



HAL
open science

Préparation et caractérisation de communautés microbiennes simplifiées dégradant le propionate

Antoine Jaspert

► **To cite this version:**

Antoine Jaspert. Préparation et caractérisation de communautés microbiennes simplifiées dégradant le propionate. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. hal-04215512

HAL Id: hal-04215512

<https://hal.inrae.fr/hal-04215512>

Submitted on 22 Sep 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bretagne Occidentale

**Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Agroalimentaire
de Bretagne atlantique (ESIAB)**

INRAE

PROSe
PRocédés biOtechnologiques
au Service de l'Environnement

**PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DE COMMUNAUTÉS MICROBIENNES
SIMPLIFIÉES DEGRANDANT LE PROPIONATE**

Stage de 3^{ème} année

27/02/23 – 31/08/23
Antoine JASPART

Année universitaire 2022/2023

**ESIAB Ecole Supérieure d'Ingénieurs
en Agroalimentaire de Bretagne Atlantique**

À Brest :

Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané

Tél. 02 90 91 51 00

À Quimper :

2 rue de l'Université,

29000 Quimper

Tél. 02 98 64 19 49

Université de Bretagne Occidentale

**Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Agroalimentaire
de Bretagne atlantique (ESIAB)**

**PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DE COMMUNAUTÉS MICROBIENNES
SIMPLIFIÉES DEGRANDANT LE PROPIONATE**

Stage de 3^{ème} année

27/02/23 – 31/08/23

Antoine JASPART

Enseignant référent : Monsieur Gaëtan Burgaud

Année universitaire 2022/2023

**ESIAB Ecole Supérieure d'Ingénieurs
en Agroalimentaire de Bretagne Atlantique**

À Brest :

Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané

Tél. 02 90 91 51 00

À Quimper :

2 rue de l'Université,

29000 Quimper

Tél. 02 98 64 19 49

Remerciements

Je tiens à remercier M. Gaëtan Burgaud, responsable de la formation Microbiologie & Qualité de l'ESIAB et enseignant chercheur responsable de ce projet qui a su m'aiguiller tout au long de mon stage sur ce rapport.

Par ailleurs, je tenais à remercier l'ESIAB qui m'a soutenu dans la réalisation de ce stage et qui m'a donné la possibilité d'effectuer ce stage à INRAE.

Enfin je tenais à remercier le centre INRAE d'Antony ainsi que tout le personnel de l'unité PROSE pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de fin d'étude.

Je tenais à remercier plus particulièrement mes maîtres de stage : Chrystelle Bureau et Cédric Midoux, mes encadrants, qui ont su m'apporter leurs connaissances afin de mener à bien le projet. Je voulais remercier Angéline Guenne pour avoir analysé mes échantillons (AGV, IRMS).

Lexique

Atm : Unité qui correspond à la pression atmosphérique moyenne de référence au niveau de la mer qui s'établit à 1013 hPa (hectopascals) ou 1 bar.

Bio augmentation : Pratique consistant à introduire des micro-organismes exogènes ayant des capacités de biodégradation afin d'assurer le processus de biodégradation et de réduire les temps de traitement.

Biodéchets des ménages : Tout déchet non dangereux biodégradable de jardin ou de parc, tout déchet non dangereux alimentaire ou de cuisine issu des ménages ou de producteurs assimilés (restaurants, traiteurs, magasins de vente au détail).

CNTP : Conditions Normales de Température et de Pression

Compostage : Traitement biologique aérobie de déchets fermentescibles.

Déchets putrescibles : Déchets fermentescibles susceptibles de se dégrader spontanément dès leur production. Ils ont un pouvoir fermentescible intrinsèque.

Économie circulaire : Développement d'un système de production et d'échanges prenant en compte, dès leur conception, la durabilité et le recyclage des produits ou de leurs composants de sorte qu'ils puissent être réutilisés ou redevenir des matières premières nouvelles, afin de réduire la consommation des ressources et d'améliorer l'efficacité de leur utilisation.

Méthanisation : Traitement biologique anaérobie des déchets fermentescibles produisant un gaz combustible (biogaz) et un digestat.

OMA : Ordures Ménagères et Assimilés

OMR : Ordures Ménagères Résiduelles : désigne la part des déchets qui restent après la collecte séparée.

OTU : Operational Taxonomic Unit (en français : Unité Taxonomique Opérationnelle) est utilisée pour regrouper des individus phylogénétiquement proches.

Valorisation : Réemploi, réutilisation, régénération, recyclage, valorisation organique ou énergétique des déchets. Valorisation organique : utilisation du compost, digestat ou autres déchets organiques transformés par voie biologique pour amender les sols.

V S : Volatil Solid

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
1.1. PRESENTATION DU LIEU DE STAGE	1
1.1.1. INRAE	1
1.1.2. L'unité de recherche : PROSE	1
1.2. CONTEXTE DE L'ETUDE	2
1.2.1. Production et valorisation de déchets organiques	2
1.2.2. La méthanisation ou digestion anaérobie	4
1.2.3. Paramètres physico-chimique de la digestion anaérobie	6
1.2.4. Inhibiteurs de la digestion anaérobie	6
1.2.5. Le propionate dans la digestion anaérobie	7
1.3. OBJECTIFS & PROBLEMATIQUE	10
2. MATERIELS & METHODES	12
2.1. SYSTEME EXPERIMENTAL	12
2.1.1. Présentation du système	12
2.1.2. Inoculum	12
2.1.3. Milieu BMP	12
2.1.4. Substrat : propionate de sodium	13
2.1.5. Conditions expérimentales	14
2.1.6. Prélèvements	16
2.2. ANALYSES CHIMIQUES	16
2.2.1. Volume biogaz	16
2.2.2. Composition du biogaz	16
2.2.3. Fractionnement isotopique	16
2.2.4. pH	17
2.2.5. AGV	17
2.3. ANALYSES DES COMMUNAUTES MICROBIENNES	18
2.3.1. Croissance microbienne	18
2.3.2. Séquençage ADNr 16S	18
2.3.3. Traitement bio-informatique des séquences	20
2.3.4. Analyse statistique	20
3. RESULTATS & DISCUSSION	21
3.1. BATCHS « ENRICHISSEMENT » (A, B, C, D, E ET F)	21
3.1.1. Analyse de la production de gaz	21
3.1.2. Analyse du taux de production de biogaz	22
3.1.3. Analyse des biogaz	24
3.1.4. Analyse isotopique	26
3.1.5. Séquençage	27
3.2. BATCHS « DILUTION-STIMULATION »	32
3.2.1. Analyse de la production de gaz	32
3.2.2. Analyse isotopique	33
3.2.3. Evolution de la population (densité optique)	34
3.2.4. Analyse des AGV	35
3.2.5. Séquençage	35
CONCLUSION	40
BIBLIOGRAPHIE	41

Table des figures

Figure 1 : Composition des ordures ménagères résiduelles (OMR) en 2017	2
Figure 2 : Les composantes de l'économie circulaire.....	2
Figure 3 : Composition des déchets entrant en plate-forme de compostage et en unité méthanisation	3
Figure 4 : La méthanisation : intrants et valorisation du biogaz et du digestat.....	3
Figure 5 : Les étapes de la digestion anaérobie (B. : bactéries ; A. : Archées).....	4
Figure 6 : Principales voies de formation de propionate durant la digestion anaérobie	8
Figure 7 : Principales voies de dégradation du propionate durant la digestion anaérobie.....	9
Figure 8 : Dispositif expérimental	12
Figure 9 : Protocole expérimental résumé des batchs « enrichissement ».....	15
Figure 10 : Protocole expérimental résumé des batchs « dilution – stimulation ».....	15
Figure 11 : Préparation de la bibliothèque d'amplicons	18
Figure 12 : Principe du séquençage SBS Illumina.....	19
Figure 13: Volume de biogaz produit au cours du temps pour les batchs A, B, C, D et E.....	21
Figure 14 : Volume de biogaz produit au cours du temps (en jour) pour les batchs F.....	21
Figure 15: Taux de production de biogaz en fonction de la concentration en propionate (g/L).	23
Figure 16 : Volume moyen des gaz produits (CH ₄ , CO ₂ et H ₂) pour les batchs A, B, C, D et E.	24
Figure 17 : Volume moyen des gaz produits (CH ₄ , CO ₂ et H ₂) pour le batch F.....	25
Figure 18 : Facteur isotopique apparent (α_{app}) du batch A, B, C, D et E.	26
Figure 19: Facteur isotopique apparent (α_{app}) du batch F.....	26
Figure 20 : Abondance relative des règnes pour le batch C, D et E.....	27
Figure 21 : Abondance relative des OTUs majoritaires pour le batch C, D et E.	28
Figure 22 : Abondance relative des règnes pour le batch F à 1, 2, 3, 5 et 8 g/L.	29
Figure 23 : Abondance relative des OTUs majoritaires pour le batch F à 1, 2, 3, 5 et 8 g/L.....	30
Figure 24 : étude de l'effet de la concentration en propionate sur la composition en OTU dans le batch F avec une ACP.....	31
Figure 25 : Volume des gaz produits (CH ₄ , CO ₂ et H ₂) pour le batch M.	32
Figure 26 : Facteur isotopique apparent (α_{app}) du batch M.	33
Figure 27 : Densité optique moyenne (600 nm) du batch M au début et à la fin du batch de chaque génération.....	34
Figure 28 : Abondance relative des règnes pour le batch M.	35
Figure 29 : Abondance relative des OTUs majoritaires pour le batch M.	36
Figure 30 : Abondance relative des OTUs d'archées majoritaires pour le batch M.	37
Figure 31 : Diversité alpha du batch M.....	38
Figure 32 : étude de la composition en OTU des générations du batch M avec une ACP.....	38

Table des tableaux

Tableau 1 : Réaction de dégradation des AGV et énergie libre de Gibbs.	9
Tableau 2 : Composition du milieu BMP.	13
Tableau 3 : Composition de la solution mère d'éléments trace.	13
Tableau 4 : Composition des batchs.....	14
Tableau 5 : OTUs majoritaires pour le batch C, D et E	28
Tableau 6 : OTUs majoritaires pour le batch F à 1, 2, 3, 5 et 8 g/L.....	30
Tableau 7 : OTUs majoritaires pour le batch M.....	36

1. Introduction

1.1. Présentation du lieu de stage

1.1.1. INRAE

Ce stage a été réalisé au sein de l'Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE). INRAE est un établissement public à caractère scientifique et technologique de recherche public (EPST). Il est né le 1^{er} janvier 2020 de la fusion entre l'Institut national de la recherche agronomique (Inra) et l'Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (Irstea). INRAE compte 18 centres localisés dans toute la France, 11000 agents (8200 titulaires et 2800 contractuels) répartis dans 202 unités de recherches, 43 unités expérimentales et 22 unités de service (INRAE, 2023).

Le centre de Jouy-en-Josas – Antony, présidé par Nathalie Touze, compte 18 unités de recherche dont 10 unités mixtes de recherche (UMR), 2 unités expérimentales et 5 unités de services pour environ 1000 agents. Il est rattaché à l'université Paris-Saclay, et est composée de 2 implantations distinctes : une à Jouy-en-Josas (78) et une à Antony (92). Le centre de Jouy-en-Josas - Antony développe des recherches sur la biologie animale, la microbiologie, les sciences de l'aliment, la chaîne du froid, la gestion des déchets et la gestion de l'eau.

1.1.2. L'unité de recherche : PROSE

L'unité de recherche PROSE (PRocédés biOtechnologiques au Service de l'Environnement), implantée sur le site d'Antony, mène des recherches sur les biotechnologies environnementales (digestion anaérobie, traitements des eaux...). L'activité de l'unité s'inscrit dans de nombreux domaines tels que l'écologie microbienne, les biotechnologies, les génies des procédés, la métagénomique, la bio-informatique...

L'unité est dotée d'équipements de pointe en chimie analytique (analyseurs et chromatographes dont certains couplés à des spectrophotomètres de masse isotopique ou à haute résolution) et en biologie moléculaire (séquenceurs dernière génération, électrophorèse automatisée...).

L'unité est dirigée par Théodore Bouchez (directeur) et par Laurent Mazéas (directeur adjoint). L'unité est composée de 3 pôles : pôle porteur de projet, pôle analytique et pôle expérimentation. L'unité compte une vingtaine d'agents titulaires et une dizaine de doctorants, post-doctorants.

1.2. Contexte de l'étude

1.2.1. Production et valorisation de déchets organiques

L'article L. 541-1-1 du code de l'environnement définit les biodéchets comme : "Les déchets non dangereux biodégradables de jardin ou de parc, les déchets alimentaires ou de cuisine provenant des ménages, des bureaux, des restaurants, du commerce de gros, des cantines, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que les déchets comparables provenant des usines de transformation de denrées alimentaires."

Une partie de ces déchets peut être évitée, par exemple grâce à la lutte contre le gaspillage alimentaire. Le reste de ces déchets peut et doit être valorisé spécifiquement, pour garantir une bonne qualité de traitement. Ils représentent une ressource importante en matière et en énergie ainsi qu'une éventuelle source de revenus.

Les biodéchets (déchets putrescibles) représentent un tiers du contenu de la poubelle résiduelle des Français, c'est-à-dire un tiers des déchets qui ne sont pas triés par les ménages (Figure 1). C'est un gisement non négligeable qu'il faut maintenant détourner de l'élimination en vue d'une économie circulaire de la matière organique (Figure 2).



Figure 1 : Composition des ordures ménagères résiduelles (OMR) en 2017 (Source : ADEME, MODECOM®).



Figure 2 : Les composantes de l'économie circulaire (Source : ADEME).

Dans de nombreux pays d'Europe (Allemagne, Italie, Espagne, Belgique ...), la valorisation organique des biodéchets collectés sélectivement s'est développée depuis une dizaine d'années.

Les déchets organiques ont la particularité de pouvoir être dégradés par des micro-organismes, ils sont donc fermentescibles. C'est pourquoi, la valorisation biologique est largement utilisée pour les déchets putrescibles. Les 2 méthodes de valorisation biologique sont le compostage (procédé aérobie) et la méthanisation ou digestion anaérobie (procédé anaérobie).

Le compostage permet la dégradation de la matière organique en présence d'oxygène pour la production de compost. Alors que la digestion anaérobie ou méthanisation est un procédé biologique qui exploite la capacité de certains microorganismes à dégrader la matière organique en l'absence d'oxygène pour produire un biogaz riche en méthane, utilisable comme source d'énergie (Bernet, 2015). C'est la production de méthane qui est majoritairement recherchée dans digestion anaérobie même si les déchets digérés, appelés digestat, peuvent être utilisés en agriculture pour fertiliser les sols.

Les flux de déchets organiques entrant en plateforme de compostage sont en très grande majorité des déchets verts (64%), mais également des biodéchets des ménages (3%) (Figure 3a). Les déchets entrant dans les unités de méthanisation sont très majoritairement des biodéchets et des produits alimentaires non consommés (71 %) ainsi que des déchets verts (25%) (Figure 3b).

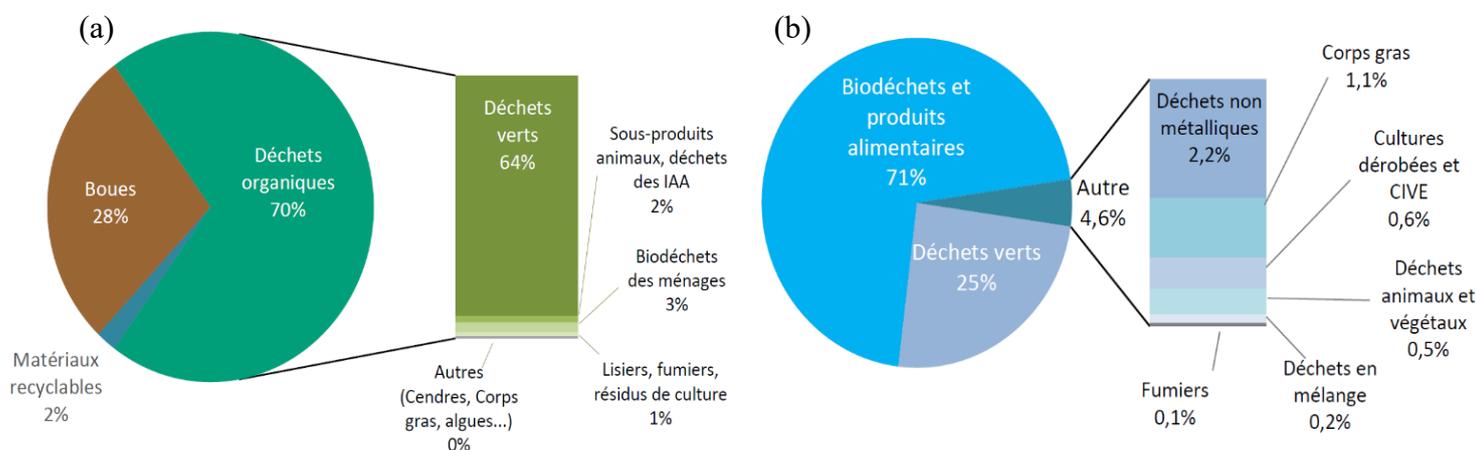


Figure 3 : Composition des déchets entrant en plate-forme de compostage (a) et en unité méthanisation (b) (Source : ADEME).

Ces filières de traitement des biodéchets permettent un retour au sol de la matière organique (compost ou digestat) dans les deux cas et de produire des énergies renouvelables (électricité, chaleur ou biocarburant) grâce à la récupération du biogaz (méthanisation uniquement) (Figure 4).

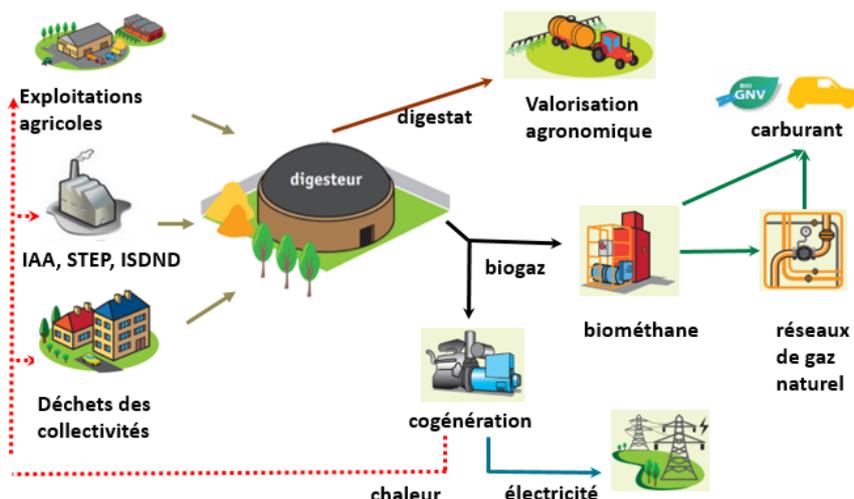


Figure 4 : La méthanisation : intrants et valorisation du biogaz et du digestat (Source : ATEE).

1.2.2. La méthanisation ou digestion anaérobie

La digestion anaérobie ou méthanisation est un procédé microbiologique de dégradation de la matière organique en l'absence d'oxygène pour produire du digestat qui présente une valeur agronomique et un biogaz riche en méthane (CH_4 , 50-70 %) et en gaz carbonique (CO_2 , 20-50 %) (Caponiutti *et al.*, 2020). Cette énergie renouvelable peut être utilisée pour la production d'électricité et de chaleur, la production d'un carburant, ou être injectée dans le réseau de gaz naturel après épuration.

Le méthane, s'il n'est pas récupéré et valorisé, est un gaz à effet de serre important qui a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur au CO_2 . Plus de 60% des émissions de méthane sont d'origine anthropique c'est-à-dire issue de l'activité humaine (agriculture, énergie, secteur des déchets) (Bernet, 2015). Ces dernières années, l'intérêt pour la production de biogaz suscite un intérêt grandissant en tant qu'alternative aux combustibles fossiles tant dans les pays industrialisés que dans les pays émergents ou en développement.

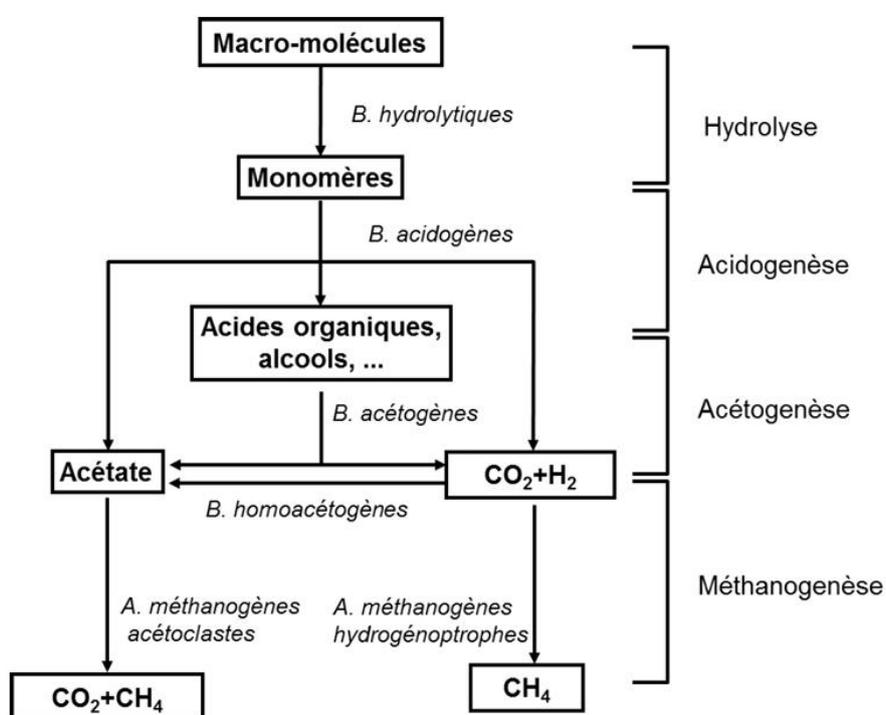


Figure 5 : Les étapes de la digestion anaérobie (B. : bactéries ; A. : Archées) (Source : Bernet, 2015).

a) L'hydrolyse

La première étape de la digestion anaérobie est l'hydrolyse. Dans cette étape, les molécules complexes (polymères) sont décomposées en molécules simples : les monomères. L'hydrolyse a lieu par l'action des hydrolases libérées par de nombreuses bactéries aérobies (Yadav *et al.*, 2022). C'est une étape limitante car sa durée est fonction de la nature du substrat particulièrement lorsqu'il est composé de molécules très complexes.

