

**Titre:** Biodégradation du trichloroéthylène (TCE) dans un réacteur couplé anérobiose/aérobiose  
Title: anérobiose/aérobiose

**Auteur:** Adeline Narjoux  
Author:

**Date:** 2000

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Narjoux, A. (2000). Biodégradation du trichloroéthylène (TCE) dans un réacteur couplé anérobiose/aérobiose [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].  
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8805/>

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8805/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Yves Comeau, & Stéphane Guillaud  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

BIODÉGRADATION DU TRICHLOROÉTHYLÈNE (TCE) DANS UN RÉACTEUR  
COUPLÉ ANAÉROBIE/AÉROBIE

ADELINE NARJOUX

DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CIVIL)  
AVRIL 2000



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

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

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-57421-0

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

BIODÉGRADATION DU TRICHLOROÉTHYLÈNE (TCE) DANS UN RÉACTEUR  
COUPLED'ANAÉROBIE/AÉROBIE

présenté par : NARJOUX Adeline  
en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées  
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DESJARDINS Raymond, Ph.D., président  
M. COMEAU Yves, Ph.D., membre et directeur de recherche  
M. GUIOT Serge, D.S., membre et codirecteur de recherche  
M. MILLETTE Denis, Ph.D., membre

## REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Yves Comeau, mon directeur de recherche à l'École Polytechnique, pour ses conseils scientifiques et techniques, précis et précieux.

Je remercie mon codirecteur le Dr Serge Guiot, chef du groupe de Bioingénierie Environnementale à l'Institut de Recherche en Biotechnologie du CNRC pour son aide et pour ses encouragements. Ce travail a été financé par des fonds CRSNG (recherche individuelle, Dr Serge Guiot, en tant que professeur associé au Département de Génie Civil de l'université de Sherbrooke) et par des fonds d'opération du Groupe de Bioingénierie Environnementale à l'Institut de Recherche en Biotechnologie du CNRC.

Je remercie le Dr Raymond Desjardins qui a bien voulu être Président du jury d'examen.  
Je remercie le Dr Denis Millette, membre externe du jury d'examen.

Je remercie l'ensemble du groupe de Bioingénierie Environnementale, notamment ceux qui ont participé au travail expérimental : Jérôme Breton, Christiane Cantin, Jean-Claude Frigon, et ceux qui ont pris le temps de répondre à mes questions comme Boris Tartakovsky. Je n'oublie pas Xavier Ducarre, qui a fait partie du groupe pendant 6 mois de stage pour l'IUP de Perpignan. Je remercie également les personnes du groupe de Chimie Analytique qui ont réalisé les analyses : Chantale Beaulieu, Alain Corriveau, Stéphane Deschamps. Leur expertise a été des plus utiles, et leur disponibilité et leurs conseils appréciés.

Merci à Sandra, Michelle, Darwin, Khalid, Carolina, Sabriah.

Et merci à tous les autres, de l'IRB ou non : Anne-Laure, Catherine, Caroline, Lamine, Philippe, Sandra.

## RÉSUMÉ

Les techniques conventionnelles de traitement des eaux souterraines contaminées sont le pompage et le traitement physico-chimique en surface, et elles requièrent une longue durée et sont coûteuses. La biorémediation *in situ* constitue une alternative séduisante pour éliminer les inconvénients de la technique de "pompage et traitement". Dans le cas de la biodégradation du TCE, la combinaison des métabolismes anaérobie et aérobie est particulièrement intéressante car ils sont complémentaires. Un biofilm granulaire, comportant des anaérobies au cœur des granules et des aérobies en périphérie, offre la possibilité d'une association étroite des métabolismes, favorable à une plus grande efficacité de dégradation du TCE.

Le projet présenté avait pour objectifs 1) d'identifier les principaux processus microbiens significatifs et les relations entre les groupes microbiens correspondants, et de préciser le rôle des méthanolotrophes dans l'écosystème, 2) de développer une biomasse granulaire adaptée au TCE dans un réacteur couplé anaérobie/aérobie et enrichie en méthanolotrophes, et 3) d'évaluer les conditions optimales de la dégradation du TCE dans un réacteur couplé anaérobie/aérobie.

Pour atteindre l'objectif 1), une revue de la littérature et une représentation conceptuelle de l'écosystème microbien ont été réalisées. Pour atteindre les objectifs 2) et 3), la dégradation du TCE en présence d'éthanol comme substrat primaire a été étudiée dans un réacteur couplé anaérobie/aérobie, lors d'une augmentation progressive de la charge en TCE, et lors de modifications des conditions de couplage. Pour compléter l'objectif 1), des tests d'activité spécifique ont été réalisés sur la biomasse du réacteur à différentes étapes afin de suivre l'évolution des groupes trophiques. À la fin de l'expérience, le potentiel de minéralisation de la biomasse dans différentes conditions trophiques a été évalué par des tests de minéralisation en microcosmes.

Le système expérimental comportait une colonne réactive de 15 L connectée à une recirculation de 1.7 L, le liquide étant recirculé du haut vers le bas de la colonne réactive. L'aération était réalisée par bullage d'air directement dans le liquide recirculé. Le système a été opéré pendant 17.5 mois, à un temps de rétention hydraulique de 1 jour, un taux de recirculation de 25:1 pour une vitesse ascensionnelle de 2.2 m/h. Les étapes successives ont été une phase de démarrage de 4.5 mois, une phase d'acclimatation au TCE jusqu'à

20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>·d de 5 mois, une phase de maintenance sans TCE de 2 mois, et une phase à 2 mg TCE/ L<sub>réacteur</sub>·d pendant 6 mois. Au démarrage, la charge organique spécifique objectif était de 0.4 g DCO/g MVES·d et pendant l'acclimatation, elle était de 0.3 g DCO/g MVES. Elle a été diminuée à 0.07 g DCO/g MVES·d à la fin de l'acclimatation, puis au cours des 2 derniers mois de l'expérience, elle a graduellement augmenté en raison de la diminution constante de la concentration en biomasse.

Le rendement du substrat en méthane a été pendant 6 mois caractéristique d'un système anaérobie, à 0.30 L (STP) CH<sub>4</sub>/g DCO<sub>enlevée</sub>, ensuite une augmentation de l'aération et la diminution de la charge organique ont réduit ce rendement à 0.10 L (STP) CH<sub>4</sub>/g DCO<sub>enlevée</sub>. La part du métabolisme aérobie est passée de 5% à 20% en terme de DCO consommée.

À des charges inférieures à 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>·d, aucun sous-produit chloré n'a été détecté à l'effluent du réacteur. Par la suite, le TCE et le c-DCE ont été mesurés en concentrations variables selon les fluctuations de charge, le c-DCE augmentant régulièrement pour devenir prépondérant. A l'arrêt de l'alimentation en TCE, le flux de sous-produits chlorés sortant était égal au flux entrant sur une base molaire. Lors de la reprise de l'alimentation en TCE à 2 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>·d, 90 à 95% du TCE entrant sortaient à l'effluent sous forme de c-DCE. La capacité de dégradation a donc été montrée jusqu'à 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>·d, puis la poursuite de l'augmentation de charge et/ou les surcharges ont entraîné la perte de la capacité de dégradation au-delà du c-DCE. Seule la capacité de déchlororation en c-DCE a été conservée à la seconde période de charge en TCE.

À la fin de la période de démarrage, les tests d'activité ont prouvé un enrichissement en méthanogènes et en méthanotrophes. Les tests d'activité méthanotrophes ont montré une diminution d'activité méthanotrophique, parallèlement à l'augmentation de la charge en TCE et à la perte de la capacité de déchlororation au-delà du c-DCE. Cependant, à la fin de l'expérience, une bonne activité méthanotrophique a été mesurée. La même biomasse granulaire anaérobie/aérobie acclimatée au TCE s'est montrée capable de minéraliser plus de 90% de TCE (2 mg TCE/g MVES) en présence de CH<sub>4</sub> et d'O<sub>2</sub>. Les tests de minéralisation indiquaient donc que le potentiel de minéralisation existait. Les pourcentages de minéralisation supérieurs à 20% dans les microcosmes les plus actifs ont été atteints après 5 jours au moins. Un temps de rétention hydraulique de 1 jour est donc

faible par rapport à ces temps de minéralisation. Dans les microcosmes, les conditions expérimentales favorisaient un groupe trophique précis, alors que la compétition ou d'autres processus pouvaient prédominer dans le réacteur.

Dans un système couplé anaérobiose/aérobiose de dégradation du TCE, les interactions entre les populations bactériennes sont nombreuses et des biotransformations complexes sont possibles dans un même réacteur. Après le développement d'un consortium de dégradation du TCE efficace dans un premier temps, la capacité de dégradation complète a été perdue au-delà d'une charge de  $15 \text{ mg TCE/L}_{\text{réacteur}}\cdot\text{d}$ . La modification des conditions de couplage par une augmentation du métabolisme aérobiose n'a pas permis de restaurer la capacité de dégradation antérieure. Le maintien du système dans un état stationnaire a été parfois problématique, et le dispositif d'aération a montré des limites.

Dans ce travail, l'enrichissement en activité méthanotrophe a été démontré dans un système couplé anaérobiose/aérobiose. Les résultats obtenus ont montré une réelle capacité de dégradation complète du TCE dans le système couplé anaérobiose/aérobiose à des charges inférieures à  $10-15 \text{ mg TCE/L}_{\text{réacteur}}\cdot\text{d}$ . En revanche, ils ont mis en évidence l'instabilité du système, et l'impossibilité de retrouver les performances initiales après une rupture de fonctionnement. La complexité du système et des interactions entre les paramètres hydrauliques, physico-chimiques et biologiques a montré la nécessité d'une identification plus précise des conditions et des paramètres d'opération déterminants. L'alcalinité en entrée et dans l'effluent liquide du réacteur, et l'hydrogène dans le biogaz ont été reconnus comme des paramètres probablement importants du suivi du réacteur. La conception d'un système d'aération plus fiable et moins perturbateur du régime hydraulique du système est requise. Les premiers éléments de modélisation fournis dans cette étude ouvrent la voie pour développer un modèle en tant qu'outil d'aide à la compréhension, à la conception et à l'opération d'un système couplé de dégradation du TCE.

## ABSTRACT

Plumes of contaminated groundwater are usually managed by pump-and-treat systems, and subsurface treatments involve often physical and chemical clean-up techniques. These systems must be operated for very long time periods and for this reason they are expensive processes. *In situ* bioremediation provides beneficial alternatives to pump-and-treat, that are relatively cheap and result in complete mineralization of organic contaminants. Chlorinated ethenes like PCE and TCE are widespread groundwater contaminants in North America, and pump-and-treat technology is not very efficient for this kind of compound. Aerobic and anaerobic environments have limitations in their TCE biodegradation abilities that complement each other when they are combined. Therefore, coupling of reductive and oxidative catabolisms in a granular biofilm might allow for complete TCE biodegradation.

The objectives of the work were 1) to develop a granular biomass acclimated to TCE in a coupled anaerobic/aerobic reactor and to enhance methanotrophic activity in the biomass, 2) to assess optimal conditions for TCE degradation in a coupled anaerobic/aerobic reactor, and 3) to identify efficient microbial processes and relationships between microbial populations, and to specify methanotrophs' place in the microbial ecosystem.

The potential for anaerobic/aerobic degradation of trichloroethylene (TCE) was studied in a coupled anaerobic/aerobic reactor, using ethanol as primary substrate. TCE loading rate was gradually increased and several coupling conditions were tested. Specific activity tests were performed on reactor biomass at different experimental steps to follow trophic groups during TCE acclimatation in reactor. At the end of the experiment, microcosm assays were conducted to evaluate TCE mineralization potential of biomass under different trophic conditions.

Experimental setup consisted of a reactive column (10 cm inside diameter (I.D.), effective liquid volume 15 L) connected to a recirculation line with two aeration columns (5 cm I.D., effective liquid volume of 0.5 L each). Liquid was recycled in an upflow manner at a recirculation ratio of 25 to 1. Air was sparged in the aeration columns to maintain dissolved oxygen at around 2 mg/L in the influent of the reactive column. The system was operated at room temperature (27°C), at a hydraulic retention time (HRT) of 1 day,

and a liquid upflow velocity of 2.2 m/h. The system was operated for 17.5 months, with a 4.5 month startup period, a 5 month TCE acclimation period ending up to a maximum of 20 mgTCE/L<sub>reactor</sub>.day, a 2 month maintenance period on ethanol alone, and a 6 month period at low TCE loading (2 mgTCE/L<sub>reactor</sub>.day). TCE degradation performance was evaluated in the system. The inoculum consisted of a mixture of anaerobic granular sludge from a food industry wastewater treating reactor (Champlain Industries, Cornwall, Ontario), activated sludge from a municipale treatment plant (Sainte-Catherine, Quebec) and an anaerobic PCE-dechlorinating sludge from a reactor previously operated in the laboratory. The column was inoculated at 15 gVSS/L<sub>reactor</sub>. During the initial startup period, ethanol was fed to reach a specific organic loading rate (SOLR) of 0.4 g COD/g VSS.day so as to promote granulation. During the acclimatation phase, SOLR was 0.3 g COD/g VSS.day. Organic loading rate (OLR) was decreased at the end of acclimatation period, consequently dropping the SOLR to 0.07 g COD/g VSS.day. During the last 2 months, biomass contents in reactor decreased regularly and SOLR then increased. Performance of the coupled system was evaluated based on gas balances. Efficiency of TCE dechlorination was evaluated on the results of TCE, DCEs and VC analysis in liquid effluent and off-gas.

The methane yield was 0.30 L (STP) CH<sub>4</sub>/g COD<sub>removed</sub>, for 6 months, a typical value in anaerobic systems. Aeration was increased and OLR was decreased, and it resulted in a decrease in methane yield to 0.10 L (STP) CH<sub>4</sub>/g COD<sub>removed</sub>.

At TCE loads below 15 mg TCE/L<sub>reactor</sub>.day, no chlorinated metabolites were detected in the effluent. At TCE loads above 17.5 mg TCE/L<sub>reactor</sub>.day, effluent analysis showed cis-dichloroethylene (c-DCE) to be the dominant metabolite, while vinyl chloride (VC) was not at all detected. At a load of 20 mgTCE/L<sub>reactor</sub>.day, aeration rate was increased in order to increase aerobic metabolism. c-DCE proportion in effluent increased gradually, and at the end of acclimatation period cis-DCE in the effluent was in the same order of magnitude as in the influent (mole to mole). The 20 mg TCE/L<sub>reactor</sub>.day load apparently impaired the TCE-dechlorinating capacity of the once acclimated biomass, although the first reductive dechlorination step was still performed. A 2 month period of feeding without TCE (ethanol alone) was then performed, to restore an active coupled biomass. When TCE feeding was resumed at a low loading rate (2 mg TCE/L<sub>reactor</sub>.day), c-DCE was the terminal product of TCE dechlorination (90-95% of TCE was transformed in c-

DCE). It seems that a longer operating time would be needed for the biomass to recover its previous activity potential.

At the end of startup period, specific activity tests showed that an enrichment in methanogens and methanotrophs had been achieved in the reactor biomass. Methanotrophic activity tests showed a decreasing methanotrophic activity concurrently to the TCE loading rate increase. However, at the end of the experiment, specific methanotrophic activity was restored. The above TCE-acclimated anaerobic/aerobic granules were shown to be able to mineralize over 90% of the TCE (2 mg TCE/g biomass dry weight) in the presence of  $\text{CH}_4$  and  $\text{O}_2$ , even though the biomass in the system was only performing the first step of TCE reductive dechlorination. Looking to the mineralization rate in the more efficient microcosms (20% of mineralization within 5 days), it was not possible to achieve the complete dechlorination within the HRT of 1 day imposed in the reactor.

In a coupled anaerobic/aerobic TCE degradation system, several interactions between bacterial populations are taking place and complex biotransformations are allowed in a single reactor. Developing an efficient TCE-degrading consortium was possible in a first step, however above  $15 \text{ mg TCE/L}_{\text{reactor}} \cdot \text{day}$  the complete TCE degrading ability was lost. Increasing aerobic metabolism did not restore the TCE degradation activity in reactor to its former state. Keeping the system in a stable state was sometimes difficult, and aeration system was debalancing hydraulic regim and then overall system.

Enrichment in methanotrophic activity has been achieved in the coupled anaerobic/aerobic reactor. Above  $10-15 \text{ mg TCE/L}_{\text{reactor}} \cdot \text{day}$ , TCE complete degradation was achieved. However, the system was unstable and after loosing the degradation ability in the reactor, it was impossible to restore the previous degradation ability. Interactions between operational parameters (hydraulic, physico-chemical, biological) are complex. Some important parameters to monitore the system should be identified, and a new aeration system would be useful to achieve a more stable state. Modeling could be a tool to help to understand and to operate the coupled anaerobic/aerobic system.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	iv
<b>RÉSUMÉ .....</b>	v
<b>ABSTRACT .....</b>	viii
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	xi
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	xiv
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	xvi
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS .....</b>	xviii
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	xx
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION.....</b>	1
1.1 Problématique .....	1
1.2 Hypothèses .....	4
1.3 Objectifs.....	5
<b>CHAPITRE II : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	6
2.1 Les éthènes chlorés .....	6
2.1.1 Propriétés physico-chimiques des éthènes chlorés.....	6
2.1.2 Origine, toxicité, réglementation .....	7
2.1.3 Comportement d'un DNAPL dans l'environnement.....	8
2.1.4 Biochimie de dégradation des éthènes chlorés.....	9
2.2 Vue d'ensemble de l'écosystème microbien dans un système couplé de dégradation du TCE.....	12
2.2.1 Le cométabolisme.....	13
2.2.2 Les interactions trophiques entre les populations .....	16
2.2.3 Couplage des voies de dégradation des éthènes chlorés dans un système anaérobiose/aérobiose.....	18

2.3 Métabolisme anaérobie .....	19
2.3.1 Métabolisme de la matière organique en conditions méthanogènes .....	19
2.3.2 La sulfato-réduction en conditions méthanogènes .....	22
2.3.3 Biodégradation des éthènes chlorés en conditions anaérobies.....	25
2.4 Métabolisme aérobie .....	28
2.4.1 Les hétérotrophes .....	28
2.4.2 Les méthanotrophes .....	29
2.4.3 Biodégradation des éthènes chlorés en conditions aérobies.....	36
2.5 Couplage des métabolismes anaérobies et aérobies .....	41
2.5.1 Présentation, principes de fonctionnement.....	41
2.5.2 Stoechiométrie de la transformation du substrat dans un système couplé.....	42
2.5.3 Représentation matricielle des processus microbiens.....	47
<b>CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>52</b>
3.1 Le réacteur couplé .....	52
3.1.1 Description du dispositif expérimental .....	52
3.1.2 Produits chimiques .....	55
3.1.3 Inoculum.....	56
3.1.4 Alimentation du réacteur .....	56
3.1.5 Méthodes d'analyses .....	59
3.2 Caractérisation de la biomasse.....	63
3.2.1 Tests d'activité spécifique.....	63
3.2.2 Tests de minéralisation .....	66
3.3 Suivi du réacteur .....	70
<b>CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>71</b>
4.1 Résultats du réacteur .....	71
4.1.1 Phases opératoires du réacteur .....	71
4.1.2 Profils temporels d'opération et de performance du réacteur .....	73
4.1.3 Analyse des performances du réacteur .....	85
4.2 Caractérisation de la biomasse.....	97
4.2.1 Tests d'activité spécifique.....	97
4.2.2 Tests de minéralisation .....	103

<b>CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>111</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>115</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>128</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Abréviation et formule chimique pour les six éthènes chlorés.....	3
Tableau 2.1	Normes de qualité dans les eaux souterraines.....	8
Tableau 2.2	Les principaux mécanismes réactionnels de dégradation des hydrocarbures aliphatiques halogénés (Vogel et al., 1987).....	10
Tableau 2.3	Rendement énergétique de réductions utilisant H <sub>2</sub> comme donneur d'électrons (adapté de Zehnder, 1988 et de Dolfing, 1999) .....	11
Tableau 2.4	Rendement énergétique de la minéralisation des éthènes chlorés en conditions aérobies (adapté de Dolfing, 1994).....	12
Tableau 2.5	Réactions impliquées dans la formation de méthane à partir de l'éthanol (Zehnder, 1988) .....	20
Tableau 2.6	Données thermodynamiques sur la méthanogénèse (Karhadakar et al., 1987; Zehnder, 1988) .....	23
Tableau 2.7	Données thermodynamiques sur la sulfato-réduction (Hao et al., 1996; Karhadakar et al., 1987; Zehnder, 1988) .....	23
Tableau 2.8	Classification et caractérisation des méthanotrophes (Murrell et al., 1998).....	32
Tableau 2.9	Valeurs seuil d'inhibition de la sMMO par le cuivre à travers la littérature.....	33
Tableau 2.10	Activité de biodégradation des éthènes chlorés par des méthanotrophes .....	38
Tableau 2.11	Composantes ou variables d'état de la représentation matricielle .....	47
Tableau 2.12	Processus biologiques de la représentation matricielle .....	48
Tableau 2.13	Représentation matricielle du système couplé de dégradation du TCE : stoechiométrie et cinétique des processus .....	51
Tableau 3.1	Composition de la solution de nutriments pour 1 g DCO/L <sub>nutriments</sub> .....	58
Tableau 3.2	Formule de la solution de métaux en traces et concentrations correspondantes dans la solution de nutriments.....	58
Tableau 3.3	Concentrations des éléments clés pour certains métabolismes .....	59
Tableau 3.4	Tests d'activité spécifique réalisés : substrats consommés .....	65

Tableau 3.5	Tests d'activités de la caractérisation finale de la biomasse du réacteur.....	65
Tableau 3.6	Tests de minéralisation réalisés lors de la caractérisation finale de la biomasse.....	66
Tableau 3.7	Conditions expérimentales de minéralisation du [1,2- <sup>14</sup> C]TCE.....	68
Tableau 3.8	Liste des paramètres de suivi du système couplé .....	70
Tableau 4.1	Phases d'opération du réacteur.....	71
Tableau 4.2	Paramètres d'opération du réacteur au cours des différentes phases opératoires, par périodes de fonctionnement stable du réacteur.....	85
Tableau 4.3	Bilan DCO autour du réacteur.....	88
Tableau 4.4	Performances du système.....	90
Tableau 4.5	Rendements de production de CH <sub>4</sub> et rendement d'oxydation de la charge organique dans le réacteur.....	91
Tableau 4.6	Performances de dégradation du TCE dans le réacteur.....	93
Tableau 4.7	Activité méthanotrophe de la biomasse du réacteur au cours du temps.....	98
Tableau 4.8	Activité éthanol de la biomasse du réacteur au cours du temps.....	98
Tableau 4.9	Activité acétate de la biomasse du réacteur au cours du temps .....	99
Tableau 4.10	Activité hydrogénotrophe de la biomasse du réacteur au cours du temps.....	99
Tableau 4.11	Test d'activité témoin de compétition entre les hétérotrophes aérobies et les méthánotrophes (jour 470).....	101
Tableau 4.12	Paramètres de minéralisation calculés .....	107

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Principes des techniques de traitement des eaux souterraines .....	2
Figure 1.2	Déchlorations réductrices séquentielles des éthènes chlorés.....	3
Figure 2.1	Comportement théorique d'un DNAPL dans le sous-sol (adapté de Huling et Weaver, 1991) .....	9
Figure 2.2	Schéma de principe des phénomènes en jeu lors du cométabolisme (adapté de Chang et Alvarez-Cohen, 1995a) .....	14
Figure 2.3	Schéma conceptuel des réactions d'un écosystème couplé anaérobie/aérobiose de dégradation du TCE avec l'éthanol comme substrat.....	16
Figure 2.4	Couplage des voies de dégradation anaérobie et aérobiose du PCE (adapté de Whittaker et al., 2000 et Mohn et Tiedje, 1992) .....	18
Figure 2.5	Étapes du flux de C lors de la dégradation anaérobie de la matière organique en conditions méthanogènes (Zehnder, 1988).....	19
Figure 2.6	Rapport COD/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> et compétition entre les méthanogènes et les sulfato-réductrices (adapté de Hao et al., 1996) .....	25
Figure 2.7	Déchloration réductrice des éthènes chlorés (Mohn et Tiedje, 1992)...	27
Figure 2.8	Voies d'oxydation du méthane et d'assimilation du formaldéhyde (adapté de Hanson et Hanson, 1996) .....	30
Figure 2.9	Transformations spontanées de l'époxyde du TCE selon le pH (adapté de Vogel et al., 1987).....	38
Figure 2.10	Produits majoritaires et mécanismes de l'oxydation du TCE par <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (adapté de Fox et al., 1990) .....	39
Figure 2.11	Biochimie de l'oxydation du TCE par la souche M (Nakajima et al., 1992) .....	39
Figure 2.12	Composés identifiés lors de l'oxydation cométabolique du TCE par des MMO bactériennes ou eucaryotes (adapté de Dolfing et al., 1993).....	40
Figure 3.1	Schéma du montage du réacteur couplé anaérobie/aérobiose.....	54
Figure 3.2	Préparation de la solution de TCE dans l'éthanol .....	57
Figure 3.3	Bouteille de test d'activité.....	64
Figure 3.4	Microcosme de minéralisation du [1,2- <sup>14</sup> C]TCE .....	67

Figure 3.5	Courbe de minéralisation et représentation graphique des paramètres de réponse (Millette et al., 1995).....	68
Figure 4.1	Taux de charge en TCE du réacteur (mg TCE/L <sub>réacteur</sub> .d) - Surdoses indiquées par les triangles .....	72
Figure 4.2	Principaux paramètres d'opération et de performance.....	74
Figure 4.3	Charge organique volumique (moyennes mobiles sur 5 données) (OLR en g DCO/L <sub>réacteur</sub> .d) et charge organique spécifique (moyennes mobiles sur 5 données) (F/M en g DCO/g MVES.d).....	76
Figure 4.4	Évolution du contenu en biomasse du réacteur (g MVES/L <sub>réacteur</sub> ) et profil de lessivage de la biomasse à l'effluent (moyennes mobiles sur 7 données) (g MVES/L <sub>réacteur</sub> .d).....	77
Figure 4.5	Charge organique spécifique (moyennes mobiles sur 5 données) (F/M en g DCO/g MVES.d) et acides gras volatils (AGV) à l'effluent (g DCO/L <sub>réacteur</sub> .d) .....	79
Figure 4.6	Taux d'aération (L O <sub>2</sub> /L <sub>réacteur</sub> .d) et rendement de production de la charge organique en CH <sub>4</sub> (moyennes mobiles sur 7 données) .....	81
Figure 4.7	Taux d'aération et rendement de production de la charge organique en CO <sub>2</sub> (moyennes mobiles sur 7 données) .....	82
Figure 4.8	pH (moyennes mobiles sur 7 données) et rendement en CO <sub>2</sub> (moyennes mobiles sur 7 données) dans le réacteur.....	83
Figure 4.9	TCE et métabolites en entrée et en sortie du réacteur sur une base molaire (mmol éthènes chlorés/L <sub>réacteur</sub> .d) .....	84
Figure 4.10	Éléments du bilan DCO .....	87
Figure 4.11	Activité spécifique méthanolotrophe en fonction de la charge en TCE ..	100
Figure 4.12	Activités méthanolotrophes et anaérobies au port#6 en fonction de la charge en TCE du réacteur.....	101
Figure 4.13	Schéma de création de zones trophiques préférentielles dans le réacteur et des structures granulaires correspondantes .....	102
Figure 4.14	Efficacité d'inhibition de la méthanogénèse par le BES.....	104
Figure 4.15	Courbes de minéralisation en conditions anaérobies .....	105
Figure 4.16	Courbes de minéralisation en conditions aérobies .....	106

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

$\Delta G^0$	variation d'énergie libre de formation dans les conditions standards (P = 1 atm et T = 273 K)
BDI	indice de biodégradation
BES	acide 2-bromoethanesulfonique ( $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ )
c-DCE	cis-dichloroéthylène ( $\text{CHCl}=\text{CHCl}$ )
t-DCE	trans-dichloroéthylène( $\text{CHCl}=\text{CHCl}$ )
1,1-DCE	1,1-dichloroéthylène( $\text{CCl}_2=\text{CH}_2$ )
CMA	concentration maximale acceptable (Norme USEPA pour l'eau souterraine)
CMAO	concentration maximale acceptable objectif (Norme USEPA pour l'eau souterraine)
CV	chlorure de vinyle ( $\text{CH}_2\text{CHCl}$ )
DCO	demande chimique en oxygène
DNAPL	“Dense non aqueous phase liquid”
EPA	Agence de protection de l'environnement des États-Unis (cf. USEPA)
ETH	éthylène ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ )
EtOH	éthanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )
FAD	flavine adénine dinucléotide, coenzyme transporteur d'électrons
LNSM	milieu salin minimum pauvre en nitrate (“Low nitrate minimum salt medium”)
MBP	bactéries méthanogènes
MEF	Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec
MES	matières en suspension
MMO	méthane monooxygénase
MSM	milieu salin minimum

MES	matières en suspension
MVES	matières volatiles en suspension
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide, coenzyme transporteur d'électrons (NAD <sup>+</sup> : forme oxydée; NADH : forme réduite)
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, coenzyme transporteur d'électrons (NADP <sup>+</sup> : forme oxydée; NADPH : forme réduite)
NAPL	voir DNAPL
NBDI	indice de biodégradation normalisé
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCE	perchloroéthylène (CCl <sub>2</sub> =CCl <sub>2</sub> )
pMMO	méthane monooxygénase particulaire
Sc	substrat cométabolisé
Se	substrat énergétique
Sg	substrat de croissance
sMMO	méthane monooxygénase soluble
SRB	bactéries sulfato-réductrices
STP	conditions standards de température et pression (P ≈ 1 atm et T = 273 K) ("Standard Temperature and Pressure")
$T_c^b = \frac{dM_c}{dM_b}$	capacité de transformation de la biomasse ou encore quantité maximale de composé cométabolisé (c) transformé par unité de masse de biomasse (b) avant l'inactivation cellulaire
$T_c^s = \frac{dM_c}{dM_s}$	capacité de transformation du substrat ou encore quantité maximale de composé cométabolisé (c) transformé par unité de masse de substrat (s)
TCE	trichloroéthylène (CCl <sub>2</sub> =CHCl)
USEPA	"United States Environmental Protection Agency" Agence de protection de l'environnement des États-Unis

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1	Propriétés physico-chimiques intéressantes en vue de la biorémédiation...	129
Annexe 2	Mécanismes réactionnels des hydrocarbures aliphatiques halogénés .....	133
Annexe 3	Métabolisme de la matière organique en conditions méthanogènes.....	136
Annexe 4	Métabolisme des méthanolotrophes .....	141
Annexe 5	Protocoles des méthodes d'analyses.....	149
Annexe 6	Tests d'activité.....	157
Annexe 7	Test de minéralisation du [1,2- <sup>14</sup> C]TCE.....	164
Annexe 8	Données brutes d'opération et de performance du réacteur .....	169

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Problématique

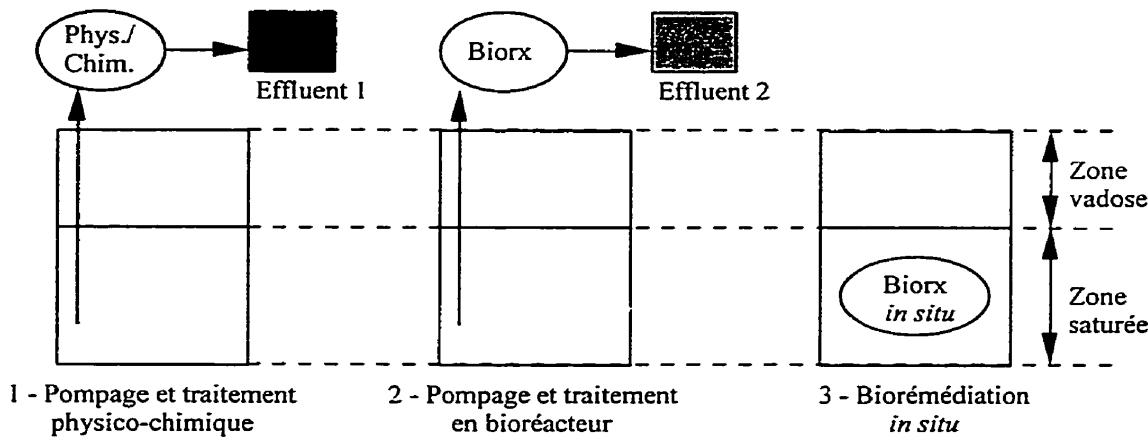
Le perchloroéthylène (PCE) et le trichloroéthylène (TCE) sont des solvants chlorés utilisés et produits à grande échelle pour le nettoyage et le dégraissage industriels. Depuis les années 80, de nombreux sites contaminés par ces deux produits ont été identifiés. L'Agence de Protection de l'environnement américaine a établi une liste de plus de 1400 sites contaminés prioritaires (National Priorities List), considérés comme des menaces inacceptables pour la santé publique ou l'environnement (Pankow et Cherry, 1996). Dans cette liste, 85% des sites présentent une contamination des eaux souterraines, et le TCE est le composé le plus souvent trouvé, le PCE étant le troisième (Lee et al., 1998).

Les techniques conventionnelles de traitement des eaux souterraines contaminées par du PCE ou du TCE sont le pompage et le traitement en surface. Les deux méthodes classiques de traitement sont de type physico-chimique : 1) l'adsorption sur charbon activé et 2) le dégazage par “strippage” suivi du traitement des contaminants transférés dans la phase gazeuse (Russell et al., 1992). Ces deux techniques peuvent être combinées.

La technique de “pompage et traitement” requiert une longue durée et est coûteuse, si les contaminants sont difficiles à récupérer par pompage, ce qui est le cas des solvants chlorés (Fetter, 1993; Huling et Weaver, 1991; Pankow et Cherry, 1996). Les déversements de ces composés constituent alors des sources de contamination pour des dizaines d’années, leur dégradation étant très lente dans les conditions naturelles des eaux souterraines et des sols (Norris et al., 1994). Souvent le pompage est surtout un dispositif pour contenir le panache de contamination, sans réduction significative de la concentration dans la zone contaminée (Fetter, 1993). De plus, les deux traitements physico-chimiques consistent en une simple extraction de la phase liquide, sans transformation des composés. Le produit récupéré ensuite comme la solution de lavage

du charbon activé par exemple, est encore un déchet toxique, et son élimination a un coût (Figure 0.1).

La biorémédiation *in situ* est la mise en oeuvre de procédés biologiques de dégradation directement dans le milieu contaminé (Cookson, 1995; Norris et al., 1994). Elle constitue une alternative séduisante car les deux inconvénients majeurs des techniques classiques de traitement sont alors éliminés : le pompage et les coûts associés sont supprimés, et les contaminants sont dégradés. Le pompage et la biodégradation en réacteur de surface est une amélioration par rapport au traitement physico-chimique, mais l'idéal est le développement d'un bioréacteur *in situ*.



Abréviations : Phys/Chim. = traitement physico-chimique; Effluent 1 : effluent concentré en TCE; Biorx : bioréacteur; Effluent 2 : effluent faiblement concentré en éthènes chlorés

Figure 0.1 - Principes des techniques de traitement des eaux souterraines

Dans de nombreux cas de contamination par le PCE ou le TCE, des éthènes moins chlorés sont détectés. En particulier, le cis-dichloroéthylène (c-DCE) et le chlorure de vinyle (CV) s'accumulent dans des proportions différentes selon les sites (Cookson, 1995; Russell et al., 1992). Les autres éthènes chlorés (Tableau 1.1) sont détectés, mais pas toujours et parfois seulement en traces.

En conditions anaérobies, la biodégradation du PCE se fait par étapes successives et les produits de dégradation sont : le TCE, le dichloroéthylène (DCE), le CV et l'éthylène (ETH) (Figure 1.2) (Mohn et Tiedje, 1992).

Tableau 1.1 - Abréviation et formule chimique pour les six éthènes chlorés

Abréviation	Nom	Formule chimique
PCE	perchloroéthylène	$C_2Cl_4$
TCE	trichloroéthylène	$C_2HCl_3$
c-DCE	cis-dichloroéthylène	$C_2H_2Cl_2$
t-DCE	trans-dichloroéthylène	$C_2H_2Cl_2$
1,1-DCE	1,1-dichloroéthylène	$C_2H_2Cl_2$
CV	chlorure de vinyle	$C_2H_3Cl$

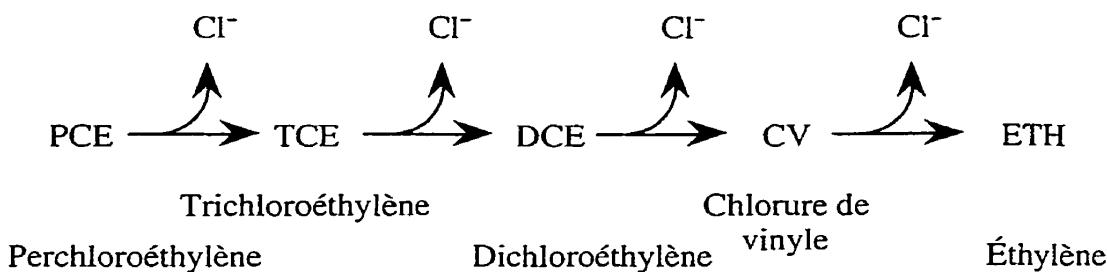


Figure 1.2 - Déchlorations réductrices séquentielles des éthènes chlorés  
(Mohn et Tiedje, 1992)

Ces réactions sont des réductions et le niveau d'oxydation diminuant avec le nombre de chlore, la vitesse de réaction diminue à chaque étape (Vogel et al., 1987). Il n'est donc pas surprenant de trouver les intermédiaires moins chlorés accumulés dans les eaux souterraines et les sols contaminés. La déchlororation du CV en éthène est une étape limitante reconnue (Haston et McCarty, 1999).

Inversement, une molécule de plus en plus réduite sera plus facilement dégradée par oxydation, c'est-à-dire en conditions aérobie. Les molécules moins chlorées sont donc plus facilement biodégradables en aérobiose (Vogel et al., 1987). Parmi les éthènes chlorés, seul le PCE est récalcitrant à la biodégradation en conditions aérobie. Les méthanotrophes sont les microorganismes aérobies identifiés comme particulièrement intéressants dans la biodégradation des éthènes chlorés, en raison de leur potentiel de transformation à des taux élevés (Sullivan, 1998).

La déchlororation réductrice du PCE ou du TCE produit des molécules plus facilement biodégradables en conditions aérobie que le PCE ou le TCE. Les environnements

aérobies et anaérobies sont donc complémentaires pour la biodégradation du PCE ou du TCE (Cookson, 1995). Le couplage des conditions anaérobie et aérobie apparaît comme un moyen efficace de combiner les avantages des deux métabolismes pour une dégradation complète, sans accumulation de métabolites chlorés (Guiot et al., 1995).

Le couplage des deux métabolismes pour la biodégradation d'hydrocarbures aliphatiques chlorés a été étudiée en bioréacteur, et son efficacité a été prouvée par rapport à un traitement simple anaérobie ou aérobie (Long et al., 1993). Le couplage peut être réalisé de deux façons :

- par un traitement séquentiel avec deux unités successives, anaérobie et aérobie, (Fogel et al., 1995; Gerritse et al., 1995) ou par alternance anaérobie/aérobie dans une seule unité de traitement (Ndon et Randall, 1999),
- dans un seul réacteur couplé anaérobie/aérobie, par exemple grâce à un biofilm granulaire composé de microorganismes anaérobies au centre et aérobies à la périphérie (Guiot et al., 1995).

Le projet présenté dans ce document vise à mesurer et à comprendre l'évolution des processus microbiens dans un système couplé anaérobie/aérobie à biomasse granulaire, au cours d'une acclimatation progressive au TCE.

## 1.2 Hypothèses

L'efficacité de la biodégradation du TCE dans un réacteur couplé anaérobie/aérobie à boue granulaire dépend du développement des populations d'intérêt et de leur rôle dans l'écosystème microbien.

Les deux hypothèses de travail dans ce projet sont :

- La biodégradation du TCE par couplage anaérobie/aérobie est efficace dans un biofilm granulaire anaérobie/aérobie.
- Le développement d'une activité cométabolique méthanotrophe importante est possible en couplage anaérobie/aérobie.

### 1.3 Objectifs

- Identifier les principaux processus microbiens significatifs et les relations entre les groupes microbiens correspondants, et notamment préciser le rôle des méthanolotrophes dans l'écosystème.
- Développer une biomasse granulaire adaptée au TCE dans un réacteur couplé anaérobie/aérobiose de type UASB ("Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor") et enrichie en méthanolotrophes.
- Évaluer les conditions de la dégradation du TCE dans un réacteur couplé anaérobie/aérobiose, en terme de paramètres de conception et de paramètres d'opération.
- Travailler en vue du traitement *in situ* en puits réactif : la biomasse acclimatée est destinée à être utilisée pour le traitement *in situ* d'une eau souterraine, dans un puits réactif avec une concentration d'entrée de 1 ppm en TCE, et en sortie des concentrations en éthènes chlorés inférieures aux normes de l'Agence de Protection de l'Environnement Américaine, l'USEPA, soit entre 5 et 100 ppb selon l'éthène chloré.

L'étude doit fournir les premiers éléments de la modélisation du système. Un réacteur couplé anaérobie/aérobiose de dégradation du TCE est typiquement un système complexe dont les réponses aux changements sont difficiles à prévoir. Un modèle est alors un outil d'aide à la conception et à l'opération précieux. Les principes de modélisation utilisés en traitement biologique des eaux usées (Henze et al., 1987) sont applicables au système considéré.

## **CHAPITRE II**

### **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **2.1 Les éthènes chlorés**

Ce chapitre présente rapidement le trichloroéthylène (TCE) et les éthènes chlorés qui sont les produits de dégradation du TCE.

##### **2.1.1 Propriétés physico-chimiques des éthènes chlorés**

Les propriétés physico-chimiques (Annexe 1) d'un contaminant déterminent son comportement et sa répartition dans les différents compartiments de l'environnement et son potentiel de biodégradation dans un environnement donné. Les propriétés générales, notamment de volatilisation et d'adsorption, indiquent les phases présentes, et leurs parts respectives. Les viscosités seront utiles pour estimer la mobilité de la phase libre. Les propriétés d'adsorption et la solubilité aqueuse déterminent la mobilité en solution dans les eaux souterraines.

Certaines propriétés physico-chimiques des solvants chlorés, dont font partie les éthènes chlorés, expliquent pourquoi ce sont des contaminants communs et persistants dans les eaux souterraines (Huling et Weaver, 1991) :

1. leur densité supérieure à l'eau leur permet de pénétrer dans la zone saturée et de constituer ainsi une source de contamination à long terme;
2. leur faible viscosité liquide induit une grande mobilité de la phase libre dans le sous-sol;
3. leur faible tension de surface par rapport à l'eau les rend capable de pénétrer facilement dans les fractures où se trouve déjà de l'eau;
4. leur volatilité les rend très mobiles dans la zone non saturée sous forme de vapeur, plus dense que l'air;
5. leur solubilité aqueuse absolue faible en fait des contaminants difficiles à récupérer une fois dans la zone saturée;

6. leur solubilité aqueuse comparée aux normes de l'eau potable en fait des contaminants significatifs, même lors de déversements peu importants;
7. leur faible coefficient de partition (peu d'adsorption au matériau de l'aquifère) fait que l'effet retard est faible;
8. leur grande stabilité chimique et leur faible dégradabilité en fait des contaminants à long terme.

### **2.1.2 Origine, toxicité, réglementation**

Les concentrations à respecter dans les eaux souterraines dépendent de l'usage. Dans le cas de l'usage "eau potable", elles sont inférieures à 50 ppb au Québec et inférieures à 100 ppb aux États Unis (Tableau 2.1).

Les principales industries utilisatrices de solvants chlorés sont l'électronique, les manufactures de pièces métalliques et l'aérospatiale. Le TCE est un agent dégraissant universel et un ingrédient de solutions industrielles de nettoyage. Les premiers problèmes de contamination par des solvants chlorés ont été notés dans les années 70 aux États-Unis. Leur production à grande échelle et leur utilisation étaient importantes et en croissance régulière depuis 30 ans (Russell et al., 1992).

L'utilisation pendant des années de ces composés sans précautions suffisantes a conduit à la contamination de nombreux sites. Plusieurs enquêtes aux USA ont montré la présence de TCE dans des eaux souterraines utilisées comme source d'eau potable, et des captages ont été fermés dans 18 états (Pankow et Cherry, 1996; Russell et al., 1992).

Les éthènes chlorés sont toxiques et tous sont soupçonnés d'être cancérigènes. Ils sont très stables et persistants dans l'environnement. Le c-DCE et le CV sont des produits de dégradation du PCE et du TCE qui s'accumulent souvent dans les conditions de terrain (Russell et al., 1992).

Tableau 2.1 - Normes de qualité dans les eaux souterraines

	MEF - Critères d'usage[1]	EPA - Usage eau potable [3]		
	Eau de consommation (ppb)	Eau de surface et égouts (ppb)	CMA (ppb)	CMAO (ppb)
PCE	30	540		
TCE[2]	50	590	5	0
c-DCE	50	-	70	70
t-DCE	-	30000	100	100
1,1-DCE[2]	14	320	7	7
CV[2]	2	52500	2	0

[1] :site internet MEF, Grille des critères applicables aux cas de contamination des eaux souterraines (mars 1999)

([http://www.mef.gouv.qc.ca/fr/environn/sols/politique/annexe\\_2\\_grille\\_eaux.htm](http://www.mef.gouv.qc.ca/fr/environn/sols/politique/annexe_2_grille_eaux.htm))  
Eau de surface et égouts: cas de la résurgence dans l'eau de surface ou les égouts

[2] :La définition des substances cancérogènes proposée réfère aux substances classées cancérogènes, cancérogènes probables, cancérogènes possibles et peut-être cancérogènes telles que définies par Santé Canada, l'OMS ou l'EPA.

[3] :site internet USEPA 1999 ([http://www.epa.gov/OGHDW/dwh/t\\_voc.html](http://www.epa.gov/OGHDW/dwh/t_voc.html))

MEF : Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec - EPA : "Environmental Protection Agency" - CMA : concentration maximale acceptable - CMAO : concentration maximale acceptable objectif

### 2.1.3 Comportement d'un DNAPL dans l'environnement

L'abréviation anglaise retenue pour désigner les phases organiques liquides non aqueuses est NAPL ("non aqueous phase liquids"). Les NAPL sont classés en LNAPL, plus légers que l'eau, et DNAPL, plus denses que l'eau. Les éthènes chlorés sont des DNAPL, sauf le CV qui est un gaz (Chapitre 2.1.1).

Le déplacement des NAPL est gouverné par les forces de gravité et de viscosité (Pankow et Cherry, 1996). Si le déversement est suffisant pour atteindre la nappe phréatique, un DNAPL continue à migrer verticalement. Quand des couches imperméables sont atteintes, le DNAPL suit le pendage des couches et reste piégé dans les creux (Figure 2.1). Il pénètre également dans les fractures. Quatre phases sont présentes lors du déversement d'un DNAPL: une phase libre, une phase gazeuse (dans la zone vadose), une phase dissoute dans l'eau et une phase adsorbée.

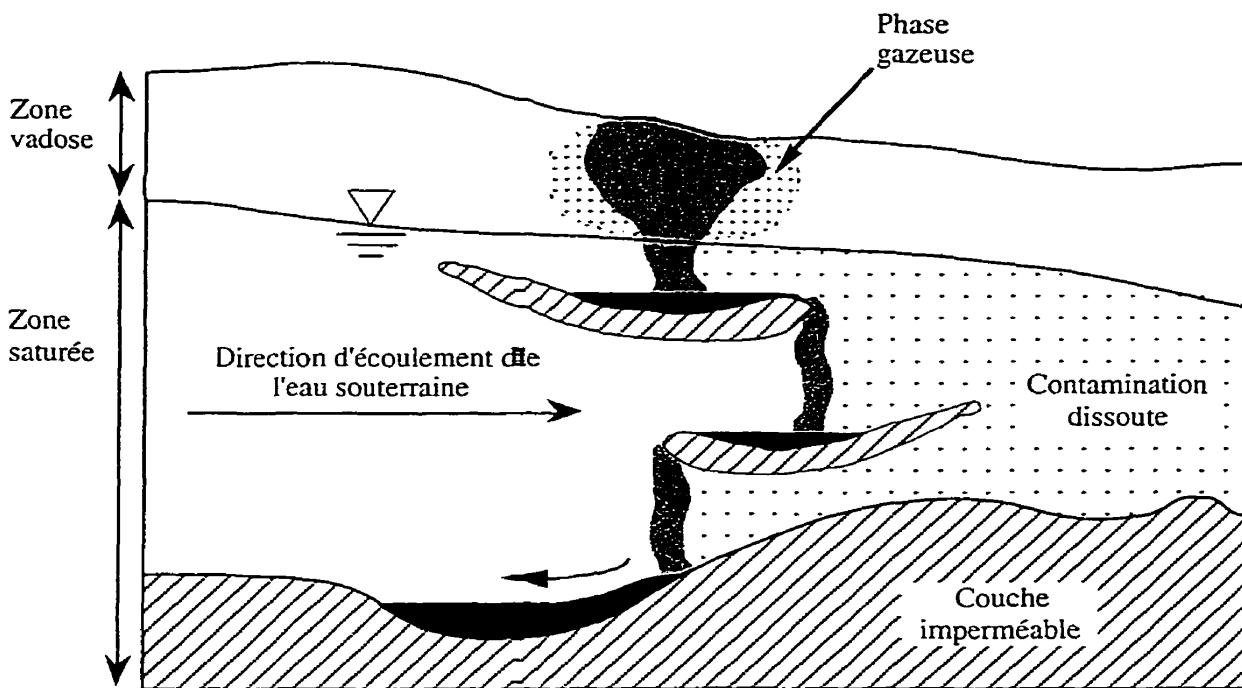


Figure 2.1 - Comportement théorique d'un DNAPL dans le sous-sol  
 (adapté de Huling et Weaver, 1991)

#### 2.1.4 Biochimie de dégradation des éthènes chlorés

##### 2.1.4.1 Mécanismes réactionnels

Les réactions de transformation des hydrocarbures aliphatiques chlorés sont divisées en deux grandes classes : les réactions ne nécessitant pas de transferts d'électrons externes (substitutions et déshydrohalogénéation) et celles qui en nécessitent (oxydations et réductions) (Tableau 2.2 et Annexe 2). Le transfert d'électrons externe est défini comme un transfert depuis un donneur ou vers un accepteur d'électrons qui n'est pas la molécule halogénée elle-même (Vogel et al., 1987).

La photolyse est un mécanisme de réaction possible, mais qui n'a aucune importance dans les environnements d'intérêt qui sont les sols, les unités de traitement d'effluents industriels ou le corps humain.

Les substitutions et les déshydrohalogénations sont possibles en conditions abiotiques, avec des vitesses de réaction très faibles. Les taux de réaction sont néanmoins augmentés

par des enzymes biologiques. Les oxydations et les réductions sont catalysées par des systèmes biologiques (Vogel et al., 1987).

Dans le cas des éthènes chlorés, les principales réactions de biodégradation sont une oxydation et une réduction : l'époxydation en conditions aérobies, et l'hydrogénolyse en conditions anaérobies (Tableau 2.2). Les principaux produits de transformation spontanée de l'époxyde du TCE sont l'acide dichloroacétique ( $\text{CCl}_2\text{H-COOH}$ ), l'acide glyoxylique ( $\text{COOH-COH}$ ), l'acide formique ( $\text{HCOOH}$ ) et le monoxyde de carbone ( $\text{CO}$ ) (Nakajima et al., 1992; Dolfling et al., 1993). La formation des produits précédents dépend du pH.

Tableau 2.2 - Les principaux mécanismes réactionnels de dégradation des hydrocarbures aliphatiques halogénés (Vogel et al., 1987)

Mécanismes de réaction	Bio. [1]	Équation de réaction
Substitution		$\text{RX} + \text{N}^- \rightarrow \text{RN} + \text{X}^-$ $\text{RX} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{HX}$
Déshydrohalogénéation		$\text{CR}_1\text{X}_2-\text{CR}_2\text{R}_3\text{H} \rightarrow \text{CR}_1\text{X=CR}_2\text{R}_3 + \text{HX}$
Oxydations		$\text{R}_1\text{R}_2\text{CHX} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{CXOH} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$ $\text{R}_1\text{R}_2\text{CXOH} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{CO} + \text{H}^+ + \text{X}^-$
• époxydation	✓	$\text{R}_1\text{R}_2\text{C=CR}_3\text{X} + \text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \begin{array}{c} \text{X} \\   \\ \text{C} \end{array} \text{---} \begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{C} \end{array} \text{---} \begin{array}{c} \text{R}_3 \\   \\ \text{R}_1 \end{array} \text{---} \begin{array}{c} \text{R}_2 \\   \end{array} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$
Réductions		$\text{RX} + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{RH} + \text{X}^-$ $\text{R}_1\text{R}_2\text{XC-}\text{CR}_3\text{R}_4\text{X} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{C=CR}_3\text{R}_4 + 2\text{X}^-$
• hydrogénolyse	✓	$2\text{RX} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{R-R} + 2\text{X}^-$
• dihaloélimination		
• couplage		

[1] mécanismes réactionnels de la biodégradation des éthènes chlorés par des microorganismes

X : halogène (Br, I, F, Cl)

R : chaîne carbonée

### 2.1.4.2 Thermodynamique de la biodégradation des éthènes chlorés

Les énergies libres de réactions sont élevées lors de la déchloration réductrice (Dolfing, 1999). Elles sont supérieures par exemple à celles de deux réactions utilisées par des microorganismes hydrogénotrophes anaérobies, des méthanogènes et des acétogènes (Tableau 2.3). La déchloration réductrice des éthènes chlorés est donc en théorie une réaction qui peut fournir suffisamment d'énergie pour la croissance cellulaire.

