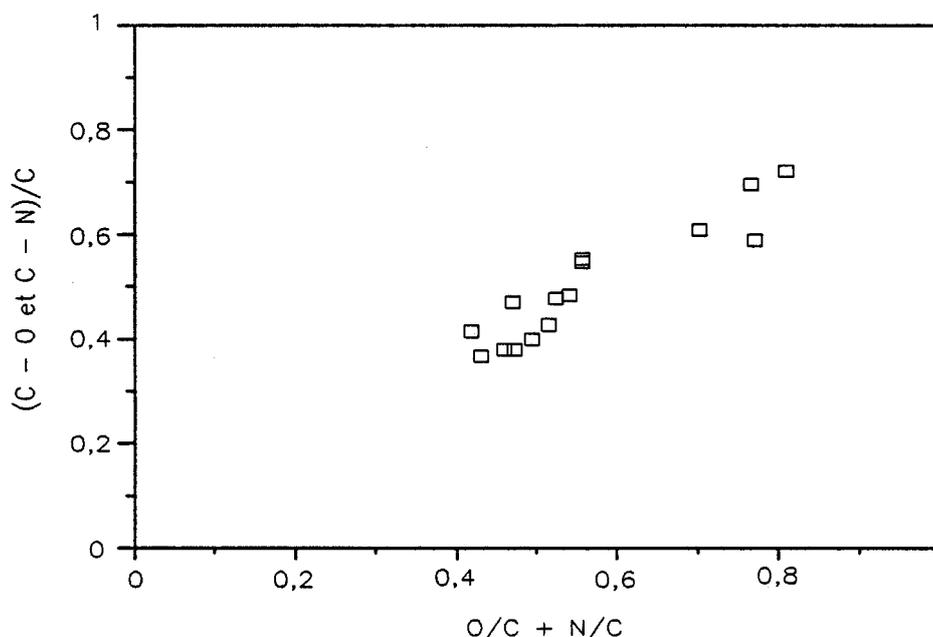


Figure 27. Proportions des composantes du pic C_{1s} dues au carbone lié à l'oxygène et à l'azote en fonction de la somme des rapports de concentrations atomiques: O/C et N/C pour l'ensemble des souches.

1.1.3.2 Relation composition de surface- paramètres physico-chimiques

Pour expliquer les propriétés des surfaces bactériennes sur la base de leurs compositions chimiques, nous avons établi des relations entre les paramètres mesurés.

L'hydrophobicité des surfaces bactériennes exprimée par l'angle de contact de l'eau est proportionnelle au contenu hydrocarboné du pic C_{1s} (Figure 28) dû aux moitiés apolaires des protéines, lipoprotéines, phospholipides, acides lipoteichoïques ou lipopolysaccharides.

En accord avec les résultats décrits par VAN DER MEI et *al.*, (1989a), une augmentation de l'angle de contact (ou une réduction de l'énergie libre de surface) est accompagnée d'une diminution du rapport de concentrations O/C qui reflète des fonctions polaires et d'une augmentation du rapport N/C qui indique une exposition accrue des protéines à la surface des bactéries (Figure 29a-b); cependant, aucune corrélation directe ($r^2 \neq 0,4$) n'a été observée dans ces trois études.

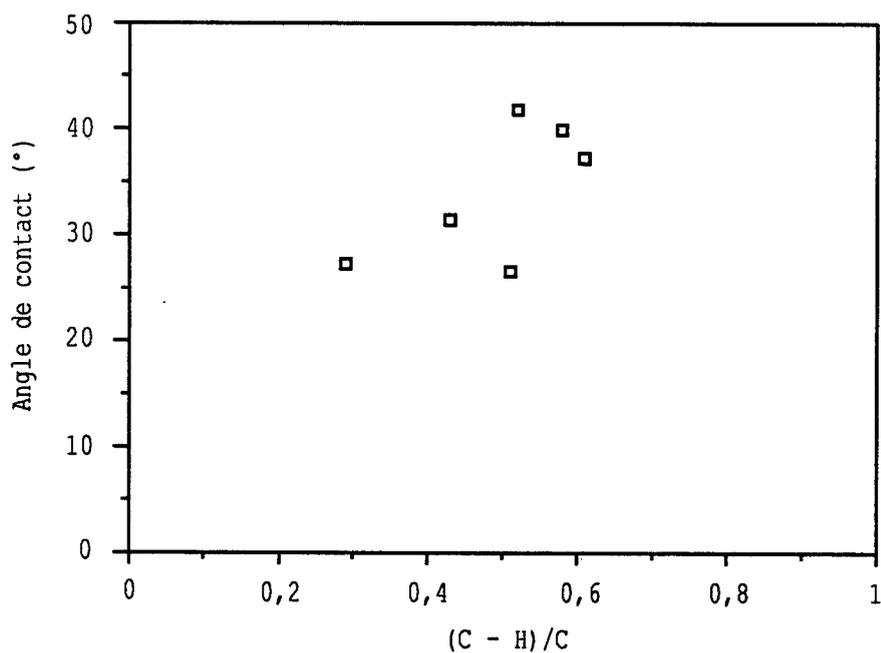


Figure 28. Angle de contact de l'eau en fonction de la fraction apolaire du pic Cls

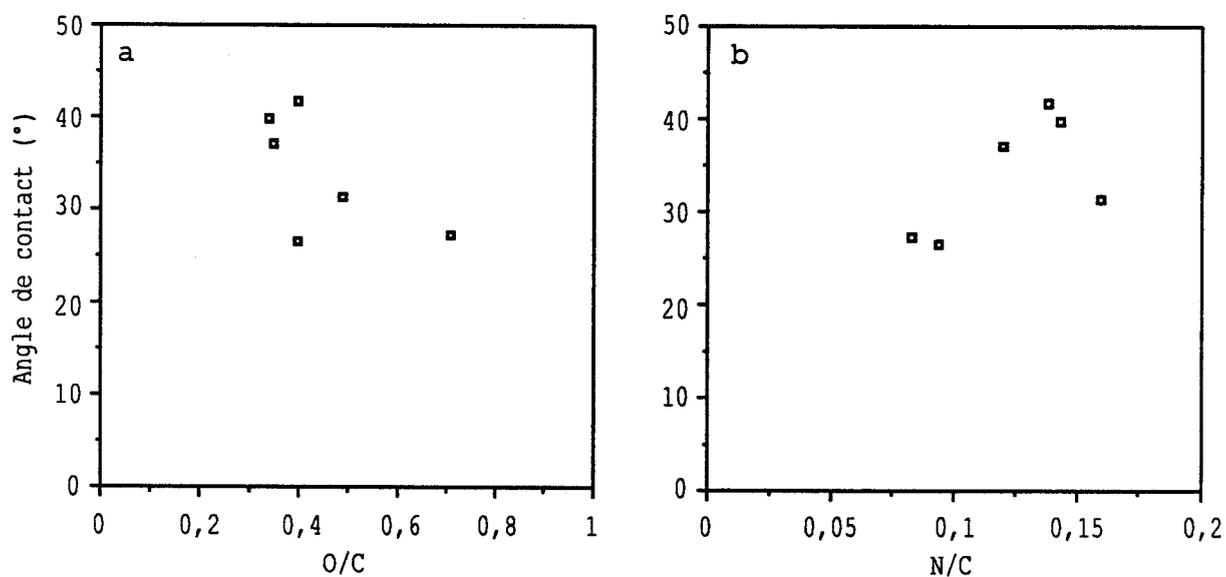


Figure 29. Angle de contact de l'eau en fonction des rapports atomiques:
 (a), oxygène/carbone; (b), azote/carbone

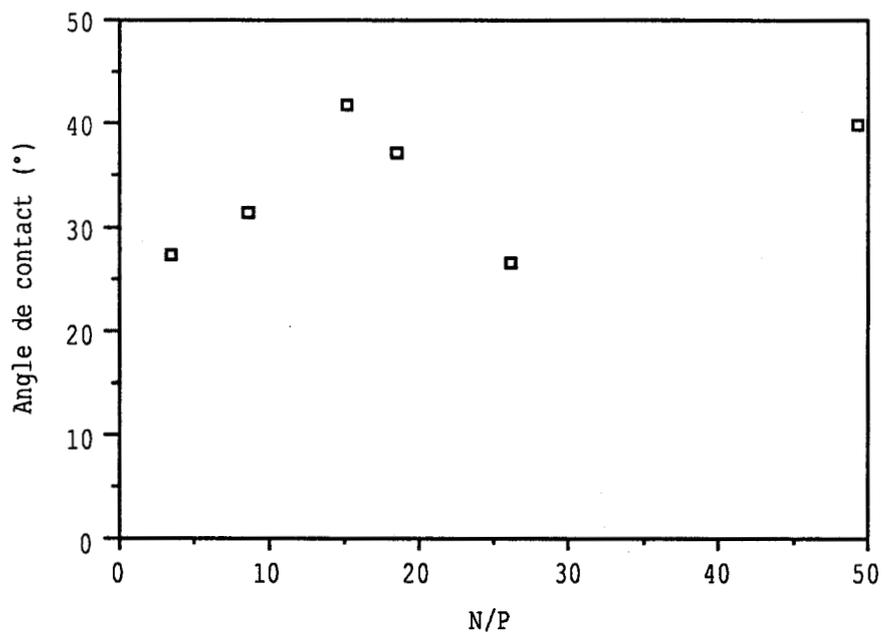


Figure 30. Angle de contact de l'eau en fonction du rapport atomique azote/phosphore

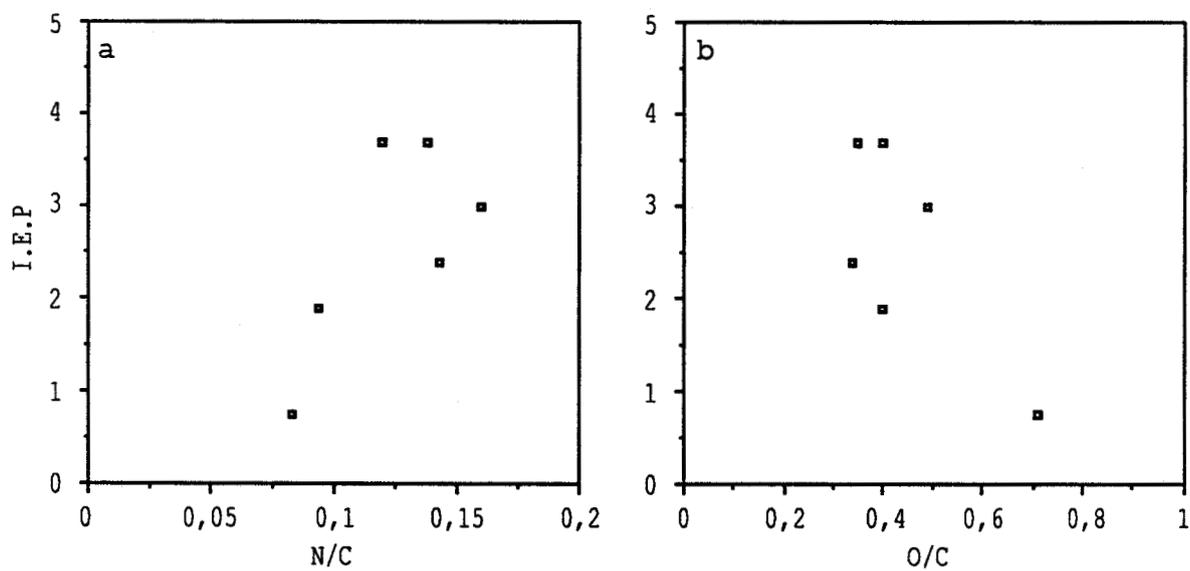


Figure 31. Point isoélectrique en fonction des rapports de concentrations atomiques
(a), azote/carbone; (b), oxygène/carbone

La tendance qui existe entre le rapport N/P et l'angle de contact (Figure 30) suggère l'intervention des protéines dans l'hydrophobicité (MOZES et *al.*, 1988).

Généralement, une augmentation des protéines (N/C élevé) conduit à une augmentation du point isoélectrique (Figure 31a). Cette augmentation correspond également à une réduction du rapport O/C (Figure 31b). BUSSCHER et *al.*, (1989) ont en effet montré que l'oxygène était responsable des hautes énergies de surface et des faibles points isoélectriques alors que des taux élevés en azote entraînaient des faibles énergies de surface et des IEP élevés. L'augmentation de l'IEP résulte d'une exposition accrue des groupements amine positivement chargés à la surface opposés aux groupements phosphate et carboxyle négativement chargés.

Aucune information n'a pu être obtenue du rapport P/C (VAN DER MEI et *al.*, 1989b).

1.1.3.3 Discussion

Nous avons tenté, à partir des données obtenues en XPS d'expliquer les paramètres physico-chimiques en relation avec les connaissances bibliographiques sur la paroi et les enveloppes externes des cellules bactériennes étudiées (Tableau XIX).

Tableau XIX. Principales caractéristiques des surfaces cellulaires

Souche bactérienne	Mobilité	Gram	Type de peptidoglycane	Polymères de l'enveloppe extracellulaire
<i>Lactobacillus</i>	-	+	m-DAP	Acide lipoteichoïque
<i>Propionibacterium</i>	-	+	L-DAP	?
<i>Desulfovibrio</i>	+	-	DAP conventionnel	Lipopolysaccharide
<i>Methanobrevibacter</i>	-	"+"	-	Pseudomuréine
<i>Methanotherix</i>	-	"-"	-	Fibrilles (glyco)protéiques
<i>Methanospirillum</i>	+	"-"	-	Fibrilles (glyco)protéiques

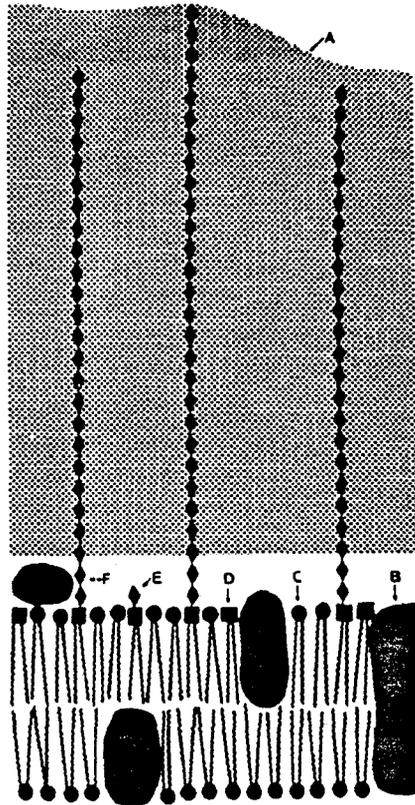


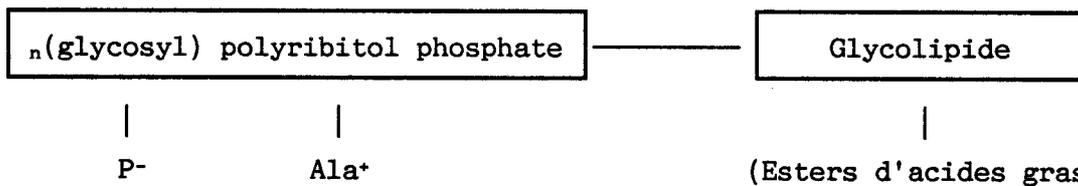
Figure 32. Représentation schématique de la paroi cellulaire (A) et de la membrane d'un *Lactobacillus*. Les composants de la membrane représentés sont, la protéine (B), le phospholipide (C), le glycolipide (D), le phosphatidyl-glycolipide (E) et l'acide lipotéichoïque (F). Les molécules de LTA sont représentées avec leur moitié glycolipidique intégrée dans la bicouche lipidique de la membrane et les chaînes de polyglycérophosphate polaires qui s'étendent dans la paroi cellulaire
D'après VAN DRIEL et *al.*, (1973).

1.1.3.3.1 Lactobacillus plantarum

- Etude bibliographique

Les parois des Lactobacilles sont constituées d'au moins trois composants structuraux: le peptidoglycane, un polysaccharide neutre (constitué de glucose, rhamnose et galactose en proportions équivalentes) et d'un polysaccharide anionique (Figure 32); ces deux polysaccharides représentent respectivement 17 et 30% en poids sec des parois des cellules en phase stationnaire (COYETTE et GHUYSEN, 1970).

Lactobacillus contient des acides ribitol téichoïques dont le phospho- monoester terminal est lié de façon covalente à un glycolipide et constituent l'acide lipotéichoïque (LTA). Les LTA de *Lactobacillus plantarum* sont des polymères linéaires d'unités de ribitol-phosphate substituées par des hydrates de carbone et la D-Alanine (WICKEN et KNOX, 1980):



On suppose que les longues chaînes de polyol-phosphate polaires s'étendent à travers la paroi cellulaire et peuvent atteindre la surface externe de la paroi (VAN DRIEL et *al.*, 1973).

- L'analyse XPS a révélé une nature hautement polysaccharidique contenant très peu de protéines (N/C faible) et de nombreux groupements phosphate; la majorité de l'oxygène de surface est sous forme O-H ou O-P (Tableau XVIII), suggérant l'exposition d'une partie des LTA à la surface de la cellule. Ces observations peuvent être confirmées par la détermination du point isoélectrique; en effet, un IEP extrêmement faible a été observé pour *Lactobacillus* probablement dû aux groupements phosphate des LTA qui présentent des pK_a de l'ordre de 2,1 (LAMBERT et *al.*, 1975), plus faibles que les groupements carboxyle des protéines. MIORNER et *al.*, (1982) ont montré que les *Staphylococci* qui possèdent un acide ribitol téichoïque présentent des IEP inférieurs à 2.

1.1.3.3.2 Propionibacterium jensenii

- Etude bibliographique

La paroi des *Propionibacterium* contient un peptidoglycane, un polysaccharide constitué d'hexosamines (glucosamine, galactosamine) et de sucres neutres (glucose, galactose et du mannose en petites quantités). Les acides aminés constitutifs de la paroi sont l'alanine, le glutamate et la glycine. *Propionibacterium jensenii* est une bactérie encapsulée et le matériel extracellulaire est plutôt de nature polysaccharidique (SKOGEN et al., 1974).

- L'analyse XPS a montré une surface cellulaire de nature moins polysaccharidique que celle de *Lactobacillus* (l'oxygène est présent sous forme d'hydroxyle et de carboxyle en proportion 1/2) et peu protéique (N/C faible), l'azote étant principalement sous forme NH₂ (Tableaux XVII et XVIII). Contrairement à *Lactobacillus*, peu de phosphore a été décelé, suggérant des groupements phosphate peu nombreux en concordance avec son point isoélectrique plus élevé.

1.1.3.3.3 Desulfovibrio sp.

- Etude bibliographique

Aucune données bibliographique spécifique à *Desulfovibrio sp.* n'a été trouvée, ce paragraphe traite donc du genre *Desulfovibrio* et des bactéries Gram négatives en général.

THOMAS (1972) a montré que la paroi de *Desulfovibrio gigas* possédait une paroi conforme au type classique des bactéries Gram négatives dont la membrane externe est constituée de lipopolysaccharides (30%), de phospholipides (20 à 25%) et de protéines (45 à 50%).

BRADLEY et GAYLARDE (1986) ont montré que la composition de la membrane externe de *Desulfovibrio vulgaris* était représentée par 19% en poids sec de protéines et 57% de sucres (dont des glucosamines).

La molécule de lipopolysaccharide (LPS) est constituée de trois régions distinctes liées de façon covalente (WICKEN et KNOX, 1980):

- un polysaccharide hydrophile o-spécifique qui varie d'une espèce à l'autre

- un noyau polysaccharidique constant constitué de 2-céto-3-déoxyoctonate (KDO) comportant des groupements phosphate et carboxyle

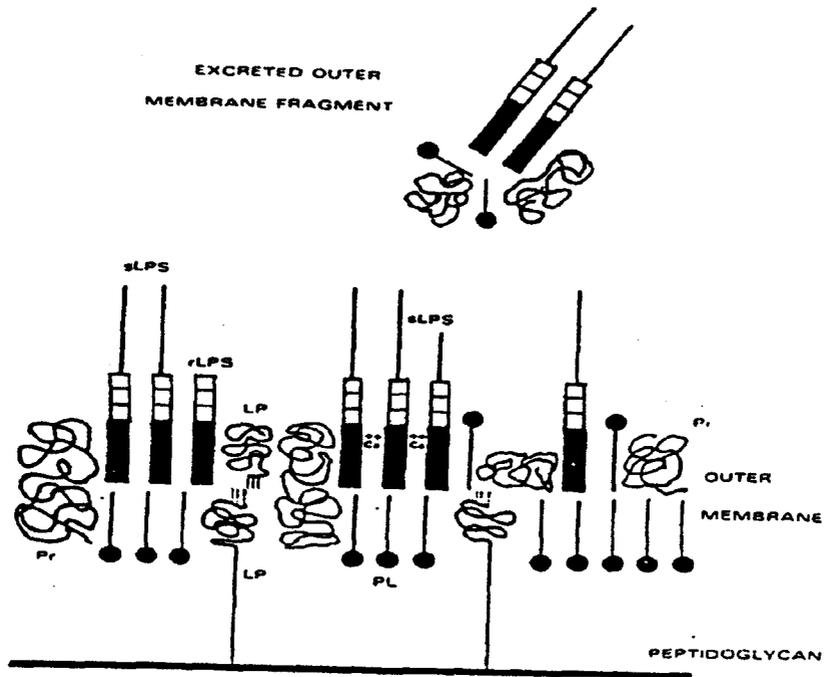


Figure 33. Représentation de l'enveloppe cellulaire d'une bactéries Gram - d'après WICKEN et KNOX (1980). Le feuillet interne de la bicouche de la membrane externe est composé de phospholipides (PL) et de protéines (Pr) avec une lipoprotéine (LP) formant un attachement covalent au peptidoglycane qui souligne la membrane plasmique. Dans le feuillet externe de la membrane externe, des molécules de lipopolysaccharides sont montrées, les trois régions de la molécule sont représentées comme un rectangle noir (lipide A), des carrés vides (noyau polysaccharidique) et des barres noires (polysaccharide O-spécifique).

- un lipide A hydrophobe dont les résidus d'ester d'acide gras sont substitués par des résidus de glucosamine phosphorylés.

BRADLEY et *al.*, (1984) ont observé que le LPS est localisé sur le feuillet externe de la membrane externe et couvre 30 à 40% de la surface alors que les phospholipides sont situés principalement vers la face interne (Figure 33).

- Analyse XPS

Le rapport protéines-sucres de 1/3 (19% et 57%) reporté par BRADLEY et GAYLARDE (1986) pour *Desulfovibrio vulgaris* est retrouvé en analyse XPS si on compare les rapports de concentration O/C et N/C (Tableau XVII). De plus, nous avons noté des quantités appréciables de phosphate en surface, laissant supposer la présence de LPS.