Les bactéries hydrolytiques ont un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif et ont une croissance relativement rapide. Elles appartiennent à de très nombreux genres microbiens parmi lesquels on peut citer : *Acetivibrio*, *Anaerovibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lachnospira*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, *Synthrophomonas*... (Moletta, 2015). L'hydrolyse est également réalisée par des eucaryotes (champignons et protozoaires).

b) L'acidogénèse

La deuxième étape est appelée l'acidogénèse. A cette étape, les monomères produits à l'issue de l'hydrolyse sont convertis en acides organiques, en alcools et en gaz. Parmi eux on retrouve des acides gras volatils (AGV) comme le butyrate (6,4-29,4 %), l'acétate (3,4-24,1 %) ou le propionate (0,3-12,8 %). On retrouve aussi d'autres molécules comme l'éthanol (15,4-28,8 %), le dioxyde de carbone et l'hydrogène (4,0-8,1 %) (Oh *et al.*, 2003). A cette étape l'acétate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone produits peuvent être directement utilisés pour la méthanogénèse (Yadav *et al.*, 2022). C'est une étape 30 à 40 fois plus rapide que l'hydrolyse. L'acidogénèse est réalisée par des bactéries anaérobies strictes. On retrouve les genres *Clostridia*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acetobacterium*, *Bacteroides*, *Pelobacter*...

c) L'acétogénèse

La troisième étape est l'acétogénèse. Cette étape permet la production de précurseurs de la méthanogénèse (acétate, hydrogène et dioxyde de carbone) à partir des molécules issues de l'acidogénèse. Cette transformation peut s'effectuer par deux voies métaboliques :

- la voie hétéroacétogène qui conduit à la production d'acétate, de dihydrogène et de dioxyde de carbone,
- la voie homoacétogène qui conduit uniquement à la production d'acétate.

La thermodynamique des réactions est défavorable car la variation d'enthalpie est positive (Tableau 1). Cela implique l'élimination du dihydrogène pour passer d'une réaction endergonique à une réaction exergonique (Siriwongrungronson *et al.*, 2007). Ces réactions ne deviennent possibles qu'avec des pressions partielles d'hydrogène très faibles, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} atm. Ceci nécessite l'élimination constante de l'hydrogène produit car l'accumulation d'hydrogène conduit à l'arrêt de l'acétogénèse

Les bactéries acétogènes ont une croissance très lente, se cultivent mal et sont sensibles aux pH extrêmes. Les hétéroacétogènes sont représentées par *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter* ou *Pelotomaculum*, alors que les homoacétogènes sont représentées par *Butyribacterium*, *Peptococcus*, *Acetobacterium*, *Clostridium*...

d) La méthanogénèse

La dernière étape du processus est la méthanogénèse. Les archées méthanogènes transforment (minéralisent) les produits de l'acétogénèse en méthane à partir du dihydrogène, de l'acétate et du dioxyde de carbone principalement. Cette transformation peut s'effectuer par deux voies métaboliques :

- la méthanogénèse acétoclaste produit du méthane et du dioxyde de carbone à partir de l'acétate ($\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$). Cette voie représente 70% du méthane produit (Yadav *et al.*, 2022),
- la méthanogénèse hydrogénotrophe produit du méthane à partir du dihydrogène et du dioxyde de carbone ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$). Cette voie représente 30% du méthane produit (Yadav *et al.*, 2022).

Les méthanogènes appartiennent au règne des archées et sont anaérobies strictes. Les méthanogènes hydrogénotrophes comprennent les genres *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum*... En revanche, en ce qui concerne la méthanogénèse acétoclastique, seulement deux genres sont représentés : *Methanosaeta* et *Methanosarcina*.

1.2.3. Paramètres physico-chimique de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie est un processus complexe qui nécessite la mise en place de certaines conditions physico-chimiques pour lesquelles l'ensemble des réactions biologiques est optimisé.

a) L'oxygène

Les premières étapes de la digestion anaérobie sont réalisées par des bactéries anaérobies strictes ou facultatives. En revanche, la méthanogénèse est réalisée par des archées anaérobies strictes. L'oxygène est donc un inhibiteur de la flore méthanogène.

b) La température

La température est un paramètre important pour la croissance des micro-organismes et de l'activité enzymatique. La digestion anaérobie est opérationnelle à des températures allant de 4°C à 70°C. On distingue classiquement trois gammes de températures de fonctionnement d'un digesteur : psychrophile (4-15°C), mésophile (20-40°C) et thermophile (45-70°C). Les digesteurs mésophiles (35°C) et thermophiles (55°C) sont les plus courants à l'échelle industrielle (Parkin & Owen, 1986). La température influe également sur les équilibres des espèces chimiques présentes dans le milieu. Les variations de températures peuvent donc affecter l'écosystème et perturber certains processus biochimiques.

c) Le pH

Tout comme la température, le pH influe sur la croissance microbienne, les réactions enzymatiques ainsi que les équilibres des espèces chimiques. Les méthanogènes sont très sensibles aux variations de pH. Le pH optimal doit être compris entre 6,5 et 7,6 (Parkin & Owen, 1986) mais l'optimal varie en fonction de l'étape du processus : les bactéries fermentatives acidifiantes se développent autour d'un pH de 5,5-6 alors que les acétogènes et les méthanogènes se situent plutôt autour d'un pH proche de la neutralité.

1.2.4. Inhibiteurs de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie implique une série de réactions biochimiques réalisées par une succession de micro-organismes spécialisés formant un véritable réseau trophique. Cela suggère un équilibre précaire entre des communautés microbiennes qui peut être facilement déstabilisé par un changement des paramètres opératoires ou encore par la présence de composés inhibiteurs.

a) L'azote ammoniacal

L'azote ammoniacal est produit lors de la dégradation de l'azote organique. Cependant au de-delà d'une certaine concentration (supérieure à 1 g/L, (Jimenez *et al.*, 2015) cette molécule peut devenir inhibitrice. L'ammoniac peut réduire considérablement les performances de la digestion anaérobie (Chapleur *et al.*, 2021). Les déchets et effluents contenant beaucoup d'azote peuvent donc inhiber la méthanisation. L'équilibre chimique entre l'ion ammonium (NH_4^+) et l'ammoniac (NH_3) dépend

principalement du pH et de la température : une augmentation du pH et/ou de la température induit une augmentation de la concentration en ammoniac, qui est la forme la plus toxique.

b) Le sulfure d'hydrogène

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est le produit de réduction du sulfate par les bactéries sulfato-réductrices (BSR). Les déchets et effluents contenant beaucoup de sulfates peuvent inhiber la digestion anaérobie. Les BSR entrent alors en compétition avec les archées méthanogènes et les bactéries homo-acétogènes pour l'hydrogène et/ou l'acétate d'une part, et avec les bactéries acétogènes pour les AGV autres que l'acétate d'autre part. Si les BSR prennent l'ascendant sur ces 3 types de populations microbiennes, alors la forte concentration en H₂S produite est toxique pour les archées méthanogènes.

c) L'hydrogène

Le bon déroulement de la digestion anaérobie nécessite un équilibre entre la production d'hydrogène (H₂) et sa consommation par les méthanogènes hydrogénotrophes. Si un déséquilibre intervient, alors l'hydrogène devient un inhibiteur des bactéries acétogènes. L'arrêt de l'acétogénèse a pour conséquences l'arrêt de la production de méthane, une augmentation de la concentration des AGV, et donc une diminution du pH, amenant ainsi à un arrêt du digesteur. On considère qu'une pression partielle inférieure à 10⁻⁴ atm permet d'éviter les phénomènes d'inhibition (Moletta, 2015). Cela permet, d'un point de vue thermodynamique, l'oxydation des acides gras volatils (AGV).

d) Les acides gras volatils

Les AGV sont des métabolites intermédiaires clés dans le processus de digestion anaérobie, cependant une trop forte accumulation de ces derniers peut être toxique pour les micro-organismes, en particulier pour les méthanogènes. Il existe un équilibre fonctionnel entre les microorganismes producteurs et consommateurs des AGV. L'accumulation des AGV engendre une baisse du pH qui impacte les bactéries hydrolytiques. D'autre part, l'acidogénèse peut être auto-inhibitrice car c'est une étape productrice d'AGV. En effet, pour des raisons thermodynamiques, le propionate et le butyrate ne peuvent être dégradés que lorsque l'acétate et l'hydrogène sont consommés (McInerney, 2005). Ce sont les archées méthanogènes les plus impactées par les AGV.

1.2.5. Le propionate dans la digestion anaérobie

Les substrats pouvant être utilisés par les archées méthanogènes sont limités à l'acétate, le CO₂ et le H₂. Les autres AGV, comme le propionate, le butyrate, le valérate ou l'éthanol, doivent d'abord être convertis en acétate et H₂ lors de l'acétogénèse.

a) Production de propionate

C'est à l'étape d'acidogénèse que le propionate est produit. Parmi les micro-organismes impliqués dans cette étape de la digestion anaérobie, les genres *Geobacter*, *Pelobacter*, *Streptomyces*, *Sorangium*, *Desulfatibacillum*, *Rhodospseudomonas*, *Mycobacterium*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, et

Ralstonia sont connues pour être responsables de la formation de propionate dans les digesteurs anaérobie (Mu *et al.*, 2023).

Le pyruvate joue un rôle central, il permet la production d'AGV dont le propionate. Chez les bactéries fermentatives, il existe 2 voies de formation du propionate à partir du pyruvate (Figure 6) :

- la voie de l'acrylate : réduction du pyruvate au cours de laquelle le lactate est formé comme intermédiaire ($C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2$). Cette voie est assurée par des *Clostridia* comme *Clostridium propinicum*.
- la voie methylmalonyl-CoA : conversion du pyruvate en oxaloacetate par une pyruvate carboxylase ($3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$). Cette voie métabolique est utilisée par les bactéries acidogènes comme les *Corynebacteria*, *Propionibacterium*, et *Bifidobacterium*.

La production du propionate est fortement influencée par une altération des conditions expérimentales comme le pH, l'inoculum ainsi que l'inhibition du produit.

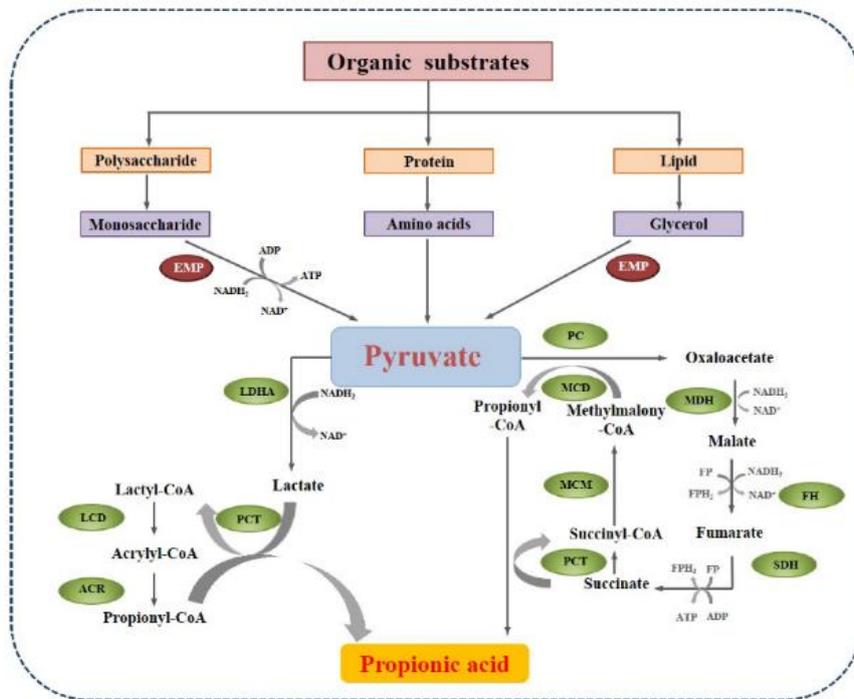


Figure 6 : Principales voies de formation de propionate durant la digestion anaérobie (Source : Mu *et al.*, 2023).

b) Métabolisme du propionate

Le propionate ne peut pas directement être utilisé par les archées méthanogènes. Il doit d'abord être converti lors de l'acétogénèse. Cette étape de la digestion anaérobie joue un rôle capital car elle est responsable de 76 % de la transformation des matières organiques réduites. La dégradation du propionate est critique en raison du fait qu'environ 6 à 35 % de la méthanogénèse totale se fait via la conversion du propionate, et l'oxydation du propionate en acétate et H₂ est souvent considérée comme l'étape limitante (Mu *et al.*, 2023).

En effet, l'oxydation du propionate a l'énergie libre de Gibbs la plus élevée (+76 kJ/mol) par rapport aux autres AGV (Tableau 1, équation P). L'oxydation du propionate est plus énergétiquement défavorable à moins que l'acétate et le H₂ produits ne soient consommés de manière synchrone pour que la réaction soit exergonique (Tableau 1, équation P+M). Cela nécessite donc une coopération,

une association syntrophique, entre les bactéries syntrophes oxydant le propionate (BSOP) et les archées méthanogènes.

Tableau 1 : Réaction de dégradation des AGV et énergie libre de Gibbs (A : acétate, P : propionate, B : butyrate, V : valérate, M : méthanogénèse).

Eq.	Réaction	ΔG (kJ/mol, 25 °C)
A	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{CH}_4$	-31.0
P	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3 \text{H}_2$	+76.1
B	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48.4
V	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+25.1
M	$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$	-135.6
P+M	$4 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3 \text{CH}_4$	-102.4

L'oxydation du propionate peut s'effectuer par deux voies (Figure 7) :

- la voie la plus commune est la MMC (Méthylmalonyl-CoA), c'est l'oxydation du propionate en acétate et en hydrogène (Propionate + 2H₂O → Acétate + CO₂ + 3H₂),
- l'autre voie, la dismutation (le propionate est à la fois l'oxydant et le réducteur) est l'oxydation du propionate en acétate et en butyrate puis le butyrate est oxydé en acétate par la β -oxydation syntrophique (2 propionate + 2H₂O → 3 Acétate + 2H₂ + H⁺) (Li *et al.*, 2023).

Les BSOP appartiennent aux genres *Desulfofundulus*, *Pelotomaculum*, *Smithella*, *Syntrophobacter* et *Syntrophobacterium*. Seul le genre *Smithella* est capable de faire la dismutation du propionate (Westerholm *et al.*, 2022).

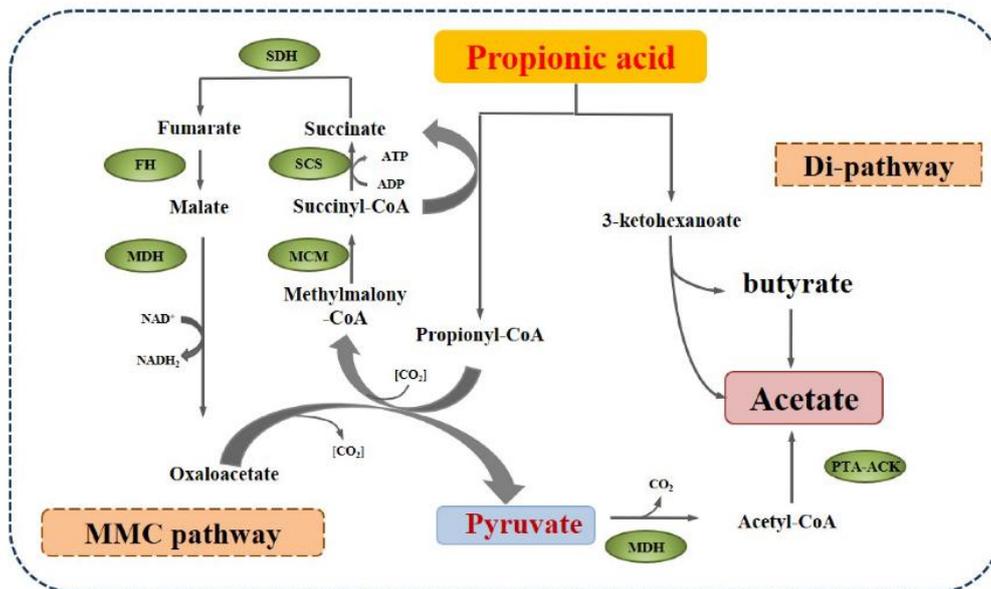


Figure 7 : Principales voies de dégradation du propionate durant la digestion anaérobie (Source : Mu *et al.*, 2023).

c) Facteurs influençant les BSOP

Les causes de l'inhibition des BSOP sont nombreuses : l'accumulation de propionate dans les digesteurs anaérobie est souvent associée à un stress comme la présence d'un inhibiteur, ou une augmentation du taux de charge. Dans des conditions thermophiles, le temps de latence qui précède la dégradation du propionate augmente considérablement (Li *et al.*, 2022). On constate une difficulté des microorganismes à s'adapter aux conditions thermophiles pour dégrader le propionate. Ce qui n'est pas le cas pour l'acétate ou le butyrate où les conditions thermophiles sont plutôt favorables.

Une augmentation de la concentration en propionate est souvent associée à une inhibition par l'ammonium dans les digesteurs anaérobie traitant des déchets riches en protéines. L'ammonium pourrait avoir un effet direct sur la population de BSOP (Bonk *et al.*, 2018) ou un effet indirect en inhibant les méthanogènes ce qui a pour conséquence une accumulation d'acétate et H₂, inhibiteurs des BSOP.

L'oxydation du propionate peut avoir lieu dans une large gamme de pH. En revanche, l'oxydation du propionate et la production de méthane sont moindres à des pH faibles du fait de l'activité plus faible des méthanogènes et des acétogènes. Un pH stable autour de 7,3 est propice au bon développement des bactéries anaérobies et des archées méthanogènes (Yuan & Zhu, 2016).

La population de BSOP représente une fraction faible de la communauté (Ito *et al.*, 2012). Certaines espèces de BSOP comme les espèces de l'ordre des *Syntrophobacterales*, ont un taux de croissance lent (Capson-Tojo *et al.*, 2017 ; Kendall *et al.*, 2006). Si on associe ces deux facteurs au fait que la réaction d'oxydation du propionate n'est pas favorable énergétiquement, de grandes quantités de propionate peuvent alors inhiber le système.

Des niveaux élevés de propionate inhibent les méthanogènes (Barredo & Evison 1991 ; Dogan *et al.*, 2005) : la dégradation du dihydrogène en méthane est alors ralentie. Le dihydrogène et l'acétate s'accumulent dans le système et inhibent les BSOP (van Lier *et al.*, 1993 ; Felchner-Zwirello *et al.*, 2013 ; Guo *et al.*, 2021).

1.3. Objectifs & problématique

La digestion anaérobie présente un potentiel intéressant. Mais une trop forte concentration en AGV notamment le propionate crée des conditions défavorables en particulier pour les méthanogènes (Li *et al.*, 2022). Le système est alors inhibé et par extension la digestion anaérobie dans sa globalité. Dans ce contexte, il est nécessaire de comprendre de manière approfondie les communautés microbiennes qui dégradent le propionate et la relation syntrophique qu'elles entretiennent avec d'autres micro-organismes notamment les méthanogènes.

L'utilisation de consortia microbiens avec moins de complexité, mais avec une efficacité égale à celle d'un consortium complexe, pourrait conduire à des processus industriels plus contrôlés et optimisés, ou encore permettre des ajouts dans des bioprocédés (bio-augmentation) pour améliorer leurs performances ou lever une inhibition.

Ainsi, l'objectif général de ce projet est d'obtenir un consortium microbien simplifié à partir de consortia complexes par une méthode dite de « dilution-stimulation ». Pour atteindre l'objectif général, il est nécessaire de passer par plusieurs étapes afin d'obtenir un consortium simplifié et stable dégradant le propionate. Ces étapes sont le suivi de l'évolution de la composition en microorganismes, l'analyse des paramètres physico-chimiques et le choix d'une concentration optimale en propionate pour le système.

Ainsi, on pourra se poser la question suivante : comment obtenir un consortium microbien simplifié stable et dégradant efficacement le propionate à partir de consortia complexes ?

Dans un premier temps, nous chercherons à enrichir et à sélectionner les BSOP d'un inoculum issu d'un digesteur anaérobie alimenté avec des biodéchets de restauration collective par des injections successives de propionate comme seule source de carbone. Puis dans un second temps, nous chercherons à diluer l'inoculum, afin de diluer la communauté microbienne globale complexe et l'enrichir en BSOP par une méthode dite de « dilution-stimulation ». Cette méthode permettrait d'obtenir une communauté microbienne simplifiée et stable dégradant le propionate, en sélectionnant uniquement les individus utiles à la dégradation du propionate grâce aux dilutions.

Pour cela, plusieurs paramètres de performance seront suivis : pH, production globale de biogaz, composition du biogaz (méthane, dioxyde de carbone, dihydrogène), ainsi que l'évolution de la communauté microbienne (métagénomique : taxonomie et abondance).