Le classement sur une échelle des potentiels redox montre que le PCE (couple PCE/TCE) et le TCE (couple TCE/DCE) sont meilleurs accepteurs d'électrons que le nitrate (couple  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ), et que le DCE (couple DCE/CV) est aussi bon accepteur d'électrons que le nitrate (Vogel et al., 1987). La thermodynamique est donc favorable à la déchloration réductrice des éthènes chlorés.

Tableau 2.3 - Rendement énergétique de réductions utilisant  $\text{H}_2$  comme donneur d'électrons (adapté de Zehnder, 1988 et de Dolfing, 1999)

Accepteur d'électrons	Produit	Équation	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol $\text{H}_2$ )	Référence biblio.
$\text{CO}_2$	$\text{CH}_4$	$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-34.8	[1]
	$\text{CH}_3\text{COOH}$	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	-26.2	[1]
PCE	TCE	$\text{C}_2\text{Cl}_4 + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{HCl}_3 + \text{HCl}$	-171.6	[2]
TCE	c-DCE	$\text{C}_2\text{HCl}_3 + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2 + \text{HCl}$	-164.4	[2]
	t-DCE		-166.6	[2]
	1,1-DCE		-166.7	[2]
c-DCE	CV	$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_3\text{Cl} + \text{HCl}$	-146.0	[2]
CV	ETH	$\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl} + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4 + \text{HCl}$	-154.3	[2]

Données de Dolfing pour les conditions standards (concentrations: 1 M, gaz à 1 atm, 25°C, pH=7)

[1] Zehnder, 1988 - [2] calculs à partir des données de Dolfing, 1999

En aérobiose, les énergies libres de réaction sont suffisantes pour la croissance microbienne, dans le cas d'une minéralisation complète en  $\text{CO}_2$  et  $\text{HCl}$ , avec  $\text{O}_2$  comme accepteur terminal d'électrons (Dolfing et Janssen, 1994). La thermodynamique est favorable à la dégradation des éthènes chlorés en aérobiose.

Tableau 2.4 - Rendement énergétique de la minéralisation des éthènes chlorés en conditions aérobie (adapté de Dolfing et Janssen, 1994)

Composé	Équation	Nb e-	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/réaction)	(kJ/éq)
CH <sub>4</sub>	CH <sub>4</sub> + 2O <sub>2</sub> → CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	8	-812.7	-101.6
PCE	C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> + O <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O → 2CO <sub>2</sub> + 4HCl	4	-1006.0	-251.5
TCE	C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> + 3/2O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O → 2CO <sub>2</sub> + 3HCl	6	-1071.8	-178.6
c-DCE	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 2O <sub>2</sub> → 2CO <sub>2</sub> + 2HCl	8	-1142.7	-142.8
t-DCE	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 2O <sub>2</sub> → 2CO <sub>2</sub> + 2HCl	8	-1145.0	-143.1
1,1-DCE	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 2O <sub>2</sub> → 2CO <sub>2</sub> + 2HCl	8	-1143.1	-142.9
CV	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl + 5/2O <sub>2</sub> → 2CO <sub>2</sub> + HCl + H <sub>2</sub> O	10	-1236.5	-123.7

(1) énergie libre par équivalent-réducteur transféré

Nb e- : nombre d'électrons transférés

En anaérobiose comme en aérobiose, la dégradation des éthènes chlorés est favorable thermodynamiquement (Dolfing et al., 1993; Dolfing et Janssen, 1994). La croissance sur des éthènes chlorés comme seule source de carbone et d'énergie est observée depuis quelques années en conditions anaérobies (Holliger et al., 1998; Maymo-Gattell et al., 1997; McCarty, 1997), et sur le VC en aérobiose (Hartman et de Bont, 1992). La récalcitrance à la dégradation reste cependant une caractéristique majeure des éthènes chlorés. La cause probable est l'absence de voies biochimiques de fixation de l'énergie. Il est cependant réaliste de considérer qu'il existe une pression de sélection en faveur des microorganismes capables d'utiliser le TCE comme seule source de carbone et d'énergie.

## 2.2 Vue d'ensemble de l'écosystème microbien dans un système couplé de dégradation du TCE

L'objectif de ce chapitre est de mettre en évidence les principaux métabolismes microbiens en jeu et leurs relations dans l'écosystème d'un réacteur couplé anaérobiose/aérobiose de dégradation du TCE.

Le cométabolisme est un processus microbien essentiel de la biodégradation des éthènes chlorés, en conditions anaérobies et en conditions aérobie. Il est donc également présenté

ici avant de présenter le fonctionnement global de l'écosystème microbien et d'aborder en détail chacun des métabolismes microbiens d'intérêt.

### 2.2.1 Le cométabolisme

Le cométabolisme est la transformation fortuite d'un composé, sans que le microorganisme utilise le composé comme source de carbone ou source d'énergie. La dégradation du composé cométabolisé nécessite la présence d'un substrat primaire comme source d'énergie (Cookson, 1995).

Le cométabolisme n'est pas du métabolisme gratuit, car une transformation cométabolique consomme de l'énergie. Le cométabolisme est défini par Criddle (1993) comme la transformation d'un composé par :

- des cellules en croissance en présence d'un substrat de croissance,
- des cellules au repos en l'absence d'un substrat de croissance,
- des cellules au repos en présence d'un substrat énergétique.

Le substrat de croissance ( $S_g$ ) est un donneur d'électrons capable de fournir suffisamment de pouvoir réducteur et d'énergie pour la croissance et le maintien. Le substrat énergétique ( $S_e$ ) est un donneur d'électrons capable de fournir du pouvoir réducteur et de l'énergie, mais pas suffisamment pour assurer la croissance.

Le cométabolisme résulte du manque de spécificité des enzymes et des cofacteurs. Il s'applique aussi bien à des oxydations qu'à des réductions. Toute transformation d'un composé satisfait à la définition du cométabolisme, si elle nécessite l'utilisation préalable ou simultanée d'un substrat de croissance ou d'énergie, et si elle ne contribue pas à la croissance (Criddle, 1993).

Le cométabolisme entraîne une perte de biomasse ou une baisse de l'activité enzymatique, à cause de trois phénomènes principalement (Chang et Alvarez-Cohen, 1995a; Criddle, 1993) (Figure 2.2) :

1. La toxicité du substrat cométabolisé ou de ses produits de transformation endommage les cellules et cause une inaktivité cellulaire (Criddle, 1993).

2. En l'absence d'un substrat de croissance ou d'un substrat énergétique, les équivalents réducteurs ( $\text{NAD(P)H}$ ) consommés par les transformations cométaboliques ne sont pas régénérés. L'épuisement des équivalents réducteurs limite alors la dégradation cométabolique, avant même la toxicité du produit (Chang et Alvarez-Cohen, 1995a).
3. Un substrat de croissance régénère les équivalents réducteurs, mais une inhibition compétitive pour l'enzyme a lieu entre le substrat de croissance et le substrat cométabolisé (Chang et Alvarez-Cohen, 1995a).

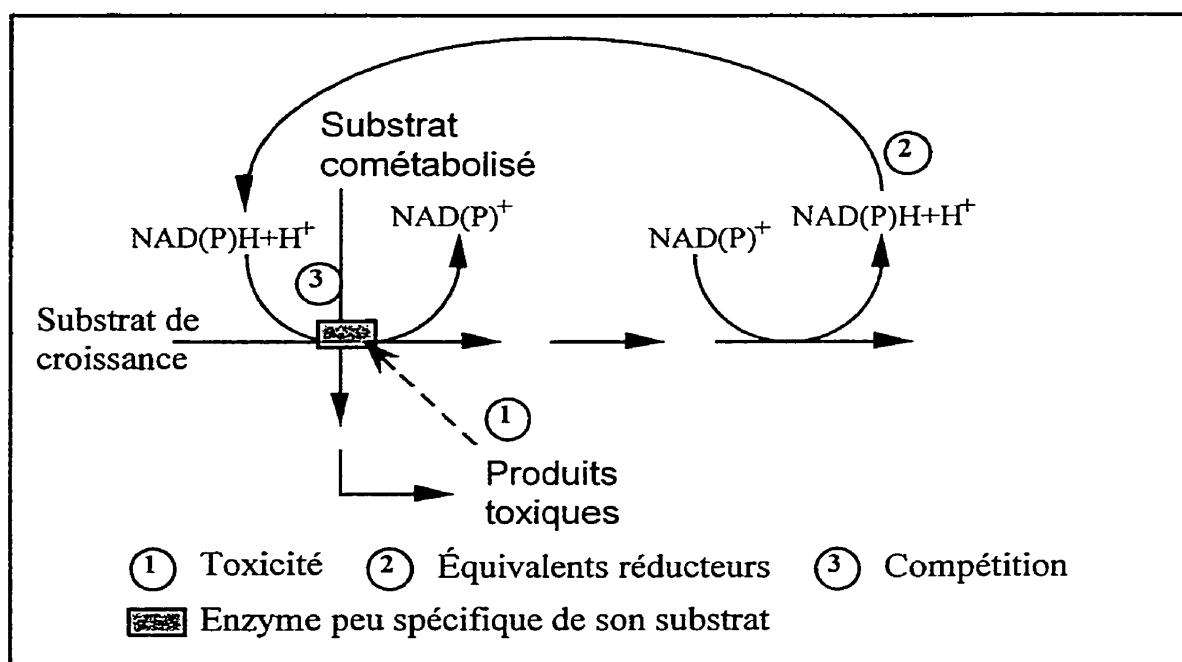


Figure 2.2 - Schéma de principe des phénomènes en jeu lors du cométabolisme (adapté de Chang et Alvarez-Cohen, 1995a)

La présence d'un substrat de croissance peut prolonger l'activité cométabolique en régénérant les équivalents-réducteurs, mais dans ce cas, l'inhibition compétitive diminue le taux de dégradation cométabolique (Chang et Alvarez-Cohen, 1995a).

Certains intermédiaires cataboliques régénèrent les  $\text{NAD(P)H}$  et ne sont pas des substrats de l'enzyme responsable du cométabolisme. Leur utilisation permet alors d'étudier la

toxicité indépendamment de l'épuisement des NAD(P)H et de l'inhibition compétitive (Chang et Alvarez-Cohen, 1995a).

Le formate est un intermédiaire de dégradation du méthane chez les méthanotrophes et il permet de régénérer le NADH. Il est largement utilisé pour étudier le cométabolisme du TCE par les méthanotrophes (Alvarez-Cohen et McCarty, 1991a; Henry et Grbic-Galic, 1991; Oldenhuis et al., 1989; Smith et McCarty, 1997).

Le substrat de croissance est cependant irremplaçable si il est l'inducteur du système enzymatique responsable du cométabolisme (Chang et Alvarez-Cohen, 1995a).

La capacité de transformation du substrat cométabolisé par la biomasse est un concept clé dans la modélisation de la cinétique du cométabolisme (Alvarez-Cohen et McCarty, 1991b). La capacité de transformation,  $T_c$ , est définie comme la quantité maximale de composé transformé par unité de masse de biomasse avant l'inactivation cellulaire (Alvarez-Cohen et McCarty, 1991a).

$$T_c^b = \frac{dM_c}{dM_b} \quad [\text{Éq. 2.1}]$$

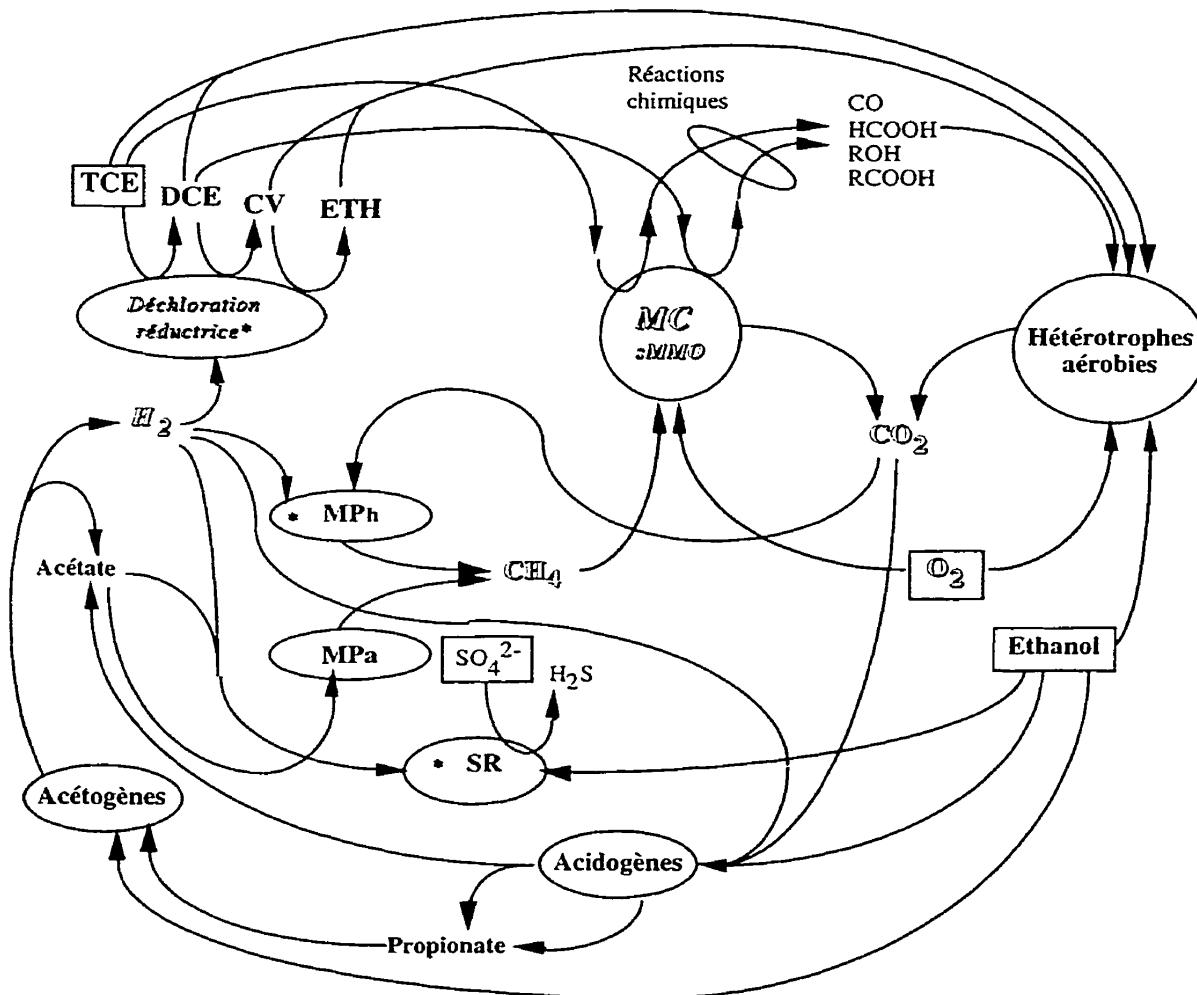
La dégradation des éthènes chlorés est réalisée par cométabolisme, en conditions anaérobie et aérobie (Holliger et Schraa, 1994; Lee et al., 1998). Les éthènes chlorés ne sont pas considérés comme de bons substrats de croissance (Dolfing et Janssen, 1994).

En anaérobiose, le principal mécanisme microbien de dégradation observé en laboratoire est probablement du cométabolisme. La déhalorespiration est un procédé microbien de dégradation non cométabolique, étudié depuis quelques années seulement. La déhalorespiration pourrait être un processus microbien courant sur le terrain, inconnu et peu étudié jusque là (McCarty, 1997).

En aérobiose, le cométabolisme par les oxygénases est le mécanisme microbien de dégradation le plus étudié car le plus prometteur à priori. Parmi les différentes oxygénases, la méthane monooxygénase soluble (sMMO) des méthanotrophes a montré les plus forts taux de dégradation (DiSpirito et al., 1992; Sullivan et al., 1998).

## 2.2.2 Les interactions trophiques entre les populations

Dans un système couplé, les interactions entre les différentes populations microbiennes sont nombreuses. Une description des principales relations trophiques est utile pour comprendre le fonctionnement global du système (Figure 2.3).



### Abréviations et symboles :

MP: bactéries productrices de méthane ou méthanogènes (MPh: méthanogènes hydrogénotrophes; MPa: méthanogènes acétolastes) ; SR: bactéries sulfato-réductrices; MC: bactéries consommatrices de méthane ou méthanotrophes; sMMO: méthane monoxygénase soluble; \* : déchloration réductrice

Figure 2.3 - Schéma conceptuel des réactions d'un écosystème couplé anaérobiose/aérobiose de dégradation du TCE avec l'éthanol comme substrat

Une telle représentation permet d'identifier le rôle du(es) processus microbien(s) à favoriser (Figure 2.3). Ici, il s'agit de favoriser les processus microbiens de dégradation des éthènes chlorés, et plus spécifiquement le cométabolisme par les méthanolotrophes.

Le schéma de la Figure 2.3 met en évidence les substrats intermédiaires clés, et les principaux groupes métaboliques en jeu.

Les métabolismes anaérobies d'intérêt dans ce système sont :

- la dégradation anaérobie de la matière organique en conditions méthanogènes, soit l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse;
- la sulfato-réduction;
- la déchloration réductrice du TCE et de ses métabolites, par cométabolisme et par halorespiration.

Les métabolismes aérobies d'intérêt sont :

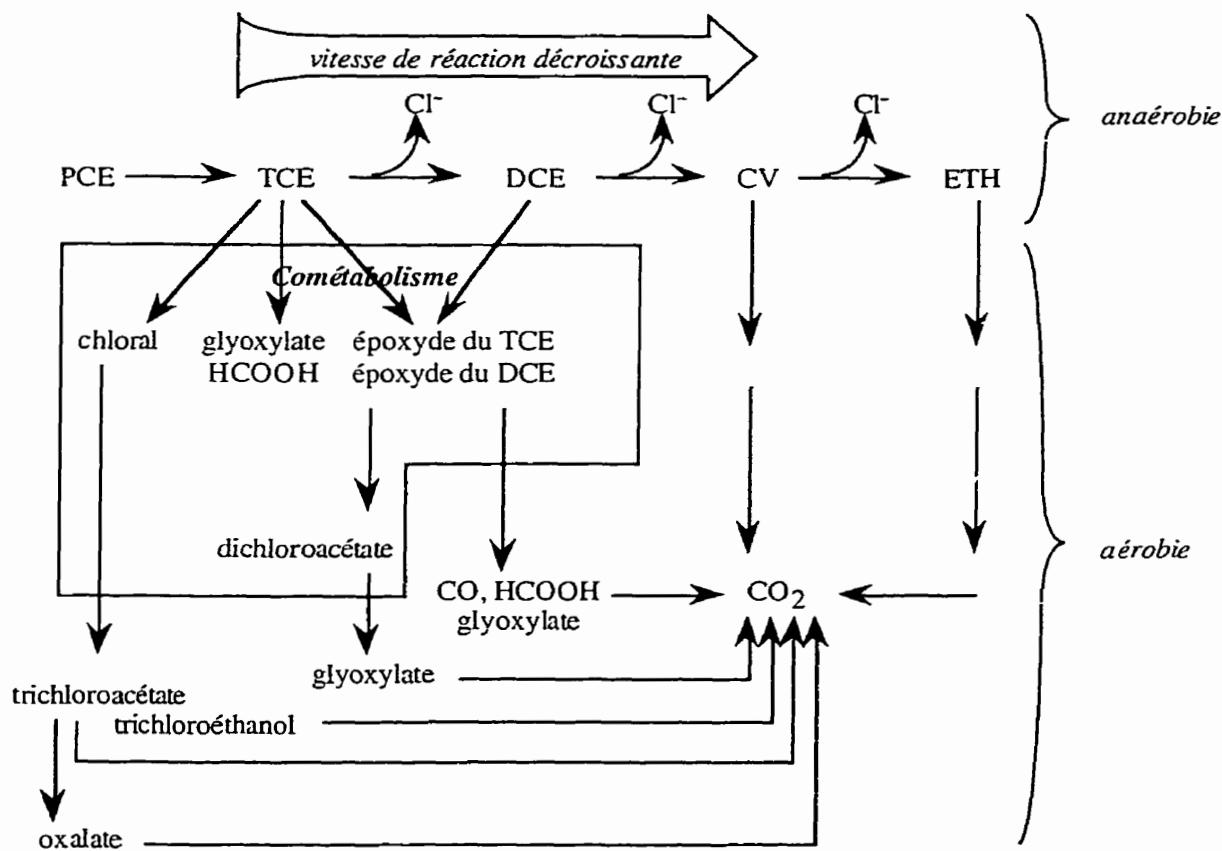
- la dégradation aérobie de la matière organique par les hétérotrophes aérobies;
- l'oxydation du méthane par les méthanolotrophes;
- l'oxydation cométabolique du TCE et de ses métabolites par les méthanolotrophes;
- la dégradation du TCE et de ses métabolites par les hétérotrophes aérobies.

Les métabolismes anaérobies et aérobies précédents vont donc être décrits.

Les principales relations entre les groupes microbiens dans un système couplé seront ensuite intégrées dans la description de fonctionnement du système.

### 2.2.3 Couplage des voies de dégradation des éthènes chlorés dans un système anaérobie/aérobie

Le schéma des processus et des relations entre les différents groupes microbiens (Figure 2.3) montre la complexité de l'écosystème couplé anaérobie/aérobie de dégradation du TCE. Avant de détailler chaque métabolisme significatif identifié, il est utile de rappeler que le système couplé anaérobie/aérobie de dégradation des éthènes chlorés se justifie par la complémentarité des métabolismes anaérobie et aérobie de dégradation (Figure 2.4).

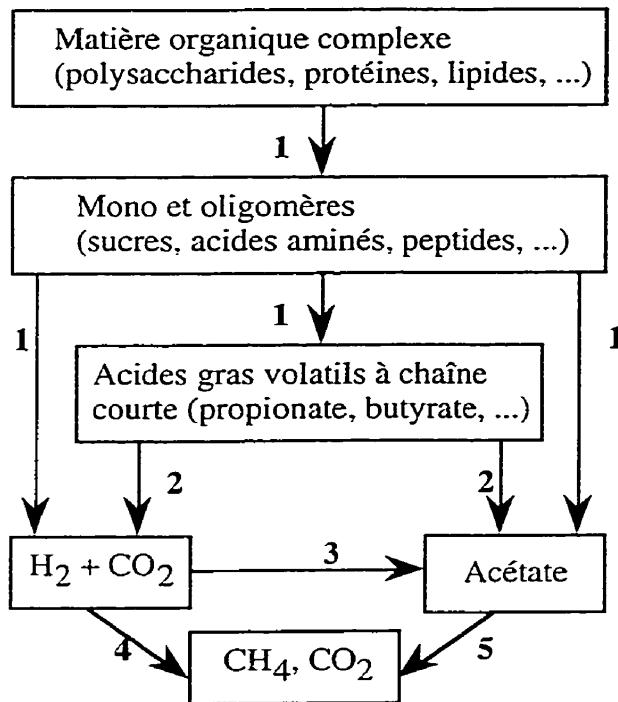


PCE : perchloroéthylène; TCE : trichloroéthylène; DCE : dichloroéthylène;  
VC : chlorure de vinyle; ETH : éthylène

Figure 2.4 - Couplage des voies de dégradation anaérobie et aérobie du PCE (adapté de Whittaker et al., 2000 et Mohn et Tiedje, 1992)

## 2.3 Métabolisme anaérobie

### 2.3.1 Métabolisme de la matière organique en conditions méthanogènes



Groupes microbiens :

- 1: bactéries fermentaires
- 2: bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène
- 3: bactéries homoacétogènes
- 4: bactéries méthanogènes hydrogénotrophes
- 5: bactéries méthanogènes acétoclastes

Figure 2.5 - Étapes du flux de C lors de la dégradation anaérobiose de la matière organique en conditions méthanogènes (Zehnder, 1988)

Une présentation préliminaire de la méthanogénèse est utile pour comprendre les interactions trophiques qui existent entre les populations bactériennes du système couplé étudié. La dégradation anaérobiose du substrat principal fournit du méthane et de l'hydrogène (Figure 2.5), le méthane étant la source unique de carbone et d'énergie des méthanotrophes et l'hydrogène le donneur d'électrons central de la déchlororation réductrice.

Les trois grandes étapes de la dégradation de la matière organique en conditions méthanogènes sont l'acidogénèse ou hydrolyse de la matière organique, l'acétogénèse et enfin la méthanol-génèse au sens propre (Annexe 3).

Les méthanol-génèses sont des dégradeurs terminaux de la matière organique et dépendent d'autres organismes anaérobies pour obtenir leurs substrats de croissance. L'acétate est le précurseur principal de méthane dans la nature et dans un digesteur anaérobiose, 70% du CH<sub>4</sub> formé proviennent de l'acétate (Zehnder, 1988).

Certains producteurs d'acétate et d'H<sub>2</sub> sont des acétogénèses producteurs obligatoires d'H<sub>2</sub>. Les acétogénèses producteurs d'hydrogène occupent une niche écologique restreinte et dépendent de l'association syntrophiqne avec des consommateurs d'H<sub>2</sub>, pour des raisons thermodynamiques et également à cause de l'inhibition de leur hydrogénase par H<sub>2</sub>. Si la pression partielle en hydrogène est trop élevée (supérieure à 10<sup>-4</sup> atm) (Zehnder, 1988), l'acétogénèse est bloquée, les acides gras volatils à chaînes longues et les alcools ne sont plus convertis en acétate. Les acétogénèses produisent du propionate, du butyrate et du lactate au lieu de l'acétate et ces acides gras volatils s'accumulent dans le milieu.

Tableau 2.5 - Réactions impliquées dans la formation de méthane à partir de l'éthanol  
(Zehnder, 1988)

Équations		$\Delta G^\circ$ (kJ/rxn)
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH + H <sub>2</sub> O → CH <sub>3</sub> COOH + 2H <sub>2</sub>	[Éq. 2.2]	9.6
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH + H <sub>2</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> O	[Éq. 2.3]	-66.5
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH + 2/3HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → 1/3CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> + 2/3CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> + 1/3H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	[Éq. 2.4]	-41.1
H <sub>2</sub> + 1/4HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 1/4H <sup>+</sup> → 1/4CH <sub>4</sub> + 3/4H <sub>2</sub> O	[Éq. 2.5]	-33.9
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH + 2H <sub>2</sub> O → CH <sub>3</sub> COOH + 3H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	[Éq. 2.6]	76.1
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O → CH <sub>4</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[Éq. 2.7]	-31.0

Dans le système étudié, le substrat carboné est l'éthanol. Plusieurs voies de dégradation de l'éthanol sont possibles car plusieurs réactions sont impliquées dans la formation de méthane (Tableau 2.5).

Il y a deux réactions de production de propionate à partir de l'éthanol, et elles sont toutes deux exergoniques ([Éq. 2.3] et [Éq. 2.4]).

La production de propionate à partir de l'éthanol, du CO<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub> est de plus en plus favorable du point de vue thermodynamique quand la pression partielle en H<sub>2</sub> augmente [Éq. 2.3]. L'autre réaction donne du propionate et de l'acétate à partir de l'éthanol, et ne dépend pas de la pression partielle en H<sub>2</sub> [Éq. 2.4]. Ces deux réactions de production de propionate peuvent être simultanées, d'autant plus que la compétition pour l'éthanol est gouvernée par plusieurs facteurs et pas seulement par l'énergie libre de réaction.

De plus, l'énergie libérée par mole de H<sub>2</sub> oxydé avec l'éthanol pour former du propionate [Éq. 2.3] est plus élevée que l'énergie libérée par mole de H<sub>2</sub> lors de la réduction du CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> [Éq. 2.5]. À faible concentration en H<sub>2</sub>, les producteurs de propionate à partir d'éthanol sont donc susceptibles d'épuiser l'hydrogène aux dépens des autres hydrogénotrophes. En outre, toutes les bactéries connues capables de former du propionate à partir de l'éthanol utilisent d'autres substrats, elles sont donc avantageées dans les environnements à substrats variables.

D'après les réactions de dégradation de l'éthanol décrites, une surcharge organique entraînera une augmentation de la pression partielle en hydrogène et se traduira par une accumulation du propionate dans le système.

### **Interactions entre hydrogénotrophes et compétition pour H<sub>2</sub>**

L'hydrogène est une source d'équivalents réducteurs utilisée par de nombreux organismes dits hydrogénotrophes : des homoacétogènes, des méthanogènes, des sulfato-réductrices, des nitrates-réductrices ammonifiantes.

La compétition pour l'hydrogène produit par les bactéries fermentaires dépend essentiellement du potentiel rédox de l'accepteur terminal d'électron (Cord-Ruwisch et al., 1988). Si un organisme utilise un accepteur d'électron à potentiel rédox plus élevé, ou encore s'il utilise l'hydrogène plus efficacement d'un point de vue thermodynamique, il

sera avantage par rapport aux autres organismes présents et sera le principal utilisateur d'hydrogène. Ainsi les accepteurs d'électrons dans l'ordre de préférence seront : nitrate ou fumarate > sulfate >  $\text{CO}_2$  (donnant du  $\text{CH}_4$ ) > soufre élémentaire ou  $\text{CO}_2$  (donnant de l'acétate).

Les conditions thermodynamiques dépendent du couple rédox mais également de la concentration du donneur d'électrons, ici  $\text{H}_2$ , et des concentrations des différents accepteurs d'électrons. Ainsi, un accepteur d'électron trop peu soluble ou en trop faible concentration par rapport aux autres accepteurs d'électrons ne permettra pas de donner l'avantage à ses utilisateurs.

### 2.3.2 La sulfato-réduction en conditions méthanogènes

Les sulfato-réductrices sont des bactéries anaérobies strictes. Elles utilisent comme accepteur terminal d'électrons le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) qu'elles réduisent en sulfure ( $\text{S}^{2-}$ ), et également le sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) et le thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), qui sont transformés en sulfate.

Les sulfato-réductrices sont capables d'utiliser l'oxydation de composés organiques comme source d'énergie. Elles peuvent donc se développer en l'absence de sulfate. Leurs sources de carbone sont des composés organiques de faible poids moléculaire:

- acides organiques (lactate, pyruvate, formate, malate),
- acides gras volatiles (acétate),
- alcools (éthanol, propanol, méthanol, butanol).

Tous ces composés sont des produits de fermentation anaérobie de la matière organique. Les sulfato-réductrices sont des dégradeurs terminaux de la matière organique comme les méthanogènes.

La source d'azote principale est l'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Le pH optimal dans l'environnement est autour de 7, et elles sont habituellement inhibées à un pH inférieur à 5.5 ou supérieur à 9.

Les sulfato-réductrices et les méthanogènes utilisent plusieurs substrats communs, et d'un point de vue thermodynamique, la sulfato-réduction est plus avantageuse que la méthanogénèse pour la majorité de ces substrats communs (Tableau 2.6 et Tableau 2.7). Pour l'hydrogène notamment, les sulfato-réductrices sont plus efficaces et seraient donc les principales utilisatrices des équivalents-réducteurs sous forme de H<sub>2</sub>.

Tableau 2.6 - Données thermodynamiques sur la méthanogénèse (Karhadkar et al., 1987; Zehnder, 1988)

Equation		$\Delta G^0$ , (kJ/réaction)
4H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	→ CH <sub>4</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-135
CH <sub>3</sub> COOH	→ CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>	-29
4CH <sub>3</sub> OH	→ 3CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-103
4CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> O	→ 3CH <sub>4</sub> + 4CH <sub>3</sub> COOH + CO <sub>2</sub>	-102

Tableau 2.7 - Données thermodynamiques sur la sulfato-réduction (Hao et al., 1996; Karhadkar et al., 1987; Zehnder, 1988)

Equation		$\Delta G^0$ , (kJ/réaction)
4H <sub>2</sub> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	→ H <sub>2</sub> S + 2H <sub>2</sub> O + 2OH <sup>-</sup>	-154
CH <sub>3</sub> COOH + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	→ H <sub>2</sub> S + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-43
4CH <sub>3</sub> OH + 3SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	→ 3HS <sup>-</sup> + 4HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup>	-364
4C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> COO <sup>-</sup> + 3SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	→ 3HS <sup>-</sup> + 4HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4CH <sub>3</sub> COO + H <sup>+</sup>	-151
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> + H <sub>2</sub> O	→ SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + HS <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>	-22
4SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> + H <sup>+</sup>	→ 3 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + HS <sup>-</sup>	-236

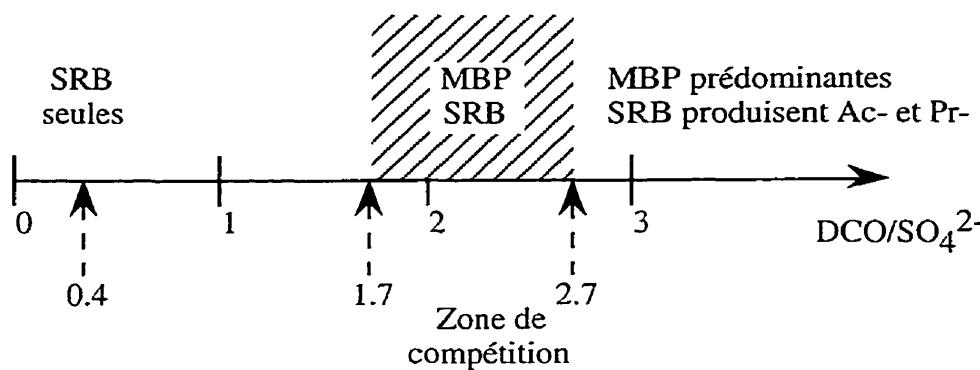
Du point de vue cinétique pour les substrats communs aux deux groupes (H<sub>2</sub>, acétate, formate, propionate, ...), les sulfato-réductrices montrent une affinité plus grande pour le substrat commun. Elles ont des constantes de saturation (K<sub>s</sub>) plus faibles, même si les taux de consommation maximum (V<sub>max</sub>) sont du même ordre de grandeur (Zehnder, 1988). Les sulfato-réductrices ont un avantage sélectif par rapport aux méthanogènes au point de vue cinétique.

Dans un écosystème microbien comme un réacteur, les interactions entre les deux populations dépendent également de facteurs écologiques qui pourraient être déterminants, par rapport aux considérations thermodynamiques et cinétiques (Cabirol et al., 1998).

Dans un biofilm par exemple, les méthanologènes peuvent être plus abondantes que les sulfato-réductrices en raison de la limitation du transfert du sulfate, et à cause des moins bonnes propriétés d'aggrégation des sulfato-réductrices en général (Cabirol et al., 1998; Hao et al., 1996; Oude Elferink et al., 1994). Notons que des sulfato-réductrices acétoclastes sont capables de s'attacher à des particules solides et de croître dans des boues granulaires (Oude Elferink et al., 1994).

En absence de sulfate, certaines sulfato-réductrices ont une croissance fermentaire ou acétogène. L'éthanol est un substrat fermentaire possible qui assure une bonne croissance. Le propionate est oxydé par des sulfato-réductrices en association syntrophe avec des méthanologènes hydrogénotrophes, mais en présence de sulfate elles oxydent le propionate par réduction simultanée du sulfate (Oude Elferink et al., 1994). Ces syntrophes facultatives ont donc un avantage écologique par rapport aux syntrophes obligatoires, notamment dans un environnement variable.

Un autre paramètre des interactions entre les méthanologènes et les sulfato-réductrices est le rapport entre la charge organique et la concentration de sulfate (Hao et al., 1996). Un rapport faible élimine toute activité méthanologène du milieu. Un rapport élevé entraîne la prédominance de la méthanologénèse, et la présence de sulfato-réductrices utilisant des voies métaboliques différentes de la sulfato-réduction (Figure 2.6).



Abréviations:

MBP : méthanogènes; SRB : bactéries sulfato-réductrices;  
Ac- : acétate; Pr- : propionate; DCO : demande chimique en oxygène

Figure 2.6 - Rapport COD/ $\text{SO}_4^{2-}$  et compétition entre les méthanogènes et les sulfato-réductrices (adapté de Hao et al., 1996)

En résumé, même si les conditions méthanogènes prédominent, il est possible de trouver des sulfato-réductrices, capables d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons que le sulfate. Elles ont alors un métabolisme fermentaire ou acétogène, avec production d'acétate et de propionate, et elles peuvent former une association syntrophe avec les méthanogènes hydrogénotrophes.

### 2.3.3 Biodégradation des éthènes chlorés en conditions anaérobies

La déchlororation réductrice catalysée par des bactéries anaérobies a deux significations physiologiques possibles (Holliger et Schraa, 1994; Lee et al., 1998) :

1. une activité cométabolique,
2. un nouveau type de respiration, appelée halo-respiration ou déhalo-respiration, où le composé chloré est accepteur d'électrons, dans des réactions fournissant l'énergie nécessaire à la croissance bactérienne.

Bon nombre d'études de la biodégradation en conditions anérobies n'indiquent pas si le processus microbien est du cométabolisme ou non. La principale raison est que dans la majorité de ces cas, le processus en lui-même n'est pas identifié. Les microorganismes

responsables de ces transformations sont dénommés "déchlorateurs réducteurs", sans autre précision.

La déchloration réductrice du PCE ou du TCE a été observée en conditions méthanogènes (Freedman et Gossett, 1989; Vogel et McCarty, 1985), en conditions sulfato-réductrices (Bagley et Gossett, 1990) et en conditions anaérobies en l'absence de méthanol-génèse (DiStephano et al., 1991) et d'acétogénèse. Il est possible que des interactions complexes existent entre les déchlorateurs et les autres populations de la communauté microbienne, et que ces interactions jouent un rôle essentiel dans la déchloration. Dans un tel cas, l'isolement du microorganisme responsable de la déchloration est plus délicate.

Les activités cométaboliques sont principalement observées avec des aliphatiques halogénés, ce sont des réactions non-spécifiques catalysées par des anaérobies strictes et facultatives. Les systèmes enzymatiques probablement impliqués contiennent des cofacteurs avec des métaux de transition (Gantzer et Wackett, 1991). Ces cofacteurs seraient responsables de la déchloration réductrice cométabolique par des méthanol-gènes, des sulfato-réductrices, des bactéries fermentaires, acétogènes, acidogènes et homoacétogènes (Holliger et Schraa, 1994).

Les déchlorations réductrices de la déhalorespiration sont des réactions très spécifiques, et les premières bactéries capables de déhalorespiration ont été observées et isolées récemment (Gerritse et al., 1996; Holliger et al., 1993; Holliger et al., 1998; Krumholz, 1997; Maymo-Gatell et al., 1995; Maymo-Gatell et al., 1999). Une propriété singulière de certaines de ces bactéries est leur régime alimentaire très restreint, avec seulement un ou deux donneur d'électrons utilisables et uniquement le PCE ou le TCE comme accepteur d'électrons (Holliger et al., 1993; Maymo-Gatell, 1997; McCarty, 1997).

En termes de potentiel d'application, la déchloration réductrice cométabolique et la déhalorespiration se différencient clairement (Holliger et Schraa, 1994):

1. cométabolisme :

- non-spécificité, donc plusieurs molécules cibles, favorable pour une plus grande flexibilité d'application du procédé,

- faibles taux de déchloration, donc quantité nécessaire de biomasse importante,

2. déhalorespiration :

- forte spécificité, donc une seule molécule cible, ce qui restreint l'utilisation d'un procédé et correspond peu aux conditions réelles où un mélange de contaminants est souvent présent,
- taux de déchloration bien supérieurs à ceux du cométabolisme.

Certaines caractéristiques de la déchloration réductrice en conditions anaérobies sont communes aux deux types de métabolisme, notamment les voies métaboliques globales. La distinction entre les deux métabolismes est faite lorsqu'elle est pertinente et possible.

La voie métabolique générale de dégradation en conditions anaérobies est une série de déchlorations réductrices séquentielles (Figure 2.7).

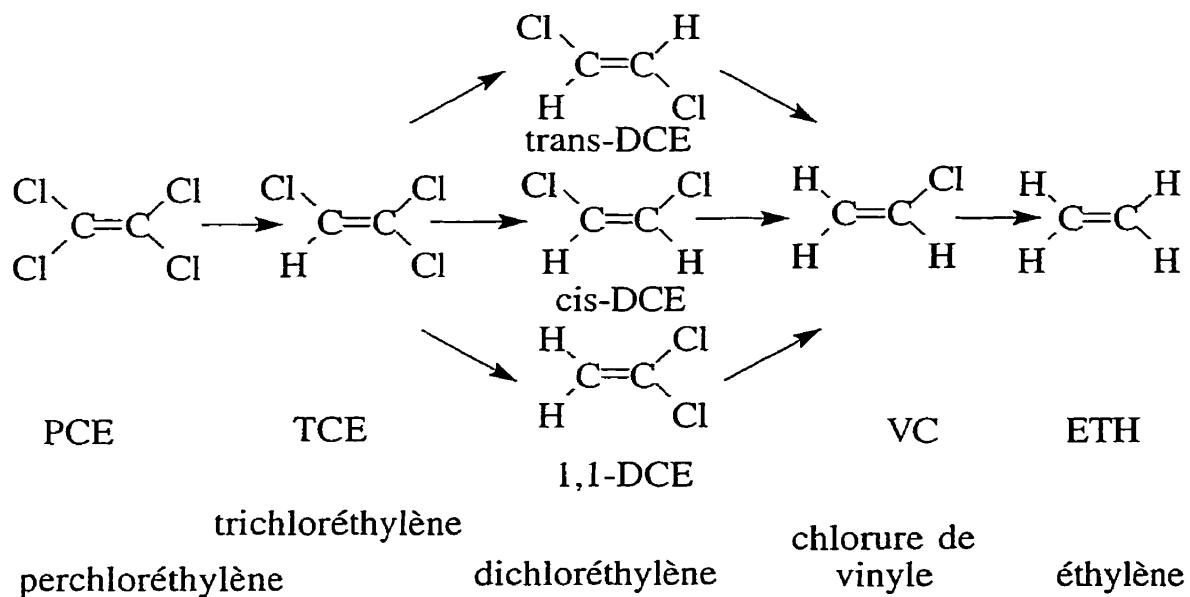


Figure 2.7 - Déchloration réductrice des éthènes chlorés (Mohn et Tiedje, 1992)

Les métabolites précédents (Figure 2.7) sont détectés, en proportions variables selon les conditions de milieu, et selon la durée de l'acclimatation de la biomasse au contaminant.

Parmi les DCE, le cis-DCE est la forme principale (Mohn et Tiedje, 1992). Le trans-DCE et le 1,1-DCE sont plus rarement détectés. Le cis-DCE et le CV sont souvent les formes accumulées, la déchloration réductrice du CV en ETH étant considérée comme l'étape la plus limitante (Bradley, 2000).

### **Donneurs d'électrons, rôle central de H<sub>2</sub>**

L'hydrogène moléculaire H<sub>2</sub> est le donneur d'électrons central de la déchloration réductrice (DiStephano et al., 1992). Ce composé joue donc un rôle central dans un système couplé anaérobiose/aérobiose de dégradation du TCE.

Les mécanismes de compétition pour H<sub>2</sub> entre les différentes populations microbiennes détermineront si la déchloration réductrice pourra ou non avoir lieu (Fennell et Gossett, 1999).

D'après des études cinétiques sur la compétition pour H<sub>2</sub>, les déchlorateurs réducteurs peuvent être de bons compétiteurs car ils ont une plus grande affinité pour H<sub>2</sub> et sont capables de l'utiliser à des seuils de concentration trop bas pour d'autres hydrogénotrophes comme les méthanogènes (Fennell et Gossett, 1999; Yang et McCarty, 1998).

## **2.4 Métabolisme aérobie**

### **2.4.1 Les hétérotrophes**

Les bactéries hétérotrophes aérobies oxydent le substrat carboné en utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électron. Le substrat est une source de carbone et un donneur d'électrons, donc une source d'énergie.

Ce sont les microorganismes les plus efficaces dans un système couplé, aussi bien d'un point de vue thermodynamique que d'un point de vue cinétique. Tant que l'oxygène et la source de carbone sont présents simultanément, les hétérotrophes aérobies se développent avant toute autre population et utilisent le substrat en premier.

L'oxydation du substrat carboné sert à la synthèse cellulaire et fournit l'énergie nécessaire, soit l'énergie pour la maintenance, l'assimilation et la croissance.

## 2.4.2 Les méthanotrophes

### 2.4.2.1 Classification et physiologie des méthanotrophes

L'étude des méthanotrophes connaît un fort développement depuis 30 ans à cause de leur potentiel de production de produits chimiques et de leurs perspectives d'application en biorémédiation, grâce à leurs capacités de dégradation de divers xénobiotiques (Murrell et al., 1998).

Les méthanotrophes montrent une activité métabolique sur plusieurs composés organiques, qui sont des contaminants des sols et des eaux souterraines. Cette activité est une oxydation cométabolique, et l'enzyme responsable est la méthane monooxygénase, peu spécifique de son substrat (Fox et al., 1990; Sullivan et al., 1998). Les capacités métaboliques des méthanotrophes varient d'une espèce à l'autre, et les composés cométabolisés sont : des alcanes halogénés, des hydrocarbures aromatiques halogénés, des alcanes à chaîne longue (au moins jusqu'à l'héxadécane), des alcènes, des hydrocarbures aromatiques et alicycliques, des composés phénolés, des alcools aliphatiques à chaîne longue et alicycliques, des composés polycycliques (Murrell et al., 1998). Les transformations sont parfois de simples oxydations analogues à la transformation du méthane en méthanol, tandis que dans d'autres cas, une oxydation supplémentaire des intermédiaires hydroxylés produit des aldéhydes et des acides carboxyliques (Murrell et al., 1998).

Les bactéries méthanotrophes forment un sous-groupe unique des méthylotrophes, capables d'utiliser le méthane comme seule source de carbone et d'énergie (Hanson et Hanson, 1996). Les méthylotrophes sont des bactéries aérobies qui utilisent comme source de carbone et d'énergie des composés à un seul carbone et plus réduits que l'acide formique (Hanson et Hanson, 1996; Whittenbury et Dalton, 1981).

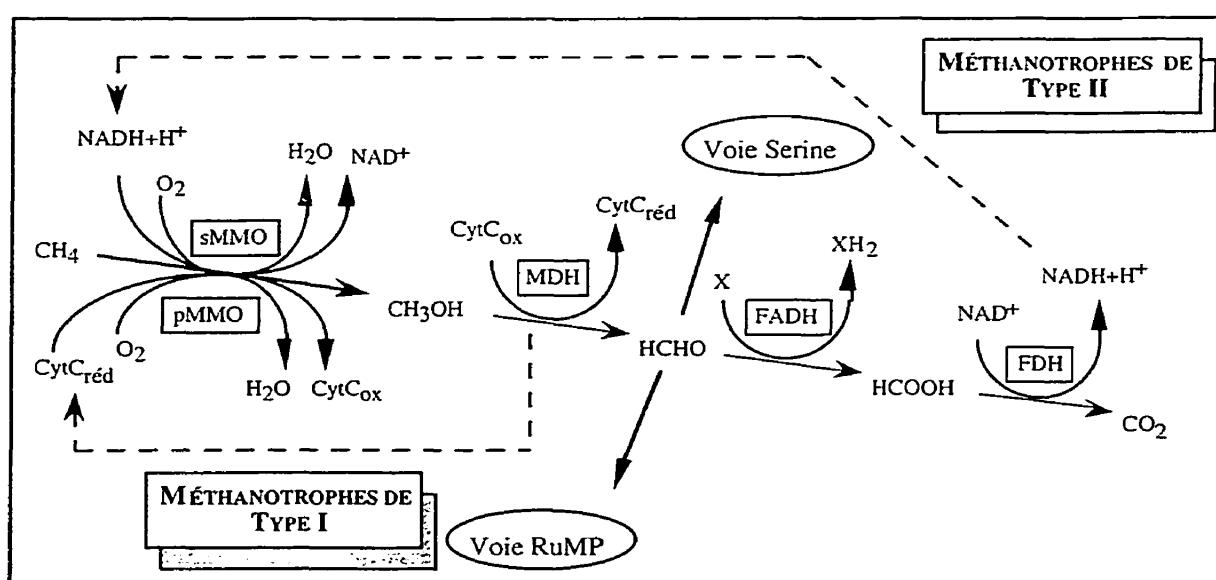
Les méthanotrophes sont des aérobies obligatoires Gram<sup>-</sup>, et sont pour la majorité des méthanotrophes obligatoires (Hanson et Hanson, 1996). La plupart des méthanotrophes forment des spores. En conditions d'excès de carbone (rapport C:N élevé), elles accumulent des polymères de stockage, du poly-β-hydroxybutyrate (PHB), jusqu'à plus de 20% du poids sec (Henrysson et McCarty, 1993; Shah et al, 1996). Un grand nombre

ont une activité nitrogénase et peuvent fixer l'azote moléculaire ( $N_2$ ) (Sullivan et al., 1998).

### Métabolisme du méthane, physiologie des méthanotrophes

Les méthane monoxygénases (MMO), enzymes responsables de l'oxydation du méthane en méthanol, sont typiques des méthanotrophes. La MMO existe sous une forme soluble (sMMO), présente dans le cytoplasme, et sous une forme dite particulaire (pMMO), liée à la membrane (Stanley et al., 1983; Sullivan et al., 1998).

La Figure 2.8 décrit les caractéristiques métaboliques communes aux méthanotrophes et met en évidence le rôle central du formaldéhyde en tant qu'intermédiaire dans le catabolisme et l'anabolisme. La principale forme de carbone assimilable est le formaldéhyde chez les méthylotrophes (Hanson et Hanson, 1996).



Abréviations:

sMMO et pMMO: méthanes monoxygénases soluble et particulaire; CytC: cytochrome C (CytC<sub>rédu</sub>: réduit; CytC<sub>ox</sub>: oxydé); MDH: méthanol déhydrogénase; FADH: formaldéhyde déhydrogénase; FDH: formate déhydrogénase; RuMP: ribulose monophosphate

Figure 2.8 - Voies d'oxydation du méthane et d'assimilation du formaldéhyde (adapté de Hanson et Hanson, 1996)

## Classification des méthanotrophes

Les méthanotrophes sont divisées en deux groupes distincts, le type I et le type II, définis selon des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques (Hanson et Hanson, 1996; Murrell et al., 1998) :

- la structure fine des membranes intracytoplasmiques, qui forment des amas intracytoplasmiques (type I) ou sont arrangées en périphérie de la cellule (type II);
- la voie d'assimilation du formaldéhyde, ribulose monophosphate (type I) ou serine (type II),
- les acides gras prédominants dans les phospholipides membranaires, à 16 carbones (type I) ou 18 carbones (type II);
- de plus, les méthanotrophes de type I sont des protéobactéries  $\gamma$  et les méthanotrophes de type II des protéobactéries  $\alpha$ .

Parmi les huit genres bactériens identifiés chez les méthanotrophes, six sont de type I et deux sont de type II (Tableau 2.8).

Un troisième groupe est défini par certains auteurs, le type X, à cause de *Methylococcus capsulatus* qui présente quelques caractéristiques du type I, mais se distingue par d'autres (Hanson et Hanson, 1996).

D'après la classification des méthanotrophes (Tableau 2.8), seules celles qui sont de type II expriment la sMMO. Les méthanotrophes possédant la sMMO n'ont aucun avantage évident, à part la capacité de croître en milieu pauvre en cuivre. Les méthanotrophes possédant la pMMO ont un meilleur rendement de croissance sur le méthane, et l'affinité pour le méthane et l'oxygène est supérieure (Hanson et Hanson, 1996). Le meilleur rendement de croissance avec la pMMO est dû sans doute au donneur d'électron, le cytochrome C, qui a un plus haut potentiel rédox que le NADH (Murrell et al., 1998; Sullivan et al., 1998).

Tableau 2.8 - Classification et caractérisation des méthanotrophes (Murrell et al., 1998)

Genre	Phylogénie	Membrane	PLFA A	Assimilation du formaldéhyde	Type de	Mol G+C
					MMO	dans ADN
<i>Methylomonas</i>	γ	Type I	16:1	RuMP	pMMO	51-59%
<i>Methylobacter</i>	γ	Type I	16:1	RuMP	pMMO	49-54%
<i>Methylomicrobium</i>	γ	Type I	16:1	RuMP	pMMO	50-60%
<i>Methylosphaera</i>	γ	Type I	16:1	RuMP	pMMO	43-46%
<i>Methylocaldum</i>	γ	Type I	16:1	RuMP/Serine	pMMO	56-58%
<i>Methylococcus</i>	γ	Type I	16:1	RuMP/Serine	pMMO/sMMO	59-66%
<i>Methylosinus</i>	α	Type II	18:1	Serine	pMMO/sMMO	62-63%
<i>Methylocystis</i>	α	Type II	18:1	Serine	pMMO/sMMO	62-63%

PLFA: acides gras des phospholipides - RuMP: ribulose monophosphate - sMMO/pMMO : méthanes monoxygénases soluble /particulaire;

### Structure et fonctionnement de la sMMO et de la pMMO

Les MMO les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les sMMO de *Methylococcus capsulatus* et de *Methylosinus trichosporium*. (Murrell et al., 1998).