1.1.3.3.4 Methanospirillum hungatei

- Analyse bibliographique

La couche la plus externe des filaments de *Methanospirillum* est composée de sous-unités protéiques (MIGAS et *al.*, 1989) et de sucres neutres (KONIG, 1988).

PATEL et *al.*, (1986) ont étudié la composition de l'enveloppe cellulaire principalement constituée de protéines (Tableau XX).

Tableau XX. Composition de l'enveloppe de *Methanospirillum hungatei* JF1 (d'après PATEL et *al.*, 1986)

Composition chimique (en pourcentage de poids sec)		Composition en acides aminés et monosaccharides (en pourcentage molaire)
Acides	59,7	29,3% hydrophobes
Aminés		38,1% neutres
		8% basiques
		24,6% acides
		71% arabinose
		6,3% galactose
Glucides	7	7,7% glucose
		7,9% mannose
		7,1% rhamnose

- L'analyse XPS a révélé des phosphates en quantité importante à la surface de *Methanospirillum* ainsi que la présence de protéines. Cependant, des quantités importantes de carbohydrates ont également été décelées alors que la détermination biochimique de l'enveloppe externe a dénoté une composition protéique; ainsi, le rapport de concentration N/C obtenu en XPS (N/C= 0,16) est inférieur à celui décrit par PATEL et *al.*, (1986) (N/C= 0,24).

Il faut cependant noter qu'à cause du procédé de lyophilisation, la conformation des molécules de surface peut masquer certains groupements qui peuvent être exposés en surface sous forme hydratée et, d'autre part que la spectroscopie XPS permet d'analyser la couche la plus externe des cellules (profondeur d'analyse de 2 à 5 nm) et que les différentes techniques ne mesurent pas nécessairement les mêmes composés.

1.1.3.3.5 Methanotherix soehngeni

- Etude bibliographique

Comme *Methanospirillum*, l'enveloppe externe est constituée d'une gaine protéique et d'hydrates de carbone dont la composition a été déterminée par PATEL et *al.*, (1986) (Tableau XXI).

Tableau XXI. Composition de l'enveloppe de *Methanotherix soehngeni* FE
(d'après PATEL et *al.*, 1986)

Composition chimique (en pourcentage de poids sec)		Composition en acides aminés et monosaccharides (en pourcentage molaire)
Acides Aminés	81	28,2% hydrophobes 36,6% neutres 12,1% basiques 23,1% acides
Glucides	7	11,2% glucose 7,8% fucose 6,6% ribose 44,9% rhamnose 3,1% mannose 1,2% galactose 25,2% osamines
Lipides	4	
Cendres	2	



X 85.000

Figure 34. Photographie en microscopie électronique de cellules de *Methanotherix* après coloration de Thiéry. Une couche polysaccharidique externe est clairement mise en évidence (liseré noir).

La composition en acides aminés des gaines de *Methanospirillum* et *Methanotherix* est très proche alors que la composition en monosaccharides varie, *Methanotherix* renfermant beaucoup plus d'acides aminés que *Methanospirillum*.

- L'analyse XPS a révélé la nature protéique de la surface de *Methanotherix* et un contenu polysaccharidique faible; les rapports de concentration O/C, N/C et P/C (0,35; 0,12 et 0,0065 respectivement) obtenus en XPS ne sont pas en accord avec ceux obtenus par PELLERIN (1987) (0,46; 0,23 et 0,0018 respectivement). Cependant, l'observation en microscopie électronique après coloration de Thiéry a montré une couche dense et uniformément répartie à la surface de *Methanotherix* (Figure 34).

1.1.3.3.6 Methanobrevibacter

- Etude bibliographique

La pseudomuréine de *Methanobrevibacter* est une chaîne constituée de résidus de N-acétyl galactosamine et d'acide N-acétyl L-talosaminuronique liés en $\beta(1\rightarrow3)$ dont la moitié peptidique est composée de trois acides aminés, le glutamate, l'alanine et la lysine; elle ne contient pas d'oses neutres.

- En XPS, la surface des cellules de *Methanobrevibacter* est caractéristique de la présence d'une protéine en surface car le rapport O/C correspond à celui d'une protéine (rapport théorique O/C= 0,34), hypothèse confirmée par le rapport N/C (rapport théorique d'une protéine N/C= 0,27) (VAN DER MEI et al., 1989a).

1.2 Supports solides

1.2.1 Rugosité

La rugosité de surface du substratum constitue un facteur important, les microrugosités peuvent en effet jouer un rôle d'attraction et de protection contre le flux liquide lors du transport et de l'attachement respectivement.

Les valeurs de R_a des différents supports, présentées dans le tableau XXII, mettent en évidence que tous ces supports sont lisses ($R_a < 0,1 \mu\text{m}$) et indiquent qu'aucun polissage n'est nécessaire pour que la mesure des angles de contact ait une signification thermodynamique. De plus, les traitements de surface (cf paragraphes suivants) n'affectent pas la rugosité.

Tableau XXII. Mesure de rugosité des supports nus et traités

Supports	R _a (μm)	R _t (μm)
PVC	0,042 ± 0,011	0,59 ± 0,17
PS	0,053 ± 0,013	0,38 ± 0,04
VERRE	0,020 ± 0,007	0,33 ± 0,05
SPVC	0,050 ± 0,016	0,69 ± 0,22
SPS	0,040 ± 0,010	0,38 ± 0,03
PVC-Fe	0,041 ± 0,012	0,60 ± 0,15
SPVC-Fe	0,044 ± 0,013	0,93 ± 0,37
PS-Fe	0,043 ± 0,014	0,40 ± 0,03
SPS-Fe	0,033 ± 0,007	0,38 ± 0,04
VERRE-Fe	0,014 ± 0,004	0,34 ± 0,07

1.2.2 Composition de surface déterminée par X.P.S

Les résultats de spectroscopie XPS obtenus au laboratoire sont concordants avec les observations de MOZES et *al.*, (1987), bien que les supports analysés n'aient pas la même origine et que des spectromètres différents aient été utilisés dans ces essais (Tableau XXIII).

Tableau XXIII. Composition élémentaire des supports déterminée en XPS

Supports	Rapport de concentration atomique					
	O/Si	Na/Si	Ca/Si	C/Si		
VERRE	2,48 (b)	0,17 (b)	0,025 (b)	1,48 (b)		
	O/C		N/C		Cl/C	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
PS	0,04	0,05	0	0	0	0
PVC	0,08	0,08	0	0	0,4	0,31

(a) Résultats expérimentaux

(b) D'après MOZES et *al.*, (1987)

1.2.3 Caractéristiques énergétiques des supports non traités

Les mesures de l'angle de contact de l'eau sur les différents solides sont présentées dans le tableau XXIV.

Les valeurs obtenues sont semblables à certaines données de la littérature, les variations observées peuvent être dues, soit à la provenance et à l'usinage des échantillons, soit au protocole de nettoyage.

Tableau XXIV. Hydrophobicité relative des surfaces solides

Supports	Angle de contact de l'eau (°)			
	Valeurs expérimentales	FACCHINI et <i>al.</i> , (1987)	PRINGLE et FLETCHER (1983)	ABSOLOM et <i>al.</i> , (1985)
PS	90,2 ± 4	95	66	nd
PVC	81,6 ± 3,6	nd ^(a)	80	95
VERRE	24 ± 5	0	nd	nd

(a) nd, non déterminé

Les caractéristiques énergétiques des solides obtenues par la méthode à deux liquides sont rassemblées dans le tableau XXV.

Tableau XXV. Caractéristiques énergétiques des surfaces solides

Supports	γ_s^p (mJ. m ⁻²)		γ_s^d (mJ. m ⁻²)		γ_s (mJ. m ⁻²)					
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
PS	2,1	0,2	28,4	40	30,5	40	25,6	28	25,6	nd
PVC	5,3	0,1	39,8	42	45,3	42	nd	nd	nd	46
VERRE	43,6	96	24,3	44	67,9	141	nd	nd	>72,5	nd

- (a) Résultats expérimentaux
- (b) VAN PELT et *al.*, (1985)
- (c) ABSOLOM et *al.*, (1985)
- (d) FLETCHER et PRINGLE (1985)
- (e) FACCHINI et *al.*, (1987)
- (f) VAN DIJK et *al.*, (1988)

Les trois supports solides ont ainsi pu être classés en fonction de leur hydrophobicité en supports hydrophobes (γ_s faible) qui présentent une composante polaire faible ou négligeable (PS et PVC) et en support hydrophile (γ_s élevé) représenté par le verre, hydrophilie causée par les nombreux groupements hydroxyle qu'il renferme.

On peut différencier les supports analysés par leur composante polaire très variable (de 2 à 44 mJ. m⁻²), la composante de dispersion est plus stable et comprise dans une gamme plus restreinte de 24 à 40 mJ. m⁻².

A l'exception du verre, les données expérimentales sont en accord avec celles reportées dans la littérature. Les résultats concernant le verre montrent une hydrophilie nettement inférieure à celle décrite dans la littérature, cette différence réside principalement dans l'estimation de la composante polaire de l'énergie de surface et provient de la technique d'analyse qui ne paraît pas adéquate pour des valeurs très élevées de γ_s . L'hydrophobicité supérieure du PS par rapport au PVC peut être expliquée par la présence en surface de très faibles quantités de groupements polaires (les rapports O/C, N/C et Cl/C des analyses en XPS sont nuls ou faibles).

D'autre part, le verre possède une densité de charges négatives très élevée (VAN LOOSDRECHT et al., 1990). Le polystyrène et le PVC sont moins chargés négativement que le verre et présentent des potentiels zeta similaires, -44 mV et -41 mV respectivement (VAN WAGENEN et al., 1981).

1.2.4 Effets de traitements chimiques sur l'hydrophobicité des solides

1.2.4.1 Oxydation sulfurique

L'oxydation sulfurique induit une sulfonation des cycles benzéniques les plus externes du polystyrène (MAROUDAS, 1975; CHANGUI et al., 1987) et la formation de groupements hydroxyle et carboxyle (CURTIS et al., 1983) et augmente ainsi considérablement la densité de charges négatives de solides divers (CHANGUI et al., 1987).

Notre étude a montré que l'oxydation sulfurique augmente considérablement la composante polaire de l'énergie de surface du polystyrène rendant ainsi le SPS hydrophile, alors que le PVC est peu affecté par ce traitement (Tableau XXVI).

Tableau XXVI. Hydrophobicité des supports oxydés

Supports	$\theta_{\text{eau-air}}$	γ_S^p	γ_S^d	γ_S			
	($^\circ$)	(mJ. m ⁻²)	(mJ. m ⁻²)	(mJ. m ⁻²)			
	(a)	(a)	(a)	(a)	(b)	(c)	(d)
SPS	35,2 ± 2,9	32,8	31,6	64,4	66,7	66,7	73
SPVC	77,5 ± 1,6	5,8	43,8	49,6	nd ^(e)	nd	nd

(a) Résultats expérimentaux

(b) FACCHINI et DICOOMO (1987)

(c) ABSOLOM et *al.*, (1985)

(d) PRINGLE et FLETCHER (1986)

(e) nd, non déterminé

1.2.4.2 Effet des cations polyvalents sur les propriétés de surface

1.2.4.2.1 Traitement ferrique

Le but du prétraitement par des solutions d'ions métalliques trivalents est de rendre les surfaces solides moins négatives et ainsi de diminuer la répulsion électrostatique cellule-support.

1.2.4.2.1.1 Dosage du fer

Le nombre d'ions ferriques fixés aux différents supports est présenté dans le tableau XXVII.

L'adsorption de fer aux supports est très faible. Les solides les plus hydrophiles tels que le verre, adsorbent de plus grandes quantités d'ions ferriques; à l'exception du verre, nos résultats sont concordants avec ceux de MOZES et *al.*, (1987). On doit cependant rappeler que les résultats expérimentaux concernant l'énergie de surface du verre n'étaient pas en accord avec ceux de la littérature, laissant suggérer une différence de composition chimique, confirmée par les résultats présents.

Tableau XXVII. Quantité de fer retenu après traitement par une solution de FeCl_3

Support	Fer adsorbé ($\mu\text{moles}/\text{m}^2$)	
	Résultats expérimentaux	MOZES et <i>al.</i> , (1987)
PS	73	84
SPS	617	nd
PVC	64	78
SPVC	220	nd
VERRE	222	21

La rétention du fer est considérablement supérieure sur les supports oxydés (SPS et SPVC) que sur les solides non traités (l'adsorption du fer est augmentée d'un facteur 9 et 4 pour le PS et le PVC respectivement). De plus, CHANGUI et *al.*, (1987) ont suggéré que les ions ferriques étaient liés plus fermement aux surfaces oxydées plus hydrophiles que sur les supports non traités.

1.2.4.2.1.2 Hydrophobicité relative des supports traités

La faible fixation des ions ferriques (de 60 à 620 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$) rend les surfaces plus hydrophiles (Tableau XXVIII). La détermination exacte des énergies de surface s'est avérée impossible car les déviations standards sur les moyennes étaient trop importantes, reflétant une répartition non homogène du fer sur la surface.

Tableau XXVIII. Effet du traitement ferrique sur l'hydrophobicité relative des solides

Supports	Angle de contact $\theta_{\text{eau-air}}$ ($^\circ$)
PS-Fe	75,2 \pm 3,3
SPS-Fe	25,9 \pm 5,0
PVC-Fe	72,1 \pm 6,5
SPVC-Fe	51,1 \pm 10,2
VERRE-Fe	20,0 \pm 2,1

Tableau XXIX. Adhésion bactérienne aux supports non traités

Supports	Bactéries adhérentes (x 10 ³ bactéries/mm ²)					
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanotherix</i>	<i>Methanospirillum</i>
PVC	179 ± 30	283 ± 56	269 ± 56	274 ± 25	78 ± 9	64 ± 7
PS	96 ± 25	89 ± 25	97 ± 6	80 ± 14	59 ± 9	3 ± 1
VERRE	67 ± 4	145 ± 11	245 ± 17	125 ± 18	0,2 ± 0	40 ± 11

Tableau XXX. Recouvrement des supports nus par les bactéries adhérentes

Supports	Adhésion exprimée en pourcentage de recouvrement des surfaces					
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanotherix</i>	<i>Methanospirillum</i>
PVC	32,2 ± 5,8	34,0 ± 2,7	37,6 ± 4,0	26,0 ± 3,0	10,7 ± 2,6	10,7 ± 1,3
PS	17,3 ± 3,7	7,3 ± 2,2	13,6 ± 3,5	7,6 ± 2,5	8,1 ± 2,5	0,5 ± 0,2
VERRE	12,0 ± 5,3	13,8 ± 2,5	34,2 ± 3,9	11,9 ± 1,8	0,02 ± 0,01	6,9 ± 1,0

CHANGUI et *al.*, (1987), ont montré une inversion de charge du polycarbonate après traitement au fer. De plus, le polycarbonate oxydé, plus négatif que le non traité, porte une charge positive plus élevée après fixation ferrique.

1.2.4.2.2 Effet d'un polyélectrolyte cationique

La fixation de la poly-L-lysine, polypeptide basique, entraîne une réduction de l'angle de contact du PVC (PVC non traité 81,6°, PVC traité 70,7°). Cette réduction de l'hydrophobicité du support a également été observée après pré-traitement de divers supports par des protéines (FLETCHER et MARSHALL, 1982; VAN LOOSDRECHT et *al.*, 1990). De plus, REYNOLDS et WONG, (1983), ont montré que la fixation de la poly-L-lysine sur l'hydroxyapatite induisait une charge positive du solide, le potentiel zeta de l'hydroxyapatite variant de -9,1 à +20,2 mV après traitement.

Les différents traitements appliqués aux supports modifient à la fois leur charge et ainsi, par créations de sites polaires, leur hydrophobicité.

2 . ADHESION DE CULTURES PURES

2.1 Intervention des interactions physico-chimiques non spécifiques

2.1.1 Adhésion des bactéries aux supports non traités

Les données obtenues pour l'adhésion des différentes souches (exprimées en nombre de bactéries adhérentes par mm² de support) aux surfaces solides sont présentées dans le tableau XXIX.

On peut remarquer que le PS est le support le moins colonisé par l'ensemble des bactéries alors que le PVC contient le nombre le plus élevé de bactéries adhérentes. On s'attend à ce que l'adhésion bactérienne au verre, support très hydrophile et très chargé négativement aux valeurs physiologiques de pH à cause de la déprotonation des groupements hydroxyle (VAN LOOSDRECHT et *al.*, 1990), soit, au contraire du PS et du PVC, dominée par les interactions électrostatiques qui impliqueraient que le verre soit préférentiellement colonisé par des cellules faiblement chargées. Ce sont cependant les bactéries les plus hydrophobes et les plus chargées qui montrent la plus grande différence dans le comportement d'adsorption entre le verre et le polystyrène.

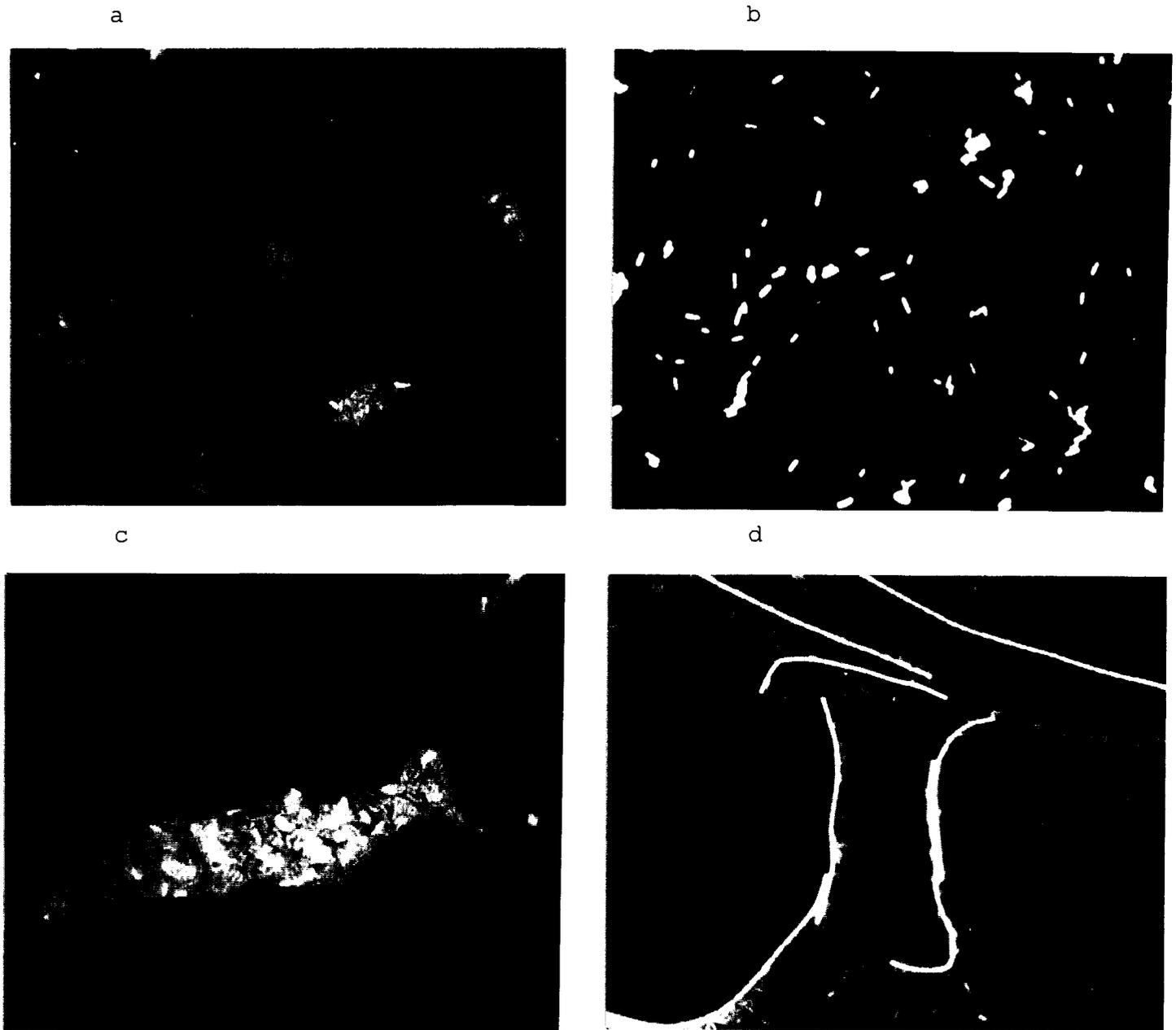


Figure 35. Photographies de microscopie à épifluorescence des bactéries les plus représentatives adhérant aux supports nus.
 (a), (b) et (c): *Lactobacillus* sur PVC, VERRE et PS;
 (d), *Methanotherrix*-PVC.
 Pour (a), (b) et (c), la barre représente $9\ \mu\text{m}$ et $10\ \mu\text{m}$ pour (d).

Tableau XXXI. Effet du prétraitement du PVC à la polylysine sur l'adhésion

Adhésion exprimée en	<i>Lactobacillus</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanotherix</i>	<i>Methanospirillum</i>
x10 ³ bactéries/mm ²	139,0 ± 40,0	352,0 ± 60,0	252,0 ± 58,0	280,0 ± 21,0	46,0 ± 4,0	42,0 ± 5,0
% de recouvrement	25,0 ± 4,7	31,1 ± 5,1	35,3 ± 4,1	26,6 ± 3,3	6,4 ± 1,3	7,1 ± 1,1

Tableau XXXII. Adhésion des bactéries aux supports oxydés

Support	Adhésion exprimée en	<i>Lactobacillus</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanotherix</i>	<i>Methanospirillum</i>
SPVC	x10 ³ bactéries/mm ²	171,0 ± 22,0	244,0 ± 30,0	304,0 ± 49,0	312,0 ± 33,0	65,0 ± 4,0	74,0 ± 9,0
	% de recouvrement	30,9 ± 3,5	29,3 ± 3,7	42,6 ± 3,3	29,7 ± 3,7	8,9 ± 1,9	12,5 ± 1,8
SPS	x10 ³ bactéries/mm ²	162,0 ± 17,0	224,0 ± 24,0	178,0 ± 32,0	178,0 ± 29,0	2,0 ± 0	21,0 ± 4,0
	% de recouvrement	29,1 ± 3,4	21,2 ± 2,7	25,0 ± 4,5	16,9 ± 2,5	0,3 ± 0,13	3,5 ± 0,7

Quand les résultats sont exprimés en pourcentage de recouvrement de la surface (Tableau XXX), on observe qu'un recouvrement maximum de 40% est atteint, ce pourcentage de recouvrement dépend en partie de la taille des bactéries. CHARACKLIS (1984) a suggéré que la saturation de recouvrement pouvait être due à l'existence d'une zone d'influence autour des cellules attachées, déterminée par les exopolymères ou d'autres mécanismes.