2. Matériels & Méthodes

2.1. Système expérimental

2.1.1. Présentation du système

Des incubations en digesteurs batch ont été réalisées pour les deux séries d'expérimentation (Figure 8). Des flacons à plasma en verre (volume utile de 250 mL pour les essais d'enrichissement, 100 mL pour les essais de dilution-stimulation) fermés hermétiquement avec un septum en caoutchouc et une bague à vis en aluminium ont été utilisés. Afin, de faciliter la mesure de production de biogaz en continu et les prélèvements de gaz et de liquide, un tuyau couplé à un robinet ont été mis en place. Chaque batch est raccordé à un compteur à gaz.

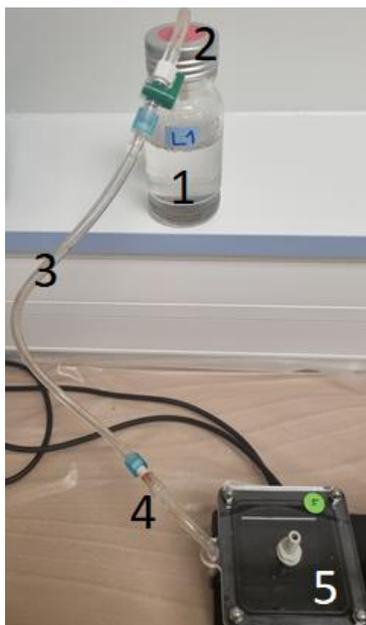


Figure 8 : Dispositif expérimental

2.1.2. Inoculum

Chaque batch estensemencé avec un inoculum issu d'un bioréacteur mésophile alimenté régulièrement avec des biodéchets issus de la restauration collective. Avant utilisation, de l'inoculum est soutiré et placé en anaérobiose afin qu'il se stabilise, c'est-à-dire qu'il n'y ait plus de production endogène de biogaz. Une fois stabilisé, l'inoculum est prêt à être utilisé. Dans le cas des expérimentations « dilution – stimulation », l'inoculum a également été préalablement filtré à 80 μm pour éliminer les plus gros débris et rendre les lectures d'absorbance à 600 nm possibles.

2.1.3. Milieu BMP

Le milieu BMP (Biochemical Methane Potential) est utilisé pour évaluer la biodégradabilité de composés organiques sous l'effet de communautés microbiennes anaérobies. C'est un tampon phosphate contenant des sels minéraux et des éléments traces. La composition du milieu BMP est la suivante :

Tableau 2 : Composition du milieu BMP.

Tampon phosphate / sels minéraux	Quantité
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	1,12 g
NH ₄ Cl	0,53 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,075 g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,1 g
FeCl ₂ , 4H ₂ O	0,02 g
Solution mère d'éléments trace	10 mL
H ₂ O	QSP 1 L

Tableau 3 : Composition de la solution mère d'éléments trace.

Solution mère d'éléments trace	Quantité
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,005 g
ZnCl ₂	0,005 g
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,003 g
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,001 g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,1 g
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,01 g
Na ₂ SeO ₃	0,005 g
H ₂ O	QSP 1 L

2.1.4. Substrat : propionate de sodium

Du propionate de sodium est utilisé en tant que substrat comme seule source de carbone dans tous les batchs sauf le contrôle qui n'en contient pas.

Dans les essais « enrichissement » plusieurs concentrations en propionate sont testées (de 0 g/L à 10 g/L, Tableau 4) afin de déterminer une concentration en propionate optimale. Une série contrôle est préparée sans propionate afin de pouvoir suivre la production de biogaz endogène qui serait liée au milieu. Les batchs A à E reçoivent 3 injections de propionate à la même concentration. Le batch F, quant à lui, a la particularité de recevoir des injections avec des concentrations croissantes en propionate à chaque injection (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 8 et 10 g/L de propionate).

Pour les essais « dilution-stimulation », une seule concentration en propionate a été utilisée : 1 g/L (déterminée grâce aux résultats des batchs « enrichissement »). Le but est de sélectionner un consortium fonctionnel, stable et simplifié dégradant le propionate grâce à une étape de dilution.

Tableau 4 : Composition des batchs.

Essai	Enrichissement						
Série	Contrôle	A	B	C	D	E	F
Inoculum (mL)	225						
BMP (mL)	25						
Propionate (g/L)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0,2 à 10,0
Essai	Dilution - Stimulation						
Série	H	I	J	K	L	M	
Inoculum (mL)	0,1	0,5	1	5	10	25	
BMP (mL)	99,9	99,5	99	95	90	75	
Propionate (g/L)	1,0						

2.1.5. Conditions expérimentales

Chaque batch est préparé en triplicat. Il contient l'inoculum, le milieu BMP ainsi que du propionate (Tableau 4).

L'anaérobiose est obtenue par 3 cycles de vide / injection de diazote pour éliminer l'oxygène et saturer le ciel gazeux en azote.

Les flacons sont placés à 35°C (conditions mésophiles) sans agitation et raccordés aux compteurs à gaz.

Dans le cas des essais « enrichissement », lorsque la production de biogaz s'arrête suite à l'ajout de propionate, des prélèvements de la phase liquide (10 mL) et de la phase gazeuse (17 mL) sont effectués dans chaque batch pour les analyses (Figure 9).

Un nouvel ajout de propionate (10 mL dans du BMP) est alors réalisé, à la même concentration pour les batchs A à E, avec une concentration croissante dans les batchs F, alors que seul du BMP est ajouté dans les batchs contrôles. Le volume est ainsi maintenu à 250 mL. Au total, trois ajouts de propionate à la même concentration ont été faits dans les batchs A à E, et onze ajouts avec des concentrations croissantes dans les batch F (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 8 et 10 g/L). Les batchs A, B, C, D et E et contrôle sont arrêtés après 3 injections.

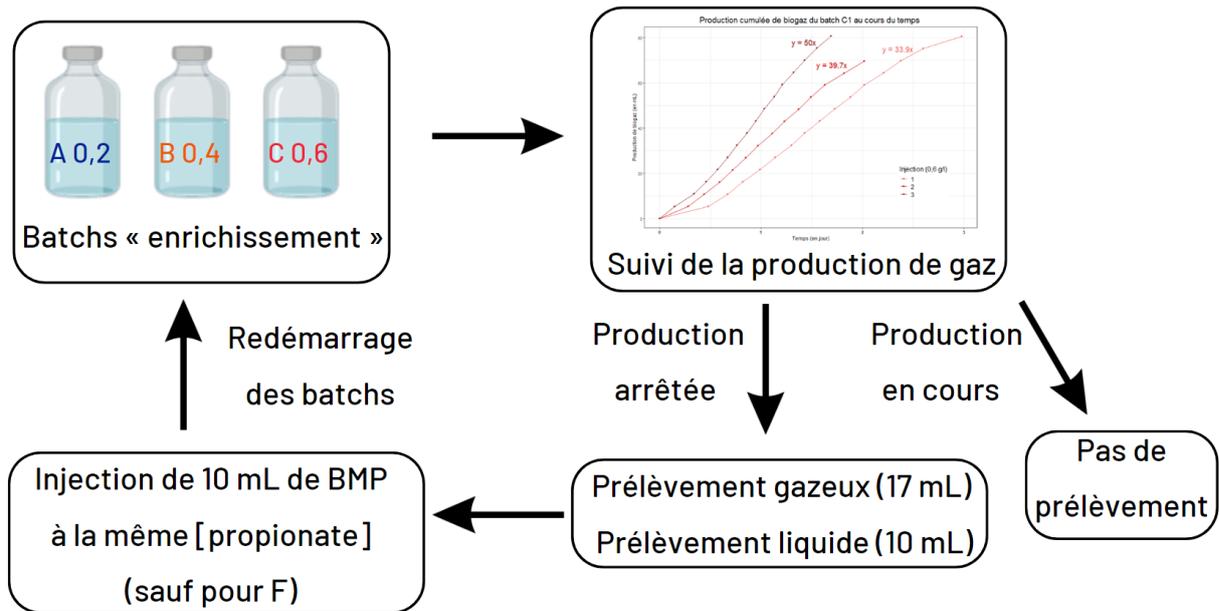


Figure 9 : Protocole expérimental résumé des batches « enrichissement ».

Pour les essais « dilution – stimulation », lorsque la production de biogaz s’arrête, des prélèvements de liquide et de biogaz sont également réalisés pour les analyses. En revanche, une partie de la phase liquide de la génération N est transférée dans de nouveaux batches afin de servir d’inoculum pour créer la nouvelle génération N+1. La nouvelle génération contient alors un certain volume d’inoculum (par exemple : 25 mL pour M) complété jusqu’à 100 mL avec du BMP contenant du propionate (75 mL pour M). A chaque nouvelle génération, on dilue la génération précédente de la même façon (dilution au quart pour M) (Tableau 4 et Figure 10).

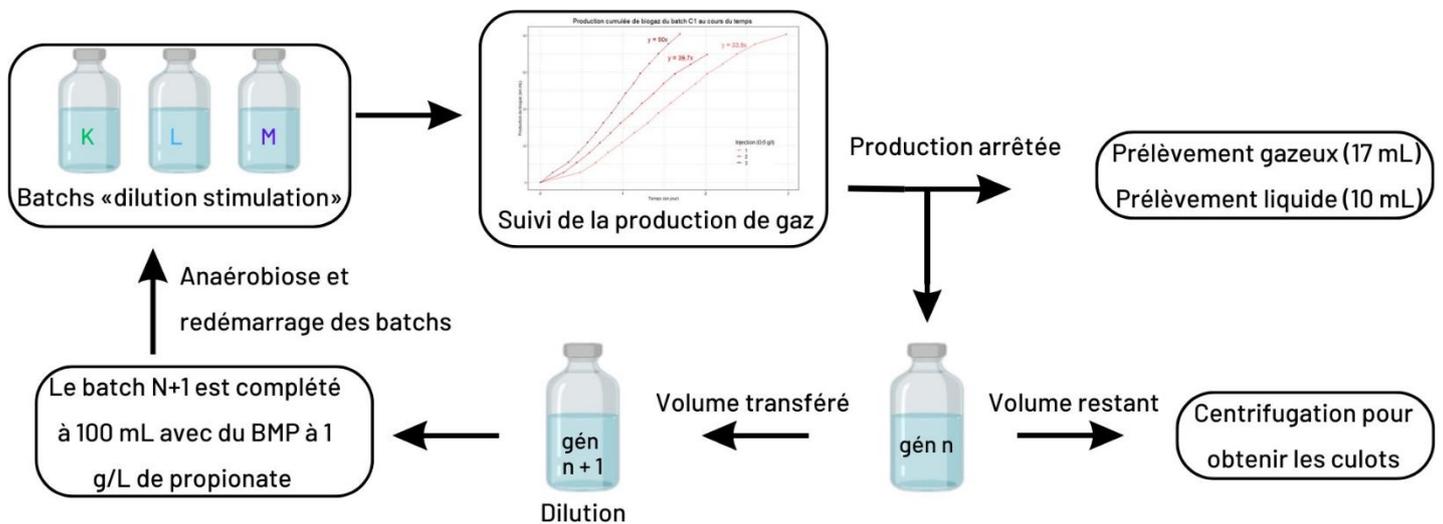


Figure 10 : Protocole expérimental résumé des batches « dilution – stimulation ».

2.1.6. Prélèvements

Les prélèvements de la phase liquide (10 mL) sont réalisés à l'aide d'une seringue via le tuyau inséré dans le septum afin de garder le système en anaérobiose. Sur les 10 mL prélevés, 6 mL sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C dans des tubes de 2 mL de sorte à pouvoir séparer le culot et le surnageant, le volume restant (4 mL) est conservé dans un tube. Les culots et les surnageants sont conservés à -20°C (sauf un des 3 surnageants qui est utilisé immédiatement après centrifugation pour mesurer le pH). Les culots seront utilisés pour réaliser un séquençage et les surnageants pour une analyse des AGV.

Les prélèvements de la phase gazeuse (17 mL) sont réalisés à l'aide d'une seringue à gaz directement dans le septum afin de garder le système en anaérobiose : 10 mL sont injectés dans un tube sous vide pour mesurer la composition du biogaz par micro-chromatographie en phase gazeuse, le restant (7 mL) dans un autre tube pour la mesure du fractionnement isotopique.

Lorsque les batchs sont arrêtés, un prélèvement habituel a lieu (liquide et gazeux). Le reste de la phase liquide est centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot gardé pour réaliser un séquençage.

2.2. Analyses chimiques

2.2.1. Volume biogaz

La production cumulée de gaz est mesurée en continu grâce aux compteurs à gaz. Chaque compteur à gaz est muni d'une chambre de 5 mL. Lorsque du biogaz est produit, le gaz s'accumule dans la chambre et lorsque le volume de gaz dépasse 5 mL, un clapet bascule. C'est ce nombre de basculements qui est enregistré, décompté et rapporté en volume de biogaz produit.

2.2.2. Composition du biogaz

La composition du biogaz (CH₄, CO₂ et H₂) est obtenue par micro-chromatographie en phase gazeuse (Varian CP4900). La micro-GC est équipée de trois colonnes d'élution en parallèle avec de l'hélium comme gaz vecteur. Le signal mesuré correspond à la différence de conductivité thermique entre le gaz de l'échantillon et le gaz vecteur.

2.2.3. Fractionnement isotopique

Afin de mettre en évidence la voie majoritairement utilisée pour la formation du méthane, une mesure du fractionnement isotopique du méthane et du dioxyde de carbone ($\delta^{13}\text{CH}_4$ et $\delta^{13}\text{CO}_2$) est réalisée. Un chromatographe en phase gazeuse (Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique Delta V Plus via un GC combustion III (Thermo Scientific) a été utilisé pour effectuer l'analyse. Comme indicateur de la voie méthanogène, le facteur isotopique apparent (α_{app}) a été calculé :

$$\alpha_{app} = \frac{\delta^{13}\text{CO}_2 + 10^3}{\delta^{13}\text{CH}_4 + 10^3}$$

Généralement, on suppose que si le α_{app} est supérieur à 1,065, la voie hydrogénotrophe est majoritaire. Au contraire, si le α_{app} est inférieur à 1,055, la méthanogénèse est dominée par la voie acétoclastique (Conrad, 2005).

2.2.4. pH

Afin de s'assurer du bon fonctionnement du système le pH est mesuré (pH-mètre IQ160) avant chaque nouvelle injection. Le but étant de s'assurer que le pH reste stable et proche de 7.

2.2.5. AGV

La chromatographie ionique (ICS 5000+) permet de déterminer la concentration en AGV des surnageants dilués au 1/4, avec une gamme de concentration allant de 1 à 500 mg/L. Le chromatographe est équipé d'une colonne d'exclusion stérique IONPAC® ICE-AS1 (9 * 250 mm) permettant la détection de nombreux AGV (propionate, butyrate, formate, acétate, lactate, valérate et caproate). Le détecteur utilisé est un détecteur à conductivité thermique. Les éluants utilisés sont l'acide heptafluorobutyrique à 0,04 mmol/L et l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH) à 5 mmol/L. La limite de détection est évaluée à 0,33 mg/L.

2.2.6. Modèles et analyses statistiques

a) Traitement des données

Après curation des artefacts, les résultats sont présentés sous forme de graphiques grâce à R Studio (version 4.2.2). Les données qui n'ont pas été prises en compte correspondent à des aléas expérimentaux (injection trop importante de propionate, mauvaise étanchéité du septum, basculements du clapet du compteur à gaz suite à la dilatation du diazote injecté pour l'anaérobiose une fois le batch placé à 35°C).

b) Volume maximal théorique de méthane

Le volume théorique de méthane a été calculé selon l'équation suivante (Angelidaki1 & Sanders, 2004) :

$$B_{o,th} = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) 22,4}{12n + a + 16b} \quad \left(CNTP \frac{LCH_4}{g - VS}\right)$$

B_{o,th} : rendement en méthane ((CNTP L CH₄)/g-VS), n : nombre d'atome de carbone, a : nombre d'atome d'hydrogène, b : nombre d'atome d'oxygène, 22,4 correspond au volume en litre d'une mole de méthane en CNTP

Le volume maximal théorique de méthane s'élève à 598 mL/g de propionate.

c) Modèle de LOESS

Pour représenter la production cumulée de biogaz (en mL/g de propionate) au cours du temps, le modèle LOESS (LOcally Estimated Scatterplot Smoothing) a été utilisé à partir des volumes moyens des triplicats d'un même batch. Le modèle de LOESS est une méthode de régression non-paramétrique. Il permet de produire des courbes lissées ajustées à un nuage de point. Les prises de mesures du volume de biogaz produit entre triplicats n'ayant pas lieu en même temps, le modèle de LOESS permet de palier à ce problème.

d) Modèle de croissance

Les taux de production de biogaz en fonction de la concentration injectée ont été calculés avec le package Growthcurver disponible dans R Studio (version 4.2.2). Il permet d'ajuster les données de vitesse de production à une forme standard de l'équation logistique :

$$N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right) e^{-rt}}$$

N_t : volume de biogaz au moment t (mL / g de propionate), K : capacité de charge (volume maximal théorique) (mL / g de propionate), N_0 : volume de biogaz au début du batch (mL / g de propionate), r : taux de production qui se produirait si aucune restriction n'était imposée (jour⁻¹), t : temps (jour)

2.3. Analyses des communautés microbiennes

2.3.1. Croissance microbienne

La croissance microbienne a été mesurée par spectrophotométrie (densité optique à 600 nm) dans les batches « dilution-stimulation » à chaque en début et fin de génération.

2.3.2. Séquençage ADNr 16S

L'ADN des culots obtenus est extrait avec le kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen ®) selon le protocole fourni par le fabricant. Le protocole combine une lyse chimique et mécanique (bead beating) afin de casser les cellules et libérer le matériel génétique. Le lysat brut est ensuite purifié par centrifugation afin d'éliminer les débris cellulaires et les inhibiteurs de PCR. Le lysat purifié contenant l'ADN passé à travers une membrane de filtration en silice. La membrane est lavée et l'ADN lié à la silice est ensuite élué en utilisant un tampon d'éluion (50 ou 100 µL). L'ADN est quantifié par spectrophotométrie à 260 nm. Les ADN extraits sont utilisés pour le séquençage des régions V4-V5 de l'ADNr 16S. Les régions V4-V5 sont amplifiées par PCR à l'aide des amorces 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3') et 928R (5'-CCCGYCAATTCMTTRAGT-3') contenant les adaptateurs spécifiques. Chaque amplicon est ensuite indexé lors d'une seconde PCR afin de pouvoir séquencer plusieurs échantillons en même temps. Chaque librairie est normalisée et poolée pour le séquençage.

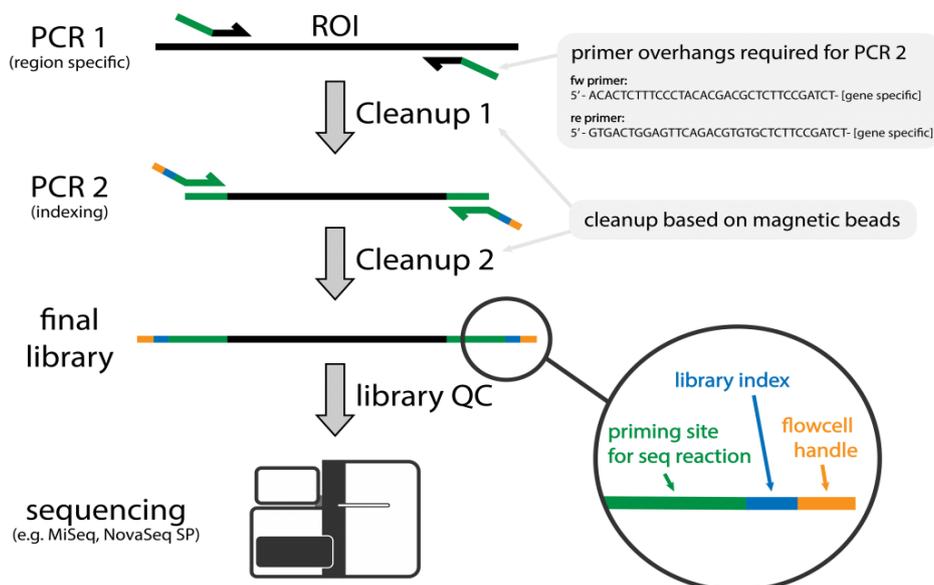


Figure 11 : Préparation de la bibliothèque d'amplicons (Source : NGI Suède)

Les bibliothèques sont séquencées à l'aide du séquenceur MiSeq (Illumina) selon le protocole du fabricant. La technologie utilisée repose sur une amplification en ponts des bibliothèques (bridge amplification) sur support solide (flow cell) (Figure 12, a) suivi d'un séquençage par synthèse chimique (SBS) des colonies d'ADN (clusters) préalablement amplifiés (Figure 12, b). Un terminateur réversible marqué par fluorescence est imagé à mesure que chaque dNTP est ajouté, puis clivé pour permettre l'incorporation de la base suivante.

