



HAL
open science

Aptitude d'écosystèmes anaérobies industriels à produire du méthane à partir d'éthanol en conditions psychrophile, mésophile et thermophile

Jojo-Charlie Mabala

► **To cite this version:**

Jojo-Charlie Mabala. Aptitude d'écosystèmes anaérobies industriels à produire du méthane à partir d'éthanol en conditions psychrophile, mésophile et thermophile. Sciences du Vivant [q-bio]. Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier, 2012. Français. NNT : . tel-02803104

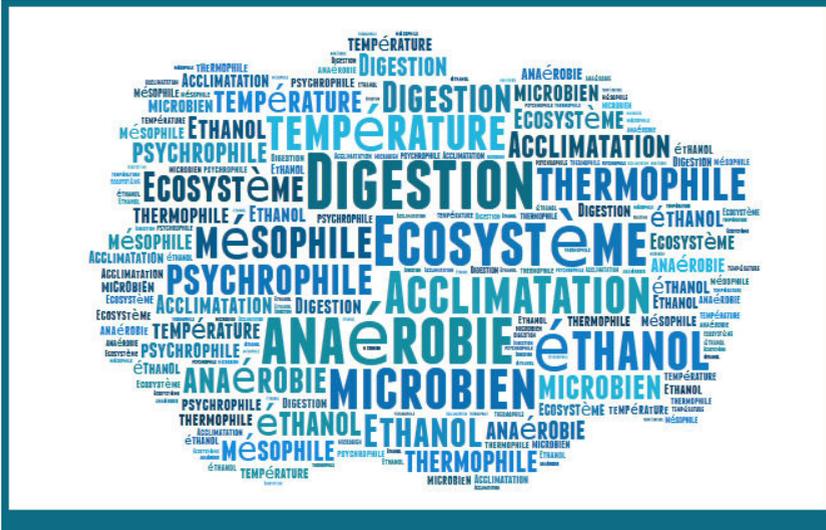
HAL Id: tel-02803104

<https://hal.inrae.fr/tel-02803104>

Submitted on 5 Jun 2020

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.



Ability of industrial anaerobic ecosystems to produce methane from ethanol in psychrophilic, mesophilic and thermophilic conditions

Aptitude d'écosystèmes anaérobies industriels à produire du méthane à partir d'éthanol en conditions psychrophile, mésophile et thermophile

Jojo Charlie MABALA

CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES
MONTPELLIER SUPAGRO

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES
AGRONOMIQUES

Discipline : Biotechnologie-Microbiologie

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés-Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

Jojo Charlie MABALA

le Mercredi 3 Octobre 2012

Titre :

***Aptitude d'écosystèmes anaérobies industriels à produire du méthane à partir
d'éthanol en conditions psychrophile, mésophile et thermophile***

JURY

M. Jean-Philippe DELGENES Directeur de Recherches, INRA Narbonne	Directeur de Thèse
M. Jérôme HAMELIN Chargé de Recherches, INRA Narbonne	Co-encadrant de Thèse
M. Joan MATA-ALVAREZ Professeur, Université de Barcelone (Espagne)	Rapporteur
M. Robert DURAN Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteur
M. Alain GRASMICK Professeur, Université de Montpellier II	Examineur

Aptitude d'écosystèmes anaérobies industriels à produire du méthane à partir d'éthanol en conditions psychrophile, mésophile et thermophile

Résumé

Le processus de dégradation anaérobie de la matière organique est un phénomène naturel largement répandu sur terre (ex. marais, lacs, rizières, systèmes digestifs d'animaux et humains). Une très grande diversité microbienne est entretenue durant ce processus, traduisant une diversité de voies métaboliques impliquées. Lorsqu'elle est complète, la digestion anaérobie aboutit à la formation de biogaz (mélange de méthane et de dioxyde de carbone). En termes de biotechnologie, le traitement par voie anaérobie de pollutions organiques permet de réduire le volume de déchets en générant du méthane valorisable sous plusieurs formes (électricité, chaleur, gaz naturel, biocarburant). Cependant, les digesteurs industriels sont optimisés pour un fonctionnement à 35°C ou à 55°C, ce qui nécessite un apport exogène d'énergie de maintenance. Ainsi, les travaux de thèse se sont intéressés à l'étude de la capacité d'adaptation de divers écosystèmes anaérobies industriels couvrant une variété de procédés et de conditions opératoires à convertir l'éthanol en biogaz à différentes températures. La première phase de l'étude avait pour but le conditionnement, en réacteurs de laboratoire, d'écosystèmes à leur température d'origine avec un substrat facilement biodégradable (éthanol). Ensuite, les performances des communautés microbiennes (potentiel méthanogène maximal et cinétique de dégradation) ont été estimées sur un gradient de température de 5°C à 55°C en fioles. La phase de conditionnement des écosystèmes en réacteur batch a montré que la production de biogaz avoisinait la production théorique et que cette production s'accompagnait d'une diminution de la durée de réaction avec ajout successif du substrat. De plus, les cinétiques de production de biogaz obtenues variaient fortement d'un écosystème à l'autre. Des profils d'empreintes moléculaires (CE-SSCP) des communautés bactériennes et archées ont été réalisés au début et à la fin du conditionnement. Ces profils de communauté ont été comparés entre eux par analyse en composante principale (ACP). Les populations bactériennes qui assuraient une performance efficiente étaient différentes de celles qui garantissaient une bonne capacité d'adaptation. Par ailleurs, le potentiel d'adaptation dépendait de la présence de populations d'archées méthanogènes bien spécifiques. En plaçant ensuite les écosystèmes conditionnés dans des conditions de température éloignées de la température d'origine, seuls les écosystèmes mésophiles se sont acclimatés aux températures psychrophiles. Comme attendu, l'activité spécifique maximale des méthanogènes était toujours obtenue à la température d'origine de l'écosystème. L'analyse des communautés bactériennes et archées à la fin de la période d'acclimatation a révélé que l'acclimatation des écosystèmes thermophiles et mésophiles à des températures plus faibles ne modifiait que légèrement la structure des communautés microbiennes. En revanche, des changements plus importants étaient obtenus lorsque la température d'incubation était augmentée par rapport à la température d'origine de l'écosystème. Finalement, l'étude de l'effet de la température d'incubation (de 5°C à 55°C) sur l'activité fermentaire et sur la structure des populations microbiennes est un bon modèle d'étude au laboratoire pour appréhender l'impact d'un facteur abiotique sur la dynamique structurelle et fonctionnelle d'une communauté microbienne complexe.

Abstract

The process of anaerobic degradation of organic matter is a natural phenomenon widespread in many ecosystems (eg, marshes, lakes, rice fields, digestive systems of animals and humans). A high microbial diversity is maintained during this process, reflecting a diversity of metabolic pathways involved. When complete, the anaerobic digestion results in the formation of biogas (mixture of methane and carbon dioxide). In terms of biotechnology,

anaerobic treatment of organic pollution reduces the volume of waste and generates energy as methane recoverable in several forms (electricity, heat, natural gas, biofuels). Industrial digesters are mostly operated at 35°C or 55°C which requires exogenous energy. The objective of the thesis is to study the adaptability of ecosystems sourced from anaerobic industrial scale reactors treating different range of wastes from different processes to convert ethanol into biogas at various temperatures. The first phase of the study was to adapt, in laboratory reactors ecosystems to their original temperature with a readily biodegradable substrate (ethanol). Then, the performances of microbial communities (the maximum methanogenic potential and degradation kinetics) were estimated on a temperature gradient from 5°C to 55°C in batch reactors. The adaptation phase of the ecosystems in lab-scale reactors showed that the biogas averaged theoretical production and this production was followed by a decrease in reaction time with successive addition of the substrate. In addition, the kinetics of the biogas obtained varied greatly from one ecosystem to another. Molecular fingerprinting profiles (CE-SSCP) of bacterial and archaeal communities were performed at the beginning and at the end of conditioning. These community profiles were compared with each other by principal component analysis (PCA). Bacterial populations that ensured efficient performance were different from those that ensured a good adaptability. In addition, the potential for adaptation depended on the presence of very specific methanogenic archaeal populations. When placing the adapted ecosystems in temperatures different from the original temperature, only mesophilic ecosystems adapted to psychrophilic temperatures. As expected, specific methanogenic activity was always obtained at the original temperature of the ecosystem. Analysis of bacterial and archaeal communities at the end of the acclimation period revealed that acclimation of thermophilic and mesophilic ecosystems to lower temperatures only modified slightly the structure of microbial communities. On the other hand, more significant changes were obtained when the incubation temperature was increased in comparison to the original temperature of the ecosystem. In summary, the study of the effect of incubation temperature (5°C to 55°C) on the fermentation activity and microbial population structure is a good model for laboratory study to understand the impact of abiotic factor on the structural and functional dynamics of a complex microbial community

Discipline: Biotechnologie- Microbiologie

MOTS-CLES : Acclimatation, méthanisation, cinétique, empreinte moléculaire, biodiversité, biogaz, digestion anaérobie, digestion anaérobie à basse température, écologie microbienne.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA, UR050, Avenue des Etangs, Narbonne F-11100, France

Remerciements

Enfin la lumière au bout du tunnel ! C'est la fin d'une belle aventure scientifique et humaine et cela n'aurait été possible sans la contribution de certaines personnes. Tout d'abord mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Jean-Philippe Delgenès pour la confiance accordée. Merci Philippe pour ton soutien indéfectible et de m'avoir ouvert les portes de la recherche. Merci à Jean-Philippe Steyer, Directeur du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne (LBE), de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ma thèse au sein du laboratoire et pour ton accueil chaleureux.

Je remercie l'ensemble du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci au Ministère gabonais de l'Enseignement Supérieur et à l'INRA pour le soutien financier. Merci à Jérôme pour les conseils avisés, pour ton amitié, pour ta disponibilité que ce soit dans le cadre de ce travail ou pour tous les problèmes du quotidien. J'ai beaucoup appris à tes côtés et j'ai encore grandi en tant qu'homme. Nicolas, Michel, Audrey, Anaïs et Philippe Sousbie je vous dois beaucoup, votre implication dans cette thèse a été un moteur pour moi.

A la grande famille du LBE, merci de m'avoir adopté. Merci à Florian, Benoit, Carlos pour les « barbecues de riches ». A mes collègues de bureau Yan, Lili, Amandine, Enrica, Maialen, Marianne. A tous les autres thésards, post-docs et stagiaires qui se sont succédés au LBE et qui ont contribué à cette belle aventure. Un Merci particulier à Sofiane, Micol, Florence, Mélanie, Xin Mei, Jean-Charles, Glenda,...

Merci à ma famille, Papa et Maman cette thèse est pour vous. Pour tous les efforts que vous avez consentis. Merci de m'avoir laissé partir si loin de vous et pour le soutien que vous n'avez cessé de me manifester. Merci à mes frères, à mes sœurs et à mes amis.

Merci à Gaby, mon rocher. Je sais que cela n'a pas toujours été facile pour toi surtout avec la naissance d'Alexanne. Merci pour ta patience et pour tout le bonheur que tu m'apportes.

Merci à Christian pour les appels téléphoniques tard le soir pour me remonter le moral. Merci pour ces 15 ans d'amitié!

Thanks Tochi for being my brother and bearing with me the burden of this work. I owe you a lot!

Remerciements

Merci à Jen, Jude et à toute ma famille d'Omaha au Nebraska.

A ma grand-mère Obatanga Antoinette

« Il n'est rien dont ne puisse triompher la persévérance. »

(Publius Syrus)

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Introduction générale.....	3
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	7
1.1. Les étapes de la digestion anaérobie.....	9
1.1.1. L'hydrolyse.....	10
1.1.2. L'acidogénèse.....	10
1.1.3. L'acétogénèse.....	10
1.1.4. La méthanogénèse.....	11
1.2. Méthodes d'étude des écosystèmes microbiens de la digestion anaérobie.....	12
1.3. Les conditions physico-chimiques de mise en œuvre de la digestion anaérobie.....	15
1.3.1. Le pH et l'alcalinité.....	15
1.3.2. La température.....	16
1.3.3. Le potentiel redox.....	17
1.3.4. Les nutriments.....	17
1.3.5. Les inhibiteurs de la digestion anaérobie.....	19
1.4. Procédés de digestion anaérobie et mode de fonctionnement.....	20
1.4.1. Traitement des résidus solides par voie humide.....	20
1.4.2. Traitement des résidus solides par voie sèche.....	23
1.4.3. Traitement des effluents liquides.....	24
1.5. La température et la méthanisation des effluents liquides et des résidus solides.....	26
1.5.1. Les effluents liquides.....	26
1.5.1.1. Les effluents urbains.....	26

Sommaire

1.5.1.2. Les effluents industriels	26
1.5.2. Les résidus solides	26
1.5.2.1. Les résidus agricoles et agro-alimentaires	26
1.5.2.2. Les boues d'assainissement.....	27
1.5.2.3. Les ordures ménagères	27
1.6. La digestion anaérobie à basse température	27
1.6.1. Psychrophiles, psychrotrophes, psychrotolérants : historique et définitions.....	27
1.6.2. Stratégie de l'adaptation à l'échelle de l'écosystème	29
1.6.3. Activités de méthanisation dans divers environnements	31
1.6.3.1. Ecosystèmes naturels.....	31
1.6.3.1.1. Les tourbières	31
1.6.3.1.2. Les sédiments des lacs d'eau douce et marins.....	32
1.6.3.1.3. Le permafrost.....	33
1.6.3.2. Environnements artificiels.....	34
1.6.3.2.1. Le lagunage anaérobie	34
1.6.3.2.2. Les réacteurs anaérobies	35
1.6.4. Les archées méthanogènes du froid	38
1.6.5. Mécanismes d'adaptation au froid des microorganismes au niveau cellulaire.....	38
1.6.5.1. Adaptation de la synthèse protéique.....	38
1.6.5.2. Maintien de la fluidité membranaire	39
1.6.5.3. Modification des mécanismes enzymatiques	40
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	45
2.1. Origines et caractéristiques des écosystèmes	47

Sommaire

2.2. Dispositifs expérimentaux	48
2.2.1. Les réacteurs de conditionnement.....	48
2.2.2. Les fioles d'adaptation à la température	49
2.3. Suivis et analyses physico-chimiques.....	51
2.3.1. Suivi et régulation des températures	51
2.3.2. Mesure du volume de biogaz	52
2.3.2.1 Compteur Ritter.....	52
2.3.2.2. Oxitop.....	53
2.3.3.2 Manomètre numérique	54
2.3.3. Détermination de la demande chimique en oxygène	55
2.3.4. Dosage des Acides Gras Volatiles (AGV).....	55
2.3.5. Dosage de l'éthanol.....	56
2.3.6. Détermination des matières sèches et des matières volatiles (MES, MVES, MS, MO).....	56
2.3.7. Détermination de la composition du biogaz (pourcentage de méthane).....	57
2.3.8. Définition de paramètres de calculs	58
2.3.8.1. Les charges organiques	58
2.3.8.2. Le rendement épuratoire en DCO	58
2.3.8.3 Activité spécifique des méthanogènes	59
2.4. Analyses moléculaires	59
2.4.1. Prélèvement et conservation des échantillons.....	59
2.4.2. Extraction et purification d'ADN génomique des échantillons	60
2.4.3. Amplification de la région variable V3 de l'ADN ribosomique 16S	60

Sommaire

2.4.4. Empreinte moléculaire par Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP).....	62
2.4.5. Analyses statistiques	62
2.4.6. Modélisation des données	63
Chapitre 3 : Potentiel de cinq écosystèmes anaérobies industriels à s’adapter à la production de biogaz à partir d'un substrat facilement biodégradable: caractérisation cinétique et microbienne	65
Abstract.....	69
3.1. Introduction	70
3.2. Materials and Methods	72
3.2.1. Origins of the ecosystems	72
3.2.2. Bioreactors operating conditions	73
3.2.3. Physico-chemical analyses.....	74
3.2.4. Molecular analyses.....	75
3.3. Results and discussion	76
3.3.1. Biogas production	76
3.3.2. Maximum biogas production rate	77
3.3.3. Metabolic adaptation potential.....	79
3.3.3.1. Bioreactor performances	79
3.3.3.2. Microbial population structures according to ecosystem pedigree	80
3.3.3.3. Microbial population structure according to fermentative performance.....	82
3.4. Conclusion	84
Post-discussion	85

Sommaire

Chapitre 4 : Acclimatation d'écosystèmes anaérobies industriels mésophiles et thermophiles à des températures comprises entre 5°C et 55°C.....	89
Abstract.....	94
4.1. Introduction	95
4.2. Materials and Methods	96
4.2.1. Inoculums sources.....	96
4.2.2. Biodegradation assays.....	97
4.2.2. Incubators and temperature monitoring	97
4.2.3. Physico-chemical analyses.....	98
4.2.4. Molecular analyses.....	99
4.2.5. Calculations	100
4.3. Results and discussion	100
4.3.1. Methane production	100
4.3.2. COD mass balance	101
4.3.3. Specific methanogenic activity	103
4.3.4. Microbial population changes according to the incubating temperatures.....	106
4.3.5. Microbial populations changes according to the inoculums performances	108
4.4. Conclusion	111
Post-discussion	112
Chapitre 5 : Conclusion générale et perspectives.....	121
Références bibliographiques	125
Annexes	151

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Evolution du nombre de publications (à gauche) et de citations (à droite) abordant la digestion anaérobie psychrophile. 4

Figure 1.1 : Schéma des quatre étapes du processus de la digestion anaérobie (à partir de Görish & Helm, 2008; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991). 9

Figure 1.2 : Evolution de l'énergie libre de Gibbs (ΔG^{*}) des réactions de conversion de l'éthanol, du propionate, du butyrate en acétate et de la production de méthane à partir de H_2/CO_2 en fonction de la pression partielle en hydrogène [propionate]=[butyrate]=[éthanol]=[acétate]= 1mM; $[HCO_3^-]$ = 100mM ; pression en CH_4 =0,5 atm 1,2 et 3 : acétogénèse du propionate , du butyrate et de l'éthanol, 4 et 5: méthanogénèse autotrophe (H_2 CO_2) et acétoclaste (Cresson, 2006) adapté de (Harper & Pohland, 1986). 12

Figure 1.3 : Méthodes moléculaires de caractérisation des écosystèmes complexes basées sur l'amplification par PCR des ADNr microbiens (Cresson, 2006). 14

Figure 1.4 : Les températures cardinales (minimum, maximum, optimum) (Madigan et al., 2009). 16

Figure 1.5 : Croissance relative des archées méthanogènes en fonction du régime de température (Lettinga et al., 2001). 17

Figure 1.6: Schéma du principe de la digestion humide des résidus solides (Buffière & Frédéric, 2008). 21

Figure 1.7 : Schéma du digesteur agité par pales centrales (Moletta, 2008). 22

Figure 1.8 : Schéma de principe d'agitation par introduction de biogaz à tubulure (Moletta, 2008). 22

Figure 1.9 : Principales technologies associées à la digestion anaérobie par voie sèche: (1) Technologie DRANCO (recirculation du digestat), (2) Technologie Valorga (recirculation du biogaz), (3) Technologie Kompas (agitation mécanique) (Buffière & Frédéric, 2008). 23

Figure 1.10 : Schéma des différentes générations de procédés d'épuration des effluents liquides (Moletta 2008). 24

Figure 1.11 : Influence de la température de culture sur la croissance d'une bactérie antarctique d' <i>Alteromonas haloplanctis</i> A23 (à gauche) et sur sa production α -amylase (à droite). Les cultures sont réalisées à 4°C (o), 18°C (■) et 25°C (▲) (Feller & Gerday, 1997; Sabri, 2001).	29
Figure 1.12 : Cycle du carbone et du méthane dans les tourbières (Juottonen et al., 2008)...	31
Figure 1.13 : Diagramme comparant les voies métaboliques de la méthanogénèse dans les sédiments des lacs d'eau douce et marins (Whiticar et al., 1986).....	33
Figure 1.14 : Zone de stabilité des hydrates de méthane dans le permafrost (Lambert et al., 2006).....	33
Figure 1.15 : Modèle conceptuel du cycle du carbone et de l'azote dans le permafrost après le dégel dans le sol Arctique (Mackelprang et al., 2011).....	34
Figure 1.16 : Principe de fonctionnement d'une lagune anaérobie (Frédéric & Lugardon, 2007).....	35
Figure 1.17 : Schéma des réacteurs UASB (à gauche) et EGSB (à droite) (Seghezzeo et al., 1998).....	37
Figure 1.18 : Configuration d'un système hybride de réacteur HUSB-UASB d'usine pilote (Álvarez et al., 2008). I: Alimentation, E: Effluent, G: biogaz, B: Pompe d'alimentation, IM: Débitmètre d'alimentation, GM: Débitmètre du biogaz.	37
Figure 2.1 : Dispositif expérimental pour les réacteurs de conditionnement.....	49
Figure 2.2 : Dispositif expérimental pour les cultures d'adaptation en fioles.....	49
Figure 2.3 : Postes d'incubation des fioles.....	51
Figure 2.4 : Exemple du suivi d'un inoculum incubé à 15°C.	52
Figure 2.5 : Compteur ritter.....	53
Figure 2.6 : Acquisition de données avec le système de mesure oxitop.	53
Figure 2.7 : Exemple de données obtenues avec un oxitop.....	54
Figure 2.8 : Acquisition des données avec le système manomètre numérique	55

Figure 2.9: Représentation schématique de la démarche globale pour la caractérisation et le suivi des populations microbiennes des écosystèmes.....	59
Figure 3.1: Chemical oxygen demand mass balance of the five inoculums placed at different temperatures ranging from 5°C to 55°C. The inoculums are ordered in the panel by the letters A to E. The metabolites are presented in the different colours set from black (ethanol) to white (methane).....	77
Figure 3.2: Adaptation of ecosystems based on the maximum specific biogas production rate over time. The ecosystems are indicated in the panel by the letters A to E in the following ..	78
Figure 3.3 : Comparative results of the potential for adaptation of the five ecosystems, based on the specific methanogenic activity rate. Only the initial batch (in grey) and the final batch (in black) are shown.	79
Figure 3.4 : Representative average of the CE-SSCP fingerprinting profiles for bacterial and archaeal communities at the end of the adaptation period. The ecosystems are indicated in the panel by the letters A to E in the following order: (A) <i>BGM</i> (B) <i>DVI</i> (C) <i>BSM</i> (D) <i>LVJ</i> and (E) <i>JDO</i>	80
Figure 3.5 : Genetic divergences between the five ecosystems from bacterial (a) and archaeal (b) CE-SSCP fingerprinting profiles according to the main features of the industrial reactors	82
Figure 3.6: Genetic divergences between the five ecosystems from bacterial (a) and archaeal (b) CE-SSCP fingerprinting profiles according to the performances obtained in bioreactors .	83
Figure 3.7: Evolution de la DCO en AGV (en bleu) et du pH (en rouge) pour les tourbes Pont-de-Martel.	86
Figure 3.8 : Evolution de la DCO en AGV (en bleu) et du pH (en rouge) pour les tourbes du lac Mannikarjv.....	87
Figure 4.1 : Chemical oxygen demand mass balance of the five inoculums placed at different temperatures ranging from 5°C to 55°C. The inoculums are ordered in the panel by the letters A to E. The intermediates compounds are presented	102

Figure 4.2 : Relative specific methanogenic activity of the five inoculums with respect to temperature. For each inoculum, the activity was estimated from the percentage at the temperature at which each inoculum had its maximum specific methanogenic activity. The inoculums are presented in the panel by the letters A to E in the following order (A) *BGM* (B) *DVI* (C) *BSM* (D) *LVJ* and (E) *JDO*. The experimental data are presented in the white open circles. The average values of the experimental data are in the black squares. Both experimental and average values were fitted to Rosso's Model. 105

Figure 4.3 : Genetic divergences of the five inoculums during acclimatation from bacterial and archaeal CE-SSCP fingerprinting profiles in relation to the inoculums temperature of origin. The values of the genetic divergences for each bottle for a given temperature are in the white open circle. The average genetic divergences for each temperature are in the full black circles. 107

Figure 4.4: Genetic divergences of the five inoculums from bacterial and archaeal CE-SSCP fingerprinting profiles based on the inoculums activity at maximum temperature. The values of the genetic divergences for each bottle for a given temperature are in the white open circle. The average genetic divergences for each temperature are in the full black circles. For each temperature, the activity was obtained from the percentage of maximum temperature. 109

Figure 4.5: Divergence of mesophilic (*BGM*, *DVI*, *LVJ*) and thermophilic (*BSM*, *JDO*) microbial communities' structure according to the incubation temperatures. The Euclidean distances of the mesophilic inoculums are represented in black and the thermophilic inoculums are represented in grey. 111

Figure 4.6: Niveau de diversité obtenu à partir des profils CE-SSCP en termes du nombre de pics bactéries (ligne en haut à gauche) et archées (ligne en haut à droite) et en termes d'indice de Simpson (ligne du bas à gauche et à droite) en fonction de la température. 117

Figure 4.7: Divergences génétiques des profils CE-SSCP des bactéries et archées des cinq écosystèmes aux températures expérimentales avec comme profils de référence ceux des écosystèmes d'origine à la fin de la phase d'acclimatation à l'éthanol. Les moyennes des divergences génétiques sont représentées par les cercles noirs. Les valeurs moyennes à la température de référence sont mises en évidence dans les cercles brisés 118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Rôle de certains oligo-éléments dans plusieurs enzymes associées à la digestion anaérobie (Fermoso et al., 2009). 19

Tableau 1.2: Performances de différents réacteurs hybrides utilisés en conditions psychrophiles (à partir d'Alvarez *et al.*, 2008)..... 30

Tableau 1.3: Pourcentage des différents acides gras présents dans les lipides totaux chez deux souches psychrophile et mésophile d'*Arthrobacter* (les températures de cultures sont respectivement de 2 °C et 25°C) (Sabri, 2001). 40

Tableau 1.4: Exemple d'enzymes psychrophiles dont la structure cristalline a été déterminée (à partir de Collins, 2008) 42

Tableau 1.5 : Paramètres d'activations pour l'activité de certaines enzymes psychrophiles et mésophiles (Feller, 2003) 43

Tableau 2.1 : Caractéristiques des écosystèmes microbiens étudiés..... 47

Tableau 2.2 : Composition et proportions des différentes solutions mères du milieu nutritif50

Tableau 2.3 : Composition et proportions de la solution tampon (volume totale 1L) 50

Tableau 2.4: Séquences and positions ciblées de l'ADNr 16S, des amorces pour PCR et CE-SSCP..... 60

Tableau 2.5: Constituants réactionnels utilisés pour la PCR-SSCP 61

Tableau 2.6 : Paramètres de la PCR..... 61

Table 3.1: Characteristics of the five industrial anaerobic reactors. TS = Total Solids, VS = Volatile Solids 72

Table 3.2: Operating conditions in the experimental reactors. Abbreviations as follows: SS, Suspended Solids, VSS, Volatile Suspended Solids, COD, Chemical Oxygen Demand, SCOD, Soluble Chemical Oxygen Demand. 73

Table 4.1 : Characteristics of the ethanol-adapted ecosystems used as inoculums 96

Table 4.2 : Summary of the significant results of the study 103

ABRÉVIATIONS

DCO ou COD	Demande Chimique en Oxygène
AGV ou VFA	Acides Gras Volatils
ARN ou RNA	Acide RiboNucléique
ADN ou DNA	Acide DésoxyriboNucléique
MO	Matière Organique
MS	Matière Sèche
MES	Matière En Suspension
MVS ou MVES	Matière Volatile en Suspension
MT	Matière Totale
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DGE	Denaturing Gel Electrophoresis
T-RFLP	Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
CE	Capillary Electrohoresis
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
PCR	Polymerase Chain Reaction
dNTP	2'-3'désoxynucléosides
qPCR	Quantitative PCR
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
ACP ou PCA	Analyse en Composante Principale
ANOVA	Analysis of variance
Mm³	Million mètre cube
UASB	Up-flow Anaerobic Sludge Blanket
EGSB	Expanded Granular Sludge Bed
CSTR	Completely Stirred Tank Reactor
CVA	Charge Volumique Appliquée
CMA	Charge Massique Appliquée
ISDND	Installation de Stockage de Déchets Non Dangereux
BMP	Biochemical Methane Potential
TSH ou HRT	Temps de Séjour Hydraulique
WWTP	Waste Water Treatment Plant
MB	Matière Brute
RUBISCO	Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase
LHD	Lactate Déshydrogénase
BGM	Boues Granulaires de Marseille
DVI	Digestat de Vinasse de Distillerie
LVJ	Lixiviat de Varennes-Jarcy
JDO	Jus de Digestat OWS
BSM	Boues STEP de Marseille

INTRODUCTION

Introduction générale

En 1776, Alessandro Volta isole le gaz méthane en s'intéressant au «gaz des marais». Le méthane issu des marais mais aussi des rizières, des déjections d'animaux et des sédiments marins est produit par la transformation de la matière organique fermentescible en absence d'oxygène par un consortium microbien (Moletta & Verstraete, 2008). Ce processus biologique naturel qui produit un mélange de gaz (biogaz) composé principalement de méthane (60 à 70%) et de gaz carbonique est appelé méthanisation ou digestion anaérobie. En tant que bioprocédé, la digestion anaérobie permet de recycler la matière organique résiduaire issue des industries agroalimentaires, des stations d'épuration, de l'agriculture, mais aussi des activités domestiques. La digestion anaérobie permet non seulement la réduction de la pollution de rejets organiques mais aussi la valorisation de la matière organique présente dans un contexte d'énergie renouvelable et de développement durable. Le digestat peut être utilisé comme amendement et comme engrais organique tandis que le méthane est une énergie verte valorisable sous diverses formes (électricité, chaleur, biocarburant, gaz naturel). Sur le plan quantitatif, l'intérêt du biogaz réside bien sûr dans l'étendue de son gisement. La masse pouvant être valorisée par digestion anaérobie est considérable. Selon un rapport de l'ADEME (ADEME, 2010), le cumul du secteur agricole et territorial, des ordures ménagères, des stations d'épuration urbaines et autres industries a produit près de 300 Mm³ de biogaz lors de l'année 2008. La moitié du biogaz produit provenait des stations d'épuration urbaines, grâce notamment à la station de Seine Aval qui représente un tiers du volume de biogaz produit dans ce secteur.

La terre est à une température moyenne de 15°C. La biosphère est en majorité constituée de micro-organismes psychrophiles capables de se développer à des températures en dessous de 5°C (Margesin & Miteva, 2011). Cependant, ces derniers n'ont pas souvent reçu l'attention qu'ils méritaient. Depuis peu, pour des raisons économiques (économie d'énergie) mais aussi pour des raisons environnementales liées au réchauffement climatique, la communauté scientifique a porté à ces micro-organismes une attention qui autrefois était négligeable. L'aspect biotechnologique des micro-organismes psychrophiles était plutôt axé sur leur application dans l'industrie pharmaceutique et l'industrie agroalimentaire. Cet intérêt est lié à leur meilleure activité enzymatique à basse température (en dessous de 15°C) en comparaison avec des micro-organismes mésophiles (25°C-40°C) et thermophiles (50°C-70°C). Ainsi, les psychrophiles sont une véritable alternative pour des réactions nécessitant moins d'énergie tout en étant plus économique par rapport à des enzymes traditionnelles plus

couteuses. La digestion anaérobie n'a pas dérogé à la règle comme l'illustre le nombre d'articles publiés (figure I.1) et référencés (figure I.2) sur le Web of Knowledge durant les 20 dernières années (Topic=(anaerobic digestion) and (psychroph* or (low temperature))).