La figure 35 montre des photographies des bactéries à différents substrats (les plus représentatives).

La composition des substrata influence la distribution des bactéries adhérentes. Les bactéries tendent à être réparties de façon homogène sur les surfaces les plus hydrophiles, *e.g.*, le verre alors qu'une agglomération bactérienne est observée sur les surfaces les plus hydrophobes (VAN PELT et *al.*, 1985).

Cette agrégation est occasionnée soit par l'existence d'hétérogénéités dans la composition de la surface qui affectent la distribution des sites d'attachement, soit elle se produit pendant le séchage des lames où le film liquide qui se rétracte entraîne une partie des cellules faiblement liées (MC ELDDOWNEY et FLETCHER, 1987).

2.1.2 Effet du prétraitement du PVC à la poly-L-Lysine

Le but de ce traitement est que les molécules polycationiques de polylysine s'adsorbent fermement à la surface solide, créant ainsi des sites cationiques qui se combinent aux sites anioniques des surfaces cellulaires et induisent une attraction électrostatique ou une répulsion réduite.

Les résultats de ces essais (Tableau XXXI) montrent que la polylysine n'a pas d'effet sur l'adhésion bactérienne, voire un effet négatif dans les cas de *Methanothrix* et de *Methanospirillum* contrairement aux observations de LAMBERTS et *al.*, (1985) et MAZIA et *al.*, (1975).

Nos résultats sont cependant en accord avec OLSSON et *al.*, (1976) qui n'ont observé aucune influence de la protéine basique fixée dans l'adhésion à l'hydroxyapatite, probablement à cause de la faible fixation de la protéine basique sur la surface.

Selon FLETCHER, (1976), l'adsorption d'une protéine de point isoélectrique adéquat (*e.g.* des protéines basiques) pour neutraliser la haute densité de charges de surface du polystyrène entraîne une augmentation du nombre de bactéries adhérentes. De la même façon, REYNOLDS et WONG, (1983), ont montré

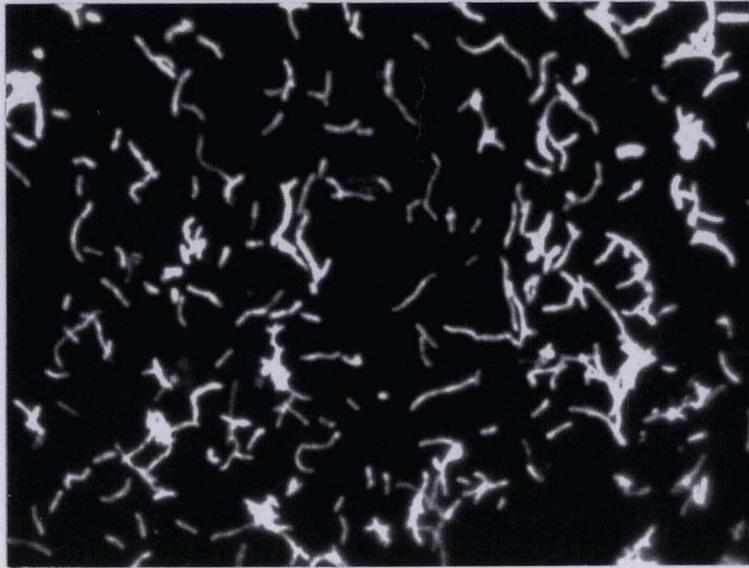


Figure 36. Photographie de Propionibacterium adhérant au SPS.
La barre représente 10 μm .

que l'adsorption d'un polypeptide basique tel que la polylysine entraîne un potentiel zeta positif et augmente légèrement l'adhésion bactérienne, alors que les polypeptides acides qui produisent un potentiel zeta très négatif réduisent l'attachement bactérien (LAMBERTS et *al.*, 1985; OLSSON et *al.*, 1976). LA MOTTA et *al.*, (1982), ont également montré que le prétraitement des surfaces solides avec des polymères synthétiques cationiques augmentait de façon significative la vitesse d'accumulation du biofilm qui devenait plus compact, mais n'intervenait pas dans l'épaisseur du biofilm.

Ainsi, la charge de la protéine ou du polypeptide est très importante (LUDWICKA et *al.*, 1984; VAN LOOSDRECHT et *al.*, 1990). En effet, s'il n'y a pas d'effet de charge, les films protéiques inhibent l'attachement par des mécanismes non électrostatiques comme l'encombrement stérique (FLETCHER, 1976; MAROUDAS, 1975) ou en se fixant sur les sites de fixation des micro-organismes, empêchant ainsi l'adhésion bactérienne (ORSTAVIK, 1977).

L'efficacité de ce traitement dépend cependant de la nature du substratum; en effet, l'adhésion de *Desulfovibrio* au PS est augmentée d'un facteur 3 après traitement à la polylysine ($89 \pm 25 \cdot 10^3$ bactéries/mm² ou $7,3 \pm 2,2$ % pour le PS et $285 \pm 38 \cdot 10^3$ bactéries/mm² ou $23,4 \pm 3,1$ % après traitement du PS).

2.1.3 Adhésion bactérienne aux supports oxydés

L'oxydation sulfurique du PVC n'entraîne aucune modification de l'attachement des différentes souches bactériennes (Tableau XXXII) alors que l'oxydation du PS induit un accroissement considérable du nombre de cellules adhérentes de *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Propionibacterium* et de *Methanobrevibacter* alors que l'attachement de *Methanospirillum* et *Methanotherix* est réduit, en accord avec les observations de PRINGLE et FLETCHER (1986).

De plus, la répartition des bactéries à la surface du SPS est beaucoup plus homogène, on ne décèle plus la présence d'agrégats; la distribution des bactéries en surface du SPVC est plus régulière avec parfois des amas de taille inférieure à ceux observés sur PVC (Figure 36), ceci étant probablement dû à l'hydrophobicité inférieure du SPVC.

Tableau XXXIII. Attachement bactérien aux supports prétraités aux ions ferriques.

Support	Adhésion exprimée en	<i>Lactobacillus</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanothrix</i>	<i>Methanospirillum</i>
PVC-Fe	x 10 ³ bactéries/mm ²	507 ± 28	628 ± 31	308 ± 26	387 ± 17	30 ± 4	91 ± 10
	% de recouvrement	91,2 ± 2	59,8 ± 7,4	31,7 ± 4,6	36,7 ± 4	5,2 ± 2,2	15,5 ± 1,7
SPVC-Fe	x 10 ³ bactéries/mm ²	489 ± 11	503 ± 24	369 ± 34	393 ± 15	11 ± 1	68 ± 5
	% de recouvrement	88 ± 3,8	47,8 ± 5,5	35,1 ± 3,7	35,1 ± 1,4	1,5 ± 0,3	11,5 ± 0,8
PS-Fe	x 10 ³ bactéries/mm ²	491 ± 21	321 ± 18	372 ± 30	319 ± 18	17 ± 2	68 ± 7
	% de recouvrement	88,5 ± 2	30,5 ± 4,1	35,4 ± 2,8	35,4 ± 2	2,3 ± 0,9	11,6 ± 1,2
SPS-Fe	x 10 ³ bactéries/mm ²	471 ± 10	479 ± 59	385 ± 44	314 ± 12	10 ± 2	61 ± 6
	% de recouvrement	84,8 ± 1,7	45,3 ± 6,5	36,7 ± 2,6	29,8 ± 1,1	1,4 ± 0,4	10,3 ± 1
VERRE-Fe	x 10 ³ bactéries/mm ²	481 ± 5	418 ± 26	447 ± 41	314 ± 15	31 ± 3	89 ± 5
	% de recouvrement	86,7 ± 1,9	39,7 ± 4,4	42,6 ± 3,9	29,9 ± 1,6	4,3 ± 1,3	15,2 ± 0,9

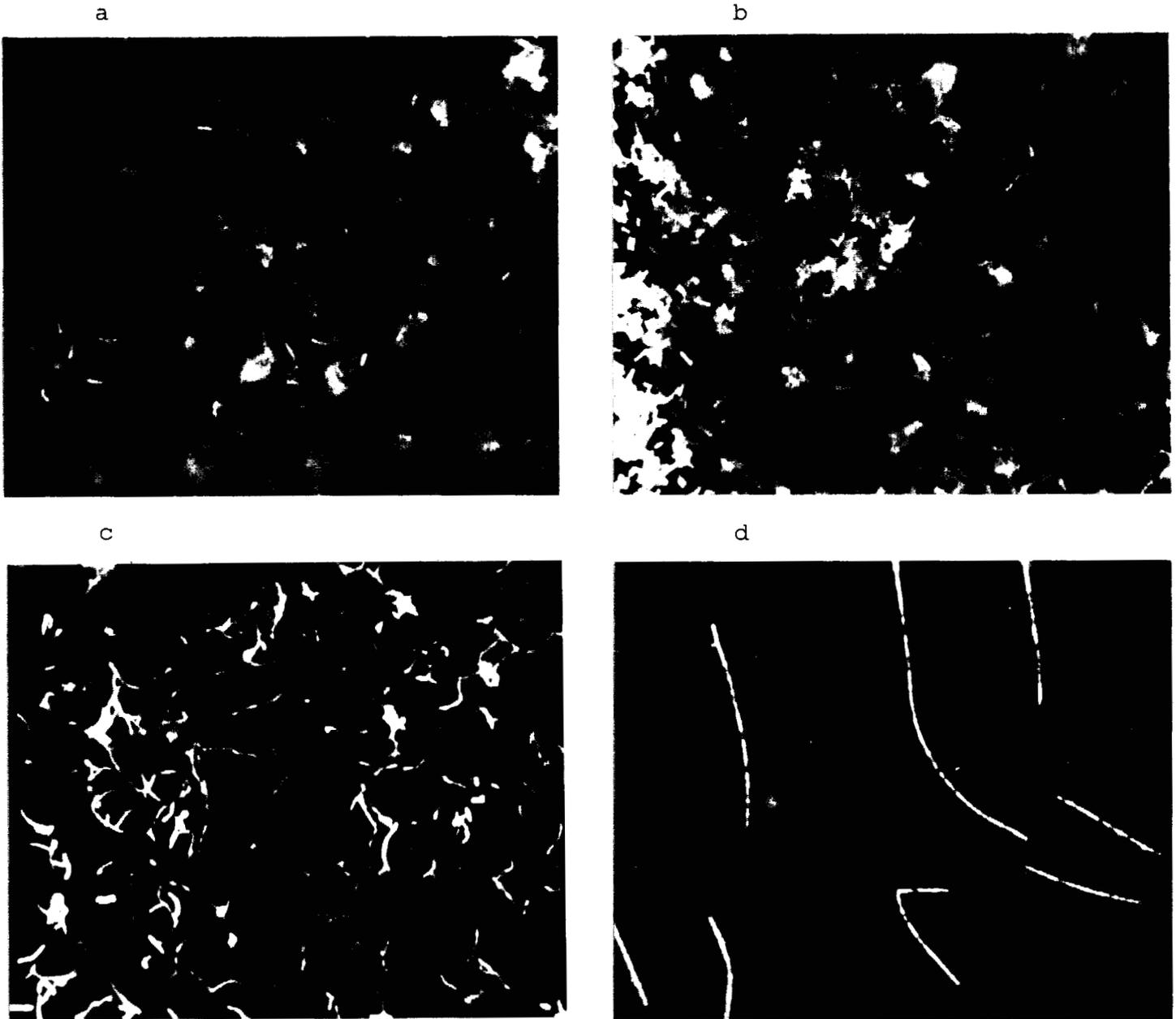


Figure 37. Photographies de différentes souches adsorbées sur les supports traités aux ions ferriques. (a) et (b), *Lactobacillus* sur PVC et VERRE; (c), *Propionibacterium*-SPS; (d), *Methanothrix*-PVC. Pour (a), (b) et (c), la barre représente $9\ \mu\text{m}$ et $10\ \mu\text{m}$ pour (d).

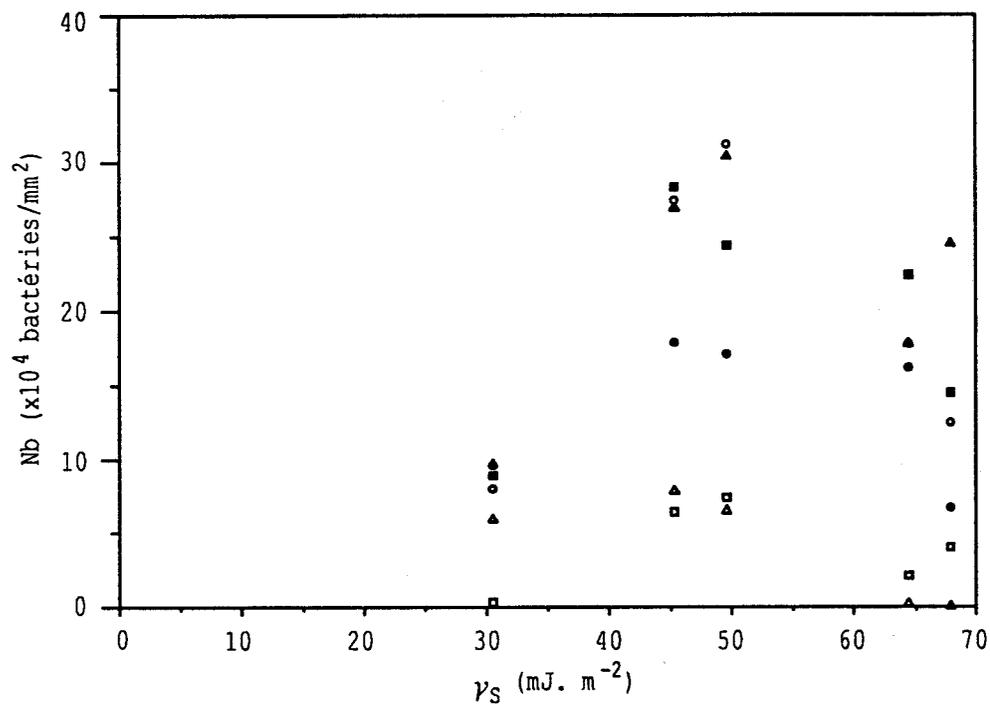


Figure 38. Nombre de bactéries adhérentes en fonction de l'énergie libre de surface des surfaces solides; (●), *Lactobacillus*; (■), *Desulfovibrio*; (▲), *Propionibacterium*; (○), *Methanobrevibacter*; (△), *Methanotherix*; (□), *Methanospirillum*.

2.1.4 Traitement au chlorure de fer

Le prétraitement au fer augmente considérablement l'attachement de *Lactobacillus* et de *Desulfovibrio* à l'ensemble des supports et, à un degré moindre, celui de *Propionibacterium*, *Methanobrevibacter* et *Methanospirillum*; les bactéries adhèrent alors de façon similaire à tous les supports quelque soit leur hydrophobicité (Tableau XXXIII) et les différences observées dans les essais sur supports nus entre le PVC et le PS ne sont plus significatives.

Le traitement ferrique du PVC et du PS semble inhiber l'attachement de *Methanothrix* alors qu'un attachement accru est observé après traitement du SPS et du VERRE.

Le traitement qui provoque une inversion de charge (CHANGUI et *al.*, 1987) permet la formation d'une couche régulière et dense de bactéries adhérant fortement aux différents supports (Figure 37), le fer sert ainsi de pontage entre les cellules et le solide (MOZES et *al.*, 1987). FLETCHER, (1988), a montré que l'addition d'ions ferriques a un effet irréversible dans l'attachement bactérien au verre.

La présence d'une petite quantité d'ions ferriques joue un rôle important en diminuant la force de répulsion notamment quand la distance de séparation est plus faible que l'épaisseur de la double couche électrostatique autour des cellules (CHANG, 1989).

2.1.5 Corrélation adhésion-propriétés physico-chimiques des surfaces

2.1.5.1 Adhésion-énergie de surface des solides

Les résultats expérimentaux suggèrent une tendance pour toutes les souches bactériennes à attacher en plus grand nombre aux solides de faible énergie de surface (c'est-à-dire aux substrata les plus hydrophobes) qu'aux surfaces plus énergétiques (Figure 38), bien qu'aucune corrélation nette ne soit observée ($r^2 = 0,1$ à $0,7$). En accord avec ceci, une étude précédente réalisée au laboratoire avait montré que *Methanothrix* adhérerait préférentiellement aux supports les plus hydrophobes (VERRIER et *al.*, 1988).

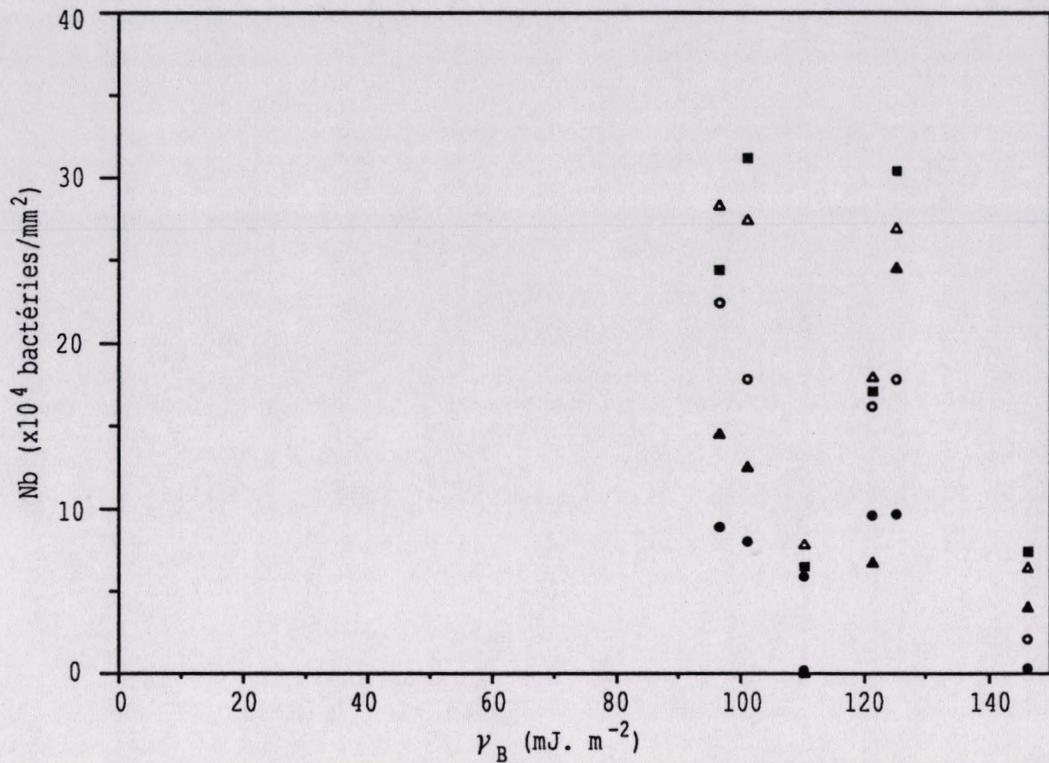


Figure 39. Relation entre adhésion bactérienne et énergie libre des surfaces bactériennes; (●), PS; (△), PVC; (■), SPVC; (○), SPS; (▲), VERRE.

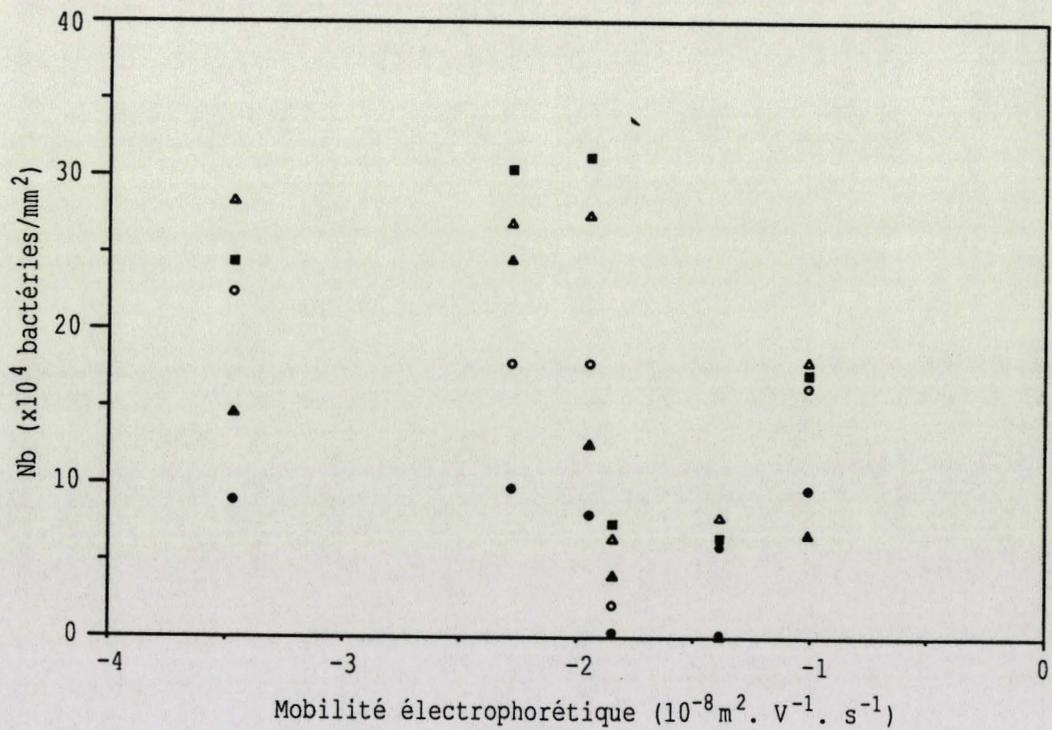


Figure 40. Adhésion des bactéries aux différents supports en fonction des mobilités électrophorétiques cellulaires; (●), PS; (△), PVC; (■), SPVC; (○), SPS; (▲), VERRE.

VAN PELT et *al.*, (1985) ont suggéré que la force de liaison bactérie-support était directement en relation avec l'énergie de surface des solides (γ_s) plutôt que le nombre de bactéries adhérentes. L'information qualitative obtenue à partir des photographies qui montrent une tendance à l'agglomération des bactéries sur les supports de faible énergie (PS, PVC) reflète une faible liaison des bactéries. Ce phénomène n'est pas observé sur les surfaces plus énergétiques (Verre, SPS) indiquant que les cellules sont attachées plus fermement.