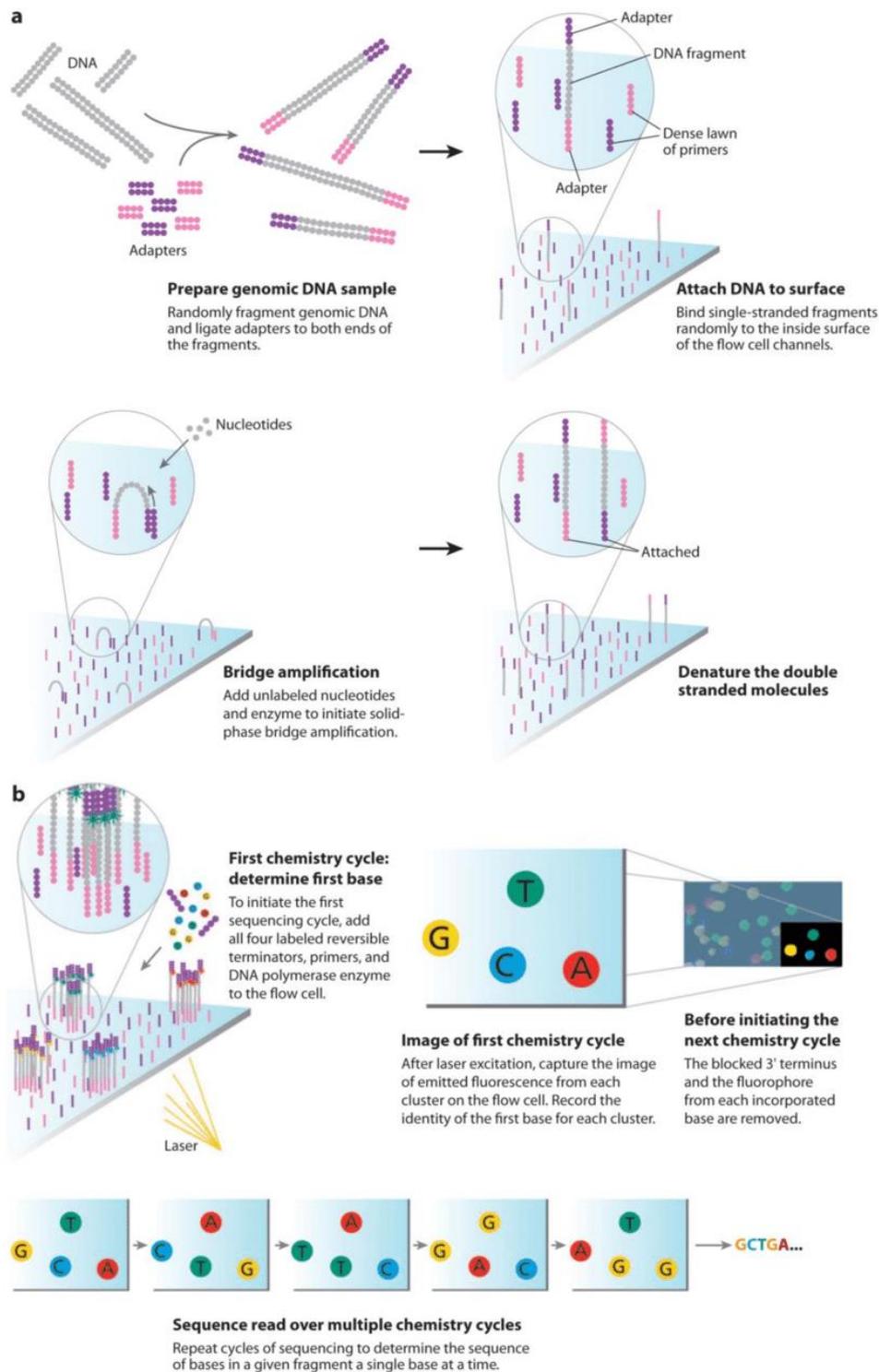


Figure 12 : Principe du séquençage SBS Illumina (Source : Illumina)

2.3.3. Traitement bio-informatique des séquences

Les séquences d'ADNr 16S ont été importées dans Galaxy, plateforme en ligne qui contient un ensemble d'outil pour la manipulation et l'analyse de données génomique. Nous utilisons le workflow FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (version 4.1.0) (Escudié *et al.*, 2018) pour analyser les données. Ainsi on construit une matrice de comptage d'OTU (Operational Taxonomic Unit) pour chaque échantillon avec une affiliation taxonomique.

L'outil a fusionné les reads « paired-end » en utilisant *flash* (version 1.2.11) sur la base des régions chevauchantes. Puis, une étape de filtration a lieu grâce à *cutadapt* (version 2.1) afin de conserver les reads qui ont une longueur comprise entre 390 et 430 pb et éliminer ceux qui contiennent des bases ambiguës ou qui ne contiennent pas les séquences d'amorces complètes. Ensuite une étape de clustering est effectuée à l'aide de l'algorithme *swarm* (version 2.1.2) avec une distance maximale d'agrégation de trois bases. Les séquences chimériques sont supprimées à l'aide de *VSEARCH* (v2.17.0) avec validation croisée entre échantillons. L'affiliation taxonomique de la séquence représentative de chaque cluster est réalisée en utilisant la base de données 16S_SILVA_Pintail100_138 à l'aide de BLAST. Enfin, un arbre phylogénétique a été construit à l'aide de FastTree (version 2.1.1018) (Escudié *et al.* 2018). Ainsi, on obtient une table de comptage de chaque OTU pour chaque échantillon, avec affiliation taxonomique.

2.3.4. Analyse statistique

Les différentes matrices de comptage issus des analyses de biologie moléculaire ont été examinés grâce à une analyse en composantes principales (ACP). Cette méthode d'analyse multivariée est une technique descriptive permettant d'étudier les relations qui existent entre différentes variables, ici les abondances des différents OTUs. L'ACP permet grâce à la projection des données sur différents axes factoriels de visualiser des corrélations entre les variables et d'identifier des groupes d'échantillons homogènes.

3. Résultats & discussion

3.1. Batches « enrichissement » (A, B, C, D, E et F)

3.1.1. Analyse de la production de gaz

Des batchs contrôle ont permis de mettre en évidence qu'il n'y avait pas de production de biogaz liée à l'injection de milieu BMP.

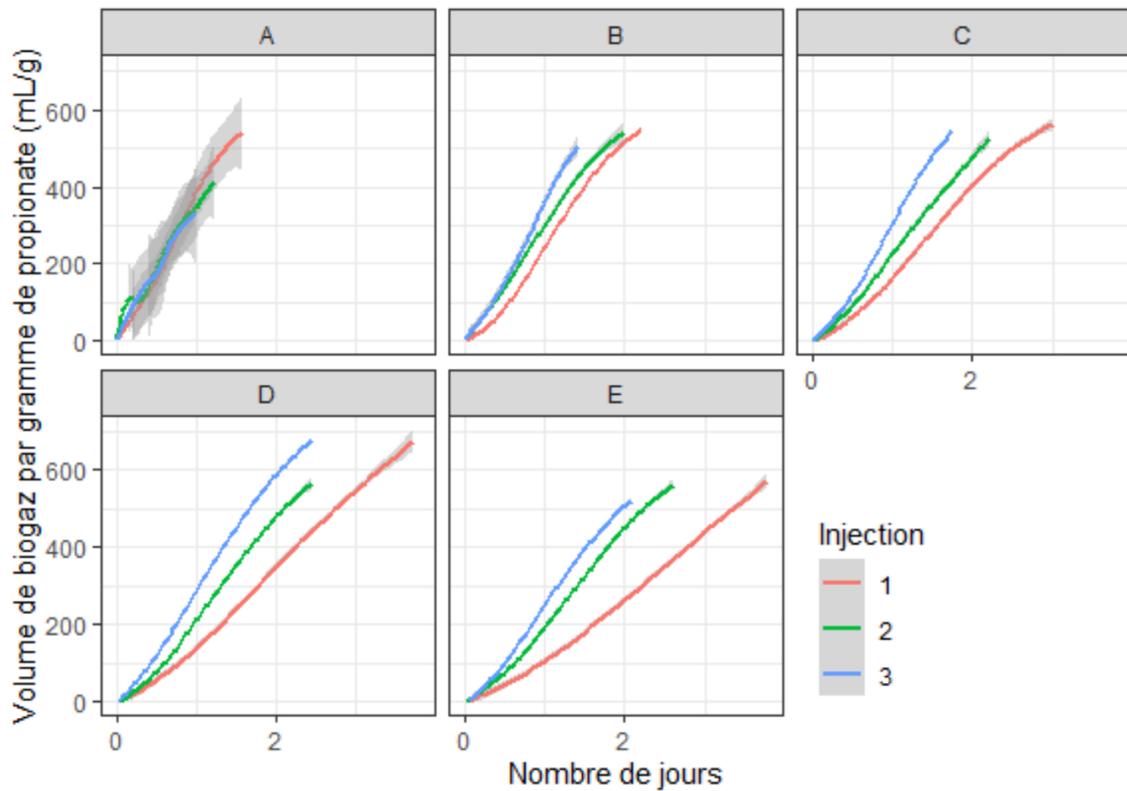


Figure 13: Volume de biogaz (mL/g de propionate) produit au cours du temps (en jour) pour les batchs A, B, C, D et E.

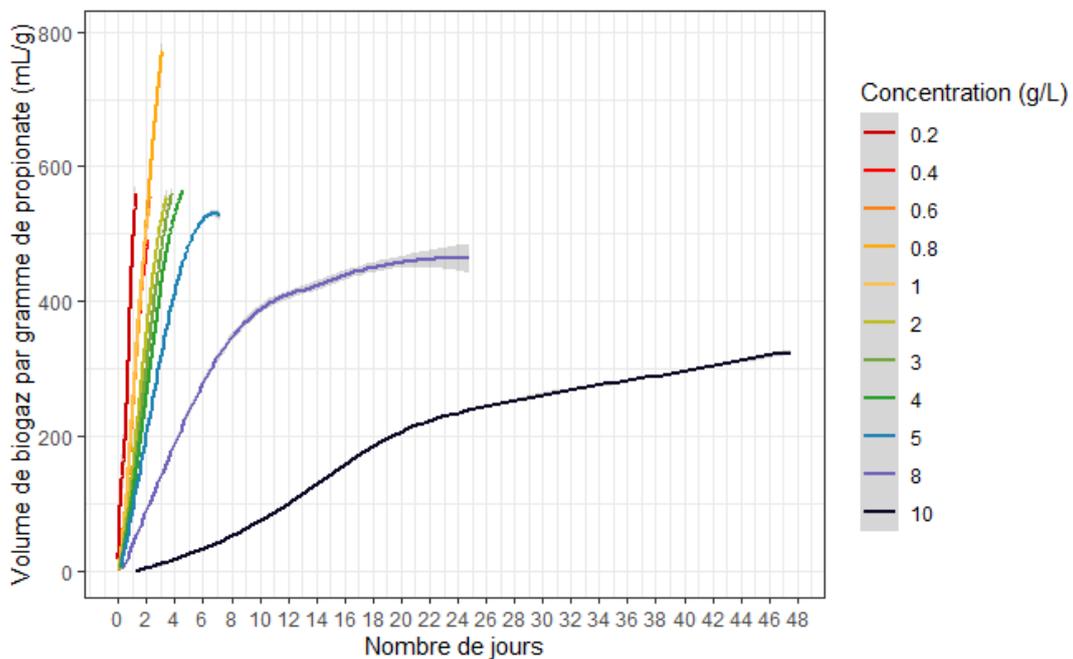


Figure 14 : Volume de biogaz (mL/g de propionate) produit au cours du temps (en jour) pour les batchs F

Dans un premier temps, on remarque qu'à chaque injection de propionate du biogaz est produit. En effet, le propionate est consommé, ce qui engendre une production de gaz jusqu'à épuisement du substrat. Cela suggère que le consortium bactérien parvient à utiliser le propionate et cela à n'importe quelle concentration testée.

A chaque injection le volume de gaz produit rapporté à la concentration en propionate injectée entre les triplicats est relativement similaire (de l'ordre de 500 à 600 mL de biogaz par gramme de propionate). Ce qui démontre que les résultats sont répétables et par conséquent fiables.

Cependant plusieurs volumes maximums sont en dehors des limites de 500 à 600 mL de biogaz par gramme de propionate :

- le batch A (Figure 13) produit moins de gaz que les autres batchs. Toutefois les erreurs standards des productions de gaz sont très importantes entre les triplicats. Il est, par conséquent, difficile de conclure quoi que ce soit sur le volume maximal produit du batch A
- Le batch F à l'injection 4 (0,8 g/L) (Figure 14) produit plus de gaz que les autres batchs. Cela s'explique par une erreur de manipulation : une trop grande quantité a été injectée dans le batch F1 à l'injection 4, faussant ainsi les résultats.

Pour le batch F (Figure 14), on remarque aussi un volume similaire entre les batchs (500 à 600 mL de biogaz par gramme de propionate). Pourtant, on observe une diminution du volume maximal de gaz produit à partir de 5 g/L. Il semblerait que le système éprouve des difficultés le propionate car en concentration trop importante par rapport la biomasse en capacité à le dégrader. Cette « inhibition » par excès de substrat se répercute sur le volume maximal de gaz produit mais aussi sur la vitesse de production de biogaz (Figure 14). On observe le même phénomène pour les concentrations à 5 g/L. Les concentrations à 5 ; 8 et 10 g/L ne seront donc pas sélectionnées pour les batchs « dilution-stimulation ».

A 10 g/L (Figure 14), on remarque un changement dans la forme de la courbe environ 21 jours après l'injection. En effet après 21 jours la vitesse de production semble diminuer davantage. Cela pourrait s'expliquer par un changement de métabolisme dans l'oxydation du propionate.

3.1.2. Analyse du taux de production de biogaz

Le taux de production de biogaz correspond à l'aptitude qu'à le consortia à dégrader rapidement le propionate. Plus celui-ci est grand et plus le volume maximal de gaz est atteint rapidement. Le volume maximal de gaz étant presque similaire entre les différents batchs « enrichissement » (500 à 600 mL/g de propionate), c'est le taux de production qui déterminera le choix de la concentration en propionate optimale pour les essais de dilution-stimulation.

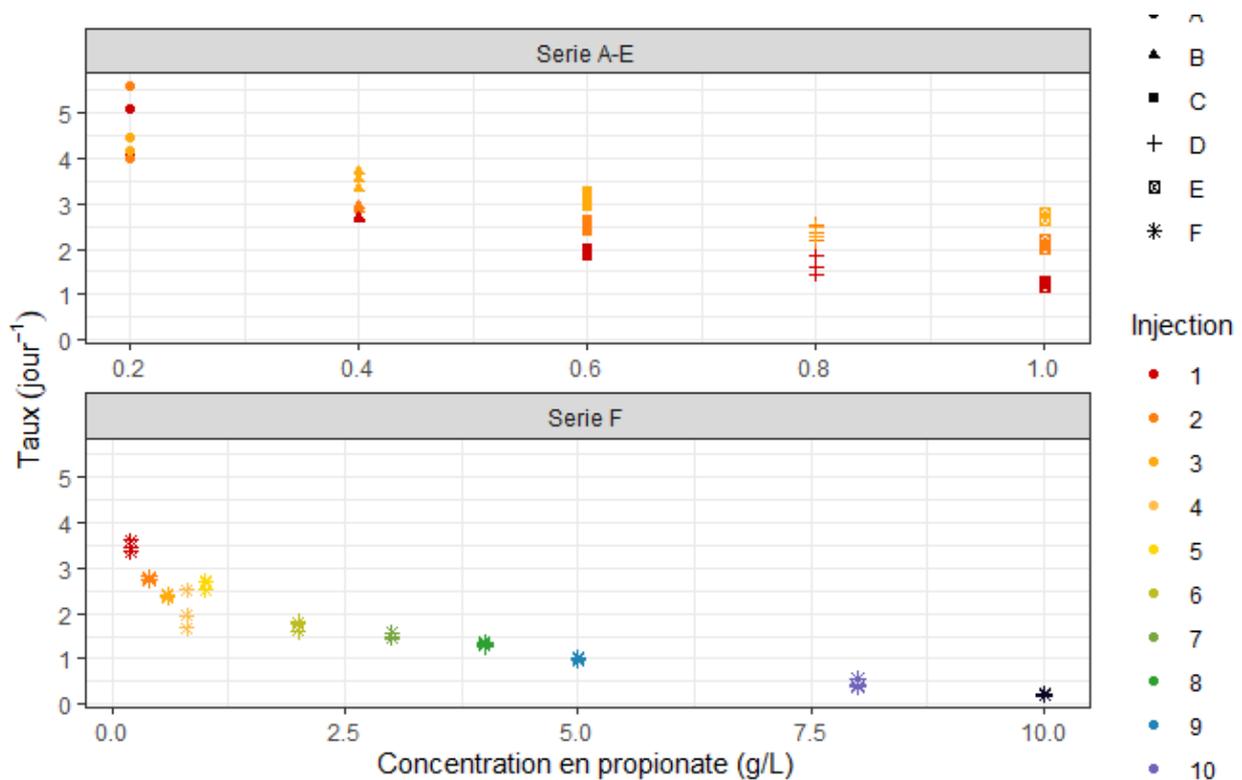


Figure 15: Taux de production de biogaz en fonction de la concentration en propionate (g/L).

Le taux de production de biogaz est corrélé au nombre d'injections et à la concentration en propionate. En effet, le taux de production est de plus en plus fort au sein d'un même batch, au fur et à mesure des injections alors que la concentration reste la même (Figure 15, série A-E). De plus, lorsque l'on compare les taux de productions entre les batchs on remarque que plus la concentration injectée est élevée et plus le taux de production est faible (Figure 15).

Cela est d'autant plus marqué pour le batch F (Figure 15, série F). On distingue 5 groupes, qui diffèrent entre eux de par leur taux de production. Le groupe 1 : 0,2 g/L à 1 g/L (courbes rouge-jaune). Le groupe 2 : 2 à 4 g/L (courbes vertes), la courbe à 5 g/L, la courbe à 8 g/L et la courbe à 10 g/L. Le taux de production entre ces groupes est assez homogène.

Le groupe 1 est représenté par des concentrations faibles en propionate. C'est à ces concentrations que le taux de production est le plus important. C'est donc dans ce groupe que la concentration optimale en propionate pour le batch « dilution-stimulation » sera sélectionnée. Nous choisirons la concentration la plus élevée de ce groupe, soit 1 g/L car il n'y pas de différence en terme de vitesse et de rendement avec les concentrations inférieures. D'autre part, de plus faibles volumes d'inoculum seront utilisés pour les batchs « dilution-stimulation », par conséquent on ne peut pas choisir des concentrations supérieures sans risquer de ne plus avoir un ratio inoculum/substrat optimal.

Bien que, le groupe 2 possède des volumes maximaux équivalents au groupe 1 (Figure 12), les taux de production eux sont moindres (Figure 15, série F). D'autre part, étant donné que l'inoculum sera dilué, il ne faudrait pas qu'un le ratio inoculum/substrat soit trop faible

A partir de 5 g/L, le taux de production et le volume maximal commence à réellement baisser (Figure 15, série F). On peut donc considérer que le ratio inoculum substrat commence à ne plus être optimal. Cet effet est encore plus marqué à 8 et à 10 g/L.

3.1.3. Analyse des biogaz

Suivre la production et le taux de production du biogaz est intéressant mais étudier la proportion des différents gaz notamment le méthane est un bon indicateur de la performance de la digestion anaérobie et par extension du système. Pour cela des graphiques en bâton du volume moyen des gaz produits sont représentés. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des volumes maximaux produits (Figure 16, 17 et 25). Le volume maximum théorique de méthane s'élève à 598 mL/g de propionate, il représenté par la ligne en pointillé noir (Figure 16, 17 et 25).

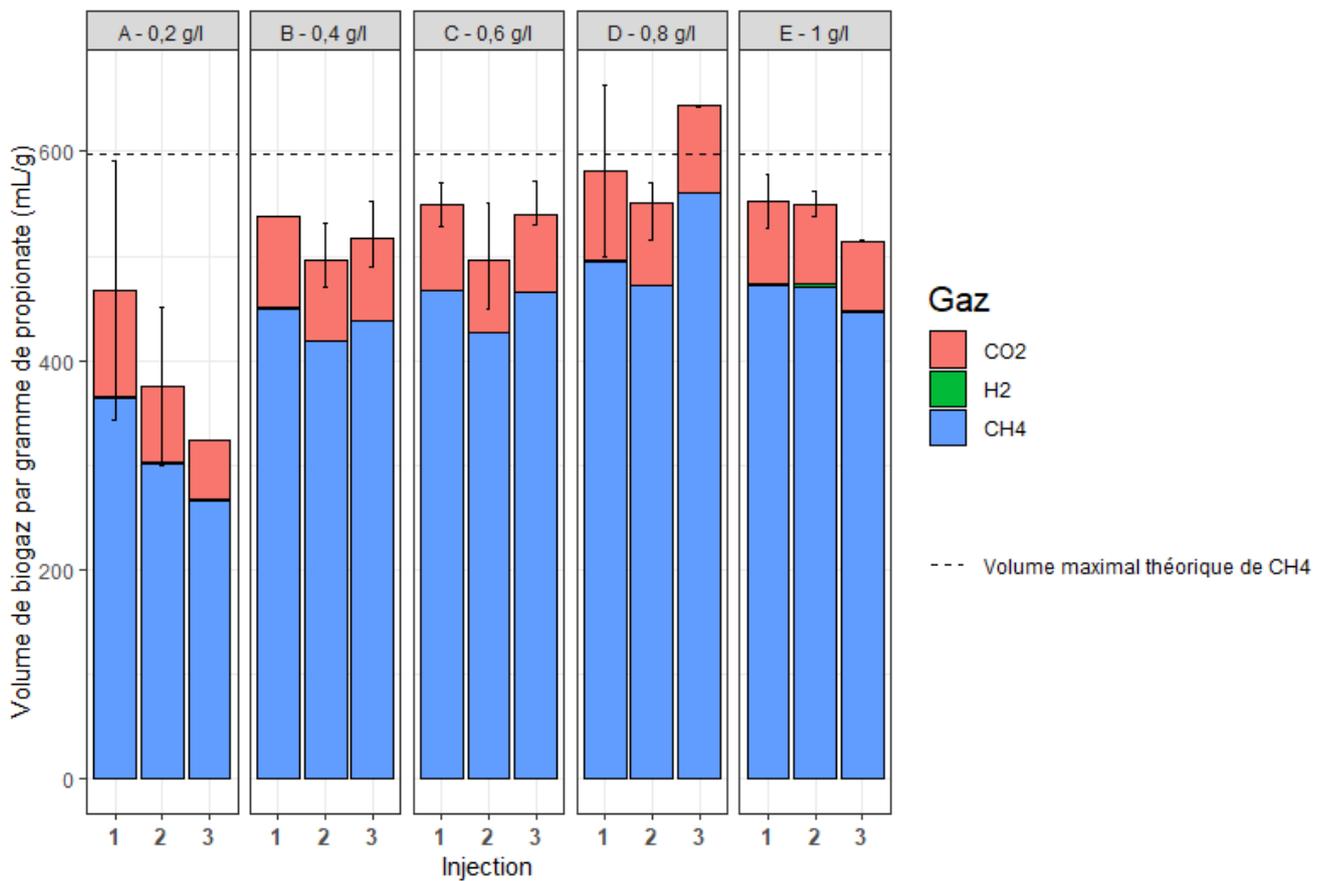


Figure 16 : Volume moyen des gaz produits (CH₄, CO₂ et H₂) pour les batchs A, B, C, D et E.