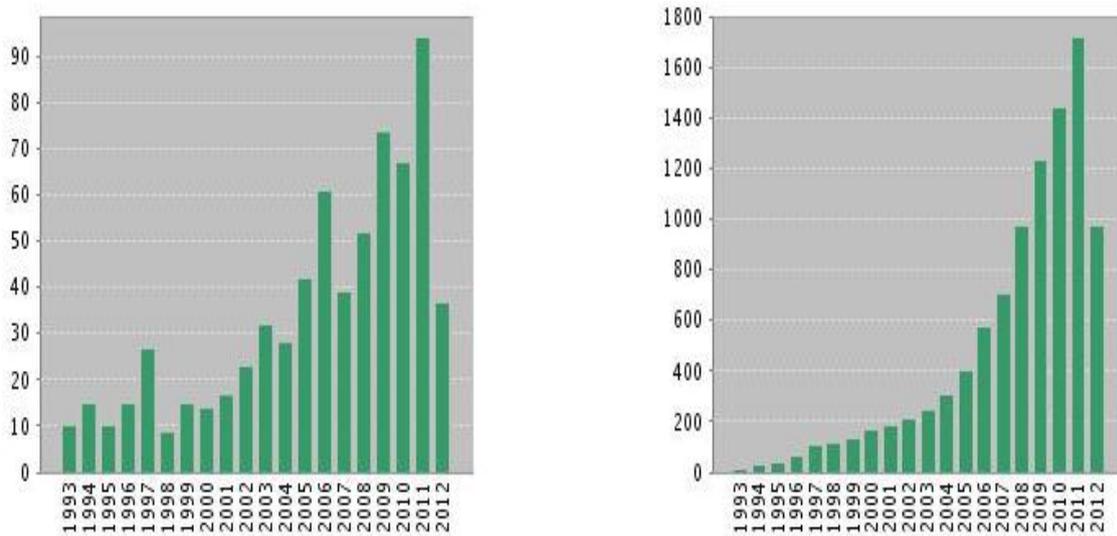


Figure I.1 : Evolution du nombre de publications (à gauche) et de citations (à droite) abordant la digestion anaérobie psychrophile.

Les travaux en psychrophilie concernent généralement le traitement des eaux usées. En effet, la majorité des effluents sont rejetés à basse température, ce qui pour le traitement actuel, nécessite un surplus d'énergie de maintenance pour les digesteurs dont l'optimisation est très souvent à 35°C voire 55°C. De plus, les archées psychrophiles représentent une fraction significative de la biomasse (Cavicchioli, 2006) et des réacteurs industriels en conditions psychrophiles ont déjà été installés avec succès (McKeown et al., 2009a; O'Reilly et al., 2009b).

Dans ce contexte, ce travail de thèse a pour objectifs de déterminer **le rôle de l'inoculum** sur la performance optimale de la digestion anaérobie et d'évaluer **le degré de spécialisation** des micro-organismes vis-à-vis de la température. Cette étude a également pour but de déterminer **la capacité d'acclimatation** des communautés microbiennes lorsque la température est éloignée de celle de l'origine de l'écosystème étudié. Ce travail doit ainsi permettre non seulement de comparer le suivi des assemblages microbiens de divers écosystèmes mais aussi de caractériser les communautés émanant de ces écosystèmes.

La thèse a été réalisée au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de l'INRA à Narbonne, grâce au soutien financier du Ministère gabonais de l'Education nationale et de l'Enseignement supérieur et de l'INRA.

La thèse est divisée en cinq chapitres:

Le chapitre 1 constitue une synthèse de l'état de l'art bibliographique sur les principes de la digestion anaérobie avec un accent particulier sur les effluents et les matrices solides. Ce chapitre contient aussi des données sur la digestion anaérobie à basse température et les mécanismes d'adaptation des consortia microbiens au froid. Les méthodes d'étude de consortia microbiens de digestion anaérobie y sont également présentées.

Le chapitre 2 fait le point sur les méthodes analytiques mises en œuvre et la méthodologie utilisée pour le suivi opérationnel des réacteurs, des fioles et les analyses moléculaires.

Les chapitres 3 et 4 sont présentés sous forme d'articles scientifiques.

Le chapitre 3 est une étude du potentiel d'adaptation à l'éthanol de divers écosystèmes anaérobies industriels. Dans un premier temps, la cinétique de production de méthane de ces écosystèmes en réacteurs batch a été évaluée. Dans un second temps, une caractérisation moléculaire des écosystèmes a été faite.

Le chapitre 4 analyse la capacité des écosystèmes à s'acclimater à des gradients de températures incluant tous les régimes de températures (psychrophile, mésophile et thermophile). Ensuite, le lien entre les performances fermentaires des écosystèmes (activité spécifique des méthanogènes), la température d'incubation et les changements génétiques des communautés bactériennes et archées a été étudié.

Le chapitre 5 fait la synthèse des résultats marquants de cette thèse et présentent les perspectives qui en découlent.

Enfin, le manuscrit est complété par deux annexes. La première décrit la méthodologie d'utilisation du système oxitop® de mesure de la biodégradabilité anaérobie par surpression. La deuxième annexe présente l'ensemble des cinétiques de biogaz produits par tous les écosystèmes inoculés à toutes les températures expérimentales testées.

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les étapes de la digestion anaérobie

La méthanisation est divisée en quatre étapes (figure 1.1) qui font intervenir différentes populations microbiennes qui se développent dans des conditions bien spécifiques (Görish & Helm, 2008).

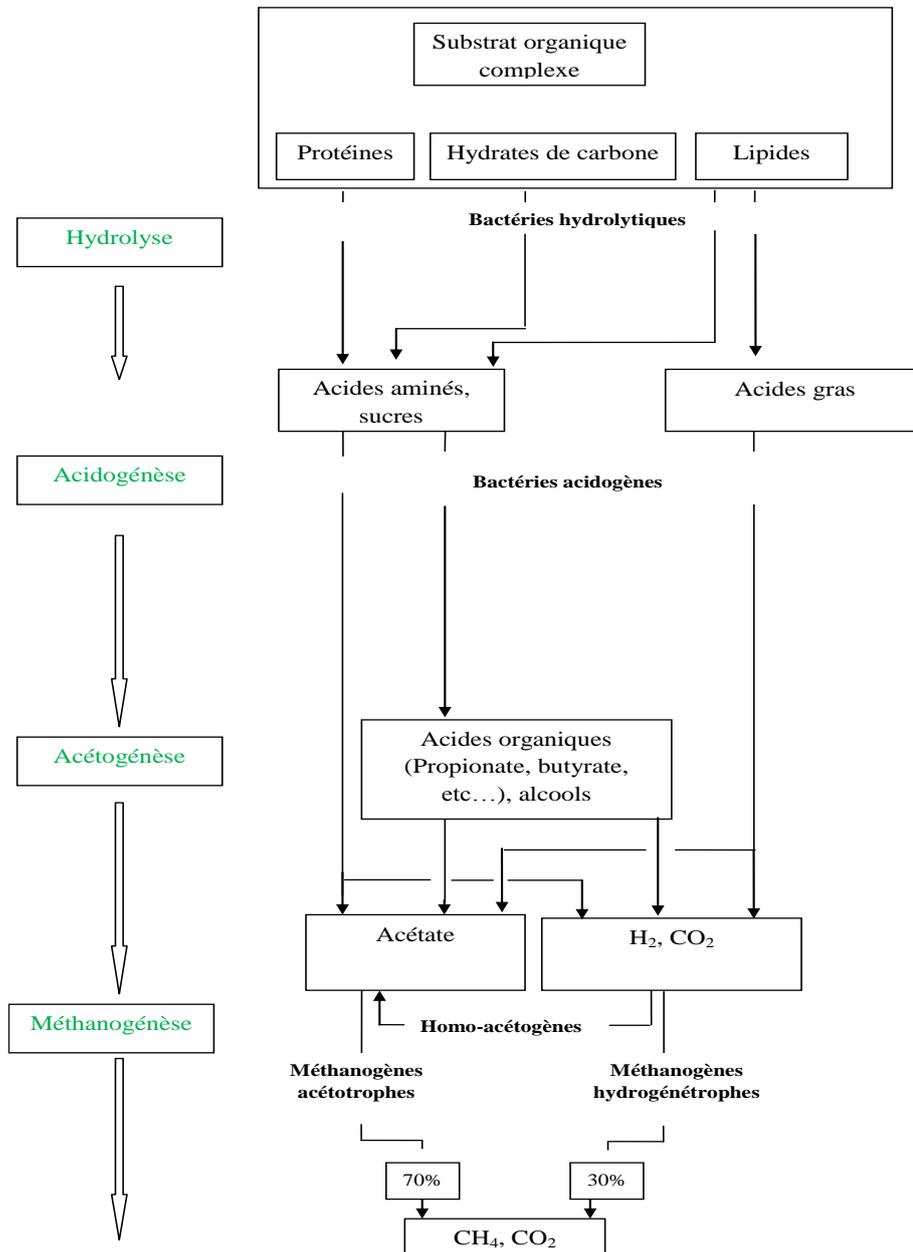


Figure 1.1 : Schéma des quatre étapes du processus de la digestion anaérobie (à partir de Görish & Helm, 2008; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991).

1.1.1. L'hydrolyse

Au cours de l'hydrolyse des polymères tels que les protéines, les hydrates de carbone et les lipides sont décomposés en monomères (monosaccharides, acides aminés et acides gras). Les bactéries présentes lors de cette phase ont un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif (Archer & Bishop, 1990) et forment un ensemble phylogénétique hétérogène regroupant de nombreux groupes bactériens (McInerney et al., 1995). L'hydrolyse est souvent considérée comme l'étape limitante dans le processus de la digestion anaérobie dans le cas de composés difficilement hydrolysables tels que la cellulose, l'amidon ou les graisses (Eastman & Ferguson, 1981; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991; Veeken & Hamelers, 1999).

1.1.2. L'acidogénèse

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

1.1.3. L'acétogénèse

Les métabolites intermédiaires générés lors de la phase d'acidogénèse sont transformés en précurseurs du méthane: l'acétate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone. Deux groupes de bactéries acétogènes se distinguent: Le premier groupe comprend les bactéries productrices obligées d'hydrogène ou OHPA («Obligate Hydrogen Producing Acetogens»).

Elles sont des anaérobies strictes et utilisent les métabolites issus de l'acidogénèse, tels que le propionate ou le butyrate, pour produire l'acétate, l' H_2 et le CO_2 . Ces bactéries ont un temps de dédoublement assez long, entre 1 et 7,5 jours (Boone & Bryant, 1980; Roy et al., 1986). Les réactions issues de ces bactéries acétogènes sont thermodynamiquement défavorables ($\Delta G_0 > 0$) et ne sont possibles que si l'hydrogène est immédiatement consommé localement par d'autres micro-organismes lors d'une association symbiotique (Stams & Plugge, 2009). De ce fait, la présence d'espèces permettant le maintien de la pression partielle de l'hydrogène basse (les méthanogènes) est nécessaire pour leur croissance (Godon, 2008). Le second groupe comprend les bactéries acétogènes non syntrophes dont le métabolisme est orienté vers la production d'acétate. Elles se développent dans un milieu riche en CO_2 et se divisent en deux groupes selon l'origine de l'acétate: Les homoacétogènes du groupe 1 qui produisent l'acétate par la réduction du H_2 et CO_2 et les homoacétogènes du groupe 2 qui utilisent les AGV et l'alcool pour produire l'acétate (Godon, 2008).

1.1.4. La méthanogénèse

La dernière étape de la méthanisation est assurée par des anaérobies stricts du domaine des archées. Ils utilisent essentiellement comme substrat l'acétate, le formate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène pour produire le méthane. Leur temps de dédoublement est compris entre 3,4 heures (Huser et al., 1982) et 7 jours (Gujer & Zehnder, 1983). Il existe deux grandes catégories d'archées méthanogènes:

- Les méthanogènes hydrogénéophiles ou hydrogénéotrophes qui produisent le méthane à partir de la réduction du CO_2 ou de l'acide formique par l'hydrogène
- Les méthanogènes acétoclastes qui utilisent l'acétate pour former le méthane (Garcia et al., 2000).

Les archées méthanogènes hydrogénéophiles vivent en association syntrophique avec les bactéries fermentaires qui leur fournissent en continu le dioxyde de carbone et l'hydrogène (Stams & Plugge, 2009). Elles jouent ainsi un rôle important dans le maintien d'une faible pression partielle en hydrogène, favorisant la croissance des bactéries acétogènes. Tout en dépendant de la pression partielle en hydrogène, la formation de méthane à partir d'acétate, d'un côté et d' H_2 et de CO_2 de l'autre ne peut avoir lieu que dans une niche énergétique très limitée (figure 1.2) quand l'enthalpie de la réaction devient négative. Quand la pression partielle de l'hydrogène est trop faible, les micro-organismes n'ont pas suffisamment d'hydrogène pour synthétiser le méthane.

En revanche, lorsque la pression partielle de l'hydrogène est trop élevée, l'oxydation en H_2 , CO_2 et d'acétate est inhibée (Görish & Helm, 2008). Les méthanogènes sont des micro-organismes très sensibles au changement affectant leur environnement. Ainsi, les paramètres opératoires appliquées aux digesteurs anaérobies tels le pH ou encore la température peuvent entraîner des changements de populations microbiennes (Hori et al., 2006; Kotsyurbenko, 2005; Kotsyurbenko et al., 2007).

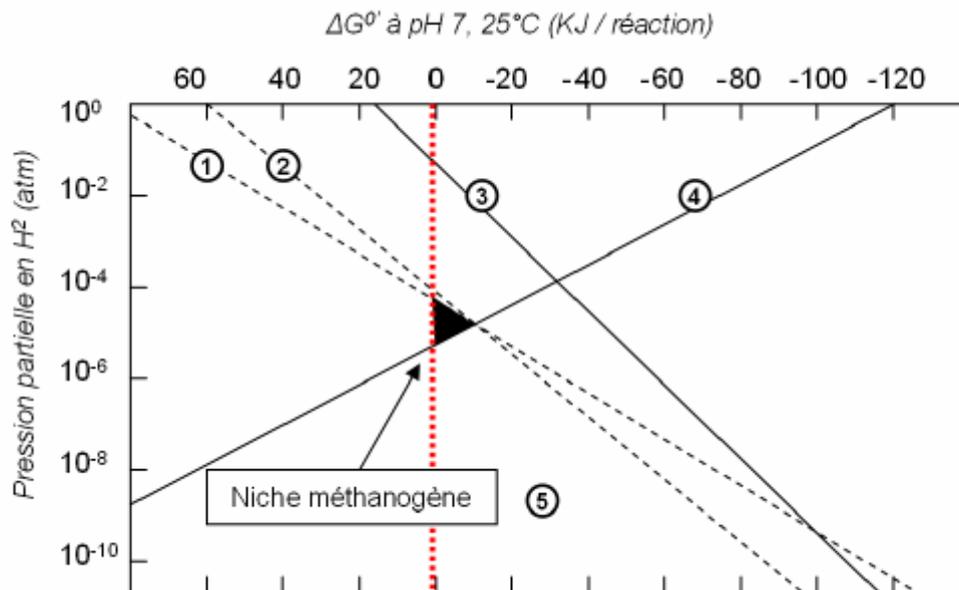


Figure 1.2 : Evolution de l'énergie libre de Gibbs (ΔG^{*}) des réactions de conversion de l'éthanol, du propionate, du butyrate en acétate et de la production de méthane à partir de H_2/CO_2 en fonction de la pression partielle en hydrogène [propionate]=[butyrate]=[éthanol]=[acétate]= 1mM; $[HCO_3^-]$ = 100mM ; pression en CH_4 =0,5 atm 1,2 et 3 : acétogénèse du propionate , du butyrate et de l'éthanol, 4 et 5: méthanogénèse autotrophe (H_2 CO_2) et acétoclaste (Cresson, 2006) adapté de (Harper & Pohland, 1986).

1.2. Méthodes d'étude des écosystèmes microbiens de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie est un procédé biologique impliquant des communautés microbiennes diverses et une grande proportion de ces micro-organismes est peu cultivable, limitant donc l'évaluation de leur biodiversité (Amann et al., 1995). Les progrès des techniques moléculaires ont permis une meilleure connaissance de la microflore anaérobie. Ces techniques basées pour la plupart sur les propriétés de la petite sous-unité des ARN

ribosomiques (ARNr) 16S présent chez tous les procaryotes (bactéries et archées) s'affranchissent des méthodes culturales (Amann et al., 1995; Godon et al., 1998).

Une autre approche moléculaire d'étude des micro-organismes anaérobies, plus spécifique aux archées méthanogènes, cible le gène fonctionnel Méthyl-coenzyme M réductase (*mcrA*), une enzyme clé dans la synthèse du méthane (Hallam et al., 2003; Juottonen et al., 2006; Tale et al., 2011; Zhang et al., 2008). L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), analyse non basée sur une étape PCR est également utilisée en digestion anaérobie afin d'évaluer la structuration spatiale des micro-organismes (Enright et al., 2009; Montero et al., 2009). Elle consiste à utiliser des sondes marquées avec un marqueur fluorescent ciblant l'ARNr des populations microbiennes considérées. Pour cela l'échantillon à analyser doit être stabilisé à l'aide d'un fixateur afin d'arrêter le métabolisme cellulaire tout en conservant les structures des micro-organismes. L'analyse peut être combinée avec un balayage microscopique à l'aide d'un microscope confocal (CSLM). Le couplage FISH-CSLM permet de visualiser directement le positionnement des différents micro-organismes marqués, de les identifier et de les localiser (Cresson et al., 2009). De ce fait, il est fréquemment utilisé dans l'étude des boues granulaires (Chu et al., 2005; Gomec et al., 2009) ou des biofilms (Habouzit et al., 2010).

Il est possible d'obtenir facilement des images globales des écosystèmes microbiens de digestion anaérobie par différentes techniques d'empreintes moléculaires (« fingerprint » en anglais). L'image de la microflore de l'écosystème permet une meilleure compréhension de son fonctionnement car elle assure le suivi dans le temps et l'espace de cet écosystème. Toutes les méthodes d'empreintes moléculaires sont basées sur une amplification préalable par PCR de l'ADN de l'écosystème étudié (figure 1.3). Il est possible de réaliser des amorces pour les bactéries et pour les archées afin d'assurer une meilleure discrimination des populations microbiennes (Godon et al., 1998). Les espèces moléculaires peuvent être différenciées soit par la taille soit par la séquence du fragment amplifié. Les techniques RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) et T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) séparent les produits PCR par leur taille (Collins et al., 2005; Scully et al., 2007).

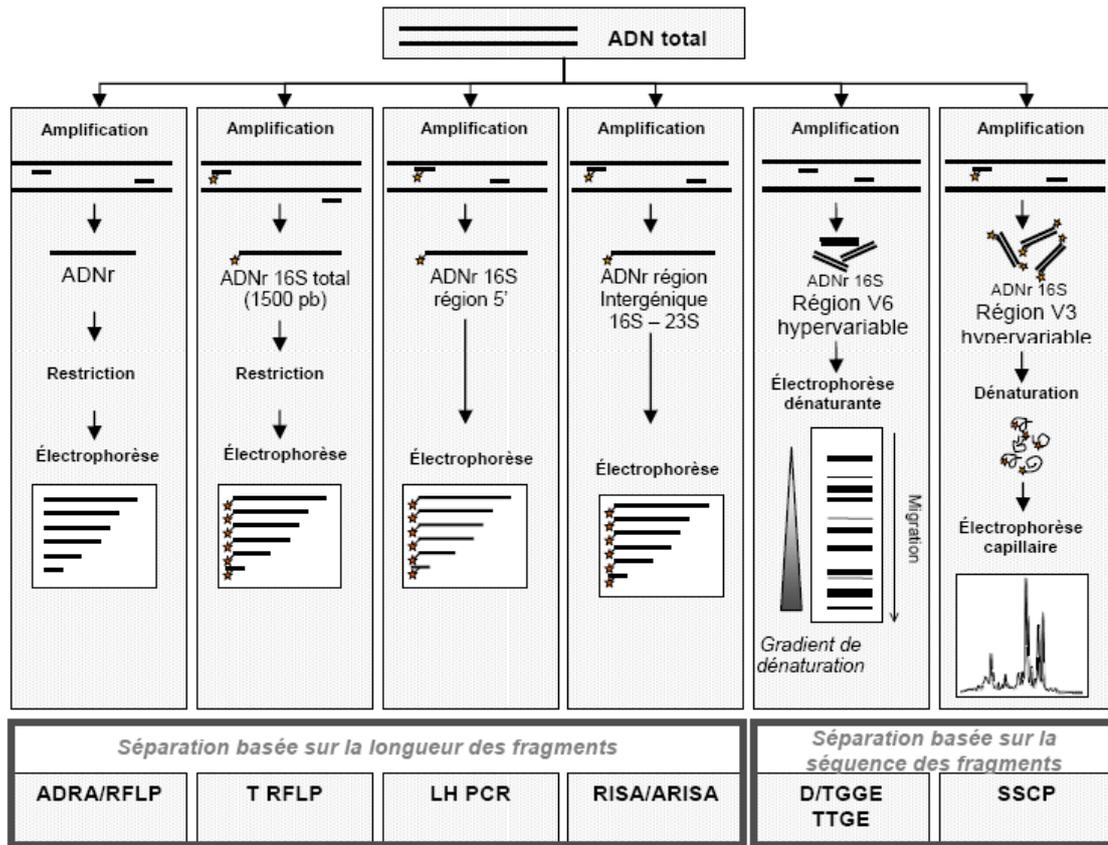


Figure 1.3 : Méthodes moléculaires de caractérisation des écosystèmes complexes basées sur l'amplification par PCR des ADNr microbiens (Cresson, 2006).

Les méthodes RFLP ou ARDRA sont basées sur la variabilité de la taille des fragments d'ADNr digérés par une ou plusieurs endonucléases et analysés par électrophorèse manuelle sur gel (Dorigo et al., 2005). Cependant cette technique est assez onéreuse et présente comme inconvénient de créer plusieurs fragments d'ADN par espèce et devient illisible dans le cas des communautés complexes. La T-RFLP (Liu et al., 1997) résorbe ce problème car elle utilise une amorce marquée par une molécule fluorescente permettant ainsi la détection d'un unique fragment d'ADNr 16S.

Pour les techniques D/TGGE (Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis), les fragments d'ADN de même taille sont séparés par électrophorèse dans un gel dénaturant d'acrylamide. Dans le cas de la DGGE, les fragments sont séparés par la dénaturation séquentielle des ADN à mesure qu'ils traversent des concentrations croissantes d'agents chimiques (urée, formamide) (Muyzer et al., 1993) ou par une augmentation progressive de la température dans les cas de la TGGE (Connaughton et al., 2006a; O'Reilly et al., 2009a). La CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism) diffère des deux techniques précédentes par ses conditions de migration électrophorétique non

dénaturantes. Les produits PCR sont dénaturés puis re-naturés rapidement. Les molécules simple-brin résultantes vont alors adopter des conformations secondaires stables qui dépendent de la séquence nucléotidique. Ces fragments présentent des différences de mobilité permettant leur séparation lors de l'électrophorèse en gel dénaturant (Zumstein et al., 2000). L'emploi de molécules fluorescentes et d'un séquenceur automatique a permis d'améliorer la sensibilité de détection. La communauté microbienne apparaît alors sous la forme d'un profil de pics (Zumstein et al., 2000). Les techniques RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) et ARISA (Automated RISA) ciblent la région intergénique 16S-23S. La discrimination des fragments PCR est alors réalisée par différence de taille. Avec la méthode ARISA, la PCR est conduite avec des amorces fluorescentes permettant ainsi une automatisation de l'étape d'électrophorèse et une détection rapide des produits PCR beaucoup plus difficile à réaliser avec RISA (Fisher & Triplett, 1999).

Actuellement, les nouvelles technologies de séquençage (pyroséquençage, Illumina, etc) permettent de générer un nombre important de séquences sans clonage préalable (Margulies et al., 2005) pour un coût toujours plus faible. Ces techniques restent cependant plus onéreuses et plus longues que les méthodes de fingerprint pour caractériser les communautés microbiennes (Sboner et al., 2011).

1.3. Les conditions physico-chimiques de mise en œuvre de la digestion anaérobie

Les différentes réactions enzymatiques de la digestion anaérobie nécessitent certaines conditions physico-chimiques. Les principales conditions sont présentées dans cette partie.

1.3.1. Le pH et l'alcalinité

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

concentration en bicarbonate (HCO_3^-), en AGV, voire en ammonium (NH_4^+) dans le cas où l'effluent à traiter est riche en azote (Bernet & Buffière, 2008).

1.3.2. La température

La température est un facteur essentiel dans les procédés biochimiques car elle a un impact sur la cinétique des réactions mais aussi sur le transfert de matière et la thermodynamique. En effet, plus l'on monte en température, plus les réactions chimiques et enzymatiques s'accélèrent et plus la croissance des micro-organismes augmentent. Cependant, cette croissance se fait jusqu'à un certain seuil de températures au-delà duquel la cellule peut être affectée de manière irréversible. C'est pourquoi pour tout micro-organisme, il existe un minimum de température au-delà duquel la croissance est possible, un optimum de température de croissance et un maximum de température au-dessus duquel toute croissance est inhibée. Ces trois températures sont appelées températures cardinales d'un micro-organisme (figure 1.4) (Madigan et al., 2009).

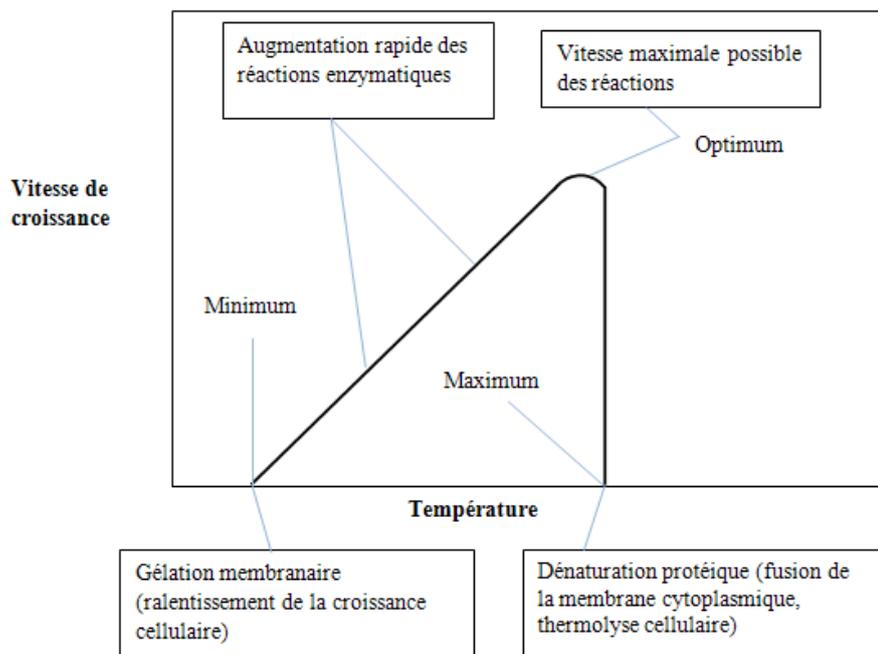


Figure 1.4 : Les températures cardinales (minimum, maximum, optimum) (Madigan et al., 2009).

Les études de Pfeffer (1974) ont démontré qu'il existe plusieurs optima de températures pour la digestion anaérobie, autour de 35°C en mode mésophile et 55°C en mode thermophile. Trois régimes de températures sont généralement admis (figure 1.5). La digestion anaérobie psychrophile est très peu connue et est souvent appliquée en milieu

tempéré et dans les régions à haute altitude (Ferrer et al., 2009; Ferrer et al., 2011; Garfi et al., 2011)

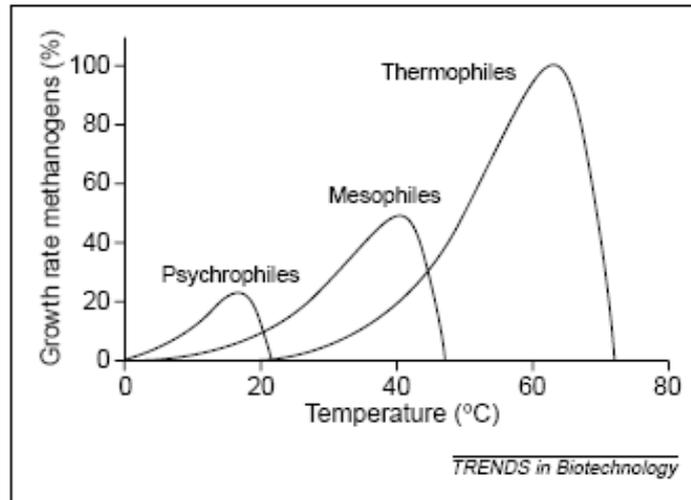


Figure 1.5 : Croissance relative des archées méthanogènes en fonction du régime de température (Lettinga et al., 2001).

Le régime mésophile est généralement le plus appliqué, il assure une stabilité de la digestion anaérobie. Le régime thermophile permet d'améliorer l'hydrolyse par rapport au régime mésophile et également d'obtenir une élimination des agents pathogènes. Il assure aussi une meilleure cinétique de dégradation du substrat et de production de biogaz (Khemkhao et al., 2011). Cependant la digestion anaérobie thermophile est réputée moins stable à cause des risques liés à la production d'AGV et d'hydrogène lors des phases d'hydrolyse et d'acidogénèse (Poh & Chong, 2009; Siles et al., 2010).

1.3.3. Le potentiel redox

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

1.3.4. Les nutriments

Les micro-organismes ont besoin d'un apport suffisant de macroéléments (azote, phosphore, etc...), d'oligo-éléments (cobalt, fer, nickel, etc..), et de vitamines pour une croissance optimale (Angelidaki et al., 2009). Les besoins en macroéléments peuvent être estimés à partir de la composition moyenne et du rendement de croissance de la biomasse

microbienne (Lettinga, 1995). Concernant les oligo-éléments, les besoins sont plus difficiles à évaluer car il est nécessaire de faire la différence entre leur présence et leur biodisponibilité réelle dans le digesteur (Speece, 1996) car certains cations métalliques essentiels peuvent être rendus inaccessibles par précipitation, notamment en présence de sulfures (Percheron et al., 1997). La présence de cobalt, de nickel et de fer est primordiale pour les réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme des méthanogènes (Fermoso et al., 2009; Takashima et al., 2011) (tableau 1.1). Sowers et Ferry (1985) ont par exemple montré qu'une concentration de moins 5 μM en Fe^{2+} et de 0,25 μM entraînait un ralentissement de la croissance des *Methanococoides methylutueus*. Une absence totale de cobalt et de biotine (vitamine B) provoquait une réduction de croissance de 94%. Plusieurs autres études ont démontré l'importance de ces éléments métalliques dans le métabolisme de méthanogènes tels que: *Methanosarcina barkeri*, *Methanospirillum hungatii*, *Methanocorpusculum parvum*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, etc.... (Demirel & Scherer, 2011).

Tableau 1.1: Rôle de certains oligo-éléments dans plusieurs enzymes associées à la digestion anaérobie (Fermoso et al., 2009).

Eléments chimiques	Fonctions enzymatiques
Cuivre (Cu)	<ul style="list-style-type: none"> • Superoxyde dismutase • Hydrogenase • Nitrite reductase • Acetyl-CoA synthase
Cobalt (Co)	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamine B12 • Co-dehydrogenase • Methyltransferase
Fer (Fe)	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrogenase • Co-hydrogenase • Methane monooxygenase • NO-reductase • Superoxyde dismutase • Nitrite et Nitrate reductase • Nitrogenase
Nickel (Ni)	<ul style="list-style-type: none"> • CO-dehydrogenase • Acetyl-CoA synthase • Methyl-CoM reductase
Zinc (Zn)	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrogenase • Formate dehydrogenase • Superoxyde dismutase

1.3.5. Les inhibiteurs de la digestion anaérobie

Nous avons vu précédemment qu'en cas de surcharge organique, l'accumulation d'AGV peut nuire au bon déroulement de la digestion anaérobie (cf § 1.1.2.). Il en est de même pour une concentration élevée d'azote ammoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). En effet, une concentration comprise entre 1500 mg.L^{-1} et 3000 mg.L^{-1} et un pH supérieur à 7,4 affectent la digestion anaérobie, de même qu'une concentration supérieure à 3000 mg.L^{-1} de NH_4^+ quel que soit le pH (Pfeffer, 1979). La présence de certains composés inorganiques (Na^+ , K^+) mais aussi des métaux lourds (Cu, Zi) servant d'additifs nutritionnels de la digestion anaérobie

peuvent être toxiques. On peut également y ajouter le sulfure d'hydrogène (H_2S) généré lors de la digestion anaérobie des effluents ou des déchets riches en protéines soufrées ou en sulfate. L' H_2S est un produit de la réduction du sulfate par les bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui entrent en compétition avec les archées méthanogènes pour les substrats communs, hydrogène et acétate. Plusieurs hypothèses expliquent la prédominance d'une espèce sur une autre. Choi et Rim (1991) par exemple ont attribué cette prédominance au ratio DCO/SO_4^{2-} de l'effluent. Ainsi pour un ratio supérieur à 2,7, la méthanogénèse est privilégiée et quand ce ratio est inférieur à 1,7 c'est le métabolisme des sulfato-réducteurs qui est favorisé. La présence d' H_2S contribue ainsi à la réduction du rendement en méthane et génère des problèmes de corrosion qui nécessitent un traitement au préalable du biogaz avant son utilisation (Chen et al., 2008). Certains antibiotiques peuvent également constituer des inhibiteurs de la digestion anaérobie, tout comme les phénols et les aldéhydes (Görish & Helm, 2008; Siles et al., 2010).