D'après SCHAKENRAAD et *al.*, (1989), l'énergie libre de surface détermine le nombre de sites de contact en fonction de l'étalement alors que la présence de macromolécules, *e.g.*, des protéines, semble influencer la distance entre la cellule et le support; la combinaison de ces deux facteurs est déterminante pour la force d'adhésion.

2.1.5.2 Adhésion-caractéristiques des surfaces bactériennes

2.1.5.2.1 Adhésion-énergie de surface des bactéries

L'influence des énergies de surface des bactéries dans l'adhésion aux différents supports est illustrée dans la figure 39. Ces mesures montrent une relation négative entre l'adhésion et les énergies des surfaces bactériennes, mais la corrélation est très faible ($r^2 = 0,1$ à $0,4$) suggérant que la liaison des cellules aux différents substrata est due en partie aux interactions hydrophobes (VAN LOOSDRECHT et *al.*, 1987a).

2.1.5.2.2 Adhésion-charge des bactéries

Aucune corrélation claire n'est décelée entre la mobilité électrophorétique à pH 7 des bactéries et leur adhésion aux surfaces solides (Figure 40), bien que les bactéries de charge négative de surface élevée présentent une tendance à mieux adhérer. Ceci a également été démontré par OLSSON et *al.*, (1976).

Cependant, HECKELS et *al.*, (1976), et CRIADO et *al.*, (1985), ont montré que la neutralisation des charges négatives de la surface bactérienne par un carbodiimide, entraînait une augmentation de l'hydrophobicité et de l'adhésion bactérienne alors que le blocage des fonctions NH_3^+ par le formaldéhyde entraînait une augmentation de la charge négative et une réduction de l'attachement.

2.1.5.3 Calcul de l'énergie libre d'adhésion de Gibbs

D'après l'approche thermodynamique décrite par ABSOLOM et *al.*, (1983) et modifiée par BUSSCHER et *al.*, (1984a) pour les énergies libres de surface basées sur les composantes polaires et dispersives, une corrélation négative entre le nombre de bactéries adhérentes, N_b , et l'énergie libre de surface, γ_s , indique que la composante polaire de l'énergie libre de la surface bactérienne, γ_B^p , doit être inférieure à la composante polaire de la tension de surface du liquide de suspension, γ_L^p .

Bien que nous ayons observé une relation négative entre N_b et γ_s dans nos essais, γ_B^p est toujours supérieure à γ_L^p (Tableau XXXIV).

Tableau XXXIV. Tension de surface du tampon de suspension (BC7) et rappel de la composante polaire de l'énergie des surfaces bactériennes

Micro-organisme	Composante polaire (mJ. m ⁻²)	Tension de surface du BC7 (mJ. m ⁻²)		
	γ_B^p	γ_L	γ_L^p	γ_L^d
<i>Methanospirillum</i>	119,9			
<i>Propionibacterium</i>	98			
<i>Lactobacillus</i>	94,1			
<i>Methanothrix</i>	83,7			
<i>Methanobrevibacter</i>	74			
<i>Desulfovibrio</i>	71,4			
Tampon BC7		60,9	36,1	24,8

Si on suppose qu'aucune liaison chimique ne se produit entre les bactéries et le substratum et que les effets des charges électriques peuvent être négligés, la force de liaison peut être décrite par l'énergie libre d'adhésion ΔG_{SBL} .

Nous avons déterminé les composantes de dispersion et polaire de l'énergie libre d'adhésion ΔG_{SBL} pour vérifier que l'adhésion aux surfaces solides des souches étudiées obéissait à l'approche thermodynamique. Ces composantes peuvent être exprimées comme:

$$\Delta G_{SBL} = \Delta G_{SBL}^d + \Delta G_{SBL}^p$$

$$\Delta G_{SBL} = (\gamma_{SB}^d - \gamma_{SL}^d - \gamma_{BL}^d) + (\gamma_{SB}^p - \gamma_{SL}^p - \gamma_{BL}^p)$$

Tableau XXXV. Composante de dispersion (ΔG_{SBL}^d) et composante polaire (ΔG_{SBL}^p) de l'énergie interfaciale d'adhésion (ΔG_{SBL})

Souche bactérienne	Support	Energie libre d'adhésion (mJ. m ⁻²)		
		ΔG_{SBL}	ΔG_{SBL}^d	ΔG_{SBL}^p
<i>Methanospirillum</i>	PS	45,0	-0,1	45,1
	PVC	36,2	-0,4	36,6
	SPVC	35,1	-0,5	35,6
	SPS	2,6	-0,2	2,8
	VERRE	-5,9	0	-5,9
<i>Propionibacterium</i>	PS	35,3	-0,2	35,5
	PVC	28,2	-0,6	28,8
	SPVC	27,3	-0,7	28
	SPS	1,9	-0,3	2,2
	VERRE	-4,6	0	-4,6
<i>Lactobacillus</i>	PS	33,5	-0,2	33,7
	PVC	26,8	-0,6	27,4
	SPVC	25,8	-0,7	26,5
	SPS	1,8	-0,3	2,1
	VERRE	-4,4	0	-4,4
<i>Methanothrix</i>	PS	28,5	-0,1	28,6
	PVC	22,8	-0,5	23,3
	SPVC	22	-0,6	22,6
	SPS	1,5	-0,2	1,7
	VERRE	-3,7	0	-3,7
<i>Methanobrevibacter</i>	PS	23,5	-0,2	23,7
	PVC	18,7	-0,6	19,3
	SPVC	18	-0,7	18,7
	SPS	1,2	-0,3	1,5
	VERRE	-3,1	0	-3,1
<i>Desulfovibrio</i>	PS	22,2	-0,1	22,3
	PVC	18	-0,1	18,1
	SPVC	17,5	-0,1	17,6
	SPS	1,3	-0,1	1,4
	VERRE	-2,9	0	-2,9

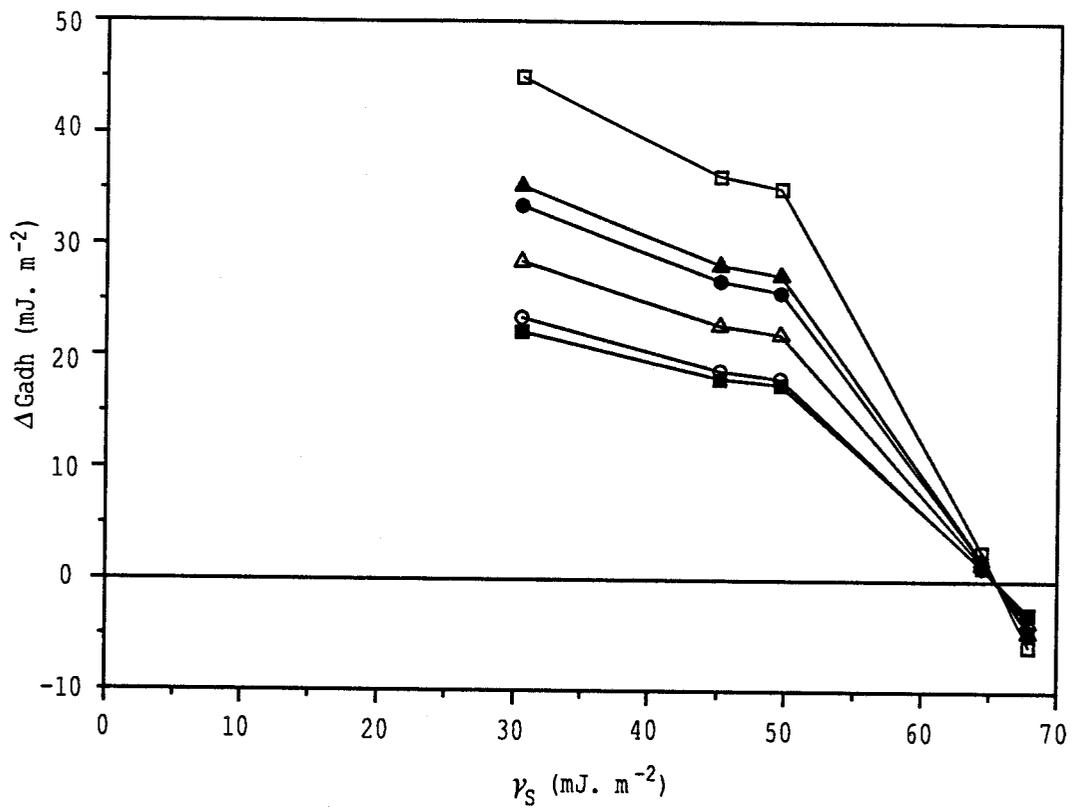


Figure 41. Influence de l'énergie libre des supports dans le calcul de l'énergie libre d'adhésion; (□), *Methanospirillum*; (▲), *Propionibacterium*; (●), *Lactobacillus*; (△), *Methanotherix*; (○), *Methanobrevibacter*; (■), *Desulfovibrio*.

$$\Delta G_{SBL} = \gamma_{SB} - \gamma_{SL} - \gamma_{BL}$$

où γ_{SB} est l'énergie libre de l'interface Solide-Bactérie

γ_{SL} est l'énergie libre de l'interface Solide-Liquide

γ_{BL} est l'énergie libre de l'interface Bactérie-Liquide.

Une valeur négative de ΔG_{SBL} dénote des conditions thermodynamiquement favorables à l'adhésion; si $\Delta G_{SBL} > 0$, on s'attend à ce qu'aucune adhésion ne se produise aux surfaces.

Les composantes polaire et de dispersion de l'énergie interfaciale d'adhésion sont présentées dans le tableau XXXV.

A l'exception du verre pour lequel $\Delta G_{SBL} < 0$ dans tous les cas impliquant que l'adhésion des différentes souches au verre est thermodynamiquement favorable, pour les autres supports, $\Delta G_{SBL} > 0$.

Les calculs de l'énergie libre interfaciale d'adhésion (ΔG_{SBL}) aux surfaces solides d'énergies libres diverses (γ_s) sont présentés dans la figure 41. La figure 41 montre un comportement similaire pour toutes les souches, quelque soit leur énergie de surface, et que ΔG_{SBL} devient négative quand le γ_s des solides est supérieur à 65,4 mJ. m⁻², suggérant que les cellules adhèrent mieux à ces substrata. Cependant, dans tous les cas, l'adhésion est observée en dépit du fait que l'énergie libre d'adhésion soit positive ou nulle. Thermodynamiquement, ceci peut seulement être expliqué sur la base des interactions de dispersion agissant à longue distance de séparation puisque ΔG_{SBL}^d est le seul paramètre qui présente des valeurs négatives permettant ainsi l'adhésion. En effet, VAN OSS et al., (1986) ont proposé que des valeurs négatives de ΔG_{SBL}^d dénotent des conditions favorables pour l'adhésion à longue distance de séparation. Les composantes polaire et de dispersion de ΔG_{SBL} agissent simultanément seulement quand les forces agissant à courte distance deviennent actives.

De plus, BUSSCHER et al., (1986), ont noté que l'adhésion réversible était associée à un ΔG_{SBL} positif alors qu'un attachement irréversible était associé à des valeurs négatives de ΔG_{SBL} .

Le nombre de bactéries adhérentes est plus important pour les substrata d'énergie de surface inférieure à 65,4 mJ. m⁻² ce qui indique que l'adhésion des bactéries étudiées aux différents supports ne peut être décrite par l'approche d'ABSOLOM et al., (1983). En effet, différents modèles d'adhésion peuvent être impliqués et aucune corrélation nette n'a été observée entre l'énergie de surface des bactéries et leur capacité à s'attacher aux surfaces. Ainsi, aucune

relation générale entre ΔG_{SBL} et le nombre de bactéries adhérentes n'existe, dénotant que les paramètres spécifiques à la souche bactérienne sont également impliqués dans le processus d'adhésion.

L'adhésion au verre peut être décrite par l'approche thermodynamique (ABSOLOM et al., 1983; BUSSCHER et al., 1984a), mais cette théorie, qui implique un contact direct entre les deux surfaces, n'est pas applicable aux autres supports.

De plus, ABSOLOM et al., (1983), ont suggéré que si l'adhésion se produit malgré une valeur positive ou nulle de ΔG_{SBL} , ce comportement est le résultat d'interactions électrostatiques entre les cellules et les substrata, ce qui explique que nous ayons observé une tendance des bactéries les plus chargées négativement à adhérer en plus grand nombre aux surfaces solides.

Cependant, la force d'adhésion dépend en partie de l'hydrophobicité des surfaces; en effet, les bactéries adhèrent plus fermement aux substrata d'énergie de surface élevée, *i.e.*, le verre et le SPS (distribution homogène des bactéries) probablement à des distances de séparation inférieures à celles des bactéries qui adhèrent aux surfaces peu énergétiques par dépôt dans le minimum secondaire décrit dans la théorie D.L.V.O (VAN LOOSDRECHT et al., 1989). D'après nos résultats, et en accord avec VAN OSS et al., (1986), et BUSSCHER et al., (1986), nous pouvons affirmer que les bactéries adhèrent réversiblement dans le minimum secondaire aux supports hydrophobes (PS et PVC) alors qu'elles s'adsorbent irréversiblement dans le minimum primaire à la surface du verre.

2.2 Intervention des polymères caractéristiques des surfaces bactériennes

Les exopolymères de la surface cellulaire peuvent altérer l'adhésion initiale des bactéries au PVC, soit par des interactions stéréochimiques (GIBBONS, 1980; RUTTER et al., 1984), soit en modifiant les caractéristiques de surface en termes d'hydrophobicité et de charge (HERMANSSON et al., 1982). Dans le but d'étudier l'intervention de polymères particuliers, nous avons choisi deux bactéries qui diffèrent de par leur composition chimique de surface, et ainsi leur comportement électrophorétique et leur hydrophobicité, *i.e.*, *Lactobacillus plantarum* et *Desulfovibrio sp.*

2.2.1 *Lactobacillus plantarum*

De nombreuses études ont montré l'implication de l'acide lipotéichoïque (LTA) soit dans l'adhésion de bactéries aux cellules animales (BOTTA, 1981; OFEK et *al.*, 1975; ALY et *al.*, 1980; CARRUTHERS et KABAT, 1983), soit dans la colonisation des dents (CIARDI et *al.*, 1977). Ainsi, les LTA sont d'importants déterminants des propriétés de surface spécifiques telles que "l'antigénicité" et des propriétés de surface non spécifiques, *i.e.*, la charge, la polarité et l'hydrophobicité (ARCHIBALD, 1988).

2.2.1.1 Traitement des cellules de *Lactobacillus plantarum* au lysozyme

KANATANI et *al.*, (1989) ont observé la formation de protoplastes de *Lactobacillus plantarum* par traitement au lysozyme qui laisse les cellules intactes. Le lysozyme attaque les liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ glycosyl du polysaccharide de la muréine. Dans le but de conserver l'intégrité et la viabilité des cellules, nous avons utilisé cette méthode indirecte pour extraire le LTA des cellules, ce dernier étant lié à l'acide muramique du peptidoglycane. Cependant, ce traitement n'est pas spécifique du LTA et les résultats reportés ci-dessous doivent être considérés avec précaution.

- L'action du lysozyme sur les cellules de *Lactobacillus* entraîne une réduction de l'hydrophobicité bactérienne déterminée par la mesure de l'angle de contact de l'eau qui varie de $27,3 \pm 0,1$ à $21,8 \pm 0,1$ pour les cellules non traitées et les cellules soumises à l'hydrolyse enzymatique, respectivement.

MIORNER et *al.*, (1983), ont suggéré que le LTA était le composant principal de la paroi cellulaire responsable de l'hydrophobicité de *Streptococcus pyogenes* si la partie lipidique s'étendait à la surface cellulaire (BEACHEY, 1975). Cependant, WICKEN et KNOX, (1975), ont montré que la partie lipidique hydrophobe était plus intimement associée à la membrane cellulaire alors que la partie hydrophile libre et les groupements phosphate s'étendaient à travers la paroi jusqu'à la surface cellulaire (CIARDI et *al.*, 1977). MIORNER et *al.*, (1983) ont montré que l'hydrolyse enzymatique (trypsine, pepsine, papaine) entraînait une réduction de l'hydrophobicité concomitante à l'extraction partielle du LTA.

- L'adhésion au PVC des bactéries prétraitées par le lysozyme est réduite de 36% (Tableau XXXVI). DANIELSSON et *al.*, (1977) ont montré que le traitement au lysozyme des cellules de *Pseudomonas sp* attachées au verre n'entraînait qu'un faible détachement des cellules (10%).

Tableau XXXVI. Effet de traitements cellulaires sur l'adhésion de *Lactobacillus plantarum* au PVC

Essais	Attachement bactérien au PVC exprimé en	
	10 ⁴ Bactéries/mm ²	% de recouvrement
Contrôle: cellules non traitées	8 ± 1	16 ± 4,5
Cellules prétraitées au lysozyme	5 ± 0,8	8,9 ± 1,4
Cellules incubées en présence de LTA exogène	2,5 ± 0,4	4,5 ± 1,1

Cependant, l'hydrolyse au lysozyme n'étant pas spécifique du LTA, nous ne pouvons pas confirmer leur intervention dans l'adhésion d'après les résultats décrits ci-dessus.

2.2.1.2 Test d'adhésion en présence de LTA exogène

Ce test d'adhésion a été réalisé par incubation simultanée des bactéries, du LTA de *Staphylococcus aureus* (SIGMA) et du PVC. Le choix du LTA commercial a été dicté par sa similitude avec celui de *Lactobacillus plantarum* (FISCHER et *al.*, 1980).

L'incubation du LTA exogène (2 mg/ml) et de la suspension bactérienne entraîne une réduction considérable de l'adhésion (67,5%) (Tableau XXXVI).

Des résultats comparables ont été observés par HOGG et MANNING (1988), CARRUTHERS et *al.*, (1983). L'inhibition de l'adhésion suggère que le LTA et les cellules bactériennes sont en compétition pour les mêmes sites de fixation ou que le LTA qui s'adsorbe rapidement (CIARDI et *al.*, 1977) entraîne un encombrement spatial qui empêche les cellules d'accéder aux sites de fixation.

Cependant, l'inhibition n'est pas totale, supposant que le LTA n'est pas seulement impliqué mais que d'autres mécanismes interviennent (HOGG et MANNING, 1988).

2.2.2 *Desulfovibrio* sp.

L'implication du lipopolysaccharide (LPS) dans l'adhésion de *Desulfovibrio desulfuricans* à l'acier a été démontré par BEECH et *al.*, (1989).

2.2.2.1 Extraction du LPS de *Desulfovibrio*

BRADLEY et *al.*, (1984), ont montré que l'EDTA 10 mM libérait le LPS et le matériel protéique de la surface de *Desulfovibrio vulgaris*. L'utilisation d'EDTA 0,1 à 1 mM libère la moitié des LPS tout en maintenant la viabilité des bactéries (KEPES, 1978).

2.2.2.1.1 Traitement des cellules bactériennes à l'EDTA

2.2.2.1.1.1 Effet du traitement sur l'hydrophobicité de *Desulfovibrio*

De nombreux travaux ont montré que les LPS et les protéines de la membrane externe des cellules confèrent aux bactéries Gram négatives des caractéristiques hydrophobes (OHMAN et *al.*, 1985). De plus, l'utilisation de mutants dépourvus de la partie polysaccharidique O-spécifique montre que cette chaîne latérale augmente l'hydrophilie des cellules (MAGNUSSON et *al.*, 1977; STENDAHL et *al.*, 1977; ROSENBERG et *al.*, 1980; HERMANSSON et *al.*, 1982; DE MAAGD et *al.*, 1989).

Le traitement à l'EDTA entraîne une légère diminution de l'hydrophobicité de *Desulfovibrio* déterminée à partir de l'angle de contact de l'eau (Tableau XXXVII), quelque soit la densité bactérienne de la suspension.

Tableau XXXVII. Effet de traitements bactériens sur l'hydrophobicité de *Desulfovibrio sp.*

Essai	Angle de contact de l'eau (°)
Témoin: cellules non traitées	41,8 ± 0,3
Cellules traitées à l'EDTA (1mM, 3mn à 37°C)	40,7 ± 0,1
Cellules traitées à l'EDTA et préincubées 1h à 37°C en présence de LPS commercial (2mg/ml)	54,4 ± 0,7

On s'attendait à ce que l'extraction du LPS entraînât une augmentation de l'hydrophobicité (MAGNUSSON et *al.*, 1977); deux raisons peuvent être invoquées: d'une part, l'EDTA libère également une partie du matériel protéique de la surface cellulaire, d'autre part, les portions hydrophobes du LPS peuvent être exposées à la surface des cellules natives.

2.2.2.1.1.2 Influence du traitement dans l'adhésion bactérienne au PVC

Les résultats des tests d'adhésion des cellules de *Desulfovibrio* non traitées ou soumises à l'action de l'EDTA sont présentés dans le tableau XXXVIII.

Les différences entre les essais ne sont pas significatives ($p < 0,1$) pour la suspension bactérienne la plus diluée ($2,2 \cdot 10^8$ bactéries/ml), alors que pour une densité bactérienne plus élevée ($2,5 \cdot 10^9$ bactéries/ml), une augmentation nette de l'adhésion des cellules après traitement à l'EDTA est observée.