La sMMO est peu spécifique de son substrat, et elle est capable de réaliser l'oxydation cométabolique de plusieurs autres substrats que le méthane, comme l'ammoniaque, le propylène, le TCE, le naphtalène, des alcanes, des alcènes et des hydrocarbures aromatiques (Hanson et Hanson, 1996; Murrell et al., 1998).

### Régulation de la synthèse de la sMMO et de la pMMO

La production de sMMO est observée durant la croissance de souches de *Methylosinus* et de *Methylococcus*, dans des milieux pauvres en cuivre. Une espèce de *Methylomonas* et une espèce de *Methylocystis* ont montré une production de sMMO (Murrell et al., 1998).

L'expression de la sMMO chez *Methylosinus* et *Methylococcus* est régulée au niveau de la transcription, par le cuivre disponible pour la croissance. Si le rapport cuivre/biomasse est faible, la synthèse de sMMO est réprimée et la synthèse de pMMO est induite. La pMMO est exprimée dans toutes les méthanotrophes connues, si la concentration du

cuivre est supérieure à 0.85-1 µmol/g cellule en poids sec (Hanson et Hanson, 1996). Le cuivre est nécessaire à sa synthèse et à son activité.

### Besoins de croissance, nutriments et inhibiteurs

Plusieurs nutriments et inhibiteurs ont des effets importants sur la croissance, sur la forme de MMO produite et sur l'activité méthanotrophique (Park et al., 1991; Stanley et al., 1983). De plus, leurs effets sont compliqués par leurs interactions. Les principaux nutriments et inhibiteurs sont présentés, afin de définir les conditions optimales de croissance et d'activité des méthanotrophes.

Le cuivre est un élément central de la production et de l'activité de la sMMO et de la pMMO (Murrell et al., 1998; Nielsen et al., 1997; Stanley et al., 1983). C'est un inhibiteur de l'expression et de l'activité de la sMMO, et un milieu pauvre en cuivre est nécessaire à la synthèse de la sMMO (Tableau 2.9). Le cuivre est en revanche un inducteur de l'expression de la pMMO, et il est requis pour l'activité enzymatique de la pMMO (Hanson et Hanson, 1996).

Tableau 2.9 - Valeurs seuil d'inhibition de la sMMO par le cuivre à travers la littérature

Culture	Cu <sup>2+</sup> (mg/L)	(µg/gVSS)	Référence bibliographique
-	0.127		Sullivan et al., 1998
-		56.6	Hanson et Hanson, 1996
<i>M. trichosporium</i> OB3b.	0.064		Park et al., 1991
<i>M. trichosporium</i> OB3b.	0.016	35.3-45.4	Tsien et al., 1989
<i>M. capsulatus</i> (Bath)	0.117	83.6	Stanley et al., 1983

Dans une culture mixte de méthanotrophes, le fer augmente nettement le taux maximal de consommation du méthane et le coefficient de rendement de croissance, qui est plus que doublé dans un milieu à 5.0 mgFe<sup>2+</sup>/L par rapport à un milieu sans fer (Boiesen et al., 1993). La sMMO et la pMMO contiennent du fer, et un manque de fer est sans doute un facteur limitant pour la synthèse des deux formes de MMO. Dans le cas d'une culture pure de *Methylosinus trichosporium* OB3b., une concentration de 4.47 mg/L de fer est recommandée en réacteur afin d'obtenir une croissance et une synthèse de sMMO optimales (Park et al., 1991).

Dans une culture mixte méthanotrophe, le remplacement du nitrate par de l'ammonium comme source d'azote augmente fortement le taux de consommation du méthane (Boiesen et al., 1993). L'explication possible est une consommation d'énergie inférieure pour assimiler l'ammonium par rapport au nitrate.

La même étude montre que la présence simultanée de cuivre ( $300 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ ) et d'ammonium ( $70 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ ) inhibe l'oxydation du méthane. La constante de saturation du méthane augmente avec la concentration en ammonium. L'inhibition est levée par l'ajout de fer. Cet exemple mettant en jeu trois espèces chimiques illustre la complexité des interactions entre les effets des nutriments.

L'ammoniaque est un inhibiteur faible de l'oxydation du méthane par la MMO, et en forte concentration, il diminue les taux de croissance des méthanotrophes. La relation avec le pH suggère que la forme ammoniaque  $\text{NH}_3$  et non l'ion ammonium  $\text{NH}_4^+$  serait responsable de l'inhibition (Bédard et Knowles, 1989; Hanson et Hanson, 1996). L'ammoniaque est oxydé par la MMO en nitrite en présence de méthane, et il s'agit d'une simple inhibition compétitive entre le méthane et l'ammoniaque pour la pMMO. L'effet de l'ammoniaque est plus complexe dans le cas d'une culture pauvre en cuivre (Sullivan et al., 1998). Le nitrite cause une inhibition plus permanente de l'oxydation du méthane par un mécanisme inconnu (Hanson et Hanson, 1996).

Dans une culture de *Methylosinus trichosporium* OB3b, la durée de la période de latence avant la phase exponentielle de croissance dépend de la concentration initiale de  $\text{CO}_2$  (Park et al., 1991). La période de latence est significativement diminuée par un apport initial de  $\text{CO}_2$  ou de  $\text{NaHCO}_3$ , en revanche le taux de croissance spécifique pendant la phase exponentielle n'est pas changé par l'apport de  $\text{CO}_2$ . Le besoin en  $\text{CO}_2$  serait dû à la voie d'assimilation du carbone par la serine, où une molécule de  $\text{CO}_2$  est nécessaire à l'assimilation de deux molécules de formaldéhyde. Lorsque la densité cellulaire est suffisante, la production de  $\text{CO}_2$  par le métabolisme couvre les besoins. L'apport de  $\text{CO}_2$  ou de bicarbonate est donc important au démarrage d'un réacteur, et plus particulièrement en cas d'aération par bullage dans le liquide, car le  $\text{CO}_2$  est alors dégazé.

Les caractéristiques cinétiques des méthanotrophes sont donc de façon certaine modifiées par certains nutriments, en particulier le fer et l'ammoniaque. Le cuivre est un élément

central de la production et de l'expression de la sMMO et de la pMMO. La concentration des éléments précédents dans un réacteur doit être contrôlée et ajustée à une valeur optimale pour l'efficacité du procédé.

#### 2.4.2.2 Écologie

Les méthanotrophes sont ubiquitaires, et elles ont été isolées à partir d'environnements variés, comme des sols, des sédiments, de l'eau douce, de l'eau de mer, des tourbières acides, des lacs salés, des sources chaudes, et des milieux froids (Murrell et al., 1998).

Elles sont généralement présentes à l'interface des zones oxique et anoxique, car elles utilisent l'ammonium et le méthane, produits de la dégradation anaérobiose de la matière organique (Hrsak et Begonja, 1998). Elles ont un rôle significatif dans le cycle du carbone.

Les interactions écologiques entre les méthanotrophes et les bactéries nitrifiantes, oxydant l'ammoniaque, sont encore mal comprises.

#### Température et pH

La plupart des méthanotrophes connues sont mésophiles en cultures pures, bien que *Methylococcus capsulatus* Bath et des souches parentes croissent à des températures supérieures à 50°C (Hanson et Hanson, 1996). Dans la nature, les populations méthanotrophes sont adaptées à diverses températures, et si dans la plupart des sols tourbeux la température optimale d'oxydation du méthane est 25°C, l'oxydation du méthane se produit encore entre 0 et 10°C.

Le pH optimal de croissance est généralement proche de 7, même s'il est un peu plus bas pour les populations originaires de sols acides, démontrant une adaptation modérée aux environnements acides (Hanson et Hanson, 1996). Lors de l'étude des conditions de cultures de *Methylosinus trichosporium* OB3b afin d'optimiser la production de sMMO, il a été montré qu'au-dessus d'un pH de 7.5, une phase de latence était observée et le taux de croissance diminuait (Park et al., 1991).

## **Distribution des populations méthanotrophes et conditions de milieu**

Dans les environnements où les formes combinées d'azote sont limitantes, les méthanotrophes de type II prédominent, dont certaines sont capables de fixer l'azote moléculaire ( $N_2$ ) (Hanson et Hanson, 1996).

Il existe des interactions complexes entre méthanotrophes et hétérotrophes aérobies. Exemple de capacité supérieure de dégradation d'un contaminant, le 2-[4-(sulphophényl)]décane, lors de la croissance sur méthane d'une association méthanotrophes-hétérotrophes, par rapport à dégradation par un seul type de population (Hrsak et Begonja, 1998).

### **2.4.3 Biodégradation des éthènes chlorés en conditions aérobies**

#### **2.4.3.1 Biodégradation par les hétérotrophes aérobies**

Le CV est minéralisé en  $CO_2$  par des bactéries aérobies capables de croître sur le CV comme seule source de carbone et d'énergie (Hartmans et al., 1985).

La minéralisation du DCE en conditions aérobies a été rapportée dans plusieurs cas en l'absence de toute autre source de carbone détectable (Bradley, 2000). Mais, la croissance d'une culture mixte dans un milieu minimum sur le DCE comme seule source de carbone n'a pas été observée (Bradley et Chapelle, 2000). La minéralisation par le métabolisme microbien en  $CO_2$  de 1,2-DCE a été montrée dans l'étude citée, mais la croissance n'a pas été observée (Bradley et Chapelle, 2000).

L'utilisation des éthènes chlorés autres que le CV comme source de carbone et d'énergie n'a pas encore été rapportée en conditions aérobies.

#### **2.4.3.2 Les oxygénases, enzymes de l'oxydation cométabolique du TCE**

Les oxygénases ou hydroxylases sont des enzymes qui catalysent l'incorporation directe du dioxygène ( $O_2$ ) dans des composés organiques (Funabiki, 1997). Les oxygénases jouent un rôle important dans le catabolisme microbien, car elles participent à de nombreuses voies métaboliques (Harayama et al., 1992). Elles initient la dégradation des composés aromatiques et celle des alcanes.

Plusieurs oxygénases sont capables de réaliser l'oxydation cométabolique du TCE, mais la sMMO présente des vitesses de dégradation du TCE supérieures aux autres oxygénases. L'oxydation cométabolique du TCE par les oxygénases suivantes a été observée : la méthane monooxygénase particulière (DiSpirito et al., 1992), la toluène dioxygénase (Wackett et Gibson, 1988), la toluène monooxygénase (Chauhan et al., 1998), l'ammoniaque monooxygénase (Arciero et al., 1989), la propane monooxygénase (Wackett et al., 1989), la propène monooxygénase (Ensign et al., 1992), l'isoprène monooxygénase (Ewers et al., 1990), la monooxygénase du cytochrome P-450 chez les Mammifères (Miller et Guengerich, 1982).

Il est admis que les vitesses maximales de dégradation du TCE ont été obtenues avec la sMMO, notamment chez *Methylosinus trichosporium* OB3b (Dolfing et al., 1993). De plus, la capacité de transformation du TCE par des cultures mixtes (quantité maximale du composé dégradée par unité de masse de biomasse) est plus élevée dans des cultures méthanotrophes que dans des cultures mixtes enrichies sur du propane, du phénol ou du toluène (Chang et Alvarez-Cohen, 1995b).

La méthane monooxygénase soluble est donc l'enzyme la plus prometteuse a priori pour de bonnes performances de dégradation du TCE.

#### **2.4.3.3 L'oxydation cométabolique par la sMMO des méthanotrophes**

La dégradation par des méthanotrophes de tous les éthènes chlorés a été observée, sauf pour le PCE (Tableau 2.10). La pMMO oxyde généralement le TCE et le c-DCE à des taux bien plus bas que ceux de la sMMO, en revanche les taux d'oxydation du t-DCE sont similaires, et certains résultats montrent même des capacités de transformation du t-DCE et du CV qui sont plus de 20 fois supérieures à celles des cellules exprimant la sMMO (Anderson et McCarty, 1997).

Tableau 2.10 - Activité de biodégradation des éthènes chlorés par des méthanolotrophes

Culture	sMMO /pMM O	TCE	c-DCE	t-DCE	1,1-DCE	CV	Réf. biblio.
<i>M. trichosporium</i> OB3b	sMMO	100%	100%	100%	40%		[1] Oldenhuis, 1989
<i>M. trichosporium</i> OB3b	pMMO		100%	56%	19%		[2] Tsien, 1989
<i>M. trichosporium</i> OB3b	sMMO	56%	100%	30%	42%	100%	
<i>M. trichosporium</i> OB3b	sMMO	✓	✓	✓	✓	✓	[3] Fox et al., 1990
Culture mixte méthanolotrophe	pMMO	0.0019	0.0580	0.5700	0.0002	0.2000	[4] Anderson et McCarty, 1997

[1] bouteilles sérologiques, avec une concentration initiale de substrat chloré de 200 µM, mesures après une incubation de 24h

[2] bouteilles sérologiques, avec des cellules au repos et pour une concentration initiale de substrat chloré de 20 µM, pourcentage de dégradation après 1 heure

[3] essais enzymatiques avec sMMO purifiée de *M. trichosporium* OB3b

[4] bouteilles sérologiques, capacités de transformation maximales observées (mol composé/mol CH<sub>4</sub>)

Pour l'époxyde du TCE, différentes voies métaboliques sont proposées (Chaudhry et Chapalamadugu, 1991; Dolfing et al., 1993; Little et al., 1988; Nakajima et al., 1992; Vogel et al., 1987). Les principaux produits identifiés par les auteurs précédents sont l'acide dichloroacétique (CCl<sub>2</sub>H-COOH), l'acide glyoxylique (COOH-COH), l'acide formique (HCOOH) et le monoxyde de carbone (CO). La formation des produits précédents dépend du pH.

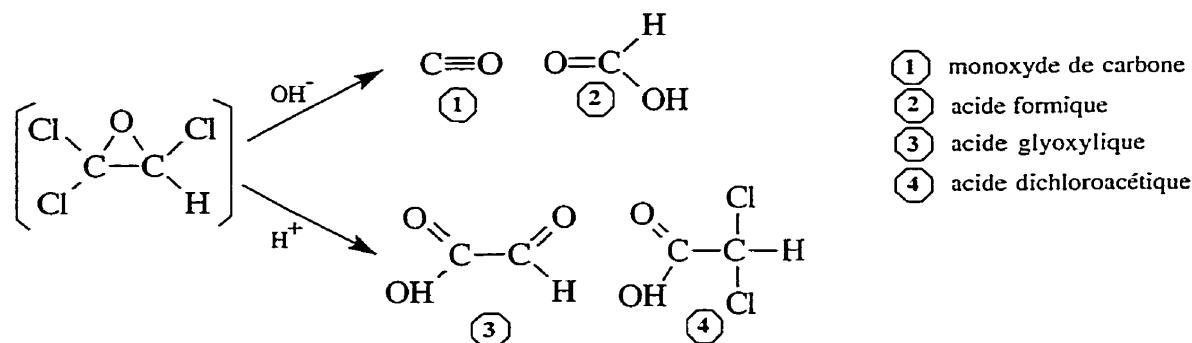


Figure 2.9 - Transformations spontanées de l'époxyde du TCE selon le pH (adapté de Vogel et al., 1987)

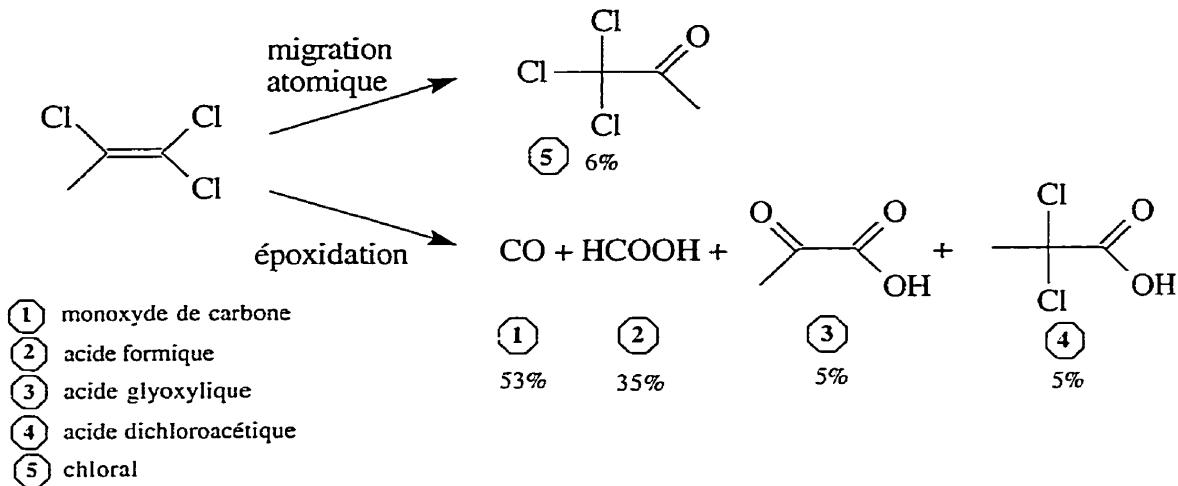


Figure 2.10 - Produits majoritaires et mécanismes de l'oxydation du TCE par *Methylosinus trichosporium* OB3b (adapté de Fox et al., 1990)

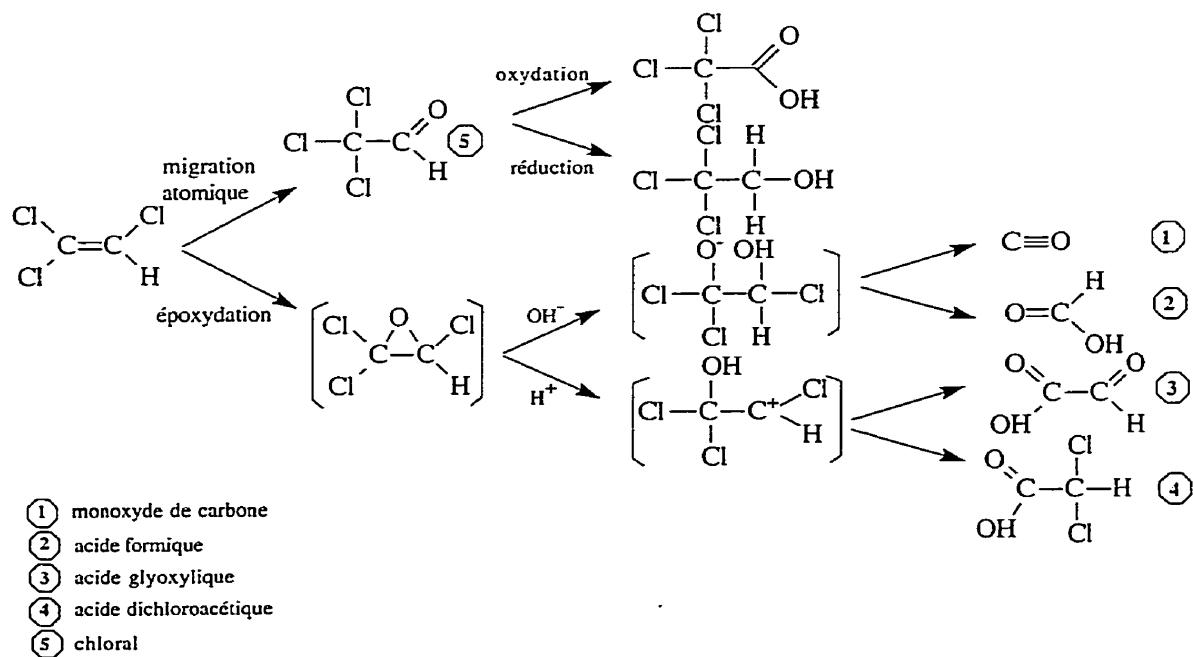


Figure 2.11 - Biochimie de l'oxydation du TCE par la souche M (Nakajima et al., 1992)

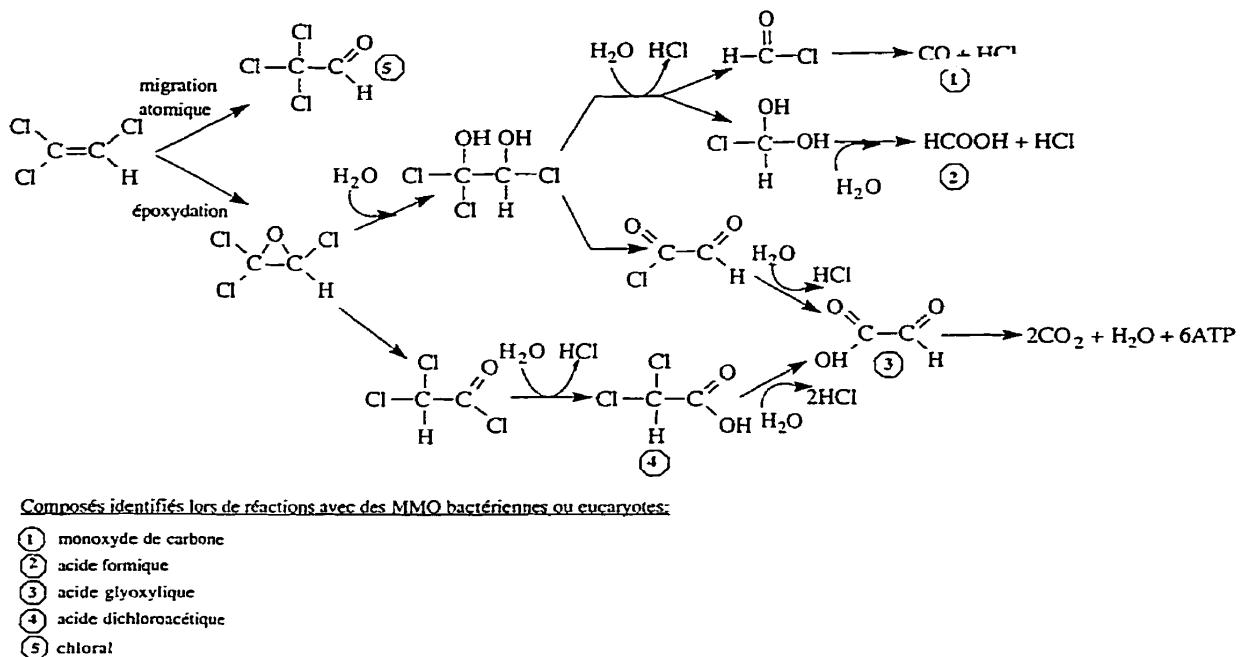


Figure 2.12 - Composés identifiés lors de l'oxydation cométabolique du TCE par des MMO bactériennes ou eucaryotes (adapté de Dolfing et al., 1993)

Un site internet de l'université du Minnesota propose différentes voies métaboliques, pour la sMMO, la toluène dioxygénase et la toluène 2-monooxygénase (<http://www.labmed.umn.edu/umbbd/tce>, Whittaker et al., 2000). Dans le cas de la sMMO, les quatre produits de dégradation de l'époxyde du TCE sont les mêmes que ceux proposés par les auteurs précédents (Annexe 5).

### Importance du mode d'apport de la charge organique

La structure de la communauté microbienne dans un réacteur est fortement influencée par le mode d'apport de la charge organique (Bailey et Ollis, 1986; Edeline, 1994). La sélection des populations microbiennes par le niveau de charge organique et l'oxygénéation est un problème classique dans les système de traitement biologique des eaux usées (Metcalf et Eddy, 1991). Une alimentation en continu maintient dans le système une concentration de substrat constante, et basse. L'avantage sélectif est alors donné aux populations qui ont une forte affinité pour le substrat dans les faibles concentrations. Un apport périodique de substrat entraîne des augmentations brutales de la concentration du

substrat, éliminant les populations incapables de supporter des fortes concentrations. Dans le cas d'une alimentation discontinue, les plus performants sont ceux qui ont de fort taux de consommation du substrat aux fortes charges. Les deux modes d'alimentation sélectionnent donc des populations aux aptitudes très différentes, en ce qui concerne le substrat de croissance (Edeline, 1994). Dans le cas d'un composé toxique cométabolisé, le mode d'apport va également sélectionner des populations différentes.

Lors de la dégradation cométabolique du TCE par des cultures enrichies sur du phénol comme substrat carboné, le mode d'apport du substrat de croissance et du TCE a un effet déterminant sur la structure des populations microbiennes d'un réacteur (Shih et al., 1996). La structure des communautés microbiennes sélectionnées et l'activité de dégradation du TCE dans des réacteurs opérés dans les mêmes conditions à part le mode d'alimentation sont très différentes (Shih et al., 1996). En cas d'alimentation continue, les champignons dominent, les filamenteuses et les prédateurs sont plus abondants, les fluctuations du contenu en biomasse sont plus importantes, et la capacité de transformation du TCE est diminuée. L'alimentation discontinue élimine des populations sensibles aux fortes concentrations du contaminant toxique. Elle favorise une plus grande diversité des populations microbiennes et diminue les filamenteuses et les rotifères prédateurs des bactéries. Le nombre de populations isolées capables d'utiliser le phénol et le TCE dépend du mode d'alimentation, et le classement dans l'ordre croissant est : alimentation continue, semi-continue puis périodique (Shih et al., 1991).

Dans le cas des méthanotrophes, une alimentation discontinue est également un moyen de contrôle de l'inhibition compétitive entre le méthane et le TCE pour la sMMO.

## 2.5 Couplage des métabolismes anaérobies et aérobies

### 2.5.1 Présentation, principes de fonctionnement

Dans un système couplé anaérobiose/aérobiose, la charge organique est dégradée en anaérobiose et en aérobiose. Le taux d'oxygénéation et la charge organique déterminent la part de chacun des deux métabolismes.

Le couplage des métabolismes anaérobies et aérobies dépend du rendement d'oxydation du substrat, défini comme le rapport entre l'oxygène consommé ( $\text{g O}_2/\text{L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ ) et la

charge organique enlevée ( $\text{g DCO/L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ ). Les hétérotrophes aérobies sont beaucoup plus performantes que les autres populations microbienne, il est donc raisonnable de considérer que tout l'oxygène transféré est consommé tant qu'un substrat carboné utilisable par les aérobies est disponible. Selon le taux de dégradation attendu du substrat fourni, il est ensuite possible de déterminer la valeur de consigne du rapport (oxygène transféré)/(charge organique) selon l'objectif de couplage.

Pour conserver les anaérobies strictes dans un système couplé, il est impératif d'éviter une suroxygénéation, car l'inhibition est irréversible. L'oxygène transféré doit être en totalité consommé par le métabolisme aérobie. Pour éviter la suroxygénéation, la valeur seuil théorique du rapport (oxygène transféré)/(charge organique) est 1, si le taux de consommation de l'oxygène transféré et le taux d'enlèvement de la charge organique sont de 100%. Il est recommandé d'appliquer un coefficient de sécurité tenant compte des variations du taux de transfert de l'oxygène et du taux d'enlèvement de la charge organique.

### **2.5.2 Stoechiométrie de la transformation du substrat dans un système couplé**

La stoechiométrie de la transformation du substrat est un paramètre de conception du système, notamment de dimensionnement d'un réacteur (Cookson, 1995). Elle permet de définir les conditions opératoires souhaitées, et de faire un suivi de fonctionnement raisonné, pour un contrôle optimal des procédés, le couplage notamment (Bailey et Ollis, 1986). Elle permet également d'interpréter les résultats de performance et de dégradation du substrat (Cookson, 1995).

Toute variation du taux d'oxygénéation ou de la charge organique ont un effet sur la production de gaz, que l'on peut prédire de façon théorique, à l'aide de la stoechiométrie de dégradation du substrat (Cookson, 1995).

Le suivi du système, dans un état stationnaire et lors de changements du taux d'oxygénéation ou de la charge organique, permet de voir si la stoechiométrie de réaction est correctement définie. Toute perturbation ensuite, lors de l'ajout d'un contaminant毒ique par exemple, permettra d'évaluer les modifications du système entraînées, en fonction du respect ou non de la stoechiométrie établie.

Il peut être éventuellement nécessaire d'écrire une nouvelle stoechiométrie mettant en jeu le(s) nouveau(x) processus dû(dus) à l'ajout du contaminant. La stoechiométrie permet de calculer les flux d'électrons et l'allocation des équivalents réducteurs à la synthèse cellulaire, et à la dégradation d'un contaminant toxique donné (Chang et Criddle, 1997). Dans certains cas, il est utile de prendre en compte l'inhibition due au contaminant ou à un(des) métabolite(s).

Dans le cas de la déchloration réductrice par exemple, l'hydrogène ( $H_2$ ) est le donneur d'électron central, et selon les conditions, il faut intégrer dans la stoechiométrie les interactions entre les déchlorateurs réducteurs et les autres populations hydrogénotrophes. Il s'agit de représenter ici la compétition pour un donneur d'électron commun, et de quantifier la part de chaque compétiteur, en ce qui concerne les équivalents réducteurs.

Si le comportement du système et la stoechiométrie sont en accord, la description globale des processus microbiens est satisfaisante. Dans le cas contraire où la stoechiométrie écrite ne permet pas de décrire le comportement du système, cela signifie qu'un (que des) processus important(s) du système n'a(ont) pas été(s) inclus dans la stoechiométrie.

La stoechiométrie présentée ici utilise la méthode proposée par McCarty (1987) pour écrire les réactions de transfert d'électrons. La réaction globale d'un métabolisme donné est appelée R et elle est obtenue en combinant trois équations de réactions d'oxydo-réduction :

- Rd : la demi-équation du donneur d'électrons,
- Ra : la demi-équation de réaction de l'accepteur d'électron, l'oxygène en aérobie, puis ensuite les principaux accepteurs d'électrons en ordre décroissant de potentiel redox sont le nitrate ( $NO_3^-$ ), le sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) et le  $CO_2$ ,
- Rs : l'équation de la réaction de synthèse cellulaire, à partir des nutriments fournis, la source d'azote étant  $NH_3$  ou  $NO_3^-$ .

L'équation globale de la réaction de consommation du substrat s'écrit alors :

$$R = Rd + fe.Ra + fs.Rs$$

[Éq. 2.8]

où : fe : fraction du substrat organique oxydée pour fournir de l'énergie,

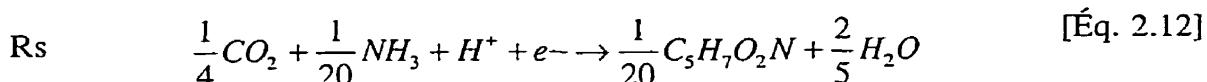
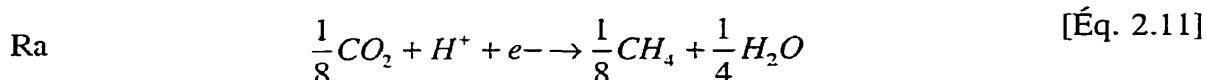
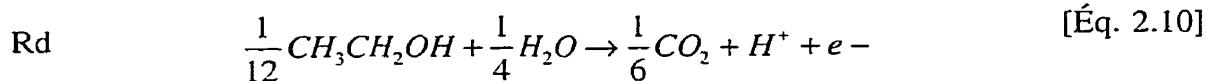
fs : fraction allouée à la synthèse cellulaire

$$fe + fs = 1 \quad [\text{Eq. 2.9}]$$

La stoechiométrie est écrite pour un système couplé anaérobie/aérobie où le substrat carboné est l'éthanol, et en tenant compte de cinq grands métabolismes d'intérêt dans le système. Les métabolismes considérés sont 1) la croissance en conditions méthanogènes, 2) la croissance en conditions sulfato-réductrices, 3) la croissance hétérotrophe aérobie, 4) la croissance méthanotrophe, et 5) le cométabolisme du TCE par les méthanotrophes.

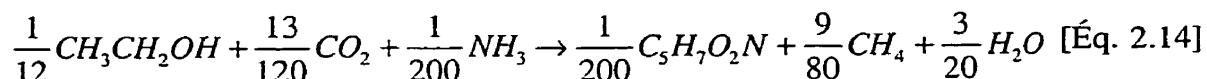
La formule chimique brute utilisée pour représenter la biomasse est  $C_5H_7O_2N$  (Bailey et Ollis, 1986). La source d'azote pour la synthèse cellulaire est l'ammoniaque, car le bicarbonate d'ammonium ( $NH_4HCO_3$ ) a été utilisé dans le système étudié comme source d'azote.

### 2.5.2.1 Croissance sur l'éthanol en conditions méthanogènes

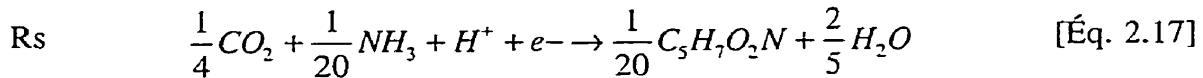
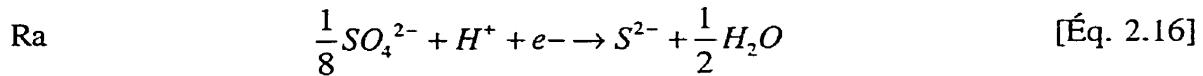
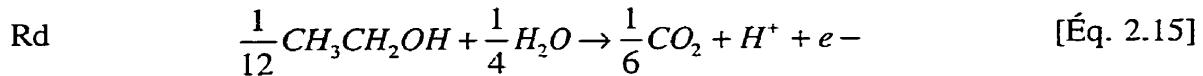


$$fs = \frac{1}{10} \quad [\text{Eq. 2.13}]$$

L'équation globale de l'oxydation de l'éthanol et de la synthèse cellulaire en conditions méthanogènes s'écrit :

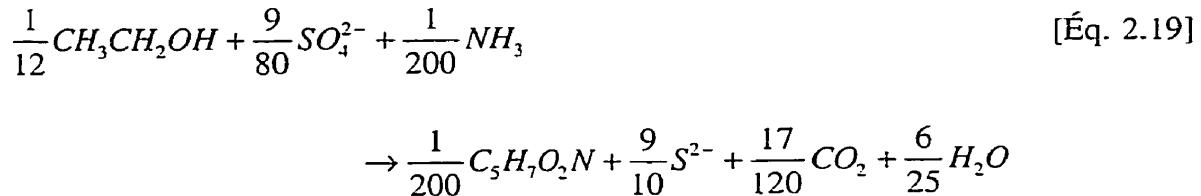


### 2.5.2.2 Croissance sur l'éthanol en conditions sulfato-réductrices

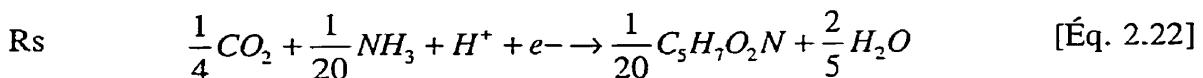
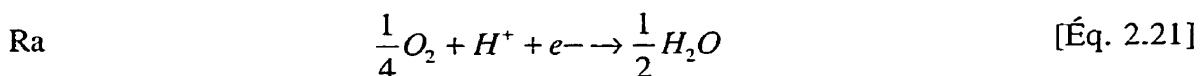
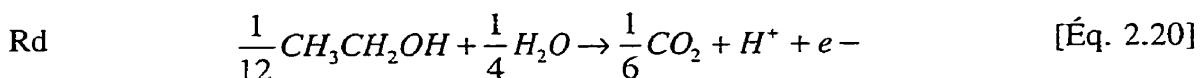


$$fs = \frac{1}{10}$$
      [Éq. 2.18]

L'équation globale de l'oxydation de l'éthanol et de la synthèse cellulaire en conditions sulfato-réductrices s'écrit :

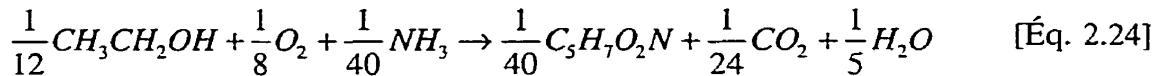


### 2.5.2.3 Croissance sur l'éthanol en conditions hétérotrophes aérobies

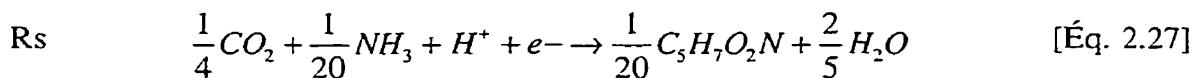
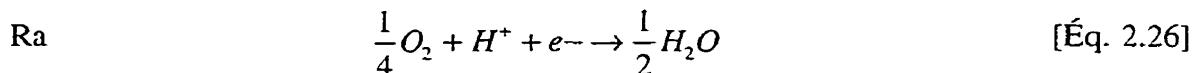
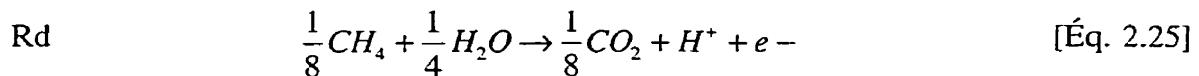


$$fs = \frac{1}{2}$$
      [Éq. 2.23]

L'équation globale de l'oxydation de l'éthanol et de la synthèse cellulaire en conditions aérobies hétérotrophes s'écrit :

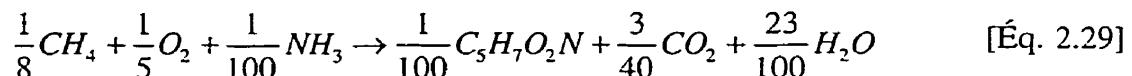


#### 2.5.2.4 Croissance méthanotrophe

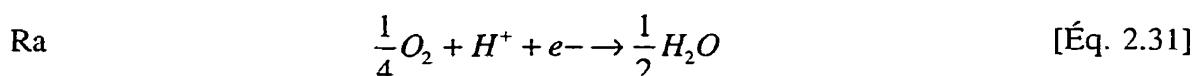
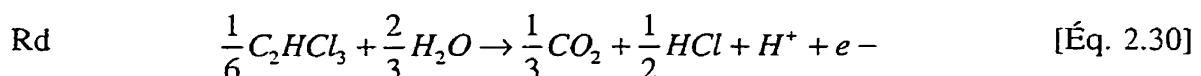


$$fs = \frac{1}{5} \quad [\text{Éq. 2.28}]$$

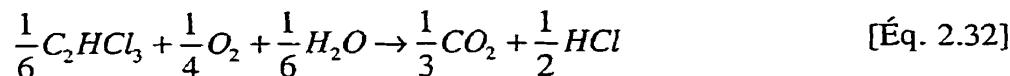
Notons que la valeur choisie de  $fs$  est arbitraire, elle est choisie plus basse que des hétérotrophes aérobies pour tenir compte du fait que les méthanotrophes sont moins efficaces que les hétérotrophes aérobies, et qu'elles ont des temps de doublement relativement longs pour des aérobies, de 12 à 24 h (Hanson et Hanson, 1996). L'équation globale de l'oxydation du méthane et de la synthèse cellulaire en conditions méthanotrophes s'écrit :



#### 2.5.2.5 Dégradation cométabolique du TCE en conditions méthanotrophes



L'équation globale de l'oxydation cométabolique du TCE en conditions méthanotrophes s'écrit :



### 2.5.3 Représentation matricielle des processus microbiens

Une représentation matricielle simplifiée des processus biologique est proposée, en utilisant la méthode de Henze (1987). La représentation matricielle va donner une vue d'ensemble des composantes (Tableau 2.11) et des processus microbiens (Tableau 2.12) du système.

Les composantes ou variables d'état (Tableau 2.11) sont les composés en solution ou particulaires présents et considérés comme significatifs dans le système. Les processus microbiens représentés (Tableau 2.12) sont de la même façon les processus considérés comme importants dans le système et significatifs.

Tableau 2.11 - Composantes ou variables d'état de la représentation matricielle

i	Symbol	Description
1	$S_{EtOH}$	EtOH en solution
2	$S_{Ac}$	Ac <sup>-</sup> en solution
3	$S_{Pr}$	Pr <sup>-</sup> en solution
4	$S_{CH4}$	CH <sub>4</sub> en solution
5	$S_{CO2}$	CO <sub>2</sub> en solution
6	$S_{SO4}$	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> en solution
7	$S_{H2}$	H <sub>2</sub> en solution
8	$S_{O2}$	O <sub>2</sub> en solution
9	$S_{TCE}$	TCE en solution
10	$S_{DCE}$	c-DCE, t-DCE, 1,1-DCE en solution
11	$S_{ETH}$	Éthane en solution
12	$S_{CV}$	CV en solution
13	$X_H$	Hétérotrophes
14	$X_{MAC}$	Méthanogènes acétolactases
15	$X_{MH2}$	Méthanogènes hydrogénotrophes
16	$X_{SR}$	Sulfato-réductrices
17	$X_{MMO}$	Méthanotrophes

Tableau 2.12 - Processus biologiques de la représentation matricielle

j	Nom	Description
1	Croissance hétérotrophe aérobie sur l'éthanol	
2	Croissance méthanogène sur l'acétate	
3	Croissance méthanogène autotrophe (sur CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> )	
4	Croissance des sulfato-réductrices sur EtOH	
5	Croissance aérobie sur le méthane (méthanotrophes)	
6	Déchloration réductrice du TCE en DCE	
7	Déchloration réductrice du DCE en VC	
8	Déchloration réductrice du VC en ETH en DCE	
9	Oxydation cométabolique du TCE	
10	Oxydation cométabolique du DCE	
11	Croissance aérobie sur le VC	
12	Décomposition des hétérotrophes	
13	Décomposition des méthanogènes acétoclastes	
14	Décomposition des méthanogènes autotrophes	
15	Décomposition des sulfato-réductrices	
16	Décomposition des méthanotrophes	

Pour chaque composé, les processus consommateurs ou producteurs sont identifiés, et les interactions entre les processus comme la compétition pour un composé ou la toxicité d'un composé par rapport à un processus sont identifiés.

La matrice écrite est une première étape, avant l'écriture complète avec les coefficients cinétiques et les coefficients stoechiométriques correspondants. La matrice est présentée en deux parties dans le Tableau 2.13. La seconde partie de la matrice donne les fonctions de saturation et d'inhibition qui vont jouer sur les taux de réaction des processus biologiques.

Les fonctions de saturation sont des fonctions de Monod et elles sont notées M<sub>S</sub>, pour un substrat S donné :

$$M_S = \frac{S}{K_S + S} \quad [\text{Éq. 2.33}]$$

où :

- $S$  : concentration du substrat (g DCO/L)
- $K_S$  : constante de saturation ou de demi-vitesse (g DCO/L)

Chaque fonction de saturation donne l'expression par laquelle il faut multiplier le taux de réaction du processus microbien auquel elle s'applique.

Par exemple, dans le cas de la croissance hétérotrophe aérobie sur l'éthanol, une fonction de saturation due à l'éthanol en solution ( $S_{EOH}$ ) s'applique au taux de croissance :

$$M_{S_{EOH}} = \frac{S_{EOH}}{K_{S_{EOH}} + S_{EOH}} \quad [\text{Éq. 2.34}]$$

Les fonctions d'inhibition sont des fonctions de Monod et elles sont notées  $I_S$ , pour un substrat  $S$  donné :

$$I_I = \frac{K_I}{K_I + I} \quad [\text{Éq. 2.35}]$$

où :

- $I$  : concentration de l'inhibiteur (g DCO/L)
- $K_I$  : constante de demi-saturation de l'inhibiteur (g DCO/L)

Comme pour une fonction de saturation, une fonction d'inhibition donne l'expression par laquelle le taux de réaction du processus microbien considéré doit être multiplié.

Par exemple, dans le cas de la croissance méthanogène, sur acétate ou sur  $\text{CO}_2/\text{H}_2$ , une fonction de saturation due à l'oxygène dissous ( $S_{O_2}$ ) s'applique au taux de croissance des méthano-gènes :

$$I_{S_{O_2}} = \frac{K_{S_{O_2}}}{K_{S_{O_2}} + S_{O_2}} \quad [\text{Éq. 2.36}]$$

Dans la suite, pour tenir compte des phénomènes d'inhibition compétitive entre deux substrats,  $S_1$  et  $S_2$ , la fonction d'inhibition proposée est exprimée en fonction du rapport des deux composantes. L'inhibition compétitive de 2 par rapport à 1 est représentée par l'expression de l'équation [Éq. 2.35] mais en utilisant le rapport  $S_2/S_1$ .

Des fonctions d'inactivation sont introduites, pour tenir compte de la toxicité du TCE et de la capacité de transformation définie par Alvarez-Cohen et McCarty (1991). Dans une première étape, il est choisi de leur attribuer une expression du type Monod, en utilisant le rapport entre le substrat cométabolisé en solution (par exemple  $S_{TCE}$ ) et la concentration en biomasse (par exemple  $X_{MMO}$ ). La fonction a exactement la même expression que la fonction d'inhibition définie [Éq. 2.36], et l'inactivation de la croissance méthanotrophe par le TCE s'écrit :

$$I_{S_{TCE}} = \frac{K_{S_{TCE}}}{K_{S_{TCE}} + \frac{S_{TCE}}{X_{MMO}}} \quad [\text{Éq. 2.37}]$$

Ceci est un première approximation, et dans la suite, il sera probablement nécessaire de définir des fonctions d'inactivation à partir des expressions déjà proposées dans les modèles cinétiques de dégradation cométabolique du TCE (Chang et Alvarez-Cohen, 1995; Chang et Criddle, 1997).

Tableau 2.13 - Représentation matricielle du système couplé de dégradation du TCE :  
stoechiométrie et cinétique des processus

		Composantes ou variables d'état (S: solubles, P: particulaires)																
		1 S <sub>EtOH</sub>	2 S <sub>Ac</sub>	3 S <sub>Pr</sub>	4 S <sub>CH4</sub>	5 S <sub>CO2</sub>	6 S <sub>SO4</sub>	7 S <sub>H2</sub>	8 S <sub>SO2</sub>	9 S <sub>TCE</sub>	10 S <sub>DCE</sub>	11 S <sub>VC</sub>	12 S <sub>ETH</sub>	13 X <sub>H</sub>	14 X <sub>MA</sub>	15 X <sub>MH</sub>	16 X <sub>SR</sub>	17 X <sub>MMO</sub>
<b>Processus biologiques</b>																		
1	Croiss. hét. aéro EtOH	-				+		-							+			
2	Crois. CH4gène Ac		-		+											+		
3	Crois. CH4gène CO2/H2			+	-	-										+		
4	Crois. SR sur EtOH	-				-											+	
5	Crois. aérobie su CH4			-	+		-											+
6	Déchl. réd. TCE- DCE						-		-	+								
7	Déchl. réd. DCE - VC										-	+						
8	Déchl. réd. VC- ETH											-	+					
9	Cométab. TCE MMO							-	-									
10	Cométab. DCE MMO							-	-									
11	Crois. aérobie su VC				+		-			-				+				
12	Déc. hét. aérobies														-			
13	Déc. CH4gènes Ac															-		
14	Déc. des CH4gèn CO2/H2															-		
15	Déc. SR															-		
16	Déc. CH4trophes																-	

Symboles utilisés dans la matrice :

+ = production du composé par le processus biologique

- = consommation du composé par le processus biologique

## CHAPITRE III

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre décrit les méthodologies utilisées afin d'atteindre les objectifs fixés. La première partie décrit le dispositif expérimental principal, soit le réacteur et les méthodes d'analyses utilisées. La deuxième partie présente les tests de caractérisation de l'activité microbienne.

#### 3.1 Le réacteur couplé

##### 3.1.1 Description du dispositif expérimental

L'expérience a été réalisée avec un réacteur de type UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor”) auquel a été ajouté un système d'aération pour avoir un réacteur couplé anaérobie / aérobiose.

Le réacteur UASB consistait en une colonne de verre de 10 cm de diamètre interne, d'une hauteur de 160 cm avec une partie de forme conique en bas du réacteur. Une zone de faible vitesse ascensionnelle commençant à 121 cm de hauteur consistait en une zone élargie de diamètre interne de 20 cm, avec des parois en pente sur lesquelles sédimentent les particules (Figure 3.1).

Dans le cône d'entrée du bas, des billes de verre de 6 mm de diamètre ont été placées pour homogénéiser le flux d'entrée et minimiser la formation des chemins préférentiels dans le lit de biomasse.

Huit ports d'échantillonnage de la biomasse étaient distribués sur la hauteur du réacteur, en-dessous de la zone élargie. Dans la zone élargie se trouvaient un port d'élimination de l'effluent à 144 cm de hauteur, et un port de recirculation à 143 cm de hauteur connecté aux colonnes d'aération.

Les deux colonnes d'aération étaient en verre de diamètre interne de 5 cm, et d'une longueur de 60 cm. L'air était apporté par un diffuseur en pierre ponce placé à l'extrémité d'un tube de verre prolongeant le bouchon en verre. La sortie des gaz se faisait par un

port sur le côté en haut de la colonne, et un autre port, à 50 cm de hauteur servait d'entrée au liquide recirculé.

Le volume utile du réacteur en lui-même était de 15.5 L et les colonnes d'aération et la recirculation avaient un volume utile de 1.2 L.

Une pompe Masterflex (Cole Palmer) à vitesse variable (1-100 rpm) équipée de trois têtes de pompe de taille 18 assurait un débit de recirculation de 400 L/d en moyenne. La vitesse ascensionnelle correspondante dans le réacteur est de 2.2 m/h. Le tampon contenant les nutriments étaient dans un bidon de 200 L, dans une chambre froide maintenue à 4°C, et l'alimentation en tampon à un débit de 16.7 L/d était assurée par une pompe péristaltique Masterflex (Cole Palmer) tournant à 6 rpm et équipée d'une tête de pompe de taille 17. Le branchement de la pompe à une minuterie assurait des cycles de fonctionnement de la pompe de 165 secondes par 5 minutes. Le mélange éthanol-TCE était apporté par une pompe (modèle 22, Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts), équipée avec deux seringues en verre étanches et avec un piston recouvert de téflon à son extrémité (modèle 1010 TLL, Hamilton Company, Reno, Nevada). Le débit d'aération de 60 L<sub>air</sub>/d en moyenne était fourni par une pompe Masterflex (Cole Palmer) à vitesse variable (1-100 rpm) équipée de deux têtes de pompe de taille 18. Le débit d'aération a été augmenté à 120 L<sub>air</sub>/d lorsque la charge en TCE était à son maximum.

Les deux lignes de gaz, en sortie du réacteur et des colonnes d'aération, étaient branchées à deux erlenmeyers contenant de l'eau acidifiée dans laquelle bullait le biogaz. Deux gazmètres étaient ensuite connectés aux erlenmeyers pour mesurer la production de gaz. Ces deux gazmètres ont été conçus au laboratoire, et agréés par Agriculture Canada (Agriculture Canada, Ottawa, Ontario).

Toutes les lignes de raccord étaient en viton ou en verre afin de minimiser les pertes par adsorption.

Le schéma du montage (Figure 3.1) montre que la recirculation avec trois têtes de pompe permettait d'apporter le substrat par le bas uniquement, tandis que le flux de liquide oxygéné était apporté à trois niveaux. Ce dispositif crée des zones successives caractérisées par un substrat carboné majoritaire en présence ou non d'oxygène. Chaque zone offre alors un avantage sélectif à un groupe trophique particulier.

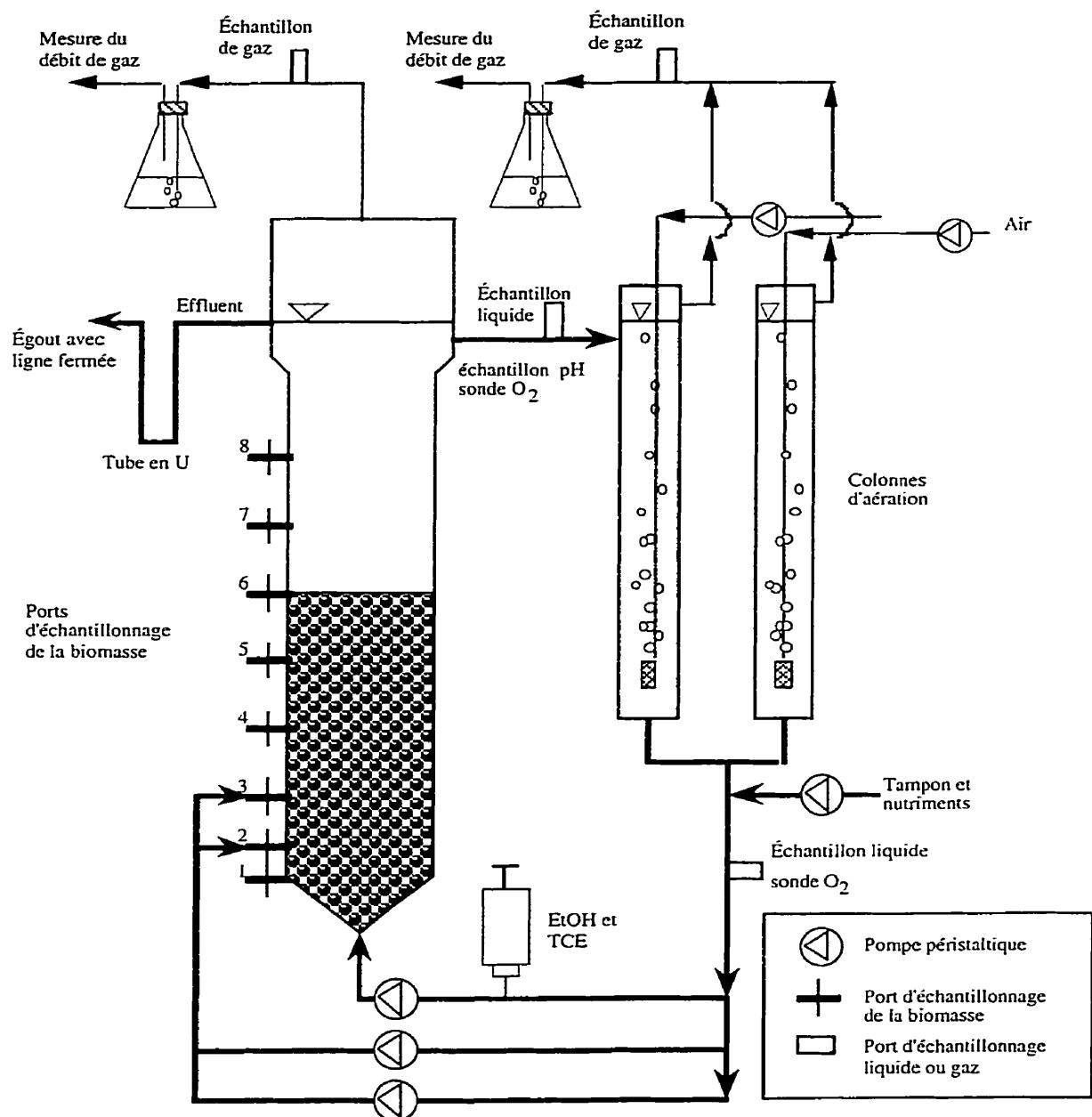


Figure 3.1 - Schéma du montage du réacteur couplé anaérobiose/aérobiose

Ainsi, la présence simultanée de l'éthanol et de l'oxygène à l'entrée favorise les hétérotrophes aérobies. L'oxygène étant limitant, une fois qu'il est consommé, l'éthanol restant est utilisé par les anaérobies pour produire du méthane. Enfin encore au-dessus, la présence simultanée d'oxygène et de méthane comme source de carbone prépondérante

limite la compétition pour l'oxygène par les hétérotrophes aérobies et avantage les méthanotrophes.