1.4. Procédés de digestion anaérobie et mode de fonctionnement

La teneur en eau détermine le type de fermentation associé à chaque déchet. Ce choix se fait en fonction de la siccité ou de la matière sèche du déchet (MS). On parlera ainsi de digestion par voie humide pour une siccité de moins de 10% et de digestion par voie sèche pour une siccité au-dessus de 20%. Pour des valeurs comprises entre 10% et 20%, la digestion anaérobie est dite semi-solide (Abbassi-Guendouz, 2012; Forster-Carneiro et al., 2008; Montero et al., 2008). L'alimentation des réacteurs anaérobies peut se faire de manière diverse. On trouve généralement trois modes d'alimentation et de soutirage : les procédés continus où l'alimentation et la vidange du réacteur se font en permanence avec un flux entrant équivalent à celui sortant. Ils sont bien adaptés au traitement des effluents liquides. Ce sont les procédés fréquemment rencontrés à l'échelle industrielle car ce sont les moins exigeants en termes de maintenance. Les procédés discontinus, dits «batch», dans lesquels les digesteurs sontensemencés puis vidés séquentiellement lorsque la production de biogaz chute ou devient nulle. Les procédés semi-continus s'opèrent par des cycles alternant alimentation et vidange.

1.4.1. Traitement des résidus solides par voie humide

Dans les réacteurs de digestion humide, les déchets sont mélangés et la teneur en eau est à une valeur proche de 85% à 90%. De plus, aux déchets préalablement mélangés, un

traitement mécanique et/ou thermique (mélangeur, pulpeur) peut être adjoint afin de permettre au mélange d'avoir la consistance souhaitée pour la digestion anaérobie. Une étape de post-traitement de déshydratation du digestat y est appliquée et l'eau récupérée est réinjectée en tête du réacteur (figure 1.6) (Buffière & Frédéric, 2008). L'agitation peut se faire soit de manière mécanique avec des pales dans des digesteurs « mélangés » ou dans les réacteurs de type « piston ». Des pales sur un axe vertical tournent et assurent le mélange (figure 1.7). Cette agitation peut être complétée par un agitateur interne fixé sur la paroi. Un second type d'agitation est réalisé dans un réacteur cylindrique, posé horizontalement avec un axe d'agitation qui est longitudinal ou des axes d'agitation transversaux. Ce type d'agitation peut également être utilisé en voie sèche. Une agitation par le biogaz peut être également appliquée. Dans un tel système, le biogaz est envoyé dans une tubulure centrale qui en remontant entraîne la matière et donc la recirculation du milieu de fermentation (figure 1.8) (Moletta, 2008).

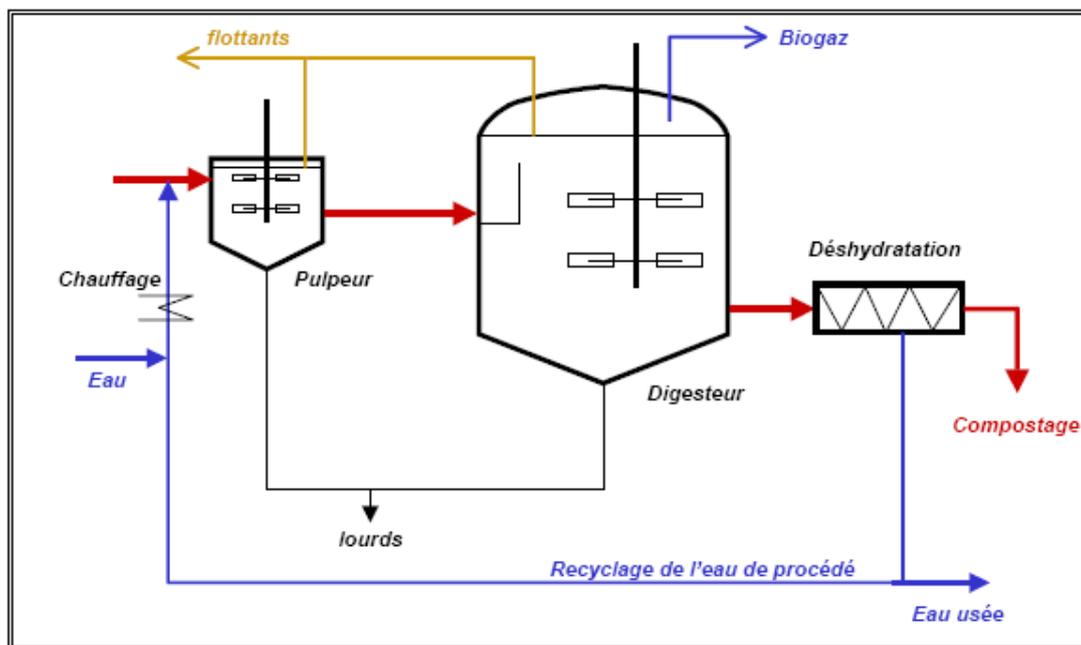


Figure 1.6: Schéma du principe de la digestion humide des résidus solides (Buffière & Frédéric, 2008).

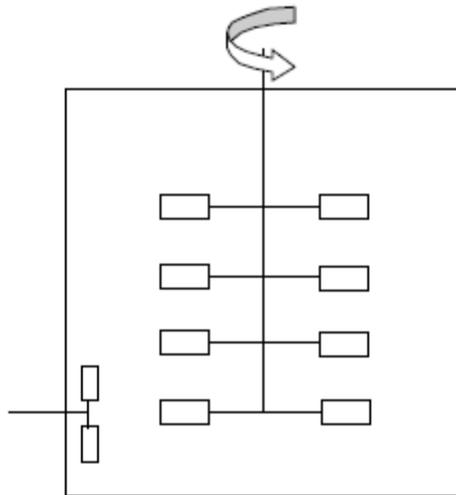


Figure 1.7 : Schéma du digesteur agité par pales centrales (Moletta, 2008).

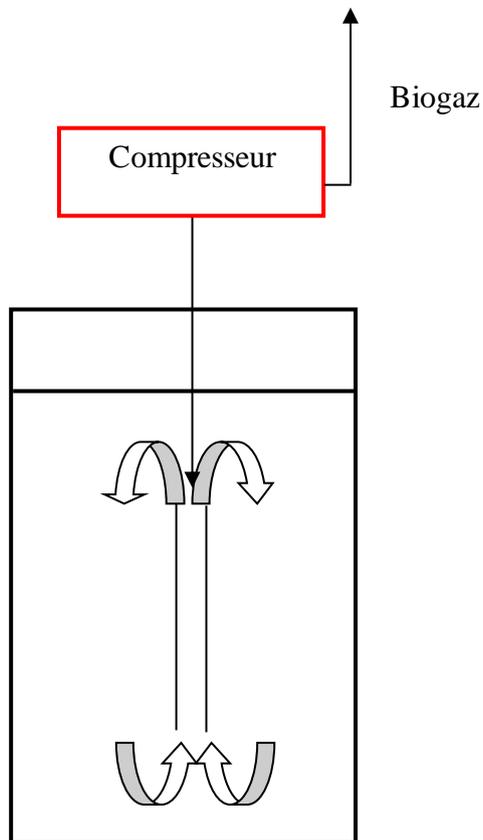


Figure 1.8 : Schéma de principe d'agitation par introduction de biogaz à tubulure (Moletta, 2008).

1.4.2. Traitement des résidus solides par voie sèche

La digestion par voie sèche permet le maintien des résidus dans leur état d'origine sans d'importants ajouts d'eau. Elle confère ainsi au milieu de fermentation une consistance non pas sèche, mais pâteuse avec une faible quantité d'eau libre. Le prétraitement nécessaire est simplement un ciblage à une taille de l'ordre de 40 mm, bien que l'on trouve également des installations fonctionnant avec des tailles supérieures (80 voire 100 mm) (Buffière & Frédéric, 2008). Les réacteurs de digestion anaérobie par voie sèche fonctionnent en mode piston et trois stratégies de mélanges se distinguent : des agitations mécaniques, par recirculation du biogaz et par recirculation du digestat (figure 1.9).

Le digesteur du procédé Dranco est une cuve cylindrique verticale (figure 1.9 (1)). Ce procédé traite en continu en conditions mésophile et thermophile des résidus solides contenant entre 45% et 50 % de taux de MS. La production de biogaz est comprise entre 100 et 150 Nm³/t de déchets ménagers. Le digesteur du procédé VALORGA est constitué d'une cuve cylindrique verticale et fonctionne en semi-continu en régimes mésophile et thermophile. Une paroi verticale est disposée entre l'axe et une génératrice du cylindre figure 1.9 (2)). Ce type procédé peut atteindre une production de biogaz de 180 Nm³/t MB. Le procédé KOMPOGAS traite en continu à des températures thermophiles (55°C-60°C) des déchets préalablement humidifiés (23% à 30% de MS) et préchauffés avant le traitement. Le digesteur KOMPOGAS est constitué d'une cuve horizontale. Un agitateur à vitesse lente assure l'évacuation des gaz de la matière en fermentation (figure 1.9.(3)) (Damien, 2008).

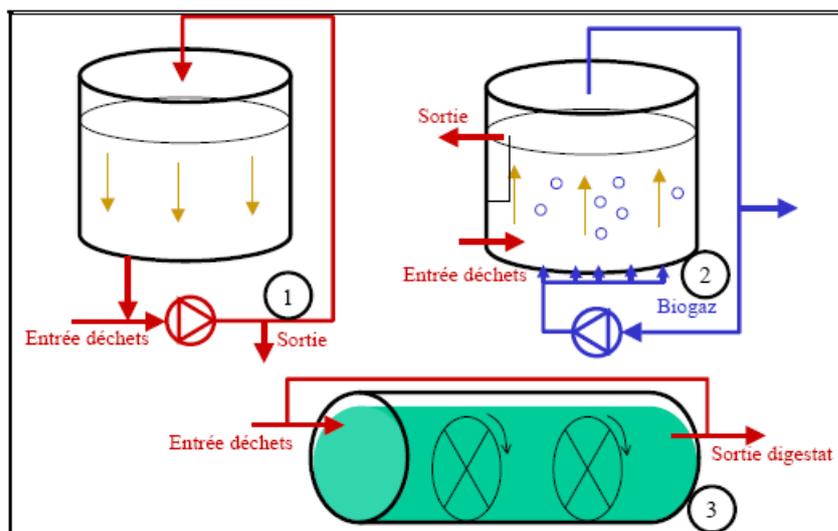


Figure 1.9 : Principales technologies associées à la digestion anaérobie par voie sèche: (1) Technologie DRANCO (recirculation du digestat), (2) Technologie Valorga (recirculation du biogaz), (3) Technologie Kompas (agitation mécanique) (Buffière & Frédéric, 2008).

1.4.3. Traitement des effluents liquides

Les procédés anaérobies de traitement d'effluents sont généralement divisés en trois générations de digesteurs (figure 1.10). La première génération (figure 1.10a) est constituée des procédés à cellules libres dont les plus primitifs sont les réacteurs Imhoff et le lagunage anaérobie (Guyot, 1990). Les réacteurs complètement mélangés sont des cuves brassées dans lesquelles les effluents sont mis en contact avec la biomasse (cellules libres). L'alimentation peut être effectuée par le bas (réacteur à flux ascendant) ou par le haut (réacteur à flux descendant) et le brassage peut se faire par voie mécanique (une ou plusieurs hélices), par voie pneumatique (compression et recirculation du biogaz) ou par voie hydraulique (recirculation d'effluent). Etant donné l'absence de rétention de la biomasse, les charges organiques sont faibles, de l'ordre de $0,5$ à $5 \text{ Kg DCO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Cependant, le procédé présente l'avantage de sa simplicité et est particulièrement adapté dans le traitement d'effluents fortement chargés en matière en suspension. Les réacteurs contacts anaérobies sont des réacteurs complètement mélangés dans lesquels on réintroduit une partie de la biomasse récupérée en sortie par décantation statique (Frédéric & Lugardon, 2007).

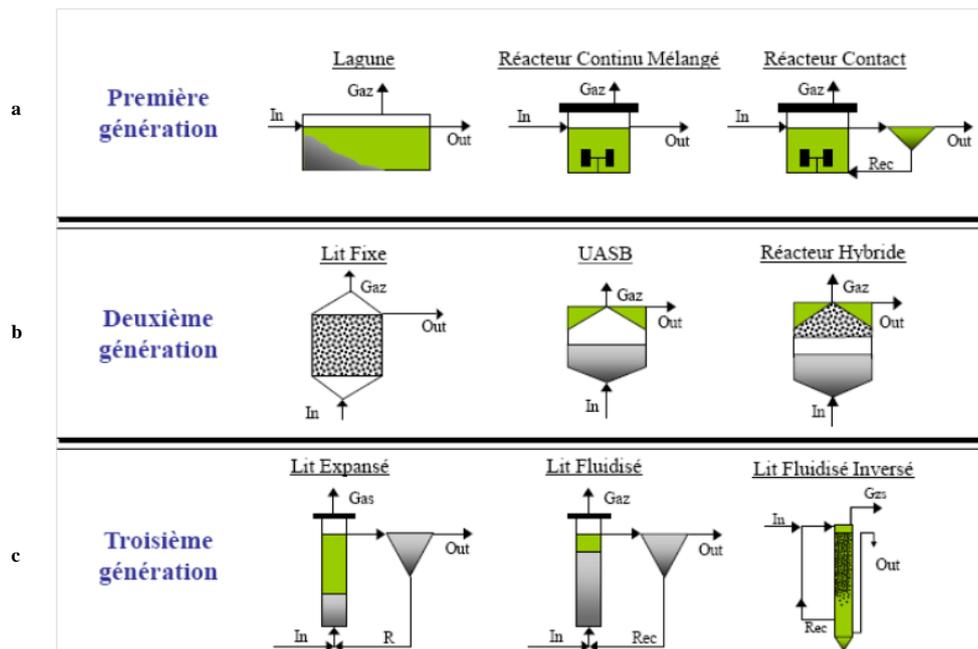


Figure 1.10 : Schéma des différentes générations de procédés d'épuration des effluents liquides (Moletta 2008).

Les procédés de digestion anaérobie de deuxième et de troisième génération sont des procédés à cellules fixées. La biomasse est concentrée sous forme d'un biofilm fixé sur un

support statique dans le cas de la deuxième génération (figure 1.10b), sur un support mobile pour les procédés de troisième génération (figure 1.10c).

Les réacteurs à boues granulaires (UASB, EGSB, IC ...) sont basés sur la capacité naturelle que présentent certains types de bactéries à s'agréger pour former entre elles des granules. L'avantage principal des procédés à boues granulaires par rapport aux réacteurs à boues libres est la possibilité de concentrer la biomasse active dans le réacteur. De plus, la surface spécifique élevée des granules permet de maximiser les échanges bactéries/substrat organique. Les granules ont une répartition spatiale optimale des bactéries impliquées dans chacune des étapes de la digestion anaérobie, ce qui permet l'accélération des voies métaboliques. La densité élevée des granules donne aux boues une bonne décantabilité et permet la formation des boues concentrées (Frédéric & Lugardon, 2007). Les réacteurs à boues granulaires peuvent traiter des charges pouvant aller jusqu'à $40 \text{ gDCO.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et acceptent des Temps de séjour Hydrique (TSH) de quelques heures à quelques jours suivant la nature de l'effluent à traiter. La présence d'une quantité importante de matières en suspension dans l'effluent à traiter peut entraîner des problèmes sérieux tels que la baisse de l'activité spécifique, la formation de mousse ou encore un ralentissement de la croissance des granules et conduire à un lessivage complet du réacteur particulièrement lors de l'accumulation prolongée de solides (Cresson, 2006).

Dans les réacteurs à lit fixe, le réacteur est rempli de supports naturels ou synthétiques, en « vrac » ou « orienté », permettant la fixation de la biomasse, la plupart du temps par formation du biofilm (Frédéric & Lugardon, 2007; Guyot, 1990). Dans les réacteurs à support en « vrac », une grande partie de la biomasse retenue dans le réacteur n'est pas attachée mais piégée dans les interstices du support, ce qui engendre le colmatage de certaines zones du réacteur et réduit les performances jusqu'à un dysfonctionnement complet. Ces problèmes peuvent être minimisés en utilisant des matériaux de remplissage ayant un coefficient de vide de 90% tels que les plastiques (PVC flocor, Pall, etc.....). Dans les réacteurs à support organisé, un garnissage ordonné constitué de tubes ou de plaques est disposé de façon à créer des canaux verticaux qui ont pour but de favoriser l'élimination de la biomasse en excès et des matières en suspension (Cresson, 2006).

Les procédés de troisième génération font appels à la fluidisation d'un lit microbien fixé sur un support synthétique ou naturel (Jewell et al., 1981). Le réacteur fluidisé se caractérise par une fluidisation du lit supérieure à 50%, et le réacteur à lit expansé par une fluidisation de l'ordre de 20%. La surface de contact du support est très grande (supérieure à $200 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$) et l'agitation est importante, ce qui élimine les problèmes de transfert de substrat.

Les TSH sont inférieurs à 12 heures. Les charges applicables peuvent dépasser les 40 kgDCO.m⁻³.j⁻¹ (Guyot, 1990).

1.5. La température et la méthanisation des effluents liquides et des résidus solides

1.5.1. Les effluents liquides

1.5.1.1. Les effluents urbains

Dans les zones tempérées, la température des effluents urbains peut atteindre en hiver des valeurs comprises entre 5°C et 10 °C (bien en dessous des valeurs optimales de la digestion anaérobie) et limiter l'application du traitement anaérobie dans ces régions. De ce fait, la digestion anaérobie présente un bilan énergétique très défavorable dû à la nécessité d'apporter une quantité d'énergie très importante pour maintenir la température dans les digesteurs (Lettinga et al., 2001). De plus, les eaux usées urbaines ont une forte fraction de solides en suspension (~50 %) ce qui rend difficile leur élimination. Dans les pays tropicaux par contre, la digestion anaérobie des effluents urbains est plutôt favorable car les effluents peuvent avoir des températures supérieures à 25°C. Le développement des digesteurs UASB a permis grâce à leur configuration mais aussi de par leur coût avantageux, une popularisation du procédé dans le traitement des effluents urbains dans plusieurs pays au climat chaud tels que la Colombie (Schellinkhout & Collazos, 1992), l'Inde (Senthilkumar et al., 2011), le Brésil (Chernicharo & Almeida, 2011) et le Mexique (Monroy et al., 2000).

1.5.1.2. Les effluents industriels

Les effluents industriels (distilleries, brasseries, papeteries, etc....) se distinguent des effluents urbains par leur forte concentration en matière organique, ce qui permet de recourir aisément à la digestion anaérobie à des températures mésophiles (30°C-40°C) correspondant bien souvent aux températures de rejet des effluents industriels. Par conséquent, une partie de l'énergie générée permet de réchauffer les réacteurs en condition optimale (Frédéric & Lugardon, 2007).

1.5.2. Les résidus solides

1.5.2.1. Les résidus agricoles et agro-alimentaires

Ils sont traités dans des digesteurs anaérobies en condition mésophile ou thermophile. Le traitement mésophile est le plus souvent utilisé du fait de sa stabilité et utilise moins de

chaleur que le traitement thermophile (De Baere et al., 2010). La digestion thermophile demeure plus efficace dans l'amélioration de la phase d'hydrolyse (Converti et al., 1999) et est plus efficace dans l'élimination des germes pathogènes (cf § 1.3.2). De plus, les expériences en thermophilie ont montré une certaine stabilité du procédé à 50°C et 55°C (Lu et al., 2007) ce qui suscite un intérêt de plus en plus croissant pour la digestion thermophile (De Baere et al., 2010).

1.5.2.2. Les boues d'assainissement

Les boues d'assainissement sont des sous-produits du traitement des effluents d'origines urbaines ou industrielles des stations d'épuration. Elles sont considérées juridiquement comme étant des déchets et leur élimination relève de la compétence des communes conformément à la loi n°75-633 du 15 juillet 1975 (ODE, 2011). Les boues d'origines industrielles sont incinérées et les cendres stockées dans les décharges de catégorie I (Koller, 2005). Les boues domestiques par contre peuvent être mélangées avec les ordures ménagères dans des centres d'enfouissement technique où leur traitement s'apparente à la méthanisation des ordures ménagères.

1.5.2.3. Les ordures ménagères

Les ordures ménagères sont traitées soit dans les digesteurs anaérobies soit stockés dans les centres d'enfouissement technique de classe 2 (Installation de stockage de déchets non dangereux ou ISDND) à température ambiante. Les déchets peuvent être stockés dans des casiers d'ISDND dans des conditions de perméabilité bien définies afin d'éviter toute percolation de lixiviats (Bouchez, 2008). En dehors des ISDND classiques, il existe également des systèmes de stockage avec recirculation des lixiviats qui permettent d'accélérer le processus de dégradation et de stabilisation des ordures ménagères dans une enceinte confinée.

1.6. La digestion anaérobie à basse température

1.6.1. Psychrophiles, psychrotrophes, psychrotolérants : historique et définitions

La définition des micro-organismes adaptés et capables de vivre à des températures froides est assez confuse. Cette confusion naît du fait que les premiers microbiologistes travaillant sur ces micro-organismes ne pouvaient, par manque d'incubateurs réfrigérés, se

référer aux températures cardinales de croissance des micro-organismes isolés pour clairement définir leur appartenance (Morita, 1975). En 1902, Schmidt-Nielsen proposa le terme «psychrophile» pour désigner toute bactérie pouvant survivre et croître à 0°C. Cependant, une année plus tard constatant que les micro-organismes isolés par Schmidt-Nielsen pouvaient se développer à des températures modérées, Müller contesta cette définition et proposa de les considérer comme des mésophiles tolérant des températures basses et non pas des bactéries qui «aiment le froid» (Morita, 1975; Sabri, 2001). En 1966, Morita classa les micro-organismes en fonction de leur température de croissance. De ce fait, il nomma psychrophile les micro-organismes ayant un optimum de croissance inférieur à 15°C et un optimum de croissance ne dépassant pas 20°C. Il utilisa le terme «psychrotrophe» pour désigner les micro-organismes avec un optimum de croissance au-dessus de 15°C et pouvant également se développer au-delà de 20°C. Finalement, il désigna «psychrotolérant» tout mésophile pouvant s'acclimater aux basses températures (Feller & Gerday, 1997; Sabri, 2001). Cependant, cette définition ne fait pas l'unanimité car d'un auteur à un autre, les températures cardinales varient (Casanueva et al., 2010; Madigan et al., 2009). Cavicchioli utilise le terme «psychrophile» pour définir de manière générale les micro-organismes qui peuvent se développer dans des environnements froids (Cavicchioli, 2006).

Toutefois, ces définitions demeurent incomplètes car elles se limitent seulement à la vitesse de croissance pour définir l'optimum thermique. En effet, Feller et al.(1994) ont démontré qu'une vitesse de croissance rapide n'est pas forcément gage d'un bon état physiologique (figure 1.11). De plus, le type et la quantité des nutriments organiques dans l'habitat influence grandement la vitesse de croissance (Feller & Gerday, 1997).

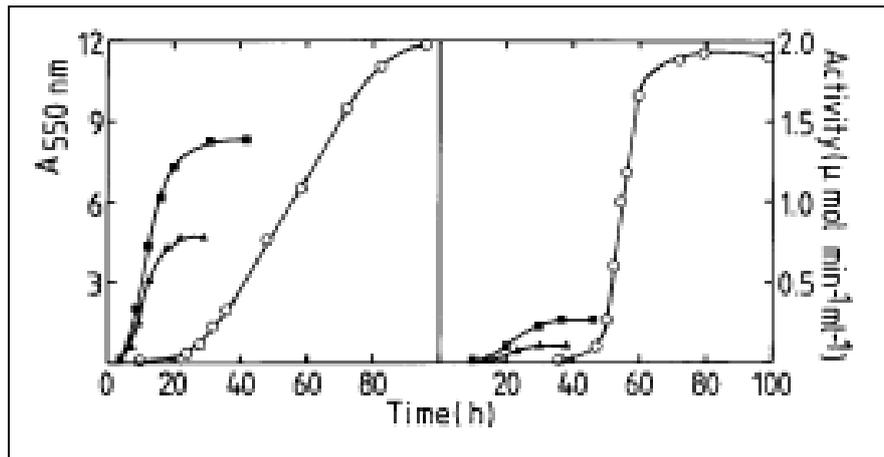


Figure 1.11 : Influence de la température de culture sur la croissance d'une bactérie antarctique d'*Alteromonas haloplanctis* A23 (à gauche) et sur sa production α -amylase (à droite). Les cultures sont réalisées à 4°C (o), 18°C (■) et 25°C (▲) (Feller & Gerday, 1997; Sabri, 2001).

1.6.2. Stratégie de l'adaptation à l'échelle de l'écosystème

Elle consiste à acclimater un écosystème mésophile à des températures psychrophiles. Les performances des réacteurs sont alors évaluées afin de déterminer les paramètres les plus appropriés pour un rendement épuratoire et une production de CH₄ optimale (King et al., 2011; Masse et al., 2008; McKeown et al., 2009).

Plusieurs équipes de recherches (tableau 1.2) se sont orientées vers ce modèle d'adaptation au vue de la difficulté d'inoculer des micro-organismes provenant d'environnements naturels froids.

Tableau 1.2: Performances de différents réacteurs hybrides utilisés en conditions psychrophiles (à partir d'Alvarez *et al.*, 2008)

Système	Volume (m ³)	T (°C)	TSH (J)	CVA (kgDCO.m ⁻³ .J ⁻¹)	DCOinfluent (g.L ⁻¹)	Rendement épuratoire (%)	Durée des essais (j)	Références
HUSB+ EGSB	0,2+0,12	17	3+2	3,3	697	69	-	(Wang, 1994)
		17	3+2	2,4	507	51		
AF+AH	0,06+0,065	13	4+8	1	480	71	144	(Elmitwalli et al., 2002a)
			3+6	1,3	480	63	69	
			2+4	1,9	480	59	81	
HUSB+UASB	25,5+20	20,6	3+13,9	0,6	401	64,6	19	(Alvarez et al., 2008a)
		18,6	2,8+6,5	0,7	281	63,6	20	
		17	5+9,3	0,3	201	49,3	26	
		14	5,7+11,6	0,2	118	53,3		

1.6.3. Activités de méthanisation dans divers environnements

1.6.3.1. Ecosystèmes naturels

1.6.3.1.1. Les tourbières

Ce sont des dépôts massifs de résidus organiques issus de la décomposition incomplète de débris végétaux de 40 cm à 500 cm (dépôts de tourbes). Les tourbières croissent par épaissement du sol de 2 à 3 cms par siècle, la tourbe est donc lentement renouvelable. Dans les pays européens peu pourvus en tourbières comme la France, ce sont des sites protégés (Damien, 2008). Le niveau assez élevé de l'eau dans les tourbes est à l'origine de sa stratification avec la présence d'une fine couche oxique. Au-dessus du niveau de l'eau, des bactéries aérobies et des champignons filamenteux dégradent la matière organique en CO_2 . Tandis qu'en dessous, la quantité d'oxygène diminue rapidement avec la profondeur (Gobalt et al., 2003; Juottonen et al., 2008). Dans les tourbières de bas marais, la production de CH_4 est réalisée principalement par les méthanogènes hydrogénotrophes. Les méthanogènes acétoclastes sont par contre très actifs dans le processus de méthanisation dans les tourbières à sphaignes acides (Kotsyurbenko et al., 2007). Les tourbières sont considérées comme des régulateurs du cycle global du carbone. A l'échelle mondiale, elles renferment 1, 4 Gt de carbone ce qui correspond à 75% du carbone atmosphérique pour une surface globale de 400 millions d'hectare. Elles sont plus présentes en Amérique du Nord, notamment au Canada (37%) en Asie et en Europe (zone boréale) et 10% en zones tropicales. Les tourbières boréales et arctiques représentent près de 99% du carbone stocké dans les tourbes (Laggoun-Défarage & Muller, 2008).

Les tourbières boréales (tourbes blondes) proviennent de la transformation des sphaignes dont le système racinaire atteint la tourbe anoxique (figure 1.12).

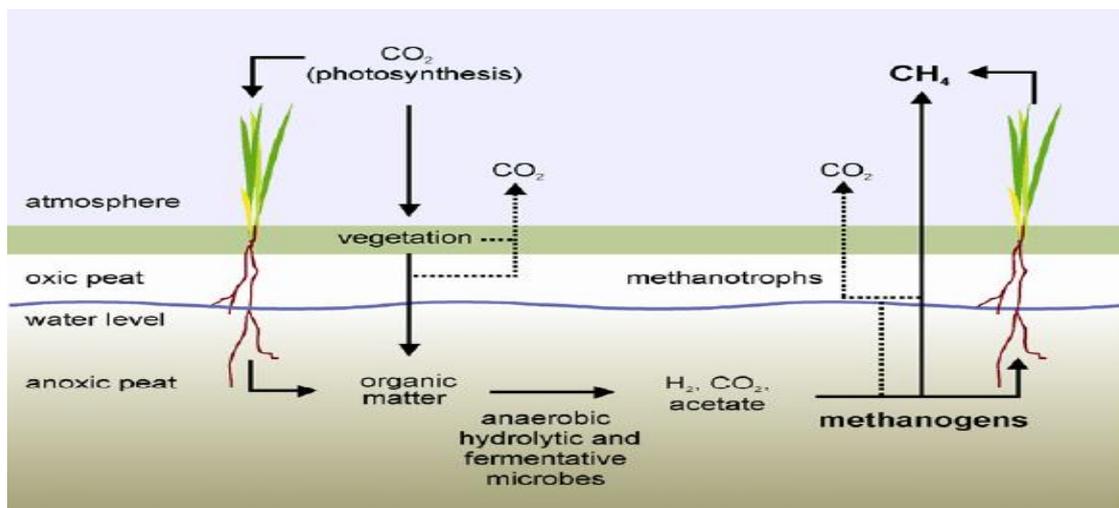


Figure 1.12 : Cycle du carbone et du méthane dans les tourbières (Juottonen et al., 2008).

Elles sont en permanence humides, gorgées d'eau à pH acide du fait de la matière organique des sphaignes qui s'y développent et s'y décomposent fournissant des acides humiques et fulviques (Damien, 2008; Juottonen et al., 2005).

1.6.3.1.2. Les sédiments des lacs d'eau douce et marins

Les lacs couvrent à peine 0,9% de la surface de notre planète mais ils sont responsables de 6 à 16% d'émission du CH₄ atmosphérique tandis que les océans n'y contribuent qu'à moins de 1% (Borrel et al., 2011). Dans les sédiments de lacs d'eau douce, l'acétate et l'hydrogène sont les précurseurs privilégiés du méthane (Nozhevnikova et al., 2007; Schulz & Conrad, 1996). La concentration en H₂ et en acétate y sont toutefois très faibles (10 nM pour H₂ et 60µM pour l'acétate) (Borrel et al., 2011) et le méthane produit dans les lacs provient majoritairement de l'acétate (Conrad, 1999; Fey & Conrad, 2000). Pour autant à l'approche des zones oxiques, le flux de H₂ plus important favorise les méthanogènes hydrogénotrophes (Schulz & Conrad, 1996). Ces phénomènes pourraient s'expliquer par l'impact de la température sur le flux de carbone et d'électrons dans les sédiments des lacs. Ce qui permet une diversification des voies métaboliques de production de méthane. Par ailleurs, le changement de température pourrait également affecter la composition des archées méthanogènes. Dans les zones profondes des lacs où la température est fréquemment basse, le transport de nutriments à travers la membrane est réduit de même que l'affinité spécifique de l'utilisation du substrat. De ce fait, des molécules simples comme l'H₂ sont facilement assimilables par diffusion. De plus, il est estimé qu'aux basses températures, l'acétate est produit par homoacétogénèse contribuant ainsi à une accumulation d'acétate disponible pour les méthanogènes acétoclastes (Schulz & Conrad, 1996).