Tableau XXXVIII. Influence du traitement à l'EDTA dans l'adhésion de *Desulfovibrio sp.* au PVC

Densité bactérienne (bactéries/ml)	Essai	Attachement bactérien exprimé en	
		10^4 bactéries/mm ²	% recouvrement
2,2. 10 ⁸	- Contrôle: cellules non traitées	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	- Cellules traitées à l'EDTA 1mM	1,1 ± 0,2	1 ± 0,2
	- Cellules traitées à l'EDTA et préincubées en présence de LPS exogène	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,3
2,5. 10 ⁹	- Contrôle: cellules non traitées	9 ± 1,2	8,5 ± 1,1
	- Cellules traitées à l'EDTA 1mM	14 ± 1	12,9 ± 1,4
	- Cellules traitées à l'EDTA et préincubées en présence de LPS exogène	5,2 ± 0,9	4,9 ± 0,9

2.2.2.2 Incubation des cellules traitées à l'EDTA en présence de LPS exogène

2.2.2.2.1 Effet du LPS exogène sur l'hydrophobicité bactérienne

Le LPS exogène entraîne une augmentation significative de l'angle de contact de l'eau (Tableau XXXVII). Cet accroissement de l'hydrophobicité peut être attribué à une exposition en surface du lipide A hydrophobe du LPS exogène. D'autre part, l'addition de cette macromolécule peut induire un réarrangement des molécules de surface de *Desulfovibrio sp.*

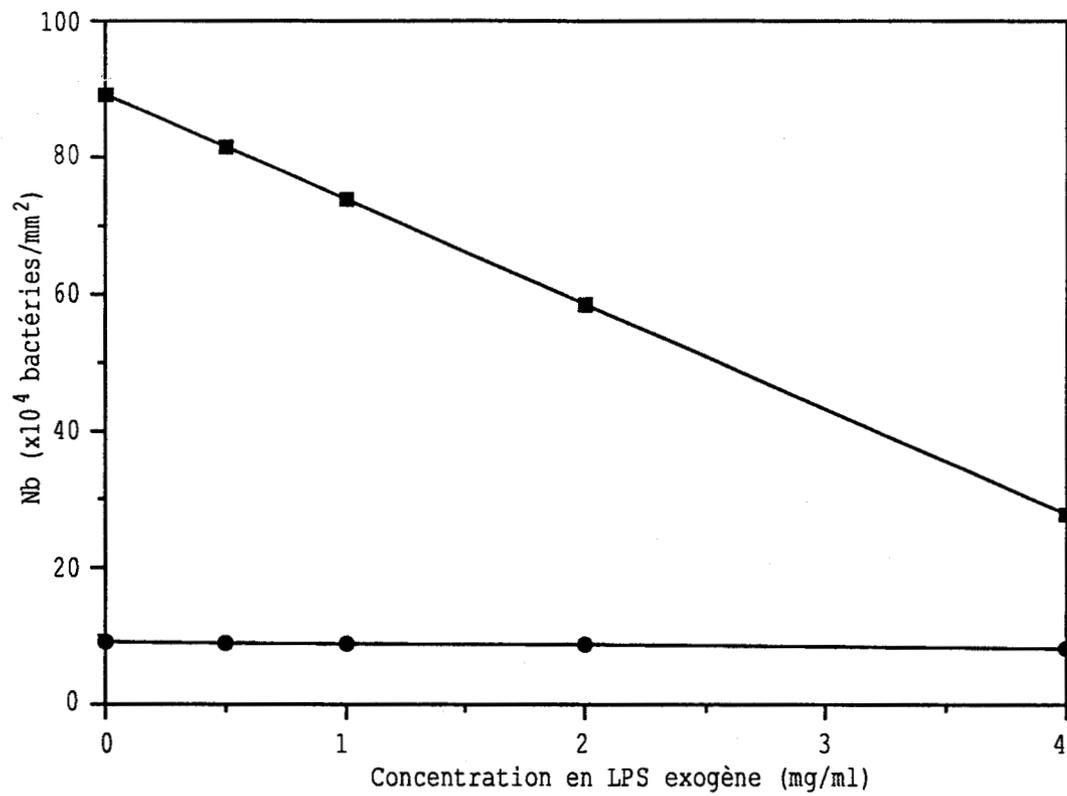


Figure 42. Effet du LPS exogène sur l'adhésion de *Desulfovibrio* au PVC; (■), suspension la plus concentrée, (●), la moins dense

2.2.2.2 Intervention dans l'adhésion

Bien que le LPS exogène augmente considérablement l'hydrophobicité des cellules traitées à l'EDTA, il réduit l'adhésion bactérienne de 42% pour la suspension bactérienne la plus concentrée (Tableau XXXVIII) ce qui suggère que l'adsorption du LPS entraîne une désorganisation de la surface cellulaire (DAVIES et *al.*, 1978) et ainsi un changement de la composition de surface.

L'adsorption du LPS aux cellules de *Desulfovibrio* est contrôlée à la fois par la disponibilité des sites récepteurs de la surface cellulaire et les différences de polarité des molécules. Ainsi, la saturation des sites de la surface cellulaire et/ou l'encombrement stérique dû au LPS lié peut empêcher l'adhésion des bactéries au PVC (DAVIES et *al.*, 1978).

2.2.2.3 Incubation simultanée du LPS exogène et des cellules non traitées

Dans le but de vérifier l'inhibition d'adhésion par adsorption de LPS exogène, nous avons incubé simultanément les bactéries non traitées avec différentes concentrations en LPS commercial pendant le test d'adhésion.

L'incubation en présence de concentrations croissantes de LPS exogène d'une suspension peu concentrée n'entraîne pas de variations ($p < 0,1$) dans l'adhésion de *Desulfovibrio* au PVC (Figure 42). En ce qui concerne la suspension bactérienne plus dense, une inhibition nette de l'attachement bactérien est observée (Figure 42), la réduction de l'attachement est ainsi proportionnelle à la concentration de LPS ajouté. DAVIES et *al.*, (1978), ont observé que la quantité de LPS adsorbé était proportionnelle à la concentration en LPS ajouté jusqu'à ce que la saturation des sites soit atteinte.

Cette inhibition de l'attachement suggère que peu de sites d'adsorption sont disponibles à la surface des substrata (PRINGLE et FLETCHER, 1986) ou que le LPS fixé empêche par encombrement stérique les cellules d'accéder aux sites de fixation. La différence des résultats observée entre les deux densités bactériennes confortent cette hypothèse. En effet, dans le cas de la suspension bactérienne la moins concentrée, tous les sites de fixation du PVC ne sont pas occupés et il n'y a aucune compétition entre le LPS exogène et les cellules

bactériennes; la densité bactérienne de l'autre suspension correspond au seuil de saturation de bactéries adhérentes au PVC, ainsi l'addition du LPS entraîne une compétition pour les sites limités à la surface du PVC.

3 . ADHESION DE POPULATIONS MIXTES AU PVC

Les environnements naturels sont généralement des systèmes hétérogènes dans lesquels des populations de micro-organismes différents coexistent. Ainsi, différents types d'interactions, positives ou négatives, basées sur des phénomènes de compétition, notamment pour le substrat de croissance en concentrations limitantes, peuvent se produire entre les micro-organismes.

Certaines bactéries sont capables d'adhérer aux matériaux solides ou de s'auto-agrégier pour compenser leur faible taux de croissance.

Cependant, la majorité des études traite de l'attachement de cultures pures et l'attachement compétitif entre différentes espèces est très peu connu.

Le but de cette étude était de vérifier si l'attachement au PVC d'une souche donnée pouvait influencer la présence d'autres souches adhérentes.

Le choix des couples bactériens a été dicté:

- soit par leur présence au sein des digesteurs anaérobies et par un substrat de croissance commun; c'est le cas de *Methanospirillum hungatei* et de *Methanobrevibacter arboriphilicus* qui sont deux méthanogènes hydrogénéphiles.

- soit à partir des observations décrites dans la littérature. ISA et al., (1986), ont montré que les bactéries méthanogènes hydrogénéphiles étaient capables de concurrencer, par leur capacité d'attachement, les bactéries sulfato-réductrices qui présentent des taux de croissance plus élevés. Notre choix s'est fixé sur le couple *Methanospirillum hungatei* et *Desulfovibrio sp.*

Deux types d'expériences d'attachement de cultures mixtes ont été réalisés:

- un attachement simultané comparé au contrôle attachement
- un attachement séquentiel comparé au contrôle détachement.

3.1 Couple Methanospirillum-Desulfovibrio

3.1.1 Effet de l'attachement simultané sur l'adhésion des espèces individuelles

Quand les deux bactéries attachent simultanément à la surface, l'adhésion

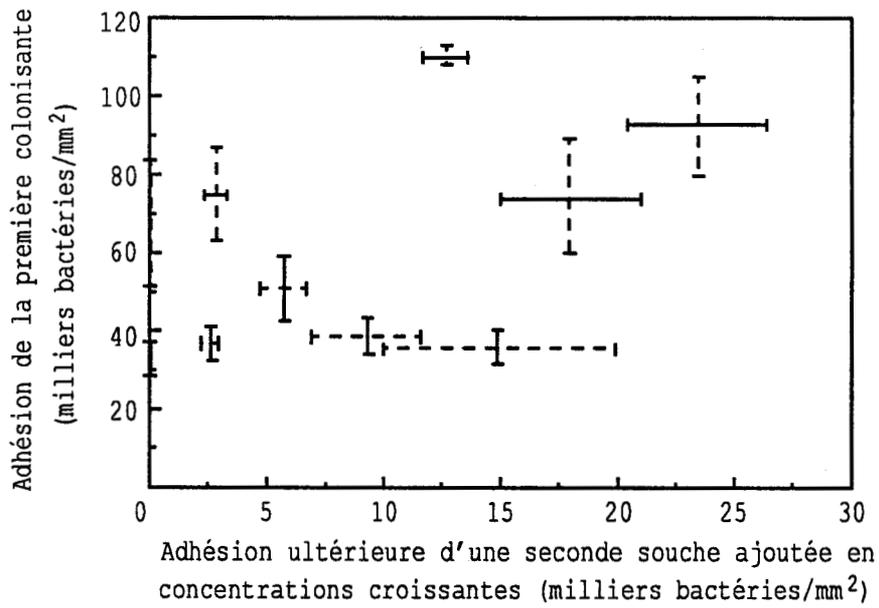


Figure 43. Attachement séquentiel: (|), *Methanospirillum*; (- - -), *Desulfovibrio*
 Les intervalles de confiance sont représentés.

des deux souches est considérablement diminuée par rapport à l'adhésion en cultures pures (Tableau XXXIX).

Tableau XXXIX. Attachement simultané au PVC

Test	Espèce bactérienne	Adhésion bactérienne exprimée en	
		10 ⁴ bactéries/mm ²	% recouvrement
Contrôle attachement	<i>Methanospirillum</i>	4,6 ± 0,5	7,8 ± 0,8
	<i>Desulfovibrio</i>	11 ± 2	10,1 ± 2,2
Attachement simultané	<i>Methanospirillum</i>	2,9 ± 0,4	5 ± 0,7
	<i>Desulfovibrio</i>	2,5 ± 0,5	2,3 ± 0,4

Si on compare la somme des bactéries adhérentes dans le contrôle attachement (15,6. 10⁴ bactéries/mm²) à celle du test simultané (5,4. 10⁴ bactéries/mm²), on observe une inhibition considérable de l'adhésion de 65%. *Desulfovibrio* est la plus affectée par la présence de l'autre bactérie; en effet, l'adhésion de *Desulfovibrio* est réduite de 77% alors que celle de *Methanospirillum* n'est inhibée que de 37%.

3.1.2 Effet de l'attachement séquentiel sur l'adhésion des espèces individuelles

L'attachement ultérieur d'une seconde espèce, en concentrations croissantes (Figure 43; traits horizontaux), ne déplace pas la première espèce colonisante (Figure 43; traits verticaux), quelque soit l'ordre de présentation des souches au PVC. Cependant, la présence de la première bactérie pré-adhérente empêche une adhésion maximale de la seconde espèce (Tableau XL, Figure 43), d'autant plus quand *Methanospirillum* est présentée en premier au PVC.

Ainsi, quand on présente *Methanospirillum* en premier au support, l'adhésion subséquente de *Desulfovibrio* est réduite de 78% et quand on inverse l'ordre d'exposition à la surface, l'adhésion de *Methanospirillum* est inhibée de 45%; ces résultats coïncident avec les pourcentages d'inhibition obtenus dans l'attachement séquentiel et la somme des bactéries adhérentes ne représentent plus que 50,5% et 92% dans les deux séquences.

a



b

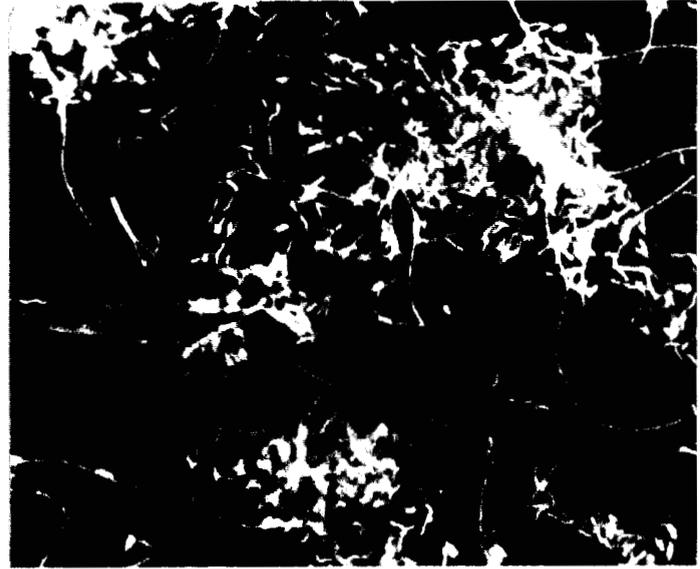


Figure 44. Attachement séquentiel de *Methanospirillum* (filaments)
et de *Desulfovibrio* d'ordre de présentation:
(a), JF1 puis G11, (b), G11 puis JF1. La barre représente 10 μm .

Tableau XL. Attachement séquentiel au PVC

Essai	Séquence	Souche	Adhésion au PVC exprimée en	
			10 ⁴ bactéries/mm ²	% recouvrement
Contrôle détachement		<i>Methanospirillum</i> JF1	3,3 ± 0,4	5,5 ± 0,7
		<i>Desulfovibrio</i> G11	6,8 ± 1,6	6,4 ± 1,5
Attachement	JF ₁ puis	<i>Methanospirillum</i> JF1	3,6 ± 0,4	6,2 ± 0,7
	G ₁₁	<i>Desulfovibrio</i> G11	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5
séquentiel	G ₁₁ puis	<i>Methanospirillum</i> JF1	1,8 ± 0,3	3 ± 0,5
	JF ₁	<i>Desulfovibrio</i> G11	7,5 ± 1,4	7,2 ± 1,4

Il faut également noter que l'incubation en présence de tampon de suspension, *i.e.*, le contrôle détachement, détache une partie des bactéries adhérentes. En effet, si on compare la somme des bactéries adhérentes du contrôle détachement à celle du contrôle attachement, on observe une diminution de 35% du nombre de bactéries adsorbées qui ont été détachées par le liquide.

De plus, un phénomène d'agrégation bactérienne a été décelé dans nos essais où les cellules de *Desulfovibrio* sont étroitement liées aux filaments de *Methanospirillum* (Figure 44a et b).

3.2 Couple Methanospirillum-Methanobrevibacter

3.2.1 Attachement simultané

Quand les deux espèces bactériennes sont présentes simultanément dans la suspension, le nombre total de bactéries adhérentes est réduit de 29%, mais, contrairement au cas précédent, c'est *Methanospirillum* qui est la plus affectée (46% d'inhibition d'attachement) alors que l'adhésion de *Methanobrevibacter* ne subit qu'une réduction de 25% (Tableau XLI).

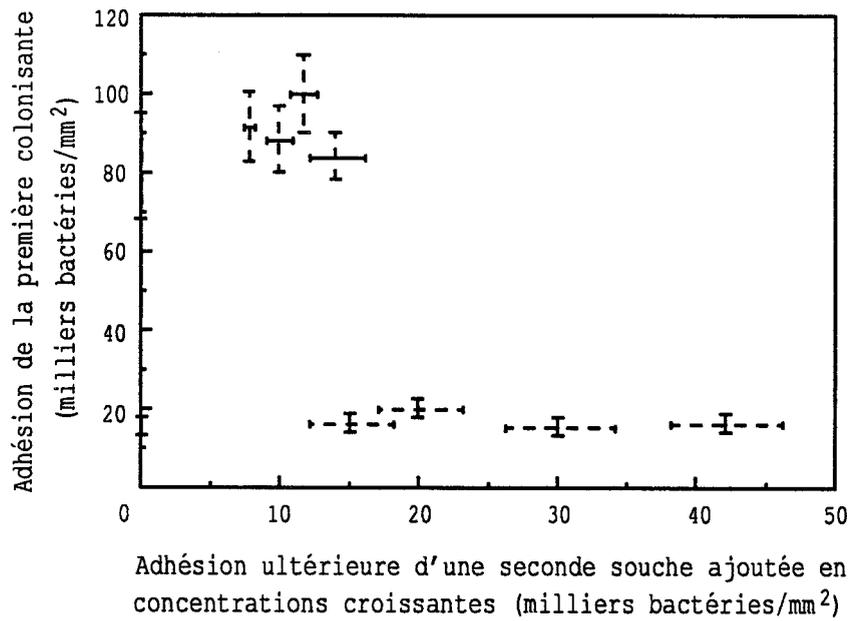


Figure 45. Attachement séquentiel: (|), *Methanospirillum*; (---), *Methanobrevibacter*
 Les intervalles de confiance sont représentés.

Tableau XLI. Attachement simultané au PVC

Test	Espèce bactérienne	Adhésion bactérienne exprimée en	
		10 ⁴ bactéries/mm ²	% recouvrement
Contrôle attachement	<i>Methanospirillum</i>	2,2 ± 0,2	3,7 ± 0,4
	<i>Methanobrevibacter</i>	9 ± 0,8	15,3 ± 1,4
Attachement simultané	<i>Methanospirillum</i>	1,2 ± 0,2	2 ± 0,3
	<i>Methanobrevibacter</i>	6,8 ± 0,7	11,3 ± 1,1

3.2.2 Attachement séquentiel

De façon, analogue au couple précédent, l'attachement subséquent d'une seconde espèce ne déplace pas la première souche adhérente (Figure 45), quelque soit la séquence dans laquelle les micro-organismes sont présentés au PVC.

Si *Methanospirillum* (Figure 45, traits pleins) est la première bactérie mise en contact avec le support, l'adhésion ultérieure de *Methanobrevibacter* (Figure 45, traits pointillés) est réduite de 51%, alors que quand l'ordre de présentation est inversé, l'adhésion antécédente de *Methanobrevibacter* n'empêche pas celle de *Methanospirillum* (Tableau XLII).

Ainsi, seule la présence de *Methanospirillum* en tant que première colonisatrice inhibe toute adhésion ultérieure.

Dans ces essais, le tampon de suspension ne détache que 10% des cellules adhérentes totales par rapport à la somme des contrôles attachement; cette différence de détachement avec l'exemple précédent est principalement dû au faible détachement de *Methanobrevibacter*. En effet, dans les deux couples étudiés, le pourcentage de détachement des cellules de *Methanospirillum* par le tampon de suspension est de 28% et 27% respectivement, alors que dans le premier cas la présence du liquide entraîne le détachement de 38% de cellules adhérentes de *Desulfovibrio* et, dans le deuxième essai, uniquement 6% des cellules de *Methanobrevibacter*.

Tableau XLII. Attachement séquentiel au PVC

Essai	Séquence	Souche	Adhésion au PVC exprimée en	
			10^4 bactéries/mm ²	% recouvrement
Contrôle détachement		<i>Methanospirillum</i> JF1	1,6 ± 0,2	2,7 ± 0,3
		<i>Methanobrevibacter</i> AZ	8,5 ± 1,1	14,4 ± 1,9
Attachement	JF ₁ puis	<i>Methanospirillum</i> JF1	1,7 ± 0,2	2,9 ± 0,3
	AZ	<i>Methanobrevibacter</i> AZ	4,2 ± 0,4	7,1 ± 0,7
séquentiel	AZ puis	<i>Methanospirillum</i> JF1	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,3
	JF ₁	<i>Methanobrevibacter</i> AZ	8,4 ± 0,6	14,2 ± 0,9

3.3 Discussion

L'attachement d'une espèce bactérienne est influencé par l'adhésion précédente ou simultanée d'une autre bactérie, bien que l'attachement de *Methanobrevibacter* n'ait aucun effet sur l'adhésion subséquente de *Methanospirillum*.

De plus, dans les deux cas présentés ci-dessus, la réduction d'attachement de la seconde espèce est plus élevée quand *Methanospirillum* est présentée en premier au PVC, ce qui implique un rôle important de l'ordre de présentation des micro-organismes aux surfaces. FLETCHER, (1980), a également observé un attachement successif de bactéries marines à divers substrata *in situ*. CORPE, (1972), a montré que la formation du film bactérien initial était suivie par l'attachement d'autres organismes (JONES et ISAACSON, 1983; WILLCOX et *al.*, 1990). De telles observations ont également été réalisées dans les digesteurs anaérobies (ZELLNER et *al.*, 1987). TOMEI et *al.*, (1985), ont observé l'attachement sélectif des bactéries consommatrices d'hydrogène, utilisé pour concurrencer les bactéries sulfatoréductrices (ISA et *al.*, 1986).

Pendant l'attachement simultané, les deux espèces sont présentes dans le tampon de suspension et des interactions intercellulaires peuvent se produire et entraîner des modifications des caractéristiques des surfaces bactériennes, ou la formation d'agrégats (MC ELDOWNEY et al., 1987).

Selon BIBEL et al., (1983), les quantités plus faibles de bactéries adhérant en mélange suggèrent un manque d'indépendance dans l'adhésion des bactéries qui rivalisent pour les mêmes sites de fixation.

Les facteurs qui peuvent considérablement affecter l'adhésion subséquente d'autres bactéries sont les suivants:

- la présence de macromolécules sur la surface d'attachement. De tels films conditionnants (FLETCHER et MARSHALL, 1982) altèrent les propriétés d'une surface en la masquant par une couche hydratée.

- les bactéries attachées peuvent également conditionner la surface. Ainsi, l'attachement de la seconde espèce dépend à la fois de l'adhésion cellule-support (si la première bactérie ne recouvre pas la totalité de la surface) et cellule-cellule (BRANTING et al., 1989). Si la première espèce bactérienne occupe tous les sites de fixation du substratum, le succès d'une adhésion subséquente dépendra de la capacité de la seconde espèce à adhérer à la première. Ainsi, la première colonisatrice aura un effet bénéfique pour certaines souches et un effet néfaste pour d'autres espèces (WILLCOX et al., 1990; BRANTING et al., 1989). Un tel phénomène de coopérativité positive a également été observé pour l'adhésion de cultures pures (NESBITT et al., 1982). De la même façon, GIBBONS et VAN HOUTE, (1980), ont montré que différentes bactéries de la plaque dentaire étaient capables d'adhérer directement les unes aux autres. Nous avons par ailleurs observé dans nos essais d'attachement séquentiel, une association fréquente des cellules de *Desulfovibrio* aux filaments de *Methanospirillum*, contrairement aux études de MC ELDOWNEY et al., (1987), qui ont observé des bactéries adhérentes fréquemment séparées.

Cependant, le nombre de sites de fixation sur le substratum est limité et l'attachement d'une espèce peut empêcher celui d'autres cellules dans la même région soit par encombrement stérique (BIBEL et al., 1983), soit par excrétion de polymères (HIRSCH, 1984), soit par répulsion électrostatique (RUTTER et VINCENT, 1984).

Il est important de rappeler ici que *Methanospirillum* est une bactérie méthanogène filamenteuse et l'inhibition de l'adhésion subséquente observée

peut être expliquée soit par l'encombrement spatial qui empêche l'accès aux sites de fixation libres, ou à l'excrétion d'un polymère antiadhésif qui déterminerait un périmètre "interdit" autour des filaments.