### 3.1.2 Produits chimiques

Les produits chimiques qui ont été utilisés sont les suivants :

- Mélange de gaz standard PCE (322 ppm), TCE (330 ppm), cis-DCE (106 ppm), trans-DCE (53,5 ppm), 1,1-DCE (48,7 ppm), CV (110 ppm) dans de l'azote, Air Products.
- PCE pur à 99,9%+ (HPLC grade, Sigma-Aldrich), 100 mL.
- TCE pur à 99,5%+ (spectrophotometric grade, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis), 2 L.
- cis-1,2-DCE pur à 98% (GC détecteur HALL, Supelco), 1000 mg.
- trans-1,2-DCE pur à 99% (GC détecteur HALL, Supelco), 5000 mg.
- 1,1-DCE pur à 99% (GC détecteur HALL, Supelco), 5000 mg.
- CV dans du MeOH, à 200 µg/mL à 99% (GC détecteur HALL, Supelco), 1000 µL.
- Chlorobenzène pur à 99,9%, Sigma, 25 mL.
- Méthanol à 99,8%, American Chemicals Ltd., 4 L.
- Ethanol anhydre, Les Alcools de Commerce Inc., 4 L.
- Eau distillée.

Le TCE et l'éthanol servaient à alimenter le réacteur. Les autres produits sont utilisés pour les analyses, décrites au chapitre 3.1.5.

### 3.1.3 Inoculum

L'inoculum du réacteur était un mélange de trois boues :

- 2.5 L d'une boue granulaire de traitement anaérobiose d'un effluent agro-alimentaire (Champlain Industries, Cornwall, Ontario),
- 2.5 L de boue activée d'une station municipale de traitement des eaux usées (Sainte Catherine, Québec),
- 5 L d'une boue provenant d'un réacteur de traitement anaérobiose du PCE, et conservée à 4°C depuis 2 ans.

Les boues granulaires de Champlain ont été homogénéisées avec un mixeur (Osterizer, Sunbeam Corporation, Ontario) pendant 4 minutes.

La teneur en matières volatiles en suspension (MVES) du mélange de 10 L a été mesurée en triplicata, et a donné une valeur moyenne de 33 g MVES/L. La mesure des MVES est une mesure approchée de la matière organique satisfaisante dans de nombreux cas (Metcal et Eddy, 1991). La mesure des MVES a été utilisée tout au long de l'expérience pour estimer le contenu en biomasse (Chapitre 3.1.5.8).

Pour améliorer la granulation, du chitosan, un polymère naturel, a été ajouté. Du chitosan est dissous dans une solution d'acide acétique à 1%, pour obtenir une concentration de 10 g/L. La dose choisie dans le cas présent correspond à une valeur modérée, inférieure par prudence à celle qui est recommandée par El-Mamouni et al. (1998). Elle est de 10 mg de chitosan par g de MES. Dans l'inoculum de 10 L, les solides en suspension sont en concentration de 41.9 g MES/L, ce qui correspond à une dose de chitosan de 4190 mg. Un volume de 420 mL de la solution de chitosan a été préparé, par ajout de 4.2 g de chitosan, et de 4.2 mL d'acide acétique dans 416 mL d'eau distillée. Le chitosan a été ajouté aux 10 L de boue, avant l'inoculation.

### 3.1.4 Alimentation du réacteur

Le réacteur a d'abord été alimenté en éthanol sans TCE, pour développer une biomasse granulaire couplée anaérobiose/aérobiose. L'objectif de charge était de

0.2 g DCO/g MVES.d pour la période de croissance, et la première période d'augmentation progressive du TCE. Une seconde période d'alimentation en TCE a eu lieu, avec un objectif de charge organique en éthanol à 0.1 g DCO/g MVES.d.

En pratique la charge organique a été ajustée régulièrement au contenu en biomasse du réacteur. La charge organique volumique a donc été de 2 g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d en moyenne pendant les 100 premiers jours, avec des fluctuations importantes à cause de pertes en biomasse. Par la suite, la charge organique volumique a été de 1.5 g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d, puis avant de commencer la seconde période d'alimentation en TCE, la charge a été diminuée à 0.5 g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d.

La solution de TCE était préparée dans les seringues de 10 mL directement, à l'aide d'une autre seringue en verre, munie d'une aiguille suffisamment fine pour rentrer dans les seringues de 10 mL (Figure 3.2). La procédure vise à minimiser les pertes par volatilisation. La charge en TCE a été augmentée par paliers de 2 mg/Lréacteur.d jusqu'à 20 mg/Lréacteur.d. La concentration du mélange préparé dans la seringue a donc été ajustée en fonction de la charge.

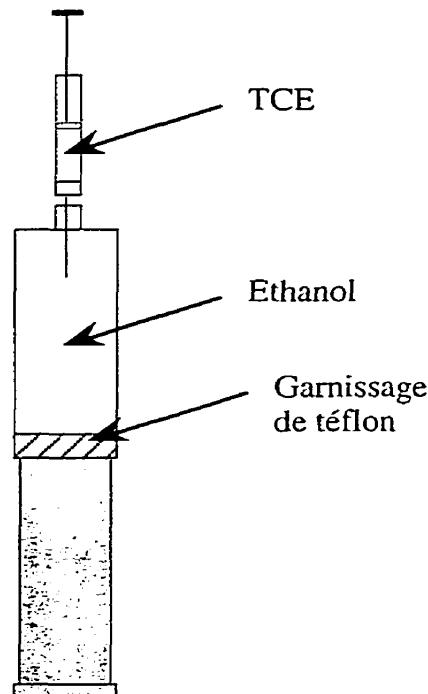


Figure 3.2 - Préparation de la solution de TCE dans l'éthanol

La solution de nutriments utilisée était préparée pour respecter un rapport DCO:N:P de 100:12:1, rapport requis pour les besoins de croissance des aérobies (Metcalf et Eddy, 1991). Un tampon afin de maintenir un pH neutre était ajouté, sous deux formes : bicarbonate de potassium et bicarbonate de sodium. Le tampon bicarbonate est préférable au tampon phosphate dans la perspective d'une application industrielle car il est bien

moins cher. Pour couvrir les besoins en éléments traces, une solution de métaux était ajoutée à la solution de nutriments, de façon à respecter un rapport DCO:S de 100:0.2.

Les formules des deux solutions sont données dans le Tableau 3.1 et le Tableau 3.2, dans le cas d'une charge organique de 1 g DCO/L<sub>nutriments</sub>.d. Toute modification de la charge organique exprimée par litre de réacteur et/ou du temps de rétention hydraulique doit être prise en compte pour adapter les deux formules.

Tableau 3.1 - Composition de la solution de nutriments pour 1 g DCO/L<sub>nutriments</sub>.d

Composé	Concentration (mg/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.1
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	338.9
KHCO <sub>3</sub>	866.7
NaHCO <sub>3</sub>	666.7
Métaux (mL/L)	26.7

Tableau 3.2 - Formule de la solution de métaux en traces et concentrations correspondantes dans la solution de nutriments

Composé	Concentration dans	
	Préparation (mg/L)	Nutriments (mg/L)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	195.0	5.20
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	307.5	8.20
EDTA	44.8	1.19
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	39.0	1.04
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	12.5	0.33
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	15.5	0.41
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12.5	0.33
NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	7.0	0.19
CuSO <sub>4</sub>	4.5	0.12
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.5	0.09
AlK(SO <sub>4</sub> ).12H <sub>2</sub> O	1.5	0.04
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	1.3	0.03

Le Tableau 3.3 donne, pour la formule de nutriments, les concentrations correspondantes des éléments identifiés dans la revue bibliographique comme importants pour certains métabolismes microbiens.

Tableau 3.3 - Concentrations des éléments clés pour certains métabolismes

Elément	Concentration dans la solution de nutriments (mg/L)
$\text{Cu}^{2+}$	0.05
$\text{NH}_4^+$	77.37
$\text{SO}_4^{2-}$	5.85
$\text{NO}_3^-$	0.18
$\text{Fe}^{2+}$	0.65

La concentration en cuivre est inférieure au seuil d'inhibition de la synthèse et de l'activité de la sMMO. Le fer est en concentration suffisante pour couvrir au moins en partie les besoins des méthanotrophes.

Dans la gamme de pH 7.0-7.5 et avec 77.37 mg/L d'ammonium ajouté, la concentration d'ammoniaque est comprise entre 0.40 et 1.27 mg $\text{NH}_3$ /L.

Pour la formule utilisée, le rapport DCO/ $\text{SO}_4^{2-}$  est 171/1, donc beaucoup trop élevé pour que la sulfato-réduction soit significative dans le système.

### 3.1.5 Méthodes d'analyses

#### 3.1.5.1 Le TCE et ses métabolites en phase liquide

Le TCE, les DCE et le CV dans l'effluent liquide étaient analysés par la méthode headspace sur un chromatographe gazeux (GC) (Sigma 2000, Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut) avec un échantillonneur automatique Tekmar 14-4401-000. Le GC était équipé d'une colonne DB-Petro 100 (Supelco) de dimensions 100m x 0.25mm x 0.25 $\mu\text{m}$ , et d'un détecteur ionisateur de flamme (FID) (Perkin-Elmer) maintenu à 200°C.

Le programme de température de la colonne était de 50°C pendant les 5 premières minutes, puis une augmentation de 5°C par min jusqu'à 175°C.

La méthode et la procédure expérimentale sont décrites en Annexe 5

Deux courbes de calibration étaient réalisées si nécessaire, soit si des concentrations élevées étaient observées. La gamme normale de calibration était 0-1000 ppb, et l'autre gamme était 1000-20000 ppb.

Les limites de détection étaient de 9 ppb pour le TCE, 8 ppb pour le 1,1-DCE, 9 ppb pour le t-DCE, 13 ppb pour le c-DCE et 18 ppb pour le CV. La précision de la méthode était de 10%.

Dans les échantillons du réacteur, un pic inconnu apparaissait souvent à un temps de rétention tel que tout pic de CV aurait été masqué si il était présent. Cette méthode ne nous a donc pas permis d'analyser le CV de façon fiable dans nos échantillons liquides.

### **3.1.5.2 Le TCE et ses métabolites en phase gazeuse**

Le TCE, les DCE et le CV ont été analysés dans le biogaz par un chromatographe gazeux (Hewlett Packard, modèle HP6890) équipé d'une colonne à garnissage (1% SP-1000 60/80 Carbopack B, Supelco), de dimensions longueur x diamètre interne = 6' x 1/8'', et muni d'un détecteur FID (Hewlett Packard) maintenu à 250°C. Le gaz porteur était l'hélium, à un débit de 49.2 mL/min. Le programme de température était 170°C pendant 12 min.

La méthode et la procédure expérimentale sont décrites en Annexe 5.

Tous les éthènes chlorés étaient visibles par cette méthode, mais le c-DCE et le t-DCE n'étaient pas bien séparés. Le CV était bien identifié. Les limites de détection étaient de l'ordre du nanogramme pour tous les composés, et la précision de l'ordre de 10%.

Les échantillons de gaz de 100 µL étaient prélevés avec une seringue étanche en verre de 250 µl munie d'une valve (Hamilton, modèle #1725).

### **3.1.5.3 Le méthane, le dioxyde de carbone et l'oxygène**

Le CH<sub>4</sub>, le CO<sub>2</sub> et l'O<sub>2</sub> étaient analysés dans les gaz par un GC (Hewlett Packard, modèle HP6890) équipé d'une colonne à garnissage (Supelco), de dimensions 3 x 12' x 1/8'', et muni d'un détecteur à conductivité thermique (TCD). Le gaz porteur était l'argon à un débit de 59 mL/min. Le programme de température était 35°C pendant 7.5 min, puis une augmentation de 75°C par min jusqu'à 100°C, et un maintien à 100°C pendant 6 min.

Les échantillons de gaz de 300 µL étaient prélevés à l'aide d'une seringue en verre étanche munie d'une valve (Hamilton, modèle #1750).

L'hydrogène était également détectable et mesurable par cette méthode.

#### **3.1.5.4 Les acides gras volatils (AGV)**

L'acétate, le propionate et le butyrate, étaient analysés par un GC Sigma 2000 (Perkin-Elmer) équipé d'un détecteur FID maintenu à 200°C et d'une colonne à garnissage en verre de dimensions 90 cm x 6 mm (60/80 Carbopak C / 0.390% Carbowax 20-µm / 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Supelco). La colonne était maintenue à 120°C, et le gaz porteur était l'azote.

La procédure expérimentale de préparation des échantillons est décrite en Annexe 5.

#### **3.1.5.5 L'éthanol**

L'éthanol était mesuré dans la recirculation du réacteur, et lors des tests d'activité. L'analyse était réalisée par un GC (Sigma 2000, Perkin-Elmer) équipé d'une colonne (Hay Sep 9 80/100, Supelco) de dimensions 1.83 m x 0.125 mm, et muni d'un détecteur FID. Le gaz porteur était l'azote.

La procédure expérimentale de préparation des échantillons est décrite en Annexe 5.

#### **3.1.5.6 Les chlorures inorganiques**

Les chlorures inorganiques étaient mesurés dans le tampon contenant les nutriments et dans la recirculation par la méthode Hach au thyocianate mercurique, avec un spectrophotomètre Hach DR/3000. Les deux types d'échantillons représentaient respectivement la valeur en entrée du réacteur (nutriments) et la valeur à la sortie du réacteur (recirculation).

La procédure expérimentale est décrite en Annexe 5.

### **3.1.5.7 La demande chimique en oxygène (DCO)**

La DCO soluble et totale était mesurée à l'effluent du réacteur avec la méthode Hach #8000, mais en utilisant des solutions acide et de digestion préparées au laboratoire.

La procédure expérimentale est décrite en Annexe 5.

### **3.1.5.8 Les matières volatiles en suspension (MVES)**

La concentration en biomasse dans le réacteur ou dans les bouteilles sérologiques des tests d'activité était estimée par la mesure des matières volatiles en suspension (MVES). Les analyses consistent en une déshydratation à 105°C pour mesurer les solides totaux en suspension (MES) et une combustion à 605°C (gazéification de la matière organique) pour mesurer les matières volatiles en suspension (méthodes 2540D et 2540E, Standard Methods, 1995). Un profil des MVES dans le réacteur est fait par l'analyse des MES/MVES des 9 échantillons de biomasse prélevés à l'effluent et aux 8 ports répartis sur la hauteur du réacteur.

La mesure des MVES a été utilisée tout au long de l'expérience pour estimer le contenu en biomasse. Il est raisonnable de considérer que dans la boue du réacteur les interférences sur la mesure des MVES pour estimer la biomasse sont négligeables. Les interférences possibles sont 1) les matières minérales et les sels gazéifiés lors de la combustion et donc pris en compte dans la mesure des MVES, 2) les complexes formés par le CO<sub>2</sub> produit lors de la combustion, comme le CaCO<sub>3</sub> qui est stable jusqu'à 825°C.

La procédure expérimentale est décrite en Annexe 5.

### **3.1.5.9 Le pH et la température**

Le pH était mesuré dans un échantillon liquide de la recirculation à l'aide d'un pH mètre Accumet (modèle 825MP, Fisher) et une électrode en verre standard (Fisher).

La température était mesurée dans le tube en U à l'effluent avec un thermomètre au mercure (Canlab).

## 3.2 Caractérisation de la biomasse

Les essais de caractérisation de la biomasse sont des tests d'activité et des tests de minéralisation du [1,2-<sup>14</sup>C]TCE en microcosmes. Ces essais permettent d'évaluer en conditions optimales la présence de groupes trophiques, et leur activité, et de suivre l'évolution dans le temps de cette activité.

### 3.2.1 Tests d'activité spécifique

Le principe des test d'activité spécifique est présenté de façon générale ici, et le détail est donné pour chaque substrat dans les protocoles en Annexe 6.

Les tests d'activité spécifique sont des essais en bouteilles sérologiques de 120 mL contenant un mélange de l'échantillon et de tampon phosphate, et le substrat dont la consommation est mesurée (Figure 3.3). Le tampon phosphate est à pH 7.5, de concentration 0.05 M et Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> sont en concentrations équimolaires. Le tampon est préparé en anaérobiose si les tests d'activité spécifique doivent être réalisés en anaérobiose.

Le volume du mélange d'échantillon et de tampon phosphate est de 10 mL habituellement, si le nombre d'échantillonnages ne dépasse pas cinq. Au-delà de cinq échantillonnages, le volume du mélange dans les bouteilles est augmenté.

La concentration en biomasse du mélange est de l'ordre de 5 g MVES/L pour les substrats liquides, et de 1 à 2 g MVES/L pour les substrats gazeux. Pour un substrat gazeux faiblement soluble, une concentration en biomasse entraîne un taux de consommation volumique accru, qui peut être alors supérieur au taux de transfert gaz-liquide. Une interférence sur la mesure de consommation est alors possible à cause de la limitation du transfert gaz-liquide.

Les bouteilles sérologiques sont scellées à l'aide d'anneaux en aluminium sur des bouchons en caoutchouc (Fischer Scientific). Elles sont incubées à 30 ou 35°C selon le substrat et agités à 100 rpm pour les substrats liquides et 400 rpm pour les substrats gazeux, pour un bon transfert gaz-liquide. Un schéma de bouteille sérologique de test d'activité est présenté à la Figure 3.3.

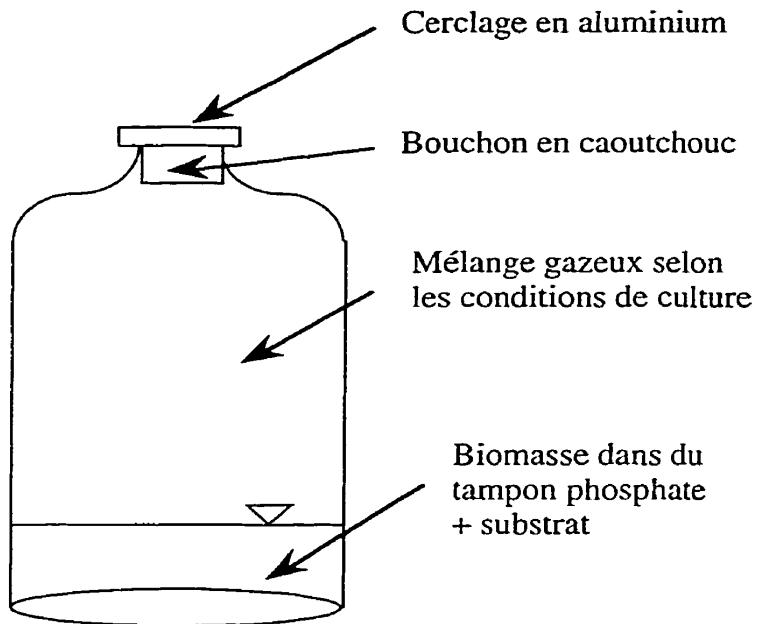


Figure 3.3 - Bouteille de test d'activité

La consommation du substrat injecté est suivie au cours du temps, par des échantillonnages de la phase liquide ou de la phase gazeuse. Les temps d'échantillonnage sont définis selon la vitesse de réaction escomptée, et cinq points sont normalement suffisants pour tracer une courbe de consommation satisfaisante. Le test peut être arrêté quand plus de 50% du substrat fourni initialement ont disparu. La concentration de la biomasse est alors immédiatement mesurée par une analyse des MVES de la phase liquide restant, dont le volume doit être supérieur à la moitié du volume initial.

Le calcul de l'activité spécifique est fait en prenant la pente maximale de consommation divisée par la quantité de biomasse estimée par le test des MVES.

Les essais sont systématiquement réalisés en triplicatas, et les témoins autoclavés en duplicitas.

Quatre principaux groupes trophiques d'intérêt dans le système couplé étudié ont été identifiés. De plus, l'aspect du lit de boue montrait une stratification, il semblait donc intéressant de voir si l'activité pour un substrat donné différait selon la hauteur de prélèvement dans le réacteur. Les niveaux de prélèvement ont donc été dans le bas du lit,

au port #3, dans le haut du lit, au port #6, et au port #8, au-dessus du lit granulaire où se trouvait une biomasse floconneuse claire, avec quelques granules emprisonnés.

Les activités correspondantes ont donc été suivies par des tests d'activité réalisés à différents temps de la vie du réacteur (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 - Tests d'activité spécifique réalisés : substrats consommés

Processus microbien	Substrat suivi					Biomasse		
	O <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	Ac	EtOH	#8	#6	#3
CH <sub>4</sub> trophes	✓	✓				✓	✓	✓
CH <sub>4</sub> gènes H <sub>2</sub>			✓			✓	✓	✓
CH <sub>4</sub> gènes Ac				✓			✓	✓
Acidogènes					✓		✓	✓

CH<sub>4</sub>trophes : méthanotrophes - CH<sub>4</sub>gènes H<sub>2</sub> : méthanolgènes hydrogénotrophes - CH<sub>4</sub>gènes Ac : méthanolgènes acétoclastes - EtOH : éthanol - Ac : acétate  
Biomasse #8 (#6, #3) : prélevée au port d'échantillonnage #8 (#6, #3)

Lors de la caractérisation finale de la biomasse, des tests d'activité supplémentaires ont été ajoutés pour évaluer un plus grand nombre de processus microbiens et fournir ainsi une vue d'ensemble plus complète du système (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 - Tests d'activités de la caractérisation finale de la biomasse du réacteur

Processus microbien	Substrat suivi (P=production)					BES	Biomasse		
	O <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	Ac	EtOH		#8	#6	#3
CH <sub>4</sub> trophes	1	✓	✓				✓	✓	✓
Témoin compétition [1]	2	✓	✓		✓		✓	✓	✓
CH <sub>4</sub> gènes H <sub>2</sub>	3		✓				✓	✓	✓
CH <sub>4</sub> gènes Ac	4			✓			✓	✓	✓
Acidogènes	9				✓			✓	✓
Témoin BES	10		P		✓	✓	[1]	[1]	[1]

P : production suivie; ✓ : disparition suivie

[1] témoin de compétition entre les méthanolotrophes et les hétérotrophes aérobies

[2] : mélange de plusieurs prélèvements = représentatif de l'ensemble du réacteur - Test #5: interaction entre les méthanolotrophes et les hétérotrophes aérobies

CH<sub>4</sub>trophes - CH<sub>4</sub>gènes H<sub>2</sub> - CH<sub>4</sub>gènes Ac : voir Tableau 3.4

Ac - EtOH - Biomasse #8 (#6, #3) : voir Tableau 3.4

Glc : glucose - BES : 2-bromoéthanesulfonate

### 3.2.2 Tests de minéralisation

Le détail de la procédure expérimentale des tests de minéralisation est donné en Annexe 7. Quatre tests de minéralisation du [1,2-<sup>14</sup>C]TCE ont été réalisés à la fin de l'expérience, lors de la dernière période de faible charge en TCE. L'objectif est d'identifier les processus microbiens de dégradation du TCE potentiels dans le réacteur (Tableau 3.6).

Les quatres tests de minéralisation sont accompagnés de trois tests d'activité en parallèle dans lesquels la disparition des substrats est suivie. Ces trois tests témoins mettent en évidence un épuisement de l'un ou l'autre des substrats. Dans les conditions méthanotrophes, quand le méthane ou l'oxygène est épuisé, une réalimentation par injection de gaz à travers le septum est faite.

Tableau 3.6 - Tests de minéralisation réalisés lors de la caractérisation finale de la biomasse

Tests #	Substrat / Source de C				BES	Substrat suivi			
	O <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	EtOH	[ <sup>1,2</sup> - <sup>14</sup> C]TCE		O <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	EtOH	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub>
1			✓	✓					✓
2	✓	✓		✓					✓
3	✓		✓	✓	✓				✓
4	✓		✓	✓					✓
5	✓	✓				✓	✓		
6	✓		✓			✓			✓
7	✓		✓		✓	✓			✓

BES: 2-bromoéthanesulfonate, inhibiteur des méthanogènes

Groupes/processus microbiens étudiés selon les tests réalisés:

- #1 : hétérotrophes aérobies
- #2 : méthanotrophes
- #3 : hétérotrophes en absence de production de méthane
- #4 : témoin de 3
- #5 : témoin de 2, pour vérifier si les substrats, CH<sub>4</sub> et O<sub>2</sub>, sont limitants
- #6 : témoin de 3, pour vérifier si les substrats, EtOH et O<sub>2</sub>, sont limitants
- #7 : témoin de 3, pour vérifier l'effet du BES sur la consommation des substrats, EtOH et O<sub>2</sub>

Comme les tests d'activité, les essais de minéralisation sont réalisés dans des bouteilles sérologiques de 120 mL, contenant un mélange de biomasse du réacteur et de milieu de culture (Figure 3.4). Ici, le milieu de culture choisi était le même que dans le réacteur, afin

de reproduire les mêmes conditions. Les microcosmes sont scellés à l'aide de valves mininerts, recouvertes de téflon sur la face interne, afin de diminuer l'adsorption du TCE.

Dans chaque microcosme se trouve une éprouvette en verre de 5 mL contenant 0.5 mL d'une solution 1 N de KOH. Cette solution piège tout le CO<sub>2</sub> produit dans l'atmosphère, donc le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. La solution de KOH est récupérée régulièrement et remplacée par une solution fraîche. La radioactivité du KOH récupéré est mesurée par un compteur à scintillation (Wallac, 1409, Turku, Finlande), et permet de suivre la minéralisation du substrat radioactif introduit initialement dans le microcosme.

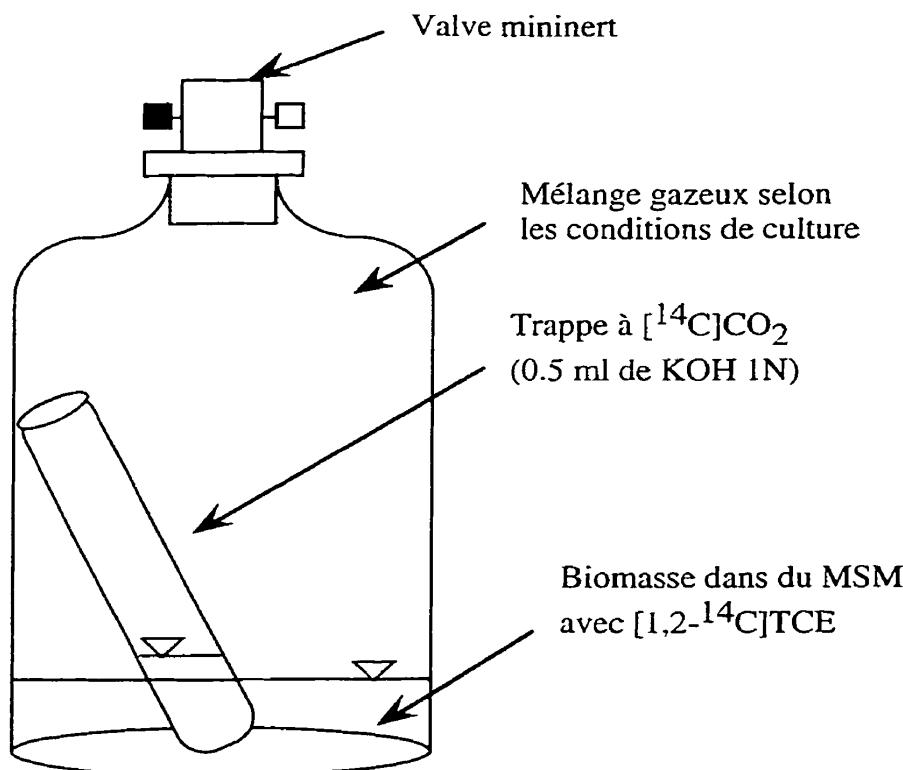


Figure 3.4 - Microcosme de minéralisation du [1,2-<sup>14</sup>C]TCE

Les conditions expérimentales respectées dans les tests de minéralisation sont résumées au Tableau 3.7. Le volume du mélange était de 10 mL, et la concentration en biomasse visée était de 1 à 2 g MVES/L.

Chaque test a été réalisé en triplicata et avec deux témoins positifs, c'est-à-dire contenant de la biomasse autoclavée. L'échantillon utilisé est une combinaison de prélèvements à trois hauteurs dans le réacteur afin d'avoir une biomasse représentative de l'ensemble.

Tableau 3.7- Conditions expérimentales de minéralisation du [1,2-<sup>14</sup>C]TCE

Tests	Air (%)	CH <sub>4</sub> (%)	EtOH (g/L)	TCE (mg/L)	TCE- <sup>14</sup> C (dpm/btl)	BES (mmol/gMVES)	Agitation (rpm)	T (°C)
1			3	2	100 000		140	30
2	80	20		2	100 000		140	30
3	100		3	2	100 000	20	140	30
4	100		3	2	100 000		140	30
5	80	20					140	30
6	100		3				140	30
7	100		3				140	30

Les résultats des essais de minéralisation sont traités en utilisant une méthode qui définit des paramètres de réponse de la minéralisation (Millette et al., 1995) (Figure 3.5). L'avantage de cette méthode empirique est de pouvoir comparer des tests différents à l'aide des indices de biodégradation calculés.

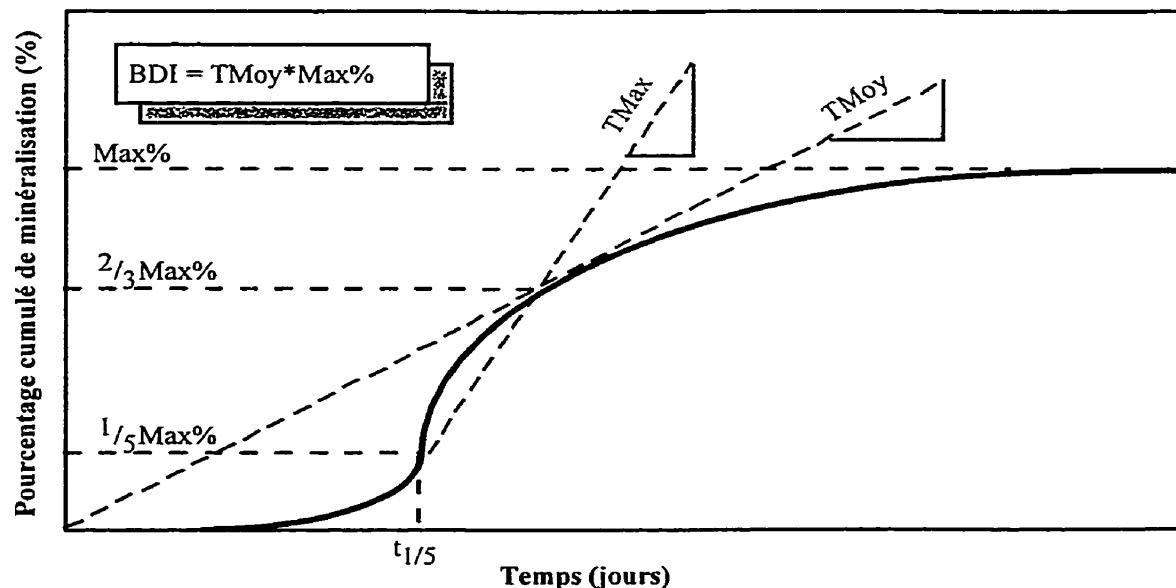


Figure 3.5 - Courbe de minéralisation et représentation graphique des paramètres de réponse (Millette et al., 1995)

Les paramètres de réponse, représentés graphiquement à la Figure 3.5, sont définis comme suit :

- Max% : fraction finale de la radioactivité initiale retrouvée sous forme de  $^{14}\text{CO}_2$ ;
- Lat : temps nécessaire pour atteindre 1/5 de Max%;
- TMax : taux de minéralisation entre Lat et 2/3Max%;
- TMoy : taux de minéralisation moyen entre le temps initial et 2/3Max%;
- BDI : indice de biodégradation, tenant compte de Max% et TMoy;
- NBDI : indice de biodégradation normalisé, rapport entre les indices de biodégradation de l'échantillon et celui du témoin.

Les formules de calcul des indices BDI et NBDI sont :

$$BDI = Tmoy \times Max\% \quad [\text{Éq. 3.1}]$$

$$NBDI = \frac{BDI_{ech}}{BDI_{tém}} \quad [\text{Éq. 3.2}]$$

où,  $BDI_{ech}$  représente le BDI de l'échantillon et  $BDI_{tém}$  le BDI du témoin.

Le paramètre Lat est défini pour avoir un point précis de fin de la période de latence. Le calcul de TMoy est une méthode d'estimation du taux de minéralisation moyen, dans laquelle est prise en compte la période de latence et la période où se produit la majorité de la minéralisation.

Il faut calculer le paramètre Max%, si la pente finale n'est pas encore nulle. Le Max% calculé est alors une estimation de la valeur finale si le test était poursuivi jusqu'à la fin.

### 3.3 Suivi du réacteur

L'ensemble des analyses réalisées autour du réacteur sont présentées dans le Tableau 3.8.

Tableau 3.8 - Liste des paramètres de suivi du système complé

Phase	Type	Paramètre	Dates d'échantillonnage							
			$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t_5$	$t_f$	
Liquide	Physique	Débits	R	R	R	R	R	R	R	
		pH	R	R	R	R	R	R	R	
	Chimique	T	R	R	R	R	R	R	R	
		DCO	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	
		AGV	R	R	R	R	R	R	R	
		EtOH	R	R	R	R	R	R	R	
		TCE, DCE, CV	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	R <sub>d</sub>	
	Biologique	Profil MES/MVES <sup>(1)</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
		Activités	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
		Microcosmes							✓	
Gaz	Physique	Débits	R	R	R	R	R	R	R	
		CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub>	R	R	R	R	R	R	R	
		TCE, DCE, CV	R	R	R	R	R	R	R	

R: analyse de routine

Rd: analyse de routine moins fréquente (2 fois par semaine)

<sup>(1)</sup> dates des profils MES/MVES différentes des dates de tests d'activité, mais pour la lisibilité du tableau, elles ne sont pas inscrites dans le tableau; dates des profils SS/MVES:  $t_1=115$ j,  $t_2=188$ j,  $t_3=267$ j,  $t_4=322$ j,  $t_5=425$ j,  $t_f=457$ j,  $t_s=519$ j

$t_i$  inoculum

$t_1$  1ère série de tests d'activités avant le démarrage de l'acclimatation au TCE, jour 110-115

$t_2$  2ème série de tests d'activités, jour 147

$t_3$  3ème série de tests d'activités, jour 202

$t_4$  4ème série de tests d'activités, jour 223

$t_5$  5ème série de tests d'activités, jour 267-278

$t_f$  6ème série de tests d'activités, jour 459-488, et deux séries de microcosmes jour 470 et jour 530, et fin de l'expérience, pendant la dernière phase de charge en TCE

Les mesures de routine et les calculs ont été faits sur une base quotidienne.

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont présentés en trois parties.

Dans la première partie, les résultats du réacteur sont décrits au cours du temps, avec des profils temporels sur la durée totale de l'expérience et des résultats par périodes d'intérêt définies. Chacune de ces périodes est étudiée sur une durée représentative d'un état stationnaire du réacteur.

Dans la seconde partie, les résultats précédents sont interprétés à l'aide des tests de caractérisation de la biomasse, soient les tests d'activité et les tests de minéralisation.

La troisième partie est une discussion sur l'ensemble des résultats.

#### **4.1 Résultats du réacteur**

##### **4.1.1 Phases opératoires du réacteur**

Tableau 4.1 - Phases d'opération du réacteur

Début (jour)	Durée (mois)	Phase (#)	Charge (mg TCE/L <sub>réacteur</sub> .d)
0	4.5	1	Démarrage
139	5	2	Acclimatation
287	2	3	Maintenance
337	6	4	Faible charge

L'expérience d'une durée de 17,5 mois s'est déroulée en 4 périodes. Les étapes successives ont été une phase de démarrage de 4,5 mois sans TCE, une phase d'acclimatation progressive au TCE de 5 mois, une phase de maintenance sans TCE de 2 mois et une phase de faible charge en TCE à 2 mg TCE/ L<sub>réacteur</sub>.d pendant 6 mois. (Tableau 4.1 et Figure 4.1).

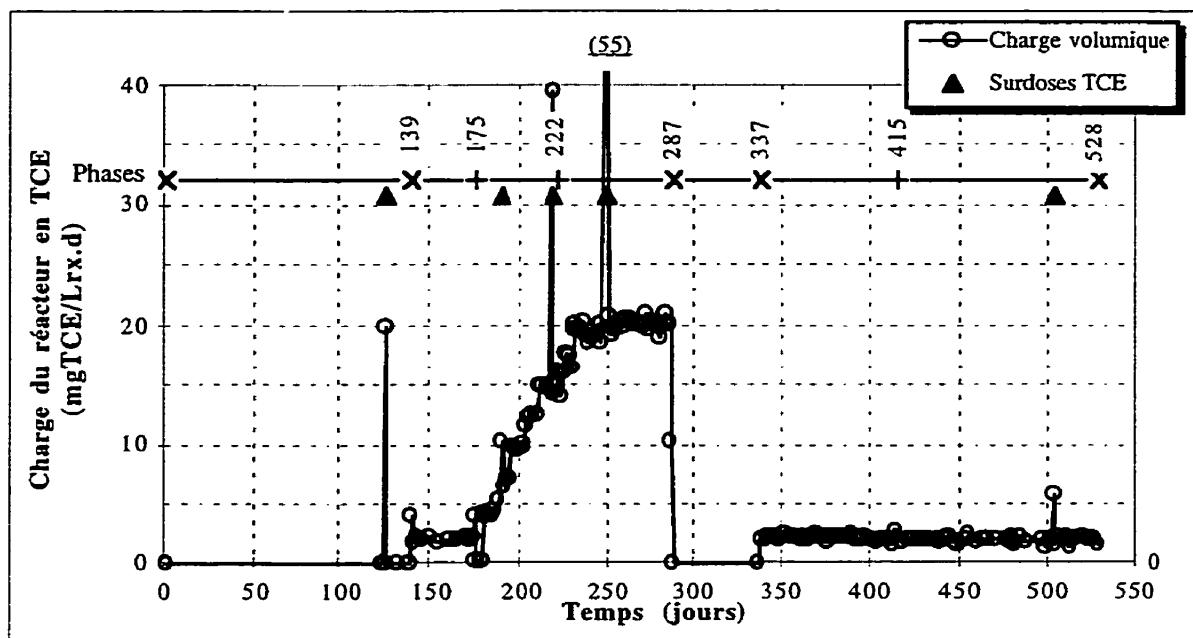


Figure 4.1 -Taux de charge en TCE du réacteur (mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d) - Surdoses indiquées par les triangles

**Démarrage du réacteur** - Le réacteur a été inoculé à 15 g MVES/L<sub>réacteur</sub> (MVES : matières volatiles en suspension). Pour favoriser la croissance microbienne et la granulation, le taux de charge organique spécifique (éthanol) était fixé à un objectif de 0.4 g DCO/g MVES.d (conditions de croissance non limitantes, Edeline, 1994) au cours de la période de démarrage. En raison des pertes de biomasse, l'alimentation en éthanol a été sans cesse ajustée afin de respecter l'objectif de charge spécifique. À la fin des 4,5 mois, la biomasse était bien granulée (granules noirs d'environ 3 mm de diamètre) et la concentration en biomasse était de 5 g MVES/L<sub>réacteur</sub>. À ce moment, le système couplé anaérobiose/aérobiose était faiblement oxygéné (0.7 L O<sub>2</sub>/L<sub>réacteur</sub>.d) et moins de 10% de la charge organique étaient dégradés par voie aérobie.

**Acclimatation au TCE** - Le réacteur a été alimenté en TCE pendant 40 jours à 2 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d. Une fois le système stabilisé (avec pour critère principal un rendement du substrat en CH<sub>4</sub> stable), la charge en TCE a été graduellement augmentée pour atteindre en 50 jours un maximum de 20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d. Le taux d'aération a été augmenté de 1 à 2 L (STP) O<sub>2</sub>/L<sub>réacteur</sub>.d, et le réacteur a été opéré dans ces conditions pendant 60 jours. À des charges inférieures à 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d, aucun sous-produit

chloré du TCE n'a été détecté dans l'effluent ou dans les gaz. Pendant l'acclimatation au TCE, les performances du système étaient évaluées par les rendements de production de gaz (production nette de  $\text{CH}_4$  et  $\text{CO}_2$  rapportée à l'enlèvement de charge organique), par des tests d'activité et par l'efficacité de dégradation du TCE à l'aide des mesures des éthènes chlorés dans les gaz et dans l'effluent liquide. À la fin de cette période de 5 mois, le contenu en biomasse était de 10 g MVES/L<sub>réacteur</sub>. Notons que pendant cette phase, des surdoses d'alimentation en TCE ont eu lieu à la suite de défaillances techniques du système d'alimentation.

**Maintenance sans TCE** - À la fin des 5 mois, la capacité de déchloration du TCE dans le réacteur a chuté, et le c-DCE est devenu le produit terminal principal de dégradation. L'alimentation en TCE a été arrêtée alors pendant deux mois, et les conditions de couplages ont été modifiées en faveur du métabolisme aérobie, principalement par une diminution de la charge organique (à partir du jour 326). Lors de cette modification des conditions de couplage anaérobiose/aérobie, le contenu en biomasse du réacteur a diminué jusqu'à environ 8 g MVES/L<sub>réacteur</sub>.

**Faible charge en TCE** - Ensuite, l'alimentation en TCE a été redémarrée pendant 6 mois à une charge constante de 2 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>-d. Le contenu en biomasse a continué à diminuer, et à la fin de l'expérience il s'est stabilisé vers 4 g MVES/L<sub>réacteur</sub>. La charge organique (éthanol) a été maintenue au même niveau que pendant la période de maintenance, ainsi que les conditions d'aération. Lors de cette période d'alimentation en TCE, 15 à 30% de la charge organique étaient dégradés par voie aérobie.

#### 4.1.2 Profils temporels d'opération et de performance du réacteur

Cette section présente l'historique du réacteur, i.e. le déroulement strictement chronologique des opérations, ainsi que des paramètres de performance, indépendamment les uns des autres. L'historique inclut également les événements qui se sont produits (incidents, surdoses, pertes, défaillances, etc). L'objectif est de donner un aperçu complet du déroulement expérimental (Figure 4.2), des fluctuations qui sont survenues, délibérément ou incidemment, des événements qui se sont succédés au cours de l'opération et de leurs raisons. L'interprétation des résultats se fera ensuite dans la perspective de l'historique du réacteur.

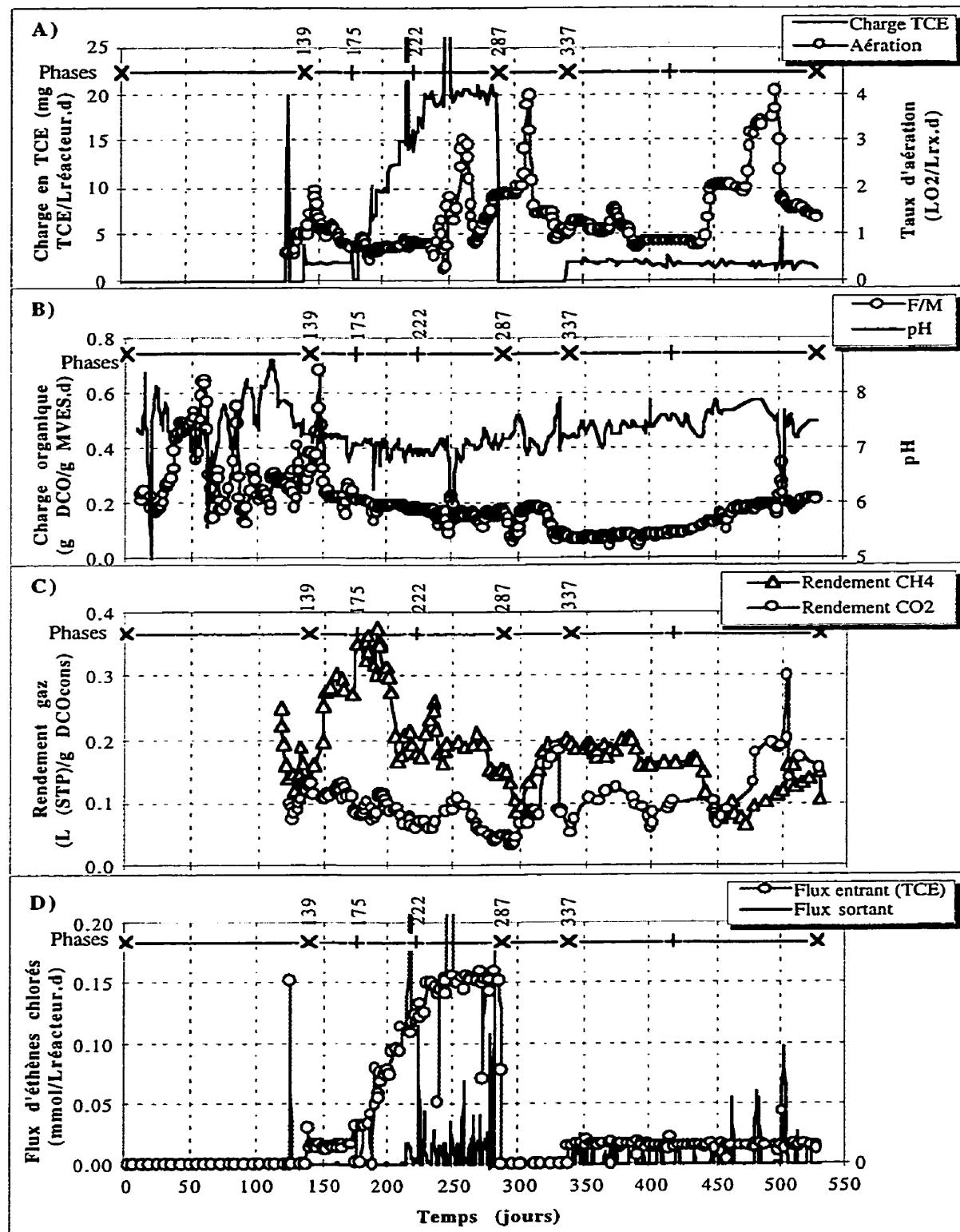


Figure 4.2 - Principaux paramètres d'opération et de performance

**Régime hydraulique** - Au démarrage, les pertes accidentelles en biomasse ont été importantes. Ces pertes étaient dues à la formation de blocs de biomasse entraînés par du biogaz dans la tête du réacteur, obstruant alors l'effluent ou la recirculation. La prise en masse de la boue était probablement due au chitosan. La période initiale sans TCE était une phase de démarrage et de stabilisation, après la perte d'environ 2/3 de la biomasse par rapport à la quantité initiale. Les critères de stabilisation du réacteur étaient le régime hydraulique, les conditions physico-chimiques et le fonctionnement biologique. Une fois les pertes accidentelles de boue maîtrisées et arrêtées, le contenu en biomasse dans le réacteur a été évalué par la mesure des matières volatiles en suspension (MVES) et la charge organique a été ajustée à la quantité de biomasse restant. Le régime hydraulique a été modifié également pour diminuer le temps de rétention hydraulique (TRH) de 2 jours à 1 jour, de façon à tester le système dans des conditions opératoires plus acceptables économiquement. Le taux de recirculation a également été augmenté à environ 25 de façon à avoir une vitesse ascensionnelle de 2.2 m/h. Une telle vitesse ascensionnelle s'est avérée suffisante dans un bioréacteur anaérobiose pour obtenir des granules bien formés et contenant une biomasse avec de bonnes activités spécifiques anaérobies (acétate, propionate et H<sub>2</sub>) (Guiot et al., 1992). Dans le même travail, il a été montré que la vitesse ascensionnelle de 2 m/h est la limite inférieure de fluidisation du lit granulaire. Une vitesse ascensionnelle de 2 m/h est donc suffisante pour assurer un régime hydrodynamique favorable à une bonne granulation et au développement de populations anaérobies actives à l'intérieur des granules. Bien qu'une vitesse ascensionnelle du liquide comprise entre 2 et 4 m/h soit optimale en ce qui concerne la granulation et les activités spécifiques des granules (Arcand et al., 1994), il a été décidé de conserver la vitesse ascensionnelle proche du seuil de fluidisation de 2 m/h pour minimiser les risques de pertes par lessivage à l'effluent.

**Charge organique (éthanol)** - Pendant l'acclimatation au TCE, l'objectif de charge organique en éthanol était de 1.5 g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d. Le contenu en biomasse du réacteur était faible au début de l'acclimatation au TCE (de l'ordre de 5 g MVES/L<sub>réacteur</sub>) et la charge organique d'entrée permettait de ne pas limiter la croissance (charge spécifique au début de 0.3 g DCO/g MVES.d). Avec une charge organique de 1.5 g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d, il était prévu que le rapport DCO:TCE serait 75:1 sur une base massique, une fois la charge maximale en TCE atteinte (20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d). Le rapport DCO:TCE dans un système de dégradation du TCE doit être minimisé, car les coûts d'opération et les besoins de

de dégradation du TCE doit être minimisé, car les coûts d'opération et les besoins de maintenance du procédé sont proportionnels à la quantité de substrats et de nutriments à apporter. Il était donc prévu de diminuer la charge organique à la fin de l'acclimatation au TCE, afin d'alimenter le système à un rapport DCO:TCE de l'ordre de 20:1 au maximum. À la charge maximale en TCE (20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d), la perte des performances de dégradation du TCE par la biomasse n'a pas permis de poursuivre l'acclimatation et de diminuer la charge en éthanol afin d'évaluer le système soumis à un rapport DCO:TCE de 20:1. Après l'arrêt du TCE, l'objectif d'alimentation en éthanol a été diminué de 1.5 à 0.5 g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d. À ce moment, la charge spécifique est passée de 0.18 à 0.08 g DCO/g MVES.d. Par la suite, la charge organique volumique (g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d) est restée constante, mais les variations de biomasse ont résulté en une augmentation progressive de la charge spécifique qui était de 0.2 g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d à la fin de l'expérience (Figure 4.3). Notons que six accidents de surcharge organique ont eu lieu, les plus importants étant aux jours 146 et 249. Ces accidents ont été liés à des dysfonctionnements du système d'injection de la solution d'éthanol.