Dans les sédiments marins, la réduction des sulfates prédomine sur la méthanogénèse (Holmer & Kristensen, 1994). Cependant, les méthanogènes coexistent dans ces environnements avec les bactéries sulfato-réductrices en utilisant principalement comme sources de carbone les composés méthylés (méthanol, triméthylamine) (Franzmann et al., 1997; Von Klein et al., 2002). Par conséquent, la majorité des méthanogènes isolés des environnements marins sont des méthylotrophes strictes (Garcia et al., 2000; Oremland & Boone, 1994; Von Klein et al., 2002). Dans certains lacs marins comme le lac Ace en antarctique à des profondeurs au-delà 20 m, l'absence totale de sulfate permet la production du méthane biogénique par la réduction du CO₂ (figure 1.13) (Franzmann et al., 1997; Whiticar et al., 1986).

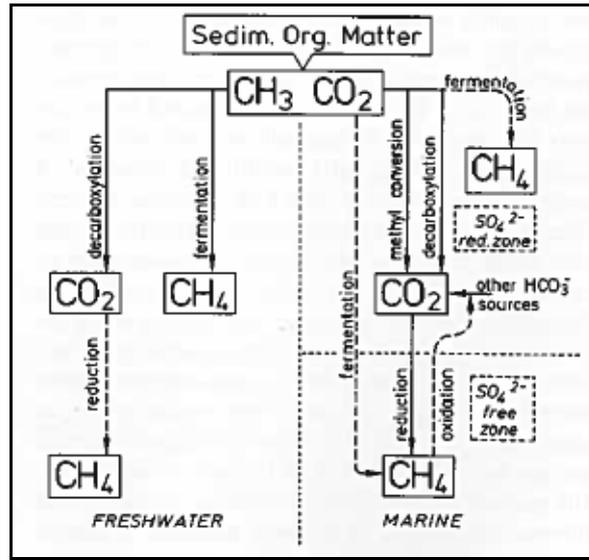


Figure 1.13 : Diagramme comparant les voies métaboliques de la méthanogénèse dans les sédiments des lacs d'eau douce et marins (Whiticar et al., 1986).

1.6.3.1.3. Le permafrost

Le permafrost est défini comme une zone où la température reste en dessous de 0°C pendant au moins deux ans. Ces terrains existent depuis environ la fin du Pliocène (environ 1,88 million d'années) dans les régions circumpolaires de l'Asie et de l'Amérique (Lambert et al., 2006). Dans le permafrost, l'hydrate de méthane peut exister en équilibre avec la glace et le gaz libre lorsque ce dernier est piégé. Il peut également être dissous dans l'eau en dessous du permafrost (figure 1.14) (Lambert et al., 2006; Rivkina et al., 2007).

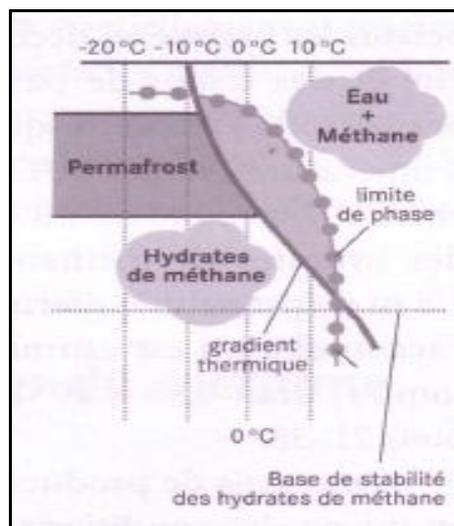


Figure 1.14 : Zone de stabilité des hydrates de méthane dans le permafrost (Lambert et al., 2006).

Des études ont montré l'existence des méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes dans le permafrost. Selon lesdites études, l'émission de CH₄ est proportionnelle à la température et à l'épaisseur de la couche du sol dégelée (Rivkina et al., 2004).

Le dégel du permafrost provoque la libération du méthane piégé dans la glace. Par ailleurs, la matière organique devenue disponible est dégradée en anaérobiose en CO₂ et en CH₄ et le cycle de l'azote est mis en marche (figure 1.15).

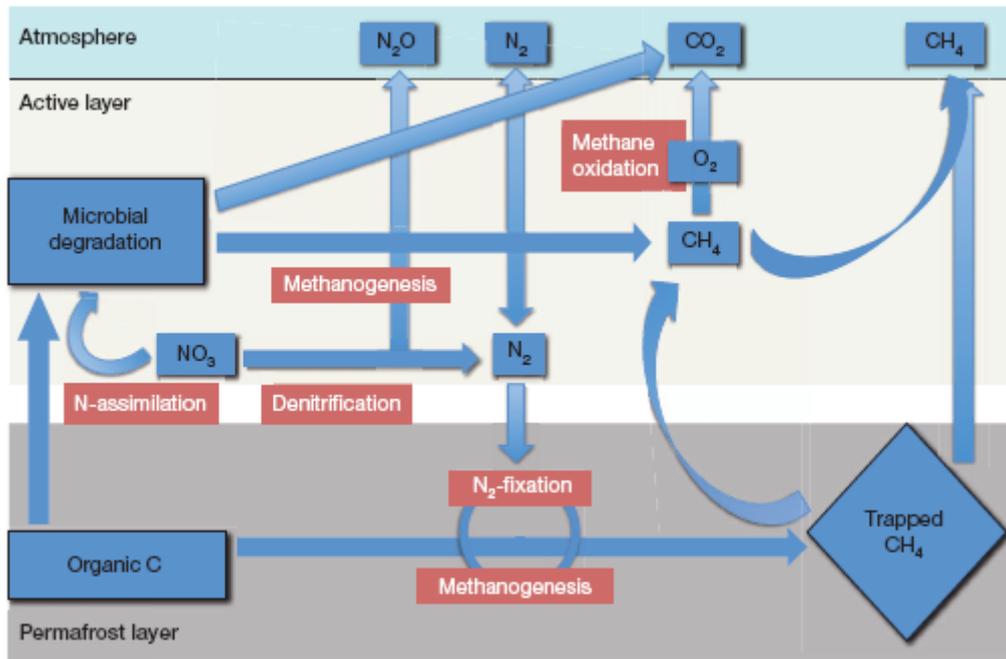


Figure 1.15 : Modèle conceptuel du cycle du carbone et de l'azote dans le permafrost après le dégel dans le sol Arctique (Mackelprang et al., 2011).

1.6.3.2. Environnements artificiels

1.6.3.2.1. Le lagunage anaérobie

C'est un procédé extensif en forme de bassin contenant un lit de boues (Moletta, 2008b). La profondeur doit être importante (comprise entre 2 et 5 m) afin de favoriser les processus anaérobies en évitant la prolifération algale (figure 1.16) (Piétrasanta & Bondon, 1994). La température est le paramètre le plus sensible au bon fonctionnement d'un lagunage anaérobie du fait de son influence sur l'activité de fermentation. Les températures d'utilisation élevées (supérieures à 25°C) font que ce système existe essentiellement dans les pays tropicaux pour le traitement des effluents domestiques et agro-industriels. La production de biogaz en dessous de 15°C est très faible et augmente 7 fois par tranche de 5°C au-dessus de 18°C (28 m³.ha⁻¹.j⁻¹ à 12°C et 490 m³.ha⁻¹.j⁻¹ à 22°C). Les autres paramètres non négligeables

sont le pH et le temps de séjour des effluents liquides. Le pH doit être maintenu aux environs de 7 pour obtenir un bon rendement en biogaz méthane. En ce qui concerne le temps de séjour, l'expérience montre qu'une durée de 2 jours est un bon compromis et permet d'atteindre des rendements épuratoires voisins de 70% (Piétrasanta & Bondon, 1994).

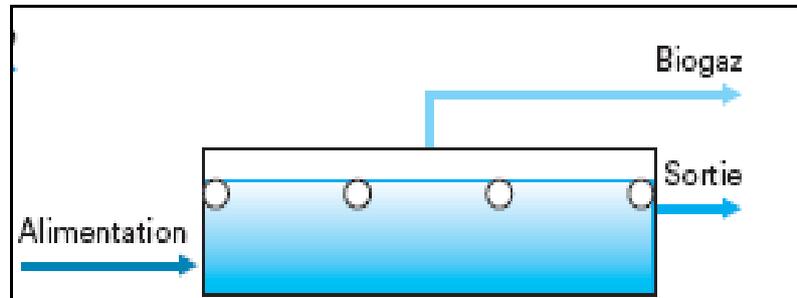


Figure 1.16 : Principe de fonctionnement d'une lagune anaérobie (Frédéric & Lugardon, 2007).

1.6.3.2.2. Les réacteurs anaérobies

La digestion anaérobie psychrophile a fait l'objet de plusieurs études, notamment dans le traitement des eaux usées urbaines (Connaughton et al., 2006a; Connaughton et al., 2006b; Lettinga et al., 1999; Lettinga et al., 2001; Madden et al., 2010). Les raisons évoquées pour cet intérêt croissant ont été mentionnées dans le paragraphe 1.5.1.1. Il existe également certains réacteurs fonctionnant en psychrophilie dans traitement du lisier porcin (Dague et al., 1998; King et al., 2011; Masse et al., 2008). Du fait de l'importance de la température dans les procédés anaérobies, certaines innovations majeures en vue d'améliorer la performance des réacteurs aux basses températures ont vu le jour. Elles concernent par exemple des études plus approfondies sur la qualité de l'inoculum et sa capacité à se développer en conditions psychrophiles, la nature du déchet, du substrat à traiter et la configuration du réacteur ainsi que sa capacité à retenir l'inoculum (Dhaked et al., 2010; van Lier et al., 1997). Sur ce dernier point, plusieurs études ont montré la fiabilité de l'utilisation des réacteurs à plusieurs compartiments qui offrent des meilleurs rendements en comparaison à des réacteurs à compartiment unique (Alvarez et al., 2008b; van Lier et al., 1994).

Le développement des réacteurs UASB (Upflow Anaerobic Sludge Bed) a contribué à l'avancée de la digestion anaérobie psychrophile dans le traitement des eaux urbaines. Il s'agit des réacteurs les plus répandus dans le traitement des effluents industriels solubles. L'effluent est reparti de façon homogène en bas du réacteur et traverse un lit de boues granulaires. Le

biogaz est recueilli dans la partie supérieure du réacteur (figure 1.16) (Frédéric & Lugardon, 2007) . Dans le paragraphe 1.5.1.1, nous avons mentionné les différentes difficultés de l'application du traitement des eaux urbaines dans les pays tempérés. L'application du procédé UASB a permis le maintien de la matière en suspension dans le lit de boue du réacteur. Les granules formés ont des bonnes propriétés de sédimentation et une bonne résistance mécanique ce qui évite leur lessivage. La vitesse ascensionnelle du liquide est généralement stabilisée entre 1 et 1,5 m.h⁻¹ (Cresson, 2006; Seghezzi et al., 1998) et permet un meilleur abattement. Dans les conditions favorables de température (autour de 20°C à 25°C) une fraction des solides en suspension sera hydrolysée, réduisant leur accumulation dans le réacteur et produisant une boue bien digérée; ceci augmente la conversion de la DCO en méthane (Noya, 2008).

Cependant dans les réacteurs UASB, le contact inoculum-eaux usées est assez réduit ce qui entraîne des problèmes de mixité et des faibles rendements à des températures en dessous de 20°C (Seghezzi et al., 1998). L'accumulation des MES dans le lit de boue à certaines températures altère l'activité méthanogène et réduit la performance du réacteur (Elmitwalli et al., 2002a).

L'application de la recirculation des effluents combinée avec des réacteurs plus grands a contribué au développement des réacteurs EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) (Seghezzi et al., 1998). Dans ce système, la quasi-totalité de la boue retenue est employée et contrairement au réacteur UASB, une fraction beaucoup plus importante des organismes immobilisés participent au processus en raison de l'affinité extraordinaire avec le substrat (figure 1.17).

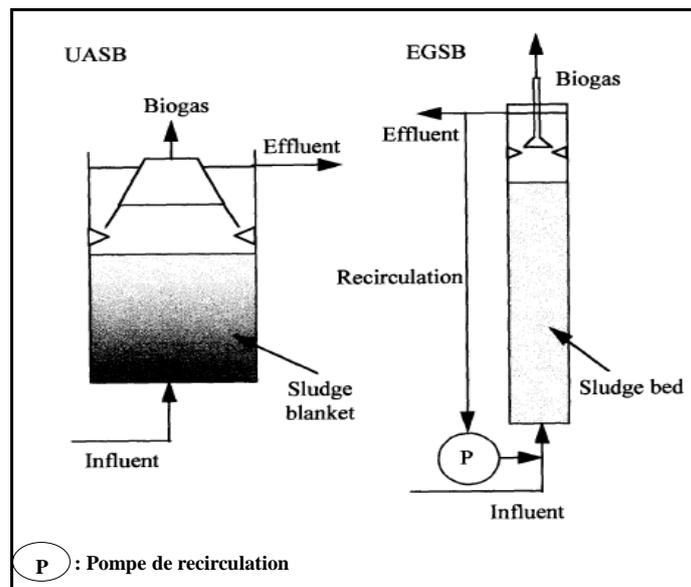


Figure 1.17: Schéma des réacteurs UASB (à gauche) et EGSB (à droite) (Seghezzi et al., 1998).

La conception des EGSB est appropriée pour le traitement des effluents dont la DCO est inférieure à 1 g.L^{-1} . De 5°C à 10°C par exemple, des pourcentages d'élimination de la DCO de 90% ont été atteints (Lettinga et al., 2001). Le facteur limitant pour l'application directe des réacteurs EGSB serait en plus des coûts énergétiques supplémentaires, les fortes teneurs en MES de l'effluent à la sortie (concentration à peu près identique à celle de l'eau traitée) (van Lier et al., 1997).

Afin de pallier les insuffisances des réacteurs UASB et EGSB et d'améliorer l'activité méthanogène, des systèmes des réacteurs hybrides ont été conçus. Dans de tels systèmes, la phase non méthanogène et la phase méthanogène se déroulent dans deux réacteurs distincts (Alvarez et al., 2008a). Les réacteurs hybrides combinant un UASB avec un EGSB, ou un filtre anaérobie (AF) avec un hybride anaérobie (AH) ont été largement testés avec des résultats satisfaisants (tableau I.2). Alvarez et al (2008a) ont par exemple utilisé un système hybride constitué d'un HUSB (Hydrolytique Upflow Sludge Bed) et d'un UASB pour le traitement des eaux usées municipales en psychrophilie (figure 1.18).

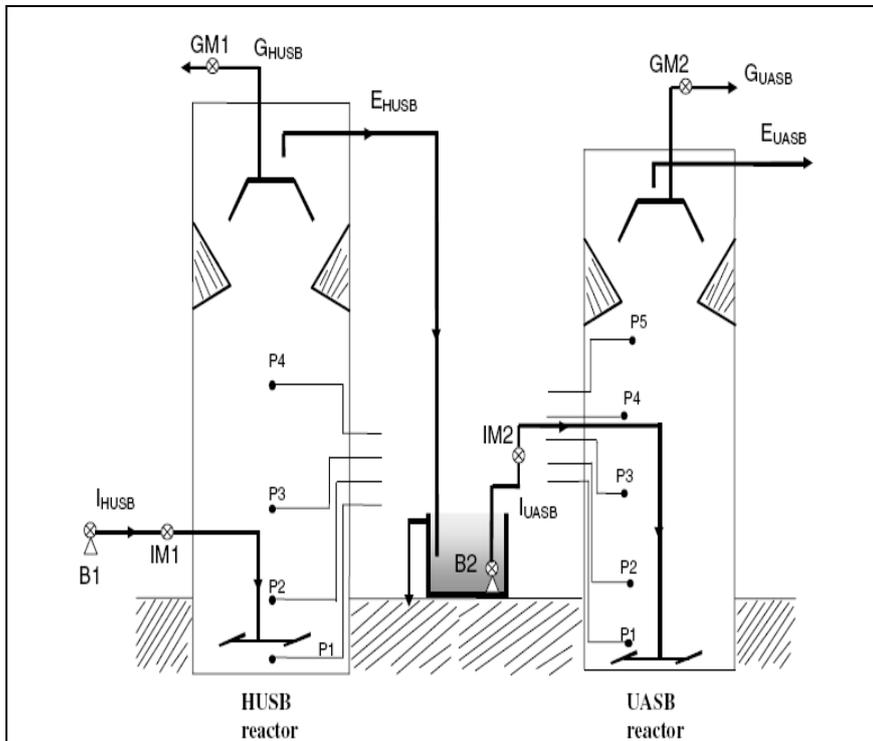


Figure 1.18 : Configuration d'un système hybride de réacteur HUSB-UASB d'usine pilote (Álvarez et al., 2008). I: Alimentation, E: Effluent, G: biogaz, B: Pompe d'alimentation, IM: Débitmètre d'alimentation, GM: Débitmètre du biogaz.

Le premier réacteur (HUSB) agit comme un hydrolyseur de MES et le second comme un réacteur de digestion anaérobie. Connaughton et al.(2006b) ont montré que des réacteurs hybrides EGSB-AF à 15°C traitant des effluents de brasseries avaient un rendement épuratoire comparable à celui obtenu à 37°C avec les mêmes charges organiques appliqués. D'autres pistes étudiées consistent à utiliser des réacteurs ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor) qui permettent d'augmenter les conditions de mélange, une meilleure sédimentation et un maintien de la biomasse dans le réacteur. Un taux de 60% de DCO éliminée a été obtenu à 5°C avec un temps de séjour hydraulique de 6h (Dague et al., 1998). Des réacteurs AMBR (Anaerobic Migrating Blanket Reactor) plus simples et moins coûteux que les ASBR permettent de réduire le temps de séjour hydraulique (Dhaked et al., 2010). Angenent et al.(2001) ont pu atteindre des rendements épuratoires de 59% à 73% à des températures comprises entre 15°C et 20°C avec un temps de séjour de 4hr dans le traitement des effluents de laiterie avec ce type de digesteur.

1.6.4. Les archées méthanogènes du froid

Il n'existe à ce jour que six archées méthanogènes psychrophiles et psychrotolérants dont les génomes ont été séquencés: *Methanococoides burtonii* (Franzmann et al., 1992), *Méthanogénium frigidum* (Franzmann et al., 1997), *Methanosarcina lacustris* (Simankova et al., 2001), *Methanosarcina baltica* (Von Klein et al., 2002), *Methanogénium marinum* (Chong et al., 2002), *Methanococoides alaskense* (Singh et al., 2005). Plusieurs souches de ces archées méthanogènes ont également été isolées (Nozhevnikova et al., 2001; Simankova et al., 2003).

1.6.5. Mécanismes d'adaptation au froid des microorganismes au niveau cellulaire

Les micro-organismes sont équipés de mécanismes cellulaires leur permettant de s'adapter aux variations de températures de leur habitat naturel. Dans cette partie, nous discuterons de quelques exemples de mécanismes développés pour faire face aux basses températures.

1.6.5.1. Adaptation de la synthèse protéique

Toute baisse de température d'un micro-organisme par rapport à sa température physiologique entraîne une surexpression de protéines dites «cold-shock» (Csps). Ces

protéines sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que l'expression génétique et la régulation de la fluidité membranaire (Phadtare, 2004).

Les protéines «cold-shock» psychrophiles et thermophiles restent très peu étudiées en comparaison de leurs homologues mésophiles. Cependant certaines études notent plusieurs similarités entre les protéines psychrophiles et mésophiles notamment les séquences d'ADN (Collins et al., 2006b; D'Amico et al., 2006; Tosco et al., 2003) et la présence de protéines spécifiques du froid produites lors d'une exposition prolongée aux basses températures, les Caps, « Cold acclimation proteins». Le rôle des Caps serait le maintien de la fluidité membranaire et/ ou le remplacement des peptides dénaturés (Panoff et al., 1997).

Les protéines d'antigel (AFP) présentes chez certains vertébrés, plantes, mycètes et bactéries (*Marimonasprimoryensis*) permettent la survie à des températures inférieures à 0°C en se fixant sur des petits cristaux de glace inhibant ainsi la croissance et la recristallisation de la glace (D'Amico et al., 2006). Des molécules protectrices comme le tréhalose, le glycérol et le sorbitol produits par les psychrophiles protègent les structures cellulaires et assurent une osmolarité cellulaire optimale pour faire face à la déshydratation et la dénaturation des protéines (D'Amico et al., 2006; Kawahara, 2008; Sabri, 2001) et le maintien de l'activité enzymatique *in vivo* (Kawahara, 2008; Phadtare, 2004).

1.6.5.2. Maintien de la fluidité membranaire

La perte de la fluidité membranaire est une des premières conséquences de l'exposition de tout micro-organisme aux basses températures. Elle s'accompagne d'effets dévastateurs affectant les propriétés physiques et les fonctions des membranes biologiques (échange moléculaires, régénération énergétique, division cellulaire, viscosité de la membrane cytoplasmique, etc...) (Shivaji & Prakash, 2010). Les lipides gouvernent les propriétés physiques des membranes biologiques par conséquent ces dernières varient en fonction de l'habitat thermique des micro-organismes. La baisse de la température de croissance provoque une augmentation de la production d'acides gras insaturés, polyinsaturés et à courtes chaînes (tableau 1.3) (D'Amico et al., 2006; Sabri, 2001).

Par ailleurs, il existe également une forte proportion d'acides gras *cis* à double liaisons insaturés et des *antésio*-ramifiés (D'Amico et al., 2006). D'autres études ont montré que le raccourcissement des chaînes d'acides gras réduit les interactions van der Waals entraînant par la même occasion une augmentation de la fluidité membranaire (Russel, 2008).

Tableau 1.3: Pourcentage des différents acides gras présents dans les lipides totaux chez deux souches psychrophile et mésophile d'*Arthrobacter* (Les températures de cultures sont respectivement de 2 °C et 25°C) (Sabri, 2001).

Acides gras	<i>Arthrobacter globiformis</i> (mésophile) 25°C	<i>Arthrobacter glacialis</i> (psychrophile) 2°C
	%	%
C13	< 0,1	2,6
C14	2,6	5
C15	72,7	69,4
C16	10,6	18,7
C17	13,6	4,2
Acides gras linéaires	8	1,1
Acides gras ramifiés	91,9	98,6
Acides gras insaturés	2,6	31,2

1.6.5.3. Modification des mécanismes enzymatiques

Les réactions enzymatiques sont dépendantes de la température et peuvent être décrites par l'équation d'Arrhénius, $K_{cat} = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$, (1-1), où K_{cat} est la constante de vitesse de réaction enzymatique. Elle reflète le nombre d'évènements catalytiques qu'effectue une enzyme par unité de temps. E_a représente l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfait ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T , la température absolue et A , le facteur pré-exponentiel. Selon cette équation, il existe une relation proportionnelle entre la vitesse des réactions enzymatiques et la température. Autrement dit, toute baisse en température entraîne une réduction de l'activité enzymatique et la magnitude de cette baisse est dépendante de l'énergie d'activation (E_a). Cette relation explique en partie la valeur Q_{10} qui exprime l'influence de la température dans un procédé biochimique. Par exemple, une température de croissance réduite de 37°C à 0°C provoque une réduction de 20 à 250 fois l'activité d'une enzyme mésophile (Feller, 2003; Morgan-Kiss et al., 2006).

Les micro-organismes psychrophiles ont développé plusieurs stratégies leur permettant de maintenir les flux métaboliques à des températures extrêmement basses. Certaines espèces comme *Fundulus heteroclitus* augmentent la synthèse de certaines enzymes tel que les lactates déshydrogénases (LDH) (Crawford & Powers, 1992; Feller & Gerday, 1997). De même les études menées par Devos et al.(1998) sur deux souches d'algues psychrophiles, Chloromanas ANTI 1 et ANTI 3, ont montré que la production en excès de l'enzyme RUBISCO contrebalançait sa faible efficacité catalytique aux basses températures. Cependant, cette stratégie est énergétiquement défavorable (Siddiqui & Cavicchioli, 2006). D'autres espèces synthétisent des isoenzymes adaptés à différents gradients de températures (Hochheimer et al., 1998; Lin & Somero, 1995; Monteiro et al., 1998). Cette stratégie s'avère insuffisante car elle nécessite la présence de plusieurs copies de gènes. Par ailleurs, elle est plus apte pour des organismes dont l'adaptation est fonction de la saison comme chez certains nématodes et poissons (Collins, 2008).

L'hypothèse communément admise d'adaptation au froid est la relation existante entre la flexibilité, la stabilité et l'activité des enzymes (D'Amico et al., 2006). Cette hypothèse suggère que les enzymes psychrophiles augmentent la flexibilité de leur structure moléculaire afin de compenser de «l'effet de gel» des habitats froids (Johns & Somero, 2004). Cette flexibilité accrue peut concerner, soit la protéine entière, soit être limitée à certaines structures comme celles impliquées dans les réactions catalytiques. Des études sur des enzymes psychrophiles à multi-domaines telles que la chitobase (Lonhienne et al., 2001), la phosphoglycérate kinase (Bentahir et al., 2000) et l' α -amylase (Claverie et al., 2003) ont par exemple montré que les domaines catalytiques sont moins stables que les domaines non catalytiques et que ces derniers avaient une stabilité égale à celle de leurs homologues mésophiles. Les structures cristallographiques des protéines psychrophiles (tableau 1.4) indiquent que les conformations des protéines psychrophiles partagent certaines similitudes avec leurs homologues mésophiles et thermophiles (D'Amico et al., 2006).

Cependant, il existe certaines modifications de la structure des enzymes psychrophiles permettant une amélioration de la flexibilité. Elles sont souvent caractérisées par une réduction de la force et /ou du nombre de facteurs de stabilisation enthalpique ou entropique. D'autres ajustements comprennent par exemple une diminution des liaisons hydrogènes, des interactions aromatiques, une augmentation de la surface d'hydrophobicité, une faible teneur en proline et arginine et une meilleure accessibilité au site catalytique (Collins, 2008; Feller, 2003; Violot et al., 2005).

Tableau 1.4: Exemple d'enzymes psychrophiles dont la structure cristalline a été déterminée (à partir de Collins, 2008).

Enzyme	Organisme hôte	Référence
<i>Alkaline phosphatase</i>	Souche bactérienne TAB5	(Wang et al., 2007)
<i>Alpha-amylase</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	(Aghajari et al., 1998)
<i>Aspartate carbamoyltransférase</i>	<i>Moritella profunda</i>	(De Vos et al., 2007)
<i>Béta-galactosidase</i>	<i>Arthrobacter</i> sp C2-2	(Skalova et al., 2005)
<i>Catalase</i>	<i>Vibrio salmonicida</i>	(Riise et al., 2007)
<i>Cellulase</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	(Violot et al., 2005)
<i>Protéase (trypsin)</i>	<i>Oncorhynchus Ketav</i>	(Toyota et al., 2002)
<i>Protéase (K-like)</i>	<i>Serratia</i> Sp	(Helland et al., 2006)
<i>Uracil-DNA glycosylase</i>	<i>Gadus morhua</i>	(Leiros et al., 2003)

L'équation (1-1) peut également s'exprimer selon la théorie de l'état de transition pour donner la relation suivante: $K_{cat} = \frac{kK_B T}{h} e^{-\Delta G^*/RT}$ (1-2) où k est le coefficient de transmission généralement égal à 1, K_B est la constante de Boltzmann ($1,3805 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), h , la constante de Planck ($6,6256 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) et ΔG^* l'énergie standard d'activation de Gibbs ou la variation de l'énergie de Gibbs du complexe enzyme-substrat (ES*). La variation de l'énergie de Gibbs se compose selon l'équation ci-contre. $\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$, où ΔH^* , représente l'énergie standard d'activation, ΔS^* l'entropie standard d'activation et T , la température absolue (en Kelvin). En remplaçant ΔG^* dans l'équation (1-2), on obtient la relation suivante: $K_{cat} = \frac{K_B T}{h} e^{-((\Delta H^*/RT) + (\Delta S^*/R))}$, (1-3).

La comparaison des paramètres thermodynamiques d'activation des enzymes psychrophiles, mésophiles et thermophiles indique que l'activité spécifique (K_{cat}) des psychrophiles est supérieure à celle des mésophiles et des thermophiles aux basses

températures accompagnés d'une plus faible énergie standard d'activation de Gibbs (proche de zéro) grâce à une baisse de ΔH (Collins, 2008; D'Amico et al., 2006; Siddiqui & Cavicchioli, 2006) (tableau 1.5).

Tableau 1.5 : Paramètres d'activations pour l'activité de certaines enzymes psychrophiles et mésophiles (Feller, 2003)

Enzymes	Sources		T (°C)	K_{cat} (s ⁻¹)	ΔG^* (KJ/mol)	ΔH (KJ/mol)
Trypsine	Psychrophile	Morue groenlandaise	5	82	57,7	33
	Mésophile	Bovine		27,7	60,2	53,9
Amylase	Psychrophile	<i>Alteromonas</i>	15	0,97	55,6	73,6
	Mésophile	<i>Bacillus</i>		0,68	59,7	99,6
Subtilisine	Psychrophile	<i>Bacillus TA41</i>	15	25,4	62,7	36
	Mésophile	<i>B.subtilis</i>		5,4	66,4	46
Glucose 6-phosphatase déshydrogénase	Psychrophile	Poisson antarctique	0	106,5	56,1	36,8
	Mésophile	Humaine		42,4	58,2	51,9
Xylanase	Psychrophile	Levure antarctique	5	14,8	61,7	45,4
	Mésophile	Levure		4,9	64,3	49,9
Chitiobase	Psychrophile	<i>Arthrobacter</i>		98	59,5	44,7
	Mésophile	<i>Serratia.marcescens</i>	15	18	63,5	71,5
Chitinase A	Psychrophile	<i>Arthrobacter</i>		1,7	69,2	60,2
	Mésophile	<i>Serratia.marcescens</i>		3,9	67,2	74,3
Glutamate déshydrogénase	Psychrophile	Poisson antarctique	5	3,8	64,8	33,4
	Mésophile	Bovine		0,9	68,1	59

La diminution de l' ΔH permet ainsi aux enzymes psychrophiles d'être moins dépendantes de la température et d'accélérer la vitesse de catalyse (Collins, 2008; Siddiqui &

Cavicchioli, 2006). Cependant un tel mécanisme basé uniquement sur l'efficacité catalytique ne serait présent que chez une minorité d'enzymes (Feller et Gerday, 1997). De plus, elle ne s'explique que lorsque l'enzyme est en condition de saturation en substrat.

La majorité des enzymes intracellulaires sont en présence de concentrations relativement faibles en substrat, voisines de la valeur de K_m (constante de Michaelis-Menten qui représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat) (Sabri, 2001). L'approche la plus aboutie est un effet conjugué de la constante catalytique (K_{cat}) et de l'affinité de l'enzyme pour le substrat (K_m) par le rapport K_{cat}/K_m . Pour des enzymes opérant à des concentrations de substrats très élevées comme les enzymes digestives et extracellulaires l'optimisation du K_{cat} est privilégiée. Par contre, pour des enzymes ne nécessitant pas une forte concentration en substrat (exemple: enzymes intracellulaires), certaines études ont démontré que les deux paramètres peuvent être optimisés dans certains cas (Collins, 2008; Hoyoux et al., 2001; Lonhienne et al., 2001). Toutefois, il est toujours difficile de dire avec exactitude lequel des paramètres sera optimisé (Collins, 2008).