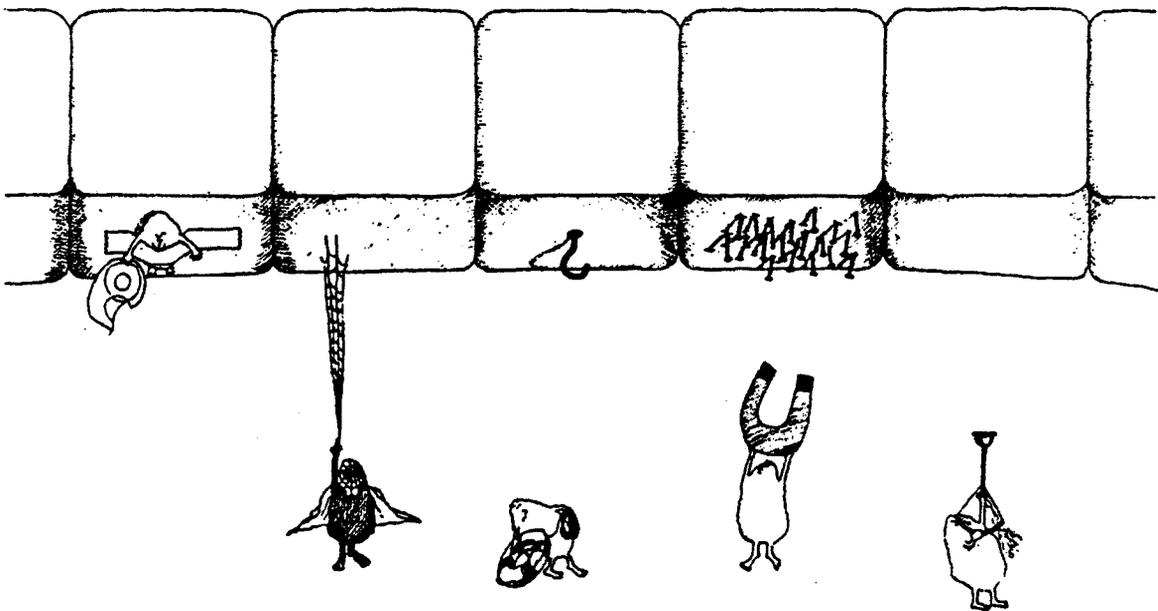
Cependant, le nombre théorique de sites de fixation disponibles sur le PVC, qui est de l'ordre de $10^5/\text{mm}^2$ (résultats non présentés), n'est jamais atteint dans les essais d'attachement séquentiel suggérant que tous les sites ne sont pas occupés.

CONCLUSION GENERALE

Bien que l'ultrastructure et la composition des biofilms et agrégats méthanogènes soient parfaitement connues, aucune étude systématique de la formation de ces biofilms en surface des matériaux plastiques n'a été réalisée jusqu'à présent. C'est pourquoi, les travaux que nous avons réalisés ont été consacrés à la caractérisation des propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes et solides dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la colonisation initiale de différents supports par les bactéries méthanogènes et de promouvoir l'adhésion bactérienne. L'augmentation de la densité de bactéries adhérentes et de la vitesse d'accumulation de la biomasse peut raccourcir la phase de latence du développement du biofilm, étape primordiale dans les conditions de démarrage des réacteurs anaérobies à culture fixée.

La question à élucider dans tous les domaines concernés par l'adhésion microbienne (biofouling, infection, plaque dentaire, ...) est la suivante:

"Comment les bactéries attachent-elles aux surfaces?", c'est-à-dire, quels types d'interactions sont impliqués (interactions électrostatiques, hydrophobes, stéréochimiques, spécifiques,...).



Mécanismes d'adhésion d'après CERI et WESTRA (1988)

Nous avons abordé l'adhésion des bactéries anaérobies selon les deux approches généralement décrites:

- l'approche thermodynamique basée sur la détermination des énergies libres de surface des cellules et du support qui permet de calculer l'énergie libre d'adhésion

- la théorie D.L.V.O qui prend en considération les interactions électrostatiques et les forces de dispersion de van der Waals.

Après avoir mis au point une méthodologie originale permettant une détermination exacte et reproductible des angles de contact sur tapis bactériens, nous avons estimé les énergies de surface des souches étudiées; elles sont comprises dans une gamme de 96,5 à 146,2 mJ. m⁻², correspondant à des bactéries moyennement hydrophobes à hydrophiles.

La microélectrophorèse a permis de déterminer les mobilités électrophorétiques en fonction du pH; toutes les bactéries étudiées portent une charge négative à pH 7 (de -3,5 à -1. 10⁻⁸ m². V⁻¹. s⁻¹).

L'importance de la composition élémentaire des surfaces bactériennes dans l'adhésion a été démontrée à partir de la relation observée entre la composition élémentaire et l'hydrophobicité bactérienne. D'autre part, les données chimiques obtenues ont été utilisées pour interpréter la dépendance de la charge vis-à-vis du pH.

Après caractérisation des supports solides en termes de rugosité de surface et d'hydrophobicité, nous avons réalisé des essais d'adhésion en conditions statiques où nous avons observé un très faible attachement des bactéries méthanogènes filamenteuses, e.g., *Methanotherix* et *Methanospirillum*.

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'énergie de surface des bactéries d'une part, ou des solides d'autre part, et le nombre de bactéries adhérentes. Les résultats de cette étude ont montré qu'un nombre élevé de bactéries adhérerait aux matériaux de faible énergie de surface, à l'exception du polystyrène et que les bactéries les plus hydrophobes présentaient une tendance à adhérer à tous les supports. Aucune relation nette n'a par ailleurs été observée entre les mobilités électrophorétiques et l'attachement bactérien.

FLETCHER, (1988), a émis l'hypothèse suivante qui renforce l'importance de la connaissance de la composition élémentaire des surfaces bactériennes: sur un substratum de faible énergie, c'est-à-dire hydrophobe, les constituants lipidiques ou les groupements non polaires des polysaccharides de surface peuvent intervenir dans l'adhésion alors que sur une surface hydrophile, les polysaccharides hydratés peuvent représenter les substances adhésives.

L'utilisation de traitements chimiques des solides dans le but d'accroître l'adhésion bactérienne a montré qu'ils engendraient une réduction significative de l'hydrophobicité des supports. De plus, nous avons observé une adsorption

accrue de bactéries aux supports chargés négativement par fixation de cations trivalents, *e.g.*, les ions ferriques, qui diminuent la répulsion électrostatique cellule-support.

L'interaction bactérie-support a également été déterminée théoriquement en calculant l'énergie libre interfaciale d'adhésion ΔG_{SBL} . Pour la totalité des souches, ΔG_{SBL} devient positive pour les matériaux d'énergie libre inférieure à 65,4 mJ. m⁻², cette valeur positive décrivant une faible liaison (VAN PELT, 1985) et une adhésion réversible (BUSSCHER et *al.*, 1986).

Nous avons montré que nos essais sur supports hydrophobes ne répondaient pas au concept thermodynamique de description de l'adhésion proposé par ABSOLOM et *al.*, (1983), et BUSSCHER et *al.*, (1984a) qui implique un contact direct entre les cellules et le support.

Ainsi, l'adhésion réversible aux supports hydrophobes se produit à une certaine distance de séparation de la surface, dans le minimum secondaire.

Si on considère la force d'adhésion, nous pouvons affirmer que l'adhésion aux surfaces de faible énergie peut être décrite par la théorie D.L.V.0 où les cellules qui adhèrent dans le minimum secondaire sont adsorbées réversiblement alors que l'attachement est beaucoup plus ferme sur les supports hydrophiles engendrant la formation de monocouches homogènes de bactéries adhérentes.

L'existence de ce minimum secondaire a récemment été confirmée par l'utilisation de la microscopie d'interférence en réflexion (FLETCHER, 1988). Ces observations ont été confirmées par les microphotographies qui ont montré une agglomération des cellules faiblement attachées aux surfaces hydrophobes, en opposition aux substrata de forte énergie, et par le contrôle détachement des essais en cultures mixtes où nous avons montré que la seule présence du tampon pouvait extraire une partie des bactéries faiblement adhérentes (VAN PELT, 1985).

Ces résultats confirment les observations réalisées en réacteur anaérobie qui stipulent que les biofilms méthanogènes sont faiblement fixés aux supports polymériques et facilement érodés par le flux liquide (HUYSMAN et *al.*, 1983).

L'utilisation de cations trivalents, *i.e.*, les ions ferriques, qui réduisent la distance de séparation cellule-support renforce cette hypothèse puisque la majorité des bactéries adhèrent invariablement à tous les supports traités, quelque soit leur hydrophobicité, et sont distribuées uniformément sur les surfaces, impliquant un attachement plus ferme.

Cependant, toutes les techniques utilisées dans cette étude fournissent des informations sur la composition chimique globale des surfaces cellulaires et négligent ainsi la présence de parties moléculaires spécifiques et localisées qui peuvent intervenir dans l'attachement bactérien. Ainsi, nous avons montré que l'incubation d'une bactérie Gram positive, *Lactobacillus*, et d'une bactérie Gram négative, *Desulfovibrio*, en présence de LTA ou de LPS exogènes, respectivement, inhibait l'adhésion de façon significative, par occupation des sites de fixation plutôt que par interactions spécifiques.

Les résultats ont démontré que l'attachement bactérien à une surface peut être affecté par la composition de la population adhérente et peut différer considérablement de l'attachement d'une espèce en culture pure. Les essais d'attachement mixte ont montré l'importance de la séquence dans laquelle les micro-organismes sont présentés au PVC. Bien que la première espèce interfère avec l'attachement de la seconde, le degré et le mécanisme varie pour chaque combinaison.

Le but de notre prochaine recherche sera de déterminer si les résultats obtenus dans cette étude peuvent être appliqués à la colonisation à long terme de populations méthanogènes définies ou non, en réacteurs de laboratoire sous des conditions hydrodynamiques.

ANNEXES

ANNEXE I

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE B.C.Y.T par litre
(Base Carbonate Yeast extract Trypticase pH 7)

- <u>Solution macrominérale</u>		<u>50 ml</u>
Composition: KH ₂ PO ₄	6 g/l	
NaCl	12 g/l	
MgCl ₂ , 6H ₂ O	2 g/l	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,6 g/l	
- <u>Solution de vitamines</u> (concentrée 10 fois)		<u>1 ml</u>
Composition: Biotine	2 mg/ml	
Acide Folique	2 mg/ml	
Pyridoxine-HCl	10 mg/ml	
Thiamine-HCl	5 mg/ml	
Riboflavine	5 mg/ml	
Acide Nicotinique	5 mg/ml	
DL-Calcium panthoténate	5 mg/ml	
Vitamine B12	0,1 mg/ml	
- <u>Traces minérales</u>		<u>10 ml</u>
Composition: Acide nitrilotriacétique neutra-	12,8 g/l	
lisé à pH 6,5 avec KOH 10 N		
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,35 g/l	
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,1 g/l	
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,024 g/l	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1 g/l	
ZnCl ₂ anhydre	0,1 g/l	
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,025 g/l	
H ₃ BO ₃	0,01 g/l	
Na Molybdate, 2H ₂ O	0,024 g/l	
NaCl	1 g/l	
Na ₂ SeO ₃ , 5H ₂ O	0,026 g/l	
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,12 g/l	
- <u>NH₄Cl</u>		<u>1 g</u>
- <u>Extrait de Levure</u>		<u>0.5 g</u>
- <u>Trypticase</u>		<u>0.5 g</u>
- <u>Resazurine</u> à 2%		<u>1 ml</u>
- <u>Tampon HEPES</u> 50 mM		<u>11.9 g</u>
- <u>KHCO₃</u> anhydre: - pour N ₂ CO ₂ 85-15%		<u>2.1 g</u>
- pour H ₂ CO ₂ 80-20%		<u>5.6 g</u>

ANNEXE II

DOSAGE COLORIMETRIQUE DU FER A L'ORTHOPHENANTHROLINE

Principe: Fe^{2+} donne avec la *o*-phénanthroline un ion complexe rouge contenant trois molécules de *o*- phénanthroline pour un Fe^{2+} .
Pour le dosage des ions Fe^{3+} , il est nécessaire de réduire au préalable Fe(III) en Fe(II) par de l'acide ascorbique.

Mode opératoire: le dosage s'effectue à pH 3,5.

4 ml d'échantillon

0,4 ml d'acide ascorbique à 2%

0,4 ml d'orthophénanthroline à 2%

Laisser 1h à l'abri de la lumière.

La lecture est ensuite réalisée à 515 nm à l'aide d'un spectrocolorimètre PYE UNICAM SP 8.100 équipé d'une microcuve à circulation, d'épaisseur 10 mm.

Dans les conditions de dosage précédentes, la concentration de fer contenu dans l'échantillon est obtenue en mg/l.

ANNEXE III

DETERMINATION DE L'ENERGIE DE SURFACE DES BACTERIES

En pratique, γ_S , γ_S^p et γ_S^d des surfaces bactériennes ont été calculées comme suit:

a. γ_L de la série de mélanges eau milliQ-n propanol a été déterminée par la méthode tensiométrique de la lame immergée de WILHEMY (BELLON-FONTAINE, 1986). Le principe de cette technique est de mesurer la force verticale appliquée par la surface du liquide sur une lame. On utilise pour cela un tensiomètre PROLABO à équilibrage automatique qui permet de mesurer la force exercée par le liquide sur une lame de platine que l'on émerge, l'appareil affiche directement la valeur de la tension de surface.

b. γ_L^d des différents mélanges eau-n propanol est calculé après détermination des angles de contact des liquides sur parafilm (BUSSCHER et al., 1984a), pour lequel on connaît les paramètres suivants:

$$\gamma_S^d \text{ parafilm} = 25,5 \text{ mJ. m}^{-2}$$

$$\gamma_S^p = 0$$

π_e est supposée nulle

Le remplacement de ces valeurs dans l'équation du chapitre 3113 donne:

$$\cos \theta_{PAR} = -1 + 2 \frac{(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2}}{\gamma_L}$$

$$(\gamma_L^d)^{1/2} = \frac{\gamma_L (\cos \theta_{PAR} + 1)}{2 (\gamma_S^d)^{1/2}}$$

$$\gamma_L^d = \left[\frac{\gamma_L (\cos \theta_{PAR} + 1)}{10,1} \right]^2$$

On peut alors déterminer γ_L^p à partir de:

$$\gamma_L^p = \gamma_L - \gamma_L^d$$

c. γ_S^d de la surface bactérienne est calculée par mesure de l'angle de contact θ_H d'un liquide apolaire, *e.g.*, l'hexadécane, sur le tapis bactérien (γ_L^p de l'hexadécane est nulle et π_e est supposée nulle).

En remplaçant dans l'équation du chapitre 3113 la tension de surface γ_L de l'hexadécane par sa valeur numérique (27,6 mJ. m⁻²), on obtient:

$$\cos \theta_H = -1 + 2 \frac{(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2}}{\gamma_L}$$

$$(\gamma_s^d)^{1/2} = \frac{\gamma_L (\cos \theta_H + 1)}{2 (\gamma_L^d)^{1/2}}$$



$$\gamma_s^d = [2,63. (\cos \theta_H + 1)]^2$$

d. γ_s^d de la bactérie est calculée à partir de l'équation suivante, dérivée de celle du chapitre 3113:

$$\gamma_L (\cos \theta + 1) - 2 (\gamma_s^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2} = 2(\gamma_s^p \cdot \gamma_L^p)^{1/2} - \pi_e$$

En traçant $\gamma_L (\cos \theta + 1) - 2 (\gamma_s^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2}$ en fonction de $(\gamma_L^p)^{1/2}$, on obtient une droite de pente $2 (\gamma_s^p)^{1/2}$ et d'ordonnée à l'origine π_e .

e. L'énergie libre de surface est alors obtenue par: $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$

ANNEXE IV
ANALYSE XPS DES ECHANTILLONS BACTERIENS

Principe de la spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

Cette technique est basée sur l'effet photoélectrique. L'échantillon est bombardé par un faisceau monochromatique (dans notre cas, il s'agit d'une anode d'aluminium AlK_{α}) ou non, qui induit l'émission des électrons des niveaux s et p.

L'énergie cinétique E_k des photoélectrons émis est mesurée dans un analyseur d'énergie électrostatique. Cette mesure permet la détermination de l'énergie de liaison dans l'échantillon à partir de la relation:

$$h\nu = E_b + E_k$$

Le nombre de photoélectrons émis est tracé en fonction de leur énergie de liaison, produisant un spectre d'énergie du photoélectron. Chaque pic du spectre enregistré est caractéristique d'un niveau d'énergie donné pour un élément donné (C, O, N, P, ...). L'énergie de liaison nette des photoélectrons dépend de l'état chimique (niveau d'oxydation, électronégativité des atomes liés) de l'élément.

A cause de la diffusion non élastique des électrons dans un solide, l'information recueillie concerne les couches moléculaires les plus externes (2 à 5 nm de profondeur d'analyse) et conduit à une analyse élémentaire de la surface.

Les déplacements des pics donnent une information sur les liaisons dans lesquelles les atomes sont liés et, en conséquence, sur les groupements fonctionnels présents en surface.

Description de l'appareil

Il s'agit d'un spectromètre à photoélectrons X type SSX 100, modèle 206 (Surface Science Instruments Co.).

Tout spectromètre XPS se compose de:

- une source de rayons X représentée par une anode métallique (AlK_{α} ou MgK_{α})
- un analyseur d'énergie qui sépare les électrons de différentes énergies cinétiques de sorte que le système de détection puisse les compter individuellement; c'est un analyseur électrostatique hémisphérique
- un détecteur d'électrons. Les électrons qui passent à travers l'analyseur sont dirigés vers le détecteur d'électrons.

ANNEXE V
 DETERMINATION DES ENERGIES DE SURFACE DES SUPPORTS
 PAR LA TECHNIQUE A DEUX LIQUIDES

Une goutte d'eau (indice W) est déposée sur l'échantillon immergé dans un hydrocarbure (indice H) apolaire ($\gamma_H = \gamma_H^d$). La condition d'équilibre s'écrit:

$$\gamma_{SH} = \gamma_{SW} + \gamma_{HW} \cos\theta$$

D'après le modèle de Fowkes:

$$\gamma_{SH} = \gamma_S + \gamma_H - 2(\gamma_S^d \gamma_H^d)^{1/2}$$

$$\gamma_{SW} = \gamma_S + \gamma_W - 2(\gamma_S^d \gamma_W^d) - I_{SW}^p$$

où: γ_S est l'énergie du solide ($\gamma_S = \gamma_S^p + \gamma_S^d$)

γ_W représente la tension de surface de l'eau

γ_H est l'énergie de surface de l'hydrocarbure

I_{SW}^p représente la contribution des forces polaires à l'énergie interfaciale; $I_{SW}^p = 2(\gamma_S^p \gamma_W^p)^{1/2}$

En remplaçant γ_{SH} et γ_{SW} par ces expressions dans l'équation de Young, on obtient l'équation générale:

$$\gamma_W - \gamma_H + \gamma_{HW} \cos\theta = 2(\gamma_S^d)^{1/2} [(\gamma_W^d)^{1/2} - (\gamma_H^d)^{1/2}] + I_{SW}^p$$

Cette équation a la forme $Y = aX + b$. Ainsi, la mesure des angles de contact de gouttes d'eau dans divers hydrocarbures permet de tracer une droite de pente $2(\gamma_S^d)^{1/2}$ et d'ordonnée à l'origine I_{SW}^p .

Dans les cas de solides à très faible énergie de surface, *e.g.*, le téflon, il est impossible de déposer la goutte à la surface car l'eau ne déplace pas l'alcane adsorbé sur le polymère; il est alors nécessaire de remplacer l'eau par un autre liquide tel que la formamide.

La méthode à deux liquides permet de mesurer les composantes de dispersion et polaires de l'énergie de surfaces. De plus, cette méthode est sensible à de très faibles variations de l'état de surface, ce qui nécessite la réalisation de nombreux essais.

ANNEXE VI

POSTER PRESENTE A LA CONFERENCE: "BIOADHESION", GRONINGEN, 6-9 Novembre 1990

INFLUENCE OF ELECTROSTATIC AND HYDROPHOBIC INTERACTIONS ON INITIAL ADHESION OF ANAEROBIC BACTERIA

F.FREGARD⁽¹⁾, G.ALBAGNAC⁽¹⁾ and C.VERNIN⁽²⁾

(1) I.N.R.A, STA, 369 rue Jules-Guesde-B.P 39, 59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, FRANCE

(2) S.G.N, 1 rue des Hérons, Montigny le Bretonneux, 78182 Saint Quentin en Yvelines, FRANCE

INTRODUCTION

Two theories allow the description or the prediction of initial bacterial adhesion
 - the DLVO theory modelises both Van der Waals and electrostatic interactions
 - the thermodynamic approach mainly describes Van der Waals interactions.

OBJECTIVES

The aim of this study was to correlate bacterial surface-charge and surface free energy with the adhesion of six anaerobic bacteria on five supports of different surface free energy, i.e., polyvinyl-chloride (PVC), polystyrene (PS), sulfonated polyvinyl-chloride (SPVC), sulfonated polystyrene (SPS) and glass.

MATERIALS AND METHODS

SURFACE FREE ENERGY

- Surface free energy (γ_s) of solids was determined by the two-liquids method from the measurement of the steady state contact angle (Θ) of a drop of water on a support immersed in alkane (hexane, octane, decane, pentane, hexadecane).
 - Bacterial surface free energy was determined by depositing a drop of n propanol-water mixtures on a bacterial layer in air. The steady state contact angle was measured using a video recording system (Mitsubishi Corporation).

ELECTROPHORETIC MOBILITY

The electrophoretic mobility of suspended bacteria in PBS at different pH values was determined as the velocity of cells in an electric field using a laser Doppler velocimetry with a Zeta Sizer (Malvern Instruments, England).

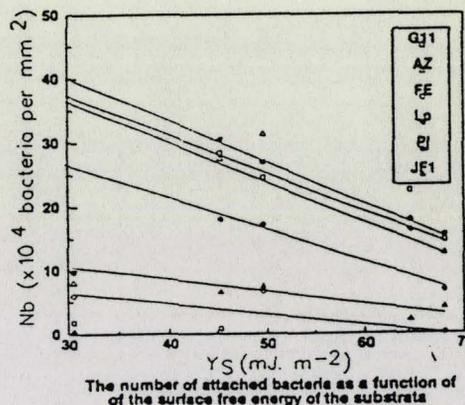
CELL ADHESION

The number of adhering bacteria on different substrata (100 fields per slide) was measured by epifluorescence microscopy (Olympus BH2) and image analyse (Quantimet Q10, Cambridge Instruments, England).