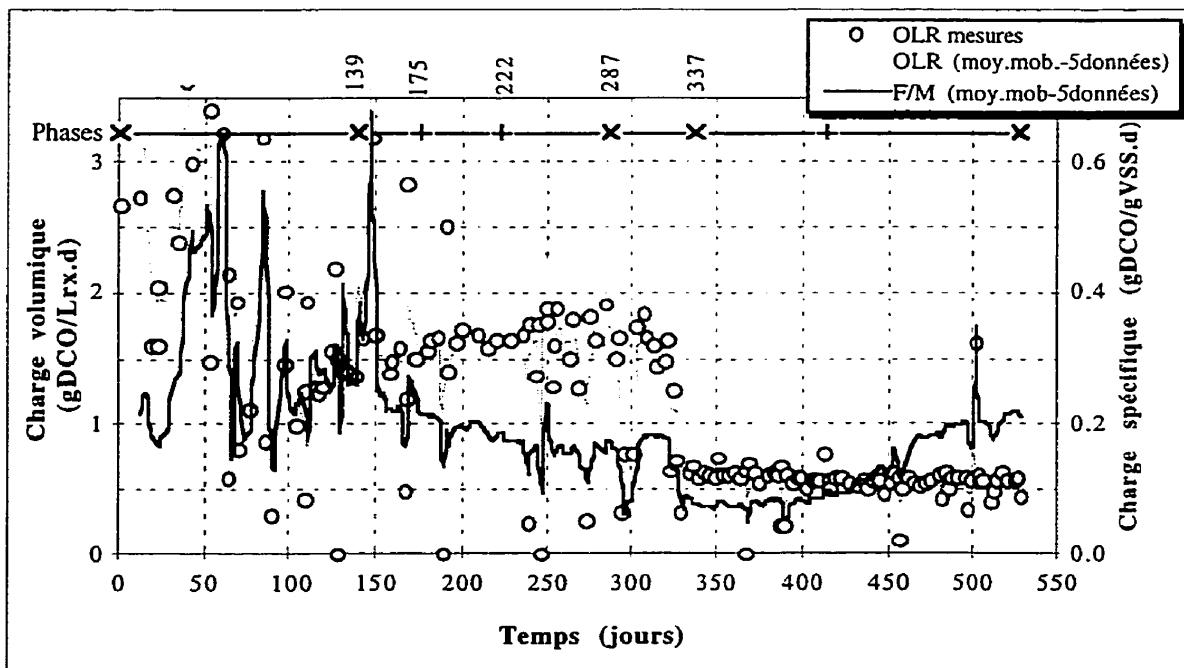


Figure 4.3 - Charge organique volumique (moyennes mobiles sur 5 données) (OLR en g DCO/L<sub>réacteur</sub>.d) et charge organique spécifique (moyennes mobiles sur 5 données) (F/M en g DCO/g MVES.d)

**Biomasse dans le réacteur (MVES)** - Le contenu en biomasse du réacteur estimé par la quantité de matières volatiles en suspension (MVES) était de  $5 \text{ g MVES/L}_{\text{réacteur}}$  à la fin de la période de démarrage. Après la période initiale instable, le contenu en biomasse du réacteur a augmenté de façon régulière au cours de la période d'acclimatation au TCE pour atteindre  $10 \text{ g MVES/L}_{\text{réacteur}}$  vers le jour 250, soit après 110 jours d'acclimatation au TCE (Figure 4.4). Une première modification des conditions de couplage a eu lieu entre les jours 255 et 265, grâce à une augmentation du taux d'aération qui est passé de 0.7 à  $2.3 \text{ L O}_2/\text{L}_{\text{réacteur}}\cdot\text{d}$ . L'augmentation de l'aération avait pour objectif de favoriser le développement des méthanotrophes (microorganismes aérobies). Le contenu en biomasse du réacteur a diminué dès ce moment. Par la suite, la modification du couplage en faveur du métabolisme aérobie a été réalisée par la diminution de la charge organique, qui a été divisée par 3. Le taux d'aération a été maintenu à un taux supérieur à celui des deux premières phases, variant entre 0.8 et  $1.4 \text{ L O}_2/\text{L}_{\text{réacteur}}\cdot\text{d}$ . Le contenu en biomasse du réacteur a diminué de façon constante et il s'est stabilisé à environ  $4 \text{ g MVES/L}_{\text{réacteur}}$  dans les deux derniers mois de l'expérience.

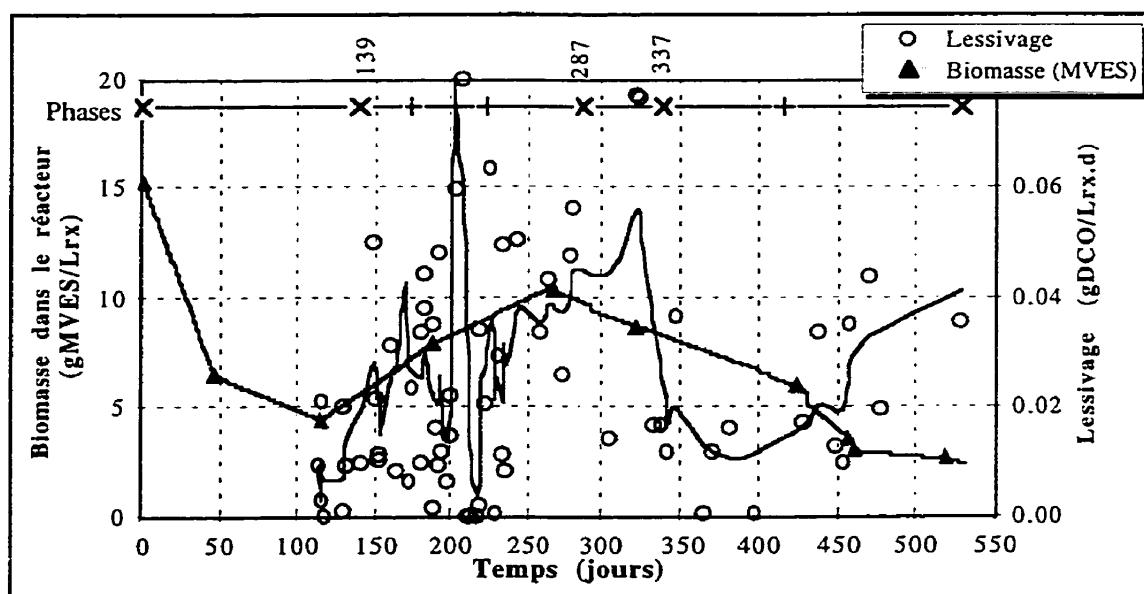


Figure 4.4 - Évolution du contenu en biomasse du réacteur ( $\text{g MVES/L}_{\text{réacteur}}$ ) et profil de lessivage de la biomasse à l'effluent (moyennes mobiles sur 7 données)  
 $(\text{g MVES/L}_{\text{réacteur}}\cdot\text{d})$

Les conditions d'opération du réacteur ne permettaient donc pas de conserver la biomasse dans le réacteur, et la valeur finale de  $4 \text{ g MVES/L}_{\text{réacteur}}$  était très basse, donc peu favorable à une capacité de dégradation conséquente du TCE dans le système. Dans des conditions de couplage similaires, il a été montré que le contenu en biomasse d'un réacteur du même type peut être de l'ordre de  $14 \text{ g MVES/L}_{\text{réacteur}}$  (Stephenson et al., 1999).

Le régime hydraulique (vitesse ascensionnelle de 2.2 m/h et temps de rétention hydraulique de 1 jour) est resté identique lors des variations de contenu en biomasse et ne peut donc les expliquer. En revanche, des augmentations du taux d'aération ont été réalisées pour favoriser le métabolisme aérobie, i.e. les méthanolotrophes (Figure 4.6). L'aération est un facteur de diminution du contenu en biomasse retenue dans un réacteur couplé (Stephenson et al, 1999). On peut s'attendre à ce que l'oxygénation supporte une plus grande proportion de bactéries aérobies et, en conséquence, un rendement de croissance global plus élevé (augmentation de la biomasse). Il est raisonnable de penser qu'une partie appréciable des microorganismes aérobies croissent en suspension et donc qu'ils sont plus directement soumis au lessivage. Ceci limite évidemment la rétention de la biomasse aérobie, donc la masse totale de biomasse dans le réacteur. De plus, la croissance aérobie attachée produit des granules floconneux et moins denses. Thaveesri et al. (1994) ont observé un lessivage considérable de biomasse dû à la croissance active de microorganismes aérobies ou facultatifs dans un réacteur UASB qui était continuellement exposé à l'oxygène de l'air ambiant.

En parallèle, une diminution de la charge organique (Figure 4.3) a été réalisée afin d'atteindre un rapport DCO:TCE plus faible en entrée du réacteur, que lors de la première période d'acclimatation au TCE (rapport DCO:TCE faible favorable aux applications industrielles pour des raisons de coût). La diminution de la charge organique a pu entraîner une augmentation transitoire du taux de lessivage (défini comme la perte de biomasse à l'effluent en fonction du temps), suivie d'une diminution et d'une stabilisation à une valeur plus basse que précédemment. La charge organique est devenue insuffisante pour que les pertes en biomasse, par lessivage et par respiration endogène, soient compensées par la croissance microbienne.

**Les acides gras volatils** - Lorsque le réacteur était stable (productivité en méthane constante), les acides gras volatils (AGV) n'étaient pas détectés à l'effluent (Figure 4.5). L'acétate était détecté de temps en temps, dans des concentrations faibles de l'ordre de 10 à 20 mg DCO/L<sub>réacteur.d</sub>. Chaque surcharge organique brutale (accidents) a été suivie instantanément d'une forte augmentation de la concentration de l'acétate et de l'apparition du propionate à l'effluent. Les concentrations en AGV lors des accidents pouvaient monter à plus de 500 mg DCO/L<sub>réacteur.d</sub>, puis diminuer rapidement à des concentrations de l'ordre de 100 mg DCO/L<sub>réacteur.d</sub> en 1 ou 2 jours. En revanche, le retour aux valeurs normales d'acétate prenait au moins 5 ou 6 jours. Les accidents les plus sévères ont entraîné des concentrations en AGV supérieures à 20 mg DCO/L<sub>réacteur.d</sub> pendant 3 semaines. Le propionate était détecté lors des accidents de surcharge en éthanol ou en TCE, indiquant un découplage des populations anaérobies (acidogènes, acétogènes et méthanoliques).

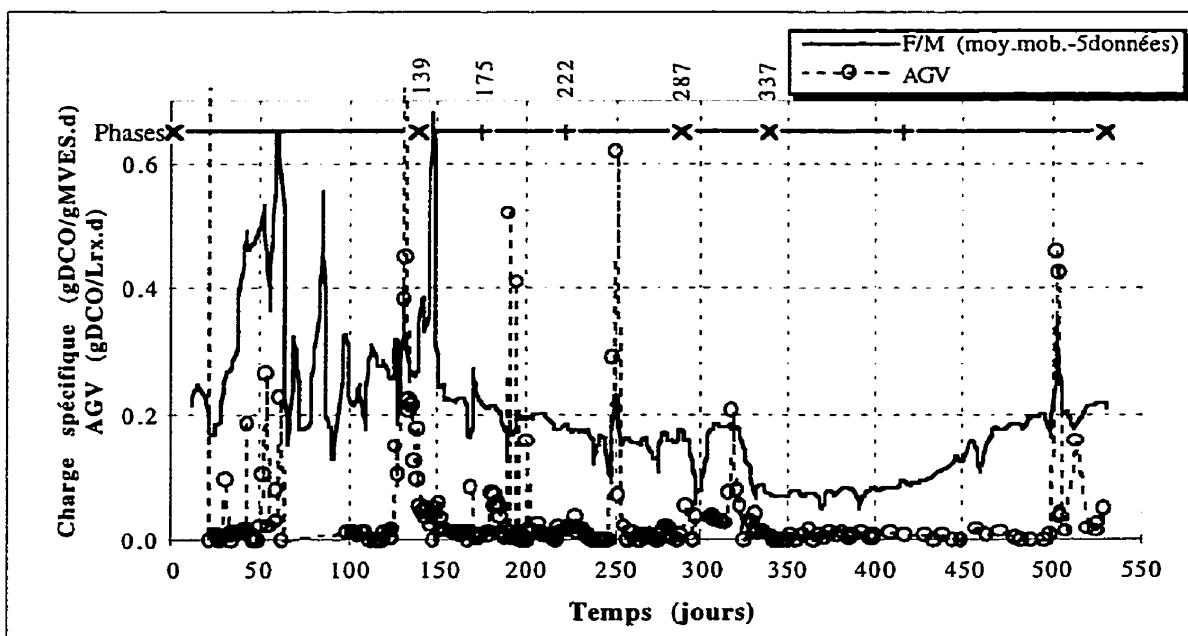


Figure 4.5 - Charge organique spécifique (moyennes mobiles sur 5 données) (F/M en g DCO/g MVES.d) et acides gras volatils (AGV) à l'effluent (g DCO/L<sub>réacteur.d</sub>)

L'efficacité d'enlèvement de la charge organique (définie comme la charge organique enlevée, en g DCO<sub>consommée</sub>/L<sub>réacteur.d</sub>, rapportée à la charge organique alimentée, en g DCO/L<sub>réacteur.d</sub>) a toujours été de l'ordre de 100%, sauf lors des accidents de surcharge

organique, et à la fin de l'expérience où il était de l'ordre de 90%. Lors des surcharges organiques, les baisses de performance d'enlèvement de la charge organique sont liées à un découplage des acidogènes, acétogènes et méthanologènes. L'accumulation des AGV et l'augmentation de la pression partielle en hydrogène sont les indicateurs d'un déséquilibre entre les populations anaérobies. Une baisse de pH trop sévère et une augmentation de la pression partielle en hydrogène peuvent entraîner une inhibition irréversible de ces populations.

Lors de l'acclimatation au TCE, le propionate dans l'effluent a été détecté lorsque les charges en TCE étaient supérieures à  $10 \text{ mg TCE/L}_\text{réacteur}$ . Les surdoses accidentelles en TCE (Figure 4.1) ont également entraîné une apparition du propionate dans l'effluent et une augmentation de l'acétate. Lors des accidents de surcharge organique ou en TCE, le propionate est apparu à l'effluent et sa disparition du système a demandé plus de temps lors des accidents plus importants. Dans le système étudié, le propionate est l'indicateur d'un déséquilibre de fonctionnement du métabolisme anaérobie, comme le prévoit la théorie du métabolisme de l'éthanol en conditions méthanogéniques (Chapitre 2) (Zehnder, 1988).

**La production de méthane dans le réacteur** - Lors de la dégradation par voie anaérobie, le rendement théorique en  $\text{CH}_4$  du substrat (production de  $\text{CH}_4$ , rapportée à la DCO enlevée) est de 0.35 L (STP)  $\text{CH}_4/\text{g DCO}_\text{consommée}$ , sans considérer la part de la DCO allouée à la croissance. En estimant cette part à 10%, le rendement théorique en  $\text{CH}_4$  dans un système anaérobie est de 0.315 L (STP)  $\text{CH}_4/\text{g DCO}_\text{consommée}$ . Dans un système couplé, le rendement en méthane du substrat est d'autant plus bas que le métabolisme aérobie est privilégié.

Dans le système étudié, le rendement en  $\text{CH}_4$  a diminué à partir de valeurs au démarrage supérieures à 0.3 L (STP)  $\text{CH}_4/\text{g DCO}$ , typiques d'un système anaérobie, jusqu'à 0.1 L (STP)  $\text{CH}_4/\text{g DCO}$  au jour 300 (Figure 4.6). Cette diminution a été observée alors que les conditions de couplage avaient été modifiées en faveur du métabolisme aérobie, par augmentation de l'aération (Figure 4.6) et par diminution de la charge organique (Figure 4.3).

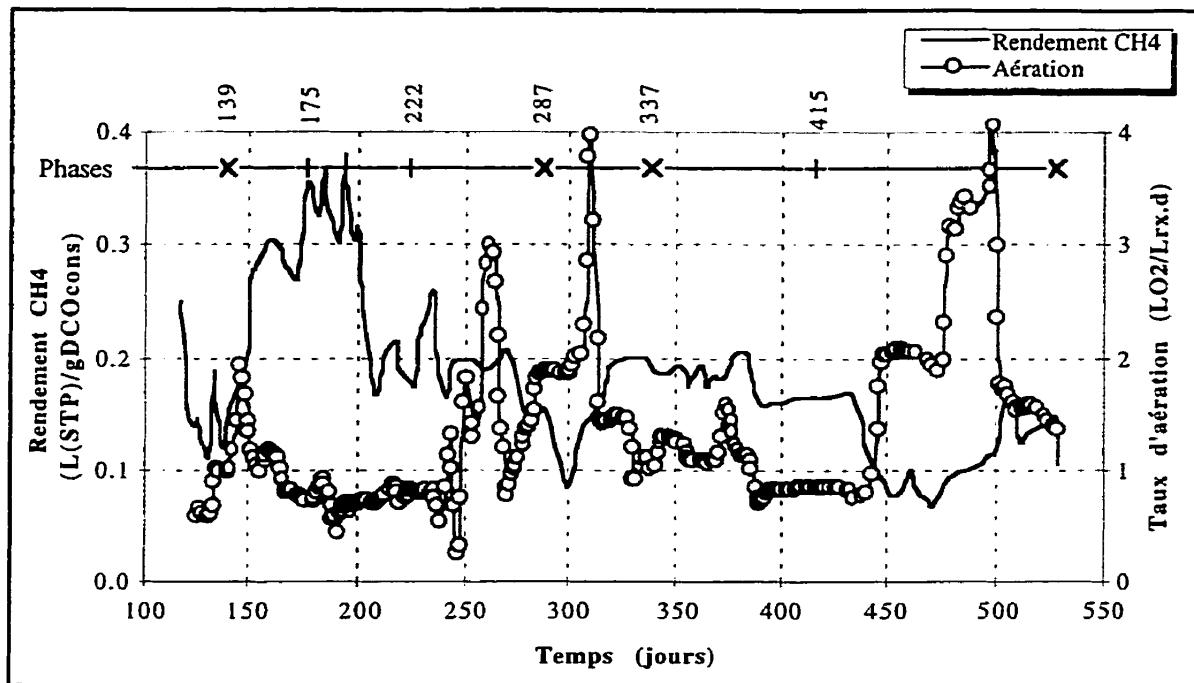


Figure 4.6 - Taux d'aération ( $L\text{ O}_2/L_{réacteur.\text{d}}$ ) et rendement de production de la charge organique en  $\text{CH}_4$  (moyennes mobiles sur 7 données)

**La production de  $\text{CO}_2$  dans le réacteur** - Les modifications des conditions de couplage ont affecté également la productivité nette du  $\text{CO}_2$ , estimée par la mesure de la concentration en  $\text{CO}_2$  dans les effluents gazeux du réacteur (Figure 4.7). La production nette de  $\text{CO}_2$  était basse par rapport aux valeurs rapportées dans un système couplé opéré dans des conditions de couplages similaires (Stephenson et al., 1999). Pour des rendements en méthane de  $0.25\text{ L (STP)} \text{CH}_4/\text{g DCO}_{\text{éliminée}}$ , le rapport des rendements en  $\text{CH}_4$  et  $\text{CO}_2$  rapporté par Stephenson et al. (1999) est de l'ordre de 0.5 sur une base volumique. Dans le système étudié, ce rapport  $\text{CH}_4:\text{CO}_2$  était compris entre 2 et 3 pour la même productivité en  $\text{CH}_4$ . Dans la suite de l'expérience, le rapport  $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ , tout en restant élevé (supérieur à 1), a diminué alors que la productivité en méthane diminuait.

Cependant il faut d'abord noter qu'ici la seule source de carbone était l'éthanol, alors que dans les travaux de Stephenson (1999), c'était le sucre.

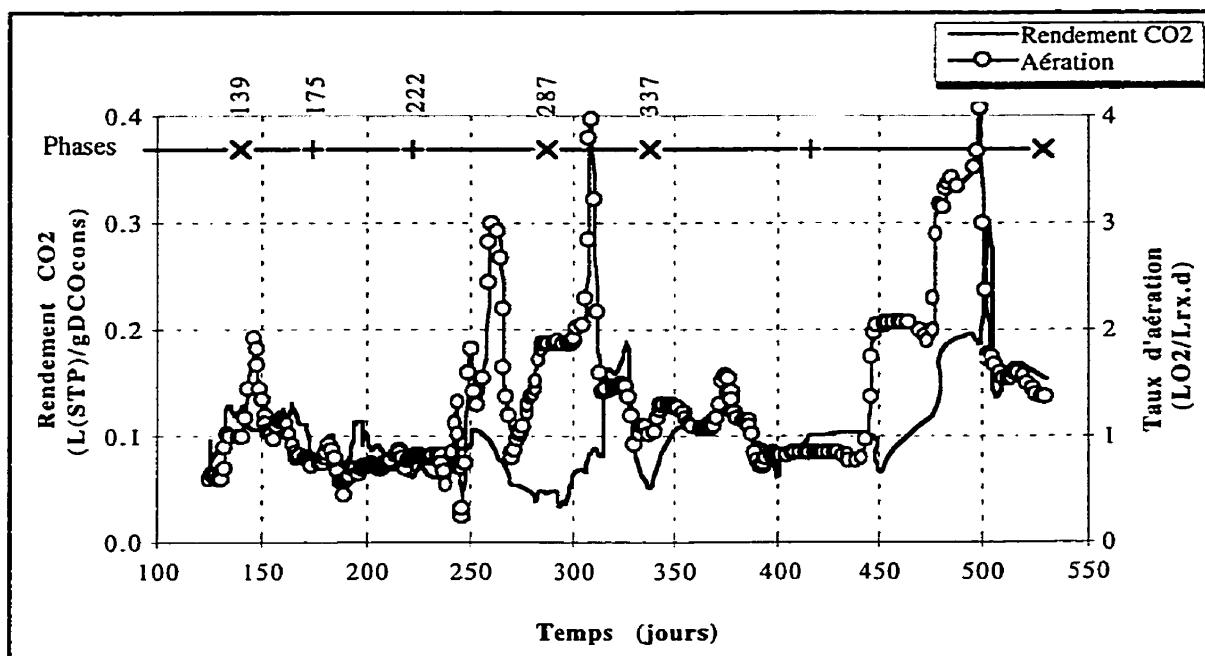
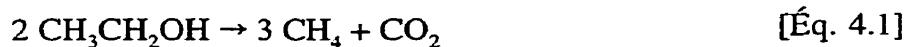


Figure 4.7 - Taux d'aération et rendement de production de la charge organique en  $\text{CO}_2$  (moyennes mobiles sur 7 données)

Le rapport théorique  $\text{CH}_4:\text{CO}_2$  lors de la dégradation de l'éthanol en conditions méthanogènes est de 3:1, d'après l'équation de réaction :



contre 1:1, pour les sucres (glucose par exemple) :



Il est donc normal que, même pour des conditions de couplages similaires, le rapport observé  $\text{CH}_4:\text{CO}_2$  soit de l'ordre de trois fois supérieur aux valeurs observées dans les travaux de Stephenson et al. (1999).

Une raison supplémentaire pour expliquer un déficit en  $\text{CO}_2$  gazeux pourrait être la part du  $\text{CO}_2$  dissous sous forme de bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). L'équilibre entre les trois espèces chimiques présentes en solution ( $\text{CO}_2$  dissous ou  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ ) dépend du pH. Une mesure de l'alcalinité (quantité de bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) et de carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en solution) en entrée et en sortie du réacteur aurait permis de tester et de vérifier l'hypothèse

proposée. Une forte quantité de bicarbonate était apportée au réacteur : le tampon était du bicarbonate de potassium et du bicarbonate de sodium, et la source d'azote était du bicarbonate d'ammonium. Le pH donne néanmoins une indication sur les espèces chimiques prédominantes dans l'effluent. Comme la première constante de dissociation de l'acide carbonique est de 6.4, pour un pH supérieur à 7.4, le bicarbonate serait l'espèce prédominante. Il est donc raisonnable de supposer que le CO<sub>2</sub> produit reste sous forme de bicarbonate en phase liquide. Cependant, l'équilibre entre les trois espèces est plus complexe, la température et l'alcalinité totale doivent être prises en compte pour déterminer les espèces prédominantes selon le pH (Sawyer et al., 1994). À 25°C, à pH 7.0 et pour une alcalinité totale de 100 mg CaCO<sub>3</sub>/L, seulement 20 mg CaCO<sub>3</sub>/L de l'alcalinité sont dus au CO<sub>2</sub> dissous (Sawyer et al., 1994).

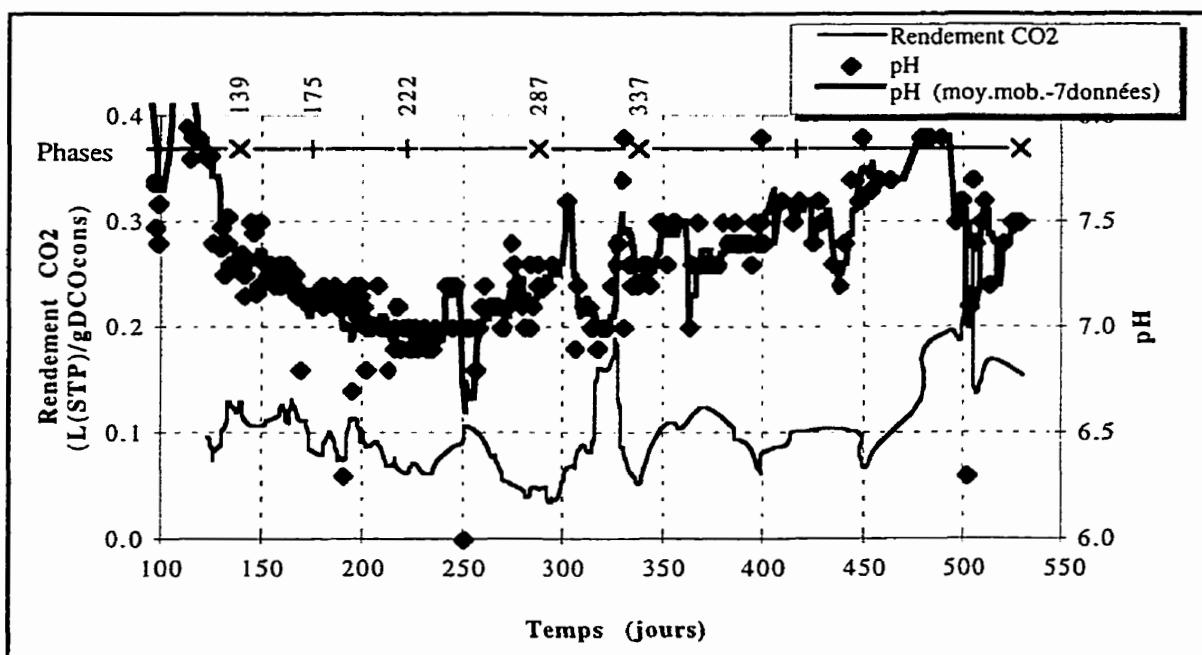


Figure 4.8 - pH (moyennes mobiles sur 7 données) et rendement en CO<sub>2</sub> (moyennes mobiles sur 7 données) dans le réacteur

Dans le réacteur, le pH a varié dans une gamme de 7.0 à 7.8 (Figure 4.8). Au démarrage, le pH très fluctuant traduisait les difficultés d'opération et de stabilisation du réacteur. À la fin de la période de démarrage (jour 130), le pH a été stabilisé et il est resté entre 7.0 et 7.2 jusqu'au jour 250 environ. L'impact du pH durant cette période est donc

probablement marginal. Ensuite, le pH a été de l'ordre de 7.5 ou supérieur. Dans cette seconde partie, il est donc permis de supposer que le CO<sub>2</sub> produit était piégé en partie dans la phase liquide sous forme de bicarbonate. Ceci contribuerait donc, en plus du changement du rapport entre les catabolismes anaérobies et aérobies, au fait que le rapport observé CH<sub>4</sub>:CO<sub>2</sub> ait diminué à des valeurs entre 2 et 1 dans la seconde partie de l'expérience, par comparaison aux valeurs situées entre 3 et 2 du début de l'expérience.

**Dégradation du TCE dans le réacteur** - Le TCE et ses métabolites n'ont pas été détectés en sortie avant le jour 218 (charge en TCE de 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>·d) (Figure 4.9). Après, les composés chlorés détectés ont augmenté régulièrement jusqu'à ce que le flux de sortie soit à peu près équivalent au flux d'entrée sur une base molaire. La seconde période d'alimentation en TCE à faible charge a été caractérisée par une présence constante des chlorés dans les gaz et l'effluent liquide. Le flux sortant était équivalent au flux entrant sur une base molaire et les composés chlorés sortant étaient aux 2/3 dans la phase liquide.

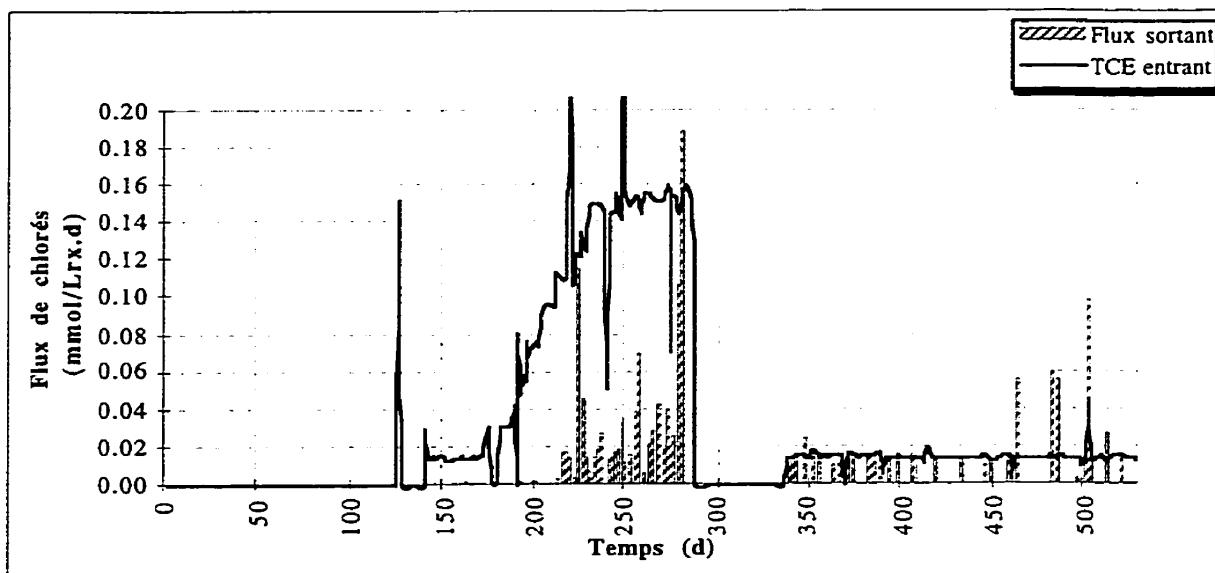


Figure 4.9 - TCE et métabolites en entrée et en sortie du réacteur sur une base molaire (mmol éthènes chlorés/L<sub>réacteur</sub>·d)

Pour la deuxième période d'alimentation en TCE (faible charge), le flux entrant était de l'ordre de 0.15 mmol/L<sub>réacteur</sub>·d. Entre le jour 380 et le jour 430, les résultats ont été stables

et la totalité du TCE entrant était retrouvé à la sortie du réacteur, essentiellement sous forme de c-DCE (Figure 4.11). Le flux dans les gaz était de  $0.005 \text{ mmol/L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ , le TCE représentant moins de 10%, et le flux dans le liquide était de  $0.010 \text{ mmol/L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ , le TCE représentant moins de 5%.

#### 4.1.3 Analyse des performances du réacteur

##### 4.1.3.1 Périodes d'analyse identifiées

Tableau 4.2 - Paramètres d'opération du réacteur au cours des différentes phases opératoires, par périodes de fonctionnement stable du réacteur

Période de calcul (jour)	TCE [2]	Paramètres d'opération [1]					
		TRH (d)	TCE (mg TCE/ $\text{L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ )	X (g MVES/ $\text{L}_{\text{réacteur}}$ )	OLR (g DCO/ $\text{L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ )	F/M (g DCO/g MVES)	Aération ( $\text{L O}_2/\text{L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ )
124-138	0	$1.1 \pm 0.2$	$0.0 \pm 0.0$	$5.1 \pm 0.2$	$1.44 \pm 1.00$	$0.28 \pm 0.20$	$0.73 \pm 0.26$
157-174	2	$1.0 \pm 0.2$	$2.0 \pm 0.2$	$6.8 \pm 0.3$	$1.52 \pm 0.45$	$0.22 \pm 0.06$	$0.90 \pm 0.18$
180-188	5	$1.2 \pm 0.5$	$4.5 \pm 0.6$	$7.7 \pm 0.1$	$1.60 \pm 0.05$	$0.21 \pm 0.01$	$0.72 \pm 0.17$
195-202	10	$1.0 \pm 0.2$	$9.7 \pm 0.4$	$8.2 \pm 0.1$	$1.62 \pm 0.07$	$0.20 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.11$
211-216	15	$1.0 \pm 0.1$	$14.9 \pm 0.2$	$8.7 \pm 0.1$	$1.66 \pm 0.10$	$0.19 \pm 0.01$	$0.74 \pm 0.07$
256-266	20[3]	$1.1 \pm 0.2$	$20.0 \pm 0.4$	$10.3 \pm 0.1$	$1.67 \pm 0.11$	$0.16 \pm 0.01$	$2.26 \pm 0.87$
275-285	20[4]	$1.0 \pm 0.1$	$20.1 \pm 0.5$	$9.9 \pm 0.1$	$1.64 \pm 0.13$	$0.16 \pm 0.01$	$1.37 \pm 0.28$
327-336	0	$0.9 \pm 0.2$	$0 \pm 0$	$8.4 \pm 0.1$	$0.69 \pm 0.18$	$0.08 \pm 0.02$	$1.08 \pm 0.29$
390-415	2	$1.0 \pm 0.2$	$1.8 \pm 0.5$	$6.6 \pm 0.2$	$0.52 \pm 0.13$	$0.08 \pm 0.02$	$0.75 \pm 0.05$
504-530	2	$1.1 \pm 0.3$	$1.9 \pm 0.2$	$2.6 \pm 0.1$	$0.54 \pm 0.05$	$0.21 \pm 0.02$	$1.37 \pm 0.15$

[1] moyennes sur des mesures journalières en conditions stationnaires

[2] valeur de la consigne de charge en TCE (mg TCE/ $\text{L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ )

[3] et [4] : même charge en TCE (20 mg TCE/ $\text{L}_{\text{réacteur}} \cdot \text{d}$ ), mais [3] aération augmentée et [4] fin de la période à forte charge

Les performances du réacteur ont été analysées sur des périodes stationnaires, sans accidents ou perturbations d'opération et suffisamment longues pour être représentatives. Chaque phase de charge en TCE a été représentée au moins par une période. Les phases de charge en TCE ne correspondent pas à une période de conditions d'opération stables et, pour cette raison, il était nécessaire de faire l'analyse des performances par période stable du point de vue des opérations et des performances. Pour chacune des périodes, des moyennes des paramètre d'opération et de performance ont été calculées. Les tableaux complets des moyennes des paramètres d'opération et des paramètres de performance

sont fournis en Annexe 6. Cette méthode d'analyse par période a été choisie afin de caractériser les périodes et de comparer justement des données, en vue d'établir des corrélations entre les paramètres. Les conditions d'opération du réacteur lors des périodes d'analyse choisies sont décrites dans le Tableau 4.2.

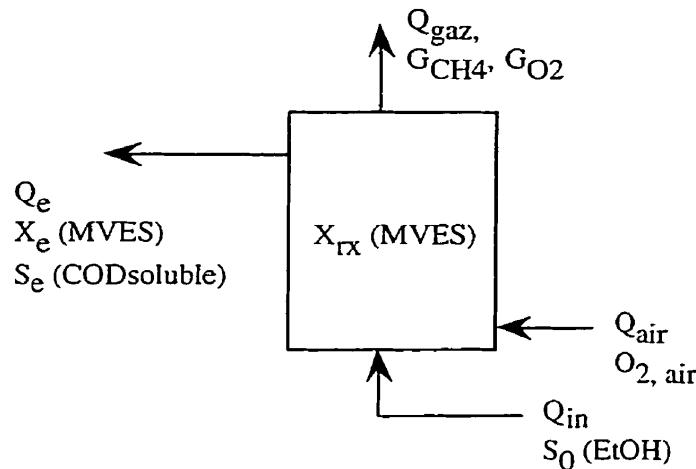
#### 4.1.3.2 Bilan DCO autour du réacteur

Le bilan sur la demande chimique en oxygène (DCO) dans le système couplé a été calculé sur les périodes stationnaires définies, afin de voir les effets éventuels des modifications des conditions de couplage ou de la charge en TCE. Le bilan sur la DCO devait être un outil de suivi du fonctionnement global, indicateur des conditions de couplage dans le réacteur.

Le paramètre central du bilan DCO est le taux de charge organique (OLR). Tous les autres éléments du bilan DCO sont calculés et rapportés à ce taux de charge et ils sont exprimés en unités DCO. Le bilan est la somme de ces éléments et il ferme lorsqu'il est égal à 100%. L'écriture du bilan DCO par phase évalue la part de chaque phénomène représenté par un élément du bilan.

Un bilan DCO simplifié est adapté au système couplé étudié (Figure 4.10) :

- le taux de charge organique est égal à l'alimentation en éthanol,
- l'accumulation dans le réacteur est estimée par les mesures ponctuelles de MVES dans le réacteur, considérant que dans le réacteur la variation de DCO soluble est négligeable,
- l'oxygène consommé est soustrait à la charge organique d'entrée du réacteur,
- la DCO en sortie du réacteur comporte trois termes : la DCO soluble et la DCO particulaire dans l'effluent liquide, et la DCO sous forme de méthane dans les gaz.



$Q_{\text{in}}$ : débit d'alimentation ( $L_{\text{affluent}}/d$ ),  $S_0$ : charge organique dans l'affluent  
( $\text{g DCO}/L_{\text{affluent}}$ )

$Q_{\text{air}}$ : débit d'aération ( $L_{\text{air}}/d$ );  $O_2, \text{air}$ : concentration d' $O_2$  dans l'air d'entrée ( $\text{g O}_2/L_{\text{air}}$ )

$Q_e$ : débit effluent ( $L_{\text{effluent}}/d$ ),  $X_e$ : MVES à l'effluent ( $\text{g DCO}/L_{\text{effluent}}$ ),  
 $S_e$ : COD soluble à l'effluent ( $\text{g DCO}/L_{\text{effluent}}$ )

$Q_{\text{gaz}}$ : débit de biogaz ( $L_{\text{gaz}}/d$ );  $G_{\text{CH}_4}$  et  $G_{\text{O}_2}$ : concentrations en  $\text{CH}_4$  ( $\text{g DCO}/L_{\text{gaz}}$ ) et en  $\text{O}_2$   
( $\text{g O}_2/L_{\text{gaz}}$ )

$X_{\text{RX}}$ : accumulation de MVES dans le réacteur ( $\text{g DCO}/L_{\text{réacteur}}$ )

Figure 4.10 - Éléments du bilan DCO

En utilisant les termes définis dans la Figure 4.10, le bilan DCO s'écrit :

$$\text{Bilan}(\%) = \frac{Q_{\text{air}} \times O_{2,\text{air}} + V_{\text{rx}} \frac{dX_{\text{rx}}}{dt} + Q_e \times (X_e + S_e) + Q_{\text{gaz}} \times (G_{\text{CH}_4} - G_{\text{O}_2})}{Q_{\text{in}} \times S_0} \quad [\text{Éq. 4.3}]$$

Soit en divisant par  $V_{\text{rx}}$  et avec  $Q_{\text{in}} = Q_e$  :

$$\text{Bilan}(\%) = \frac{\phi O_2 + \frac{\Delta X_{\text{rx}}}{\Delta t} + D \times X_e + D \times S_e + \phi G_{\text{CH}_4}}{OLR} \quad [\text{Éq. 4.4}]$$

avec :

$$OLR = \frac{Q_{\text{in}} \times S_0}{V_{\text{rx}}} \quad \begin{array}{l} \text{charge organique à l'entrée du réacteur} \\ (\text{g DCO}/L_{\text{réacteur}} \cdot d) \end{array}$$

$$\phi O_2 = \frac{Q_{\text{air}} \times O_{2,\text{air}} - Q_{\text{gaz}} \times G_{\text{O}_2}}{V_{\text{rx}}} \quad \begin{array}{l} \text{efficacité volumique de consommation d'oxygène} \\ (\text{g O}_2/L_{\text{réacteur}} \cdot d) \end{array}$$

$\frac{\Delta X_{rx}}{\Delta t}$	taux volumique d'accumulation de la biomasse dans le réacteur (g DCO/L <sub>réacteur</sub> .d)
$D = \frac{Q_{in}}{V_{rx}}$	taux de dilution (d <sup>-1</sup> )
$D \times X_e = \frac{Q_e \times X_e}{V_{rx}}$	flux de lessivage de la biomasse à l'effluent sur une base volumique (g DCO/L <sub>réacteur</sub> .d)
$D \times S_e = \frac{Q_e \times S_e}{V_{rx}}$	flux de sortie de DCO soluble à l'effluent sur une base volumique (g DCO/L <sub>réacteur</sub> .d)
$\phi G_{CH_4} = \frac{Q_{gaz} \times G_{CH_4}}{V_{rx}}$	flux de sortie de méthane dans les gaz sur une base volumique (g DCO/L <sub>réacteur</sub> .d)

Pendant la phase de démarrage et au cours de la première moitié de la phase d'acclimatation au TCE, le bilan de DCO était pratiquement fermé : jusqu'au jour 202, le bilan était proche de 100%, excepté pour la période 124-138 jours où il était de 80%, ce qui est probablement imputable à des erreurs expérimentales (défaillance des mesures de débits de gaz, voir section 4.1.2). À partir de la charge de 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d, les bilans calculés ont diminué à 70% ou moins (entre autres 39%, à la fin de la période d'acclimatation au TCE, à la charge de 20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d) (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 - Bilan DCO autour du réacteur

Période de calcul (jour)	TCE	Éléments du bilan DCO (g DCO/L <sub>réacteur</sub> .d)						Bilan DCO (%)
		OLR	$\phi O_2$	$\Delta X_{rx}/\Delta t$	D.Xe	D.Se	$\phi G_{CH_4}$	
124-138	0	1.44 ± 1.00	0.10 ± 0.05	0.07 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.12 ± 0.13	[3] 0.79 ± 0.43	80
157-174	2	1.52 ± 0.44	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.00	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.04	1.29 ± 0.28	98
180-188	5	1.60 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01	1.41 ± 0.20	100
195-202	10	1.62 ± 0.07	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.06	0.09 ± 0.14	1.35 ± 0.24	97
211-216	15	1.66 ± 0.10	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.94 ± 0.13	63
256-266	20[1]	1.67 ± 0.11	0.41 ± 0.17	0.01 ± 0.14	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.69 ± 0.21	70
275-285	20[2]	1.64 ± 0.13	0.09 ± 0.05	-0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.52 ± 0.14	39
327-336	0	0.69 ± 0.18	0.14 ± 0.08	-0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.34 ± 0.08	70
390-415	2	0.52 ± 0.13	0.16 ± 0.05	-0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.26 ± 0.06	78
504-530	2	0.54 ± 0.05	0.28 ± 0.05	-0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.05	0.20 ± 0.09	104

[1] et [2] : même charge en TCE (20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d), mais aération augmentée [1] et fin de la période à forte charge [2]

[3] évaluation sur la base d'une productivité estimée de 0.3 L (STP) CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub>.d

1 - perturbations importantes du réacteur rendant les mesures de gaz peu fiables;

2 - le rendement estimé en CH<sub>4</sub> de 0.23 L (STP) CH<sub>4</sub>/g DCO<sub>consommé</sub> probable d'après les conditions d'aération et de charge organique

Cependant, par la suite, le bilan calculé a réaugmenté et a atteint des valeurs de l'ordre de 100%, à la fin de l'expérience. Les bilans calculés trop faibles correspondaient à des périodes de charge en TCE élevées (à partir de 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>/d), de diminution de la productivité du réacteur en CH<sub>4</sub> et de diminution du contenu en biomasse du réacteur.

Les déficits dans les bilans semblent liés à une charge élevée en TCE dans le réacteur. Il est possible que le TCE, à partir d'une certaine dose, agisse comme agent découplant, au niveau des chaînes respiratoires, qu'elles soient anaérobies ou aérobies. Dans le cas d'un rôle du TCE en tant qu'agent découplant, une dissipation d'énergie biologique (équivalents-réducteurs) est possible, avec un déficit au niveau de la biosynthèse ou/et des fuites d'équivalents-réducteurs (Lehninger, 1978). Il est donc possible que certains éléments du bilan n'aient pas été pris en compte et mesurés, ce qui expliquerait la non fermeture du bilan. Ajoutons que le flux d'hydrogène sortant du réacteur a toujours été considéré comme négligeable et n'a jamais été pris en compte dans le calcul du bilan. Il est cependant probable que, durant les périodes de perturbation, une production supplémentaire d'hydrogène ait eu lieu parallèlement aux AGV. La production supplémentaire d'hydrogène aurait certainement dû être prise en compte.

#### **4.1.3.3 Impact du couplage sur la performance du réacteur : enlèvement de la charge organique primaire et productivité en méthane**

Le Tableau 4.4 nous montre que l'enlèvement de la charge était presque complet durant toute la durée de l'expérience, avec des valeurs d'efficacité (ORE) fluctuant entre 90 et 100%. Le couplage n'a donc pas affecté la capacité d'enlèvement de la DCO du réacteur. Au contraire, la comparaison des niveaux d'efficacité avant et après les modifications des conditions de couplage (au jour 250), montre une nette tendance à un accroissement de l'efficacité après que le taux d'aération ait été augmenté. Les valeurs sont passées d'une fluctuation dans une gamme de 90-100% à une gamme beaucoup plus étroite de 98-100%, si l'on excepte la valeur plus faible (91%) à la dernière période (période 504-530). Cette valeur de 91% est probablement attribuable au fait que le réacteur ne contenait plus beaucoup de biomasse active, le contenu en biomasse ayant diminué plus que deux fois par rapport aux périodes précédentes. Il est plausible de penser que l'accroissement du rapport des catabolismes aérobie/anaérobie a permis d'atteindre des concentrations de DCO plus basses à l'effluent et a favorisé la capacité de polissage du système.

Tableau 4.4 - Performances du système

Période de calcul (jour)	Étape expérimentale		Paramètres de performance du réacteur [1]				
	TCE [2]	Densité de biomasse (g MVES/Lréacteur.d)	ORE (%)	CH <sub>4</sub> dans biogaz du réacteur (%)	Productivité en CH <sub>4</sub> (L(STP) CH <sub>4</sub> /Lréacteur.d)	Productivité en CO <sub>2</sub> (L(STP) CO <sub>2</sub> /Lréacteur.d)	
124-138	0	0± 0	5.1± 0.2	90 ± 9	59± 16	[5] 0.30± 0.16	0.13± 0.04
157-174	2	2.0± 0.2	6.8± 0.3	92 ± 5	65± 6	0.49± 0.11	0.18± 0.04
180-188	5	4.5± 0.6	7.7± 0.1	97 ± 1	72± 3	0.53± 0.08	0.14± 0.04
195-202	10	9.7± 0.4	8.2± 0.1	94 ± 9	61± 21	0.51± 0.09	0.17± 0.05
211-216	15	14.9± 0.2	8.7± 0.1	100 ± 0	70± 4	0.36± 0.05	0.15± 0.04
256-266	20[3]	20.0± 0.4	10.3± 0.1	98 ± 2	63± 8	0.26± 0.08	0.14± 0.04
275-285	20[4]	20.1± 0.5	9.9± 0.1	99 ± 1	52± 3	0.19± 0.05	0.06± 0.03
327-336	0	0.0± 0.0	8.4± 0.1	98 ± 6	35± 19	0.13± 0.03	0.05± 0.03
390-415	2	1.8± 0.5	6.6± 0.2	100 ± 1	38± 2	0.10± 0.02	0.04± 0.02
504-530	2	1.9± 0.2	2.6± 0.1	91 ± 10	25± 2	0.08± 0.03	0.07± 0.03

[1] moyennes sur des mesures journalières en conditions stationnaires

[2] valeur de la consigne de charge en TCE (mg TCE/Lréacteur.d)

[3] et [4] : même charge en TCE (20 mg TCE/Lréacteur.d), mais aération augmentée [3] et fin de la période à forte charge [4]

[5] estimation sur la base d'une productivité estimée de 0.3 L (STP) CH<sub>4</sub>/Lréacteur.d

1 - perturbations importantes du réacteur rendant les mesures de gaz peu fiables;

2 - le rendement estimé en CH<sub>4</sub> de 0.23 L (STP) CH<sub>4</sub>/g DCO<sub>enlevée</sub> semblait probable d'après les conditions d'aération

La production nette de méthane dans le système a diminué de 0.5 L (STP) CH<sub>4</sub>/Lréacteur.d à 0.05 L (STP) CH<sub>4</sub>/Lréacteur.d. Dans un système strictement anaérobiose, le rendement théorique de production de méthane est de 0.315 L (STP) CH<sub>4</sub>/g DCO<sub>enlevée</sub>, en estimant à 10% la part de la DCO enlevée allouée à la croissance. Les conditions d'aération appliquées dans le système ne sont pas inhibitrices des méthanogènes (Kato et al., 1993; Stephenson et al., 1999; Shen et al., 1996). Le rendement net de production de méthane dépend donc principalement de la part de la DCO consommée en aérobiose et de l'activité méthanotrophe dans le réacteur. Une augmentation du rendement d'oxydation de la charge organique (O<sub>2</sub> consommé rapporté à la DCO totale consommée) ne permet donc pas de prédire simplement (linéairement) la diminution de rendement de production du méthane. Il y a cependant une corrélation inverse entre le rendement en CH<sub>4</sub> (exprimé en équivalent-O<sub>2</sub>, en % de la DCO enlevée) et le rendement d'oxydation. Après les

modifications des conditions de couplage en faveur de l'aérobiose, le rendement d'oxydation du substrat a été augmenté, signifiant que la part de la dégradation du substrat par voie aérobiose a augmenté, entraînant une diminution du rendement en CH<sub>4</sub> et de la part de la DCO dégradée par voie anaérobiose (Tableau 4.4 et Tableau 4.5).

Tableau 4.5 - Rendements de production de CH<sub>4</sub> et rendement d'oxydation de la charge organique dans le réacteur

Période de calcul (jour)	Densité de biomasse [2] (g MVES/ L <sub>réacteur</sub> )	Rendement [1] (g O <sub>2,consommé</sub> / g DCO <sub>consommé</sub> )	Rendement en CH <sub>4</sub> [1] (L(STP) CH <sub>4</sub> / g DCO <sub>consommé</sub> )	CH <sub>4</sub> -DCO/ DCO <sub>consommé</sub> (%)
124-138	0	5.1± 0.2	0.10± 0.05	[5] 0.23± 0.26
157-174	2	6.8± 0.3	0.07± 0.02	0.35± 0.19
180-188	5	7.7± 0.1	0.05± 0.01	0.34± 0.06
195-202	10	8.2± 0.1	0.04± 0.01	0.33± 0.09
211-216	15	8.7± 0.1	0.05± 0.00	0.21± 0.05
256-266	20[3]	10.3± 0.1	0.41± 0.17	0.16± 0.06
275-285	20[4]	9.9± 0.1	0.09± 0.05	0.12± 0.05
327-336	0	8.4± 0.1	0.14± 0.08	0.19± 0.10
390-415	2	6.6± 0.2	0.16± 0.05	0.18± 0.07
504-530	2	2.6± 0.1	0.28± 0.05	0.15± 0.10

[1] moyennes sur des mesures journalières en conditions stationnaires

[2] valeur de la consigne de charge en TCE (mg TCE/Lréacteur.d)

[3] et [4] : même charge en TCE (20 mg TCE/Lréacteur.d), mais aération augmentée [3] et fin de la période à forte charge [4]

[5] estimation sur la base d'une productivité estimée de 0.3 L (STP) CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub>.d

1 - perturbations importantes du réacteur rendant les mesures de gaz peu fiables;

2 - dans les conditions d'opération du réacteur, le rendement estimé en CH<sub>4</sub> de 0.23 L (STP) CH<sub>4</sub>/g DCOconsommée semblait acceptable

Avant les modifications des conditions de couplage, la production de méthane était dans une gamme de 0.3 à 0.5 L (STP) CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub>.d et le pourcentage de méthane dans l'atmosphère du réacteur était de l'ordre de 60% à 70% (Tableau 4.4). Ce niveau de productivité en méthane permet une très bonne croissance des méthanotrophes dans un réacteur couplé (Shen et al, 1996). Après les modifications de couplage en faveur du métabolisme aérobiose, ce pourcentage a diminué tout au long de l'expérience et, à la fin, il était de 25% (Tableau 4.4). Dans la littérature, les cultures d'enrichissement en

méthanotrophes en phase liquide sont réalisées sous un flux d'un mélange gazeux CH<sub>4</sub>:(air-CO<sub>2</sub>) dans des proportions 1:4 sur une base volumique (Henry et Grbic-Galic, 1990; Stanley et al., 1988; Tsien et al., 1989). Il est donc raisonnable de penser que le méthane dans notre système couplé n'était pas limitant pour la croissance des méthanotrophes. Dans les cultures d'enrichissement en méthanotrophes, le mélange air-CO<sub>2</sub> contient 10 à 20% de CO<sub>2</sub> sur une base volumique, et le rapport CH<sub>4</sub>:O<sub>2</sub> est donc de l'ordre de 2:1 à 1.8:1 sur une base volumique. Un rapport CH<sub>4</sub>:O<sub>2</sub> élevé est considéré comme favorable à la croissance des méthanotrophes. Dans le réacteur, ces conditions prévalaient, probablement au moins au démarrage et dans la première partie de la phase d'acclimatation. Ensuite ce rapport CH<sub>4</sub>:O<sub>2</sub> a probablement diminué avec l'augmentation de l'aération (valeurs de CH<sub>4</sub> et d'O<sub>2</sub> dissous dans le réacteur non disponibles). Notons qu'il est possible que le méthane en solution dans notre système ne soit pas en sursaturation aussi forte que dans des réacteurs anaérobies, en raison de la consommation par les méthanotrophes.

La loi de Henry a été utilisée pour estimer le CH<sub>4</sub> dissous dans le réacteur, en supposant le liquide en équilibre avec l'atmosphère dans le haut du réacteur. Le calcul avec des coefficients de Henry de la littérature (Metcalf et Eddy, 1991) a donné des concentrations de 14 mg CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub> à 70% de CH<sub>4</sub> dans le gaz et 5 mg CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub> à 25% de CH<sub>4</sub> dans le gaz. Dans des systèmes anaérobies, la concentration réelle en méthane dissous peut excéder de 12 à 70 fois la valeur de saturation calculée avec la loi de Henry en considérant la phase liquide en équilibre avec le biogaz, en raison du transfert de masse de la phase liquide à la phase gazeuse qui est limitant par rapport à la productivité (Pauss et al., 1990). Il est donc raisonnable de considérer que dans le système étudié, la concentration en CH<sub>4</sub> dissous était au moins égale aux valeurs calculées avec la loi de Henry. Enfin, dans une gamme de 1.6 à 16.5 mg CH<sub>4</sub>/L, l'activité de l'enzyme sMMO (oxydation du méthane par les méthanotrophes) dans des cellules de *Methylosinus trichosporium* OB3b est stimulée par l'augmentation de concentration du CH<sub>4</sub> dissous lors de la culture en réacteur (Bowman et Sayler, 1994).