En conclusion sur la digestion anaérobie à basse température, le développement des réacteurs plus performants aboutissant à un meilleur abattement de la DCO a permis l'essor de la digestion anaérobie psychrophile particulièrement dans le traitement des eaux usées urbaines. Dans les pays tropicaux, il a contribué à promouvoir l'utilisation des réacteurs UASB moins coûteux et plus appropriés pour ces régions. A l'échelle pilote, la digestion anaérobie psychrophile consiste principalement à acclimater des écosystèmes mésophiles à des températures psychrophiles et à évaluer les performances des réacteurs aux basses températures. Si aujourd'hui cette approche semble être une voie salvatrice du procédé anaérobie au froid, il n'en demeure pas moins que les expériences restent assez longues et rendent donc très difficile son application à l'échelle industrielle en dépit de résultats forts intéressants. De plus, il existe très peu de recherches orientées vers l'utilisation des écosystèmes microbiens naturels psychrophiles certainement du fait des connaissances limitées sur le mode de conservation et d'inoculation. Les avancées en biologie moléculaire ont permis un meilleur dimensionnement des réacteurs mais aussi une meilleure connaissance de la microflore présente dans les inocula. Cependant en dépit de ce succès, la digestion anaérobie psychrophile est toujours considérée comme peu applicable à l'échelle industrielle.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ce chapitre est une description de l'ensemble des matériels et des méthodes utilisés au cours de la thèse. Il est divisé en quatre parties. La première partie décrit les origines et les caractéristiques des différents écosystèmes microniens testés. La deuxième partie est une présentation des dispositifs expérimentaux en réacteurs et en fioles. La troisième partie est axée sur les différentes mesures hors ligne et en ligne effectuées pendant les expérimentations sur les réacteurs de conditionnement et les fioles. La dernière partie fait état des différentes analyses moléculaires effectuées en réacteurs ainsi que des fioles et les outils statistiques et de modélisation utilisés pour ces travaux.

2.1. Origines et caractéristiques des écosystèmes

Sept écosystèmes d'origines diverses ont été testés au cours de ce travail. Ils ont été choisis en fonction de critères bien spécifiques: Le procédé de digestion (humide, sèche), le type de substrats traités (effluents, matrices solides) et la température de fermentation (thermophile, mésophile ou psychrophile). Les caractéristiques des écosystèmes sont résumées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Caractéristiques des écosystèmes microbiens étudiés

Inoculum	Température d'origine	Substrat	Type de fermentation	MT(%)	MS(%)
Boues granulaires de Marseille	Mésophile	Effluents de sucrerie	humide	8,5*	7,1*
Boues DVI	Mésophile	Vinasse de distillerie	humide	4,4	4,1
Boues de STEP de Marseille	Thermophile	Boues activées	humide	2,4	1,6
Lixiviats de Varennes-Jarcy	mésophile	Ordures ménagères	sèche	19,1	9,7
Jus de digestat d'OWS	Thermophile	Ordures ménagères	sèche	29,8	13,4
Tourbe Pont-de-martel	Milieu naturel psychrophile	sphaignes	Semi-sèche	18,56	14,45
Tourbe d'Estonie	Milieu naturel psychrophile	sphaignes	Semi-sèche	16,35	12,85

*considérant que l'expansion du lit de boues est de 50%.

La première phase de l'étude a été menée en réacteurs. Le suivi de la production de biogaz cumulé des différents écosystèmes testés nous a permis de déterminer la capacité desdits inocula à dégrader le substrat (éthanol 96%). La seconde phase a été effectuée en fioles de 1 L, elle avait pour but de mesurer l'activité des écosystèmes à sept différentes températures, de 5°C à 55°C.

Après la phase de conditionnement en réacteur sur substrat « éthanol », seuls les écosystèmes capables de dégrader ce substrat ont été utilisés en fioles.

2.2. Dispositifs expérimentaux

2.2.1. Les réacteurs de conditionnement

Le conditionnement des écosystèmes s'est fait en réacteur de 5 L à double enveloppe en verre thermostaté (figure 2.1) afin de maintenir la température du milieu réactionnel proche de la température d'origine de l'écosystème (15°C, 35°C, ou 55°C). L'ajout de l'éthanol s'est fait en mode batch à un ratio de substrat/ biomasse égal à 0,5 gDCO/gMVS. L'agitation était assurée par un agitateur magnétique (variomag electronicrührer). Les réacteurs étaient équipés d'un système de mesure du volume de biogaz produit (compteur Ritter millingas Counter MGC-1). L'acquisition des données (pH et volume de biogaz) était assurée par le logiciel MODULAR SPC développé au laboratoire. L'évolution au cours du temps du volume de biogaz produit a été mesurée pour chaque cycle d'ajout du substrat. Un bilan physico-chimique a ensuite été effectué sur le dernier batch avec mesure du volume de biogaz produit, de la composition du biogaz, de la concentration en DCOsoluble à la fin du dernier batch, de la concentration en MES et MVS dans le réacteur.

Le schéma du dispositif expérimental est présenté à la figure 2.1. Le conditionnement des tourbes s'est fait dans les mêmes conditions excepté le volume du réacteur qui était de 3 L (volume utile 2,5 L). Une dilution avec une solution tamponnée a été nécessaire afin d'ajuster le pH. Concernant l'écosystème «boues granulaires» (BGM), elles ont été agitées jusqu'à ce que les granules se cassent. Pour l'écosystème «Jus de digestat OWS» (JDO), une dilution du digestat brut de 1,5L avec de l'eau et une centrifugation (3000g, 15 minutes à 4°C) ont été faites afin de récupérer le jus.

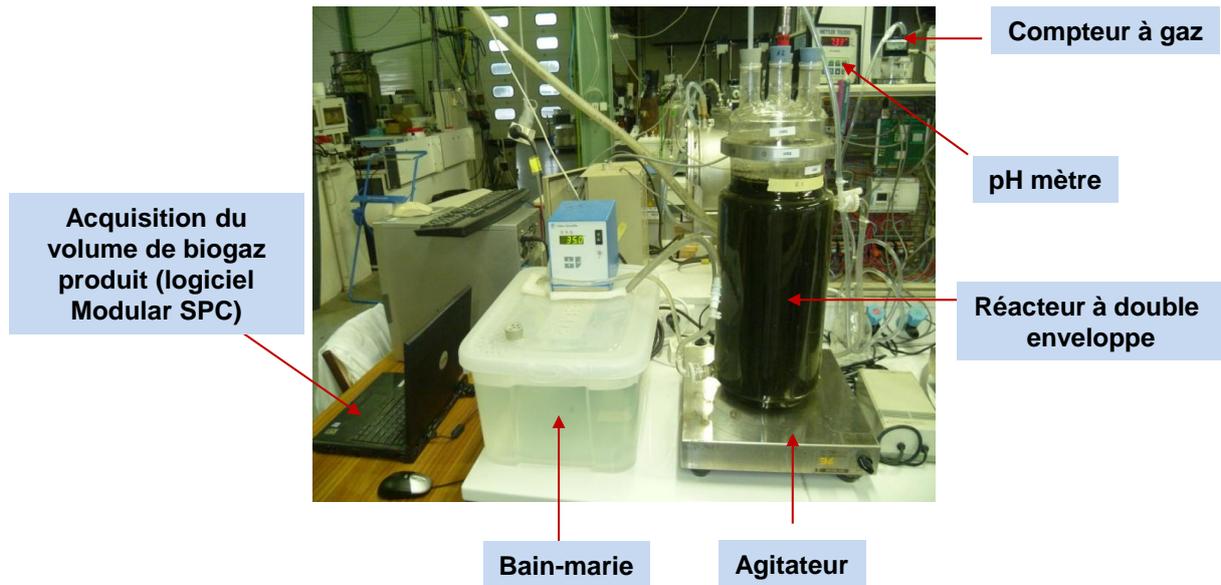


Figure 2.1 : Dispositif expérimental pour les réacteurs de conditionnement.

2.2.2. Les fioles d'adaptation à la température

La phase d'adaptation des écosystèmes à différentes températures s'est faite en fioles ISO de 1 L avec GL 45 central fabriquées sur mesure à partir d'un flacon auquel on a ajouté 2 sorties latérales avec collerette à sertir de diamètre 20 mm. Le dispositif expérimental fiole+ tête d'oxytop et les conditions opératoires de l'inoculation en fioles sont présentés respectivement dans la figure 2.2 et les tableaux 2.2 et 2.3.

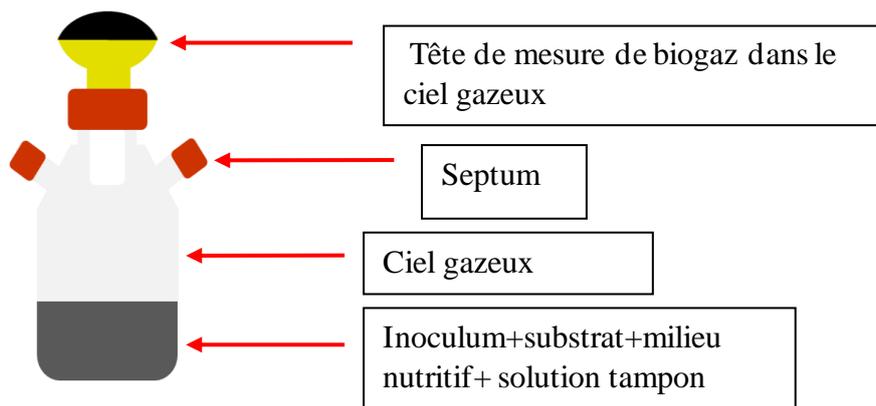


Figure 2.2 : Dispositif expérimental pour les cultures d'adaptation en fioles.

Les fioles ont été inoculées à 3 g.L^{-1} de matières volatiles en suspension avec un volume utile de 300 mL. $1,60 \mu\text{L}$ d'éthanol a été ajouté afin d'obtenir un ratio de substrat sur biomasse de $0,3 \text{ gDCO/gMVS}$. Les volumes d'inoculum, de solutions nutritives et de solution

tampon à ajouter dans les fioles d'adaptation sont dépendants de la concentration en MVS de l'écosystème stock conditionné. Une feuille de calcul Excel a été faite pour obtenir automatiquement ces volumes. Par exemple pour l'inoculum Boues DVI, le volume utile était composé de la manière suivante: 40 ml de solution oligo-éléments, 1, 7 mL de solution macro-éléments, 64,84 mL d'inoculum et 193,46 mL de solution tampon.

Tableau 2.2 : Composition et proportions des différentes solutions mères du milieu nutritif

	Concentration (g.L ⁻¹)	Source de
Solution mère macro-éléments		
NH ₄ Cl	26,6	N
KH ₂ PO ₄	10	K,P
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	6	Mg
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	3	Ca
Solution mère oligo-éléments		
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	2	Fe
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,5	Co
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	0,1	Mn
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	0,1	Ni
ZnCl ₂	0,05	Zn
H ₃ BO ₃	0,05	B
Na ₂ SeO ₃	0,05	Se
CuCl ₂ , 2 H ₂ O	0,04	Cu
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,01	Mo

Tableau 2.3 : Composition et proportions de la solution tampon (volume totale 1L)

Tampon phosphate	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (g)	N (mol)
KH ₂ PO ₄	138	3,47	0,025
K ₂ HPO ₄	228	17,1	0,075

Les fioles + milieu nutritif + solution tampon sont préalablement autoclavés (121°C, 30 mn) et l'ajout de l'inoculum se fait en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Les fioles ont été incubées à différents postes thermostatés aux températures expérimentales (figure 2.3). Les fioles 5°C sont placées dans une chambre froide à 5°C sur une table agitante. Celles à 10°C sont dans un bain-marie de 10°C placé dans la chambre froide à 5°C. Les flacons 15°C sont dans un frigo dont la température a été ajustée à 15°C. Les fioles 23°C et 35°C sont respectivement dans des pièces thermostatées à 23°C et 35°C et celles à 30°C et 55°C sont dans des étuves réglées à 30°C et 50°C. Le suivi des températures est assuré par un système de surveillance et de traçabilité (cf § 2.3.1).

Les fioles sont ensuite placées à leurs températures d'incubation. Après deux heures d'incubation, le substrat est ajouté à travers le septum. Le démarrage des mesures avec les oxitops est aussitôt enclenché. La mise en marche d'une tête à oxitop ainsi que l'acquisition des données sont expliquées en annexe 1.

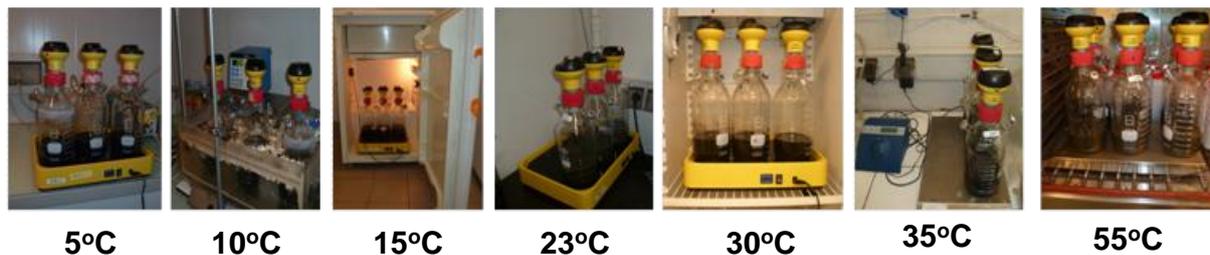


Figure 2.3 : Postes d'incubation des fioles.

2.3. Suivis et analyses physico-chimiques

2.3.1. Suivi et régulation des températures

Chaque incubateur est équipé d'un système récepteur/émetteur Labaguard 2 (AES CHEMUNEX). Ce système enregistre en temps réel comme la température de l'incubateur et transmet les données sur un serveur grâce au logiciel eviSENSE® (figure 2.4).



Figure 2.5 : Compteur ritter

2.3.2.2. Oxitop

C'est une méthode de mesure manométrique de la surpression créée par le biogaz produit lors de la méthanisation. La variation de la pression est enregistrée sur une « tête » qui enregistre en continu la différence de pression accumulée dans le ciel gazeux par rapport à la pression atmosphérique (précision 1%). Les données obtenues sont transmises à distance à un contrôleur par infrarouge (figure 2-6).

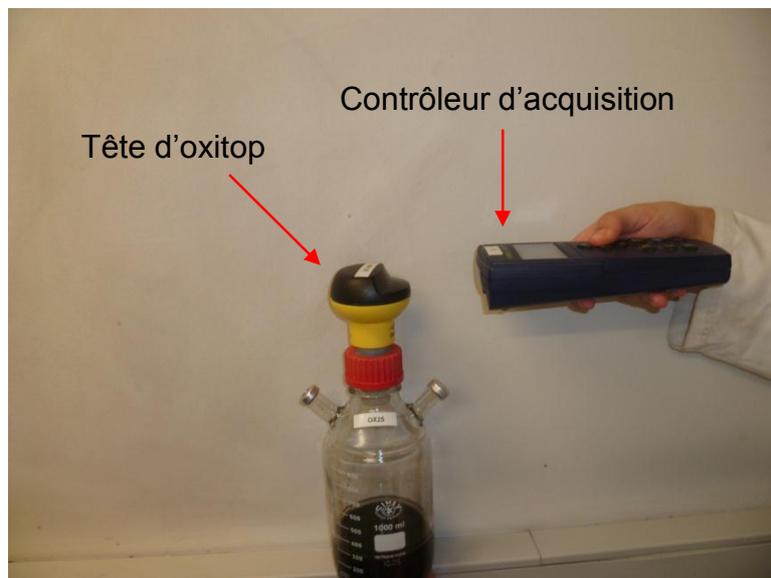


Figure 2.6: Acquisition de données avec le système de mesure oxitop.

Les données stockées, en hPa, sont reportées sur un fichier excel (figure 2.7).

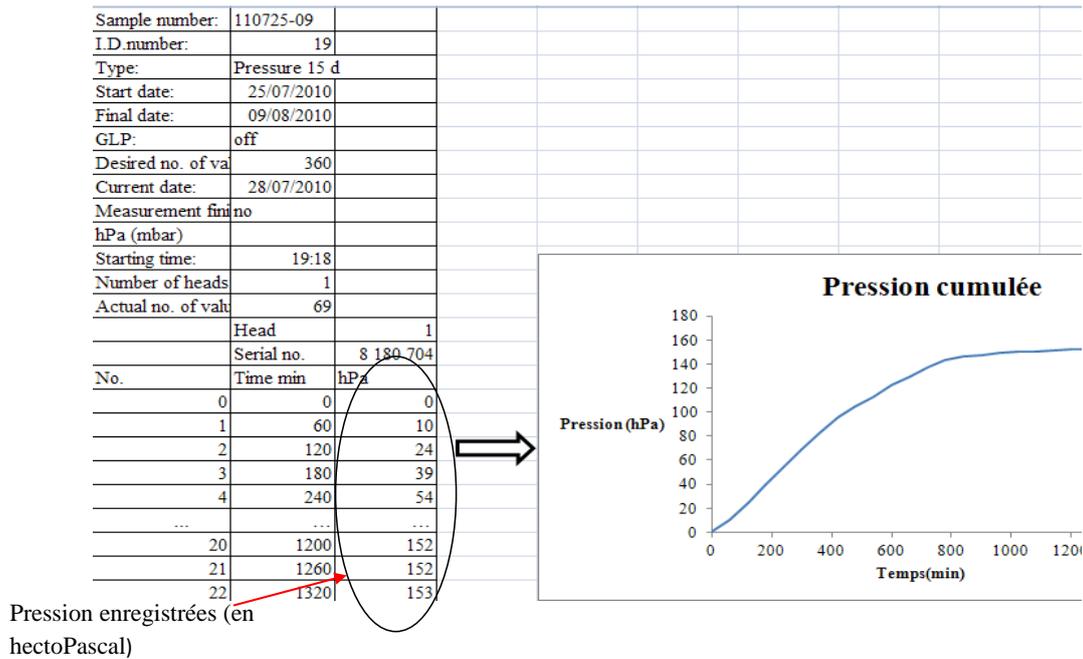


Figure 2.7 : Exemple de données obtenues avec un oxitop.

Il est alors possible d’obtenir le volume de biogaz produit en utilisant la relation présenté dans l’équation 2-1.

$$V_p = \frac{V_{ciel} * \Delta P * 273,15}{P_i * (273,15 + T)} \quad (2-1)$$

V_p : volume de biogaz produit (mL)

P_i : Pression initiale ou Pression atmosphérique (hPa)

ΔP : Pression lue sur l’oxitop (hPa)

T : Température d’incubation (°C)

2.3.3.2 Manomètre numérique

La pression dans les fioles peut être également enregistrée à l’aide d’un manomètre numérique (figure 2-8). Le manomètre utilisé dans le cadre de ces travaux est un manomètre LEO 2 (KELLER Métrologie de la Pression) composé d’un capteur de pression piézorésistif. Les données sont stockées dans une EEPROM. Le microprocesseur LEO 2 lit le signal du capteur de pression et calcule la pression avec une précision de 0,1 %. La pression est mesurée et affichée 2 fois par seconde. L’affichage supérieur indique la pression actuelle et l’affichage inférieur la pression maximale (MAX) ou minimale (MIN) depuis le dernier RESET. Le manomètre LEO 2 comporte 2 touches de commande. La touche de gauche met en marche le manomètre et autorise le choix d’une fonction telle que l’unité de pression. La

touche de droite active la fonction choisie. Elle permet aussi de passer de l'affichage de la pression maximale à celui de la pression minimale.

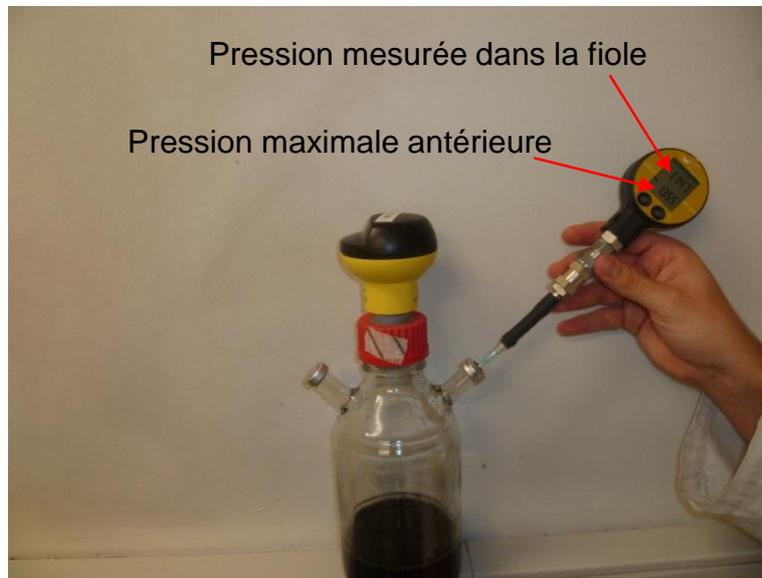


Figure 2.8: Acquisition des données avec le système manomètre numérique

2.3.3. Détermination de la demande chimique en oxygène

La méthode de mesure de demande chimique en oxygène utilisée au cours de ce travail est celle de la microméthode à l'aide d'un kit Spectroquant de marque AQUALYTIC. Le principe du dosage s'applique uniquement à la détermination de la demande chimique en oxygène des solubles oxydables par le dichromate. Le principe de l'analyse consiste en l'oxydation de la matière organique contenue dans un échantillon en milieu acide (H_2SO_4), en présence d'un catalyseur ($AgSO_4$), par le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). Au cours de l'analyse, l'échantillon au préalable dilué (afin de rester dans la gamme de détection de la DCO du kit comprise entre 0 et $1500\text{ mg O}_2.L^{-1}$.) à un volume total de 2 ml de solution finale à tester est placé dans un réacteur de minéralisation pendant 2 heures à $150^\circ C$. Après refroidissement, la DCO de l'échantillon est déterminée par la mesure de l'absorption à 620 nm grâce à un spectrophotomètre (HACH DR/2000).

2.3.4. Dosage des Acides Gras Volatiles (AGV)

La nature et la concentration des acides gras volatils (AGV) sont déterminées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse GC800 (Fisons Instruments) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un passeur automatique d'échantillons AS800. La colonne utilisée est une colonne Econocap FFAP (Alltech) d'une longueur de 15 m et d'un diamètre de 0,53

cm, avec une épaisseur de film de 1,2 μm . La température de l'injecteur est de 250°C, celle du détecteur de 275°C. La montée en température du four est programmée de 80°C à 120°C en 3 minutes. Le gaz vecteur est un mélange d'azote (25 kPa), d'hydrogène (50 kPa) et d'air (100 kPa). Le volume d'échantillon injecté est de 1 μL . L'analyse est effectuée sur la phase soluble (surnageant de centrifugation). La méthode employée est celle de l'étalon interne (1 g d'acide éthyl-2-butyrique dans 1L d'eau acidifiée à 5 % avec H_3PO_4). La gamme d'étalonnage est préparée à partir de six composés (acides acétique, propionique, iso-butyrique, butyrique, iso-valérique et valérique) à 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ chacun. Les échantillons sont préparés, tout comme la gamme étalon (1mL), en mélangeant 0,5 mL d'échantillon (éventuellement dilué pour être dans la gamme d'étalonnage) et 0,5 mL d'étalon interne. La gamme d'étalonnage est comprise entre 0,25 et 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et le seuil de quantification est situé à 0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. L'erreur de mesure est de l'ordre de 2 à 5 %.

2.3.5. Dosage de l'éthanol

Deux méthodes ont été utilisées pour le dosage de l'éthanol.

La première méthode est le dosage par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un appareil Intersmat IGC 121 DFL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est une colonne remplie : 60/80 Carbopack B / 5% Carbowax 20 M. Une solution de 2 μL composée d'un volume de la solution à doser et d'un volume d'une solution aqueuse de méthanol (étalon interne) est injectée. La température de l'injecteur est de 150°C, celles du four et du détecteur sont respectivement de 85°C et 150°C. La pression du gaz vecteur, l'azote, est 1,8 bar, celle de l'hydrogène est de 1 bar et celle de l'air est de 0,9 bar.

La seconde méthode est par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les analyses sont faites avec un système couplé de matériel Waters/Dionex et une colonne de chromatographie de chez Biorad : HPX87H. L'éluant utilisé est l'acide sulfurique à 0,005 M et le débit de la pompe est calibré à 0,4 $\text{mL}\cdot\text{mn}^{-1}$. Un volume d'échantillon compris entre de 0,5 et 0,9 mL est prélevé et mis dans les « vials » adaptées au passeur automatique Waters 717. La température de la colonne est de 35°C.

2.3.6. Détermination des matières sèches et des matières volatiles (MES, MVES, MS, MO)

Afin de déterminer la teneur en matière en suspension (MES) ou en matière volatiles en suspension (MVS), un volume ($V_{\text{échantillon}}$) d'échantillon liquide de 15 mL est centrifugé pendant 15 minutes à 15 000 rpm à 4°C. Le culot de centrifugation est introduit dans un

creuset en porcelaine préalablement séché, de masse connue (P_1). Cette capsule est ensuite placée dans une étuve à 105°C pendant 24 heures. L'eau est ainsi évaporée et il ne reste dans le creuset que la matière sèche. Durant ce séchage, les composés volatils comme les AGV sont volatilisés : ils ne sont pas comptés dans la mesure de la matière sèche. Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur (P_2). La différence de masses correspond donc à la matière sèche contenue dans l'échantillon : la matière en suspension peut alors être mesurée. Le creuset est ensuite mis au four à 550°C pendant deux heures. Après refroidissement, le creuset est de nouveau pesé (P_3) : il ne reste plus que la matière minérale. La masse de la matière organique est obtenue par différence entre la masse de matière sèche et la masse de matière minérale. La matière organique est assimilée à la matière volatile à 550°C.

Les matières en suspension et les matières volatiles en suspension sont donc calculées suivant les formules :

$$MES = \frac{P_2 - P_1}{V_{\text{échantillon}}} \text{ en g.L}^{-1} \quad (2-2)$$

$$MVS = \frac{P_2 - P_3}{V_{\text{échantillon}}} \text{ en g.L}^{-1} \quad (2-3)$$

Les matières sèches (MS) et les matières organiques (MO) sont déterminées de la même façon mais sans étape de centrifugation. Les mesures sont réalisées en triplicat.

2.3.7. Détermination de la composition du biogaz (pourcentage de méthane)

La composition du biogaz est déterminée par chromatographie en phase gazeuse grâce à un analyseur GC-8A (commercialisé par Shimadzu) relié à un intégrateur de type C-R3A (Shimadzu). Ce chromatographe permet le dosage de six composés : CO₂, N₂O, H₂, O₂, N₂ et CH₄. La séparation est réalisée grâce à deux colonnes montées en série. La première est une colonne Hayesep Q (Touzart & Matignon) garnie de Silicagel avec une granulométrie de 80 à 100 mesh, d'une longueur de 2 m et d'un diamètre de 3,175 mm, elle permet la séparation du CO₂ et du N₂O. Dans le cas de la seconde colonne, la séparation des quatre autres gaz est réalisée grâce à un tamis moléculaire 5Å (Touzart & Matignon), d'une longueur de 2 m, d'un diamètre de 0,125 inch avec une granulométrie de 80 à 100 mesh. Les deux colonnes sont séparées par une colonne vide de 10 m de long, qui ralentit le passage des gaz au niveau du tamis moléculaire. Le gaz vecteur utilisé est l'argon (2,8 bars). La température du four est de 30°C, celle de l'injecteur et du détecteur de 100°C. Le volume d'injection est de 1 mL. La

détection est réalisée à l'aide d'un catharomètre (principe du pont de Wheatstone) dont l'intensité du courant est fixée à 80 mA. La concentration des échantillons est déterminée par étalonnage externe. Le gaz étalon utilisé est composé de 25% (v/v) de CO₂, 0,2 % de N₂O, de 5 % d'H₂, de 2 % d'O₂, de 10 % de N₂ et de 57,8 % de CH₄. L'erreur de mesure est de l'ordre de 5%.

2.3.8. Définition de paramètres de calculs

2.3.8.1. Les charges organiques

La charge organique permet de comparer l'alimentation des différents réacteurs. Elle peut être volumique ou massique. Dans le premier cas, elle exprime le flux de matière rapporté à l'unité de volume du réacteur (équation 2-4) et dans le second cas, elle est rapportée à la quantité de biomasse présente dans le réacteur (équation 2-5). La charge s'exprime souvent en DCO pour les effluents et en quantité de matières volatiles pour les solides, dont la DCO est plus difficile à caractériser. Dans le cadre de nos travaux, elle a été exclusivement ramenée à la quantité de DCO introduite étant donné que nous traitons uniquement des substrats liquides.

$$CVA = \frac{DCO_{con}}{t * Vu} \quad \text{en gDCO.L}^{-1}.\text{j}^{-1} \quad (2-4)$$

$$CMA = \frac{CVA}{MVS} \quad \text{en gDCO.gMVS}^{-1}.\text{j}^{-1} \quad (2-5)$$

t: Durée (en j)

Vu : Volume utile du réacteur (L)

DCO_{in} : DCO introduite (gDCO.L⁻¹)

MVS : Matières Volatiles en Suspension

CVA : Charge Volumique Appliquée

CMA : Charge Massique Appliquée

2.3.8.2. Le rendement épuratoire en DCO

Il est basé sur la mesure de la DCO dégradée (DCO_{dég}) et la DCO introduite (DCO_{in}) et la DCO non consommée (DCO_{out}) selon l'équation

$$DCO_{dég} = DCO_{int} - DCO_{out} \quad \text{en g.L}^{-1} \quad (2-6)$$

$$Y_{ep} = \frac{DCO_{in} - DCO_{out}}{DCO_{int}} \times 100 \quad \text{en \% (2-7)}$$

2.3.8.3 Activité spécifique des méthanogènes

$$SMA = \frac{V_{CH_4}}{DCO_{deg} \cdot j} \quad \text{en mLCH}_4 \cdot \text{gDCOdeg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1} \dots \dots (2-8)$$

2.4. Analyses moléculaires

L'étude des espèces microbiennes présentes au sein d'échantillons complexes est schématisée sur la figure 2.9. Les techniques mises en œuvre sont basées sur l'extraction de l'ensemble des ADN génomiques présents dans un échantillon, la détection et l'analyse des gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S, présent chez tous les procaryotes. Les variations génétiques sur ce gène sont porteuses d'informations phylogénétiques et les modifications de structure génétique des communautés dans leur ensemble peuvent être observées par empreinte moléculaire (« fingerprint » en anglais) et interprétées par des analyses statistiques multivariées.

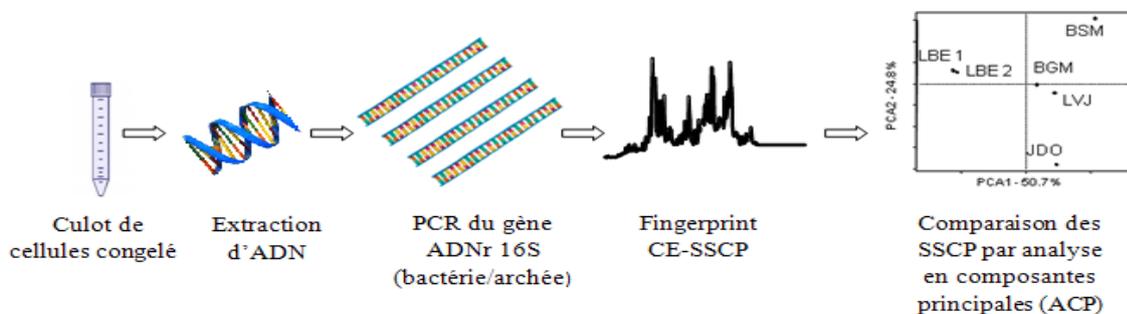


Figure 2.9: Représentation schématique de la démarche globale pour la caractérisation et le suivi des populations microbiennes des écosystèmes.

2.4.1. Prélèvement et conservation des échantillons

Les échantillons de boue sont prélevés dans les réacteurs de 5L avant et après conditionnement. En fioles, les prélèvements ont été réalisés à la fin de la phase d'adaptation. Pour chaque prélèvement, 2 mL de boue ont été centrifugés à 7000 rpm pendant 10 minutes. Le culot sec est conservé à -20°C avant extraction d'ADN.

2.4.2. Extraction et purification d'ADN génomique des échantillons

Le protocole détaillé d'extraction et de purification des ADN totaux est décrit par Godon et al.(1997). La lyse cellulaire est réalisée par chauffage à 70°C pendant 1 heure puis par action mécanique des micro-billes de zirconium de 100 µm de diamètre dans un vibro-broyeur (MM200, Retsch) pendant 10 minutes à la vitesse maximale. Le polyvinylpyrrolidone (PVPP) est ensuite ajouté afin d'éliminer les composés phénoliques, inhibiteurs des réactions enzymatiques et en particulier de la réaction en chaîne par polymérisation ou Polymerase Chain Reaction (PCR). L'ADN génomique est ensuite précipité à l'isopropanol puis purifié sur micro-colonne du Kit QIamp DNA Mini Kit (Qiagen). La quantité et la pureté des acides nucléiques extraits sont déterminées par la mesure de l'absorbance (DO_{260} et DO_{260}/DO_{280} respectivement) à l'aide de l'appareil Infinite M200 Reader (Tecan). Les ADN extraits ont été enfin conservés à -20°C avant leur amplification PCR.