RESULTS

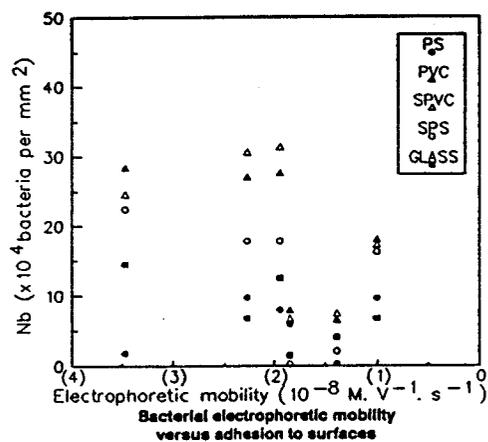
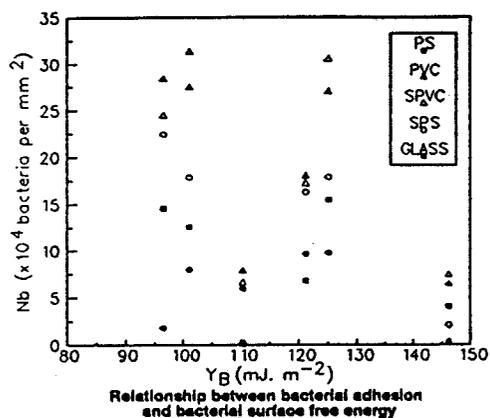
LONG-RANGE DISPERSION (44%) AND SHORT-RANGE POLAR (46%) COMPONENTS OF THE INTERFACIAL FREE ENERGY OF ADHESION, ΔG_{ad}

Strain	Support	Surface free energies (mJ. m ⁻²)				Interfacial free energies of adhesion (mJ. m ⁻²)		
		γ_s	γ_b	γ_{sb}	γ_{sb}^p	ΔG_{ad}	ΔG_{ad}^p	ΔG_{ad}^n
JF1	PS	26.3	119.9	28.4	2.1	-0.1	45.1	45
	PVC			39.8	5.3	-0.4	36.6	36.2
	SPVC			43.8	5.8	-0.5	35.6	35.1
	SPS			31.6	37.8	-0.2	2.8	2.6
	GLASS			26.3	43.6	0	-5.9	-5.9
P1	PS	27.1	98			-0.2	35.5	35.3
	PVC					-0.6	28.8	28.2
	SPVC					-0.7	28	27.3
	SPS					-0.3	2.2	1.9
	GLASS					0	-4.6	-4.6
J2	PS	27.1	98.1			-0.2	33.7	33.5
	PVC					-0.6	27.4	26.8
	SPVC					-0.7	26.5	25.8
	SPS					-0.3	2.1	1.8
	GLASS					0	-4.4	-4.4
JF	PS	26.4	112.7			-0.1	28.6	28.5
	PVC					-0.5	23.1	22.8
	SPVC					-0.6	22.4	22
	SPS					-0.2	1.7	1.5
	GLASS					0	-3.7	-3.7
AZ	PS	27	74			-0.2	23.7	23.5
	PVC					-0.6	19.3	18.7
	SPVC					-0.7	18.7	18
	SPS					-0.3	1.5	1.2
	GLASS					0	-3.1	-3.1
GL1	PS	25.1	71.4			-0.1	22.3	22.2
	PVC					-0.1	18.1	18
	SPVC					-0.1	17.4	17.5
	SPS					-0.1	1.4	1.3
	GLASS					0	-2.9	-2.9



Bacterial attachment was favored by low surface free energy, PVC and SPVC, but bacteria tended to agglomerate on these substrata, reflecting a weak binding in the secondary minimum. Such an agglomeration was not found on high free energy surfaces, glass and SPS.

The dispersion surface free energy was almost constant whereas polar free energy of different surfaces was quite different.



There was a weak tendency for the more hydrophobic and negatively charged bacteria to attach in higher number to all of the substrata.

CONCLUSIONS

The negative values for ΔG^d indicates favourable condition for adhesion at long separation distances (> 50 nm) for low free energy supports.

A stronger bacterial attachment is found on high free energy surfaces, in this case, adhesion takes place at lower separation distance.

However, in all cases, a negative relationship between bacterial charge and number of attached bacteria is strongly suggest a relevant influence of electrostatic interactions. This is confirmed by the importance of polar free energy of both bacteria and substrata in bacterial adhesion which was observed in our experiments.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABSOLOM D.R., LAMBERTI F.V., POLICOVA Z., ZINGG W., VAN OSS C.J., NEUMANN A.W. (1983)

Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 90-97.

ABSOLOM D.R., ZINGG W., THOMSON C., POLICOVA Z., VAN OSS C.J., NEUMANN A.W. (1985)

Erythrocyte adhesion to polymer surfaces. *J. Colloid Interface Sci.*, 104, 51-59.

ALLISON D.G., SUTHERLAND I.W. (1987)

The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1319-1327.

ALY R., SHINEFIELD H.R., LITZ C., MAIBACH H.I. (1980)

Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. *J. Infect. Diseases*, 141, 463-465.

AMORY D.E., GENET M.J., ROUXHET P.G. (1988)

Application of XPS to the surface analysis of yeasts cells. *Surf. Interf. Anal.*, 11, 478-486.

ARCHIBALD A.R. (1988)

Bacterial cell wall structure and the ionic environment. In *Homeostatic Mechanisms in Micro-organisms. FEMS Symposium*, 44, 159-174.

BALCH W.E., FOX G.E., MAGRUM L.J., WOESE C.R., WOLFE R.S. (1979)

Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbial Rev.*, 43, 260-296.

BARKER H.A. (1956)

Biological formation of methane. In *Bacterial Fermentations*, John Wiley & Sons inc. New York, pp 1-27.

BARTELL F.E., ZUIDEMA hH.H. (1936)

Wetting characteristics of solids of low surface tensions such as talc, waxes and resin. *J. Am. Chem. Soc.*, 58, 1449-1454.

BEACHEY E.H. (1975)

Binding of group A streptococci to human oral mucosal cells by lipoteichoic acid (LTA). *Trans. Assoc. Am. Physicians Phila.*, 88, 285-288.

BEECH I.B., GAYLARDE C.C. (1989)

Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to solid steel surfaces. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 201-207.

BELLON-FONTAINE M.N. (1986)

Caractérisation physico-chimique des surfaces solides et adhésion des bactéries aux surfaces. *These de 3ème cycle*, Paris VI.

BHATIA D., VIETH W.R., VENKATASUBRAMANIAN K. (1985)

Steady-state and transient behavior in microbial methanification. I. Experimental results. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1192-1198.

BIBEL D.J., ALY R., BAYLES C., STRAUSS W.G., SHINEFIELD H.R., MAIBACH H.I. (1983)

Competitive adherence as a mechanism of bacterial interference. *Can. J. Microbiol.*, 29, 700-703.

BOCHEM H.P., SCHOBERTH S.M., SPREY B., WENGLER P. (1982)

Thermophilic biomethanisation of acetic acid: morphology and ultrastructure of a granular consortium. *Can. J. Microbiol.*, 28, 500-510.

BOONE D.R., BRYANT M.P., (1980)

Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 626-632.

BOONE D.R., XUN L. (1987)

Effect of pH, temperature and nutrients on propionate degradation by a methanogenic enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1589-1592.

BORIES A., RAYNAL J., JOVER J.P. (1982)

Fixed-film reactor with plastic media for methane fermentation of distillery wastewaters. *Proc. 2nd E.C. Conference Energy for Biomass*, pp 567-571.

BOTTA G.A. (1981)

Surface components in adhesion of group A Streptococci to pharyngeal epithelial cells. *Curr. Microbiol.*, 6, 101-104.

BRADLEY G., GAYLARDE C.C., JOHNSTON J.M. (1984)

A selective interaction between ferrous ions and lipopolysaccharide in *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Gener. Microbiol.*, 130, 441-444.

BRADLEY G., GAYLARDE C.C. (1986)

Influence of iron on outer membrane components of *Desulfovibrio vulgaris*. *Curr. Microbiol.*, 13, 39-42.

BRADLEY G., GAYLARDE C.C. (1988)

Iron uptake by *Desulfovibrio vulgaris* outer membrane components in artificial vesicles. *Curr. Microbiol.*, 17, 189-192.

BRANTING C., SUND M.L., LINDER L.E. (1989)

The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro. *Archs. Oral. Biol.*, 34, 347-353.

BREITENBUCHER K., SIEGL M., KNUPFER A., RADKE M. (1989)

Open-pore sintered glass as a high-efficiency support media in bioreactors: new results and long-term experiences achieved in high-rate anaerobic digestion. In *Technical Advanced in Biofilm Reactors*, Nice 4-6 April, pp 39-48.

BRYANT M.P., CAMPBELL L.L., REDDY C.A., CRABILL M.R. (1977)

Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1162-1169.

BRYERS J.D., CHARACKLIS W.G. (1982)

Processes governing primary biofilm formation. *Biotech. Bioeng.*, 24, 2451-2476.

BUHR H.O., ANDREWS J.F. (1977)

The thermophilic anaerobic digestion process. *Water Res.*, 11, 129-149.

BUSSCHER H.J., WEERKAMP A.H., VAN DER MEI h., VAN PELT A.W.J., DE JONG H.P., ARENDS J. (1984a)

Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 980-983.

BUSSCHER H.J., VAN PELT A.W.J, DE BOER P., DE JONG H.P., ARENDS J. (1984b)
The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces*, 9, 319-333.

BUSSCHER H.J., UYEN H.M.W.J.C., WEERKAMP A.H., POSTMA W.J., ARENDS J. (1986)
Reversibility of adhesion of oral Streptococci to solids. *FEMS Microbiol. Lett.*, 35, 303-306.

BUSSCHER H.J., WEERKAMP A.H., VAN DER MEI H.C., VAN STEENBERGHE D., QUIRYNEN M., PRATT I.H., MARECHAL M., ROUXHET P.G. (1989)
Physicochemical properties of oral streptococcal cell surfaces and their relation with adhesion to solid substrata *in vitro* and *in vivo*. *Colloids and Surfaces*, 42, 345-353.

CARRUTHERS M.M., KABAT W.J. (1983)
Mediation of staphylococcal adherence to mucosal cells by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.*, 40, 444-446.

CERI H., WESPRA Y. (1988)
Host binding proteins and bacterial adhesion: ecology and binding model. *Biochem. Cell. Biol.*, 66, 541-548.

CHANG Y.I. (1989)
The effect of cationic electrolytes on the electrostatic behavior of cellular surfaces with ionizable groups. *J. Theor. Biol.*, 139, 561-571.

CHANGUI C., DOREN A., STONE W.E.E., MOZES N., ROUXHET P.G. (1987)
Surface properties of polycarbonate and promotion of yeast cells adhesion. *Journal de Chimie Physique*, 84, 275-281.

CHARACKLIS W.G. (1984)
Biofilm development: a process analysis. In Marshall K.C. (ed) *Microbial Adhesion and Aggregation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 137-157.

CHARTRAIN M., ZEIKUS J.G. (1986)
Microbial ecophysiology of whey biometanisation: characterization of bacterial trophic populations and prevalent species in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 188-196.

CIARDI J.E., ROLLA G., BOWEN W.H., REILLY J.A. (1977)
Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. *Scand. J. Dent. Res.*, 85, 387-391.

CONRAD R., PHELPS T.J., ZEIKUS J.G. (1985)
Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 595-601.

CORPE W.A. (1972)

Microfouling: the role of primary film forming marine bacteria. In *Proc. 3rd Int. Congr. Marine Corrosion and Fouling*, ACKER R. F., BROW B.F., DE PALMA J.R. and INVERSON W.P. (eds), Northwestern University Press, Evanston, pp 598-609.

CORPE W.A. (1980)

Microbial surfaces components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In *Adsorption of Microorganisms To Surfaces*, G. Bitton and K.C. Marshall, Eds., Wiley-Interscience, New York, pp 105-144.

COSTERTON J.W., GEESEY G.G., CHENG K.J. (1978)

Comment collect les bactéries. *Pour la Science*, 5, 100-110.

COSTERTON J.W. (1980)

Some techniques involved in study of adsorption of microorganisms to surfaces. In *Adsorption of Microorganisms To Surfaces*, G. Bitton and K.C. Marshall, Eds., Wiley-Interscience, New York, pp 105-144.

COSTERTON J.W., IRVIN R.T. (1981)

The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35, 299-324.

COSTERTON J.W., LAPPIN-SCOTT H.M. (1989)

Behavior of bacteria in biofilms. *ASM News*, 55, 650-654.

COYETTE J., GHUYSEN J.M. (1970)

Structure of the walls of *Lactobacillus acidophilus* strain 63 AM Gasser. *Biochemistry*, 9, 2935-2943.

CRIADO M.T., FERREIROS C.M., SAINZ V. (1985)

Adherence and hydrophobicity in *Neisseria meningitidis* and their relationship with surface charge. *Med. Microbiol. Immunol.*, 174, 151-156.

CURTIS A.S.G., FORRESTER J.V., Mc INNES C., LAWRIE F. (1983)

Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J. Cell Biol.*, 97, 1500-1506.

DANIELSON A., NORKRANS B., BJORNOSSON A. (1977)

On bacterial adhesion - The effect of certain enzymes on adhered cells of a marine *Pseudomonas* sp. *Botanica Marina*, 20, 13-17.

DAVIES M., STEWART-TULL D.E.S., JACKSON D.M. (1978)

The binding of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* to mammalian cell membranes and its effect on liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 508, 260-276.

DE MAAGD R.A., RAO A.S., MULDER I.H.M., GOOSEN-DE ROO L., VAN LOOSDRECHT M.C.M., WIJFFELMAN C.A., LUGTENBERG B.J.J. (1989)

Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viviae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.*, 171, 1143-1150.

DERJAGUIN B.V., LANDAU L. (1941)

Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta. Physicochem.*, URSS, 14, 633-662.

DE ZEEUW W., LETTINGA G. (1981)

Acclimatation of digested sewage sludge during the start-up of an anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. In *Proc. 35th Industrial Waste Conf. Ann. Arbor.*, pp 39-47.

DOLFING J.A., GRIFFIOEN A., VAN NEERNEN A.R.W., ZEVENHUIZEN L.P.T.M. (1985)
Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.*, 31, 744-750.

DOLFING J.A. (1987)

Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. PhD Thesis, Wageningen, The Netherlands.

DOYLE R.J., NESBITT W.E., TAYLOR K.G. (1982)

Hypotheses on the mechanisms of adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.*, 15, 1-5.

DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G., VERRIER D. (1984)

Methane production processes by fermentation of biomass. In *Synthetic Fuels*. Ed. par G.E. BEGHI, pp 219-232.

DUBOURGUIER H.C., PRENSIER G., SAMAIN E., ALBAGNAC G. (1985)

Granular methanogenic sludge. In *Energy from Biomass*, Palz W. (eds), Elsevier Applied Science Publishers, pp 542-546.

DUBOURGUIER H.C., ARCHER D.B., ALBAGNAC G., PRENSIER G. (1988)

Structure and metabolism of methanogenic microbial conglomerates. In *Anaerobic Digestion, 5th Int. Symp. Anaerob. Dig.*, Bologna, Italy, 22-26 May.

ESCALANTE-SEMERANA J.C., LEIGH J.A., WOLFE R.S. (1984)

New insights into the biochemistry of methanogenesis from H₂ and CO₂. *Proc. 4th. Int. Symp. Microbiol. Growth on C₁ compounds*. Ed. R.L. CRAWFORD, R.S. HANSON, pp 191-198.

FACCHINI P.J., DICOSMO F., RADVANIY L.G., GIGUERE Y. (1988)

Adhesion of *Catharanthus roseus* to surfaces: effect of substrate hydrophobicity. *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 935-938.

FERRY J.G., SMITH P.H., WOLFE R.S. (1974)

Methanospirillum, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatei* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 465-469.

FIEBIG K. (1981)

Methanbildung aus cholin drech eine definierte Mischkultur. Thesis, University of Gottingen, Germany.

FISCHER W., KOCH H.U., ROSEL P., FIEDLER F. (1980)

Alanine ester-containing native lipoteichoic acids do not act as lipoteichoic acid carrier. *J. Biological Chemistry*, 255, 4557-4562.

FLETCHER M. (1976)

The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. *J. Gener. Microbiol.*, 94, 400-404.

FLETCHER M. (1977)

The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.*, 23, 1-6.

FLETCHER M. (1980)

Adherence of a marine micro-organisms to smooth surfaces. In *Bacterial Adherence*, BEACHEY E.H. (eds), 6, 346-374.

FLETCHER M., MARSHALL K.C. (1982)

Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 184-192.

FLETCHER M., PRINGLE J.H. (1985)

The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial attachment to solid surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, 104, 5-14.

FLETCHER M. (1987)

How do bacteria attach to solid surfaces. *Microbiological Sciences*, 4, 133-136.

FLETCHER M. (1988)

Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol.*, 170, 2027-2030.

FLETCHER M., LESSMANN J.M., LOEB G.I. (1990)

Bacterial surface adhesives and biofilm matrix polymers of marine and freshwater bacteria. In *Proc. Bioadhesion Conference*, Groningen, The Netherlands, November 6-9.

FOWKES F.M. (1967)

Intermolecular and interatomic forces at interfaces. *Surfaces and Interfaces*, 1, 197-224.

FOWKES F.M. (1983)

Acid-base interactions in polymer adhesion. In *Physicochemical Aspects of Polymer Surfaces*, K.C. MITTAL, Eds, Plenum Press, 2, 583-603.

FYNN G.H., WHITMORE T.N. (1982)

Colonization of polyurethane reticulated foam biomass support particle by methanogen species. *Biotechnol. Lett.*, 4, 577-582.

GEESEY G.G. (1982)

Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *ASM News*, 48, 9-14.

GIBBONS R.J. (1980)

Adhesion of bacteria to the surfaces of the mouth. In *Microbial Adhesion to Surfaces*, (R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent, eds). Soc. of Chemical Industry-Ellis Horwood Ltd, pp 351-378.

GIBBONS R.J., VAN HOUTE J. (1980)

Bacterial adherence and the formation of dental plaques. In *Bacterial Adherence*, BEACHEY E.H. (eds), 6, 61-104.

GORRIS L.G.M., VAN DEURSEN J.M.A., VAN DER DRIFT C., VOGELS G.D. (1988)

Influence of wastewater composition on biofilm development in laboratory methanogenic fluidized-bed reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 95-102.

GORRIS L.G.M., VAN DEURSEN J.M.A., VAN DER DRIFT C., VOGELS G.D. (1989)

Biofilm development in laboratory methanogenic fluidized bed reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 687-693.

GOUET J.P. (1974)

Les comparaisons de moyennes et de variances; application à l'agronomie. *Bureau d'Etudes Statistiques de l'I.T.C.F.*, pp 5-53.

GRINNEL F. (1974)

Studies on the mechanism of cell attachment to a substratum: evidence for three biochemically distinct processes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, 304-310.

GUNSALUS R.P., WOLFE R.S. (1980)

Methyl Coenzyme M reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.*, 265, 1891-1895.

HARADA H., ENDO G., TOHYA Y., MOMONOI K. (1988)

High rate performance and its related characteristics of granulated sludges in UASB reactors treating various wastewaters. In *Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion*. Bologna, Italy, 22-26 May.

HARVEY M., FORSBERG C.W., BEVERIDGE T.J., POS J., OGILVIE J.R. (1984)

Methanogenic activity and structural characteristics of the microbial biofilm on a needle-punched polyester support. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 633-638.

HECKELS J.E., BLACKETT B., EVERSON J.S., WARD M.E. (1976)

The influence of surface charge on the attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human cells. *J. Gener. Microbiol.*, 96, 359-364.

HENZE M., HARREMOES P. (1983)

Anaerobic treatment of wastewater in fixed-film reactors. A literature reviews. *Wat. Sci. Tech.*, 15, 1-101.

HERMANSSON M., KJELLEBERG S., KORHONEN T.K., STENSTROM T.A. (1982)

Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. *Arch. Microbiol.*, 131, 308-312.

HIRSCH P. (1984)

Microcolony formation and consortia. In *Microbial Adhesion and Aggregation*, MARSHALL K.C. (eds), Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, pp 373-393.

HOBBIES J.E., DALEY R.J., JASPER S. (1977)

Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1225-1228.

HOGG S.D., MANNING J.E. (1988)

Inhibition of adhesion of viridans streptococci to fibronectin-coated hydroxyapatite beads by lipoteichoic acid. *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 483-489.

HUGHES D.E. (1979)

In *Proc. 1st International Symposium on Anaerobic Digestion*. University College, Cardiff, September 17-21.

HULSHOFF POL L.W. (1989)

The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. PhD Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

- HUSER B.A., WUHRMANN K., ZEHNDER A.J.B. (1982)
Methanothrix soehngeni gen. nov. sp. nov. a new acetotropic non-hydrogen oxidizing *Methanobacterium*. *Arch. Microbiol.*, 132, 1-9.
- HUYSMAN P., VAN MEENEN P., VAN ASSCHE P., VERSTRAETE W. (1983)
Factors affecting the colonization of non porous packing materials in model upflow methane reactors. *Biotechnol. Lett.*, 5, 643-648.
- ISA Z., GRUSENMEYER S., VERSTRAETE W. (1986)
Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: microbiological aspects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 580-587.
- JIMENO A., BERMUDEZ J.J., CANOVAS-DIAZ M., MANJON A., IBORRA J.L. (1990)
Methanogenic biofilm growth studies in an anaerobic fixed-film reactor. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 387-394.
- JONES G.W., ISAACSON R.E. (1983)
Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 10, 229-260.
- KANATANI K., MIURA H., SAKAMOTO M., OSHIMURA M. (1989)
Protoplast formation and regeneration of *Lactobacillus plantarum*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1185-1187.
- KANDLER O., KONIG H. (1985)
Cell envelopes of Archaeobacteria. In *The Bacteria*, WOESE C.R., WOLFE R.S. (eds), Academic Press, Inc. New York, 8, 413-458.
- KEPES A. (1978)
La cellule bactérienne. In *Aspects moléculaires des fonctions membranaires*, MASSON (eds), pp 105-113.
- KOHLER M.P.E., ZEHNDER A.J.B. (1984)
Carbon monoxide dehydrogenase and acetate thiokinase in *Methanothrix soehngeni*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 21, 287-292.
- KONIG H. (1988)
Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.*, 34, 395-406.
- KRISTJANSSON J.K., SCHONHEIT P., THAUER R.K. (1982)
Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch. Microbiol.*, 131, 278-282.
- KUENEN S.G., HARDER W. (1982)
Microbial competition in continuous culture. In Burns R.G., Slater J.H. (eds), *Experimental Microbial Ecology*, Blackwell Scientific Publishers Oxford, pp 342-367.
- LAMBERT P.A., HANCOCK I.C., BADDILEY J. (1975)
The interaction of magnesium ions with teichoic acid. *J. Biochem.*, 149, 519-524.
- LAMBERTS B.L., PEDERSON E.D., SIMONSON L.G. (1985)
The effects of basic and acidic synthetic polypeptides on the adherence of the oral bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*, to hydroxyapatite. *Archs. Oral. Bio.*, 30, 295-298.