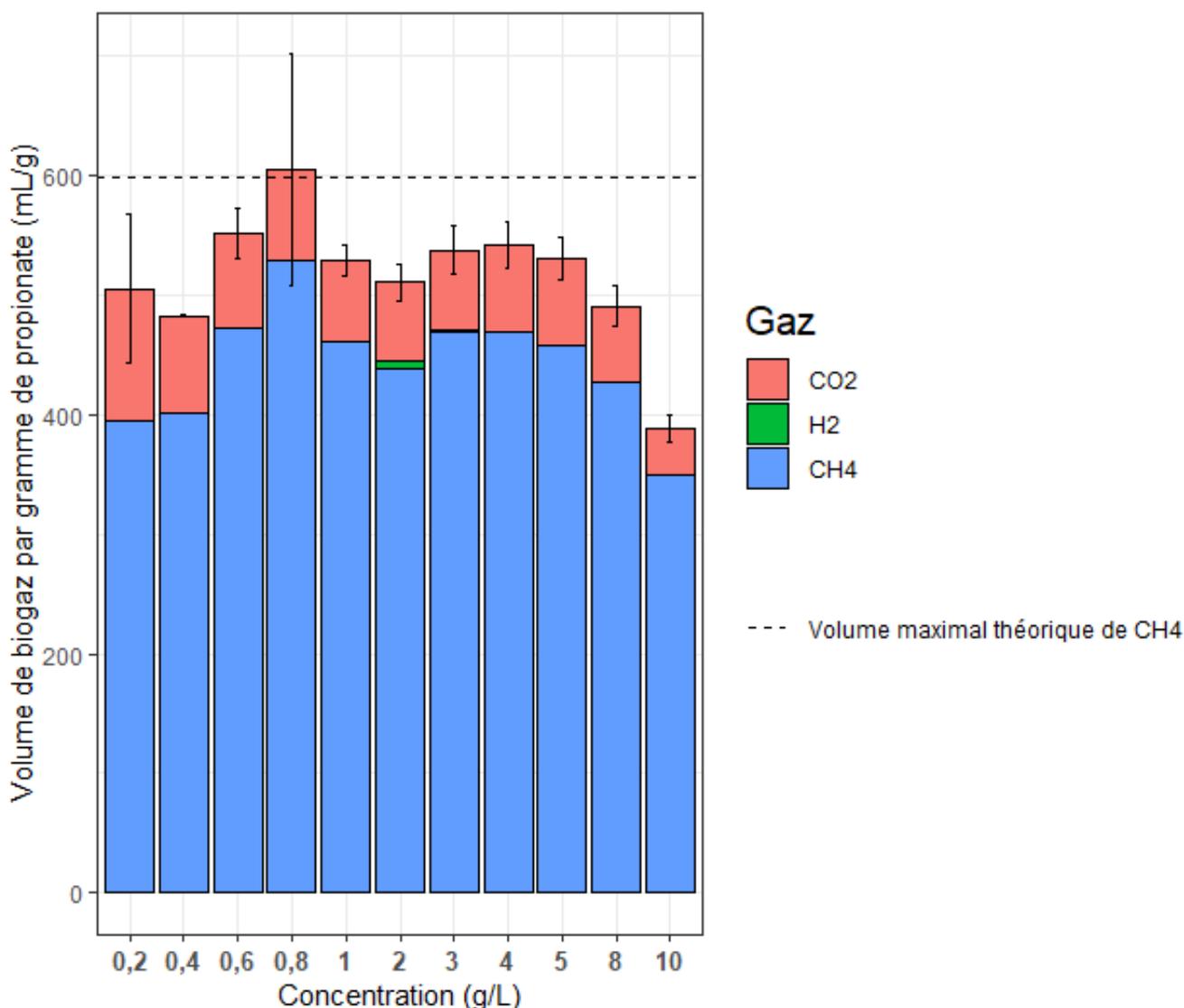


Figure 17 : Volume moyen des gaz produits (CH₄, CO₂ et H₂) pour le batch F.

La proportion de gaz produits est similaire entre les différents batchs A, B, C, D et E (Figure 16). Le méthane est majoritairement produit à environ 85%. Le dioxyde de carbone et le dihydrogène représentent respectivement environ 14,3% et 0,17 % des gaz produits. Pour le batch F, la proportion de gaz produits est similaire entre les différents batchs. Les proportions de gaz pour le batch F (Figure 17) sont similaires aux batchs A, B, C, D et E (85,5 % de méthane, 14,35 % de dioxyde de carbone et moins de 0,16 % de dihydrogène).

On remarque que les volumes expérimentaux en méthane pour les batchs B à E se rapprochent du volume en méthane théorique (Figure 16). Les rendements sont donc satisfaisants pour ces batchs : de l'ordre de 83%. Cependant, les rendements du batch A viennent baisser cette moyenne.

Les rendements de F eux sont moins importants (Figure 17). On obtient un rendement moyen de 73% (sans prendre en compte l'injection à 0,8 g/L). Les rendements à 5 ; 8 et 10 g/L font baisser le rendement moyen du batch F à cause d'un volume maximal produit plus faible comparé aux autres concentrations.

3.1.4. Analyse isotopique

L'analyse isotopique permet de mettre en évidence la voie méthanogène empruntée pour la formation du méthane (voie acétoclastique, voie hydrogénotrophe ou pas de voie préférentielle). Certains micro-organismes utilisent une voie ou l'autre, ou les deux. Ainsi, les résultats d'analyse isotopique pourront être comparés aux résultats de séquençage.

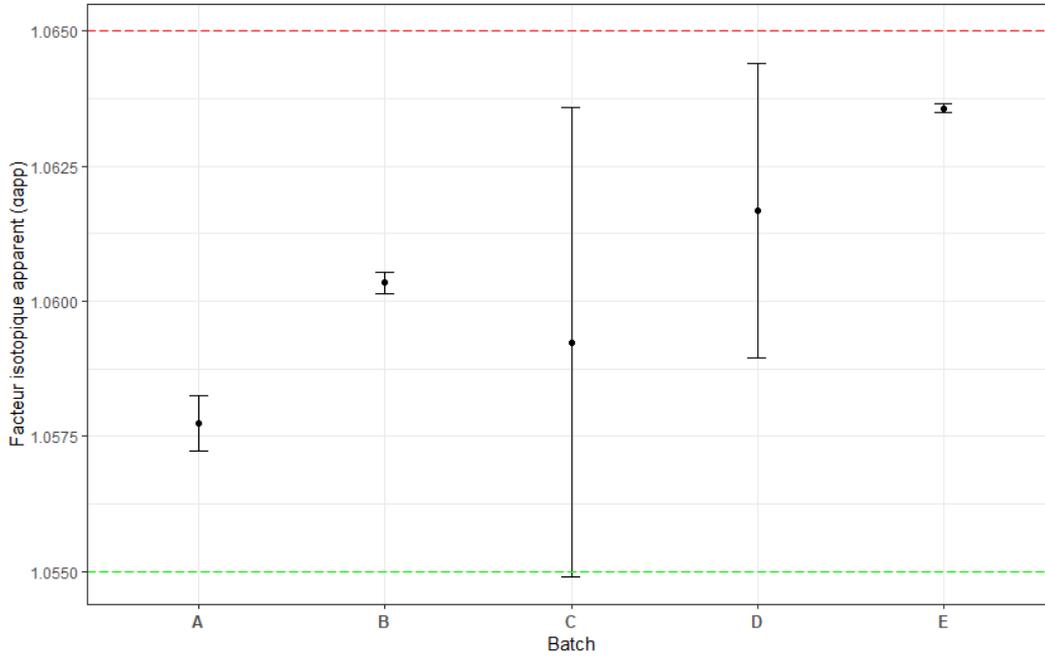


Figure 18 : Facteur isotopique apparent (α_{app}) du batch A, B, C, D et E.

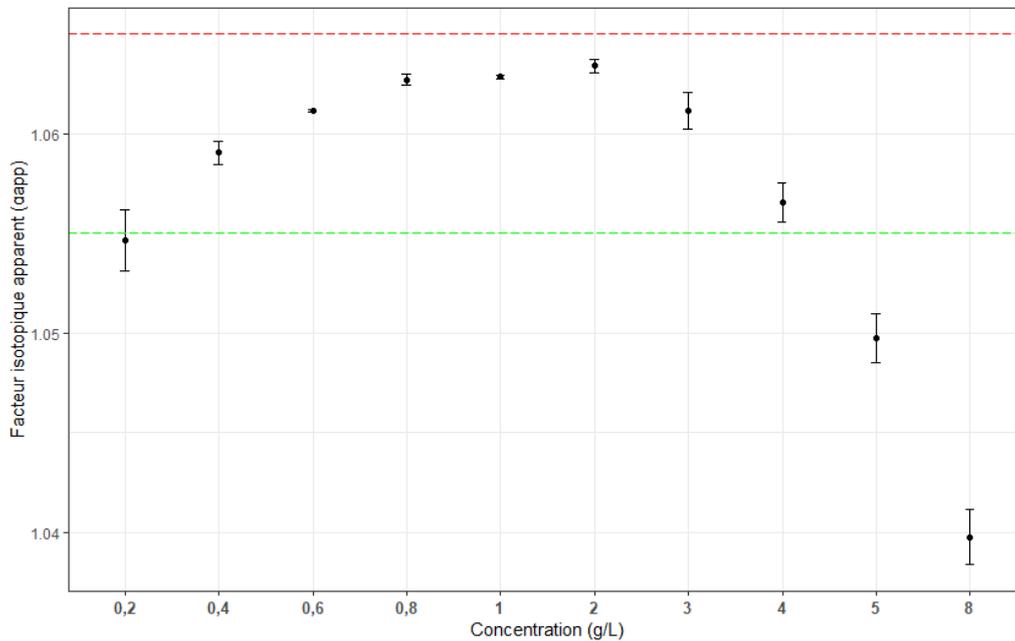


Figure 19: Facteur isotopique apparent (α_{app}) du batch F.

On remarque qu'il n'y a pas de voies préférentielles pour les batchs A, B, C, D et E (Figure 18).

Pour le batch F, on constate que les concentrations entre 0,2 et 4 g/L n'empruntent pas de voies préférentielles de la méthanogénèse (Figure 19). A l'inverse, on remarque que les concentrations supérieures (5 et 8 g/L) induisent un changement de méthanogénèse. On passe d'une méthanogénèse dite mixte à une méthanogénèse acétoclastique (Figure 19). Ces concentrations en propionate

élevées peuvent engendrer une pression de sélection importante sur le consortium et principalement sur les archées méthanogènes. Il est probable qu'un changement important de la proportion de micro-organisme opère à partir de 5 g/L et par extension un changement de méthanogénèse.

3.1.5. Séquençage

a) Batches C, D et E

L'analyse de la communauté microbienne par séquençage permet de faire des corrélations entre les paramètres expérimentaux physico-chimiques et les communautés microbiennes des échantillons. On cherche ainsi à comprendre en quoi les communautés influencent les bioprocédés de digestion anaérobie.

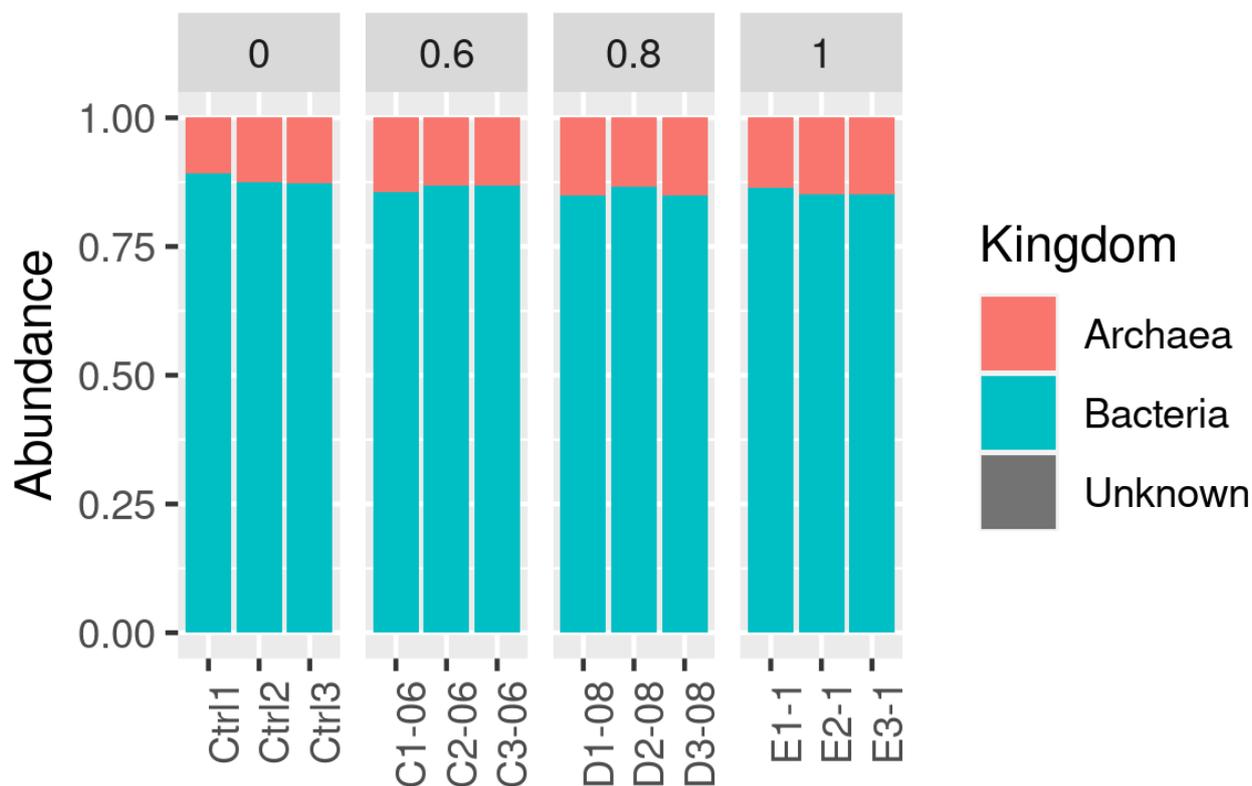


Figure 20 : Abondance relative des règnes pour le batch C, D et E.

Il n'y a pas d'évolution de la communauté microbienne au niveau des règnes entre le contrôle et les batches C, D et E (Figure 20). Il y a environ 85% de bactéries et 15% d'archées lorsque la concentration en propionate est faible. Cette abondance relative est courante dans les digesteurs anaérobies, par exemple pour l'étude de Montero *et al.*, 2008 l'abondance (au démarrage du batch) était de 88% de bactéries et 12 % d'archées.

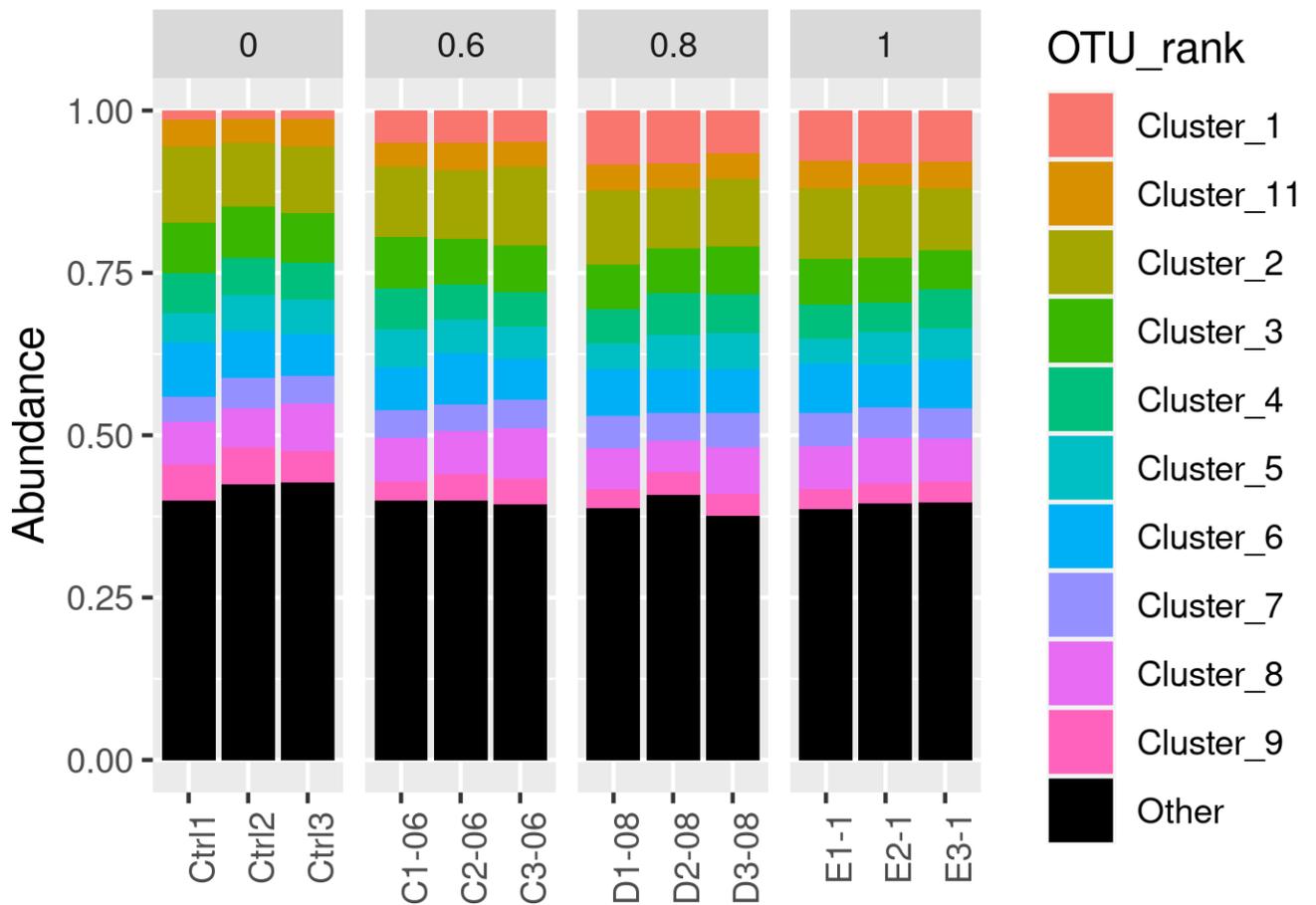


Figure 21 : Abondance relative des OTUs majoritaires pour le batch C, D et E.

Tableau 5 : OTUs majoritaires pour le batch C, D et E

OTU	Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Cluster_1	Bactérie	<i>Desulfobactera</i>	<i>Syntrophobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophobacteraceae</i>	<i>Syntrophobacter</i>	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>
Cluster_11	Bactérie	Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	
Cluster_2	Bactérie	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	DMER64	<i>Rikenellaceae bacterium DTU002</i>
Cluster_3	Bactérie	<i>Thermotogota</i>	<i>Thermotogae</i>	<i>Kosmotogales</i>	<i>Kosmotogaceae</i>	<i>Mesotoga</i>	<i>Mesotoga infera</i>
Cluster_4	Bactérie	<i>Bacteroidota</i>	<i>Ignavibacteria</i>	<i>Ignavibacteriales</i>	PHOS-HE36		
Cluster_5	Archée	<i>Halobacterota</i>	<i>Methanosarcinia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	
Cluster_6	Bactérie	Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	Multi-affiliation	
Cluster_7	Archée	<i>Halobacterota</i>	<i>Methanosarcinia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanothrix soehngenii</i>
Cluster_8	Bactérie	<i>Synergistota</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>		
Cluster_9	Bactérie	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Lentimicrobiaceae</i>	<i>Lentimicrobium</i>	

On remarque que les 10 OTUs majoritaires représentent environ 60% de la communauté microbienne (Figure 20). Parmi eux, on retrouve la bactérie du genre *Syntrophobacter* (Cluster_1) et

les archées méthanogènes du genre *Methanosarcina* (Cluster_5) et *Methanosaeta* (Cluster_7) (Tableau 5).