2.4.3. Amplification de la région variable V3 de l'ADN ribosomique 16S

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est utilisée pour amplifier exponentiellement un fragment de génome ciblé spécifiquement par des oligonucléotides nommés amorces (« primers » en anglais). Dans cette étude, un fragment d'ADN de 200 pb englobant la région variable V3 du gène de l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S) a été spécifiquement ciblée. Les amorces universelles bactériennes utilisées w49 (sens) et w104 (antisens) entourent la région V3 de l'ADNr 16S et ciblent des zones hautement conservées du gène ADNr 16S au sein des bactéries. Pour les archées, d'autres amorces spécifiques sont utilisées (tableau 2.4).

Tableau 2.4: Séquences and positions ciblées de l'ADNr 16S, des amorces pour PCR et CE-SSCP

Amorces	Séquences (5'- 3')	Position dans <i>E.coli</i>	Marqueur fluorescent	Sens(F) Antisens(R)	ADNr16S ciblé	Références
W49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	330		F	<i>Bacteria</i>	Zumstein et al 2000
W104	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	533	FAM	R	Universelle	Zumstein et al 2000
W274	CCCTACGGGGCGCAGCAG	340		F	<i>Archaea</i>	(Ovreas et al., 1997)
W275	GGWTACCTTGTTACGACTT	519	FAM	R	<i>Archaea</i>	(Ovreas et al., 1997)

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Un marqueur fluorescent FAM (6-carboxy-fluorescein) est positionné en position 5' sur l'un des deux brins de chaque couple d'amorces afin de pouvoir détecter les produits PCR lors de l'analyse en séquenceur capillaire (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) par CE-SSCP. L'amplification est faite dans un volume réactionnel final de 50 μL (tableau 2.5), à l'aide de la polymérase possédant une activité de correction des erreurs de lecture (Pfu turbo, Stratagène), dans un thermocycleur (EPgradient, Eppendorf), suivant les programmes détaillés dans le tableau 2.6.

Tableau 2.5: Constituants réactionnels utilisés pour la PCR-SSCP

Produits	Volume (μL)
Enzyme polymérase (Pfu turbo 2.5 U/ μL)	0,5
Tampon 10X Pfu turbo	5
dNTP (200 nM/amorce)	4
Amorces sens (400 nM, bactéries & 500 nM, archées)	1
Amorce antisens (400 nM, bactéries & 500 nM, archées)	1
ADN génomique	1
Eau ultrapure	37,5

L'amplification est vérifiée en déposant 5 μL du produit PCR sur 2% gel agarose et 5 μL du marqueur de taille 100 bp (invitrogen).

Tableau 2.6 : Paramètres de la PCR

Étapes	Microorganismes			
	Bactéries		Archées	
	Température	Durée	Température	Durée
Dénaturation initiale	94°C	2 min	94°C	2 min
Dénaturation	94°C	30 sec	94°C	30 sec
Hybridation	61°C	30 sec	65°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec	72°C	30 sec
Elongation finale	72°C	10 min	72°C	10 min
Nombre de cycles	25		30	

La qualité de l'amplification et la taille des produits PCR ont été contrôlées par électrophorèse capillaire en puce DNA Chip 1000 (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies).

2.4.4. Empreinte moléculaire par Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP)

Une empreinte moléculaire (« fingerprint » en anglais) est basée sur la séparation des molécules d'ADN par électrophorèse sur la base de leur séquence nucléotidique. Ainsi, il est possible d'obtenir facilement et rapidement une image globale de la diversité génétique contenue dans un mélange complexe d'ADN. Avant l'analyse CE-SSCP, les produits PCR ont été dilués (1 µL) et mélangés à 18.925 µL de formamide et 0.075 µL d'étalon interne (GS 400 HD-ROX, Applied Biosystems). Ils ont été ensuite dénaturés par chauffage (5 min à 95°C) puis refroidis rapidement (10 min dans de la glace). A la suite de cette soudaine dénaturation, les fragments d'ADN simple brin adoptent une conformation secondaire stable qui permettra de les séparer par électrophorèse capillaire. La détection des produits PCR est réalisée grâce au marquage fluorescent de l'amorce marquée. L'électrophorèse a été réalisée dans un séquenceur (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) équipé d'un capillaire de 50 cm de long contenant 5.6% de polymère non dénaturant CAP (Applied Biosystems). L'électrophorèse a été réalisée à 12 kV pendant 30 minutes à 32°C. Les profils génétiques obtenus ont été alignés grâce à l'échelle moléculaire GS 400 HD ROX servant d'étalon interne pour prendre en compte d'éventuelle différence de mobilité électrophorétique entre échantillon. L'intensité du signal obtenu a été normalisée et l'abondance relative des pics a été extraite des profils en utilisant la librairie StatFingerprints (Micheland et al, 2009a) du logiciel R 2.10.1 (R development Core Team, 2009). Les analyses multivariées sur les empreintes génétiques ont été réalisées par la librairie vegan (Oksanen et al, 2010) du logiciel R.

2.4.5. Analyses statistiques

Les divergences génétiques entre les profils CE-SSCP des écosystèmes aux différentes températures expérimentales ont été comparées par distance euclidienne. One-way ANOVA et des régressions linéaires ont été effectuées pour comparer des ensembles de données de production de méthane.

2.4.6. Modélisation des données

Afin de déterminer les paramètres de production de biogaz obtenus pour les différents batchs en réacteurs de conditionnement, les données ont été ajustées à une équation de Gompertz modifiée (2-9) en utilisant le logiciel Matlab (version 6.5 MathWorks®):

$$B(t) = P \cdot \exp\{-\exp[R_m \cdot e / P (\lambda - t) + 1]\} \quad (2 - 9)$$

P représente la production maximale de biogaz (NmLbiogaz.gMVS⁻¹), R_m est le vitesse maximale spécifique à la production de biogaz (NmLbiogaz.gMVS⁻¹.j⁻¹), λ est le temps de latence (jour), t est le temps d'incubation (jour) et e exp (1) (Quéméneur et al., 2011).

Pour chaque inoculum, l'activité spécifique des méthanogènes a été ajustée en fonction de la température d'incubation en utilisant le modèle de Rosso (Rosso et al., 1995).

**CHAPITRE 3 : POTENTIEL DE CINQ ÉCOSYSTÈMES
ANAÉROBIES INDUSTRIELS À S'ADAPTER À LA
PRODUCTION DE BIOGAZ À PARTIR D'UN SUBSTRAT
FACILEMENT BIODÉGRADABLE: CARACTÉRISATION
CINÉTIQUE ET MICROBIENNE**

Avant-propos :

Des tests d'activité sont régulièrement effectués en digestion anaérobie. Ces tests consistent à vérifier la capacité d'un consortium microbien à dégrader un substrat test et permettre ainsi d'évaluer la qualité dudit consortium. La majorité des tests se limite à estimer le potentiel méthanogène des archées méthanogènes localisées à la fin de la chaîne trophique de la digestion anaérobie. L'activité est généralement estimée en condition batch en mesurant le biogaz produit après ajout de substrat (Rozzi & Remigi, 2004)

En dépit d'une masse de données générées importantes, la comparaison des données de biodégradabilité dans la littérature est très difficile. Ce n'est pas seulement dû à la variabilité de l'équipement utilisé, mais aussi aux différentes conditions et protocoles utilisés. En outre, les résultats sont souvent présentés dans des unités variables qui rendent les comparaisons très difficiles (Angelidaki et al., 2009). Plusieurs études ont été menées afin de définir une méthodologie compréhensive de détermination du potentiel méthanogène (Angelidaki et al., 2009; Lesteur et al., 2010). Cependant, le plus souvent ces méthodes occultent l'aspect microscopique.

L'objectif de ce travail était de vérifier le potentiel d'adaptation d'écosystèmes microbiens de digestion anaérobie à une molécule facilement biodégradable, l'éthanol. Pour cela, sept consortia microbiens couvrant une variété de procédés et de conditions opératoires, notamment vis à vis de la température, ont été choisis. A la suite d'une première phase qui a consisté à conditionner ces écosystèmes à l'éthanol (substrat test) seuls cinq écosystèmes (mésophiles et thermophiles) ont été capables de s'adapter à l'éthanol. Les écosystèmes psychrophiles n'ayant pas donné les résultats escomptés, ils ne font donc pas partie des résultats présentés dans cette étude. Par la suite, des analyses microbiologiques sur les écosystèmes opérationnels ont pu établir le lien entre changements de structure des communautés microbiennes et leur capacité d'adaptation à fermenter l'éthanol à leur température de référence.

Titre en anglais: **Potential of five industrial anaerobic ecosystems for adaptation to biogas production from a readily-biodegradable substrate: Kinetic and microbial characterization**

Personnes impliquées: Charlie Mabala, Jean-Philippe Delgenès, Anaïs Bonnafous, Michel Torrijos, Nicolas Bernet, Jean-Philippe Steyer, Jérôme Hamelin

Abstract

The potential of five ecosystems from various sources to adapt to biogas production using ethanol was investigated. Ecosystems varied according to their temperature (mesophilic or thermophilic), water content (wet to dry), process (suspended biomass, biofilms, granules) or feed (sludge, household or agribusiness wastes). In four out of the five ecosystems, specific methanogenic activity (SMA) rose to 79% after 4 to 7 ethanol batches in lab-scale bioreactors. Bacterial and archaeal community structures were assessed before and after the adaptation period using molecular fingerprinting profiles (CE-SSCP). The changes in CE-SSCP profiles were quantified by principal component analysis (PCA). Significant correlations of SMA improvement with the bacterial ($r^2=0.617$, $P=0.033$) and archaeal ($r^2=0.570$, $P=0.039$) communities were highlighted. To sum up, different bacterial populations ensured the ecosystems efficient performance and ability to adapt.

Keywords: Anaerobic digestion, adaptation, specific methanogenic activity, 16S ribosomal RNA, Microbial community diversity.

3.1. Introduction

Anaerobic digestion is a well-established technology for the treatment by microbial consortia of polluted organic residues such as sewage, animal manure, industrial effluent and solid substrates by microbial consortia, with biogas as the end product (Raposo et al., 2011b). Several industrial processes are currently in use for treating solid residues, depending on to the water content of such residues. For the treatment of effluents, processes based on suspended biomass are common, along with more intensive processes with microorganisms embedded on biofilms or in granules (Habouzit et al., 2010). Also, operational temperatures range considerably. Psychrophilic temperatures ($20^{\circ}\text{C} <$) are seldom used and then only in the treatment of specific waste with mesophilic ecosystems (Zhang et al., 2011). For industrial anaerobic digesters, the most frequent temperatures are mesophilic (around 35°C) or thermophilic (55°C or above).

For anaerobic digestion process, standard activity tests have been used to assess reactor performance and biomass quality. Activity is defined as the inherent capacity of resident microbial populations to degrade a standardized test material (Rozzi & Remigi, 2004). Most activity tests are limited to assessing specific methanogenic activity since they target the final step of the anaerobic digestion process that relies on the very sensitive methanogenic *Archaea*. Activity is generally estimated in batch conditions by measuring biogas production after substrate addition (Sorensen & Ahring, 1993). Some studies have pointed out comprehensive methods based on the biochemical methane potential of organic wastes (Angelidaki et al., 2009). Biochemical methane potential (BMP) has been developed to ascertain the methane production of a given substrate during its anaerobic degradation. The procedure is suited both to determining the range of anaerobic digestibility of different substrates with a given sludge inoculum (Raposo et al., 2011a), and to evaluating the range of biomass activities of various anaerobic inocula on a single model substrate (Lopes et al., 2004). Many factors affect the optimization of anaerobic digestion biodegradability, including the origin of the sludge inoculum, the substrate, and the operating conditions (Raposo et al., 2011a; Raposo et al., 2011b).

Hence, these factors should be clearly defined and characterized before BMP assays are undertaken. To this end, experiments focusing on the effect of the proportion of substrate to inoculum on anaerobic digestion have been carried out (Lopes et al., 2004) as well as experiments dedicated to specific substrates (Angelidaki et al., 2009). Only a few studies have been undertaken focusing on the influence of biomass characteristics in anaerobic digestion (Elbeshbishy et al., 2012; Lopes et al., 2004), due no doubt to the lack of a standardization procedure for acclimation or adaptation of sludge inocula (Raposo et al., 2011a). The origin of the sludge is one of the major parameters affecting BMP assays since it determines the initial activity of the microorganisms during the test (Elbeshbishy et al., 2012).

Advances in culture-independent molecular biological techniques have helped broaden understanding of microbial diversity in anaerobic digestion (Godon et al., 1997; Nelson et al., 2011). Molecular tools such as fingerprinting profiles or gene inventories have made it possible to study the dynamics of diversity during the start-up of a biofilm reactor (Cresson et al., 2009) and the dynamics of communities in mature digesters (Zumstein et al., 2000). They have permitted study of the impact of certain pollutants on diversity (Siggins et al., 2011), the adaptation of ecosystems to increasing salinity (Lefebvre et al., 2007), the shift in community structure with the development of anaerobic granules (McKeown et al., 2009) and the acclimation of a mesophilic inoculum to psychrophilic temperatures (Collins et al., 2006a; Siggins et al., 2011).

In the light of the above, the present work aimed at studying the link between the structural diversity of a biomass along with its specific activity and subsequent changes during its adaptation to an activity test substrate. To achieve this goal, five industrial ecosystems differing in the type of fermentation (wet, semi-dry, dry,), their reactors processes and temperatures (mesophilic, thermophilic) were tested.

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Origins of the ecosystems

The five industrial ecosystems were taken from full-scale anaerobic treatment plants. One sludge was taken from a full-scale anaerobic UASB reactor treating effluents from the sugar industry (named *BGM*). A second sludge was taken from a full-scale wastewater treatment plant (named *BSM*) and a third sludge was taken from a 1 m³ anaerobic digester treating distillery vinasse (named *DVI*). The leachate (named *LVJ*) and the digestate supernatant (named *JDO*) originated from full-scale reactors treating household waste. The initial characteristics of the ecosystems are summarized in Table 3.1.

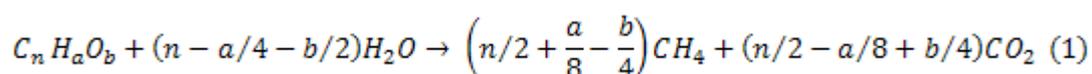
Table 3.1: Characteristics of the five industrial anaerobic reactors. TS = Total Solids, VS = Volatile Solids

Type of ecosystem	Temperature (°C)	Process	Type of fermentation	Feed	TS (%)	VS (%)
<i>BGM</i>	35	UASB	Wet	Sugar industry effluent	8.5*	7.1*
<i>DVI</i>	35	Fixed bed with carrier	Wet	Industrial distillery vinasses	4.4	4.1
<i>BSM</i>	55	CSTR	Wet	WWTP sludge	2.4	1.6
<i>LVJ</i>	35	Plug flow	Dry	Household waste	19.1	9.7
<i>JDO</i>	55	Plug flow	Dry	Household waste	29.8	13.4

*Based on granular sludge bed expansion of 50%

3.2.2. Bioreactors operating conditions

The experiments were carried out in 5 double-walled reactors of 5 L effective volume, maintained by a thermostatically-regulated water bath at either 35°C or 55°C to correspond to the temperatures of the industrial reactors. The reactors were fed by batch additions of ethanol at 0.5 gCOD_{added}.gVSS⁻¹_{reactor}. Mixing in the reactors was done by magnetic stirring (Variomag® Mobil Direct 230V) at 500 rpm. Biogas production was measured online by Milligascounter MGC-1 flow meters (Ritters gas meters) fitted with a 4-20 mA output. The “Modular SPC” software was used to acquire the data (gas output and pH). Online biogas measurements made it possible to follow the progress of the reaction phase. A batch was considered as completed when the biogas volume in the experiment reached the expected theoretical volume given by the Buswell Equation (1) for ethanol, namely 467 mL.gCOD⁻¹.



The margin of error was from 2% to 5%. The operating conditions for each ecosystem are presented in Table 2.

Table 3.2: Operating conditions in the experimental reactors. Abbreviations as follows: SS, Suspended Solids, VSS, Volatile Suspended Solids, COD, Chemical Oxygen Demand, SCOD, Soluble Chemical Oxygen Demand.

Type of ecosystem	Temperature (°C)	SS (g.L ⁻¹)	VSS (g.L ⁻¹)	SCOD (g.L ⁻¹)	pH	COD added per cycle (g)	Number of batches
<i>BGM</i>	35	19.3	16.3	1.6	7.3	8.16	5
<i>DVI</i>	35	14.8	13.7	0.8	7.3	6.85	7
<i>BSM</i>	55	10.8	6.2	7.6	8.1	3.12	5
<i>LVJ</i>	35	4.1	2.4	7.5	8.2	1.21	4
<i>JDO</i>	55	4.8	3.2	7.5	8.2	1.61	4

Two milliliters of each inoculum were collected from reactors and then centrifuged at 7500 g for 10 min before the initial batch and after the final batch. The pellets were stored at -20°C

awaiting DNA extraction. The experiments lasted from 1 week to 2 months depending on the ecosystem.

3.2.3. Physico-chemical analyses

All the analyses were carried out before the initial ethanol batch and at the end of the final batch. Soluble Chemical Oxygen Demand (SCOD) analysis was preceded by a centrifugation step (8000 g, 15 min, 4°C). The COD was measured by a colorimetric method using Hach 0-1.500 mg/l vials (Jirka & Carter, 1975). Total Solids (TS), Volatile Solids (VS) and Volatile Suspended Solids (VSS) were measured following *Standard Methods* (APHA, 1992).

Volatile fatty acid (VFA) concentrations were measured using a gas chromatograph (GC-8000, Fisons Instruments) equipped with a flame ionization detector and an automatic sampler (AS 800, Fisons instruments). The column used was a semi-capillar Econocap FFAP (Alltech) column with 15 m length, 0.53 cm diameter and 1.2 µm Phase ECTM 1000 film. The temperature of the splitless injector was 250°C, the temperature of the detector was 275°C. The temperature increased from 80°C to 120°C in 3 min. The carrier gas was nitrogen (25 kPa). One µL of sample was injected. The calibration was made with a mixture of 6 acids (standard solution): acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4), isobutyric (iC4), valeric (C5) and iso-valeric (iC5) acids at 1 g.L⁻¹ each. The calibration range was 0.25 to 1 g.L⁻¹ by dilution of the standard solution. The internal standard method (1 g of ethyl-2-butyric acid in 1 L of water acidified with 50 mL of H₃PO₄) was used to measure total VFA concentration by mixing equal volumes of the internal standard solution and the sample or the standard solution. The margin of error was between 2 % and 5 % with a quantification threshold of 0.1 g.L⁻¹. The concentrations of ethanol were measured by HPLC in accordance with Quéméneur et al (2011). Biogas composition was determined using a gas chromatograph (Shimadzu GC-8A) connected to a C-R3A integrator and equipped with a CTRI Alltech column. The following gases were measured: CO₂, H₂, O₂, N₂ and CH₄. The column was made up of 2 concentric columns: the 3.175 mm-diameter inner column permitting the separation of CO₂ from the other gases was filled with Silicagel, while the other gases were separated in the 6.350 mm-diameter outer column filled with a molecular sieve. The carrier gas was argon at 2.8 bars. The temperatures were 30°C for the oven and 100°C for the injector and the detector. The detection of gaseous compounds was done using a thermal conductivity detector

and the intensity of current was 80 mA. The volume of injected biogas was 1 ml. The calibration was done with a standard gas composed of 25 % CO₂, 5 % H₂, 2 % O₂, 10 % N₂ and 58 % CH₄. The margin of error was 5 %.

To determine biogas production parameters obtained for the different batches, data were fitted to a modified Gompertz equation (2) using Matlab software (version 6.5 MathWorks®):

$$B(t) = P \cdot \exp\{-\exp[R_m \cdot e/P(\lambda - t) + 1]\} \quad (2)$$

where P is the maximum biogas yield (NmLbiogas.gVSS⁻¹), R_m is the maximum specific biogas production rate in (NmLbiogas.gVSS⁻¹.day⁻¹), λ is the lag-phase time (day), t is the incubation time (day) and e is exp(1) (Quéméneur et al., 2011).

Specific methanogenic activity (SMA) was measured (in gCOD. gVSS⁻¹.day⁻¹) from the substrate degradation rate (ds/dt) as described by Soto et al.(1993) in equation (3)

$$(A_{c_m})_S = - (ds/dt) / X_0 \quad (3)$$

Where A_{c_m} is the specific methanogenic activity, X_0 is the volatile suspended solids concentration and S is the COD concentration.

3.2.4. Molecular analyses

DNA was extracted as described by Godon et al.(1997). The amount and purity of DNA in the extracts were measured by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan).

To analyze the structure of the bacterial and archaeal communities, the V3 region of the 16S rRNA genes was amplified using, for *Bacteria*, the universal primers W49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3', *Escherichia coli* position F331) and 5'-fluorescein phosphoramidite-labeled W104 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3', *E. coli* position R533) and, for *Archaea*, the universal primers W274 (5'-CCCTACGGGGCGCAGCAG-3', *E. coli* position R340) and 5'-fluorescein phosphoramidite-labeled W275 (5'-TTACCGCGGGCGGCTG-3' *E. coli* position R519) (Shin et al., 2010). Each PCR mixture (50 µL) contained 1X *Pfu* Turbo DNA polymerase buffer, 200 µM of each dNTP, 130 ng of each primer, 0.5 U of *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene) and 1 to 5 ng of genomic DNA.

Reactions were performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf). After an initial denaturation step at 94°C for 2 min , 25 temperature cycles for *Bacteria* and 30 cycles

for *Archaea* were carried out at 94°C for 30 s., 51°C for 30 s for *Bacteria* and 61 for *Archaea*, 72°C for 30 s , and 72°C for 10 min.

One µL of the appropriate dilution of the PCR product was mixed with 18.5 µL of formamide and 1.5 µL of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Samples were heat-denatured at 95°C for 5 min and immediately cooled in ice. Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) was performed in an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) with 50 cm-long capillary tubes filled with a non-denaturing 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems). Samples were eluted at 12 kV and 32°C for 30 min.

The CE-SSCP fingerprinting profiles were aligned with the internal standard to take into account inter-sample electrophoretic variability. The CE-SSCP fingerprinting profiles were normalized using the StatFingerprints library (Michelland et al., 2009) from R software version 2.10.1 (R Development CoreTeam, 2009) in accordance with standard procedure (Fromin et al., 2002). Each single 16S rDNA sequence in a CE-SSCP fingerprinting profile gave a one peak. The area under a peak represented the relative abundance of the corresponding microbial species in the community. Relative difference in community structures were assessed using Principal Component Analysis (PCA) based on the vegan library (Oksanen et al., 2010) of the R software.

3.3. Results and discussion

3.3.1. Biogas production

The reactors were run in batch mode with ethanol. High concentrations of biomass were used for seeding in order to study the adaptation of the biomass to ethanol degradation without considering growth. Figure 3.1 presents the biogas production for each ecosystem. Neither residual ethanol nor volatile fatty acids were detected at the end of the experiment, showing that the substrate was entirely consumed. The ecosystems reached the theoretical biogas production level, which represented about 95% to 98% of biodegradation. These results were consistent with previously-reported percentages obtained with activity test based on ethanol (Battimelli et al., 2009). The percentages of CH₄ in the biogas varied over a narrow range, from 68% (*JDO*, *BSM*) to 76% (*BGM*, *LVJ*), with a mean value of 72% ± 3 for all the ecosystems at the end of adaptation period. Actual total CH₄ production matched the theoretical volume of CH₄. The time required for a complete reaction decreased as the

accumulated number of batches rose, whatever the ecosystem. This result was interpreted as an adaptation of the industrial ecosystems to new operating conditions. Comments about differences between each ecosystem adaptation are discussed below.

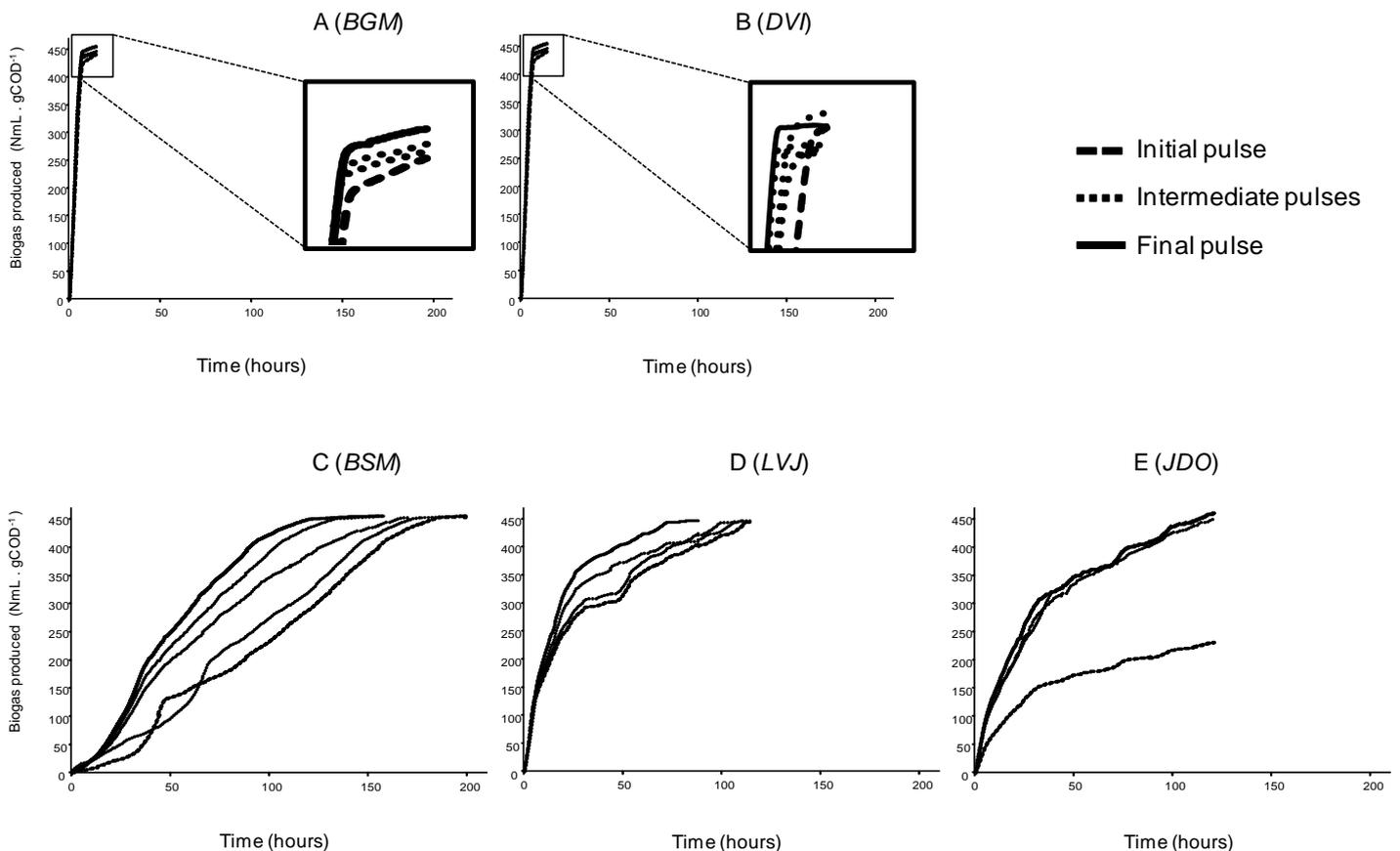


Figure 3.1: Kinetics of biogas production for the five ecosystems. The ecosystems are indicated in the panel by the letters A to E in the following order: (A) *BGM* (B) *DVI* (C) *BSM* (D) *LVJ* and (E) *JDO*. The initial batch is indicated by a broken line, intermediate batches by dotted lines and the final batch by a solid line.

3.3.2. Maximum biogas production rate

Figure 3.2 shows the maximum specific biogas production rate based on the Gompertz model. The coefficients r^2 determined by fitting the Gompertz curve for all the batches had a mean value of 0.97, indicating that this model was suitable to describe these biogas production kinetics, as previously observed (Quéméneur et al., 2011).

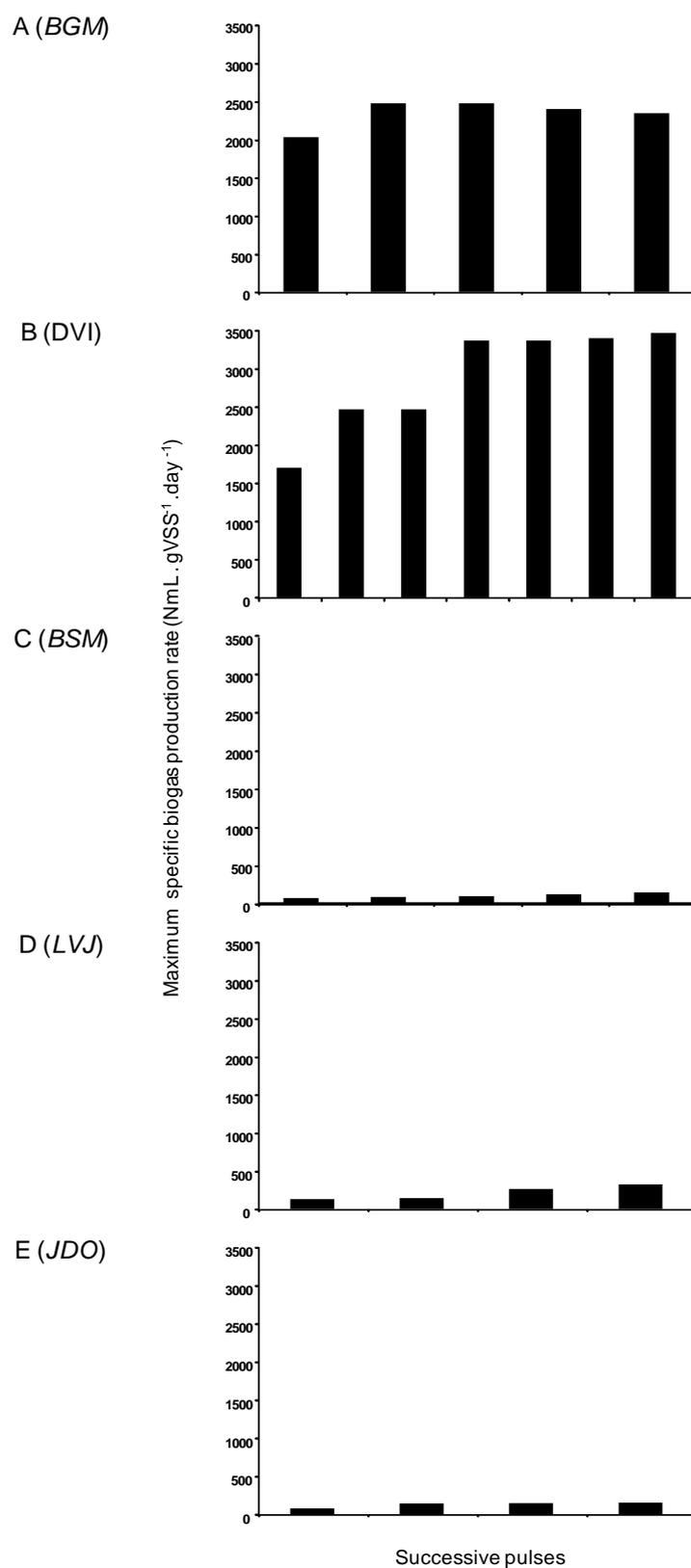


Figure 3.2: Adaptation of ecosystems based on the maximum specific biogas production rate over time. The ecosystems are indicated in the panel by the letters A to E in the following

order: (A) *BGM* (B) *DVI* (C) *BSM* (D) *LVJ* and (E) *JDO*. The maximum specific biogas rate was determined by fitting a Gompertz model ($r^2 \geq 0.95$).