LA MOTTA E.J., ASCE M., HICKEY R.F., BUYDOS J.F. (1982)

Effect of polyelectrolytes on biofilm growth. *J. Environ. Eng. Div. Proc. Am. Soc. Civil. Engineers*, 108, 1326-1341.

LANGWORTHY T.A., TORNABENE T.G., HOLZER G. (1982)

Lipids of Archaeobacteria. *Zbl. Bakt. Hyg., I., Abt. Orig.*, C₃, 228-244.

LE RUYET P. (1984)

Hydrolyse et fermentation des polyosides végétaux par les bactéries anaérobies. *Thèse de Docteur-Ingénieur*.

LETTINGA G. (1980)

Anaerobic digestion for energy saving and production. *1st E.C. Conference "Energy from Biomass"*, London and New York, Applied Science Publishers, pp 264-278.

LETTINGA G., HULSHOFF POL L.W., KOSTER I.W., WIEGANT W.M., DE ZEEUW W.J., RINZEMA A., GRIN P.C., ROERSMA R.E., HOBMA S.W. (1984)

High-rate anaerobic wastewater treatment using the UASB reactor under a wide range of temperature conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2, 253-284.

LILJEMARK W.F., BLOOMQUIST C.G., FENNER L.J., ANTONELLI P.J., COULTER C. (1989)

Effect of neuraminidase on the adherence to salivary pellicle of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mitis*. *Caries Res.*, 23, 141-145.

LORDER J.C., LISS P.S. (1985)

Control by organic coatings of the surface charge of estuarine suspended particles. *Limnol. Oceanogr.*, 30, 418-421.

LOVLEY D.R., KLUG M.J. (1983)

Sulfate reducers can outcompete Methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 187-192.

LUDWICKA A., JANSEN B., WADSTROM T., PULVERER G. (1984)

Attachment of *Staphylococci* to various synthetic polymers. *Zbl. Bakt. Hyg.*, A 256, 479-489.

MAAT D.Z., HABETS L.H.A. (1987)

The upflow anaerobic sludge blanket wastewater treatment system: a technical review. *Pulp. Paper. Can.*, 88, 60-64.

MAGNUSSON K.E., STENDAHL O., TAGESSON C., EDEBO L., JOHANSSON G. (1977)

The tendency of smooth and rough *Salmonella thyphimurium* bacteria and lipopolysaccharide to hydrophobic and ionic interaction, as studied in aqueous polymer two-phase systems. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 85, 212-218.

MARGOLIS L.B., ROZOVSKAJA I.A., CRAGOE E. (1988)

Intracellular pH and cell adhesion to solid substrate. *FEBS Lett.*, 234, 449-450.

MAROUDAS N.G. (1975)

Polymer exclusion, cell adhesion and membrane fusion. *Nature*, 254, 695-696.

MARSHALL K.C., STOUT R., MITCHELL R. (1971)
Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.*, 68, 337-348.

MARSHALL K.C. (1985)
Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In *Bacterial Adhesion* (SAVAGE D.C. and FLETCHER M., eds) Plenum Press, New York and London, pp 133-161.

MARSHALL K.C. (1986)
Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 25, 59-86.

MAZIA D., SCHATTEN G., SALE W. (1975)
Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J. Cell Biol.*, 66, 198-200.

Mc ELDOWNEY S., FLETCHER M. (1986)
Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.*, 132, 513-523.

Mc ELDOWNEY S., FLETCHER M. (1987)
Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Arch. Microbiol.*, 148, 57-62.

Mc INERNEY M.J., BRYANT M.P., HESPELL R.B., COSTERTON J.W. (1981)
Syntrophomonas wolfei gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 1029-1039.

MIGAS J.V., ANDERSON K.L., CRUDEN D.L., MARKOVETZ A.J. (1989)
Chemotaxis in *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 264-265.

MIORNER H., ALBERTSSON P., KRONVALL G. (1982)
Isoelectric points and surface hydrophobicity affinity partition in aqueous two-phase systems. *Infect. Immun.*, 36, 227-234.

MIORNER H., JOHANSSON G., KRONVALL G. (1983)
Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A *Streptococci*. *Infect. Immun.*, 39, 336-343.

MOZES N., MARCHAL F., HERMESSE M.P., VAN HAECHT J.L., REULIAUX L., LEONARD A.J., ROUXHET P.G. (1987)
Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and non electrostatic interactions. *Biotech. Bioeng.*, 30, 439-450.

MOZES N., LEONARD J., ROUXHET P.G. (1988)
On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta*, 945, 324-334.

MURRAY W.D., VAN DEN BERG L. (1981)
Effect of support material on the development of microbial fixed films converting acetic acid to methane. *J. Appl. Bacteriol.*, 51, 257-265.

NANNINGA H.J., GOTTSCHAL J.C. (1987)

Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. nov. and other sulfate-reducing bacteria isolated from an anaerobic purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 802-809.

NESBITT W.E., DOYLE R.J., TAYLOR K.G., STAAT R.H., ARNOLD R.R. (1982)

Positive cooperativity in the binding of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Infect. and Immun.*, 35, 157-165.

NEUMANN A.W., GOOD R.J., HUPE C.J., SEJPAL M. (1974)

An equation-of-state approach to determine surface tensions of low-energy solids from contact angles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 49, 291-304.

OFEK I., BEACHEY E.H., JEFFERSON W., CAMPBELL G.L. (1975)

Cell membrane-binding properties of group A streptococcal lipopolyteichoic acid. *J. Exp. Medicine*, 141, 990-1003.

OHMAN L., MAGNUSSON K.E., STENDAHL O. (1985)

Effect of monosaccharides and ethyleneglycol on the interaction between *Escherichia coli* bacteria and octyl sepharose. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.*, 93, 133-138.

OLSSON J., GLANTZ P.O., KRASSE B. (1976)

Surface potential and adherence of oral *Streptococci* to solid surfaces. *Scand. J. Dent. Res.*, 84, 240-242.

ORLA-JENSEN S. (1928)

The lactic acid bacteria. In J.W. Boissevain and Co., Haarlem, The Netherlands.

ORSTAVIK D. (1977)

Sorption of *Streptococci* to glass: effects of macromolecular solutes. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 85, 47-53.

OWENS D.K., WENDT R.C. (1969)

Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polymer. Sci.*, 13, 1741-1747.

PARKIN G.F., SPEECE R.E. (1983)

Attached versus suspended growth anaerobic reactors: response to toxic substances. *Wat. Sci. Tech.*, 15, 261-289.

PATEL G.B., SPROTT G.D., HUMPHREY R.W., BEVERIDGE T.J. (1986)

Comparative analyses of the sheath structures of *Methanothrix concilii* GP6 and *Methanospirillum hungatei* strains GP1 and JF1. *Can. J. Microbiol.*, 32, 623-631.

PELLERIN P. (1987)

Caractérisation des oligosaccharides de *Methanothrix soehngeni*. Thèse de 3^{ème} cycle, USTLFA, LILLE.

PHELPS T.J., CONRAD R., ZEIKUS J.G. (1985)

Sulfate-dependent interspecies H₂ transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during coculture metabolism of acetate or methanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 589-594.

POWELL M.S., SLATER N.K.H. (1983)

The deposition of bacterial cells to solid surfaces. *Biotech. Bioeng.*, 25, 891-900.

PRENSIER G., DUBOURGUIER H.C., THOMAS I., ALBAGNAC G., BUISSON M.N. (1988)
Specific immunological probes for studying the bacterial associations in granules and biofilms. In *Proc. Granular Anaerobic Sludge, Microbiology and Technology*, Lettinga G., Zehnder A.J.B., Grotenhuis J.T.C. and Hulshoff Pol L.W. (eds), pp 25-27.

PRINGLE J.H., FLETCHER M., ELLWOOD D.C. (1983)

Selection of attachment mutants during the continuous culture of *Pseudomonas fluorescens* and relationship between attachment ability and surface composition. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2557-2569.

PRINGLE J.H., FLETCHER M. (1986)

Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1321-1325.

PRINGLE J.H., FLETCHER M. (1986)

Adsorption of bacterial surface polymers to attachment substrata. *J. Gen. Microbiol.*, 132, 743-749.

REYNOLDS E.C., WONG A. (1983)

Effects of adsorbed protein on hydroxyapatite zeta potential and *Streptococcus mutans* adherence. *Infect. and Immun.*, 39, 1285-1290.

ROBINSON J.A., TIEDGE J.M. (1984)

Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Arch. Microbiol.*, 137, 26-32.

ROBINSON R.W., AKIN D.E., NORDSTEDT R.A., THOMAS M.V., ALDRICH H.C. (1984)
Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 127-136.

ROSENBERG M., GUTNICK D., ROSENBERG E. (1980)

Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 9, 29-33.

ROSENBERG M., BAYER E.A., DELAREA J., ROSENBERG E. (1982)

Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 929-937.

ROUXHET P.G., MOZES N., HERMESSE N., MATTA-AMMOURI M.P. (1987)

Immobilization of microorganisms by adhesion to a support: influence of physico-chemical factors. In *Proc. 4th European Congress on Biotechnology*, (O.M. Neijssel, R.R. van der Meer and K.C.A. luyben, eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 2, 193-196.

ROUXHET P.G., MOZES N. (1990)

Physical chemistry of the interface between attached microorganisms and their support. *Wat. Sci. Tech.*, 22, 1-6.

ROY F., SAMAIN E., DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G. (1986)

Syntrophomonas sapovorans sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch. Microbiol.*, 5, 381-401.

RUTTER P.R., VINCENT B. (1980)

The adhesion of microorganisms to surfaces: physico-chemical aspects. In *Microbial adhesion to surfaces*, (R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent, eds). Soc. of Chemical Industry-Ellis Horwood Ltd, pp 79-92.

RUTTER P.R., VINCENT B. (1984)

Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms, and the fluid phase. In *Microbial adhesion and aggregation*, Marshall K.C. (ed). Springer, Berlin heidelberg New York, pp 21-38.

SCHAKENRAAD J.M., ARENDS J., BUSSCHER H.J. (1989)

Kinetics of cell spreading on protein precoated substrata: a study of interfacial aspects. *Biomaterials*, 10, 43-50.

SCHOENHEIT P., KRISTJANSSON J.K., THAUER R.K. (1982)

Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Arch. Microbiol.*, 132, 285-288.

SJOLLEMA J., BUSSCHER H.J., WEERKAMP A.H. (1989)

Experimental approach for studying adhesion of microorganisms to solid substrata: applications and mass transport. *J. Microbiol. Method.*, 9, 79-90.

SKOGEN L.O., REINBOLD G.W., VEDAMUTHU E.R. (1974)

Capsulation of *Propionibacterium*. *J. Milk Food Technol.*, 37, 314-321.

SMALL D.A., MOORE N.F. (1987)

Measurement of surface charge of *Baculovirus polyhedra*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 598-602.

SONNENFELD E.M., BEVERIDGE T.J., DOYLE R.J. (1985)

Discontinuity of charge on cell wall poles of *Bacillus subtilis*. *Can. J. Microbiol.*, 31, 875-877.

STENDAHL O., EDEBO L., MAGNUSSON K.E., TAGESSON C., HJERTEN S. (1977)

Surface charge characteristics of smooth and rough *Salmonella typhimurium* bacteria determined by aqueous two-phase partitioning and free zone electrophoresis. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 85, 334-340.

STENSTROM T.A. (1989)

Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ., Microbiol.*, 55, 142-147.

STIEB M., SCHINCK B. (1985)

Anaerobic oxydation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a spore-forming, obligately syntrophic bacterium. *Arch. Microbiol.*, 140, 387-390.

STRONACH S.M., DIAZ-BAEZ M.C., RUDD T., JOHN N. (1987)

Factors affecting biomass attachment during start-up and operation of anaerobic fluidized beds. *Biotech. Bioeng.*, 30, 611-620.

SUTHERLAND I.W. (1980)

Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. In *Microbial adhesion to surfaces*, (R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent, eds). Soc. of Chemical Industry-Ellis Horwood Ltd, pp 329-337.

TADROS T.F. (1980)

Particle-surface adhesion. In *Microbial Adhesion To Surfaces* (R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent, eds). Soc. of Chemical Industry-Ellis Horwood Ltd, pp 93-116.

TAMAI Y., MAKUUCHI K., SUZUKI M. (1967)

Experimental analysis of interfacial forces at the plane surface of solids. *J. Phys. Chem.*, 71, 1741-1747.

TEN BRUMMELER E., HULSHOFF POL L.W., DOLFING J., LETTINGA G., ZEHNDER A.J.B. (1985)

Methanogenesis in an U.A.S.B reactor at pH 6 on an acetate-propionate mixture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1472-1477.

THAUER R.K., JUNGERMAN K., DECKER K. (1977)

Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 41, 100-180.

THIELE J.H., CHARTRAIN M., ZEIKUS G. (1988)

Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 10-19.

THOMAS P. (1972)

Ultrastructure de *Desulfovibrio gigas* Le Gall et de *Desulfovibrio hildenborough*. *J. Microscopie*, 13, 349-360.

TOMEI F.A., MAKI J.S., MITCHELL R. (1985)

Interactions in syntrophic associations of endospore-forming, butyrate-degrading bacteria and H₂-consuming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1244-1250.

TOUZEL J.P., ALBAGNAC G. (1983)

Isolation and characterization of *Methanosarcina mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol. Lett.*, 16, 241-245.

TOUZEL J.P., PETROFF D., ALBAGNAC G. (1985)

Isolation and characterization of a new thermophilic *Methanosarcina*, the strain CHTI 35. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6, 66-71.

TOUZEL J.P., PRENSIER G., ROUSTAN J.L., THOMAS I., DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G. (1988)

Description of a new strain of *Methanotherix soehngeni* and rejection of *Methanotherix concilii* as a synonyme of *M. soehngeni*. *Intern. J. System. Bacteriol.*, 38, 30-36.

URRIBELARREA J.L., PAREILLEUX A. (1981)

Anaerobic digestion: microbial and biochemical aspects of volatile acid production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 118-122.

VAN DEN BERG L., KENNEDY K.J. (1980)

Support materials for stationary fixed film reactors for high-rate methanogenic fermentations. *Biotechnol. Lett.*, 3, 165-170.

VAN DEN BERG L., LENTZ C.P. (1980)

Effects of film area-to-volume ratio, film support, height and direction of flow on performance of methanogenic fixed film reactors. In *Anaerobic Filters: An Energy Plus for Wastewater Treatment*, January 9-10, pp 1-10.

VAN DEN BERG L., KENNEDY K.J. (1982)

Performance characteristics of anaerobic downflow stationary fixed film reactors. In *First International Symposium On Fixed Film Processes*, Kings Island, pp 1419-1436.

VAN DER MEI H.C., LEONARD A.J., WEERKAMP A.H., ROUXHET P.G., BUSSCHER H.J. (1988)

Surface properties of *Streptococcus salivarius* HB and non fibrillar mutants: measurement of zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy. *J. Bacteriol.*, 170, 2462-2466.

VAN DER MEI H.C., BROKKE P., DANKERT J., FEIJEN J., ROUXHET P.G., BUSSCHER H.J. (1989a)

Physico-chemical surface properties of non-encapsulated and encapsulated coagulase-negative *Staphylococci*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2806-2814.

VAN DER MEI H.C., GENET M.J., WEERKAMP A.H., ROUXHET P.G., BUSSCHER H.J. (1989b)

A comparison between the elemental surface compositions and electrokinetic properties of oral *Streptococci* with and without adsorbed salivary constituents. *Arch. Oral Biol.*, 34, 889-894.

VAN DIJK L.J., GOLDSWEER R., BUSSCHER H.J. (1988)

Interfacial free energy as a driving force for pellicle formation in the oral cavity: an *in vivo* study in Beagle dogs. *Biofouling*, 1, 19-25.

VAN DRIEL D., WICKEN A.J., DICKSON M.R., KNOX K.W. (1977)

Cellular location of the lipoteichoic acids of *Lactobacillus fermenti* NCTC 6991 and *Lactobacillus casei* NCTC 6375. *J. Ultrastructure Res.*, 43, 483-497.

VAN LOOSDRECHT M.C.M., LYKLEMA J., NORDE W., SCHRAA G., ZEHNDER A.J.B. (1987a)

The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1893-1897.

VAN LOOSDRECHT M.C.M., LYKLEMA J., NORDE W., SCHRAA G., ZEHNDER A.J.B. (1987b)

Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1898-1901.

VAN LOOSDRECHT M.C.M. (1988)

Bacterial adhesion. PhD Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

VAN LOOSDRECHT M.C.M., LYKLEMA W., NORDE W., ZEHNDER A.J.B. (1989)

Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb. Ecol.*, 17, 1-15.

VAN LOOSDRECHT M.C.M., NORDE W., LYKLEMA J., ZEHNDER A.J.B. (1990)

Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Sciences*, 52, 105-114.

- VAN OSS C.J., GOOD R.J., CHAUDHURY M. (1986)
The role of Van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, 111, 378-390.
- VAN PELT A.W.J. (1985)
Adhesion of oral streptococci to solids. *PhD Thesis*, Groningen, The Netherlands.
- VAN PELT A.W.J., VAN DER MEI H.C., BUSSCHER H.J., ARENDS J., WEERKAMP A.H. (1984)
Bacterial surface free energy and adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 25, 279-282.
- VAN PELT A.W.J., WEERKAMP A.H., UYEN M.H.W.J.C., BUSSCHER H.P., DE JONG H.P., ARENDS J. (1985)
Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH₃ to polymers with different surface free energies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1270-1275.
- VAN WAGENEN R.A., COLEMAN D.L., KING R.N., TRIOLO P., BROSTROM L., SMITH L.M., GREGONIS D.E., ANDRADE J.D. (1981)
Streaming potential investigations: polymer thin films. *J. Colloid. Interface Sci.*, 84, 155-162.
- VERDIER I., (1990)
Mécanismes de formation initiale des biofilms méthanogènes. *Mémoire d'Ingénieur C.N.A.M.*
- VERRIER D., MORTIER B., DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G. (1988)
Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. In *Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion*, Bologna, Italy, May 22-26.
- VERWEY E.J., OVERBEEK J.T.G. (1948)
Theory of the stability of lyophobic colloids. Elsevier/ North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- VOGELS G.D., VAN BEELEN P., KELTJENS J.T., VAN DER DRIFT C. (1984)
Structure and function of methanopterin and other 7-methylpterins of methanogenic bacteria. *Proc; 4th. Int. Symposium Microbial Growth on C1 Compounds*, Ed. R. L. Crawford, R. S. Hanson, pp 182-187.
- WAGNER C.D., DAVIS L.E., ZELLER M.V., TAYLOR J.A., RAYMON R.H., GALE L.H. (1981)
Empirical atomic sensitivity factors for quantitative analysis by electron spectroscopy for chemical analysis. *Surf. Interf. Anal.*, 3, 211-225.
- WICKEN A.J., KNOX K.W. (1975)
Lipoteichoic acids: a new class of bacteria antigen. *Science*, 187, 1161-1167.
- WICKEN A.J., KNOX K.W. (1980)
Bacterial cell surfaces amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta*, 604, 1-26.
- WIEGANT W.M., DE MAN A.W.A. (1986)
Granulation of biomass in the thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors treating acidified wastewaters. *Biotech. Bioeng.*, 28, 718-727.

WILLCOX M.D.P., DRUCKER D.B., HILLIER V.F. (1990)

Cohesion between oral streptococci and *Neisseria pharyngis* on saliva-coated glass, in the presence and absence of sucrose. *Microbios.*, 61, 197-205.

WOESE C.R., FOX G.E. (1977)

Phylogenetic structure of the procaryotic domain the primary kingdoms. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 5088-5090.

WOLLERSHEIM R. (1989)

Adhesion and biofilm development of acetate-, propionate-, and butyrate-degrading microorganisms on glass surfaces. *Biotechnol. Lett.*, 11, 749-752.

ZEHNDER A.J.B., HUSER B.A., BROCK T.D., WUHRMANN K. (1980)

Characterization of an acetate-decarboxylating non hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 124, 1-11.

ZEHNDER A.J.B., INGORSSEN K., MARTI K. (1982)

Microbiology of methane bacteria. In *Anaerobic Digestion*, 2nd. Int. Symp. On Anaerob. Dig., Travemunde, 6-11 September.

ZELLNER G., WINTER J. (1987a)

Analysis of a highly efficient methanogenic consortium producing biogas from whey. *System. Appl. Microbiol.*, 9, 284-292.

ZELLNER G., VOGEL P., KNEIFEL H., WINTER J. (1987b)

Anaerobic digestion of whey and whey permeate with suspended and immobilized complex and defined consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 306-314.

ZINDER S.H. (1984a)

Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *ASM News*, 50, 294-298.

ZINDER S.H., CARDWELL S.C., ANGUISH T., LEE M., KOCH M. (1984b)

Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotherix* sp. as an important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 796-807.



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.

Ce travail constitue une étude des mécanismes impliqués dans l'adhésion initiale de bactéries méthanogènes, ou autres anaérobies, aux matériaux plastiques. Dans cette optique, nous avons caractérisé les propriétés des surfaces bactériennes et polymériques en terme de charge, d'hydrophobicité et de composition chimique à l'aide de méthodologies originales.

Nous avons montré que les bactéries méthanogènes filamenteuses, de nature hydrophile, adhéraient 3 à 4 fois moins à l'ensemble des supports que les autres bactéries anaérobies et, dans tous les cas, nous avons observé une adhésion maximale au PVC.

Nos essais ont montré l'intervention de l'hydrophobicité et de la charge des surfaces dans la colonisation initiale. Cependant, nos travaux sur supports de faible énergie de surface répondent à la théorie D.L.V.O. des interactions à longue distance, les bactéries adsorbant réversiblement dans le minimum secondaire alors qu'elles adhèrent de façon plus homogène et plus ferme aux supports hydrophiles et aux surfaces traitées par des cations trivalents, à des distances de séparation inférieures.

Nous avons par ailleurs observé l'importance de polymères de surface, tels que le lipopolysaccharide ou l'acide lipotéichoïque qui interviennent indirectement dans l'adhésion par l'intermédiaire de leurs propriétés de surface.

Enfin, nous avons montré qu'il existait une compétition pour l'attachement qui varie en fonction des populations en présence et que la séquence de présentation des bactéries au support intervenait souvent dans l'adhésion subséquente.