La présence des OTUs ne change pas entre les différents batchs en revanche l'abondance relative varie. On peut voir que plus il y a de propionate, et plus l'abondance du genre *Syntrophobacter* augmente (de 1% dans le contrôle à 8% dans E). *Syntrophobacter* est une bactérie connue pour son activité syntrophique d'oxydation du propionate (Chen *et al.*, 2005). Ceci montre qu'il y a bien un enrichissement en BSOP après 3 injections de propionate à la même concentration.

a) Batch F

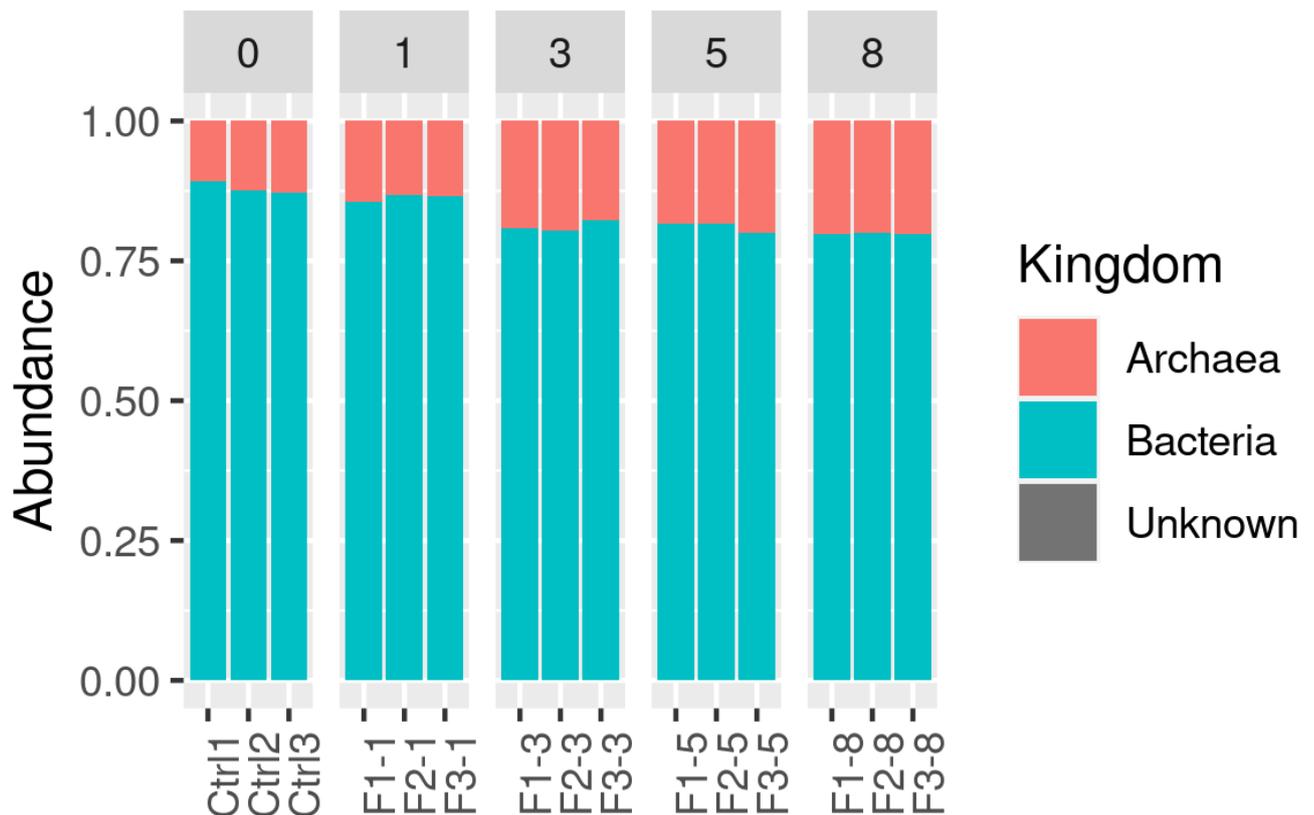


Figure 22 : Abondance relative des règnes pour le batch F à 1, 2, 3, 5 et 8 g/L.

On remarque une évolution de la communauté microbienne au niveau du règne en fonction de la concentration en propionate dans les batchs F (Figure 22). A partir de 3 g/L de propionate, on passe de 15% d'archées à 20%.

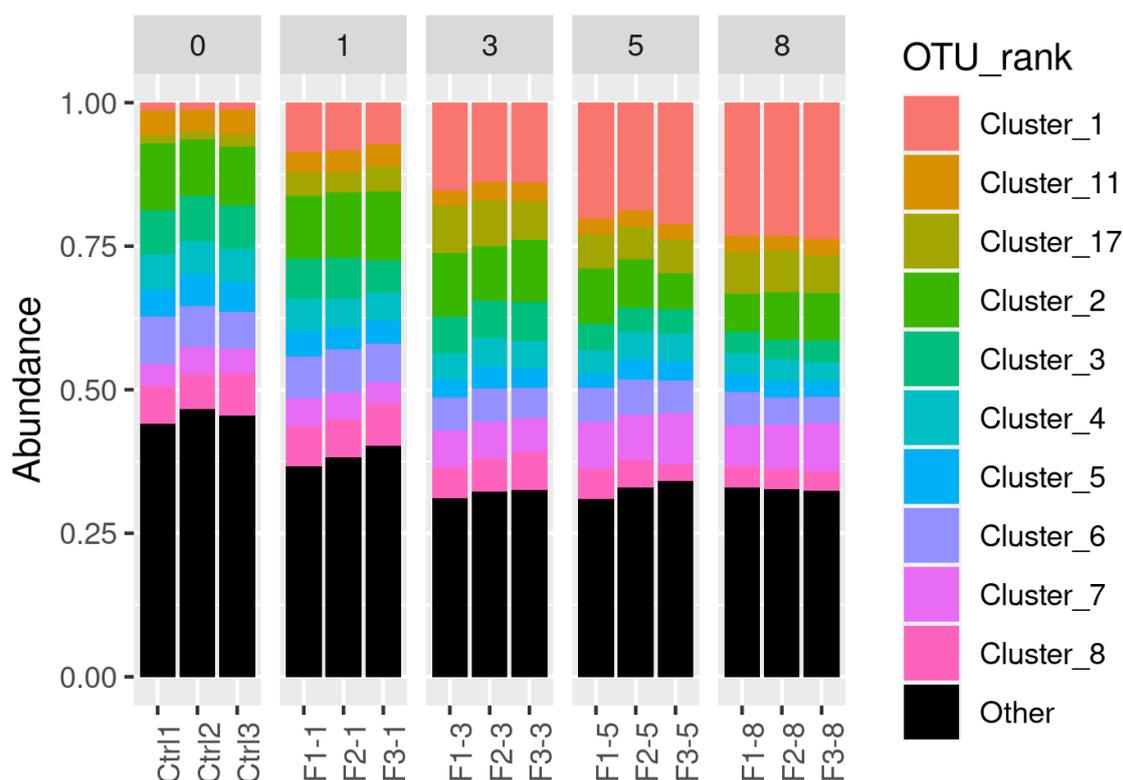


Figure 23 : Abondance relative des OTUs majoritaires pour le batch F à 1, 2, 3, 5 et 8 g/L

Tableau 6 : OTUs majoritaires pour le batch F à 1, 2, 3, 5 et 8 g/L

OTU	Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Cluster_1	Bactérie	<i>Desulfobactera</i>	<i>Syntrophobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophobacteraceae</i>	<i>Syntrophobacter</i>	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>
Cluster_11	Bactérie	Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	
Cluster_17	Archée	<i>Halobacterota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>	
Cluster_2	Bactérie	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	DMER64	<i>Rikenellaceae bacterium DTU002</i>
Cluster_3	Bactérie	<i>Thermotogota</i>	<i>Thermotogae</i>	<i>Kosmotogales</i>	<i>Kosmotogaceae</i>	<i>Mesotoga</i>	<i>Mesotoga infera</i>
Cluster_4	Bactérie	<i>Bacteroidota</i>	<i>Ignavibacteriia</i>	<i>Ignavibacteriales</i>	PHOS-HE36		
Cluster_5	Archée	<i>Halobacterota</i>	<i>Methanosarcinia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	
Cluster_6	Bactérie	Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	<i>Clostridium sp.</i>
Cluster_7	Archée	<i>Halobacterota</i>	<i>Methanosarcinia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanothrix soehngenii</i>
Cluster_8	Bactérie	<i>Synergistota</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>		

On remarque que les 10 OTUs majoritaires représentent entre 60% et 70% de la communauté microbienne (Figure 23). Parmi eux, on retrouve comme pour le batch C, D et E : *Syntrophobacter* (Cluster_1), *Methanosarcina* (Cluster_5), *Methanosaeta* (Cluster_7) (Tableau 6). En revanche, on retrouve une archée méthanogène du genre *Methanospirillum* (Cluster_17), qui n'est pas présente dans les 10 OTUs majoritaires des batchs C, D et E. Ces 4 genres représentent 13% de la communauté microbienne dans le contrôle et passent à 42% à 8 g/L de propionate.

On peut voir que plus il y a de propionate, et plus l'abondance du genre *Syntrophobacter* augmente (de 1% dans le contrôle à 24% à 8 g/L). Ceci montre qu'il y a bien un enrichissement en BSOP après ajout de propionate à des concentrations croissantes. D'autre part, on remarque également une augmentation croissante de l'abondance de *Methanospirillum* (de 2% dans le contrôle à 7% à 8 g/L) et de *Methanosaeta* à partir de 3 g/L (5% dans le contrôle et 1 g/L, 8% dans les concentrations supérieures). En revanche l'abondance de *Methanosarcina* tend à diminuer (de 6% dans le contrôle, à 3% à 8 g/L). *Methanospirillum* est un méthanogène hydrogénotrophe (Saha *et al.*, 2020), *Methanosaeta* est un méthanogène acétoclastique, et *Methanosarcina* est capable d'utiliser les 2 voies de méthanogénèse.

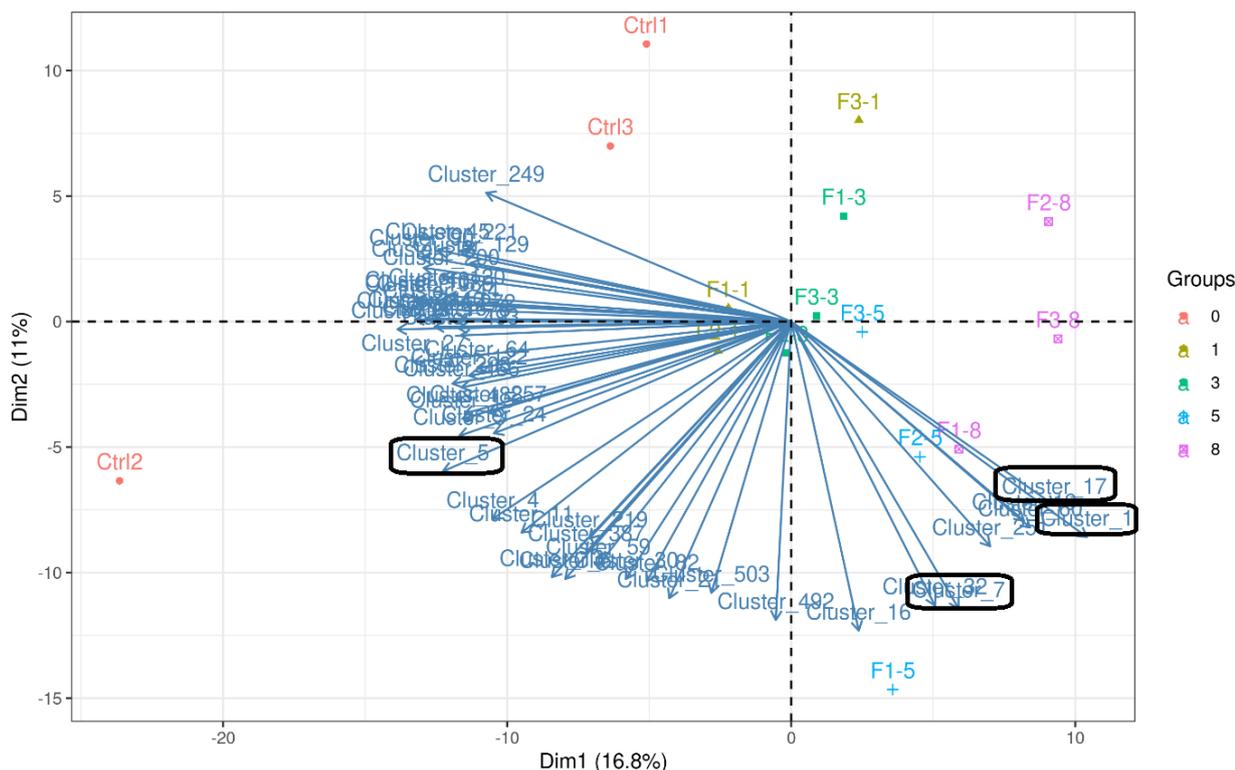


Figure 24 : Etude de l'effet de la concentration en propionate sur la composition en OTU dans le batch F avec une ACP.

F2-5, F1-8, F2-8 et F3-8 qui sont les batchs les plus concentrées en propionate (5 et 8 g/L) ont des coordonnées positives élevées sur l'axe 1. A l'inverse les contrôles (Ctrl) qui sont les batchs sans propionate (0 g/L) coordonnées négatives à l'axe 1. La concentration en propionate est corrélée à l'axe 1. Les clusters 1, 17 et 7 (*Syntrophobacter*, *Methanospirillum* et *Methanosaeta*) contribuent fortement à l'axe 1. A l'inverse, le Cluster_5 (*Methanosarcina*) est corrélé négativement avec l'axe 1. Par conséquent, l'abondance en *Syntrophobacter*, *Methanospirillum* et *Methanosaeta* est corrélée à une concentration en propionate élevée. D'autre part, l'abondance de *Methanosarcina* est corrélée à une concentration en propionate faible. Au regard des résultats d'isotopie et de séquençage, on peut voir que le changement de méthanogénèse (Figure 19) est corrélé à l'augmentation de l'abondance de *Methanosaeta* qui est une archée méthanogène acétoclaste obligatoire.

3.2. Batches « dilution-stimulation »

La concentration à 1 g/L est par conséquent utilisée pour réaliser les batches « dilution – stimulation ». Le but de cette étape est l'obtention d'un consortium microbien simplifié et stable capable de dégrader efficacement le propionate. Pour y parvenir, plusieurs dilutions ont été effectuées sur l'inoculum. Cependant les batches avec les dilutions les plus fortes : H, I, J, K et L (Tableau 4) n'ont pas obtenu des résultats satisfaisant. En effet, uniquement la 1^{ère} génération produit du gaz à partir du propionate pour les batches H, I et J et pour les batches K et L uniquement la 1^{ère} et la 2^{ème} génération. Ainsi, ces batches comprennent uniquement 2 ou 3 générations, ce qui n'est pas suffisant pour garantir une « dilution – stimulation » des batches : ces batches ne seront pas présentés.

Néanmoins, la méthode de « dilution – stimulation » effectuée sur le batch M a bien fonctionné. Au total, ce sont 5 générations qui produisent du gaz, les résultats obtenus sur le batch M sont prometteurs contrairement aux autres. Ce sont les résultats du batch M qui seront analysés.

3.2.1. Analyse de la production de gaz

La production de gaz ainsi que les vitesses de production pour le batch M n'est pas reproductible entre les triplicats (surtout en comparaison avec les batches « enrichissement »). Cela s'explique par des problèmes d'étanchéité au niveau des septa. Toutefois, on aperçoit une tendance au niveau de la production maximale de biogaz. Le batch M produit à chaque injection environ 270 à 310 mL (sans prendre compte M-G5) de biogaz par gramme de propionate (Figure 25). Or le batch M devrait produire le double : 500 à 600 mL de biogaz par gramme de propionate. Cette faible production de gaz engendre des rendements moyens en méthane de 20%.

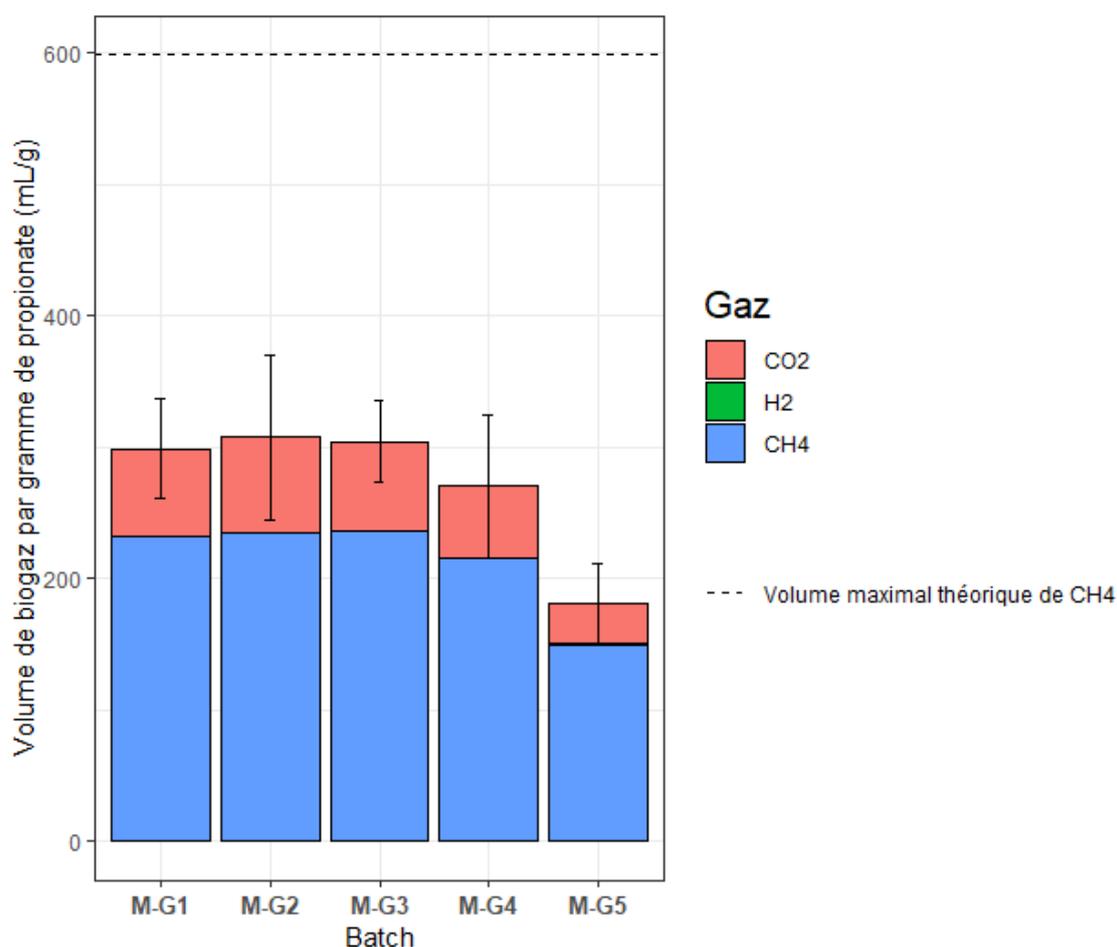


Figure 25 : Volume des gaz produits (CH₄, CO₂ et H₂) pour le batch M.

Cette différence de production peut s'expliquer par un ratio inoculum / substrat trop faible en comparaison aux batchs « enrichissement » dans lesquels les quantités d'inoculum étaient plus importantes et non limitantes à 1 g/L de propionate. Cela expliquerait la difficulté pour les micro-organismes à dégrader le substrat.

On peut observer que le volume maximal produit est légèrement inférieur pour M-G5 (180 mL de biogaz par gramme de propionate) comparé aux générations précédentes (300 mL de biogaz par gramme de propionate). Cela peut s'expliquer par une dilution trop importante du consortium.

Les proportions de gaz obtenus pour le batch M sont de 77,8 % de méthane, 22,12 % de dioxyde de carbone et 0,08% de dihydrogène (Figure 25). Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus pour les batchs « enrichissements ».

3.2.2. Analyse isotopique

Les résultats de l'analyse isotopique nous montrent que le batch M-G4 emprunte une méthanogénèse acétoclastique. Il semblerait que les batchs M-G2 et M-G3 n'empruntent pas de voies préférentielles et que M-G1 utilise la voie acétoclastique mais le risque d'erreur est important (écart-types importants) (Figure 26). Il est par conséquent difficile de tirer une conclusion quant à la voie empruntée.

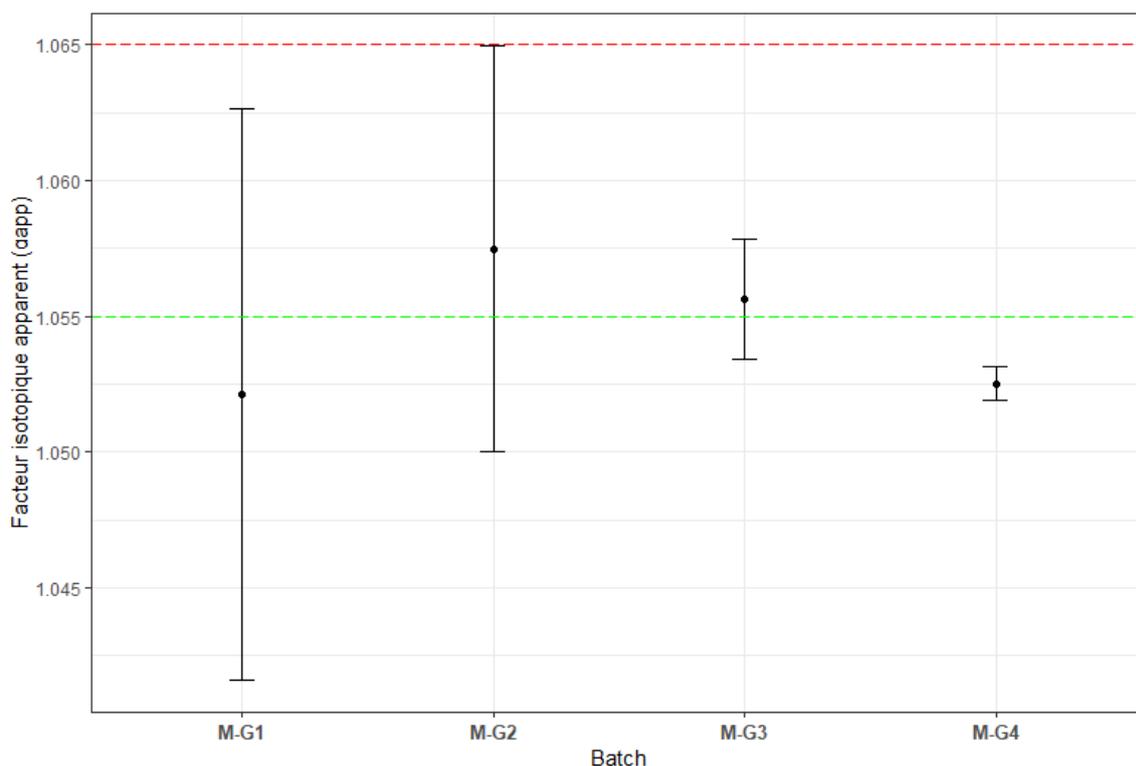


Figure 26 : Facteur isotopique apparent (α_{app}) du batch M.