In this study, the maximum specific biogas production rate was considered as the rate at which microorganisms produce biogas in both the acidogenic and methanogenic phases. It was also the basis for ascertaining the minimum number of batches required to achieve adaptation. For example, the *BGM* and *JDO* ecosystems reached maximum activity after the second feeding whereas the *LVJ* and *BSM* ecosystems required three and four feedings respectively. After the adaptation period, the *BGM* and *DVI* had the highest maximum specific biogas production rates in each batch cycle due to the high concentrations of active biomass found in these ecosystems in comparison to the others (Liu & Tay, 2004; Michaud et al., 2003). Both ecosystems originated in mesophilic anaerobic digesters treating effluent with easily-fermentable substrates (effluent from the sugar industry and wine industries).

3.3.3. Metabolic adaptation potential

3.3.3.1. Bioreactor performances

Figure 3.3 represents specific methanogenic activity (SMA) before and after the adaptation process.

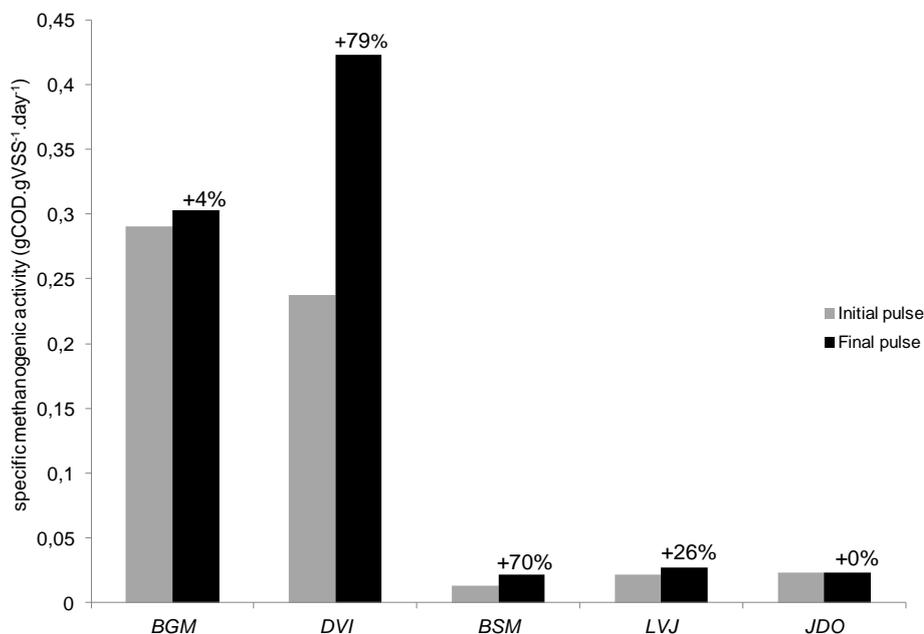


Figure 3.3 : Comparative results of the potential for adaptation of the five ecosystems, based on the specific methanogenic activity rate. Only the initial batch (in grey) and the final batch (in black) are shown.

Except for *JDO*, which shared no variation either before or after the adaptation period, all the other ecosystems experienced an improvement in specific methanogenic activity in varying proportions ranging from 4% (*BGM*) to 79% (*DVI*). Four types of ecosystem emerged: ecosystems characterized by a wide variation in SMA between the first and last ethanol batches (*DVI* and *BSM*), those with a moderate variation (*LVJ*), those with a low variation (*BGM*) and ecosystems with no variation (*JDO*). The changes in performance were independent of the initial performance and the intrinsic performances were not enough to assess the adaptation potential.

3.3.3.2. Microbial population structures according to ecosystem pedigree

Representative *Bacteria* and *Archaea* average of the CE-SSCP fingerprinting profiles of the five ecosystems at the end of adaptation period are presented in Figure 3.4.

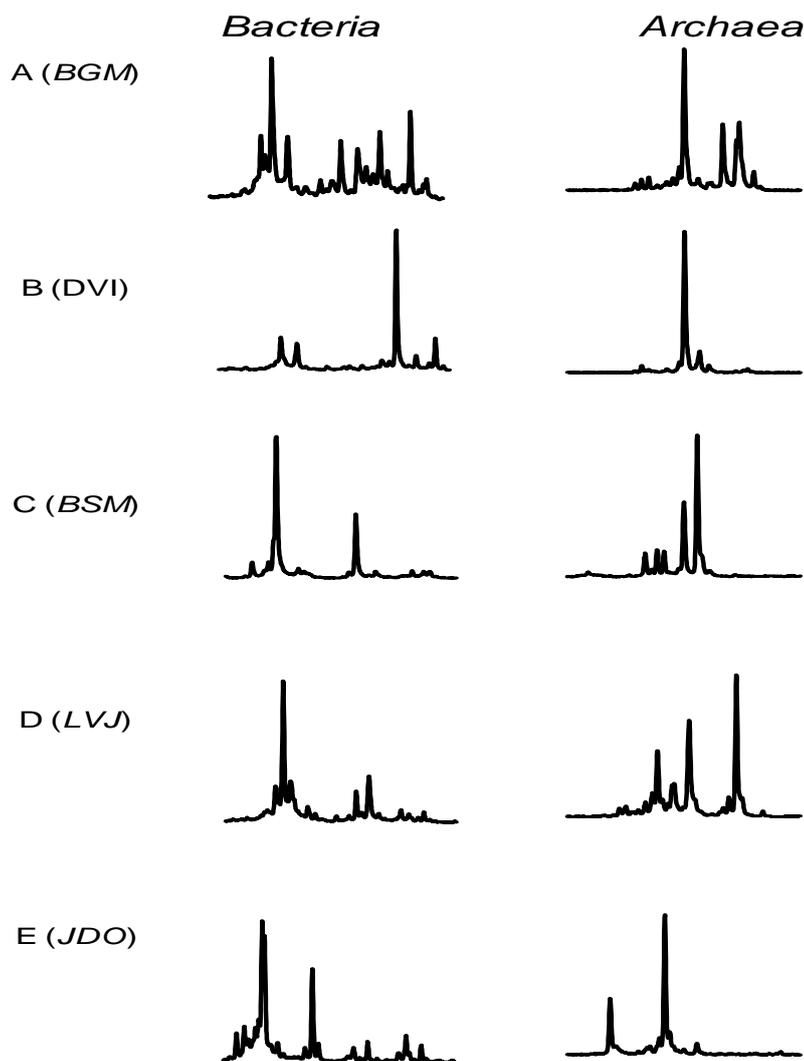


Figure 3.4 : Representative average of the CE-SSCP fingerprinting profiles for bacterial and

archaeal communities at the the adaptation period. The ecosystems are indicated in the panel by the letters A to E in the following order: (A) *BGM* (B) *DVI* (C) *BSM* (D) *LVJ* and (E) *JDO*.

The different ecosystems chosen according to the characteristics of the industrial digesters (water content, temperature, etc) displayed different dominant microbial communities. This result is in accordance with Leclerc et al (2004) who observed that the archaeal diversity in anaerobic digesters is influenced by both the operating conditions of the digesters and the environmental parameters. Microbial diversity was calculated based on the number of visible peaks in CE-SSCP fingerprinting profiles. The number of peaks ranged from 16 to 24 for *Bacteria* and from 11 to 16 for *Archaea*, which is in accordance with the range of values reported by Delbès et al. (2001). For a given ecosystem, the bacterial diversity observed was always higher as compared to the archaeal diversity. Similar results were obtained in other studies (Godon et al., 1997; Nelson et al., 2011). The *LVJ* had the highest number of peaks for *Bacteria* (24 peaks) and *Archaea* (16 peaks), whereas the *BSM* ecosystem had the lowest number of peaks (15 bacterial peaks and 9 archaeal peaks).

Principal component analysis (PCA) was used to determine the major genetic differences between microbial communities as a function of the total solids content and the temperature of the industrial anaerobic reactors where the ecosystems were sourced (Figure 3.5).

The PCA revealed 70.7% of genetic difference between the first two principal components on the basis of a comparison of bacterial CE-SSCP fingerprinting profiles (Figure 3.5a) and 77.0% of genetic difference when comparing archaeal CE-SSCP fingerprinting profiles (Figure 3.5b). The differences observed in community structure were related to the total solids content and the temperature of the industrial digesters of origin. Significant linear correlations were found with total solids ($r^2=0.952$, $P<0.001$) and temperature ($r^2=0.518$, $P=0.046$) for bacterial CE-SSCP fingerprinting profiles. In addition, significant correlations with total solids ($r^2=0.875$, $P=0.002$) and temperature ($r^2=0.554$, $P=0.026$) were also found for archaeal CE-SSCP fingerprinting profiles. It is well known that a large core of microbial diversity is needed to guarantee an efficient anaerobic digestion process (Nelson et al., 2011) but it is also evident that operating conditions have major impact on microbial diversity (Leclerc et al., 2004; Werner et al., 2011). For example, it has been shown that thermophilic and mesophilic ecosystems host different species (Levén et al., 2007).

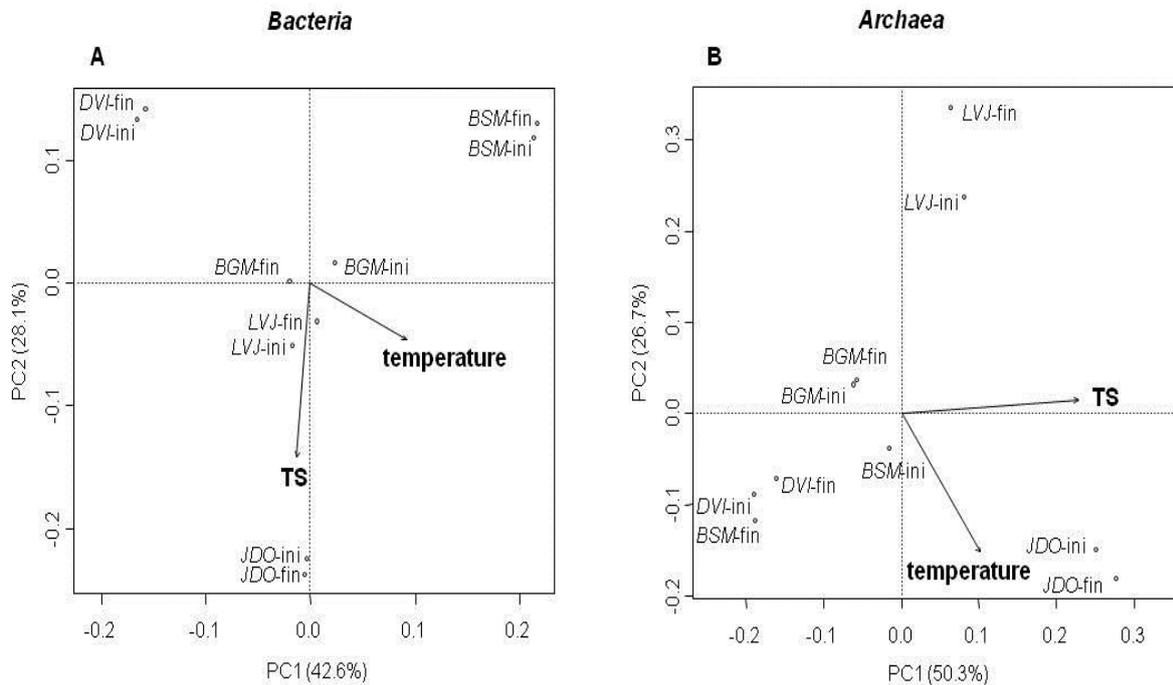


Figure 3.5 : Genetic divergences between the five ecosystems from bacterial (a) and archaeal (b) CE-SSCP fingerprinting profiles according to the main features of the industrial reactors (%TS and temperature).

3.3.3.3. Microbial population structure according to fermentative performance

Figure 3.6 highlights the major genetic differences between microbial communities in relation to the performances of the experimental reactors. The changes in community structure correlated with specific methanogenic activity (SMA) and with improvement in specific methanogenic activity (SMA improvement). Significant correlations to bacterial CE-SSCP fingerprinting profiles were found with SMA ($r^2=0.617$, $P=0.033$) and SMA improvement ($r^2=0.716$, $P=0.006$). The directions of SMA and SMA improvement arrows were orthogonal, indicating that ecosystem acclimation was not correlated to its intrinsic performance in PCA (Figure 3.6a). The fact that some *Bacteria* were dominant in ecosystems that were initially effective (good initial SMA) does not ensure the ability of an ecosystem to improve its performance in a new operating context (SMA improvement).

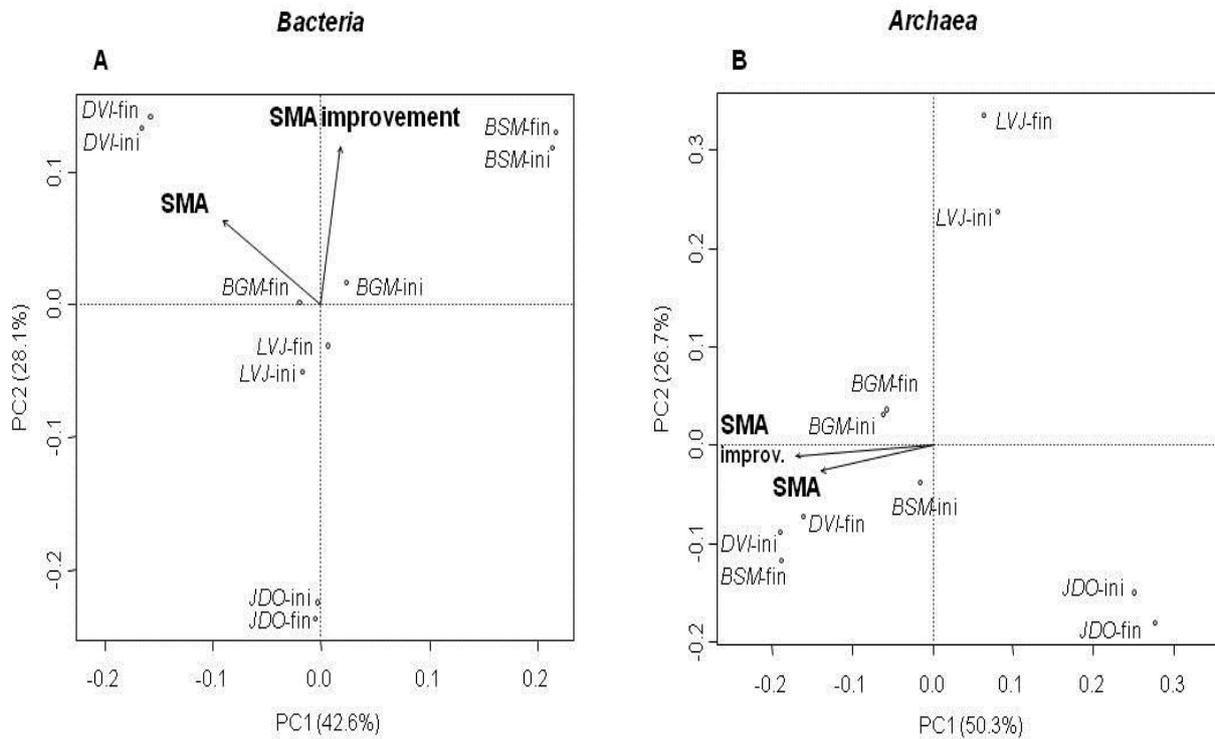


Figure 3.6: Genetic divergences between the five ecosystems from bacterial (a) and archaeal (b) CE-SSCP fingerprinting profiles according to the performances obtained in bioreactors (specific methanogenic activity (SMA) and improvement in SMA).

Archaeal-based ordinations also showed significant correlations with SMA improvement ($r^2=0.556$, $P=0.021$) CE-SSCP fingerprinting profiles, but contrary to *Bacteria*, SMA and SMA improvement gradients were oriented in the same direction (Figure 3.6b). Dominant *Archaea* found in efficient ecosystems (*DVI* and *BSM*) were also found as performance improved during the adaptation. In this study, the reactors were fed with ethanol which is rapidly converted into acetate which then feeds the *Archaea* directly. It may exert a selective pressure on resident efficient archaeal populations. Studies on anaerobic inoculums from diverse sources have already reported that microbial community structures and the characteristics of initial sludge were of great importance in bioreactor performance (Enright et al., 2009; Leclerc et al., 2004). In fact, in relation to temperature, digesters operated in thermophilic conditions have shown better performance than those in mesophilic conditions (Yu et al., 2002).

3.4. Conclusion

In this study, the potential for adaptation of lab-scale bioreactors inoculated with ecosystems originating in industrial anaerobic digesters was investigated. The ecosystems, selected as a function of environmental conditions (temperature, water content, etc.), showed different microbial structures. Their initial specific methanogenic activity did not govern adaptation potential. Different microbial bacterial populations ensured efficient performance and the ability to adapt. Adaptation potential depended on the initial intrinsic activity of *Archaea*. The experimental bioreactors were used at operating temperatures typical of industrial anaerobic digesters. The potential for adaptation of these ethanol-adapted ecosystems to various ranges of temperatures remains to be studied.

Post-discussion

Rappel des principaux résultats

Le suivi de la production de biogaz au cours de cette étude a permis de constater que les différents écosystèmes industriels atteignaient une production de biogaz avoisinant la production théorique. De plus, une diminution de la durée pour une réaction complète a été observée avec ajout successif du substrat. Les cinétiques de production de biogaz obtenues ont permis de conclure que les écosystèmes ayant une grande concentration de biomasses actives avaient également les cinétiques les plus élevées. Par ailleurs, ces écosystèmes provenaient de digesteurs industriels traitant des effluents contenant des substrats facilement fermentescibles. A la fin de la période de conditionnement, les écosystèmes ont été classés en fonction de leur capacité à améliorer l'activité spécifique des méthanogènes entre le premier batch et le dernier batch. Ainsi quatre types d'écosystèmes se sont distingués. Les écosystèmes avec un taux d'amélioration très élevé (plus de 50%). Ce fut le cas des écosystèmes *DVI* et *BSM* avec respectivement 79% et 70% d'amélioration. Ceux avec une amélioration modérée de l'activité (moins de 50%) dont fait partie l'écosystème *LVJ* avec 26% de taux d'amélioration. La troisième classe d'écosystèmes est constituée de ceux avec un faible taux d'amélioration (moins de 10%) dont fait partie l'écosystème *BGM* avec 4%. Enfin, les écosystèmes avec aucune amélioration de l'activité entre le premier et le dernier batch (écosystème *JDO*).

Pour chaque écosystème, l'amélioration de la performance n'était pas due à la croissance de certaines populations microbiennes, étant donné le faible ratio substrat/biomasse utilisé. De ce fait, nous avons conclu que cette amélioration est probablement liée à l'activation enzymatique des populations présentes initialement.

Recherche des nouveaux écosystèmes psychrophiles et caractérisation supplémentaires des écosystèmes

Comme nous le mentionnons en début de ce chapitre, des écosystèmes d'origine psychrophiles ont été testés. Cependant, ces derniers n'ont pu fournir des résultats satisfaisants. Les deux écosystèmes testés étaient des tourbes acides à sphaigne du Pont-de-Martel en Suisse et du lac Mannikjarv en Estonie. Les tourbes du Pont-de-Martel avaient un taux de matière sèche de $14\% \pm 0,8$ tandis que celle du lac Mannikjarv étaient à $12\% \pm 0,5$ de

Chapitre 3 : Potentiel de cinq écosystèmes anaérobies industriels à s'adapter à la production de biogaz à partir d'un substrat facilement biodégradable : caractérisation cinétique et microbienne

matière sèche. Avant ensemencement en réacteur, les tourbes ont été diluées à 20% avec une solution de tampon phosphate pour un volume utile de 2,5L. Un volume d'éthanol de 1mL (1,67g de DCO) a été ajouté dans le réacteur en anaérobiose (chapitre 2 : Matériel et Méthodes) afin de vérifier l'activité méthanogène des tourbes. La production de biogaz ainsi que la dégradation de la DCO ont fait l'objet d'un suivi à 15°C. Les figures 3.7 et 3.8 résument le suivi de la DCO acidifiée (DCO AGV) des réacteurs inoculés avec les deux tourbes. Après six mois d'incubation, les réacteurs ont été arrêtés du fait de la faible dégradation de la DCO et de l'acidification du milieu.

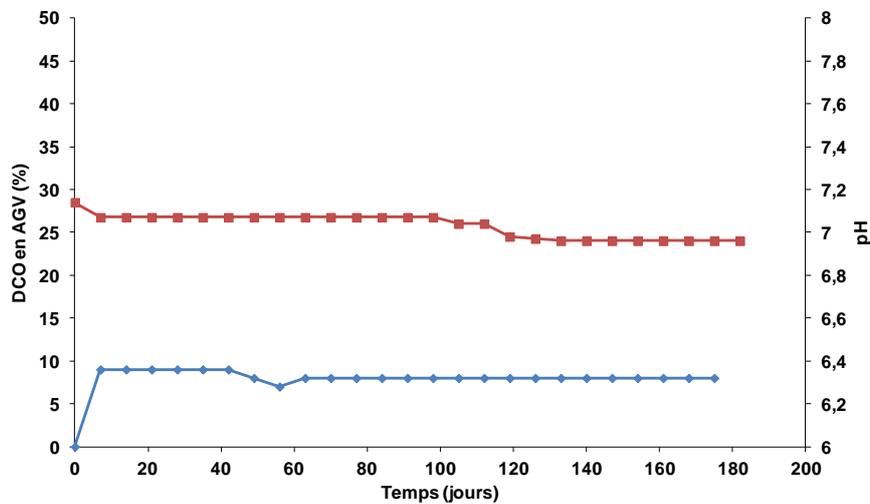


Figure 3.7: Evolution de la DCO en AGV (en bleu) et du pH (en rouge) pour les tourbes Pont-de-Martel.

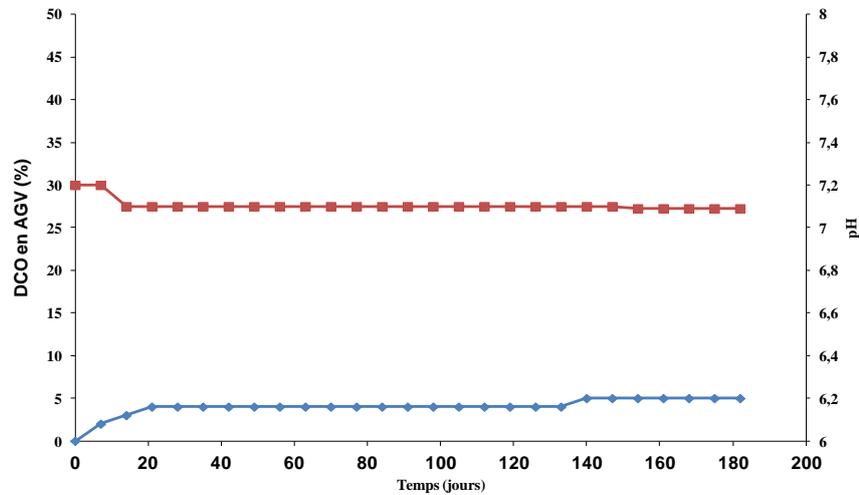


Figure 3.8 : Evolution de la DCO en AGV (en bleu) et du pH (en rouge) pour les tourbes du lac Mannikarjv.

En outre, aucune production de biogaz n'a été observée. La DCO était en majorité composée de l'éthanol à 92% pour la tourbe du Pont-de-Martel et 95% pour la tourbe du lac Mannikjarv et d'acétate. La faible acidification du milieu était certainement liée à une activité réduite des bactéries impliquées dans la conversion en acétate de l'éthanol. Néanmoins la présence d'acétate a permis de conclure qu'il existait bien une activité de bactéries anaérobies même-ci cette dernière demeure assez faible par rapport à la DCO ajoutée. L'absence de méthane et de dioxyde de carbone était une indication du manque de croissance des archées méthanogènes .

Le manque de connaissance en matière d'échantillonnage et de conservation de la tourbe peut en partie expliquer les raisons d'un tel échec. Les tourbières sont des milieux d'une extrême fragilité et sont par conséquent très vulnérables et sensibles aux perturbations tant directes (drainage, apports de nutriments, extraction) qu'indirectes (changement climatique). Tous ces changements peuvent contribuer à la perte de la biodiversité spécifique (Laggoun-Défarage & Muller, 2008). Il est donc indispensable de se rapprocher d'une équipe spécialisée dans le traitement de la tourbe. Il y a beaucoup de variation entre les types de tourbières et leur végétation. Ainsi, les sites échantillonnés devraient avoir été étudiés par les écologistes des tourbières. Leur connaissance sur la végétation, la classification des tourbières seraient prépondérants dans le bon déroulement de l'échantillonnage. Une autre piste consiste

en la recherche d'autres écosystèmes typiques du froid (chapitre 1 partie 1.6.3.1). Cependant avant tout, une caractérisation des espèces microbiennes présentes dans les écosystèmes sélectionnés est nécessaire. Dans la partie 1.2 du premier chapitre, nous avons fait état de certaines approches permettant l'étude des consortia microbiens de digestion anaérobie. Ces méthodes permettent à la fois de connaître les espèces présentes dans un écosystème (approche neutre) et de comprendre les capacités fonctionnelles de cet écosystème (approche fonctionnelle). Une troisième approche dite « métagénomique » consiste à séquencer en totalité tous les génomes présents dans un échantillon fournissant ainsi un aperçu complet de la composition mais aussi de ses fonctions métaboliques potentielles (Michelland, 2009b). Ainsi en complément de cette étude, il serait utile de quantifier les micro-organismes présents initialement et en fin d'expérience en PCR quantitative ciblant les archées et les bactéries. Il serait par ailleurs intéressant de faire des inventaires de gènes 16S (pyroséquençage) afin de voir si les consortia adaptés correspondent à des micro-organismes typiques de la digestion anaérobie.

Configuration de réacteurs et conditions opératoires

Tout au long de ce manuscrit, nous avons évoqué les différents types des réacteurs utilisés en digestion anaérobie sèche ou humide. Nous avons également discuté des avancées en matière de digestion anaérobie psychrophile et des différentes méthodes appliquées en vue de l'optimisation des réacteurs aux basses températures. Dans cette étude, nous avons travaillé en mode batch et le mélange au sein des réacteurs s'effectuait à l'aide d'un agitateur magnétique. Il sera préférable pour des expérimentations futures d'appliquer des modes en continu tout en s'assurant que le type de réacteurs utilisés assurent de façon optimale le mélange entre le substrat et la biomasse. Plusieurs types de réacteurs mentionnés dans les parties 1.4.2 et 1.4.3 peuvent faire l'objet d'études plus approfondies sur la digestion anaérobie des écosystèmes psychrophiles. Il se pourrait aussi que plusieurs conditions opératoires puissent être appliquées afin de déterminer lesquelles permettent un meilleur rendement épuratoire de la DCO et de croissance de la biomasse comme c'est le cas dans les travaux consacrés à la digestion anaérobie à basse température où les conditions opératoires telles que les charges appliquées, les temps de séjour hydraulique sont régulièrement changées afin de déterminer les conditions optimales pour une meilleure production de biogaz et d'abattement de la DCO.

**CHAPITRE 4 : ACCLIMATATION D'ÉCOSYSTÈMES
ANAÉROBIES INDUSTRIELS MÉSOPHILES ET
THERMOPHILES À DES TEMPÉRATURES COMPRISES
ENTRE 5°C ET 55°C**

Avant-propos :

La plupart des réacteurs industriels de digestion anaérobie sont optimisés pour fonctionner à des plages de températures mésophiles et thermophiles. Les travaux du chapitre précédent se sont intéressés au comportement de divers écosystèmes naturels et industriels psychrophile mésophile et thermophile en digesteurs de laboratoire alimentés avec de l'éthanol. A la fin de la phase de conditionnement, les écosystèmes ont montré une diversité de performance selon l'origine de l'inoculum et leurs caractéristiques respectives (taux de matière sèche, température du fonctionnement des digesteurs industriels, ...). Outre les performances intrinsèques des écosystèmes, la capacité à maintenir une activité de méthanisation à des températures éloignées de la température nominale de fonctionnement donne une indication sur l'adaptation écologique de ces écosystèmes à des perturbations environnementales. L'adaptation d'écosystèmes industriels à des perturbations environnementales est rarement évaluée. Pourtant, ces perturbations ne sont pas rares en fonctionnement normal (variation de charge appliquée, toxicité ponctuelle, mélange non homogène, etc.) et méritent d'être étudiées. L'influence du changement de température est facilement maîtrisable au laboratoire. De fait, ce paramètre *température* est un bon modèle d'étude pour évaluer l'adaptation des écosystèmes à une perturbation.

Même si un micro-organisme peut survivre et se développer au sein d'une large gamme de température en culture pure, la survie de ce même micro-organisme en culture mixte va dépendre de sa compétitivité par rapport aux autres espèces présentes. L'acclimatation d'un écosystème va donc dépendre à la fois de la diversité microbienne initiale et de la capacité des différentes espèces présentes à modifier leur métabolisme à la nouvelle température de fonctionnement.

Si la littérature fait état d'expérimentations sur l'acclimatation de plusieurs écosystèmes de digestion anaérobie de sources diverses à des températures psychrophiles, mésophiles et thermophiles (Ortega et al., 2008; Zhang et al., 2011) très peu de travaux sont orientés vers une acclimatation simultanée de plusieurs écosystèmes à des gradients de température couvrant tous les régimes de température. Ainsi, l'objectif de ce travail était de vérifier la capacité d'acclimatation d'écosystèmes conditionnés à un substrat test (l'éthanol dans notre cas) à des températures aussi bien psychrophiles, mésophiles que thermophiles en ayant comme substrat celui ayant servi lors du conditionnement en réacteur. L'activité spécifique des méthanogènes des écosystèmes aux différentes températures expérimentales a été évaluée. Elle a permis de comparer les cinétiques de production de méthane des

Chapitre 4 : Acclimatation d'écosystèmes anaérobies industriels mésophiles et thermophiles à des températures comprises entre 5°C et 55°C

écosystèmes lorsque ces derniers sont incubés à des températures qui s'éloignent de leur température d'origine. Enfin, l'étude de la dynamique des communautés microbiennes nous a permis de faire le lien entre diversité structurelle des micro-organismes et changement de températures.

Titre en anglais: **Acclimation of mesophilic and thermophilic industrial methane producing microbial consortia at temperatures ranging from 5°C to 55°C**

Personnes impliquées : Charlie Mabala, Jérôme Hamelin, Anaïs Bonnafous, Michel Torrijos, Audrey Battimelli, Nicolas Bernet, Jean-Philippe Steyer, Jean-Philippe Delgenès

Abstract

The degradation process of organic matter under anaerobic conditions is a natural phenomenon widespread on the earth under a wide range of temperature (eg, sediments, animal digestive systems, mires,...). Anaerobic digestion leads to the formation of biogas (a mixture of CO₂ and CH₄). A large microbial diversity is maintained during this process. In terms of biotechnological applications, the anaerobic treatment of liquid effluents and solid residues reduces the volume of organic residues by generating methane. However, most of the industrial digesters are optimized for operation at 35°C or 55°C which requires exogenous energy maintenance. In this study, five industrial ecosystems served as inoculums to investigate acclimation at psychrophilic (5°C, 10°C, 15°C), mesophilic (23°C, 30°C, 35°C) and thermophilic (55°C) temperatures. Ethanol was used as the sole source of carbon. The highest specific methanogenic activity (SMA) was always obtained at the temperature where the inoculums were taken. None of the thermophilic inoculums could be acclimated at the psychrophilic temperatures. Bacterial and archaeal community structures at the end of the acclimation period were analyzed by Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) and interpreted with regards to the shift in temperature and the SMA achieved. The acclimation of thermophilic and mesophilic inoculums to lower temperatures slightly modified the bacterial and archaeal communities. By contrast, larger changes in communities were observed when the temperature of incubation was increased compared to the temperature of the original inoculum. To sum up, increasing the temperature of functioning had a major impact on the microorganisms, either in terms of performance and community change.

Keywords: Anaerobic digestion, inoculum acclimation, microbial community structure, 16S ribosomal RNA, Low Temperature Anaerobic Digestion (LTAD).