La productivité en CH<sub>4</sub> du réacteur (0.50 L (STP) CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub>.d au début de l'expérience et 0.05 L (STP) CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub>.d à la fin de l'expérience) a donc été favorable à un enrichissement en méthanotrophes pendant toute l'expérience.

Les productivités en CH<sub>4</sub> et en CO<sub>2</sub> du réacteur ont diminué tout au long de l'expérience à peu près en parallèle (coefficient de corrélation linéaire de 0.78). Le rapport entre la productivité en CH<sub>4</sub> et la productivité en CO<sub>2</sub> du réacteur est resté compris entre 2.5 et 3.1, sauf à certaines périodes : au moment de la plus forte productivité en CH<sub>4</sub> ce rapport était de 3.8, à la fin de l'acclimatation au TCE (20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d) le rapport est tombé à 1.8, puis dans la dernière phase d'acclimatation ce rapport était de 2.3 puis de 1.1 à la fin de l'expérience. Le rapport entre les deux productivités CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub> du réacteur n'a pas changé exactement au moment du changement des conditions de couplage, il a diminué plus tard. La mesure dans les gaz du CH<sub>4</sub> et du CO<sub>2</sub> n'a donc pas permis de suivre simplement le changement de la part des catabolismes aérobie et anaérobiose. Il a été expliqué plus haut que la mesure dans les gaz est sans doute insuffisante pour estimer la production de CO<sub>2</sub> et qu'une mesure de l'alcalinité aurait été utile.

#### 4.1.3.4 Performances de transformation et de dégradation complète du TCE dans le réacteur

Tableau 4.6 - Performances de dégradation du TCE dans le réacteur

Période de calcul (jour)	[2]	Étape expérimentale		Densité de biomasse (g MVES/L <sub>réacteur</sub> )	Taux spécifiques [1]	
		Charge en TCE (mg TCE/L <sub>réacteur</sub> .d)	(μmol TCE/g MVES.d)		Transformation (μmol TCE/g MVES.d)	Dégradation complète (μmol TCE/g MVES.d)
124-138	0			5.1±0.2		
157-174	2	2.0±0.2	2.3±0.3	6.8±0.3	2.1±0.5	2.1±0.5
180-188	5	4.5±0.6	4.5±0.5	7.7±0.1	4.1±0.0	4.1±0.0
195-202	10	9.7±0.4	9.0±0.3	8.2±0.1	8.9±0.4	8.9±0.4
211-216	15	14.9±0.2	13.1±0.3	8.7±0.1	11.9±1.6	11.9±1.6
256-266	20[3]	20.0±0.4	15.0±0.3	10.3±0.1	14.3±1.1	11.9±2.5
275-285	20[4]	20.1±0.5	15.5±0.4	9.9±0.1	14.1±0.5	7.5±6.6
327-336	0	0.0±0.0	0.0±0.0	8.4±0.1		
390-415	2	1.8±0.5	2.2±0.6	6.6±0.2	2.2±0.1	0.1±0.1
504-530	2	1.9±0.2	5.7±0.6	2.6±0.1	2.9±2.6	[5] 0.0

[1] moyennes sur des mesures journalières en conditions stationnaires

[2] valeur de la consigne de charge en TCE (mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d)

[3] et [4] : TCE (20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d), mais [3] aération augmentée et [4] fin de la période à forte charge

[5] : sur une période de calcul de 100 jours (400-500) le taux spécifique de dégradation complète du TCE est de 0.6 μmol TCE/g MVES.d

À des charges inférieures à 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d, aucun sous-produit chloré n'a été détecté à l'effluent du réacteur et plus de 95% du TCE étaient dégradés (Tableau 4.6). Par la suite, les concentrations en TCE et en c-DCE ont fluctué selon la charge à l'entrée, le c-DCE augmentant régulièrement. À la charge de 20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d, le c-DCE et le TCE à l'effluent représentaient sur une base molaire 15-25% du TCE alimenté. Dans les 10 derniers jours de la période à charge maximale, le c-DCE a augmenté à l'effluent pour devenir prépondérant. A l'arrêt de l'alimentation en TCE, le flux de sous-produits chlorés sortant était égal au flux entrant sur une base molaire.

Lors de la reprise de l'alimentation en TCE à 2 mg/L<sub>réacteur</sub>.d, 90 à 95% du TCE entrant sortaient à l'effluent sous forme de c-DCE. Ce taux de déchloration est resté stable et aucune amélioration des performances de déchloration complète n'a été observée.

La capacité de dégradation complète du TCE a donc été montrée jusqu'à 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d, puis la poursuite de l'augmentation de charge et/ou les surcharges ont entraîné la perte de la capacité de dégradation au-delà du c-DCE. Seule la capacité de déchloration en c-DCE a été conservée à la seconde période de faible charge en TCE.

La charge en TCE de 10-15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d n'est pas une très forte charge. Des charges de l'ordre de 100 mg PCE/L<sub>réacteur</sub>.d en réacteur anaérobie ont déjà été reportées avec une déchloration du PCE en VC (Mansour et al., 1998). Des charges supérieures à 40 mg PCE/L<sub>réacteur</sub>.d en réacteur couplé anaérobie/aérobiose ont été reportées avec une déchloration complète du PCE (Tartakovsky et al., 1998). La toxicité du TCE dans le système étudié n'est donc pas obligatoirement la seule cause de la perte de capacité de dégradation du TCE.

Le méthane a des effets antagonistes sur la dégradation du TCE par les méthanotrophes possédant la sMMO (enzyme responsable de l'oxydation cométabolique du TCE) : 1) un effet négatif dû à l'inhibition compétitive entre le CH<sub>4</sub> et le TCE, et des effets positifs, 2) la régénération des équivalents réducteurs, 3) l'induction de la sMMO et 4) la régénération des cellules inactivées par croissance cellulaire (Chang et Alvarez-Cohen, 1995a; Smith et McCarty, 1997).

Il a été montré en laboratoire que dans des colonnes de sol aérobies, le méthane dissous à 4.5 mg CH<sub>4</sub>/L inhibe la dégradation cométabolique du TCE, tandis qu'à 1.5 mg/L la

dégradation avait lieu (Lanzarone et McCarty, 1990). La valeur seuil de méthane dissous pour limiter l'inhibition compétitive défavorable à la dégradation du TCE est donc inférieure à 4.5 mg CH<sub>4</sub>/L d'après cette étude. Or dans le système étudié, il a été calculé que la concentration en CH<sub>4</sub> était de 5 à 15 mg CH<sub>4</sub>/L au moins et sans doute plus en raison de phénomènes de sursaturation observés dans des réacteurs anaérobies. Aux périodes de dégradation maximale du TCE dans le réacteur (12 à 14 µmol TCE/g MVES·d), le rendement de production du méthane était entre 0.2 et 0.5 L (STP) CH<sub>4</sub>/L<sub>réacteur</sub>·d, et le méthane dissous était probablement supérieur à 10 mg CH<sub>4</sub>/L. Dans notre système, la forte productivité en méthane et donc la forte concentration en CH<sub>4</sub> dissous n'étaient donc pas des obstacles à une dégradation complète du TCE.

Dans un réacteur aérobie, Smith et McCarty (1997) ont montré que les taux de dégradation du TCE à faible concentration (1 mg TCE/L) sont réduits en présence de CH<sub>4</sub> à des concentrations de 4 à 8 mg CH<sub>4</sub>/L. En revanche, à des concentrations en TCE élevées, de 6 à 17 mg TCE/L, les mêmes concentrations en CH<sub>4</sub> augmentaient le cométabolisme du TCE. Ces résultats montrent que la concentration en CH<sub>4</sub> dissous dans le système ne doit pas être considérée indépendamment des autres paramètres, i.e. l'oxygène dissous et le TCE, pour déterminer les valeurs optimales de dégradation du TCE par des méthanotrophes.

Enfin, Chang et Alvarez-Cohen (1995a) ont montré que dans une culture mixte de méthanotrophes, le CH<sub>4</sub> en faible concentration (moins de 0.2 mg CH<sub>4</sub>/L) augmentait la vitesse initiale spécifique de dégradation du TCE (concentration initiale de 7.95 mg TCE/L et 1 g MVES/L), puis à des concentrations plus fortes, l'augmentation de CH<sub>4</sub> diminuait la vitesse spécifique initiale de dégradation du TCE. Ils ont obtenu une réponse immédiate des microorganismes à l'augmentation de concentration du CH<sub>4</sub>, ce qui est en faveur de l'action de processus rapides comme la régénération de NADH.

Le pH a augmenté dans le réacteur peu à peu à partir du jour 250, au moment de la charge maximale en TCE. Au même moment, la capacité de dégradation complète du TCE a diminué pour atteindre une valeur quasiment nulle. Park et al. (1991) ont montré que, dans des cultures de *Methylosinus trichosporium* OB3b en flacons, à un pH supérieur à 7.5, le taux de croissance méthanotrophe et l'activité sMMO diminuent et la phase de

latence augmente. Phelps et al. (1990) ont montré que l'augmentation du pH de 7.2 à 7.5 dans un réacteur aérobie recirculé en continu a causé la perte de capacité de dégradation du TCE. La capacité de dégradation du TCE a été cependant récupérée en 1 journée seulement après le retour à un pH de 7.2. L'augmentation de pH dans le réacteur a donc pu avoir un effet sur les populations méthanotrophes du réacteur.

Il est important de noter également que la forte augmentation du taux d'aération aux jours 256-266 a pu avoir un effet négatif sur les populations méthanotrophes. En absence de CH<sub>4</sub>, l'aération a un effet toxique fort sur des cultures méthanotrophes en bouteilles (Alvarez-Cohen et McCarty, 1991b; Dalton et al., 1993). Dans des cultures méthanotrophes cométabolisant le TCE, la toxicité de l'aération et la toxicité du TCE sont de deux types : 1) l'aération diminue l'activité catalytique sMMO, elle a donc un effet toxique spécifique, tandis que 2) le TCE a un effet toxique non spécifique entraînant des dommages cellulaires généraux, mesurés par une diminution et une perte finalement d'activité respiratoire des cellules endommagées (Chu et Alvarez-Cohen, 1999). Lors de l'étude de la toxicité de l'aération et du TCE, Chu et Alvarez-Cohen (1999) ont montré une forte dépendance de la sensibilité des cultures vis-à-vis de la source d'azote qu'elles étaient capables d'utiliser. Ils concluent que les méthanotrophes fixatrices de N<sub>2</sub> sont plus résistantes, probablement en raison d'une production accrue de sMMO.

Dans notre réacteur, deux sources d'azote étaient disponibles pour les méthanotrophes pendant toute la durée de l'expérience. Il s'agissait de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>). Les méthanotrophes fixatrices de N<sub>2</sub> ont donc pu être sélectionnées. L'aération a été augmentée au moment de la plus forte charge en TCE, donc au moment où les produits toxiques de dégradation du TCE étaient susceptibles d'être en plus grande concentration. Cette modification des conditions d'opération avait pour but d'augmenter le métabolisme aérobie, et plus spécifiquement le métabolisme méthanotrophe. Il est possible que cette modification ait plutôt été perturbatrice et défavorable aux méthanotrophes.

La perte de la capacité de dégradation complète du TCE dans le réacteur à la fin de la première période d'acclimatation ne s'explique donc peut-être pas de façon simple, en raison du nombre élevé de paramètres en jeu.

## 4.2 Caractérisation de la biomasse

### 4.2.1 Tests d'activité spécifique

Les tests d'activité spécifique réalisés permettent de suivre les différents groupes trophiques, au cours du déroulement opératoire du réacteur. L'activité spécifique est une mesure ponctuelle, représentative des capacités de la biomasse au moment du prélèvement et du test.

L'activité spécifique est déterminée par la mesure du taux d'épuisement d'un substrat donné dans une plage de concentrations non-limitantes et en conditions nutritionnelles optimales, par un échantillon représentatif de biomasse, de concentration connue. Le taux d'utilisation du substrat par unité de biomasse est considéré comme un indicateur du contenu relatif de la biomasse en populations compétentes pour le substrat ciblé dans le test. Les substrats ciblés dans les tests réalisés sur le réacteur sont : 1) l'éthanol (en conditions anaérobies strictes) pour les populations acétogènes productrices obligées d'hydrogène, 2) l'acéate pour les populations méthanogènes acétoclastiques, 3) l'hydrogène pour les populations méthanogènes hydrogénotrophes, 4) le méthane (en présence non-limitante d'oxygène) pour les populations aérobies méthanotrophes. Les valeurs calculées sont surtout utiles pour tracer un profil qualitatif d'évolution dynamique des populations ciblées, à mettre en parallèle avec les performances du réacteur. Par comparaison avec les valeurs initiales de l'inoculum, ces mesures donnent un indice du degré d'enrichissement de la biomasse en populations données.

Les tests d'activité en conditions anaérobies ont montré qu'à la fin de la période initiale de démarrage du réacteur, un enrichissement en populations méthanogènes (tant acétoclastes qu'hydrogénotrophes) et acétogènes a été réalisé (Tableau 4.8, Tableau 4.9 et Tableau 4.10). À ce moment, le réacteur était opéré en conditions de faible apport en oxygène, et moins de 20% de la charge organique était dégradée en aérobiose. L'apport d'oxygène dans le réacteur couplé met les acétogènes et les méthanogènes en compétition avec des populations aérobies, qui ont un rendement de croissance global et d'utilisation du substrat plus élevé. En outre, les acétogènes et les méthanogènes sont des bactéries anaérobies strictes et le contact avec l'oxygène entraîne une inhibition irréversible. Cependant, les résultats des tests d'activité indiquent que les populations anaérobies

strictes ont pu proliférer. Les activités spécifiques des anaérobies sous conditions d'oxygénéation modérée dans le réacteur ont en effet significativement augmenté par rapport à celles de l'inoculum. Ceci confirme que la consommation d'oxygène par les populations périphériques facultatives et aérobies était suffisante pour limiter la pénétration de l'oxygène et protéger de l'oxygène les anaérobies stricts à l'intérieur du granule (Guiot et al., 1997).

À la même période, un enrichissement important en méthanolotrophes a été démontré par le test d'activité méthanolotrophe (Tableau 4.7). Les tests d'activité méthanolotrophe de la fin de la période de démarrage du réacteur sont caractérisés par un démarrage de la consommation du méthane plus rapide que dans tous les autres tests méthanolotrophes réalisés par la suite.

Tableau 4.7 - Activité méthanolotrophe de la biomasse du réacteur au cours du temps

Conditions dans le réacteur		Activité calculée selon la biomasse prélevée et testée		
Jour	TCE (#)	Port#8 <sup>[1]</sup> (mgCH <sub>4</sub> /g MVES.d)	Port#6 (mgCH <sub>4</sub> /g MVES.d)	Port#3 (mgCH <sub>4</sub> /g MVES.d)
<b>Inoculum : 29 ± 4</b>				
112	0		101 ± 9	64 ± 15
202	10	283 ± 36	66 ± 7	
223	15		47 ± 3	65 ± 15
267	20	187 ± 45	34 ± 2	34 ± 4
468	2	116 ± 17	98 ± 18	185 ± 44

[1] : test au port #8 avec dans les bouteilles une concentration en biomasse de l'ordre de 1 g MVES/L, et dans les deux autres tests elle est 2 à 3 fois plus élevée

Tableau 4.8 - Activité éthanol de la biomasse du réacteur au cours du temps

Conditions dans le réacteur		Activité calculée selon la biomasse prélevée et testée		
Jour	TCE (#)	Port#8 (mgETOH/gMVES.d)	Port#6 (mgETOH/gMVES.d)	Port#3 (mgETOH/gMVES.d)
<b>Inoculum : 264 ± 27</b>				
112	0		1265 ± 122	1146 ± 91
279	20	733 ± 46	825 ± 127	937 ± 39
459	2		464 ± 112	547 ± 269

Tableau 4.9 - Activité acétaire de la biomasse du réacteur au cours du temps

Conditions dans le réacteur		Activité calculée selon la biomasse prélevée et testée		
Jour	TCE (#)	Port#8 (mgAC/L <sub>réacteur</sub> .d) (mgAC/g MVES.d)	Port#6 (mgAC/g MVES.d)	Port#3 (mgAC/g MVES.d)
<b>Inoculum : 116 ± 30</b>				
112	0 <sup>[1]</sup>		418 ± 73	652 ± 94
279	20	468 ± 136	552 ± 56	506 178
459	2 <sup>[2]</sup>		724 ± 205	385 ± 165

[1] : au port #3, valeur sous-estimée

[2] : valeurs à utiliser avec prudence car courbes de consommations peu fiables, sauf pour 1 bouteille dans chacun des tests

Tableau 4.10 - Activité hydrogénotrophe de la biomasse du réacteur au cours du temps

Conditions dans le réacteur		Activité calculée selon la biomasse prélevée et testée		
Jour	TCE (#)	Port#8 (mgH <sub>2</sub> /L <sub>réacteur</sub> .d) (mgH <sub>2</sub> /g MVES.d)	Port#6 (mgH <sub>2</sub> /g MVES.d)	Port#3 (mgH <sub>2</sub> /g MVES.d)
<b>Inoculum : 352 ± 46</b>				
112	0 <sup>[1]</sup>		469 ± 106	580 ± 64
308	10 <sup>[2]</sup>	284 ± 4	339 ± 52	358 24
460	2 <sup>[3]</sup>	443 103	202 ± 24	150 ± 47

[1] : consommation nettement plus rapide au port #3

[2] : TCE arrêté depuis 3 semaines, car mauvais résultats du test réalisé juste avant l'arrêt de l'alimentation en TCE

[3] : Concentration de la biomasse (MVES) plus faible dans les bouteilles du test sur le port #8

Dans la suite, les conditions d'opération du réacteur ont changé. En premier, une augmentation progressive de la charge en TCE jusqu'à 20 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d a été réalisée, puis à la fin de cette période d'acclimatation, les conditions de couplage ont été modifiées pour augmenter le métabolisme aérobie. Lors de l'augmentation de la charge en TCE, les tests d'activité méthanoliques montrent une perte simultanée d'activité (Tableau 4.7, Figure 4.11 et Figure 4.12).

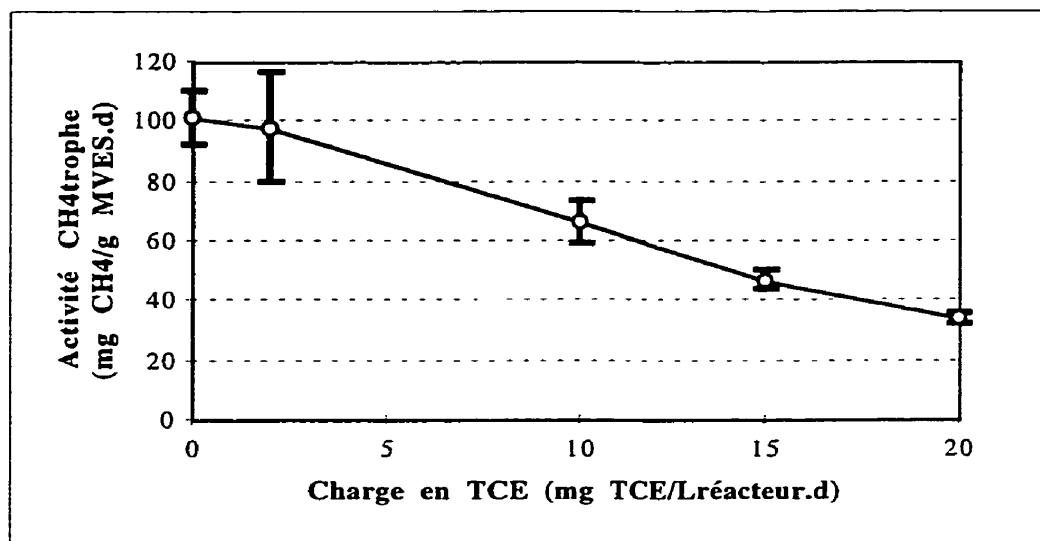


Figure 4.11 - Activité spécifique méthanotrophe en fonction de la charge en TCE

Après la reprise de l'alimentation en TCE à une faible charge, la capacité de dégradation du TCE est restée limitée dans le réacteur. Le TCE était alors presque totalement déchloré en c-DCE, produit final prédominant. Les tests d'activité ont été réalisés après 5 mois à faible charge dans ces conditions de déchlororation limitée. Ils montrent que l'activité méthanotrophe est revenue au niveau atteint après la période initiale de démarrage. Cependant dans les tests d'activité méthanotrophe, la période de latence dans la courbe de consommation du méthane est de 20 h, au lieu de moins de 10 h dans les tests de fin de la période de démarrage du réacteur. Les activités anaérobies ont clairement chuté, à environ la moitié de leurs valeurs de la fin de la période de démarrage, bien que la situation soit moins claire pour l'activité méthanogène acétoclastique. Il semble raisonnable d'attribuer cette baisse aux modifications des conditions de couplage (augmentation de l'aération et des activités aérobies, prévalant depuis plus de 200 jours au moment des tests) plutôt qu'à un impact négatif du TCE ou du c-DCE, puisqu'on a déjà vu précédemment que l'augmentation progressive de la charge en TCE n'avait pas eu d'impact.

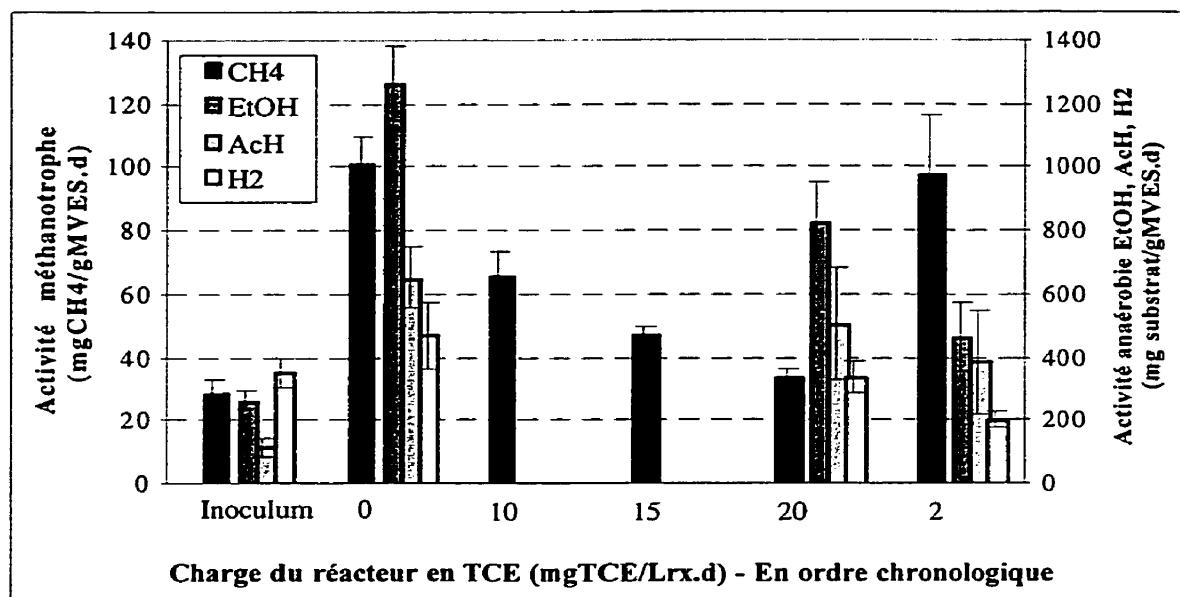


Figure 4.12 - Activités méthanotrophes et anaérobies au port#6 en fonction de la charge en TCE du réacteur

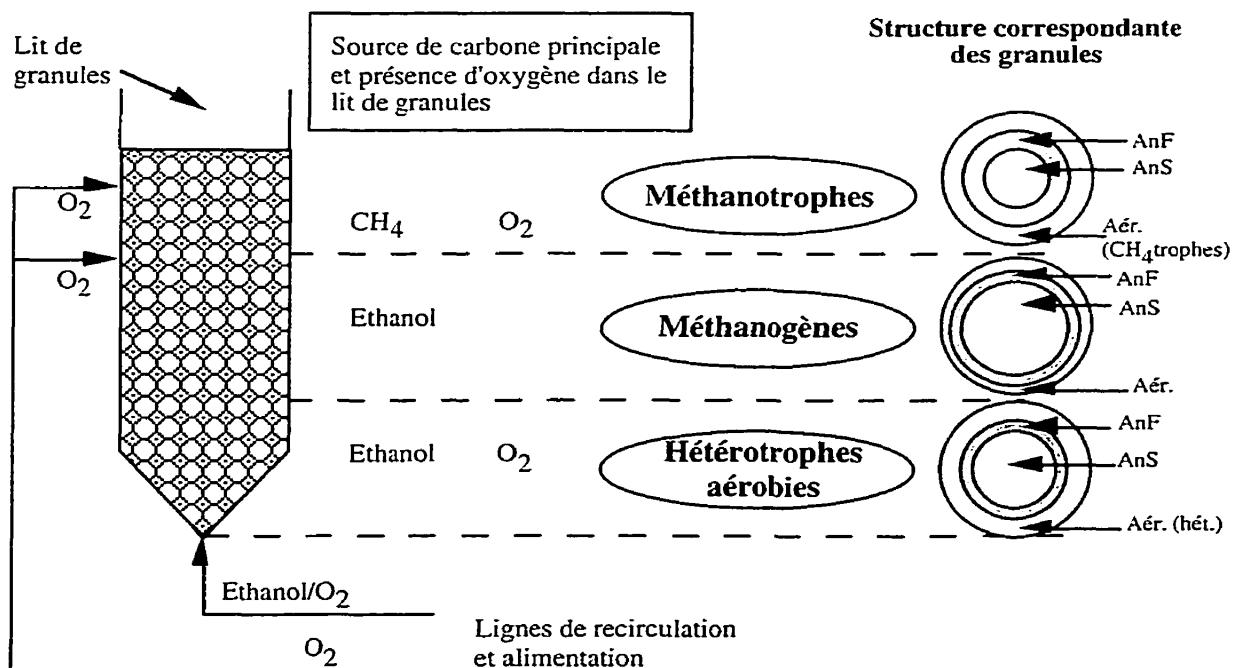
La caractérisation finale de la biomasse comprenait un test d'activité supplémentaire d'évaluation de la compétition entre les hétérotrophes aérobies et les méthanotrophes. Le test a été conduit en fournissant les deux sources de carbone et en mesurant leur disparition ainsi que celle de l'oxygène. Les résultats de ce test indiquent clairement que les populations méthanotrophes du réacteur ne sont pas du tout compétitives face aux populations hétérotrophes aérobies (Tableau 4.11). Au même moment, les tests méthanotrophes ont montré une activité méthanotrophe importante (Tableau 4.7).

Tableau 4.11 - Test d'activité témoin de compétition entre les hétérotrophes aérobies et les méthanotrophes (jour 470)

Biomasse du réacteur testée	Activité calculée pour chacun des substrat		
	CH <sub>4</sub> (mgCH <sub>4</sub> /g MVES.d)	EtOH (mgEtOH/g MVES.d)	O <sub>2</sub> (mgO <sub>2</sub> /g MVES.d)
Port#8	13 ± 14	522 ± 14	466 ± 19
Port#6	61 ± 33	812 ± 141	720 ± 61
Port#3	67 ± 91	606 ± 142	533 ± 134

D'après ce test, en présence simultanée des deux sources de carbone dans les zones oxygénées, les populations méthanotrophes ont beaucoup moins de chances de se développer et d'être actives, en raison de l'avantage net des hétérotrophes aérobies. L'ajout de deux lignes de recirculation sur le côté du réacteur et l'apport d'éthanol par la seule ligne de recirculation en bas du réacteur était probablement un moyen efficace de création de zones de conditions trophiques différentes (Figure 4.13) :

1. dans le bas du lit, une première zone hétérotrophe aérobie était créée, dans laquelle l'oxygène apporté était totalement consommé pour oxyder une partie de l'éthanol,
2. au-dessus, l'éthanol restant était consommé par les anaérobies, avec production de méthane,
3. dans la zone suivante, le méthane produit était utilisé par les méthanotrophes alimentées en oxygène grâce aux deux lignes de recirculation supplémentaires.



**Abréviations :**

AnS : anaérobies strictes; AnF : anaérobies facultatives; Aér. : aérobies; hét. : hétérotrophes;  
CH4trophes : méthanotrophes

Figure 4.13 - Schéma de création de zones trophiques préférentielles dans le réacteur et des structures granulaires correspondantes

Ce schéma de fonctionnement est possible si l'apport en oxygène en bas du réacteur est inférieur à la charge organique fournie. Si ce n'est pas le cas, la totalité de l'éthanol est consommé dans le bas du réacteur par les hétérotrophes aérobies, et les populations anaérobies ne disposent plus de substrat. La production de méthane a toujours existé dans le réacteur donc ça n'a jamais été le cas.

L'hypothèse précédente de création de zones trophiques préférentielles dans le réacteur suppose que le lit n'est pas totalement fluidisé et que les granules sont différents selon les zones trophiques définies. Les structures granulaires devraient logiquement montrer un enrichissement en un groupe trophique correspondant aux conditions privilégiées dans la zone (Figure 4.13).

#### 4.2.2 Tests de minéralisation

Deux séries de tests de minéralisation ont été réalisées, car dans la première série, il existait des doutes sur l'étanchéité des valves Mininerts utilisées.

L'acide 2-bromoethanesulfonique (BES) ( $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ) est un inhibiteur spécifique des méthanogènes (Zehnder, 1988). Il a été utilisé dans le test sous conditions hétérotrophes aérobies (éthanol comme seule source de carbone), pour éviter que des zones anoxiques dans les granules de biomasse ne permettent une activité méthanogène.

La production de  $\text{CH}_4$  aurait alors biaisé le test en fournissant du  $\text{CH}_4$  aux méthanotrophes. Un test d'activité témoin a été réalisé pour vérifier que la dose de BES utilisée était efficace (Figure 4.14).

Les résultats utilisés pour évaluer les performances de minéralisation de la biomasse sont ceux de la deuxième série de minéralisation. Deux tests en conditions anérobies ont été réalisés : 1) un test classique de minéralisation comportait un triplicata échantillonné pendant la durée de l'expérience, et 2) l'autre test a été réalisé avec des bouteilles sacrifiées en duplicata. Les témoins autoclavés étaient en duplicata dans les deux conditions.

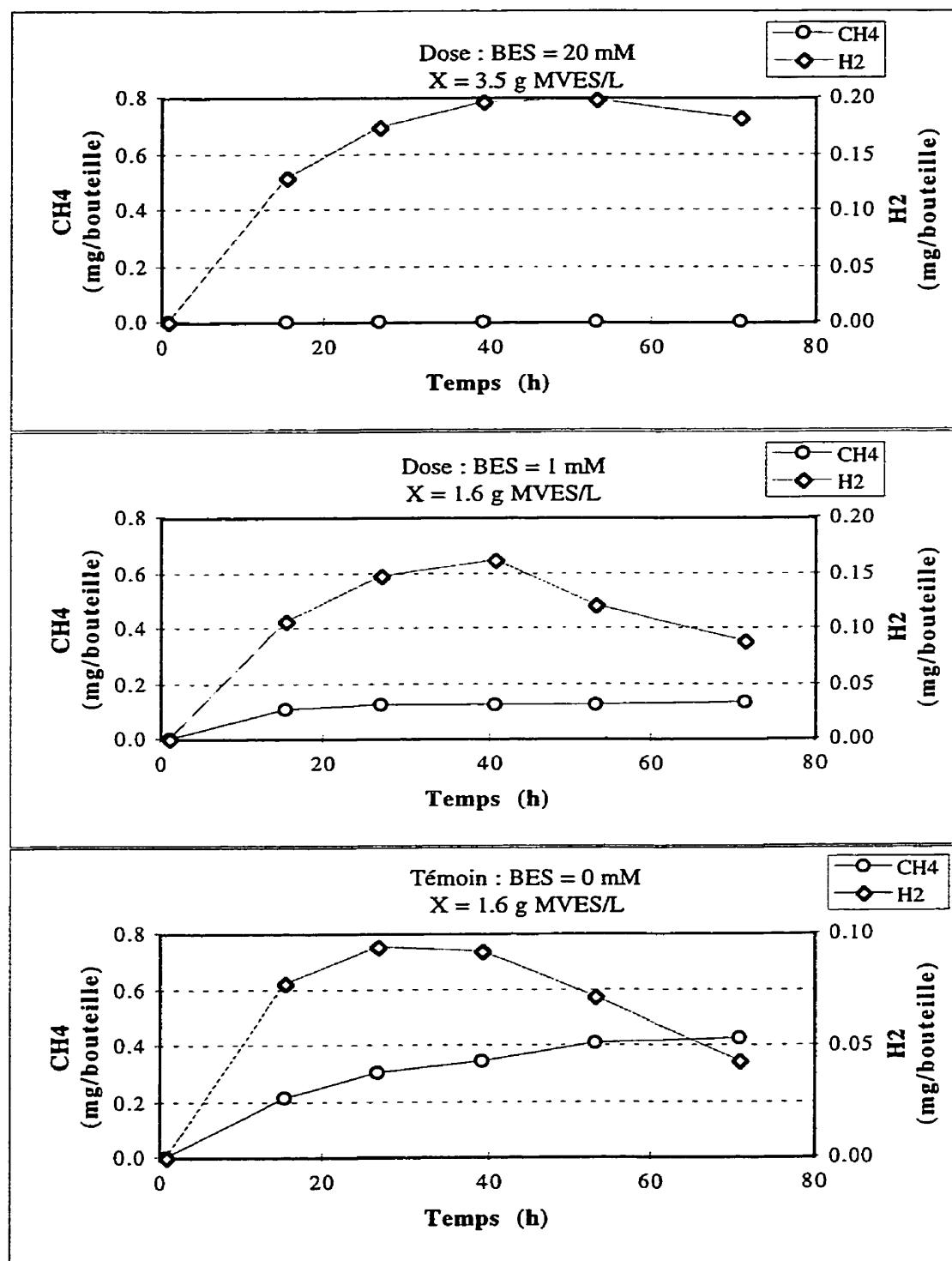


Figure 4.14 - Efficacité d'inhibition de la méthanogénèse par le BES

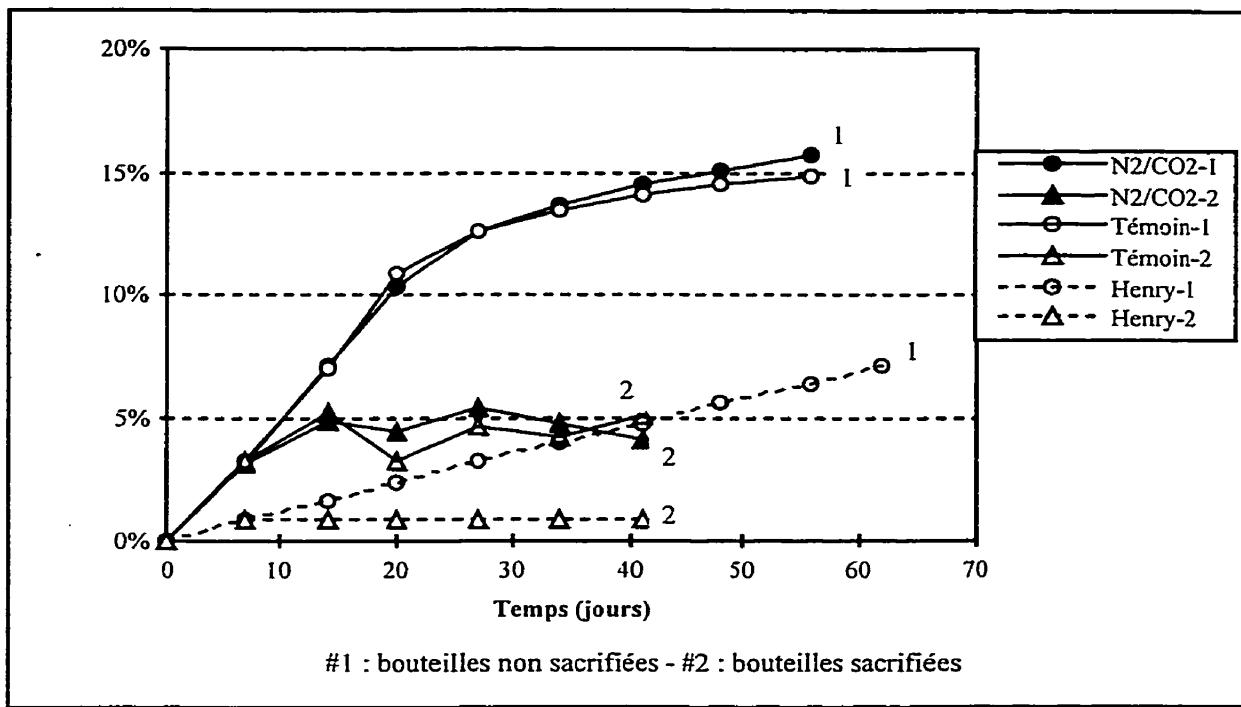


Figure 4.15 - Courbes de minéralisation en conditions anaérobies

La concentration en biomasse des bouteilles de minéralisation était de 1 à 2 g MVES/L. La concentration initiale de TCE en solution a été estimée à 0.35 mg TCE/L, en utilisant la loi de Henry (Heron et al., 1998) et en négligeant l'adsorption. La quantité totale de TCE ajoutée par bouteille était de 2 mg TCE/L, pour avoir une quantité de TCE de l'ordre de 1 à 2 mg TCE/g MVES. La charge spécifique en TCE maximale atteinte dans le réacteur a été de 2 mg TCE/g MVES à la fin de la première phase d'acclimatation. Lors de la seconde phase d'alimentation en TCE, elle était au début de 0.3 mg TCE/g MVES, et en raison de la diminution du contenu en biomasse du réacteur, elle était de 0.7 mg TCE/g MVES à la fin de l'expérience.

Dans les deux conditions anaérobies strictes (test de minéralisation classique avec échantillonnage d'un triplicata et test de minéralisation avec des bouteilles en duplicata sacrifiées à chaque échantillonnage), l'activité de minéralisation du TCE est nulle d'après les courbes des témoins et des échantillons (Figure 4.15). Dans les bouteilles non sacrifiées, un taux de minéralisation final de 15% a été mesuré contre un taux de 5% dans

les bouteilles sacrifiées. Un ordre de grandeur de perte de TCE dans le KOH a été calculé par la loi de Henry (Figure 4.15). La courbe théorique obtenue montre que la volatilisation du TCE n'est pas le seul phénomène en jeu. Cependant, après trois échantillonnages la pente de minéralisation des bouteilles non sacrifiées diminue.

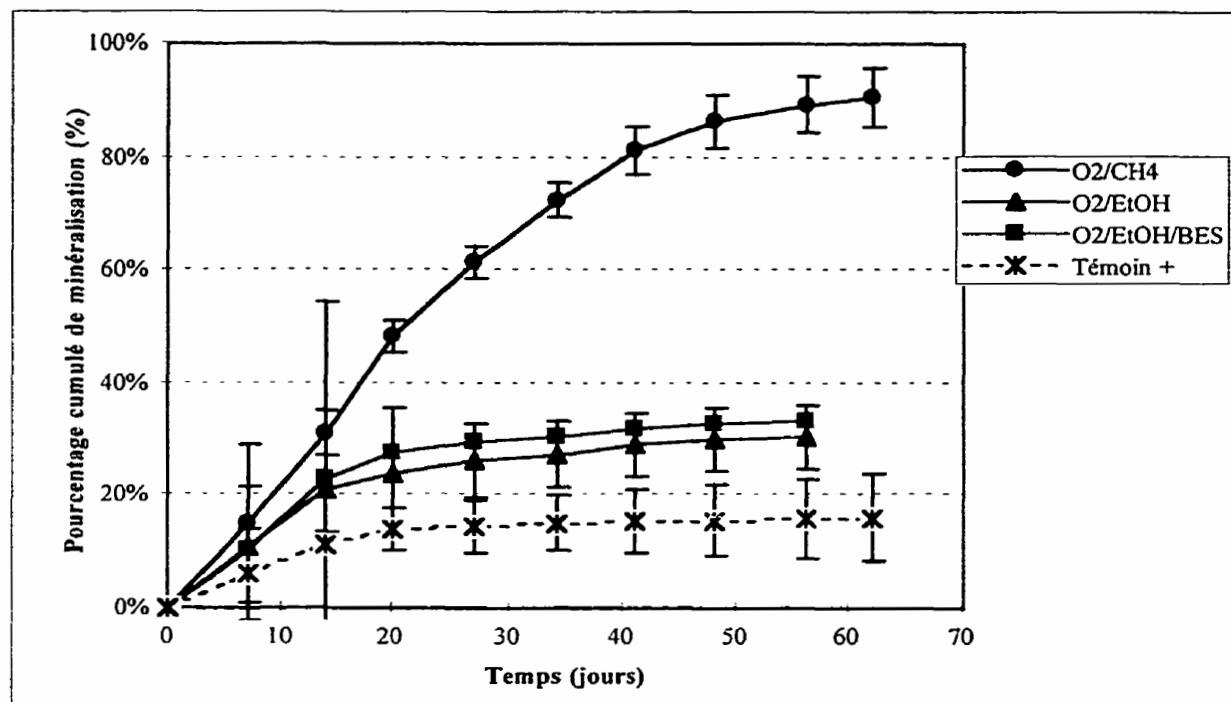


Figure 4.16 - Courbes de minéralisation en conditions aérobies

Les tests de minéralisation ont montré que le potentiel de minéralisation du TCE par la biomasse du réacteur est fort en conditions méthanotrophes (Figure 4.16 et Tableau 4.12). Il est faible en conditions hétérotrophes aérobies.

Tableau 4.12 - Paramètres de minéralisation calculés

Conditions expérimentales (1)	Cat.	Lag1/5 (jours)	Max (%)	TMax (% / d)	TMoy (% / d)	BDI (-)	NBDI (-)
<b>Février - Valves Mininerts</b>							
O <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	T+	4.6	8 ± 5	0.7	0.5	0.04	
	E	4.9	27 ± 12	2.4	1.8	0.49	12.14
O <sub>2</sub> /EtOH/BES	T+	2.9	3 ± 6	0.1	0.1	0.00	
	E	2.3	18 ± 8	1.2	1.3	0.23	103.14
O <sub>2</sub> /EtOH	T+	3.8	3 ± 5	0.1	0.1	0.00	
	E	2.0	9 ± 6	0.4	0.5	0.04	13.09
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	T+	3.8	6 ± 6	0.3	0.3	0.02	
	E	6.1	10 ± 10	0.3	0.3	0.03	1.90
<b>Mars - Septa teflon et silicones</b>							
O <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	T+	3.8	16 ± 11	0.8	0.8	0.13	
	E	8.3	91 ± 15	2.3	2.3	2.08	15.82
O <sub>2</sub> /EtOH/BES	T+	14.9	20 ±	0.7	0.5	0.09	
	E	4.6	34 ± 13	1.7	1.6	0.55	6.10
O <sub>2</sub> /EtOH	T+	7.1	19 ± 18	1.0	0.8	0.16	
	E	4.0	31 ± 12	1.5	1.5	0.46	2.91
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	T+	6.5	15 ± 12	0.6	0.5	0.08	
	E	7.0	16 ± 10	0.5	0.5	0.08	1.01
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> bout. sacrifiées	T+	1.9	4 ± 13	0.5	0.5	0.02	
	E	2.1	5 ± 10	0.5	0.5	0.02	0.99

- Max% : fraction finale de la radioactivité initiale retrouvée sous forme de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>;
- Lat : temps nécessaire pour atteindre 1/5 de Max%;
- TMax : taux de minéralisation entre Lat et 2/3Max%;
- TMoy : taux de minéralisation moyen entre le temps initial et 2/3Max%;
- BDI : indice de biodégradation, tenant compte de Max% et TMoy;
- NBDI : indice de biodégradation normalisé, rapport entre les indices de biodégradation de l'échantillon et celui du témoin.

Rappel des formules de calcul (Chapitre 3) :  $BDI = Tmoy \times Max\%$

$$NBDI = \frac{BDI_{ch}}{BDI_{tm}}$$

L'inhibiteur des méthanogènes, le BES a eu un effet positif inattendu sur le pourcentage de minéralisation en conditions hétérotrophes aérobies observé dans l'expérience (Figure 4.16 et Tableau 4.12). Une hypothèse explicative est la stimulation d'un système enzymatique par le BES qui est une molécule similaire au TCE. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier que l'effet positif du BES est réel et pour tester des hypothèses explicatives de ce phénomène.

Les tests témoins réalisés pour suivre la disparition des substrats ont montré que l'éthanol est très rapidement consommé. Après 24h, 75% de l'éthanol a disparu et après 48h, il est épuisé. Ces bouteilles n'ont pas été réalimentées en substrat carboné. La comparaison des conditions méthanotrophes et des conditions hétérotrophes aérobies aurait été plus significative, si la source de carbone des hétérotrophes n'avait pas été épuisée. Cependant, dans des tests réalisés avec de la biomasse d'un autre réacteur couplé alimenté en TCE dans des conditions similaires aux nôtres (résultats du laboratoire), l'éthanol a été suivi et réinjecté de façon intermittente afin qu'il ne soit jamais limitant. Ces test n'ont montré aucune amélioration de l'activité de minéralisation du TCE en conditions hétérotrophes aérobies. Les conditions aérobies hétérotrophiques sont donc peu propices à la minéralisation du TCE, contrairement aux conditions méthanotrophes.

L'analyse cinétique de la courbe de minéralisation du TCE en conditions méthanotrophes (Figure 4.16) permet de calculer un taux de minéralisation de 2.4% par jour. La quantité initiale de TCE dans une bouteille est de 1 à 2 mg TCE/g MVES et le taux spécifique de minéralisation correspondant calculé est donc de 50 à 100 µg TCE/g MVES.d. Le potentiel de biominéralisation spécifique est donc faible et indique une faible densité de bactéries méthanotrophes capables d'effectuer la minéralisation dans le réacteur. Les tests de minéralisation réalisés sont donc en accord avec les résultats du réacteur où, à la même époque, l'activité spécifique de déchloration complète du TCE était de 0.1 à 0.6 µmol TCE/g MVES·d (Tableau 4.6), soit 15 à 80 µg TCE/g MVES·d.

Le potentiel de minéralisation mesuré par microcosmes ne tient pas compte de la cinétique. Il est possible qu'une cinétique trop lente explique la faible dégradation du TCE dans le réacteur tenu compte du TRH (temps de rétention hydraulique). Cependant, dans la première période d'acclimatation au TCE, le régime hydraulique était le même et le temps de contact attendu était donc similaire. En outre, les conditions de couplage de la

deuxième période d'acclimatation favorisaient une plus faible production de méthane. Dans le cas d'une dégradation par les méthanotrophes possédant la sMMO, la compétition entre le méthane et le TCE a diminué par rapport à des conditions de plus forte production de méthane comme dans la première période d'acclimatation.

L'activité méthanotrophe de la biomasse du réacteur était élevée au moment où les tests de minéralisation ont été réalisés (Tableau 4.7). Les populations méthanotrophes développées dans le réacteur sont donc peu performantes en termes de minéralisation du TCE. Il est possible que ces bactéries méthanotrophes ne produisent pas ou peu de sMMO (méthane monooxygénase soluble), mais seulement de la pMMO (méthane monooxygénase particulaire). Les bactéries possédant la pMMO ont de bonnes performances d'oxydation du CH<sub>4</sub>, souvent meilleures que celles possédant la sMMO (Hanson et Hanson, 1996). De bonnes performances d'oxydation du CH<sub>4</sub> ne seraient donc pas contradictoires avec des performances de minéralisation du TCE médiocres.

Les conditions dans le réacteur (nutritionnelles, environnementales, ...) n'étaient donc pas optimales et suffisamment sélectives pour la production et l'activité de la sMMO. Ces conditions devraient donc être mieux définies et ensuite contrôlées attentivement dans le réacteur.

Les résultats du réacteur et des tests de caractérisation de la biomasse ont montré que des populations microbiennes différentes ont des rôles différents et certainement complémentaires lors de la dégradation du TCE dans un système couplé. Les populations anaérobies assurent la conversion rapide du TCE en c-DCE par une déchlororation réductrice. Quand le système était capable de dégrader le TCE, des méthanotrophes assuraient probablement ensuite la minéralisation ou dégradation complète du TCE.

Dans le cas d'une eau souterraine contaminée à 1 ppm de TCE, un pompage à une vitesse ascensionnelle de 12 m/h dans un puits réactif de diamètre interne 25 cm assure un débit de l'ordre de 10 L/min et résulte en une charge en TCE de 14 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>d. Un débit de 10 L/min est raisonnable pour contenir un panache de contamination dans des conditions de terrain et d'écoulement courantes. La charge en TCE d'un tel site (14 mg TCE/L) n'est donc pas excessive par rapport à la capacité de dégradation du réacteur couplé présenté. Par contre, la vitesse ascensionnelle est une contrainte forte dans le développement d'un puits réactif contenant une biomasse granulaire couplée. Le

système étudié a montré des problèmes de lessivage de la biomasse à une vitesse ascensionnelle approximative de 2 m/h. Le réacteur n'a pas été testé à des vitesses ascensionnelles supérieures et l'influence du régime hydrodynamique sur les performances du réacteur est donc difficilement extrapolable. Des tests sur l'influence du régime hydrodynamique seraient intéressants, en vue d'une application de terrain et pour connaître les effets sur les performances de dégradation.

## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Les objectifs de ce projet étaient

1. d'identifier les processus microbiens efficaces et les groupes microbiens correspondants dans l'écosystème couplé anaérobie/aérobiose de dégradation du TCE,
2. de développer une biomasse granulaire dans un réacteur couplé anaérobie/aérobiose de type UASB, et d'enrichir la biomasse en méthanotrophes,
3. d'évaluer les conditions de la dégradation du TCE dans un réacteur couplé anaérobie/aérobiose.

Le réacteur couplé anaérobie/aérobiose de dégradation du TCE enrichi en méthanotrophes capables de dégrader efficacement le TCE, est un système complexe. L'identification des principaux processus microbiens dans le système couplé anaérobie/aérobiose de biodégradation du TCE a été faite dans la revue bibliographique. Un schéma de principe a été proposé ainsi qu'une modélisation conceptuelle. Les principaux groupes trophiques identifiés ont été suivis par des tests d'activité au cours de l'opération du réacteur. Ils ont montré la présence et l'activité des groupes suivants : méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes, acidogènes et méthanotrophes. Un enrichissement en méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes a été montré par les tests d'activité : l'activité hydrogénotrophe est passée de 350 mg H<sub>2</sub>/g MVES.d dans l'inoculum à environ 500 mg H<sub>2</sub>/g MVES.d dans la biomasse du réacteur à la fin de la période de démarrage. Et l'activité acétoclaste est passée de 115 mg Ac/g MVES.d dans l'inoculum à 420 mg Ac/g MVES.d dans la biomasse du réacteur à la fin de la période de démarrage.

La capacité à développer une biomasse granulaire enrichie en méthanotrophes a été prouvée lors de la première étape d'opération du réacteur sans TCE. Les activités méthanotrophes mesurées sont passées de 29 mg CH<sub>4</sub>/g MVES.d dans l'inoculum à 101 mg CH<sub>4</sub>/g MVES.d dans le réacteur à la fin de la période de démarrage.

La biomasse granulaire du réacteur s'est montrée capable de dégrader complètement le TCE jusqu'à la charge de 15 mg TCE/L<sub>réacteur</sub>.d. La capacité maximale de dégradation

complète du TCE a été de  $12 \mu\text{mol TCE/g MVES.d}$ . La perte de la capacité de minéralisation du TCE dans le système a eu lieu à un taux de charge de  $10\text{-}15 \text{ mg TCE/L}_\text{réacteur}\cdot\text{d}$ . Ce niveau de charge n'était pas suffisamment élevé pour considérer que la toxicité du TCE et de ses produits de dégradation explique la diminution des performances de dégradation. En revanche, un accident avec une pointe de charge en TCE a eu lieu au début du palier de charge de  $15 \text{ mg TCE/L}_\text{réacteur}\cdot\text{d}$ , et a pu causer un choc toxique brutal irréversible. L'augmentation de charge en TCE a été poursuivie après cet accident, alors que le taux spécifique de dégradation complète du TCE n'était plus de 100% dans le système. La modification des conditions de couplage en faveur du métabolisme aérobie à la fin de la période d'acclimatation au TCE n'a pas permis de ralentir la diminution progressive du taux spécifique de dégradation complète du TCE. L'activité méthanolotrophe mesurée en bouteilles était de  $34 \text{ mg CH}_4/\text{g MVES.d}$  après l'augmentation de l'aération, donc du même ordre que dans l'inoculum. Il n'a donc pas été possible de retrouver une bonne activité méthanolotrophe par augmentation de l'aération. La diminution de l'activité méthanolotrophe de la biomasse du réacteur était négativement corrélée à la charge en TCE.