3.2.3. Evolution de la population (densité optique)

S'intéresser à la densité optique (DO) ne permet pas de déterminer précisément la concentration des micro-organismes dans les batchs en revanche cela indique l'évolution de la croissance du consortium (décroissance, croissance ou stagnation) entre deux générations. En effet, en comparant la différence de DO au début et à la fin d'une génération du batch M, on peut déterminer l'évolution de la croissance des micro-organismes.

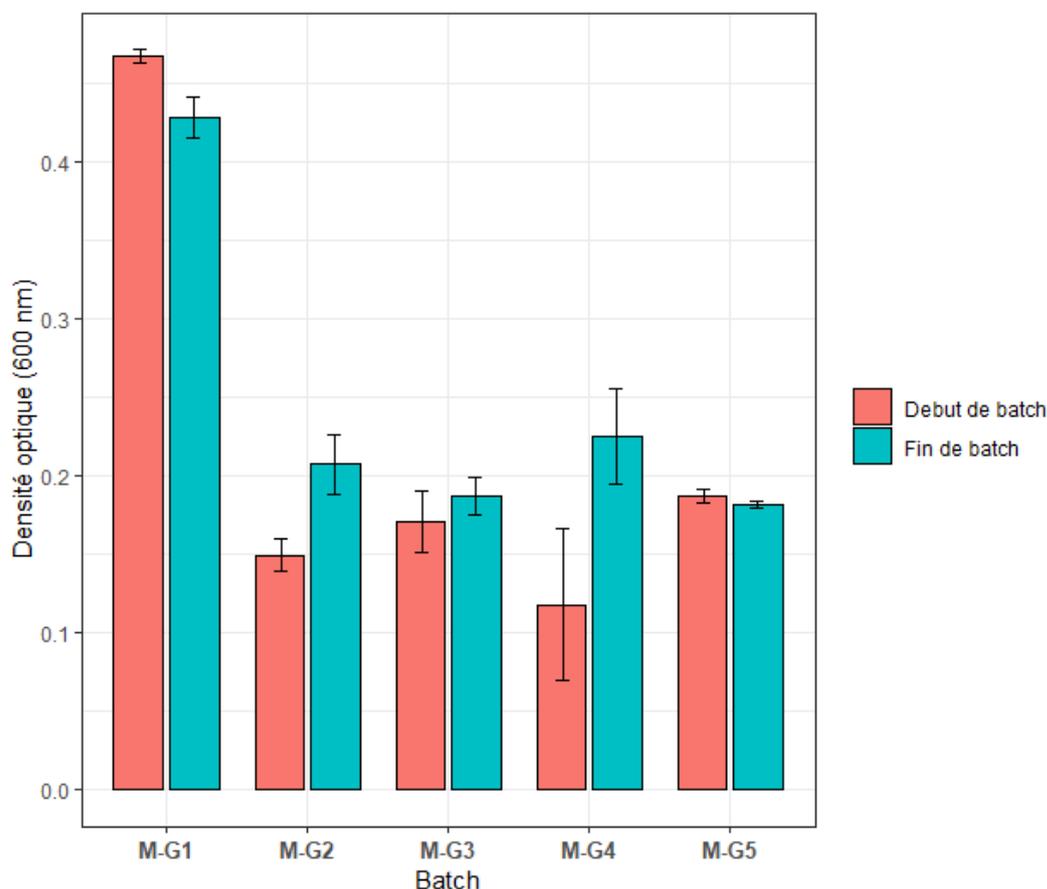


Figure 27 : Densité optique moyenne (600 nm) du batch M au début et à la fin du batch de chaque génération.

La DO moyenne globale est proche de 0,2, la concentration en micro-organisme reste la même au cours des générations. La DO moyenne d'environ 0,45 du batch M-G1 est due à la turbidité importante du milieu durant la 1^{ère} génération.

La croissance est positive pour chaque génération (Figure 27). Toutefois, on remarque qu'à la 1^{ère} génération (M-G1), le consortium connaît une décroissance. Cela s'explique très probablement par un arrêt du batch trop tardif. En effet, le temps entre le dernier basculement de clapet du compteur à gaz et l'arrêt du batch M-G1 est de presque 13 jours contre 7 jours en moyenne pour les autres générations du batch M. Pendant 13 jours le consortium n'a pas produit de gaz et par conséquent n'a pas consommé de propionate. Ainsi, il est très probable que pendant ce laps de temps une autophagie s'est mise en place et / ou une mort cellulaire a pu avoir lieu.

La croissance de la population de micro-organismes est positive jusqu'à la 5^{ème} génération où la croissance de la population commence à stagner. Cette stagnation est due à un ratio inoculum / substrat trop faible à cause de dilutions successives.

3.2.4. Analyse des AGV

Les concentrations obtenues des AGV permettent d'avoir une estimation de l'état de fonctionnement global d'un batch.

On remarque des tendances en ce qui concerne les concentrations en AGV.

Le valérate, le formate, le caproate et le butyrate ne sont pas détectés. Ces AGV ne sont normalement pas produits dans nos conditions expérimentales à partir du propionate.

On détecte des traces de propionate à une concentration inférieure à la limite de quantification pour M-G2, M-G3 et M-G4. On ne détecte pas de trace de propionate pour le batch M-G1. Il semblerait, par conséquent, que la totalité du propionate n'a pas été consommée. Cela confirme bien le fait que le ratio inoculum / substrat est faible : les micro-organismes en trop petit nombre dans les batchs ne peuvent pas dégrader l'intégralité du substrat.

L'acétate est l'AGV le plus présent au sein du batch M. On retrouve une concentration moyenne en acétate d'environ 15 mg/L. La présence d'acétate et de propionate résiduels dans les batchs sont le signe d'une dégradation incomplète de ces deux AGV. Le propionate n'a pas été totalement converti en acétate, qui lui-même n'a pas été totalement converti en gaz. Ceci peut donc expliquer la faible production de biogaz.

3.2.5. Séquençage

Il y a 85% de bactéries et 15% d'archées dans l'inoculum. Il y a un peu plus d'archées à la génération 1 (19% pour M2 et M3). On peut voir que l'abondance des archées a tendance à diminuer au cours des générations pour revenir autour des 15% à la génération 4 (Figure 28).

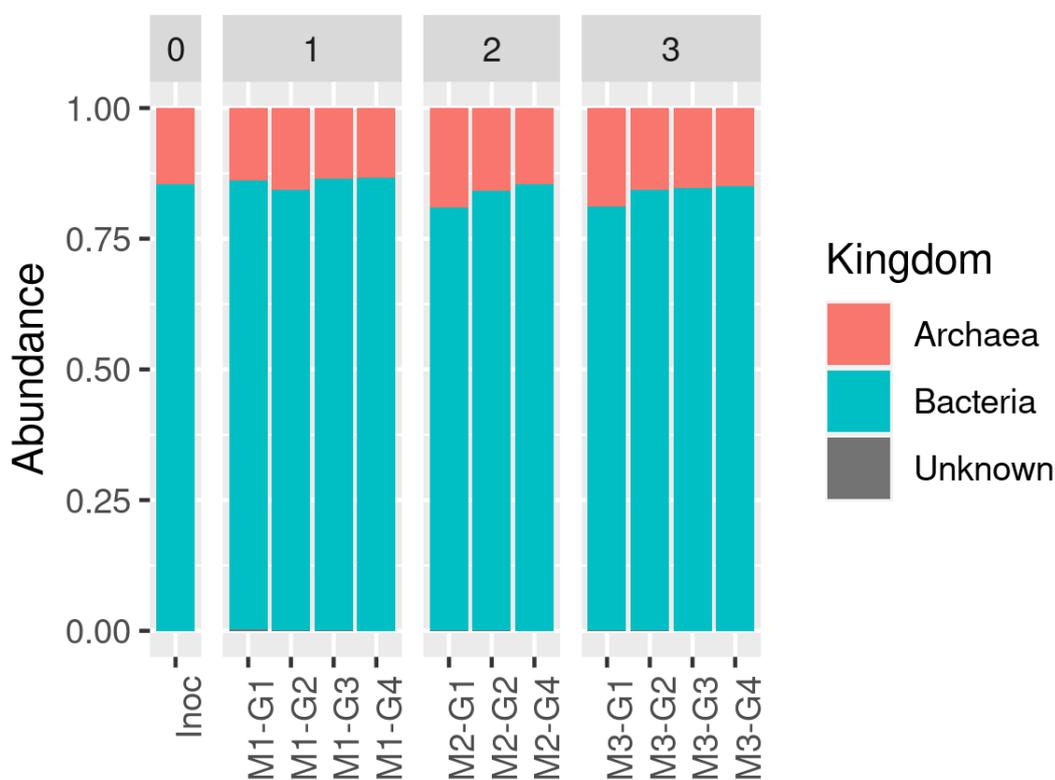


Figure 28 : Abondance relative des règnes pour le batch M.

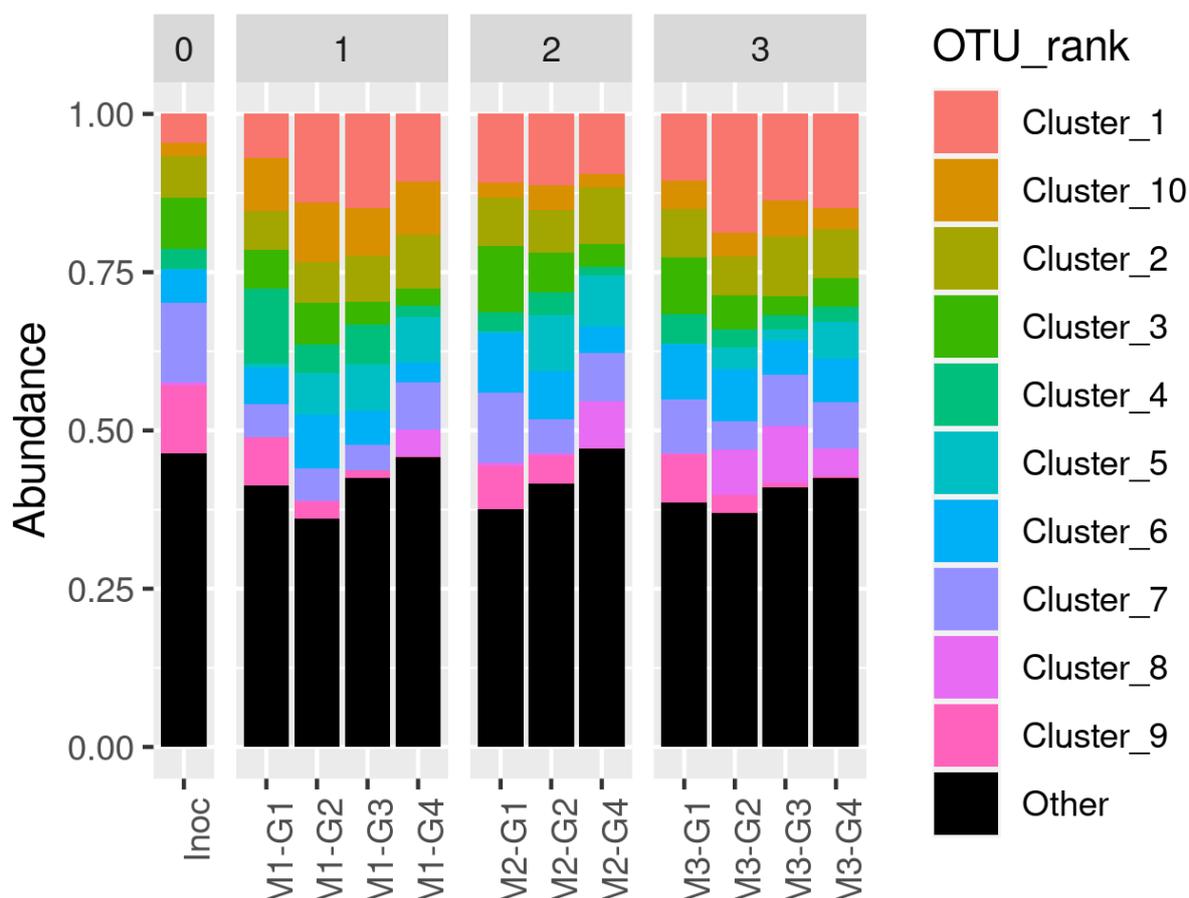


Figure 29 : Abondance relative des OTUs majoritaires pour le batch M.

Tableau 7 : OTUs majoritaires pour le batch M.

OTU	Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Cluster_1	Bactérie	<i>Desulfobactera</i>	<i>Syntrophobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophobacteraceae</i>	<i>Syntrophobacter</i>	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>
Cluster_10	Bactérie	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Lentimicrobiaceae</i>	<i>Lentimicrobium</i>	
Cluster_2	Archée	<i>Halobacterota</i>	<i>Methanosarcinia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanotheroxiphosgenii</i>
Cluster_3	Bactérie	<i>Thermotogota</i>	<i>Thermotogae</i>	<i>Kosmotogales</i>	<i>Kosmotogaceae</i>	<i>Mesotoga</i>	<i>Mesotoga infera</i>
Cluster_4	Bactérie	<i>Bacteroidota</i>	<i>Ignavibacteria</i>	<i>Ignavibacteriales</i>	PHOS-HE36		
Cluster_5	Bactérie	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechlorobacter</i>	
Cluster_6	Archée	<i>Halobacterota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>	
Cluster_7	Bactérie	<i>Synergistota</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>		
Cluster_8	Bactérie	Firmicutes	<i>Bacilli</i>	<i>Aneurinibacillales</i>	<i>Aneurinibacillaceae</i>	<i>Aneurinibacillus</i>	
Cluster_9	Bactérie	Firmicutes	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium sensu stricto</i>	1

On remarque que les 10 OTUs majoritaires représentent plus de 50% de l'abondance relative de la communauté microbienne totale (Figure 29).

Parmi eux, on retrouve la bactérie du genre *Syntrophobacter* (Cluster_1) et les archées méthanogènes du genre *Methanosaeta* (Cluster_2) et *Methanospirillum* (Cluster_6). Ces 3 genres peuvent représenter entre 16% (dans l'inoculum) et 33% (dans M2-G3) de la communauté microbienne. En revanche, *Methanosarcina* (Cluster_31), présent dans l'inoculum, tend à disparaître au cours des générations, contrairement à *Methanoculleus* (Cluster_67) qui semble se développer à la génération 4 (Figure 30). Ceci peut être corrélé au α apparent qui se situe entre 1,055 et 1,065, qui montre une méthanogénèse « mixte » (Figure 26), avec un équilibre entre *Methanosaeta* (acétylaclaste) et *Methanospirillum* (hydrogénotrophe).

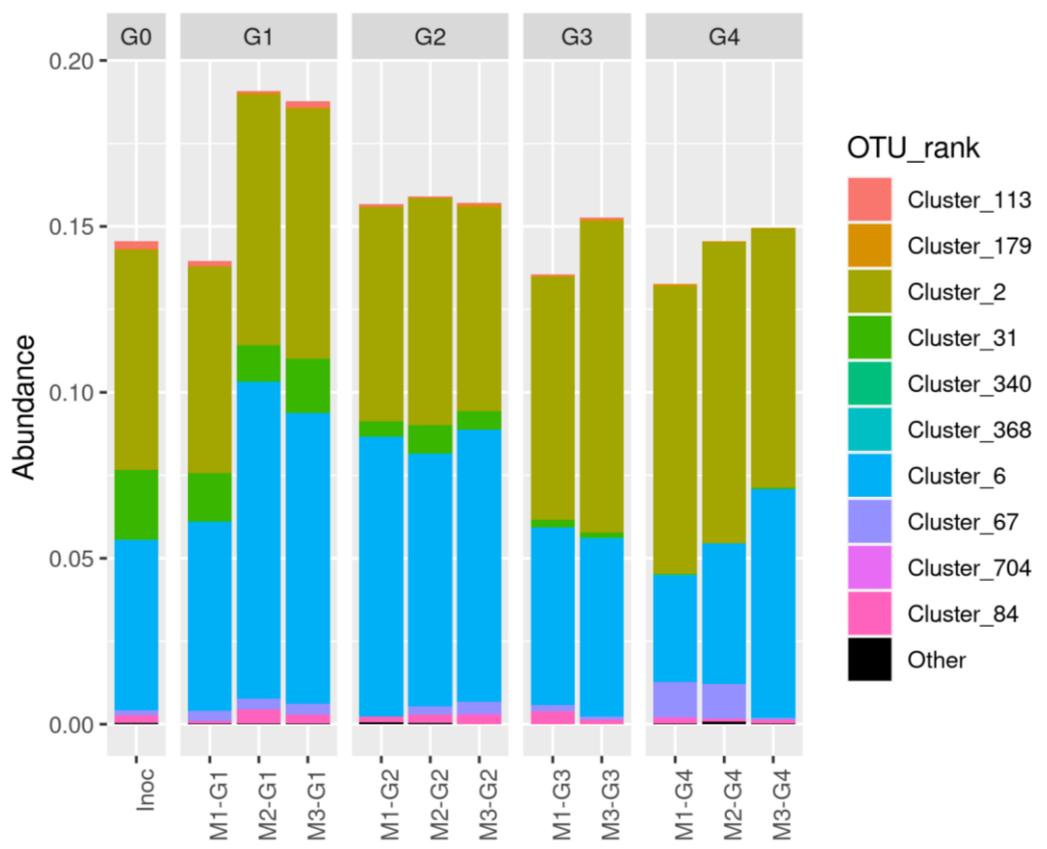


Figure 30 : Abondance relative des OTUs d'archées majoritaires pour le batch M.

On peut voir que la diversité alpha (richesse) diminue au cours des générations, signe d'une simplification de la communauté (Figure 31). Les générations successives permettent de s'affranchir des OTUs minoritaires afin de simplifier le consortium

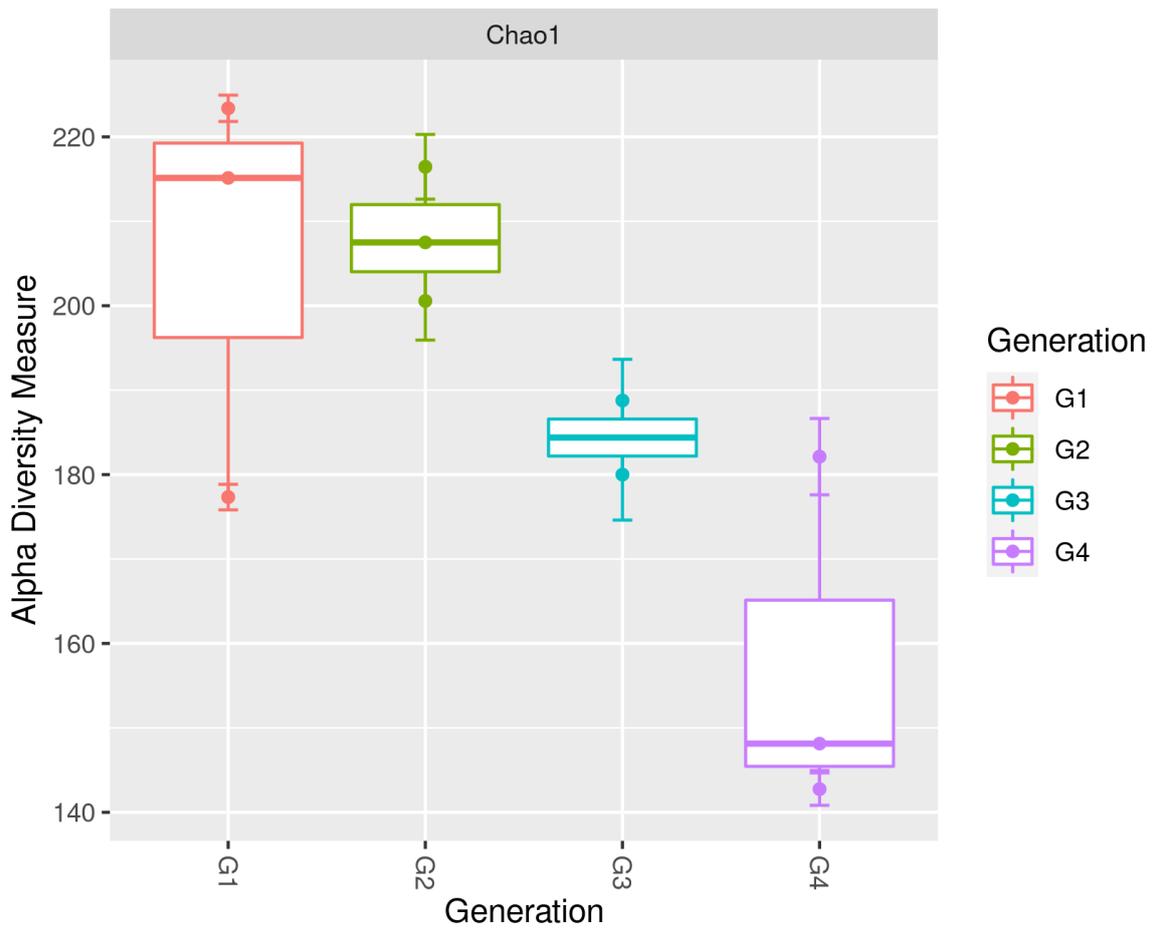


Figure 31 : Diversité alpha du batch M.