Les microcosmes réalisés à la fin de la période d'expérimentation ont prouvé le potentiel de minéralisation du TCE par les méthanolotrophes dans le système (90% de minéralisation en conditions méthanolotrophes dans les microcosmes). Au même moment, toutefois, le taux de dégradation complète du TCE était très faible dans le réacteur. Le calcul du taux spécifique de minéralisation dans les microcosmes en conditions méthanolotrophes donne des vitesses de minéralisation de l'ordre de  $50\text{ à }100 \mu\text{g TCE/g MVES.d}$ . Dans le réacteur, les taux spécifiques de dégradation complète du TCE étaient de  $15\text{ à }80 \mu\text{g TCE/g MVES.d}$ . Les tests de minéralisation ne sont donc pas en contradiction avec les performances du réacteur. Au moment de ces tests de minéralisation, l'activité méthanolotrophe mesurée en bouteilles était au même niveau qu'à la fin de la période de démarrage, mais avec une période de latence plus longue avant le démarrage de la consommation du  $\text{CH}_4$ . L'activité méthanolotrophe existait donc dans le réacteur. Le taux de minéralisation mesuré dans le réacteur ou dans les microcosmes est fonction du taux maximum observé et de la quantité de biomasse active. Le taux maximum observé dépend des conditions de milieu, et les microcosmes ont été réalisés en respectant des conditions optimales pour le groupe trophique correspondant. Il est donc raisonnable de considérer

que le taux maximum observé n'est pas diminué par des conditions de milieu défavorables. D'après les tests d'activité méthanotrophe, la biomasse du réacteur est enrichie en méthanotrophes, en revanche la MMO responsable de cette activité n'est pas identifiée. La biomasse méthanotrophe présente pourrait posséder principalement la pMMO et non la sMMO capable de cométaboliser le TCE. Les taux de minéralisation mesurés pourraient donc s'expliquer par une biomasse active très peu développée.

Les principales recommandations tirées du travail présenté sont les suivantes :

1. une modélisation du système permettrait de préciser les principales composantes et les principaux mécanismes microbiens significatifs; la compréhension du système ainsi obtenue permettrait de définir des stratégies nouvelles d'opération; la complexité du système montre le besoin d'une bonne représentation de la stoechiométrie des processus significatifs de ce système et la prise en compte de tous les éléments nécessaires au contrôle du procédé;
2. un nouvel essai pilote au laboratoire avec un suivi plus détaillé permettrait de mieux caractériser la robustesse du système :
  - le niveau d'aération et la charge organique sont des éléments importants du bon fonctionnement des méthanotrophes dans le système couplé; des tests en bouteilles d'optimisation du rapport  $\text{CH}_4/\text{O}_2$  donneraient des indications pour un meilleur contrôle des conditions de couplage dans le réacteur, qui pourrait être réalisé par mesure du  $\text{CH}_4$  et de l' $\text{O}_2$  dissous dans le réacteur;
  - des éléments supplémentaires du bilan DCO devraient être mesurés : l'alcalinité en entrée et à l'effluent et l'hydrogène dans les gaz; le bilan DCO serait alors un outil utile de suivi des conditions de couplage et du bon fonctionnement du système;
  - une mesure de l'activité sMMO et de l'activité pMMO par des tests colorimétriques simples et rapides permettrait de suivre le type de population méthanotrophe dans le réacteur, et d'évaluer la corrélation entre le taux de dégradation du TCE et la présence de la sMMO; ces tests colorimétriques

- pourraient aussi être utilisés pour préciser les conditions de production de sMMO dans le système;
- un suivi de la toxicité du TCE, du c-DCE, du t-DCE et du 1,1-DCE par des tests en bouteilles permettrait de voir si une corrélation existe entre la capacité de dégradation du procédé et la toxicité du TCE et de ses produits de dégradation;
3. pour une mise à l'échelle du procédé en vue de la conception d'un puits réactif *in situ*, des essais au laboratoire permettraient d'évaluer les effets du régime hydrodynamique sur les performances du système; un nouveau montage expérimental plus proche des conditions d'un puits réactif devrait alors être proposé.

## RÉFÉRENCES

- Alvarez-Cohen, L. and P. L. McCarty (1991a). "A Cometabolic Biotransformation Model for Halogenated Aliphatic Compounds Exhibiting Product Toxicity." *Environmental Science and Technology* 25(8): 1381-1387.
- Alvarez-Cohen, L. and P. L. McCarty (1991b). "Effects of Toxicity Aeration and Reductant Supply on Trichloroethylene Transformation by a Mixed Methanotrophic Culture." *Applied and Environmental Microbiology* 57(1): 228-235.
- Anderson, J. E. and P. L. McCarty (1997). "Transformation Yields of Chlorinated Ethenes by a Methanotrophic Mixed Culture Expressing Particulate Methane Monooxygenase." *Applied and Environmental Microbiology* 63(2): 687-693.
- Arcand, Y., S. R. Guiot, M. Desrochers and C. Chavarie (1994). "Impact of the Reactor Hydrodynamics and Organic Loading on the Size and Activity of Anaerobic Granules." *J. Chem. Eng.* 56: B23-B35.
- Arciero, D., T. Vannelli, M. Logan and A. B. Hooper (1989). "Degradation of Trichloroethylene by the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas europaea*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 640-643.
- Bagley, D. M. and J. M. Gossett (1990). "Tetrachloroethene Transformation to Trichloroethene and Dichloroethene by Sulfate-reducing Enrichment Cultures." *Applied and Environmental Microbiology* 56(8): 2511-2516.
- Bailey, J. E. and D. F. Ollis (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw Hill Book Company, New York, NY.
- Bédard, C. and R. Knowles (1989). "Physiology, Biochemistry, and Specific Inhibitors of  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_4^+$ , and CO Oxydation by Methanotrophs and Nitrifiers." *Microbiological Reviews* 53(1): 68-84.
- Boiesen, A., E. Arvin and K. Broholm (1993). "Effect of Mineral Nutrients on the Kinetics of Methane Utilization by Methanotrophs." *Biodegradation* 4: 163-170.

- Bowman, J. P. and G. S. Sayler (1994). "Optimization and Maintenance of Soluble Methane Monooxygenase Activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b." Biodegradation **5**: 1-11.
- Bradley, P. M. (2000). "Microbial Degradation of Chloroethenes in Groundwater Systems." Hydrogeology Journal **8**: 104-111.
- Bradley, P. M. and F. H. Chapelle (2000). "Aerobic Mineralization of Dichloroethene as Sole Carbon Substrate." Environmental Science and Technology **34**(1): 221-223.
- Cabirol, N., F. Jacob, J. Perrier, B. Fouillet and P. Chambon (1998). "Interaction between Methanogenic and Sulfate-Reducing Microorganisms during Dechlorination of High Concentration of Tetrachloroethylene." J. Gen. Appl. Microbiol. **44**: 297-301.
- Carr, C. S. and J. B. Hughes (1998). "Enrichment of High-Rate PCE Dechlorination and Comparative Study of Lactate, Methanol, and Hydrogen as Electron Donors To Sustain Activity." Environmental Science and Technology **32**: 1817-1824.
- Chang, H. L. and L. Alvarez-Cohen (1995a). "Model for the Cometabolic Biodegradation of Chlorinated Organics." Environmental Science and Technology **29**(9): 2357-2367.
- Chang, H.-L. and L. Alvarez-Cohen (1995b). "Transformation Capacities of Chlorinated Organics by Mixed Cultures Enriched on Methane, Propane, Toluene, or Phenol." Biotechnology and Bioengineering **45**: 440-449.
- Chang, W.-k. and C. S. Criddle (1997). "Experimental Evaluation of a Model for Cometabolism : Prediction of Simultaneous Degradation of Trichloroethylene and Methane by a Methanotrophic Mixed Culture." Biotechnology and Bioengineering **56**(5): 492-501.
- Chaudhry, G. R. and S. Chapalamadugu (1991). "Biodegradation of Halogenated Organic Compounds." Microbiological Reviews **55**(1): 59-79.
- Chauhan, S., P. Barbieri and T. K. Wood (1998). "Oxydation of Trichloroethylene, 1,1-Dichloroethylene, and Chloroform by Toluene/o-Xylene Monooxygenase from

*Pseudomonas stutzeri* OX1." Applied and Environmental Microbiology **64**(8): 3023-3024.

Chu, K.-H. and L. Alvarez-Cohen (1999). "Evaluation of Toxic Effects of Aeration and Trichloroethylene Oxidation on Methanotrophic Bacteria Grown with Different Nitrogen Sources." Applied and Environmental Microbiology **65**(2): 766-772.

Cord-Ruwisch, R., H.-J. Seitz and R. Conrad (1988). "The Capacity of Hydrogenotrophic Anaerobic Bacteria to Compete for Traces of Hydrogen Depends on the Redox Potential of the Terminal Electron Acceptor." Archives of Microbiology **149**: 350-357.

Cookson, J. T. (1995). Bioremediation Engineering : Design and Application. New York, McGraw-Hill, Inc.

Criddle, S. C. (1993). "The Kinetics of Cometabolism." Biotechnology and Bioengineering **41**: 1048-1056.

Dalton, H. P., P. C. Wilkins and Y. Jiang (1993). Structure and mechanism of action of the hydroxylase of the soluble methane monooxygenase. Microbial growth on C1 compounds. J. C. M. a. D. P. Kelley. Andover, United Kingdom, Intercept: 65-80.

DiSpirito, A. A., J. Gulledge, A. K. Shiemke, C. J. Murrell, M. E. Lidstrom and C. L. Krema (1992). "Trichloroethylene Oxidation by the Membrane-Associated Methane Monooxygenase in Type I, Type II and Type X Methanotrophs." Biodegradation **2**: 151-164.

DiStephano, T. D., J. M. Gossett and S. H. Zinder (1991). "Reductive Dechlorination of High Concentrations of Tetrachloroethene to Ethene by an Anaerobic Enrichment Culture in the Absence of Methanogenesis." Applied and Environmental Microbiology **57**(8): 2287-2292.

DiStephano, T. D., J. M. Gossett and S. H. Zinder (1992). "Hydrogen as an Electron Donor for Dechlorination of tetrachloroethene by an Anaerobic Mixed Culture." Applied and Environmental Microbiology **58**(11): 3622-3629.

- Dolfing, J. (1999). "Comment on "Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture"." Environmental Science and Technology **33**(12): 2127.
- Dolfing, J. and D. B. Janssen (1994). "Estimates of Gibbs Free Energies of Formation of Chlorinated Aliphatic Compounds." Biodegradation **5**: 21-28.
- Dolfing, J., A. J. Van den Wijngaard and D. B. Janssen (1993). "Microbiological Aspects of the Removal of Chlorinated Hydrocarbons from Air." Biodegradation **4**: 261-282.
- Edeline (1994). L'épuration biologique des eaux. Théorie et technologie des réacteurs. Paris, France, Lavoisier.
- El-Mamouni, R., R. Leduc and S. R. Guiot (1998). "Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process." Water Science and Technology **38**(8-9): 341-347.
- Ellis, L. (2000). Tetrachloroethene Pathway Map (Anaerobic), © 2000, University of Minnesota, The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database. <http://www.labmed.umn.edu/umbbd/tce> **2000**.
- Ensign, S. A., M. R. Hyman and D. J. Arp (1992). "Cometabolic Degradation of Chlorinated Alkenes by Alkene Monooxygenase in a Propylene-Grown *Xanthobacter* Strain." Applied and Environmental Microbiology **58**: 3038-3046.
- Ewers, J., D. Freier-Schröder and H. J. Knackmuss (1990). "Selection of Trichloroethylene (TCE) Degrading Bacteria that Resist Inactivation by TCE." Archives of Microbiology **154**: 410-413.
- Fennell, D. E. and J. M. Gossett (1999). "Comment on "Enrichment of High-Rate PCE Dechlorination and Comparative Study of Lactate, Methanol, and Hydrogen as Electron Donors To sustain Activity"." Environmental Science and Technology **33**: 2681-2682.
- Fetter, C. W. (1993). Contaminant Hydrogeology. New York, Maxwell Macmillan International Pub. Co.

Fogel, S., R. Lewis, D. Groher and M. Findlay (1995). PCE Treatment in Saturated Soil Columns : Methanogens in Sequence with Methanotrophs. Third International In-Situ and On-Site Bioreclamation Symposium, San Diego, CA, USA, Batelle Press.

Fox, B. G., J. G. Bornemam, L. P. Wackett and J. D. Lipscomb (1990). "Haloalkene Oxidation by the Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: Mechanistic and Environmental Implications." Biochemistry **29**(27): 6419-6427.

Freedman, D. L. and J. M. Gossett (1989). "Biological Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene to Ethylene under Methanogenic Conditions." Applied and Environmental Microbiology **55**(9): 2144-2151.

Funabiki, T. (1997). Oxygenases and Model Systems. Boston, Kluwer Academic Publishers.

Gantzer, C. J. and L. P. Wackett (1991). "Reductive Dechlorination Catalized by Bacterial Transition-Metal Coenzymes." Environmental Science and Technology **25**(4): 715-722.

Gerritse, J., V. Renard, T. M. Pedro Gomes, M. D. Collins and J. C. Gottscall (1996). "*Desulfobacterium* sp. strain PCE1, an Anaerobic Bacterium that Can Grow by Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene or ortho-Chlorinated Phenols." Archives of Microbiology **165**: 132-140.

Gerritse, J., V. Renard, J. Visser and J. C. Gottschal (1995). "Complete Degradation of Tetrachloroethene by Combining Anaerobic Dechlorinating and Aerobic Methanotrophic Enrichment Cultures." Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**: 920-928.

Guiot, S. R. (1997). Process Coupling of Anaerobic and Aerobic Biofilms for Treatment of Contaminated Waste Liquids. 3rd Int. Symp. of the Int. Society for Environ. Biotech. (1996), Boston, Mass., USA, Elsevier Science.

Guiot, S. R., Y. Arcand and C. Chavarie (1992). "Advantages of Fluidization on Granule Size and Activity Development in Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactors." Water Science and Technology **26**(3-4): 897-906.

- Guiot, S. R., X. Kuang, C. Beaulieu, A. Corriveau and J. Hawari (1995). Anaerobic and Aerobic/Anaerobic Treatment for Tetrachloroethylene (PCE). Third International In-Situ and On-Site Bioreclamation Symposium, San Diego, CA, USA, Batelle Press.
- Hanson, R. S. and T. E. Hanson (1996). "Methanotrophic Bacteria." Microbiological Reviews **60**(2): 439-471.
- Hao, O. J., J. M. Chen, L. Huang and R. L. Buglass (1996). "Sulfate-reducing Bacteria." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **26**(1): 155-187.
- Harayama, S., M. Kok and E. L. Neidle (1992). "Functional and Evolutionary Relationships among Diverse Oxygenases." Annual Reviews in Microbiology **46**: 565-601.
- Hartmans, S. and J. A. M. de Bont (1992). "Aerobic Vinyl Chloride Metabolism in *Mycobacterium aurum* L1." Applied and Environmental Microbiology **58**(4): 1220-1226.
- Hartmans, S., J. A. M. de Bont, J. Tramper and K. C. A. M. Luyben (1985). "Bacterial degradation of vinyl chloride." Biotechnol. Letters **7**: 383-388.
- Haston, Z. C. and P. L. McCarty (1999). "Chlorinated Ethene Half-Velocity Coefficients ( $K_s$ ) for Reductive Dehalogenation." Environmental Science and Technology **33**(2): 223-226.
- Henry, S. M. and D. Grbic-Galic (1990). "Effect of Mineral Media on Trichloroethylene Oxidation by Aquifer Methanotrophs." Microbial Ecology **20**: 151-169.
- Henry, S. M. and D. Grbic-Galic (1991). "Influence of Endogenous and Exogenous Electron Donors and Trichloroethylene Oxidation Toxicity on Trichloroethylene Oxidation by Methanotrophic Cultures from a Groundwater Aquifer." Applied and Environmental Microbiology **57**(1): 236-244.
- Henrysson, T. and P. L. McCarty (1993). "Influence of the Endogenous Storage Lipid Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate on the Reducing Power Availability during Cometabolism of Trichloroethylene and Naphtalene by resting Methanotrophic Mixed Cultures." Applied and Environmental Microbiology **59**(5): 1602-1606.

Henze, M., C. P. Leslie Grady Jr, W. Gujer, G. V. R. Marais and T. Matsuo (1987). "A General Model for Single-sludge Wastewater Treatment Systems." Water Research **21**(5): 505-515.

Heron, G., T. H. Christensen and C. G. Enfield (1998). "Henry's Law Constant for Trichloroethylene between 10 and 95°C." Environmental Science and Technology **32**(10): 1433-1437.

Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, L. Wolfgang, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss and Zehnder (1998). "*Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a Strictly Anaerobic Bacterium that Reductively Dechlorinates Tetra- and Trichloroethene in an Anaerobic Respiration." Archives of Microbiology **169**(4): 313-321.

Holliger, C. and G. Schraa (1994). "Physiological Meaning and Potential for Application of Reductive Dechlorination by Anaerobic Bacteria." FEMS Mycrobiology Reviews **15**: 297-305.

Holliger, C., G. Schraa, a. J. M. Stams and A. J. B. Zehnder (1993). "A Highly Purified Enrichment Culture Couples the Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene to Growth." Applied and Environmental Microbiology **59**(9): 2991-2997.

Hrsak, D. and A. Begonja (1998). "Growth characteristics and metabolic activities of the methanotrophic-heterotrophic groundwater community." Journal of Applied Microbiology **85**: 448-456.

Huling, S. G. and J. W. Weaver (1991). Dense Non Aqueous Phase Liquids. EPA Ground Water Issue. Ada, OK, United States Environmental Protection Agency: 25-45.

Karhadkar, P. P., J.-M. Audic, G. M. Faup and P. Khanna (1987). "Sulfide and Sulfate inhibition of Methanogenesis." Water Research **21**(9): 1061-1066.

Kato, M. K., J. A. Field and G. Lettinga (1993). "High Tolerance of Methanogens in Granular Sludge to Oxygen." Biotechnology and Bioengineering **42**: 1360-1366.

- Krumholz, L. R. (1997). "Desulfomonas chloroethenica sp. nov. Uses Tetrachloroethylene and Trichloroethylene as Electron Acceptors." International Journal of Systematic Bacteriology **47**(4): 1262-1263.
- Lanzarone, N. A. and P. L. McCarty (1990). "Column Studies on Methanotrophic Degradation of Trichloroethene and 1,2-Dichloroethane." Ground Water **28**(6): 910-919.
- Lee, M. D., J. M. Odom and R. J. J. Buchanan (1998). "New Perspectives on Microbial Dehalogenation of Chlorinated Solvents : Insights from the Field." Annual Review of Microbiology **52**: 423-452.
- Lehninger, A. (1978). Bioénergétique: base moléculaire des transformations de l'énergie biologique. Paris, InterEditions.
- Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall and P. J. Gilmer (1988). "Trichloroethylene Biodegradation by a Methane-Oxidizing Bacterium." Applied and Environmental Microbiology **54**(4): 951-956.
- Long, J. L., D. H. Stensel, J. F. Ferguson, S. E. Strand and J. E. Ongerth (1993). "Anaerobic and Aerobic Treatment of Chlorinated Compounds." Journal of Environmental Engineering **119**(2): 300-320.
- Lontoh, S. and J. D. Semrau (1998). "Methane and Trichloroethylene Degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Particulate Methane Monooxygenase." Applied and Environmental Microbiology **64**(3): 1106-1114.
- Mansour, I. and B. E. Sleep (1998). "Biodegradation of High Concentrations of Tetrachloroethene in a Continuous Flow Column System." Environmental Science and Technology **32**: 3579-3585.
- Maymo-Gatell, X., Y Chien, J. M. Gosset, and S. H. Zinder (1997). "Isolation of Bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. Science **276**, 1568-1571.

- Maymo-Gatell, X., V. Tandoi, J. M. Gossett and S. H. Zinder (1995). "Characterization of an H<sub>2</sub>-Utilizing Enrichment Culture That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Vinyl Chloride and Ethene in the Absence of Methanogenesis and Acetogenesis." Applied and Environmental Microbiology **61**(11): 3928-3933.
- McCarty (1987). Bioengineering Issues Related to In-Situ Remediation of Contaminated Soils and Groundwater. Environmental Biotechnology. G. S. Omenn. New York, Plenum Press: 143-162.
- McCarty, P. L. (1993). "*In situ* Bioremediation of Chlorinated Solvents." Current Opinion in Biotechnology **4**: 323-330.
- McCarty, P. L. (1997). "Breathing with Chlorinated Solvents." Science **276**: 1521-1522.
- Metcalf and Eddy (1991). Wastewater Engineering : Treatment, Disposal, and Reuse. New York, McGraw-Hill.
- Miller, R. E. and F. P. HGuengerich (1982). "Oxidation of Trichloroethylene by Liver Microsomal Cytochrome P-450 : Evidence for Chlorine Migration in a Transition State Not Involving Trichloroethylene Oxide." Biochemistry **21**: 1090-1097.
- Millette, D., J. F. Barker, Y. Comeau, B. J. Butler, E. O. Frind, B. Clément and R. Samson (1995). "Substrate Interaction During Aerobic Biodegradation of Creosote-Related Compounds : a Factorial Batch Experiment." Environmental Science and Technology **29**(8): 1944-1952.
- Mohn, W. W. and J. M. Tiedje (1992). "Microbial Reductive Dehalogenation." Microbiological Reviews **56**(3): 482-507.
- Murrell, C. J., I. R. McDonald and D. G. Bourne (1998). "Molecular Methods for the Study of Methanotroph Ecology." FEMS Microbiology Ecology **27**(2): 103-114.
- Nakajima, T., H. Uchiyama, O. Yagi and T. Nakahara (1992). "Novel Metabolite of Tricholorethylene in a Methanotrophic Bacterium, *Methylocystis* sp. M, and Hypothetical Degradation Pathways." Biosci. Biotech. Biochem. **56**(3): 486-489.

Ndon, U. J. and A. A. Randall (1999). "Periodic Aerated Treatment and *In-Situ* Bioremediation Strategies for Polyhalogenated Compounds." Water Research **33**(11): 2715-2720.

Nielsen, A. K., K. Gerdes and C. J. Murrell (1997). "Copper-Dependent Reciprocal Transcriptional Regulation of Methane Monooxygenases Genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporum*." Molecular Microbiology **25**(2): 399-409.

Norris, R. Hinchee, Leeson, A., Semprini, L., Brown, P. L. McCarty, Semprini, Wilson, Campbell, Reinhard, Bouwer, Borden, T. M. Vogel, Thomas and Ward (1994). Handbook of Bioremediation. Boca Raton, FL, Lewis Publishers.

Oldenhuis, R., R. L. J. M. Vimk, D. B. Janssen and B. Witholt (1989). "Degradation of Chlorinated Aliphatic Compounds by *Methylosinus trichosporum* OB3b Expressing Soluble Methane Monooxygenase." Applied and Environmental Microbiology **55**: 2819-2826.

Oude Elferink, S. J. W. H., A. Visser, L. W. Hulshoff Pol and A. J. M. Stams (1994). "Sulfate Reduction in Methanogenic Bioreactors." FEMS Microbiology Reviews **15**: 119-136.

Pankow, J. F. and J. A. Cherry (1996). Dense Chlorinated Solvents and other DNAPLs in Groundwater: history, behavior, and remediation. Portland, OR.

Park, S., L. M. Hanna, R. T. Taylor and M. W. Droedge (1991). "Batch cultivation of *Methylosinus trichosporum* OB3b. I: production of soluble methane monooxygenase." Biotechnology and Bioengineering **38**(4): 423-433.

Pauss, A., G. André, M. Perrier and S. R. Guiot (1990). "Liquid-To-Gas Mass Transfer Limitations of Methane and Hydrogen in the Biomethanation Process." Applied and Environmental Microbiology **56**(6): 1636-1644.

Phelps, T. J., J. J. Niedzielski, R. M. Schram, S. E. Herbes and D. C. White (1990). "Biodegradation of Trichloroethylene in Continuous-Recycle Expanded-Bed Bioreactors." Applied and Environmental Microbiology **56**(6): 1702-1709.

Russell, H. H., J. E. Matthews and G. W. Sewell (1992). TCE Removal from Contaminated Soil and Ground Water. Ada, OK, United States Environmental Protection Agency: 1-10.

Sawyer, C. N., P. L. McCarty and G. F. Parkin (1994). Chemistry for Environmental Engineering. New York, McGraw-Hill Inc.

Shah, N. N., M. L. Hanna and R. T. Taylor (1996). "Batch Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b : V. Characterization of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Production Under Methane-dependent Growth Conditions." Biotechnology and Bioengineering **49**: 161-171.

Shen, C. F., C. B. Miguez, D. Bourque, D. Groleau and S. R. Guiot (1996). "Methanotroph and methanogen coupling in granular biofilm under O<sub>2</sub>-limited conditions." Biotech. Letters **18**(5): 495-500.

Shih, C.-C., M. E. Davey, J. Zhou, J. M. Tiedje and C. S. Criddle (1996). "Effects of Phenol Feeding Pattern on Microbial Community Structure and Cometabolism of Trichloroethylene." Applied and Environmental Microbiology **62**(8): 2953-2960.

Smith, L. H. and P. L. McCarty (1997). "Laboratory Evaluation of a Two-Stage Treatment System for TCE Cometabolism by a Methane-Oxidizing Mixed Culture." Biotechnology and Bioengineering **55**(4): 650-659.

Stanley, S. H., S. D. Prior, D. J. Leak and H. Dalton (1983). "Copper stress underlies the fundamental change in intracellular location of methane mono-oxygenase in methane-oxidising organisms: studies in batch and continuous cultures." Biotechnol. Letters **5**: 487-492.

Stephenson, R. J., A. Patoine and S. R. Guiot (1999). "Effects of oxygeneation and upflow velocity on a coupled anaerobic/aerobic reactor system." Water Research **33**(12): 2855-2863.

Sullivan, J. P., D. Dickinson and H. A. Chase (1998). "Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO and their application to bioremediation." Critical Reviews in Microbiology **24**(4): 335-373.

- Tartakovsky (1998). "Tetrachloroethylene Dechlorination Using a Consortium of Coimmobilized Methanogenic and Methanotrophic Bacteria." Enzyme and Microbial Biotechnology **22**: 255-260.
- Thaveesri, J., B. G., G. K., K. B. and V. W. (1994). "Organic and Ammonia Nitrogen in Relation to Granular Sludge Growth." Water Science Technology **30**(12): 43-53.
- Tsien, H.-C., G. A. Brusseau, R. S. Hanson and L. P. Wackett (1989). "Biodegradation of Trichloroethylene by *Methylosinus trichisporium* OB3b." Applied and Environmental Microbiology **55**(12): 3155-3161.
- Vogel, T. M., C. S. Criddle and P. L. McCarty (1987). "Transformation of Halogenated Aliphatic Compounds." Environmental Science and Technology **21**(8): 722-736.
- Vogel, T. M. and P. L. McCarty (1985). "Biotransformation of Tetrachloroethylene to Trichloroethylene, Dichloroethylene, Vinyl Chloride, and Carbon Dioxide under Methanogenic Conditions." Applied and Environmental Microbiology **49**(5): 1080-1083.
- Wackett, L. P., G. A. Brusseau, S. R. Householder and R. S. Hanson (1989). "Survey of Microbial Oxygenases : Trichloroethylene Degradation by Propane-Oxidizing Bacteria." Applied and Environmental Microbiology **55**(11): 2960-2964.
- Wackett, L. P. and D. T. Gibson (1988). "Degradation of Trichloroethylene by Toluene Dioxygenase in Whole-Cell Studies with *Pseudomonas putida* F1." Applied and Environmental Microbiology **54**: 1703-1708.
- Whittaker, M., D. Monroe and D. J. Oh (2000). Trichloroethylene Pathway Map (Aerobic), © 2000, University of Minnesota, The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database. **2000**.
- Whittenbury, R. and H. Dalton (1981). The Methylotrophic Bacteria. The Prokaryotes. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows and H. G. Schlegel. Berlin, Springer Verlag: 894-902.

Yang, Y. and P. L. McCarty (1998). "Competition for Hydrogen within a Chlorinated Solvent Dehalogenating Anaerobic Mixed Culture." Environmental Science and Technology 32(22): 3591-3597.

Zehnder, A. J. B. (1988). Biology of Anaerobic Microorganisms, John Wiley & Sons.

**ANNEXES**

**Annexe 1 - Propriétés physico-chimiques intéressantes en vue  
de la biorémédiation**

Les propriétés physico-chimiques retenues déterminent le comportement et la répartition des composés dans l'environnement, et affectent leur biodégradabilité.

Tableau A1.1 - Liste des propriétés d'intérêt

Symbole	Unités	Nom
M	(g/mol)	masse molaire
d	(-)	densité relative à 20°C et sous 1 atm
$d_v$	(-)	densité de vapeur
Tf	(°C)	température de fusion sous 1 atm
Téb	(°C)	température d'ébullition sous 1 atm
Vd	(cp)	viscosité dynamique à 20°C
Vc	(cs)	viscosité cinématique à 20°C
$S_w$	(mg/L)	solubilité aqueuse à 20°C
$K_H$	(atm.m <sup>3</sup> /mol)	constante de Henry à 20°C
$P_v$	(mmHg)	pression de vapeur à 20°C
$K_{ow}$	(mg/L <sub>octanol</sub> )/(mg/L)	coefficient de partition octanol/eau
$K_{oc}$	(μg <sub>ads</sub> /g <sub>oc</sub> )/(μg/ml)	coefficient d'adsorption sur la matière organique

**Notes:** Unités du S.I. (système international) de préférence ou les plus utilisées dans le domaine.

Quand applicable, valeur donnée à 20 oC et sous 1 atm.

Tableau A1.2 - Propriétés physico-chimiques générales : définition

Symbol	Définition et importance par rapport à la biorémédiation du composé
d	densité relative: masse volumique du composé à 20oC rapportée à celle de l'eau à 4oC sous 1 atm => indique la tendance à migrer verticalement dans l'aquifère sous l'influence de la gravité jusqu'à une couche imperméable ( $d > 1$ ) ou à flotter sur la nappe ( $d < 1$ )
$d_v$	densité de vapeur à 20 oC relative à l'air (air: $d_v=1$ ) => indique le comportement du gaz émis dans l'atmosphère: si il se déplace au niveau du sol ( $d_v>1$ ) ou est rapidement dispersé dans l'atmosphère ( $d_v<1$ )
Tf, Téb	=> indiquent les phases présentes dans les conditions environnementales (présence ou non d'1 phase liquide pure)
Vd	=> indique la facilité avec laquelle le composé s'écoule à l'état pur; la mobilité d'un composé est inversement proportionnelle à sa viscosité dynamique
Vc	=> considère Vd et M, et indique la facilité de percolation à travers un matériau; plus Vc est faible, plus le composé tend à migrer vers le bas et à percoler à travers un matériau fin
$S_w$	concentration maximale dans l'eau en équilibre avec une phase libre sous 1 atm

Tableau A1.3 - Paramètres de volatilisation - définition

Symbol	Définition et importance par rapport à la biorémédiation du composé
P <sub>v</sub>	pression partielle du composé dans l'atmosphère au-dessus de sa phase libre à l'équilibre => tendance d'un composé à être volatilisé depuis sa phase libre; plus P <sub>v</sub> est élevée, plus composé est volatile
K <sub>H</sub>	constante de proportionnalité entre la pression partielle du composé et sa concentration dans une solution aqueuse, à l'équilibre entre les deux phases; $P_{gaz} = K_H * C_{eau}$ ou encore, H sans dimension: $C_{gaz} = H * C_{eau}$ , où C <sub>gaz</sub> et C <sub>eau</sub> concentrations en mol/m <sup>3</sup> => indique la tendance d'un composé à être volatilisé d'une solution aqueuse; plus K <sub>H</sub> est élevée, plus le composé est volatile et facilement extrait de la phase aqueuse sous vide; K <sub>H</sub> est directement proportionnelle à P <sub>v</sub> , et inversement proportionnelle à S <sub>w</sub> ( $K_H = a * P_v = b / S_w$ )

Tableau A1.4 - Paramètres d'adsorption - définition

Symbol	Définition et importance par rapport à la biorémédiation du composé
K <sub>ow</sub>	proportion du composé qui se retrouve dans l'octanol dans un mélange égal d'octanol et d'eau: $K_{ow} = C_{octanol} / C_{ea}$ => mesure du caractère hydrophobe de la molécule => indique la tendance du composé à être adsorbé sur les particules solides et la matière organique => indicateur de tendance à la bioconcentration (BC) dans organismes aquatiques (K <sub>ow</sub> élevé -> BC élevée)
K <sub>oc</sub>	quantité de composé adsorbé rapportée au carbone organique $K_{oc} = K / f_{oc}$ , où f <sub>oc</sub> est la fraction organique (m/m) exprimée en terme de carbone organique, et K est le coefficient de partition du composé entre la phase adsorbée et la phase soluble à l'équilibre => indique la tendance du composé à être adsorbé sur la matière organique

Tableau A1.5 - Valeurs seuil des propriétés physico-chimiques pour classer les composés

	T <sub>f</sub> (°C)	d (-)	V <sub>d</sub> (cp)	V <sub>c</sub> (cs)	S <sub>w</sub> (mg/L)	K <sub>H</sub> (atm.m <sup>3</sup> /mol)	P <sub>v</sub> (mmHg)	pK <sub>oc</sub> (-)	pK <sub>o</sub> (-)
Bsup	100	1	1.0	0.8	1000	1.0E-03	1.000	3.2	3.5
Binf	13	1	0.6	0.4	1	1.0E-05	0.001	2.2	2.5

Note: Bsup: borne supérieure, au-dessus de ce seuil la valeur est élevée

Binf: borne inférieure, au-dessous la valeur est faible

Tableau A1.6 - Propriétés physico-chimiques des éthènes chlorés

	M (g/mo l) [1]	d (-) [1]	d <sub>v</sub> (-) [1]	T <sub>f</sub> (°C) [1]	T <sub>eb</sub> (°C) [1]	V <sub>d</sub> (cp) [2]	V <sub>c</sub> (cs) [2]	S <sub>w</sub> (mg/L )[3]	K <sub>H</sub> (atm.m <sup>3</sup> / mol) [4]	P <sub>v</sub> (mmHg) [4]	pK <sub>OC</sub> (-) [3]	pK <sub>OW</sub> (-) [3]
PCE	165.8	1.623	5.83	-19	121	0.890	0.540	150	2.85E-02	16	2.32	3.40
TCE	131.4	1.464	4.53	-73	87	0.570	0.390	1100	1.17E-02	60	2.00	2.29
1,1-DCE	96.9	1.218	3.25	-123	32	0.330	0.270	2500	1.51E-02	500	2.18	1.32
c-DCE	96.9	1.292	3.34	-81	60	0.467	0.364	3500	4.08E-03	200	1.69	1.86
t-DCE	96.9	1.263	3.34	-49	48	0.404	0.321	6300	4.05E-03	269	1.69	2.06
VC	62.5	0.908	2.15	-154	-13	na	na	2700	6.40E-02	2548	na	0.60

Notes : (1) site internet CHEMINFO, 1999  
[\(http://CISTI:CISTI55@ccinfoweb.ccohs.ca/cheminfo/search.html\)](http://CISTI:CISTI55@ccinfoweb.ccohs.ca/cheminfo/search.html)

(2) Huling et Weaver, 1991

(3) site internet USEPA 1999

[\(http://www.epa.gov/OGHDW/dwh/t\\_voc.html\)](http://www.epa.gov/OGHDW/dwh/t_voc.html)

(4) Metcalf et Eddy, 1991

**Annexe 2 - Mécanismes réactionnels des hydrocarbures  
aliphatiques halogénés**

- **Substitutions :**

- 1.. **Conjugaison ou substitution nucléophile.** Un groupe nucléophile  $N^-$  se substitue à un halogénure  $X^-$ .
- 2.. **Solvolyse.** Le solvant sert de nucléophile, comme par exemple l'eau dans une hydrolyse.

Les réactions de substitution sont plus rapides pour les composés monohalogénés.

- **Déhydrohalogénations :**

Un halogénure  $X^-$  est éliminé d'un atome de carbone en même temps qu'un ion  $H^+$  de l'atome de carbone adjacent. Le taux de déhydrohalogénéation augmente avec le nombre d'halogènes liés au carbone qui perd un halogène.

- **Oxydations,** comportant deux mécanismes principaux:

- 1..  **$\alpha$ -hydroxylation** ou oxydation d'un lien carbone-hydrogène. Un groupe hydroxyle  $OH^-$  remplace un atome d'hydrogène, sur un carbone lié à un halogène, et l'alcool halogéné formé donne un aldéhyde par perte d'un H du groupe hydroxyle et d'un halogénure.

- 2.: **Époxydation.** Il s'agit de l'oxydation d'une double liaison entre deux carbones. L'époxyde formé a une durée de vie courte, et les réactions de transformation de l'époxyde sont spontanées et dépendent du pH (Vogel et al., 1987) (Dolfing et al., 1993). Il peut être oxydé en acide carboxylique, réduit en alcool, ou hydrolysé en acides et monoxyde de carbone.

- **Réductions,** avec trois mécanismes réactionnels :

- 1.. **Hydrogénolyse :** la substitution d'un halogène par un atome d'hydrogène :

2. **Dihaloélimination** ou la réduction vicinale : l'élimination de deux halogènes sur des atomes de carbone adjacents avec formation d'une double liaison entre les deux carbones.
3. **Couplage.** Deux groupes alhyles ou aryles se lient par élimination sur chacun d'un halogénure  $X^-$ .

**Annexe 3 - Métabolisme de la matière organique en conditions  
méthanogènes**

### Dégradation de la matière organique en conditions méthanogènes :

Les trois grandes étapes de la dégradation de la matière organique en conditions méthanogènes sont l'acidogénèse ou hydrolyse de la matière organique, l'acétogénèse et enfin la méthanogénèse au sens propre.

- Acidogénèse ou hydrolyse :

La matière organique est dégradée par les bactéries fermentaires, anaérobies strictes ou facultatives, et les polymères protéiques, glucidiques, lipidiques sont transformés en acides gras (acétate, lactate, propionate, butyrate, ...), en alcools (méthanol, éthanol), en gaz ( $H_2$  et  $CO_2$ ) et en ammoniacal.

- Acétogénèse :

Les produits de l'acidogénèse sont transformés en acétate,  $CO_2$  et  $H_2$ , qui sont les principaux précurseurs directs du méthane.

Certains producteurs d'acétate et d' $H_2$  sont des acétogènes producteurs obligatoires d' $H_2$ . Ces organismes occupent une niche écologique restreinte et dépendent de l'association syntrophique avec des consommateurs d' $H_2$ , pour des raisons thermodynamiques et également à cause de l'inhibition de leur hydrogénase par  $H_2$ .

Equations des réactions anaérobies d'oxydation de l'éthanol et du propionate avec production d'acétate et de  $H_2$  (Zehnder, 1988)

Réactions d'acétogénèse	$\Delta G^\circ$ (kJ/réaction)
$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$	9.6
$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$	76.1

Dans le cas du propionate, la transformation est thermodynamiquement défavorable si la pression partielle en  $H_2$  n'est pas inférieure à  $10^4$  atm (Zehnder, 1988). Les deux grands groupes de consommateurs d' $H_2$  sont les méthanogènes hydrogénotrophes et les sulfato-réductrices hydrogénotrophes.

- Méthanogénèse proprement dite :

Les composés connus comme source d'énergie et de carbone par les méthanogènes sont des molécules simples, et leur nombre est limité (Zehnder, 1988). Les plus courants sont l'acétate, le mélange  $CO_2-H_2$ , le formate, le méthanol et les amines méthylées. Le monoxyde de carbone permet une faible croissance de certaines méthanogènes, et des

composés méthylés soufrés comme le diméthylsulfure, le diméthyldisulfure sont également utilisables.

Principaux substrats des méthanogènes (Zehnder, 1988)

Réaction	$\Delta G^\circ$ (kJ/molCH <sub>4</sub> )
$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-139
$4\text{HCOO}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{HCO}_3^-$	-127
$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-103
$4\text{CH}_3\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{NH}_4^+$	-102
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-28
$(\text{CH}_3)_2\text{S} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \frac{3}{2}\text{CH}_4 + \frac{1}{2}\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$	-74

Les méthanogènes sont des dégradeurs terminaux de la matière organique. Les étapes de dégradation présentées mettent en évidence que les méthanogènes dépendent d'autres organismes anaérobies pour obtenir leurs substrats de croissance.

Le couplage entre les acétogènes producteurs de H<sub>2</sub> et les méthanogènes hydrogénotrophes est thermodynamiquement favorable.

Équations du couplage des acétogènes utilisateurs de l'éthanol et du propionate avec les méthanogènes hydrogénotrophes (Zehnder, 1988)

Équations	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol substrat)	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol CH <sub>4</sub> )
$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4$	-58.2	-116.4
$\frac{4}{3}\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \frac{2}{3}\text{H}_2\text{O} \rightarrow \frac{4}{3}\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4 + \frac{1}{3}\text{CO}_2$	-25.6	-34.1

L'acétate est le précurseur principal de méthane dans la nature. Dans un digesteur anaérobie, 70% du CH<sub>4</sub> formé proviennent de l'acétate (metcal et Eddy, 1991).

Certaines méthanogènes sont polyvalentes et utilisent différents substrats. En présence de plusieurs substrats, le phénomène de croissance diauxique est possible, mais pas général. Il est possible que deux substrats soient consommés simultanément, à des taux différents. L'observation de la diauxie est rendue compliquée par les changements de pH ou l'inhibition du métabolisme par H<sub>2</sub> dissous.

### **Besoins de croissance des méthanoliques :**

La croissance des méthanoliques demande un potentiel redox très bas, inférieur à -400 mV. Les facteurs de croissance organiques habituels sont des acides gras volatils (acétate, 2-méthylbutyrate, ...), le coenzyme M pour les méthanoliques incapables de le synthétiser ( $10^{-6}$  M en général), des vitamines et des compléments nutritifs complexes comme les extraits de levure.

Les besoins en azote sont couverts par l'ion ammonium. Les besoins en soufre sont satisfaits par des composés soufrés réduits, la plupart des méthanoliques manquant de sulfate-réductase. Les éléments en trace nécessaires sont le cobalt, le fer, le molybdène, le nickel, le magnésium et le potassium. Le chlorure de sodium est requis pour la croissance (5 à 15 mM).

La plupart des méthanoliques connues croissent dans une gamme de pH relativement étroite, entre 6 et 8, et sont mésophiles, la température optimale de croissance courante étant 35°C. La gamme de température acceptée est cependant très large, de 4°C à 55°C en général, un maximum de 83°C ayant été observé pour la température optimale de croissance.

### **Inhibiteurs des méthanoliques :**

Les méthanoliques sont très sensibles à de faibles concentrations d'oxygène. Les accepteurs d'électrons alternatifs comme le nitrate et le sulfate sont des inhibiteurs dans les cultures mixtes. Les dénitritantes ou les sulfatoréductrices ont en effet un avantage sélectif car elles sont plus efficaces thermodynamiquement, et elles prendront la place des méthanoliques si les conditions le permettent. Dans un réacteur méthanolique, il est donc important d'éviter les conditions favorables aux utilisateurs de nitrate ou de sulfate.

En présence de soufre, les méthanoliques produisent du sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) au lieu du méthane. Le soufre élémentaire et le sulfite ( $SO_3^{2-}$ ) sont des inhibiteurs puissants de la méthanologénèse par des hydrogénotrophes en culture pure.

L'acide 2-bromoethanesulfonique (BES) ( $BrCH_2CH_2SO_3^-$ ) est un analogue structural du coenzyme M ( $HSCH_2CH_2SO_3^-$ ), spécifique des méthanoliques, non trouvé chez d'autres organismes. Ce coenzyme est responsable de la dernière étape de la formation du méthane. Le BES est considéré comme un inhibiteur spécifique des méthanoliques. La dose requise pour l'inhibition complète de la méthanologénèse des populations d'un

digesteur anaérobie est de  $1 \times 10^{-3}$  M BES pour les acétoclastes et  $50 \times 10^{-3}$  M BES pour les hydrogénotrophes (Zehnder, 1988).

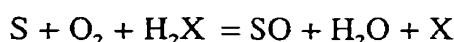
L'acide fluoroacétique est un inhibiteur spécifique des méthanogènes acétoclastes. L'acétylène et l'éthylène sont des inhibiteurs de la méthanogénèse, l'inhibition par l'éthylène étant réversible. L'inhibition par l'acétylène n'est pas due à un blocage d'une étape de la formation du méthane, et ce n'est pas un inhibiteur spécifique des méthanogènes.

#### **Annexe 4 - Métabolisme des méthanotrophes**

### **Les oxygénases, enzymes de l'oxydation cométabolique du TCE**

Les oxygénases ou hydroxylases sont des enzymes qui catalysent l'incorporation directe du dioxygène ( $O_2$ ) dans des composés organiques.

Les monooxygénases incorporent un groupe hydroxyle (OH) dans leurs substrats, par réduction de  $O_2$  et par oxydation simultanée de NAD(P)H. Un atome de  $O_2$  se retrouve dans le groupe hydroxyle du substrat, et le second est réduit en  $H_2O$  par le substrat lui-même ou par un cosubstrat réducteur ( $H_2X$ ) (Harayama et al., 1992).



Les dioxygénases incorporent 2 atomes de  $O_2$  dans leurs substrats :

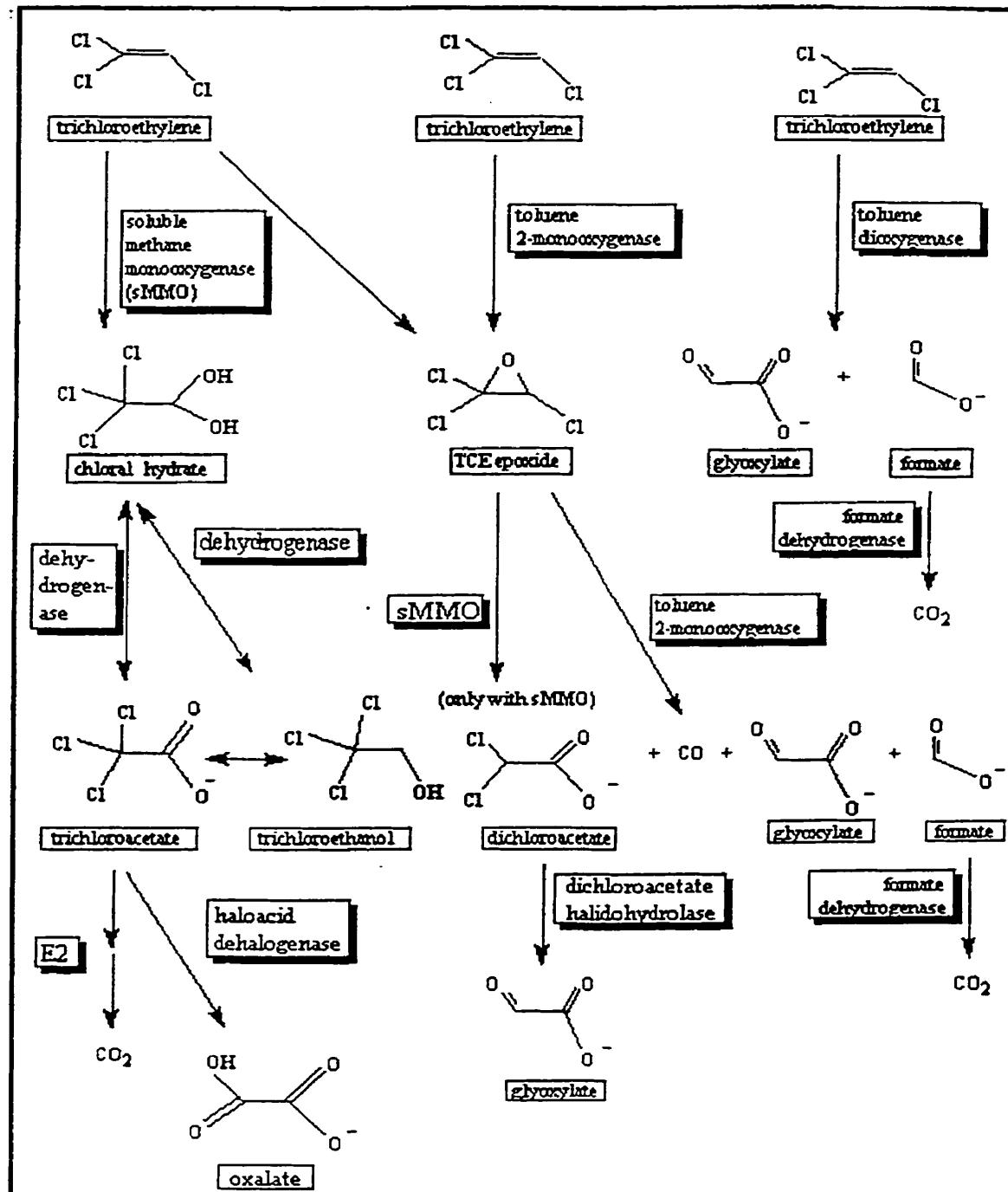
- les dioxygénases aromatiques incorporent 2 groupes hydroxyles dans les substrats aromatiques, et forment des cis-diols; pour cette réaction le donneur d'électron NAD(P)H est requis;
- les dioxygénases aromatiques de clivage, incorporent les deux atomes de  $O_2$  dans les substrats aromatiques et clivent le noyau aromatique, sans utiliser un réducteur externe pour cette réaction.

Toutes les oxygénases ont un cofacteur, un métal de transition, la flavine ou la ptéridine, qui interagit avec  $O_2$  (Harayama et al., 1992). Le cofacteur active le dioxygène, pour donner une forme hautement réactive de l'oxygène, un oxygène radicalaire ou un radical hydroxyle. Les oxygénases utilisant le cofacteur NAD(P)H ont une réaction catalytique en deux étapes : l'oxydation du NAD(P)H pour générer deux équivalents-réducteurs, puis l'hydroxylation du substrat.

Les oxygénases jouent un rôle important dans le catabolisme microbien. Elles initient la dégradation des composés aromatiques et celle des alcanes.

Plusieurs oxygénases sont capables de réaliser l'oxydation cométabolique du TCE, mais la sMMO présente des taux de dégradation du TCE très supérieurs aux autres oxygénases.

### Voies métaboliques d'oxydation du TCE par différentes oxygénases



Voies de dégradation du TCE par trois oxygénases  
 ([http://www.labmed.umn.edu/umbbd/tce/tce\\_image\\_map.html](http://www.labmed.umn.edu/umbbd/tce/tce_image_map.html), Whittaker et al., 2000)

## Méthodes d'identification et de caractérisation des méthanotrophes

Les techniques classiques d'isolement et de culture sont délicates à appliquer aux méthanotrophes à cause de leur croissance lente, qui permet par exemple le développement en premier de non-méthanotrophes sur les plaques de Pétri (Murrell et al., 1998).

Les critères de classification des méthanotrophes cités peuvent servir à identifier et suivre les changements de populations méthanotrophes.

Les acides gras inhabituels trouvés chez les méthanotrophes sont des marqueurs spécifiques, qui identifient le type de méthanotrophes présents et permettent de suivre l'activité microbienne (Nold et al., 1999). Les profils phospholipidiques établissent des relations entre souches, qui sont cohérentes avec les résultats obtenus par les séquences d'ARNr 5S ou 16S (Hanson et Hanson, 1996).

Les méthodes moléculaires utilisant l'amplification de l'ADN par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont applicables sur l'ARN 16S et des gènes fonctionnels, codant pour des enzymes spécifiques du métabolisme méthanotrophe. Ces enzymes catalysent les deux premières de l'oxydation du méthane, ce sont la méthane monooxygénase (MMO) et la méthanol déhydrogénase (MDH). Leurs séquences hautement conservées font d'elles de bons identificateurs (Murrell et al., 1998).

Les techniques immunologiques d'identification sont aussi utilisables, avec des anticorps dirigés contre les enzymes spécifiques des méthanotrophes la MMO et la MDH (Murrell et al., 1998).

La détection et le suivi de l'activité de la sMMO *in vivo* est réalisable par un test colorimétrique d'oxydation du naphtalène (Brusseau et al., 1990). Seule la sMMO réagit lors de ce test. Pour mettre en évidence une activité MMO totale, soit pMMO et sMMO confondues, un test d'époxydation du propylène est possible en routine (Hou et al., 1979 cité par Park et al., 1991).

Parmi ces méthodes d'identification et de caractérisation, le test colorimétrique est sans doute le plus facile à mettre en oeuvre, car plus simple techniquement et moins cher. Les méthodes immunologiques et les méthodes des profils d'acides gras sont les plus délicates et les moins évidentes à mettre en place, notamment pour des raisons de coûts.