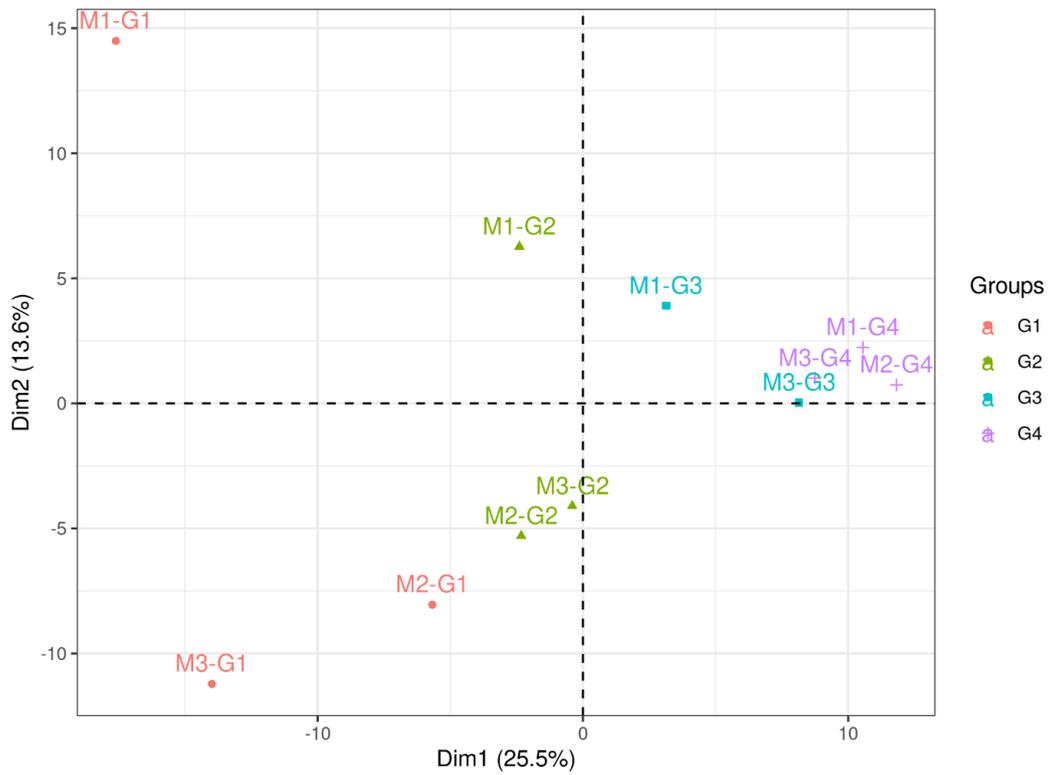


Figure 32: ACP de la composition en OTU des générations du batch M.

Sur l'ACP (Figure 32), les axes 1 et 2 expliquent presque 40% de la variabilité totale (25.5% et 13.6% respectivement). Les échantillons de chaque génération sont bien séparés pour G1, G2 et G3, alors qu'ils sont plus regroupés entre G3 et G4. On peut également constater un déplacement des générations le long de l'axe 1. Ainsi il semble y avoir une corrélation positive entre la diversité des échantillon et l'axe 1. En effet, les échantillons issus des génération 3 et 4 ont des indices de diversité faible et des valeurs de projection sur l'axe 1 élevée. Cela confirme les résultats obtenus pour la diversité alpha : les générations successives permettent de simplifier le consortium.

Conclusion

La dégradation de molécules complexes en méthane peut être perturbée par un grand nombre de facteurs dont l'accumulation de propionate. Il est donc nécessaire de comprendre de manière approfondie les mécanismes biologiques qui régissent la dégradation du propionate en méthane. Le propionate est un intermédiaire clef dans la digestion anaérobie : une grande partie de la méthanogenèse totale est réalisable uniquement via l'oxydation du propionate cependant cette réaction est énergétiquement défavorable.

C'est pourquoi, les travaux menés durant ce stage avaient pour premier objectif d'enrichir et d'identifier les microorganismes responsables de la dégradation du propionate et de sa conversion en méthane à partir d'un inoculum d'un digesteur anaérobie alimenté avec des déchets de cantine. Des premiers essais d'enrichissement ont été réalisés avec différentes concentrations en propionate. Il semble que la concentration à 1 g/L soit la plus optimale (taux de production, volume maximal, rendement). Nous avons pu enrichir les bactéries du genre *Syntrophobacter* connu pour son rôle dans l'oxydation syntrophique du propionate. Plus la concentration en propionate est élevée et plus l'abondance relative de cette bactérie est importante. D'autre part, on a pu également enrichir et identifier les archées méthanogènes (*Methanospirillum* et *Methanosaeta*).

Le second objectif était de réussir à simplifier un consortium complexe dégradant le propionate par dilution-stimulation, tout en restant efficace. L'étape de « dilution-stimulation » a montré quelques limites notamment en ce qui concerne le ratio inoculum / substrat qui était faible pour le batch avec un taux de dilution de 25% et probablement beaucoup trop pour les autres. Néanmoins, l'objectif général est rempli : la méthode de « dilution-stimulation » a permis de simplifier la population, de sorte à obtenir un consortium simplifié et dégradant le propionate mais pas aussi performant qu'attendu.

Nous avons pu donc répondre en partie à la question qui était posée. Ces résultats sont encourageants et d'autres pistes d'investigations peuvent être envisagées.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives de recherche comme par exemple réaliser des prélèvements gazeux et liquides au cours d'un batch afin d'avoir un suivi en continu de l'évolution des paramètres physico-chimiques et de la communauté microbienne dans le but étant de pouvoir déceler d'éventuels changements de métabolisme, ou de shift de la communauté. De plus, il serait intéressant, pour les batchs « dilution-stimulation », de réaliser des dilutions d'inoculum moins fortes, afin d'avoir un ratio inoculum substrat optimal pour atteindre les performances attendues.

Afin d'établir un lien entre fonction et identité des microorganismes, des techniques de marquage isotopique (SIP, Stable Isotope Probing) peuvent être utilisées pour étudier plus en profondeur les relations trophiques. Certains atomes de carbone du propionate sont substitués par leurs isotopes stables (^{13}C) : on obtient alors une molécule dite marquée. On suit alors le devenir de ce carbone marqué dans le gaz produit, et dans la biomasse qui dégrade le propionate.

Il pourrait être intéressant d'utiliser des consortia d'origines différentes, de les comparer, et pourquoi pas les mélanger afin d'améliorer les performances des incubations. Travailler en CSTR (Continuously Stirred Tank Reactor, réacteur mélangé en continu) et non plus en batch, pourrait également être une piste à envisager.

Bibliographie

Ahring BK, Sandberg M, Angelidaki I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 559–565, 1995. doi: [10.1007/BF00218466](https://doi.org/10.1007/BF00218466).

Angelidaki I, Ellegaard L, Ahring BK. A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: Focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 159–166, 1993. doi: [10.1002/bit.260420203](https://doi.org/10.1002/bit.260420203).

Angelidaki I, Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3: 117–129, 2004. doi: [10.1007/s11157-004-2502-3](https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3).

Appels L, Baeyens J, Degève J, Dewil R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 755–781, 2008. doi: [10.1016/j.pecs.2008.06.002](https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002).

Astals S, Batstone DJ, Mata-Alvarez J, Jensen PD. Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes. *Bioresource Technology* 169: 421–427, 2014. doi: [10.1016/j.biortech.2014.07.024](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.024).

Batstone DJ, Keller J, Angelidaki I, Kalyuzhnyi SV, Pavlostathis SG, Rozzi A, Sanders WTM, Siegrist H, Vavilin VA. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Sci Technol* 45: 65–73, 2002.

Bernet N. Principes et application de la digestion anaérobie pour la production d'énergie. 2015.

Caposciutti G, Baccioli A, Ferrari L, Desideri U. Biogas from Anaerobic Digestion: Power Generation or Biomethane Production? *Energies* 13: 743, 2020. doi: [10.3390/en13030743](https://doi.org/10.3390/en13030743).

Capson-Tojo G, Ruiz D, Rouez M, Crest M, Steyer J-P, Bernet N, Delgenès J-P, Escudié R. Accumulation of propionic acid during consecutive batch anaerobic digestion of commercial food waste. *Bioresource Technology* 245: 724–733, 2017. doi: [10.1016/j.biortech.2017.08.149](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.149).

Chapleur O, Poirier S, Guenne A, Lê Cao K-A. Time-course analysis of metabolomic and microbial responses in anaerobic digesters exposed to ammonia. *Chemosphere* 283: 131309, 2021. doi: [10.1016/j.chemosphere.2021.131309](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131309).

Chen S, Liu X, Dong X. Syntrophobacter sulfatireducens sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1319–1324, 2005. doi: [10.1099/ijs.0.63565-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63565-0).

Cirne DG, Paloumet X, Björnsson L, Alves MM, Mattiasson B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. *Renewable Energy* 32: 965–975, 2007. doi: [10.1016/j.renene.2006.04.003](https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.04.003).

Conrad R. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. *Organic Geochemistry* 36: 739–752, 2005. doi: [10.1016/j.orggeochem.2004.09.006](https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.09.006).

- Cooney M, Maynard N, Cannizzaro C, Benemann J.** Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen–methane mixtures. *Bioresource Technology* 98: 2641–2651, 2007. doi: [10.1016/j.biortech.2006.09.054](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.054).
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G.** FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34: 1287–1294, 2018. doi: [10.1093/bioinformatics/btx791](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791).
- Felchner-Zwirello M, Winter J, Gallert C.** Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 9193–9205, 2013. doi: [10.1007/s00253-012-4616-9](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4616-9).
- Gallert C, Winter J.** Propionic acid accumulation and degradation during restart of a full-scale anaerobic biowaste digester. *Bioresource Technology* 99: 170–178, 2008. doi: [10.1016/j.biortech.2006.11.014](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.014).
- Gopalakrishnappa C, Gowda K, Prabhakara KH, Kuehn S.** An ensemble approach to the structure-function problem in microbial communities. *iScience* 25: 103761, 2022. doi: [10.1016/j.isci.2022.103761](https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103761).
- Guo B, Zhang Y, Yu N, Liu Y.** Impacts of conductive materials on microbial community during syntrophic propionate oxidization for biomethane recovery. *Water Environment Research* 93: 84–93, 2021. doi: [10.1002/wer.1357](https://doi.org/10.1002/wer.1357).
- Ito T, Yoshiguchi K, Ariesyady HD, Okabe S.** Identification and quantification of key microbial trophic groups of methanogenic glucose degradation in an anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology* 123: 599–607, 2012. doi: [10.1016/j.biortech.2012.07.108](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.108).
- Jimenez J, Latrille E, Harmand J, Robles A, Ferrer J, Gaida D, Wolf C, Mairet F, Bernard O, Alcaraz-Gonzalez V, Mendez-Acosta H, Zitomer D, Totzke D, Spanjers H, Jacobi F, Guwy A, Dinsdale R, Premier G, Mazhegrane S, Ruiz-Filippi G, Seco A, Ribeiro T, Pauss A, Steyer J-P.** Instrumentation and control of anaerobic digestion processes: a review and some research challenges. *Rev Environ Sci Biotechnol* 14: 615–648, 2015. doi: [10.1007/s11157-015-9382-6](https://doi.org/10.1007/s11157-015-9382-6).
- Jin Y, Jiao S, Dolfing J, Lu Y.** Thermodynamics shapes the biogeography of propionate-oxidizing syntrophs in paddy field soils. *Environmental Microbiology Reports* 13: 684–695, 2021. doi: [10.1111/1758-2229.12981](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12981).
- Karakurt I, Aydin G, Aydiner K.** Sources and mitigation of methane emissions by sectors: A critical review. *Renewable Energy* 39: 40–48, 2012. doi: [10.1016/j.renene.2011.09.006](https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.09.006).
- Kendall MM, Liu Y, Boone DR.** Butyrate- and propionate-degrading syntrophs from permanently cold marine sediments in Skan Bay, Alaska, and description of *Algorimarina butyrica* gen. nov. al, sp. nov. *FEMS Microbiology Letters* 262: 107–114, 2006. doi: [10.1111/j.1574-6968.2006.00380.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00380.x).
- Khafipour A, Jordaan EM, Flores-Orozco D, Khafipour E, Levin DB, Sparling R, Cicek N.** Response of Microbial Community to Induced Failure of Anaerobic Digesters Through Overloading With Propionic Acid Followed by Process Recovery [Online]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8, 2020. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.604838> [2 Mar. 2023].

- Li D, Meng X, Sun Y, Li X, Liu X, Xie Z, Cao Q.** The microbial and functional reconstruction of instable syntrophic propionate-oxidizing methanogenesis by system recovering and injection modes changing. *Chemical Engineering Journal* 455: 140736, 2023. doi: [10.1016/j.cej.2022.140736](https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140736).
- Li Y, Wang C, Xu X, Sun Y, Xing T.** Bioaugmentation with a propionate-degrading methanogenic culture to improve methane production from chicken manure. *Bioresource Technology* 346: 126607, 2022. doi: [10.1016/j.biortech.2021.126607](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126607).
- M. Nguyen H, Hung Pham G, Ran R, Vagnoni R, Pareek V, Liu S.** Dry reforming of methane over Co–Mo/Al₂O₃ catalyst under low microwave power irradiation. *Catalysis Science & Technology* 8: 5315–5324, 2018. doi: [10.1039/C8CY01601A](https://doi.org/10.1039/C8CY01601A).
- Mcinerney M, Stams A, Boone D.** Syntrophobacter Boone and Bryant 1984, 355 VP (Effective publication: Boone and Bryant 1980, 631).
- Moletta R, Arnaud T, Berger S.** *La méthanisation (2e ed.)*. Lavoisier, 2015.
- Montero B, Garcia-Morales JL, Sales D, Solera R.** Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 99: 3233–3243, 2008. doi: [10.1016/j.biortech.2007.05.063](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.063).
- Mu L, Wang Y, Xu F, Li J, Tao J, Sun Y, Song Y, Duan Z, Li S, Chen G.** Emerging Strategies for Enhancing Propionate Conversion in Anaerobic Digestion: A Review. *Molecules* 28: 3883, 2023. doi: [10.3390/molecules28093883](https://doi.org/10.3390/molecules28093883).
- Oh S-E, Van Ginkel S, Logan BE.** The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. *Environ Sci Technol* 37: 5186–5190, 2003. doi: [10.1021/es034291y](https://doi.org/10.1021/es034291y).
- Park S, Ji Y, Park H, Lee K, Park H, Beck BR, Shin H, Holzappel W.** Park et al., 2016 Evaluation of functional properties of lactobacillus isolated from Korean white kimchi. 2016.
- Parkin GF, Owen WF.** Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges. *Journal of Environmental Engineering* 112: 867–920, 1986. doi: [10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1986\)112:5\(867\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1986)112:5(867)).
- Poirier S.** Inhibitions de la digestion anaérobie : dynamiques écologiques, indicateurs microbiens et stratégies de résistance. Cas du phénol et de l'azote ammoniacal. 2016.
- Saha S, Basak B, Hwang J-H, Salama E-S, Chatterjee PK, Jeon B-H.** Microbial Symbiosis: A Network towards Biomethanation. *Trends in Microbiology* 28: 968–984, 2020. doi: [10.1016/j.tim.2020.03.012](https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.012).
- Schauer-Gimenez AE, Zitomer DH, Maki JS, Struble CA.** Bioaugmentation for improved recovery of anaerobic digesters after toxicant exposure. *Water Research* 44: 3555–3564, 2010. doi: [10.1016/j.watres.2010.03.037](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.037).
- Siriwongrungson V, Zeng RJ, Angelidaki I.** Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water Res* 41: 4204–4210, 2007. doi: [10.1016/j.watres.2007.05.037](https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.037).
- Van Lier JB, Grolle KC, Frijters CT, Stams AJ, Lettinga G.** Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and

- defined cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1003–1011, 1993. doi: [10.1128/aem.59.4.1003-1011.1993](https://doi.org/10.1128/aem.59.4.1003-1011.1993).
- Ventorino V, Faraco V, Romano I, Pepe O.** Responses of bacterial community structure and diversity to soil eco-friendly bioremediation treatments of two multi-contaminated fields.
- Wang B, Nges IA, Nistor M, Liu J.** Determination of methane yield of cellulose using different experimental setups. *Water Sci Technol* 70: 599–604, 2014. doi: [10.2166/wst.2014.275](https://doi.org/10.2166/wst.2014.275).
- Wang Y, Zhang Y, Wang J, Meng L.** Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy* 33: 848–853, 2009. doi: [10.1016/j.biombioe.2009.01.007](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.007).
- Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL.** Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour Technol* 99: 7928–7940, 2008. doi: [10.1016/j.biortech.2008.02.044](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.044).
- Westerholm M, Castillo MDP, Chan Andersson A, Jahre Nilsen P, Schnürer A.** Effects of thermal hydrolytic pre-treatment on biogas process efficiency and microbial community structure in industrial- and laboratory-scale digesters. *Waste Manag* 95: 150–160, 2019. doi: [10.1016/j.wasman.2019.06.004](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.06.004).
- Westerholm M, Calusinska M, Dolfing J.** Syntrophic propionate-oxidizing bacteria in methanogenic systems. *FEMS Microbiol Rev* 46: fuab057, 2022. doi: [10.1093/femsre/fuab057](https://doi.org/10.1093/femsre/fuab057).
- Yadav M, Joshi C, Paritosh K, Thakur J, Pareek N, Masakapalli SK, Vivekanand V.** Organic waste conversion through anaerobic digestion: A critical insight into the metabolic pathways and microbial interactions. *Metabolic Engineering* 69: 323–337, 2022. doi: [10.1016/j.ymben.2021.11.014](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.11.014).
- Yang Y, Chen Q, Guo J, Hu Z.** Kinetics and methane gas yields of selected C1 to C5 organic acids in anaerobic digestion. *Water Research* 87: 112–118, 2015. doi: [10.1016/j.watres.2015.09.012](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.012).
- Yuan H, Zhu N.** Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58: 429–438, 2016. doi: [10.1016/j.rser.2015.12.261](https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.261).
- Zhang C, Yuan Q, Lu Y.** Inhibitory effects of ammonia on syntrophic propionate oxidation in anaerobic digester sludge. *Water Research* 146: 275–287, 2018. doi: [10.1016/j.watres.2018.09.046](https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.046).

Résumé

La digestion anaérobie est un processus par lequel un consortium de micro-organismes dégrade de la matière organique en l'absence d'oxygène pour la production de biogaz, notamment de méthane. De nos jours la production de méthane suscite un intérêt grandissant en tant qu'alternative aux combustibles fossiles pour produire de l'énergie avec une faible empreinte carbone. La digestion anaérobie se compose de 4 étapes interdépendantes les unes des autres : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse. Lors de l'acidogénèse, des Acides Gras Volatils, tel que le propionate, sont produits. C'est un intermédiaire important mais son accumulation est néfaste pour le système et par extension pour la production de méthane. De ce fait, la bio-augmentation via l'ajout d'un consortium bactérien dégradant le propionate dans un digesteur inhibé est une solution envisageable afin de permettre l'oxydation du propionate. Ainsi, l'objectif général de ce projet est d'obtenir un consortium microbien simplifié à partir de consortia complexes par une méthode dite de « dilution-stimulation ». Pour atteindre l'objectif général, il est nécessaire de passer par plusieurs étapes afin d'obtenir un consortium simplifié et stable dégradant le propionate. Ces étapes sont le suivi de l'évolution de la composition en microorganismes, l'analyse des paramètres physico-chimiques et le choix d'une concentration optimale en propionate pour le système.

Mots clés : digestion anaérobie, propionate, syntrophie, méthane, AGV, dilution-stimulation

Summary

Anaerobic digestion is a process whereby a consortium of microorganisms degrade organic matter in the absence of oxygen to produce biogas, in particular methane. Today, methane production is attracting growing interest as an alternative to fossil fuels for producing energy with a low carbon footprint. Anaerobic digestion comprises 4 interdependent stages: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis. During acidogenesis, VFAs (Volatile Fatty Acids) such as propionate are produced. This is an important intermediate, but its accumulation is bad for the system and, by extension, for methane production. For this reason, bio-augmentation via the addition of a propionate-degrading bacterial consortium in a inhibited bioprocess, is a possible solution to enable propionate oxidation. The overall aim of this project is to obtain a simplified microbial consortium from complex consortia using a « dilution-stimulation » method. To achieve this general objective, it is necessary to go through several steps in order to obtain a simplified and stable propionate-degrading consortium. These steps include monitoring the evolution of microorganism composition, analysing physico-chemical parameters and selecting the optimum propionate concentration for the system.

Keywords: anaerobic digestion, propionate, syntrophy, methane, VFA, dilution-stimulation