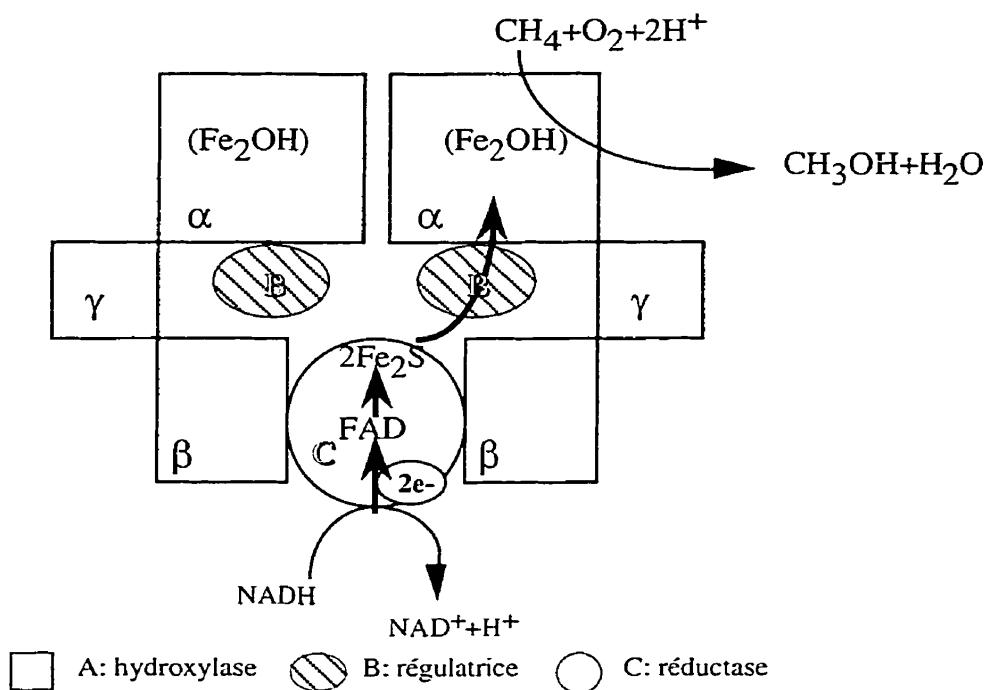
Mais le choix d'une méthode dépend des objectifs car les réponses obtenues ne sont pas équivalentes.

### **Structure et fonctionnement de la sMMO et de la pMMO**

Les MMO les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les sMMO de *Methylococcus capsulatus* et de *Methylosinus trichosporium*. (Murrell et al., 1998).

La sMMO est un complexe de trois protéines :

- la protéine A est une hydroxylase, responsable de l'oxydation du méthane en méthanol; elle comporte trois sous-unités chacune en double ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) et le site actif est sur la sous-unité  $\alpha$ ;
- la protéine B a une action régulatrice essentielle au fonctionnement de l'enzyme: elle assure le transfert des électrons vers A, elle module la spécificité par rapport au substrat et elle module le potentiel rédox; lorsque le substrat est un hydrocarbure autre que le méthane, B gouverne la régiosélectivité de la réaction;
- la protéine C est une réductase, responsable de la réduction de NADH pour fournir les équivalents-réducteurs à l'hydroxylase.

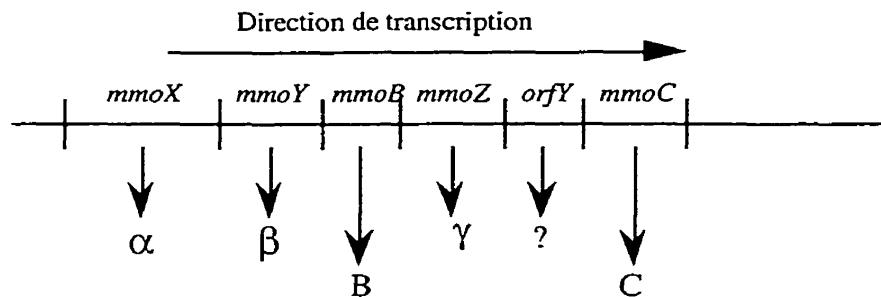


Représentation schématisée de la structure et du fonctionnement de la sMMO (adapté de Funabuki, 1997)

La sMMO est peu spécifique de son substrat, et elle est capable de réaliser l'oxydation cométabolique de plusieurs autres substrats que le méthane, comme l'ammoniaque, le propylène, le TCE, le naphtalène, des alcanes, des alcènes et des hydrocarbures aromatiques (Hanson et Hanson, 1996; Murrell et al., 1998).

La capacité de co-oxydation de nombreux composés de la sMMO en fait un biocatalyseur prometteur pour des applications industrielles. Sa production est cependant problématique, car le rendement de production est trop faible (<5gsMMO/L/h) et la sMMO est trop instable. Les études du mécanisme de réaction de la sMMO sont donc nombreuses, afin de trouver le moyen de synthétiser un catalyseur mimant la sMMO (Funabuki, 1997).

Les gènes codant pour la sMMO ont été clônés chez *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylocystis* sp. souche M. Pour ces trois méthanotrophes, les séquences sont hautement conservées, aussi bien au niveau de l'ADN qu'au niveau des séquences protéiques (Murrell et al., 1998).



*orfY* (open-reading frame) : fonction inconnue du peptide codé

### Gènes de la sMMO sur le chromosome chez *Methylosinus trichosporium* OB3b et *Methylococcus capsulatus* (Bath)

La pMMO est plus réfractaire à l'analyse biochimique. Elle a été purifiée chez *Methylococcus capsulatus* (Bath) (Zahn et DiSpirito, 1996, cités par Murrell et al., 1998). Elle comporte trois sous-unités, et contient probablement du fer et du cuivre (Hanson et Hanson, 1996; Sullivan et al., 1998). La pMMO est plus spécifique de son substrat, mais elle cométabolise aussi des alcanes et des alcènes à chaîne courte, et l'ammoniaque (Murrell et al., 1998).

Les gènes codant pour la pMMO ont été clônés, et deux d'entre eux, *pmoA* et *pmoB*, produisent des séquences d'acides aminés très similaires aux séquences codées par les gènes *amoA* et *amoB* codant des polypeptides clés de l'ammoniaque monooxygénase (AMO) d'une bactérie nitrifiante, *Nitrosomonas europaea*. *N. europaea* réalise l'oxydation cométabolique du TCE grâce à l'enzyme ammoniaque monooxygénase (AMO). Chez les méthanotrophes et les nitrifiantes étudiées, les gènes *pmo* et *amo* sont en double, sans raison connue.

**Régulation de la synthèse de la sMMO et de la pMMO** - La production de sMMO est observée durant la croissance de souches de *Methylosinus* et de *Methylococcus*, dans des milieux pauvres en cuivre. Une espèce de *Methylomonas* et une espèce de *Methylocystis* ont montré une production de sMMO (Murrell et al., 1998).

L'expression de la sMMO chez *Methylosinus* et *Methylococcus* est régulée au niveau de la transcription, par le cuivre disponible pour la croissance. Si le rapport cuivre/biomasse est faible, la synthèse de sMMO est réprimée et la synthèse de pMMO est induite. La pMMO est exprimée dans toutes les méthanotrophes connues, si la concentration du

cuivre est supérieure à 0.85-1 µmol/g cellule en poids sec (Hanson et Hanson, 1996). Le cuivre est nécessaire à sa synthèse et à son activité.

La régulation de la production de la pMMO et de la sMMO serait réalisée par une voie commune de répression-induction de la transcription des gènes de la sMMO et de la pMMO. En l'absence de cuivre, un répresseur empêche la transcription des gènes de la pMMO, et la transcription des gènes de la sMMO est induite. Les ions Cu<sup>2+</sup> désactivent le répresseur et induisent la transcription des gènes de la pMMO, tandis qu'ils répriment la transcription des gènes de la sMMO (Nielsen et al., 1997).

**Annexe 5 - Protocoles des méthodes d'analyses**

## Annexe 5A- Analyses du TCE et des métabolites en phase liquide

Recommandations, pour minimiser les pertes au cours des manipulations:

- travailler vite
- utiliser des matériaux non adsorbants: verre, téflon, ...
- penser à éviter toutes les manipulations favorisant la volatilisation, par exemple:
  - a) tirer doucement le piston d'une seringue pour éviter les bulles
  - b) mettre le bout de l'aiguille sous la surface du liquide dans lequel injection d'un composé volatil, car les solvants chlorés plus denses coulent d'abord

### 1. Solutions à préparer

1. Solution de standard interne: chlorobenzène (ClBz) dans du méthanol (MeOH): concentration: environ 450 mg/L, pour ajouter un volume raisonnable, soit 10µL par vial d'échantillon.

- *Matériel:*

Préparation dans 1 vial de 10 ou 20 mL, selon la quantité à conserver, pour la durée totale des expériences, avec 1 septum en téflon

Vials ambrés de 2 mL, pour conserver la solution mère, avec septa en téflon

- *Procédure*

Calculer le volume de ClBz à mettre dans 10 ou 20mL de MeOH pour une concentration de 450 mg/L.

Peser le vial vide (tare), ajouter du MeOH en laissant à peu près le volume nécessaire pour ajouter le ClBz. Peser le vial (tare+MeOH).

Ajouter le volume calculé de ClBz à l'aide d'une seringue gastight, le bout de l'aiguille sous la surface du MeOH.

Sceller le vial. Calculer la contraction réelle de la solution de ClBz.

Transférer dans les vials ambrés à l'aide d'une seringue en verre de 10 ou 20 mL.

Remplir les vials à ras bord (ciel gazeux minimal).

### 2. Préparation des échantillons

- Mettre 3-4 goutte de HCl concentré dans un vial headspace de 20mL pour inactiver la biomasse

- Prélever 10mL dans la recirculation en sortie du réacteur, à l'aide d'une seringue en verre
- Transférer l'échantillon dans le vial, en diluant avec de l'eau ultra pure MilliQ, si la concentration attendue excède la gamme de la courbe standard
- Ajouter rapidement 10µL de standard interne, qui est une solution de chlorobenzène dans du méthanol à une concentration de l'ordre de 500mg/L
- Sceller le vial avec un septum recouvert de téflon sur la face interne
- Conserver à 4°C, les vials retournés vers le bas, jusqu'à l'analyse

### 3. Procédure expérimentale

- Blanc: remplacer l'échantillon par de l'eau distillée, préparer comme un échantillon.
- Prévoir 1 blanc tous les 6 échantillons, et 1 au début et 1 à la fin de chaque série.
- Préparer 1 standard de l'ordre de la concentration attendue dans les échantillons.
- Analyser le standard.
- Recommencer si la mesure s'écarte de plus de 15% de la valeur attendue.
- Recalibrer le GC si l'écart mesure/valeur attendue est de plus de 15% pour les 2 standards.
- Prévoir 1h par vial.

### 4. Calculs

Calculer la masse de chaque composé dans l'échantillon en utilisant la droite de calibration.

### 5. Courbe standard

#### Principes:

- 6 à 8 point, soit 6 à 8 concentrations standards
- Gamme de calibration, 2 façons de procéder:
  - 1) 1 gamme 0-1000 ppb, et diluer les échantillons si nécessaire
  - 2) 2 gammes: 0-1000 ppb et 1000-20000 ppb, et utiliser selon l'échantillon
- Préparer et conserver à 4°C une quantité de standards suffisante pour la durée des expériences, afin d'éliminer les interférences dues à un changement de solutions standards.  
Vial de standard concentré utilisable si phase gazeuse inférieure à 5% du volume total (sinon fraction gaz trop élevée). Donc calculer le nombre d'utilisations possibles d'un vial de 2 mL, et prévoir le nombre de vials nécessaires.  
Après chaque utilisation, remplacer le septum percé avant de remettre à 4°C.
- Courbe standard tracée, 2 façons de procéder:
  - 1) Tracer concentration (ppb) versus aire ( $\mu\text{V.s}$ ). Utiliser le même volume de 10mL pour les standards et les échantillons, afin d'éliminer le calcul par la loi de Henry de la fraction en solution.
  - 2) Tracer masse (ng) versus aire ( $\mu\text{V.s}$ ). Calculer ensuite la concentration de l'échantillon en fonction du volume d'échantillon analysé.

### Matériel et réactifs

- Standards commerciaux: TCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE, VC.
- Méthanol.
- 5 vials de 20mL avec septa en téflon: 4 solutions mères concentrées et 1 mélange des 4 composés chacun à 1000ppm exactement.
- 6 vials de 10mL avec septa en téflon pour 6 standards.
- 30 vials ambrés de 2 mL avec septa en téflon, pour conservation des 6 standards.
- 15 vials de 20 mL avec septa en téflon: calibration réalisée en double (12 vials pour 6 concentrations), et mettre 1 blanc avant et après chaque série.
- Seringues en verre gastight, 10 ou 20mL et autres volumes selon les volumes prélevés prévus. Voir la procédure expérimentale pour prévoir.

### Procédure expérimentale de préparation des échantillons standards

- Préparer la solution de standard interne.
- Préparer 4 solutions mères concentrées à 40000 ppm environ, de TCE, c-DCE, t-DCE, 1,1-DCE.  
Objectif: préparer à partir des 4 solutions un mélange à exactement 1000ppm de chaque composé.
  1. Peser 1 vial de 20mL avec un septum.
  2. Mettre du MeOH, en laissant à peu près le volume nécessaire pour ajouter le composé, peser.
  3. Ajouter le volume calculé de composé à l'aide d'une seringue en verre gastight. Sceller.
  4. Calculer la concentration de la solution.
- Mélange à 1000 ppm:
  1. Peser 1 vial de 20 mL avec 1 septum en téflon. Mettre du MeOH, en laissant le volume nécessaire pour les 4 solutions mères, poser le septum sur le vial (MeOH volatile également), peser.
  2. Calculer alors les 4 volumes des solutions mères, pour avoir exactement 1000 ppm de chaque composé dans le volume de MeOH préparé.
  3. Préparer les 4 seringues des solution. Injecter dans le MeOH. Sceller le vial.
- Standards conservés:  
Préparer les 6 vials de 10mL, en diluant la solution 1000ppm dans le volume de MeOH correspondant à la concentration visée.  
Commencer par les plus petites concentrations pour limiter les pertes dans la phase gazeuse lors des prélèvements.
- Transférer chaque vial de 10mL dans 4 ou 5 vials ambrés, selon le volume disponible, en prenant soin de ne pas laisser de ciel gazeux.
- Echantillons standards:
  1. Dans les 6 vials de 20mL, mettre 3 gouttes de HCl.
  2. Ajouter 10mL d'eau distillée.
  3. Préparer 2 seringues de 10µL: standard interne (ClBz) et standard du vial correspondant à la concentration préparée. Les injecter et sceller le vial.
- Blancs: préparer 3 vials selon la procédure précédente, sans les 10µL de standard.

- Retourner les vials et les conserver à 4°C jusqu'à l'analyse.
- Remplacer les septa percés sur les vials de standards concentrés, mettre à 4°C.

*Analyses et courbe de calibration*

Durée: 1 heure par vial.

- Mettre les 6 vials en ordre de concentration croissante dans chaque série, afin de limiter les interférences de l'échantillon précédent.
- Tracer concentration versus aire ou masse versus aire.
- Vérifier que les blancs ne contiennent pas de traces des composés.
- Si possible, ajouter les tables de calibration dans la méthode d'analyse.

---

Annexe 5B- Analyses du TCE et des métabolites en phase gazeuse

---

**1 . Courbe standard**

- Fréquence du standard : 1 par mois.
- Mélange standard dans de l'azote (Air Products): PCE 322ppm, TCE 330ppm, c-DCE 106ppm, t-DCE 53,5ppm, 1,1-DCE 48,7ppm, VC110ppm.
- Ampoule d'échantillonnage (supelco, modèle 2-2161), la purger pendant 30s avec le standard, fermer alors l'entrée puis la sortie de l'ampoule 3s après.
- Prélever des volumes de 10µL, 25µL, 50µL, 100µL. Utiliser des seringues gastight et surtout avec des aiguilles adéquates (arrondies et opercule sur le côté).
- Analyse sur le GC-FID Hewlett Packard, modèle HP6890.
- Tracer la courbe de calibration pour chaque composé: la masse (ng) versus l'aire du pic 9pA), et calculer la droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation linéaire
- Calculer la limite de détection de la méthode, et la limite de quantification.

**2 . Préparation des échantillons et procédure expérimentale**

- Prélever 100µl de gaz avec une seringue en verre munie d'une valve (Hamilton, modèle #1725). Rincer 3 fois la seringue, puis laisser 15s s'équilibrer son contenu avec le biogaz avant de fermer la valve.

---

Annexe 5C- Analyses des acides gras volatils

---

**1. Solutions**

- Standard interne .
- Solution de rinçage: acide formique à 25%.

## **2 . Préparation des échantillons et procédure expérimentale**

- Prélever 5mL dans la recirculation en sortie du réacteur.
- Mettre environ 1.5mL dans un eppendorf.
- Fermer et centrifuger 2min dans une centrifugeuse à eppendorf (modèle 5414, Bronkina Instruments Division, Rexdale, Ontario).
- Mettre 350µL de standard interne et 350µL du surnageant de l'eppendorf dans un vial de 1mL.
- Caper le vial et conserver à 4°C jusqu'à l'analyse.
- Pour chaque échantillon, préparer 2 vials d'eau distillée, et 1 vial de rinçage, avec 90µL d'acide formique et 610µL d'eau distillée.

---

### Annexe 5D- Analyses de l'éthanol

---

#### **1 . Solutions**

- Standard interne de méthanol à 1g/L.
- Standard d'éthanol à 1g/L.

#### **2 . Préparation des échantillons et procédure expérimentale**

- Prélever 5mL dans la recirculation en sortie du réacteur.
- Mettre environ 1.5mL dans un eppendorf.
- Fermer et centrifuger 2min dans une centrifugeuse à eppendorf (modèle 5414, Bronkina Instruments Division, Rexdale, Ontario).
- Mettre 350µL de standard interne et 350µL du surnageant de l'eppendorf dans un vial de 1mL.
- Caper le vial et conserver à 4°C jusqu'à l'analyse.
- Pour chaque échantillon, préparer 1 vials d'eau distillée.
- Pour chaque série d'échantillon, préparer 2 vials contenant 350µL de standard éthanol et 350µL de standard méthanol.

---

### Annexe 5E- Analyses des chlorures inorganiques - Méthode colorimétrique Hach

---

#### **1 . Solutions et réactifs**

- Solution de thyocianate mercurique
- Solution d'ions ferriques

## 2. Préparation des échantillons

- Prélever 20 ml dans la recirculation du réacteur
- Centrifuger 10 min à 10000 rpm dans la centrifugeuse Beckman, avec le rotor JA-20
- Prélever le surnageant pour les analyses

## 3. Procédure expérimentale

- Régler le spectrophotomètre Hach à 455 nm
- Préparer 3 blancs, en utilisant de l'eau ultra pure MilliQ à la place de l'échantillon
- Réaliser les échantillons en triplicata, et pour chaque triplica prélever 5 ml du surnageant de l'échantillon centrifugé et mettre dans un tube Hach
- Ajouter 500 L de thyocianate mercurique et 250 L de solution ferrique
- Mélanger (vortex)
- Incuber à la température de la pièce pendant 5 min
- Utiliser les blancs pour ajuster le zéro du spectrophotomètre
- Lire l'absorbance

Note: ne pas préparer plus de 15 tubes au total en raison de la vitesse de la réaction colorimétrique, trop rapide pour ne pas avoir un décalage significatif entre le 1er tube et le 20ième tube préparé par exemple.

---

## Annexe 5F- Mesure de la demande chimique en oxygène (DCO)

---

### 1. Solutions et réactifs

- Solution de digestion : dans un erlenmeyer de 500 mL mettre
  - 1.. 8.5 g de  $\text{HgSO}_4$
  - 2.. 24.5 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
  - 3.. 250 mL d'eau distillée
  - 4.. 85 mL d'acide sulfurique concentré ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) progressivement
  - 5.. Mélanger et compléter à 500 mL
  - 6.. Verser dans une bouteille en verre brun
- Solution acide : dans une bouteille en verre brune de 1 L
  - 1.. 26.52 g  $\text{AgSO}_4$
  - 2.. 8.6 g  $\text{HgSO}_4$
  - 3.. Compléter à 1 L avec  $\text{H}_2\text{SO}_4$

### 2. Préparation de la courbe standard

- Solution standard de 1500 mg DCO/L : dans une fiole jaugée de 500 mL
  - 1.. 637 g de phtalate de potassium
  - 2.. Compléter à 500 mL avec de l'eau distillée

- Préparer 5 dilutions en triplicata de la solution standard

### **3 .      Préparation des échantillons**

- Collecter à l'effluent du réacteur 500 mL
- DCO soluble : centrifuger 10 mL pendant 10 min à 10000 rpm dans la centrifugeuse Beckman, avec le rotor JA-20
- Prélever le surnageant pour les analyses
- DCO totale : utiliser l'échantillon brut

### **4 .      Procédure expérimentale**

- Faire les analyses en triplicata
- Réaliser un triplicata blanc avec de l'eau distillée
- Mettre dans un tube Hach 2 mL d'échantillon ou de solution standard ou d'eau distillée
- Ajouter 0.5 mL de solution de digestion
- Ajouter 2.5 mL de solution acide
- Fermer et mélanger.
- Digestion dans le four Hach pendant 2 h à 140°C.
- Laisser les tubes refroidir à la température de la pièce
- Régler le spectrophotomètre Hach à 620 nm
- Utiliser le blanc avec la plus faible valeur pour régler le zéro du spectrophotomètre
- Lire l'absorbance des échantillons et utiliser la courbe standard pour calculer la concentration

**Annexe 6 - Tests d'activité**

---

## Annexe 6A- Tests d'activité avec des substrats liquides

---

### 1. Solutions et réactifs

#### 1). Solution réductrice de sulfure de cystéine à 1,25% :

- ajouter dans 50mL d'eau distillée 2.5g de cystéine HCl
- ajuster rapidement le pH à 10 avec une solution 3N de NaOH (environ 13.4mL)
- mettre la solution dans un erlenmeyer de 500mL, et purger avec N<sub>2</sub>
- ajouter 2.5g de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, et ajuster le volume à 200mL avec de l'eau distillée
- faire bouillir sous N<sub>2</sub>
- travailler sous N<sub>2</sub> pour transférer dans des bouteilles sérologiques de 50mL, sceller avec des septa et des capuchons en aluminium
- autoclaver à 15psi pendant 15min
- laisser refroidir, et mettre sous pression les bouteilles avec N<sub>2</sub> en travaillant stérilement; utiliser une aiguille #15
- conserver à 4°C

#### 2). Solution de résazurine à 0.1% (w/v).

#### 3). Tampon phosphate à pH 7.5 (0.05M), avec K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> équimolaires, préparé en conditions anérobies

- ajouter dans 500mL d'eau distillée 2.00g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.55g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.55g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O
- ajouter 1mL de résazurine 0.1%
- bouillir sous N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et en agitant pendant 30min
- répartir dans 2 bouteilles sérologiques de 500mL, les sceller avec un septum de caoutchouc et un anneau d'aluminium
- purger 2min avec N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en utilisant des aiguilles #15
- injecter à travers le septum 1mL de la solution réductrice de sulfure de cystéine pour 100mL de tampon phosphate
- vérifier que après quelques heures la solution bleue initialement devient rose, puis incolore; si la solution reste rose, elle n'est pas anaérobie
- conserver à 4°C

#### 4) Solutions de substrat, préparées puis traitées en anaérobiose selon la même procédure que le tampon phosphate, et conservées dans des bouteilles sérologiques de 50mL à 4°C

- préparer dans de l'eau distillée une solution d'éthanol à 300g/L,
- préparer une solution d'acétate à 300g/L: peser 12.4g d'acétate d'ammonium, 16.4g d'acétate de potassium, 18.3g d'acétate de sodium, ajouter 6.3mL d'acide acétique glacial, puis compléter à 150g avec de l'eau distillée

- mettre 40g de glucose dans 100mL d'eau distillée (glucose à 400g/L)

## 2. Matériel

Pour chaque biomasse:

- 1 seringue de prélèvement de la biomasse, selon le volume prélevé seringue de 10mL ou 20mL, avec ouverture agrandie pour prélever des granules
- 1 bouteille en plastique avec un barreau aimanté, peser le tout; (volume de la bouteille selon volume de mélange à préparer)
- 1 seringue de 60mL avec une aiguille #17, pour tampon HPO<sub>4</sub>
- 3 bouteilles sérologiques de 120 mL (triplicatas), 3 septas gris et 3 capuchons en aluminium; peser chaque bouteille avec un septum et un capuchon
- 1 pipette en plastique de 10 mL, embout coupé
- 1 seringue de 1mL, avec aiguille #15 (verte) pour injecter la solution d'EtOH
- 1 shaker à 35oC, 100 rpm
- 15 seringues de 3 mL, avec aiguilles #17 (violettes)
- 15 vials et 15 eppendorfs identifiés de façon identique, si 5 échantillonnages:  
(3 bouteilles) \* (5 échantillonnages) = 15 vials

## 3. Préparation des échantillons

Echantillon dans chaque bouteille sérologique:

- biomasse en concentration de 5gVSS/L, donc calculer la dilution correspondante de la biomasse dans le tampon phosphate
- volume d'échantillon de 10 mL

Préparation du mélange biomasse et tampon HPO<sub>4</sub>:

- prélever la biomasse en anaérobiose, donc en purgeant la bouteille plastique avec N<sub>2</sub>; peser
- ajouter le volume de tampon HPO<sub>4</sub> nécessaire selon la dilution: travailler sous N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et purger avec N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> la seringue de 60mL avant de prélever le tampon HPO<sub>4</sub>  
peser

Préparation des échantillons dans les bouteilles sérologiques:

**(Travailler sous N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pour les tests en anaérobiose)**

- placer la bouteille plastique contenant le mélange biomasse/tampon HPO<sub>4</sub> sur un agitateur pour homogénéiser;  
utiliser la pipette de 10 mL pour prélever: prendre le volume en 1 seule fois, et le transférer en totalité dans la bouteille sérologique sans ajustement du volume, car la sédimentation des granules est immédiate dans la pipette
- mettre 10mL de mélange dans chaque bouteille sérologique, fermer;  
peser chaque bouteille

- purger chaque bouteille avec N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pendant 2 min, utiliser des aiguilles #15

#### **4. Procédure expérimentale**

Démarrage du test:

- injecter dans chaque bouteille 0,1 mL de solution de substrat, en utilisant pour 9 bouteilles la seringue de 1 mL préalablement purgée avec N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (ne pas prendre le dernier 0,1mL de la seringue)
- noter l'heure, car le temps d'injection du substrat est le temps initial
- incuber les bouteilles à 35°C, 100 rpm

Temps d'échantillonnage choisis en fonction des connaissances disponibles sur le substrat et la biomasse.

Faire un tableau des temps d'échantillonnage prévus, avec en parallèle une colonne des temps réels, à noter au fur et à mesure.

A chaque date d'échantillonnage:

- noter la date/heure = temps d'échantillonnage dans le tableau précédent
- prélever 1mL dans chaque bouteille sérologique avec 1 seringue de 3mL purgée avec N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, la bouteille renversée et agitée pour un prélèvement homogène
- mettre dans l'eppendorf correspondant préidentifié, et centrifuger 2 min
- mettre dans un vial correspondant à l'eppendorf :
  1. analyse acétate ou éthanol : 350µl de standard interne et 350µl du surnageant
  2. analyse glucose : 600µl du surnageant
- conserver les vials à 4°C jusqu'à l'analyse
- analyse du substrat selon la méthode

#### **5. Calculs**

- Calculer à chaque échantillonnage la concentration du substrat
- Tracer les courbes de diminution de S, la concentration du substrat en fonction du temps pour chaque triplicata (mgS/L)
- Calculer pour chaque bouteille X, la concentration de la biomasse (gVSS/L)
- Utiliser la partie linéaire pour calculer le taux spécifique de consommation :

$$\text{Activité (mgSubstrat / gVSS.d)} = \frac{\Delta S}{\Delta t \times X}$$

Annexe 6A- Tests d'activité méthanotrophe

---

**1. Préparation des solutions**

**1.1. TRACE METALS SOLUTION**

- Add in a 1 Liter volumetric flask :

Compounds	Concentration ( $\mu$ M)	(mg/L)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,15	36,92
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	47,6	707,4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <i>(MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) ou</i>	2 <i>(1,6)</i>	63,9
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,01647	16,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6	41,1
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4	10,2
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,4	9,7
KI	1	22,2
FeSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	40	1000

- Complete to 1 L with demineralized water.

**1.2 LOWNITRATE SALT MEDIUM(LNSM)**

- Add in a 1 Liter volumetric flask :

Compounds	Concentration ( $\mu$ M)	(mg/L)
NaNO <sub>3</sub>	1,0	92,1
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	188,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,9	539,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0	1610,6

and 10 mL of the trace metals solution prepared

- Complete to 1 L with demineralized water

**2. Préparation des échantillons**

**2.1 MATÉRIEL**

Pour chaque biomasse:

- 1 seringue de prélèvement de la biomasse, avec ouverture agrandie pour passage des granules
- 1 bouteille en plastique avec un barreau aimanté, peser
- 3 bouteilles sérologiques de 120 mL, 3 septas gris et 3 capuchons en aluminium; peser chaque bouteille vide et pleine d'eau avec un septum et un capuchon
- 1 pipette en plastique de 10mL, embout coupé, pour remplir les bouteilles sérologiques
- 1 shaker à 30°C, 400 rpm

## 2.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Dilution de la biomasse dans le LNSM: proportions pour avoir 1 à 2gVSS/L dans les bouteilles sérologiques.

Préparer un peu plus que le volume de mélange nécessaire pour tous les échantillons, sinon dernier échantillon plus difficile à prélever identique aux autres.

- prélever la biomasse, mettre dans la bouteille plastique correspondante peser, placer sur un agitateur
- ajouter volume de LNSM selon dilution souhaitée peser
- prélever dans la bouteille plastique 20 mL environ en une seule fois (ne pas ajuster le volume), transférer dans une bouteille sérologique sceller la bouteille, peser
- purger les bouteilles 2 min avec un mélange CH<sub>4</sub> et air/CO<sub>2</sub> (80%/20%): réglages pour la culture des méthanotrophes 0,3 L/h de CH<sub>4</sub> et 0,9 L/h du mélange air/CO<sub>2</sub> noter le temps initial (échantillonnage t<sub>0</sub> après 30 min)
- incuber à 30°C et 400rpm

Remarque: les débits de gaz ne sont pas choisis selon la stoechiométrie de la réaction, mais pour respecter les conditions optimales de culture déterminées dans le laboratoire (excès de CH<sub>4</sub> dans les conditions recommandées).

### 4 . Procédure expérimentale

- Démarrage du test quand le substrat est fourni, soit quand les bouteilles sont purgées avec les gaz.
- Temps d'échantillonnage, recommandations: intervalles de 12 h, et 4 à 5 points.
- Injecter un volume de 300ul sur le GC avec détecteur TCD, méthode séparant N<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, pour suivre aussi la consommation d'O<sub>2</sub>.

### 5 . Calculs

- Calculer à chaque échantillonnage:
  - a. CH<sub>4</sub>: volume ou masse dans le headspace
  - b. O<sub>2</sub>: idem
- Tracer les courbes de consommation par bouteille en fonction du temps (masse de CH<sub>4</sub> versus le temps, et masse de O<sub>2</sub> versus le temps)
- Calculer pour chaque bouteille la quantité de biomasse (masse de VSS par bouteille)
- Utiliser la partie linéaire pour calculer le taux spécifique de consommation, soit le CH<sub>4</sub> consommé pendant le temps Δt (ΔCH<sub>4</sub>) divisé par la quantité de biomasse (VSS):

$$\text{Activité (mgCH}_4 / \text{gVSS.d}) = \frac{\Delta \text{CH}_4}{\Delta t \times \text{VSS}}$$

### 6 . Références bibliographiques

Graham et al., 1992

**Annexe 7- Test de minéralisation du [1,2-<sup>14</sup>C]TCE**

## 1. Solutions à préparer

Règles souhaitables dans la préparation des solutions de TCE et métabolites volatiles :

1. Travailler vite.
2. Dans un vial, phase gazeuse inférieure à 5% du volume total. Ne plus utiliser un vial quand ciel gazeux supérieur à 5% du volume.
3. Préparer pour stockage plusieurs vials de la même solution mère, si possible, pour disposer de la même solution en cas d'erreur de manipulation, ou pour recommencer l'expérience.

### • Solution mère de TCE froid:

Concentration objectif: 1000 mg/L.

Dilution (TCE = 1462mg/mL à 25°C) de 68µl de TCE pur (99,5% Aldrich) dans 100mL d'eau, soit concentration réelle de 994 mg/L:

1. préparer 5 vials de 20mL, et septas teflon avec cap
2. mettre dans une fiole jaugée 100 mL d'eau
3. injecter 68µl de TCE, fermer avec bouchon en verre, et mélanger
4. répartir dans les vials, en laissant le moins de headspace possible, remplir seulement 4 vials si nécessaire, et les caper

Utiliser 1 vial pour préparer 50 échantillons, le jeter après.

### • Solution mère de TCE avec TCE radioactif:

Concentration: 1000 mg/L.

### • Solution KOH (1N)

Autoclavée et fraîche.

Préparer 7 bouteilles de 50 mL.

### • MSM

Préparer au moins 4 h en avance (temps pour être sûr que le milieu anaérobie ne contient plus du tout d'oxygène dissous):

- formule du réacteur (Tableau 1 et Tableau 2)
- préparer en anaérobie et en aérobiose: en anaérobie, suivre la procédure décrite dans le protocole du laboratoire pour le tampon phosphate (faire bouillir, purger avec N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ajouter résazurine, et cystéine-Na<sub>2</sub>S)

Tableau 1 - Solution de nutriments dans le réacteur  
(charge de 0.60gCOD/Lréacteur.d et temps de rétention hydraulique de 1 jour)

Composé	Concentrations (mg/L)
<chem>KH2PO4</chem>	13.75
<chem>K2HPO4</chem>	17.55
<chem>NH4HCO3</chem>	211.81
<chem>KHCO3</chem>	541.67
<chem>NaHCO3</chem>	416.67
Métaux (mL/L)	17

Tableau 2 - Formule de la solution de métaux en traces

Composé	Concentrations (mg/L)
<chem>FeSO4.7H2O</chem>	195.0
<chem>MgSO4.7H2O</chem>	307.5
EDTA	44.8
<chem>MnSO4.H2O</chem>	39.0
<chem>(NH4)6Mo7O24.4H2O</chem>	12.5
<chem>Co(NO3)2.6H2O</chem>	15.5
<chem>ZnSO4.7H2O</chem>	12.5
<chem>NiSO4.6H2O</chem>	7.0
<chem>CuSO4</chem>	4.5
<chem>H3BO3</chem>	3.5
<chem>AlK(SO4).12H2O</chem>	1.5
<chem>Na2SeO4</chem>	1.3

### • Solution de BES

Préparer une solution à 200 g/L dans de l'eau distillée

### 2 . Matériel et préparation des échantillons

Volume d'échantillon: 10 mL par bouteille, à 1gVSS/L.

Dilution de la biomasse du réacteur pour 1gVSS/L dans les bouteilles: 1/10, or 5 contrôles C(-) sans biomasse, donc préparer 30 bouteilles soit 30 mL de biomasse prélevée du réacteur.

Echantillon représentatif de la biomasse du réacteur: pore#3 et pore#6 (ajouter qqs mL du pore#8).

### • Matériel:

35 bouteilles sérologiques de 120 mL, identifier et peser (vides et pleines d'eau pour les tests 5,6,7 où mesure de consommation d'un substrat gazeux)

35 valves mini-nerts

20 trappes à KOH

1 bouteille plastique de 100 mL avec 1 barreau aimanté, identifier et peser

1 bouteille plastique de 250 mL avec 1 barreau aimanté, identifier et peser  
 2 shakers: 1 radioactif et 1 non radioactif

- **Préparation des échantillons:**

1. **Contrôles autoclavés:** 14 bouteilles, 7 C(+) et 7 C(-).  
 Biomasse pour 7 bouteilles C(+): 3mL au pore#3, et au pore#6, et 1mL au pore#8.  
 Mettre dans la bouteille plastique de 100mL. Peser.  
 Ajouter 70mL de MSM ou tampon HPO4. Peser.  
 Remplir les 7 bouteilles C(+) avec ce mélange, placer dans 4 bouteilles trappe à KOH.  
 Fermer avec valves mini-nert. Peser.  
 Remplir les 7 bouteilles C(-) avec le MSM ou le tampon HPO4, placer dans 4 bouteilles trappe à KOH. Fermer avec valves mini-nert. Peser.  
 Autoclaver 2 fois à 24h d'intervalle.
2. **Echantillons:** 21 bouteilles  
 Prélever 10 mL au pore#3 et au pore#6, et 3mL au pore#8.  
 Mettre dans bouteille plastique de 250 mL, peser.  
 Ajouter 200mL de MSM ou tampon HPO4. Peser.  
 Remplir 21 bouteilles. Travailler sous N2/CO2 ou air/CH4 ou air, selon les bouteilles. Placer trappes KOH dans les 12 bouteilles des tests radioactifs. Fermer avec valves mini-nert. Peser

3. **Démarrage des tests**

- Injecter KOH dans la trappe (20 bouteilles).
- Injecter la solution mère de TCE correspondante: radioactive (20 bouteilles) ou non (15 bouteilles) selon les tests, quand toutes les bouteilles sont prêtes.
- Incuber à 30oC et 140 rpm.
- Echantillonnage temps initial ( $t_0$ ).

4. **Procédures d'échantillonnage**

- **Tests de minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -TCE:**
- **Tests témoins:**  
 Test 5:  
 1. analyse de gaz séparant O2 et N2 sur GC-TCD (méthode#1). Prélever 300ul.  
 Test 6 et 7:  
 1. analyse de gaz séparant O2 et N2 sur GC-TCD (méthode#1). Prélever 300ul.  
 2. analyse EtOH: prélever un peu moins de 1mL de la phase liquide, et suivre protocole EtOH.
- Analyse des SS/VSS sur les bouteilles non radioactives: tests témoins 5,6,7 (15 bouteilles).

5. **Calculs et traitement des résultats**

- **Données brutes :**  
 1. TC E radioactif : pour chaque test courbes de pourcentage de minéralisation par bouteille, triplicatas et témoins sur le même graphe

2. CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> : pour chaque test, courbes de consommation ou de production par bouteille
    - consommation de CH<sub>4</sub> et O<sub>2</sub> et production de CO<sub>2</sub> sur le même graphe si lisibilité suffisante, sinon CH<sub>4</sub> et O<sub>2</sub> sur le même graphe et CO<sub>2</sub> sur un autre
    - triplicatas et témoins sur le même graphe, ou sur 2 graphes si ce n'est pas lisible
  3. EtOH : courbes de consommation par bouteille, triplicatas et témoins sur le même graphe
- Minéralisation: calcul du taux maximum de production de CO<sub>2</sub> par bouteille, sur au moins 3 points.
  - Consommation des substrats (O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, EtOH): calcul des taux maximums de disparition des substrats par bouteille, sur au moins 3 points.
  - Rapporter à la quantité de VSS par bouteille: pour les tests 1,2,3,4 avec TCE radioactif, prendre la concentration moyenne des 15 bouteilles sur lesquelles le test SS/VSS a pu être fait.

**Annexe 8 - Données brutes d'opération et de performance du réacteur**

Tableau A8.1 - Charge en TCE par phase

Début (d)	Durée (d)	Phases TCE (-)	Charge volumique					Charge spécifique				
			Moy (mg/Lrx.d)	Stdev (#)	NbEch	Min	Max	Moy (mg/gMVES.d)	Stdev (#)	NbEch	Min	Max
0	-138	1	0	0	0	0	20	0	0	0	0	4.1
139	36	2a	2.1	0.4	30	1.6	4.0	0.3	0.1	30	0.2	0.7
175	17	2b	3.6	2.9	15	0.0	10.4	0.5	0.4	15	0.0	1.3
192	11	2c	9.0	1.2	10	7.1	10.1	1.1	0.1	10	0.9	1.2
203	19	2d	14.5	8.2	14	0.0	39.6	1.7	0.9	14	0.0	4.5
222	65	2e	18.4	7.1	57	0.0	55.2	1.9	0.7	57	0.0	5.6
287	50	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
337	78	4a	2.0	0.4	57	0.0	2.7	0.3	0.1	57	0.0	0.4
415	116	4b	1.9	0.6	65	0.3	5.7	0.6	0.3	65	0.1	2.1

Tableau A8.2 - Régime hydraulique par phase

Phases TCE (-)	Qin					Qeffluent				
	Moy (L/d)	Stdev (#)	NbEch	Min	Max	Moy (L/d)	Stdev (#)	NbEch	Min	Max
1	11.5	4.4	60	2.5	23.0	11.7	4.4	23	2.5	19.1
2a	16.7	2.5	30	12.3	23.0	17.3	1.9	9	15.7	20.6
2b	16.1	3.8	16	7.5	25.0	17.1	1.7	9	14.4	19.6
2c	15.3	5.6	11	0.0	20.6	16.8	0.4	6	16.4	17.6
2d	16.3	2.8	15	10.2	19.5	17.9	1.4	7	16.8	20.9
2e	17.1	2.2	56	10.4	21.3	15.5	3.2	14	8.5	18.2
3	17.7	2.5	35	11.4	25.4	17.7	1.3	7	16.4	19.7
4a	17.3	3.2	30	12.6	29.1	17.2	1.3	9	14.9	19.2
4b	16.9	2.7	61	3.8	22.0	14.1	5.5	15	3.8	19.5

Tableau A8.2 (suite) - Régime hydraulique par phase

Phases TCE (-)	HRT				
	Moy (L/d)	Stdev	NbEch (#)	Min	Max
1	1.7	1.0	60	0.7	6.6
2a	1.0	0.1	30	0.7	1.4
2b	1.1	0.3	16	0.7	2.2
2c	1.0	0.2	10	0.8	1.3
2d	1.1	0.2	15	0.9	1.6
2e	1.0	0.1	56	0.8	1.6
3	1.0	0.1	35	0.7	1.5
4a	1.0	0.2	43	0.6	1.9
4b	1.1	0.5	61	0.8	4.5

Tableau A8.3 - Contenu en biomasse du réacteur et lessivage par phase

Phases TCE (-)	Biomasse					Taux de lessivage				
	Moy (gMVES/Lrx)	Stdev	NbEch (#)	Min	Max	Moy (gDCO/Lrx.d)	Stdev	NbEch (#)	Min	Max
1	7.2	3.1	-	4.4	15.3	0.01	0.01	7	0.00	0.02
2a	6.4	0.5	-	5.5	7.2	0.03	0.03	9	0.01	0.09
2b	7.6	0.2	-	7.3	8.0	0.03	0.01	8	0.00	0.04
2c	8.2	0.1	-	8.0	8.4	0.03	0.05	7	0.01	0.13
2d	8.7	0.2	-	8.4	9.0	0.03	0.05	7	0.01	0.13
2e	9.8	0.4	-	9.0	10.5	0.03	0.02	13	0.00	0.06
3	9.0	0.4	-	8.3	9.8	0.18	0.31	5	0.01	0.74
4a	7.3	0.6	-	6.2	8.3	0.01	0.01	7	0.00	0.04
4b	3.6	1.2	-	2.4	6.2	0.03	0.01	8	0.01	0.04

**Note :** Pour le contenu en biomasse, les calculs sont faits sur les valeurs calculées par interpolation linéaire entre les points de mesures, d'où pas de nombre d'échantillons dans le tableau.

Tableau A8.4 - Charges organiques volumique et spécifique par phase

Phases TCE (-)	Charge organique volumique					Charge organique spécifique				
	Moy	Stdev	NbEch	Min	Max	Moy	Stdev	NbEch	Min	Max
	(gDCO/Lrx.d) (#)				.d)	(gDCO/gMVES (#)				
1	2.0	1.1	102	0.0	4.3	0.31	0.17	102	0.00	0.83
2a	1.8	1.1	32	0.5	6.9	0.29	0.19	32	0.07	1.18
2b	1.5	0.5	14	0.0	2.5	0.20	0.07	14	0.00	0.32
2c	1.5	0.2	11	1.0	1.7	0.19	0.02	11	0.12	0.21
2d	1.7	0.1	14	1.6	1.8	0.19	0.01	14	0.18	0.21
2e	1.6	0.6	57	0.0	4.4	0.16	0.06	57	0.00	0.44
3	1.2	0.5	38	0.3	1.9	0.14	0.05	38	0.03	0.20
4a	0.6	0.1	57	0.0	0.8	0.08	0.02	57	0.00	0.12
4b	0.5	0.2	64	0.1	1.6	0.17	0.07	64	0.03	0.59

Tableau A8.5 - Taux d'enlèvement de la charge organique par phase

Phases TCE (-)	ORR (Organic Removal Rate)					Taux d'enlèvement organique spécifique				
	Moy	Stdev	NbEch	Min	Max	Moy	Stdev	NbEch	Min	Max
	(%)				.d)	(gDCO/gMVES (#)				
1	91%	13%	7	67%	100%	0.32	0.19	9	0.18	0.83
2a	97%	5%	9	85%	100%	0.24	0.04	10	0.14	0.29
2b	97%	1%	7	96%	100%	0.20	0.05	9	0.12	0.30
2c	97%	2%	7	94%	99%	0.18	0.03	7	0.12	0.20
2d	100%	1%	7	98%	100%	0.19	0.02	7	0.17	0.21
2e	94%	11%	16	65%	100%	0.17	0.03	17	0.12	0.29
3	91%	20%	11	31%	100%	0.10	0.05	11	0.02	0.18
4a	97%	2%	7	95%	99%	0.08	0.01	7	0.07	0.09
4b	94%	6%	8	81%	99%	0.14	0.04	8	0.09	0.19

Tableau A8.6 - AGV totaux à l'effluent par phase

Phases TCE (-)	AGV totaux				
	Moy (gDCO/L)	Stdev	NbEch (#)	Min	Max
1	0.10	0.21	53	0.0	1.1
2a	0.03	0.03	27	0.00	0.10
2b	0.07	0.14	13	0.00	0.52
2c	0.06	0.13	11	0.00	0.41
2d	0.01	0.01	12	0.00	0.03
2e	0.03	0.11	38	0.00	0.62
3	0.04	0.04	21	0.00	0.21
4a	0.01	0.00	29	0.00	0.02
4b	0.01	0.01	3	0.00	0.02

Tableau A8.7 - Rendement net de la charge organique en CO<sub>2</sub> et en CH<sub>4</sub> par phase

Phases TCE (-)	Rendement du substrat en CO <sub>2</sub>					Rendement du substrat en CH <sub>4</sub>				
	Moy (L(STP)CO <sub>2</sub> / gDCO <sub>cons</sub> )	Stdev	NbEch (#)	Min	Max	Moy (L(STP)CH <sub>4</sub> / gDCO <sub>cons</sub> )	Stdev	NbEch (#)	Min	Max
1	0.11	0.04	11	0.02	0.19	0.17	0.08	15	0.01	0.30
2a	0.11	0.03	20	0.07	0.22	0.30	0.16	12	0.15	0.74
2b	0.08	0.03	11	0.04	0.13	0.32	0.08	7	0.17	0.40
2c	0.11	0.04	10	0.06	0.19	0.35	0.08	7	0.25	0.53
2d	0.07	0.03	7	0.03	0.11	0.19	0.05	7	0.09	0.25
2e	0.07	0.03	23	0.03	0.14	0.19	0.05	20	0.09	0.30
3	0.09	0.10	23	0.00	0.46	0.14	0.06	10	0.05	0.21
4a	0.10	0.04	16	0.03	0.19	0.18	0.03	21	0.13	0.24
4b	1.37	5.24	18	0.05	22.36	0.12	0.06	25	0.03	0.23

Tableau A8.8 - Taux d'aération et rendement d'oxydation de la charge organique par phase

Phases TCE (-)	Taux d'oxygénation					Rendement d'oxydation				
	Moy (LO <sub>2</sub> /Lrx.d)	Stdev	NbEch (#)	Min	Max	Moy (LO <sub>2</sub> /gDCO <sub>cons</sub> )	Stdev	NbEch (#)	Min	Max
1	0.69	0.28	11	0.18	1.11	0.09	0.04	3	0.04	0.13
2a	1.12	0.41	30	0.64	2.81	0.06	0.02	9	0.03	0.09
2b	0.72	0.26	13	0.00	1.06	0.03	0.01	7	0.00	0.04
2c	0.69	0.11	11	0.43	0.83	0.04	0.01	7	0.03	0.06
2d	0.77	0.12	14	0.46	0.91	0.05	0.01	7	0.04	0.07
2e	1.27	0.80	54	0.00	3.19	0.14	0.14	16	0.03	0.49
3	1.81	0.86	37	0.52	5.15	0.12	0.09	11	0.03	0.35
4a	1.07	0.24	56	0.69	1.77	0.14	0.02	7	0.10	0.17
4b	1.88	0.97	60	0.63	6.20	0.17	0.09	8	0.09	0.34

Tableau A8.9 - Paramètres d'opérations calculés sur les périodes stationnaires

Période de calcul (jour)	Phase (#)	Paramètres d'opération					
		TRH (d)	TCE (mg TCE/ Lrx.d)	X (g MVES /Lrx)	OLR (g DCO /Lrx.d)	F/M (g DCO/ g MVES)	Aération (LO <sub>2</sub> /Lrx.d)
124-138	1	1.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	5.1 ± 0.2	1.44 ± 1.00	0.28 ± 0.20	0.73 ± 0.26
157-174	2a	1.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	6.8 ± 0.3	1.52 ± 0.44	0.24 ± 0.06	0.90 ± 0.18
180-188	2b	1.2 ± 0.5	4.5 ± 0.6	7.7 ± 0.1	1.60 ± 0.05	0.21 ± 0.01	0.72 ± 0.17
195-202	2c	1.0 ± 0.2	9.7 ± 0.4	8.2 ± 0.1	1.62 ± 0.07	0.20 ± 0.01	0.65 ± 0.11
211-216	2d	1.0 ± 0.1	14.9 ± 0.2	8.7 ± 0.1	1.66 ± 0.17	0.19 ± 0.01	0.74 ± 0.07
219-229	2e	1.1 ± 0.2	15.9 ± 1.3	9.1 ± 0.1	1.65 ± 0.06	0.19 ± 0.01	0.72 ± 0.11
256-266	2f	1.1 ± 0.2	20.0 ± 0.4	10.3 ± 0.1	1.67 ± 0.11	0.16 ± 0.01	2.26 ± 0.87
275-285	2g	1.0 ± 0.1	20.1 ± 0.5	9.9 ± 0.1	1.64 ± 0.13	0.16 ± 0.01	1.37 ± 0.28
312-322	3a	0.9 ± 0.1	0 ± 0	8.8 ± 0.1	1.60 ± 0.11	0.18 ± 0.01	1.34 ± 0.03
327-336	3b	0.9 ± 0.2	0 ± 0	8.4 ± 0.1	0.69 ± 0.18	0.08 ± 0.02	1.08 ± 0.29
390-415	4a	1.0 ± 0.2	1.8 ± 0.5	6.6 ± 0.2	0.52 ± 0.13	0.08 ± 0.02	0.75 ± 0.05
504-530	4b	1.1 ± 0.3	1.9 ± 0.2	2.6 ± 0.1	0.54 ± 0.05	0.21 ± 0.02	1.37 ± 0.15

Tableau A8.10 - Paramètres de performance calculés sur les périodes stationnaires

Étape expérimentale		Paramètres de performance											
		Période de calcul	Phase (#)	ORR		ORR/M		Rendement en CH <sub>4</sub>	Productivité en CH <sub>4</sub>	Productivité en CO <sub>2</sub>			
(jour)	Lrx.d)	(g DCO/	(%)	(g DCO/	g MVES)	(L(STP)CH <sub>4</sub> /	(L(STP)CH <sub>4</sub> /	(L(STP)CO <sub>2</sub> /					
124-138	I	1.30	0.99	90	9	0.25	0.07	0.18 ± 0.26	0.23	0.16	0.13	0.04	
157-174	2a	1.39	0.29	92	5	0.21	0.04	0.35 ± 0.19	0.49	0.11	0.18	0.04	
180-188	2b	1.55	0.06	97	1	0.20	0.01	0.34 ± 0.06	0.53	0.08	0.14	0.04	
195-202	2c	1.52	0.16	94	9	0.19	0.01	0.33 ± 0.09	0.51	0.09	0.17	0.05	
211-216	2d	1.68	0.17	100	0	0.19	0.02	0.21 ± 0.05	0.36	0.05	0.15	0.04	
219-229	2e	1.70	0.06	100	0	0.19	0.01	0.17 ± 0.07	0.28	0.11	0.11	0.03	
256-266	2f	1.57	0.12	98	2	0.15	0.01	0.16 ± 0.06	0.26	0.08	0.14	0.04	
275-285	2g	1.58	0.14	99	1	0.16	0.01	0.12 ± 0.05	0.19	0.05	0.06	0.03	
312-322	3a	1.58	0.09	95	5	0.18	0.01	0.19 ± 0.04	0.30	0.04	0.11	0.04	
327-336	3b	0.68	0.21	98	6	0.08	0.02	0.19 ± 0.10	0.13	0.03	0.05	0.03	
390-415	4a	0.55	0.09	100	1	0.08	0.02	0.18 ± 0.07	0.10	0.02	0.04	0.02	
504-530	4b	0.49	0.09	91	10	0.19	0.03	0.15 ± 0.10	0.08	0.03	0.07	0.03	

Tableau A8.10 (suite) - Paramètres de performance calculés sur les périodes stationnaires

Période de calcul	Étape expérimentale	Paramètres de performance	
		Phase (#)	Rendement d'oxydation (gO <sub>2</sub> /g DCO <sub>cons</sub> ) (jour)
124-138	1	0.10 ± 0.05	
157-174	2a	0.07 ± 0.02	
180-188	2b	0.05 ± 0.01	
195-202	2c	0.04 ± 0.01	
211-216	2d	0.05 ± 0.00	
219-229	2e	0.06 ± 0.03	
256-266	2f	0.41 ± 0.01	
275-285	2g	0.09 ± 0.05	
312-322	3a	0.06 ± 0.03	
327-336	3b	0.14 ± 0.08	
390-415	4a	0.16 ± 0.05	
504-530	4b	0.28 ± 0.05	