4.1. Introduction

About 90% of our energy demand is met by fossil fuels and during this century the world energy requirements will increase by a factor of two to three. Furthermore, fossil fuels emit increasingly great concentrations of greenhouse gases in the atmosphere mostly fuel-derived CO₂ (Weiland, 2009). Thereby, several governments and world organizations have implemented strategies oriented in the development and in the use of renewable energy. The European Union has urged governments to reach 20% of renewable energy sources in their total energy supply by the year 2020 to meet the challenges posed by global warming, dependence towards energy imports and constant increase in energy prices.

Biogas produced by anaerobic digestion of organic wastes is sought to represent a good alternative to conventional energy sources. It has the double advantage to not only eliminate organic polluted residues but also to be used as a renewable energy source. Most full-scale anaerobic reactors are optimized to work under mesophilic and thermophilic temperature ranges (Collins et al., 2003; Madden et al., 2010). However under moderate or ambient temperature conditions, many wastewaters (domestic and industrial) are in the low or medium strength ranges which is far lower than the optima for treatment with conventional processes (Akila & Chandra, 2007; Lettinga et al., 2001). Thus, a considerable part of the biogas produced is directed back to the system maintenance to heat the reactors resulting in significant heating cost and overall energy loss (Ueno et al., 2007).

Wastewater treatment at low-temperature (psychrophilic) has the potential to increase cost-efficiency since the need to heat influent wastewaters is reduced or eliminated (Connaughton et al., 2006b; Galand et al., 2005; Madden et al., 2010). However, microbial activity is low at low temperature, biogas production rates is reduced, substrate is poorly used and liquid viscosity is present (Connaughton et al., 2006a; McHugh et al., 2004; Zhang et al., 2011).

The development of granular bed reactors, especially Expanded Granular Sludge Bed reactors (EGSB) has improved sludge-wastewater contact and contributed to reduce operational temperatures (Seghezzi et al., 1998; Siggins et al., 2011). Yet, this technology suffered from accumulation and removal of suspended solids (Van Lier et al., 1997). As a result, removal of suspended solids was recommended prior to anaerobic treatment (Zeeman & Lettinga, 1999). Two-stage reactors separating in two reactors the methanogenic and the

non-methanogenic stages have been widely applied for treatment of wastes in psychrophilic conditions (Alvarez et al., 2008b; Sayed & Fergala, 1995).

Much of work carried out in psychrophilic anaerobic digestion involves acclimated mesophilic communities for seeding. Parametric conditions such as the operational temperature, loading rates, types of wastes are then studied in amelioration of several engineered systems (Akila & Chandra, 2007). Moreover, advances in molecular biology mainly in PCR-based techniques have broadened experiments to comprehend mechanisms associated with microbial adaptation of various ecosystems (Collins et al., 2003; Connaughton et al., 2006b; McKeown et al., 2009).

The aim of this study was to examine acclimation of not only mesophilic but also thermophilic microbial consortia, coming from five industrial plants with different characteristics (water content, processes, and temperatures). The experiments were performed in lab-scale bioreactors at temperatures ranging from psychrophilic to thermophilic ranges. The shifts in performance and in community structure were recorded.

4.2. Materials and Methods

4.2.1. Inoculum sources

Microbial biomasses adapted to ethanol (chapitre 3) were used. Three anaerobic sludges: Three anaerobic sludges: The first sludge was taken from full-scale industrial anaerobic UASB reactor treating effluents from the sugar industry (*BGM*).

Table 4.1 : Characteristics of the ethanol-adapted ecosystems used as inoculum

Type of ecosystem	Temperature (°C)	Process	Feed	SS (g.L ⁻¹)	VSS (g.L ⁻¹)	SCOD (g.L ⁻¹)	pH
<i>BGM</i>	35	UASB	Sugar industry effluent	19.3	16.3	1.6	7.3
<i>DVI</i>	35	Fixed bed with carrier	Industrial distillery vinasses	14.8	13.7	0.8	7.3
<i>BSM</i>	55	CSTR	WWTP sludge	10.8	6.2	7.6	8.1
<i>LVJ</i>	35	Plug flow	Household waste	4.1	2.4	7.5	8.2
<i>JDO</i>	55	Plug flow	Household waste	4.8	3.2	7.5	8.2

The second sludge originated from a full-scale WWTP (*BSM*) and the last sludge originated from a 1 m³ digester treating distillery vinasse (*DVI*). Leachate (*LVJ*) and digestate supernatant (*JDO*) completed the set of inoculums. They were both from reactors treating household wastes. The characteristics of the ethanol-adapted biomasses used as inoculums are summarized in Table 4.1.

4.2.2. Biodegradation assays

The experiments were carried out in 1 L glass bottles equipped with two lateral septa. Ethanol was used as the substrate. Working volume was 300 mL, consisting of a mixture of the tested anaerobic biomasses, the substrate (at S_0/X_0 ratio equal to 0.3 gCOD_{added}·gVSS⁻¹ in the bottle), 0.1 M phosphate buffer solution, macro-elements solution composed of 26.6 g·L⁻¹ NH₄Cl, 10 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 6 g·L⁻¹ MgCl₂ 6 H₂O, 3 g·L⁻¹ CaCl₂ 2 H₂O and micro-elements: 2 g·L⁻¹ FeCl₂ 4 H₂O, 0.5 g·L⁻¹ CoCl₂ 6 H₂O, 0.1 g·L⁻¹ MnCl₂ 4 H₂O, NiCl₂ 6 H₂O 0.1 g·L⁻¹, ZnCl₂ 0.05 g·L⁻¹, H₃BO₃ 0.05 g·L⁻¹, Na₂SeO₃ 0.05 g·L⁻¹, CuCl₂, 2 H₂O 0.04 g·L⁻¹, Na₂MoO₄, 2 H₂O 0.01 g·L⁻¹. Nutrients and phosphate buffer solution were added first then autoclaved at 121°C for 20 min.

The inoculums were added with the nutrients and the phosphate buffer solution in a laminar flow hood under nitrogen flush flow. The bottles were then put in the incubators at the working temperatures (5°C, 10°C, 15°C, 23°C, 30°C, 35°C, 55°C). Ethanol was added after two hours of incubation for temperature equilibration. Biogas measurements were realized by pressure measurements using Oxitop®-C heads following Battimelli et al. (2010) for the inoculums *DVI* and *BGM*. For the remaining inoculums, pressure measurements were performed manually by digital manometer LEO 2. Inoculums *LVJ*, *BSM*, *JDO*, and *BGM* were prepared in duplicate plus a negative control without substrate. Inoculum *DVI* was prepared in triplicate.

For each substrate addition, a maximum incubation time of 90 days was chosen. Up to three pulses were performed for temperatures where the substrate was entirely consumed.

4.2.3. Incubators and temperature monitoring

Bottles were placed in water baths for incubations at 10°C and 5°C, or in temperature-controlled chambers for the other conditions at 55°C, 15°C, 23°C, 30°C and 35°C. Temperatures in the incubators were monitored by a transmitter-receiver system Labaguard 2

(AES CHEMUNEX) and stored on a server using the software eviSENSE. The margin of error was $\pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.4. Physico-chemical analyses

All the analyses were carried out at the beginning of the assay and at the end of the final ethanol batch. Soluble Chemical Oxygen Demand (SCOD) analysis was preceded by a centrifugation step (8,000 g, 15 min, 4°C) COD was measured by a colorimetric method using Hach 0-1,500 mg/l vials (Jirka & Carter, 1975). Total Solids, Volatile Solids and Volatile Suspended Solids were measured following *Standard Methods* (APHA, 1992). Volatile fatty acid (VFA) concentrations were measured using a gas chromatograph (GC-8000, Fisons instruments) equipped with a flame ionization detector and an automatic sampler (AS 800, Fisons instruments). The column used was a semi-capillar Econocap FFAP (Alltech) column with 15 m length, 0.53 cm diameter and Phase ECTM 1000 film 1.2 μm . The temperature of the splitless injector was 250°C; the temperature of the detector was 275°C. The temperature increased from 80°C to 120°C in 3 min. The carrier gas was Nitrogen (25 kPa). One μL of sample was injected. The calibration was made from a mixture of 6 acids (standard solution): acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4), isobutyric (iC4), valeric (C5) and iso-valeric (iC5) acids at 1 g.L^{-1} each. The calibration range was 0.25 to 1 g.L^{-1} by dilution of the standard solution. The internal standard method (1 g of ethyl-2-butyric acid in 1 L of water acidified with 50 mL of H_3PO_4) was used to measure total VFA concentration by mixing equal volumes of the internal standard solution and the sample or the standard solution. Error estimation was between 2 % and 5 % with a quantification threshold of 0.1 g.L^{-1} .

The concentrations of ethanol were measured by HPLC according to Quéméneur et al. (2011). The biogas composition was determined using a gas chromatograph (Shimadzu GC-8A) connected to a C-R3A integrator and equipped with a CTRI Alltech column. The following gases were measured: CO_2 , H_2 , O_2 , N_2 and CH_4 . The column was made up of 2 concentric columns. The 3.175 mm-diameter inner column was filled with Silicagel. It allowed the separation of CO_2 from the other gases. The other gases were separated in the 6.350 mm-diameter outer column filled with a molecular sieve. The carrier gas was Argon at 2.8 bars. The temperatures were 30°C for the oven and 100°C for the injector and the detector. The detection of gaseous compounds was done using a thermal conductivity detector and the intensity of current was 80 mA. The volume of injected biogas was 1 ml.

The calibration was done with a standard gas composed of 25 % of CO₂, 5 % of H₂, 2 % of O₂, 10 % of N₂ and 58 % of CH₄. Error estimation was 5 %.

4.2.5. Molecular analyses

DNA was extracted as described by Godon et al (1997). The amount and purity of DNA in the extracts were measured by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan). To analyze the structure of the bacterial and archaeal communities, the V3 region of the 16S rRNA genes were amplified using the universal primers W49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3', *Escherichia coli* position F331) and 5'-fluorescein phosphoramidite-labeled W104 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3', *E. coli* position R533) for *Bacteria*. For *Archaea* the universal primers W274 (5'-CCCTACGGGGCGCAGCAG-3', *E. coli* position R340) and 5'-fluorescein phosphoramidite-labeled W275 (5'-TTACCGCGGCGGCTG-3' *E. coli* position R519) (Shin et al., 2010). Each PCR mixture (50 µL) contained 1X *Pfu* Turbo DNA polymerase buffer, 200 µM of each dNTP, 130 ng of each primer, 0.5 U of *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene) and 1 to 5 ng of genomic DNA. Reactions were performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf). After an initial denaturation step at 94°C for 2 min, 25 temperature cycles for *Bacteria* and 30 cycles for *Archaea* were performed at 94°C for 30 s.; 51 °C for 30 s for *Bacteria* and 61 for *Archaea*, 72°C for 30 s, and 72°C for 10 min.

One µL of the appropriate dilution of the PCR product was mixed with 18.5 µL of formamide and 1.5 µL of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Samples were heat-denatured at 95°C for 5 min and immediately cooled in ice. Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) was performed in an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) with 50 cm-long capillary tubes filled with a non-denaturing 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems). Samples were eluted at 12 kV and 32°C for 30 min. Each unique 16S rDNA sequence in a CE-SSCP fingerprinting profile gave one peak. The CE-SSCP fingerprinting profiles were aligned with the internal standard to take into account inter-sample electrophoretic variability. The CE-SSCP fingerprinting profiles were normalized using the StatFingerprints library (Michelland et al., 2009) from R software version 2.10.1 (R Development CoreTeam, 2009) according to standard procedure (Fromin et al., 2002).

4.2.6. Calculations

Biogas production was determined through the increase in pressure inside the bottle headspace and the volume obtained was calculated based upon the universal gas law for ideal gases normalized to standard temperature and pressure (0°C, 1 atm).

The specific methanogenic activity (SMA) was evaluated from methane production rate as described by Soto et al.(1993). The SMA was expressed as a percentage from the optimum activity for each of the inoculum. The experimental values were fitted as a function of temperature of incubation (Rosso et al., 1995).

The genetic divergences between CE-SSCP fingerprinting profiles were compared by Euclidean distances considering as reference profiles the communities obtained from the assays performed at the temperature of inoculum origin when the activity was maximal.

One-way ANOVA was used to check if the percentage of methane in biogas could be explained by the experimental conditions (temperatures and inoculums). Linear regressions were performed for comparing data sets.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Methane production

Thermophilic inoculums (*BSM*, *JDO*) produced methane at mesophilic (23°C, 30°C, 35°C) and thermophilic (55°C) temperatures. *LVJ* was the only mesophilic inoculum which degraded the substrate completely at 55°C. *DVI* was the only inoculum which produce methane at all temperatures although at 5°C, 10°C and 55°C, although the COD added was never fully converted into biogas. Methane production with mesophilic inoculum acclimated at psychrophilic temperatures has been shown in instrumented systems (Connaughton et al., 2006a; McHugh et al., 2004; Zhang et al., 2011). Likewise, methane production of either thermophilic temperatures to mesophilic or mesophilic to thermophilic temperatures has been previously reported (Ortega et al., 2008; Yu et al., 2002).

The percentage of CH₄ in biogas averaged 74%±2% for the assays where the reaction was complete. This result was inoculum dependent (ANOVA $F_{(4,39)} = 58.55$, $p < 0.001$), and increased as temperatures decreased (ANOVA $F_{(1,42)} = 5.44$, $p = 0.024$). Zhang et al (2011) obtained similar results before reaching stabilized state (77% of CH₄ in biogas) in the acclimation of mesophilic biofilms at psychrophilic temperatures (5°C-18°C). They attributed this behavior to the ability of dominant methanogens in the bioreactor to maintain a higher methanogenic activity with decreased temperatures. The total CH₄ production was always in

accordance with the theoretical volume of CH₄ for all the inoculums from 15°C to 55°C. This production represented about 98±1% of biodegradation.

4.3.2. COD mass balance

The COD mass balance of the five inoculums according to the range of temperatures tested is presented in Figure 4.1. Less than 10% error variability in COD mass balance was observed. A strong effect of the temperature of incubation was observed and inhibitions were observed for extreme temperatures. Ethanol and volatile fatty acids (VFA) were always detected simultaneously in temperatures at which reaction was not completed. . It indicated that bacterial communities (converting ethanol into VFA) were active but not fully efficient when archaeal communities (converting VFA into biogas) were inhibited by extreme temperatures. Ethanol was mostly detected at 5°C (50% of the COD added remained) and VFA at 10°C (60% of the COD added remained). For temperatures at which the substrate was entirely consumed, the COD was converted into methane at 98±0.3%. Only the *DVI* inoculum produced methane at 5°C (12% of the COD added) and 10°C (27% of the COD added). Nevertheless, these performances remained far lower than those obtained in instrumented systems at the same temperatures where the temperatures were progressively lowered to the minimum (Dague et al., 1998; Scully et al., 2006). After 90 days, the VFA accumulated was mostly acetate at 97 ±1% and the pH value was about 5.6±0.5. It has been shown that in the acclimation of mesophilic inoculums to psychrophilic temperatures, VFA accumulation is one of the main concern (Kotsyurbenko, 2005). This accumulation agreed with the fact that in the case anaerobic degradation of easily-fermentable substrates, methanogenesis is the limiting step (Soto et al., 1993) and methanogenic *Archaea* are very sensitive in changes affecting their environment (Hori et al., 2006; King et al., 2011; Kotsyurbenko, 2005).

Indeed, during this study acidogenic phase always occurred whereas methanogenesis did not always happen. H₂ was detected in the headspace at 55°C for the *DVI* inoculum. It could be due to oxidation of acetate accumulated to H₂ and CO₂ resulted from the inhibition of acetoclastic methanogens, as previously reported (Akila & Chandra, 2007; Connaughton et al., 2006a).

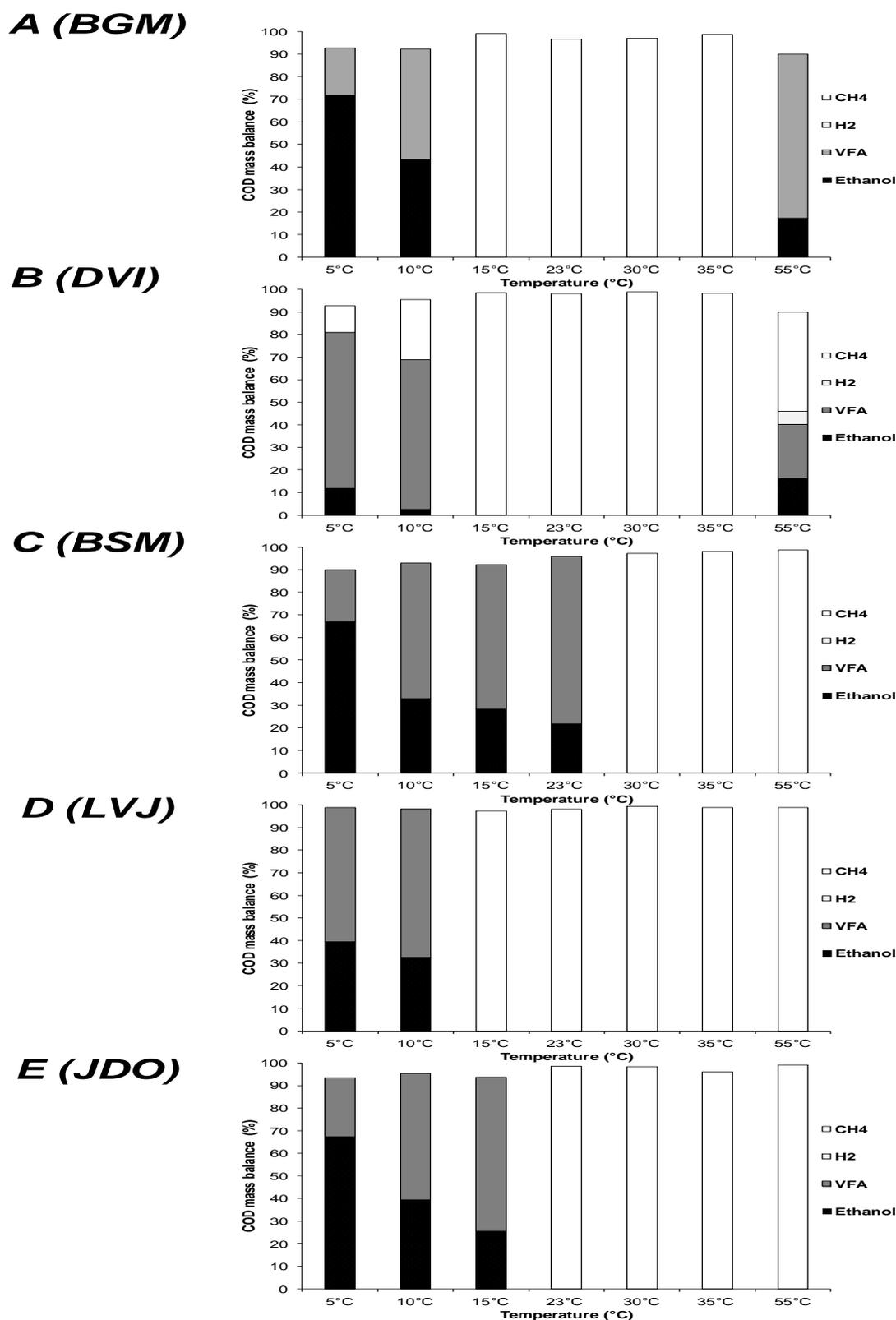


Figure 4.1 : Chemical oxygen demand mass balance of the five inoculums placed at different temperatures ranging from 5°C to 55°C. The inoculums are ordered in the panel by the letters

A to E. The metabolites are presented in the different colours set from black (ethanol) to white (methane).

4.3.3. Specific methanogenic activity

Table 4.2 highlights some of main results of this study. The maximum SMA were always at the inoculums temperature of origin. All the inoculums tested had an activity at least in a range of temperature between 15°C and 55°C. Maximum specific methanogenic activity varied from 2.8 mLCH₄.gVSS⁻¹.day⁻¹ to 55.6 mLCH₄.gVSS⁻¹.day⁻¹. *BGM* and *DVI* inoculums had the highest maximum specific biogas production rates at the end of the acclimation period. Experiments have pointed out that these differences in performance are likely due to the surplus of active biomass found in these inoculums in comparison to the others (Liu & Tay, 2004; Madden et al., 2010; Michaud et al., 2003).

Table 4.2 : Summary of the significant results of the study

Inocula	Inocula origin	Temperature at maximum SMA (°C)	Maximum SMA (mLCH ₄ .gVSS ⁻¹ .day ⁻¹)	Minimum SMA (mLCH ₄ .gVSS ⁻¹ .day ⁻¹)	Minimum working temperature (°C)	Maximum working temperature (°C)	Range of temperatures with SMA ≥ 50% of maximum SMA
<i>BGM</i>	mesophilic	35	21.4	5.3	15	35	14
<i>DVI</i>	mesophilic	35	55.6	0.1	5	55	16
<i>BSM</i>	thermophilic	55	2.8	0.2	30	55	11
<i>LVJ</i>	mesophilic	35	5.2	1.0	15	55	9
<i>JDO</i>	thermophilic	55	6.2	0.4	23	55	21

Lower activity was recorded as temperature deviated from the temperature at maximum SMA (figure 4.2). This result was consistent with previously reported works on acclimation of ecosystems to temperatures away from the ecosystems' temperature of origin (McHugh et al., 2003; Scully et al., 2006). Methanogenic activity varied according to the inoculums (Tableau 4.2; chapitre 3) and decrease in SMA was displayed in percentage of the maximal SMA for comparison purpose between inoculums. *DVI* was the only inoculum with methanogenic activity at all temperatures, though these activities remained weaker at extreme temperatures in comparison to temperatures, with 0.1%, 0.9% and 2.2% of the maximum activity at 5°C, 10°C and 55°C respectively. Two of the three mesophilic inoculums showed methanogenic

activity at 55°C. It is surprising as some studies have reported no mesophilic methanogenic activity above 45°C (Lettinga et al., 2001).

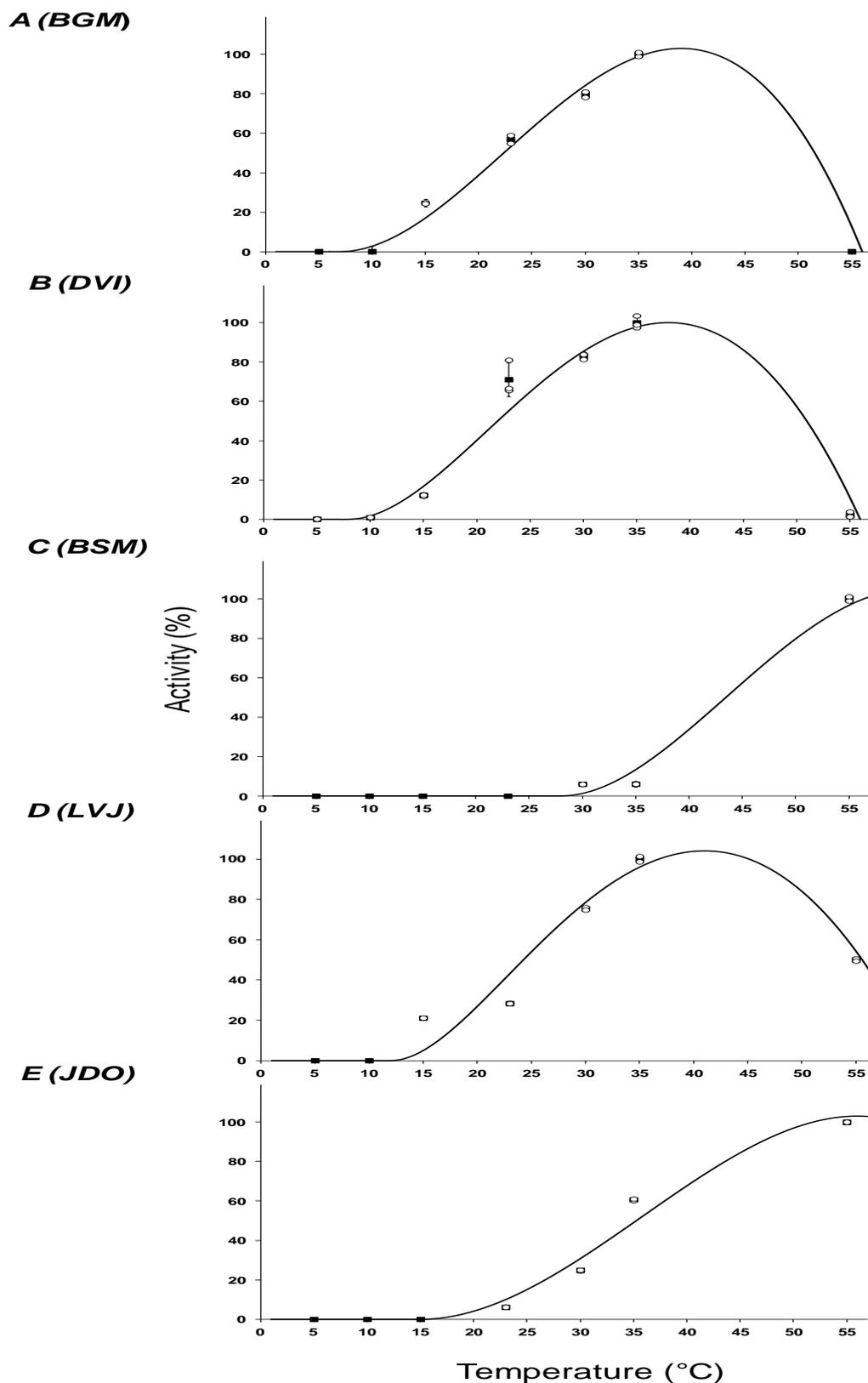


Figure 4.2 : Relative specific methanogenic activity of the five inoculums with respect to temperature. For each inoculum, the activity was estimated from the percentage at the temperature at which each inoculum had its maximum specific methanogenic activity.

The inoculums are presented in the panel by the letters A to E in the following order (A) *BGM* (B) *DVI* (C) *BSM* (D) *LVJ* and (E) *JDO*. The experimental data are presented in the white open circles. The average values of the experimental data are in the black squares. Both experimental and average values were fitted to Rosso's Model.

Hence, this result highlights the fact that methanogenic activity remains inoculum-dependent. Mesophilic inoculums acclimated better at thermophilic temperatures than thermophilic inoculums at mesophilic temperatures. Unlike mesophilic inoculums, none of the thermophilic inoculums were acclimated at psychrophilic temperatures. Drop in performance was greater with increasing temperature compared to the case where the temperature was lowered. It happens as if increasing temperatures brings about different microbial species. This assumption is in agreement with Nozhevnikova et al (1999) who assumed that thermophilic and mesophilic methanogenic populations differ in their microbial species. In order to test whether thermophilic conditions may exert a selective pressure in selecting some populations, a molecular characterization of microbial communities was performed at the end of the acclimation period for each of the inoculum for all the temperature tested.

4.3.4. Microbial population changes according to the incubating temperatures

Acclimation of the inoculums at the microscopic level was performed by looking at the genetic divergences of CE-SSCP fingerprinting profiles at the experimental temperatures (figure 4.3). The optimum temperatures were taken as the reference for the analyses. For *Bacteria*, the genetic divergences ranged from 0.04 to 0.12. This result indicates that there were few changes in bacterial population structures with changes in temperatures. The acclimation of archaeal populations from mesophilic inoculums (*BGM*, *DVI* and *LVJ*) to psychrophilic temperatures were performed by genetically related microbial populations, as observed for the bacterial populations. This observation has already been previously reported (Collins et al., 2003; Metje & Frenzel, 2005; Metje & Frenzel, 2007). However, when the temperature was increased to 55°C for mesophilic inoculums, the genetic divergence rose 4 to 7 times in comparison with the incubations at lower temperatures, indicating that different archaeal populations were involved when the temperature reaches thermophilic ranges in agreement with Nozhevnikova et al (1999). Likewise in archeal thermophilic inoculums

(*JDO, BSM*), the shift in populations was 2 to 5 times higher than mesophilic inoculums when the temperature was decreased in mesophilic range of temperatures (23°C-35°C) showing that different archaeal populations present in thermophiles are implicated in the acclimation at lower temperatures.

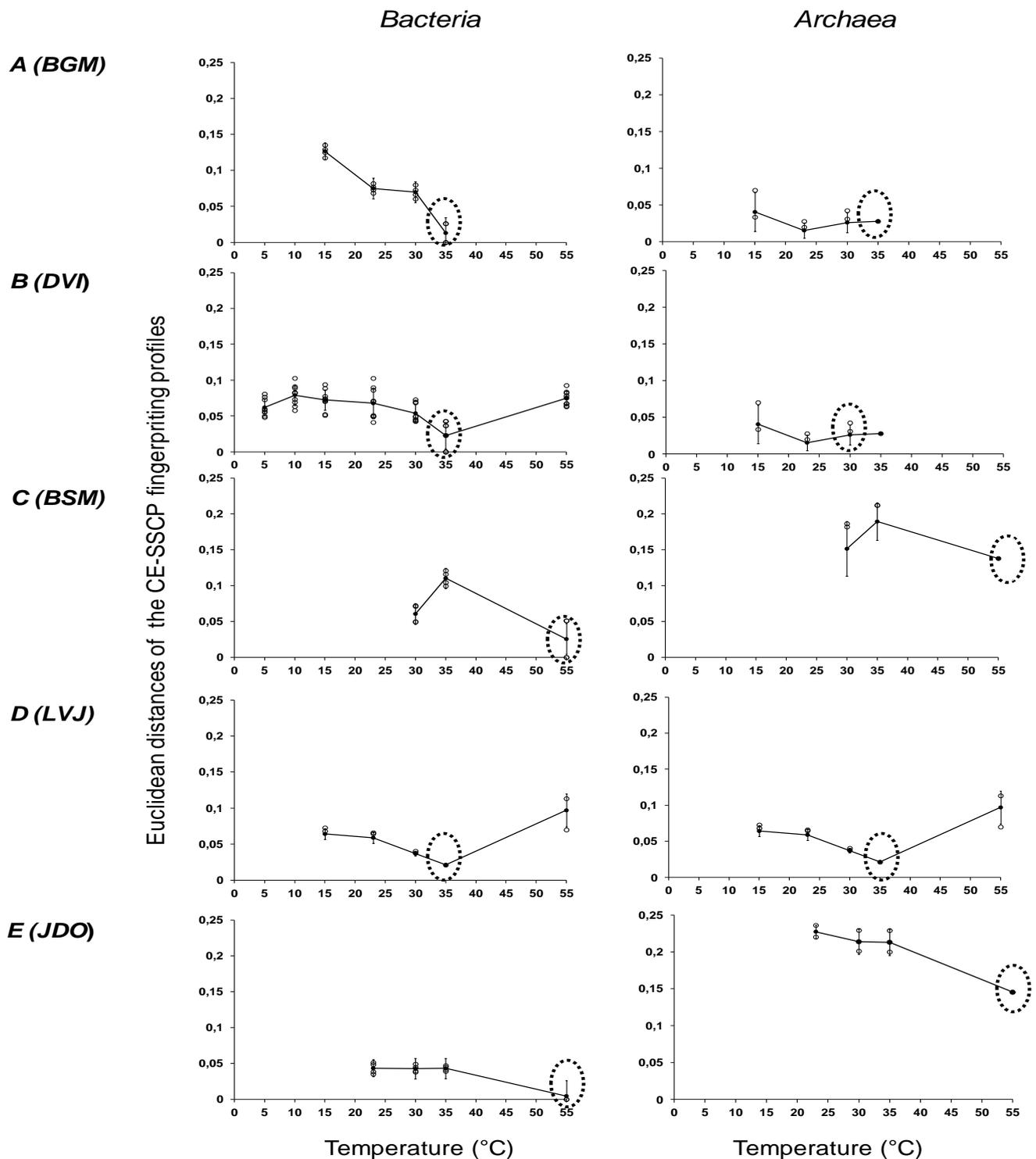


Figure 4.3 : Genetic divergences of the five inoculums during acclimation from bacterial and archaeal CE-SSCP fingerprinting profiles in relation to the inoculums temperature of

origin. The values of the genetic divergences for each bottle for a given temperature are in the white open circle. The average genetic divergences for each temperature are in the full black circles.

4.3.5. Microbial populations changes according to the inoculums performances

Bacteria and *Archaea* shifts in community structures in relation to inoculums performance are presented in figure 4.4.

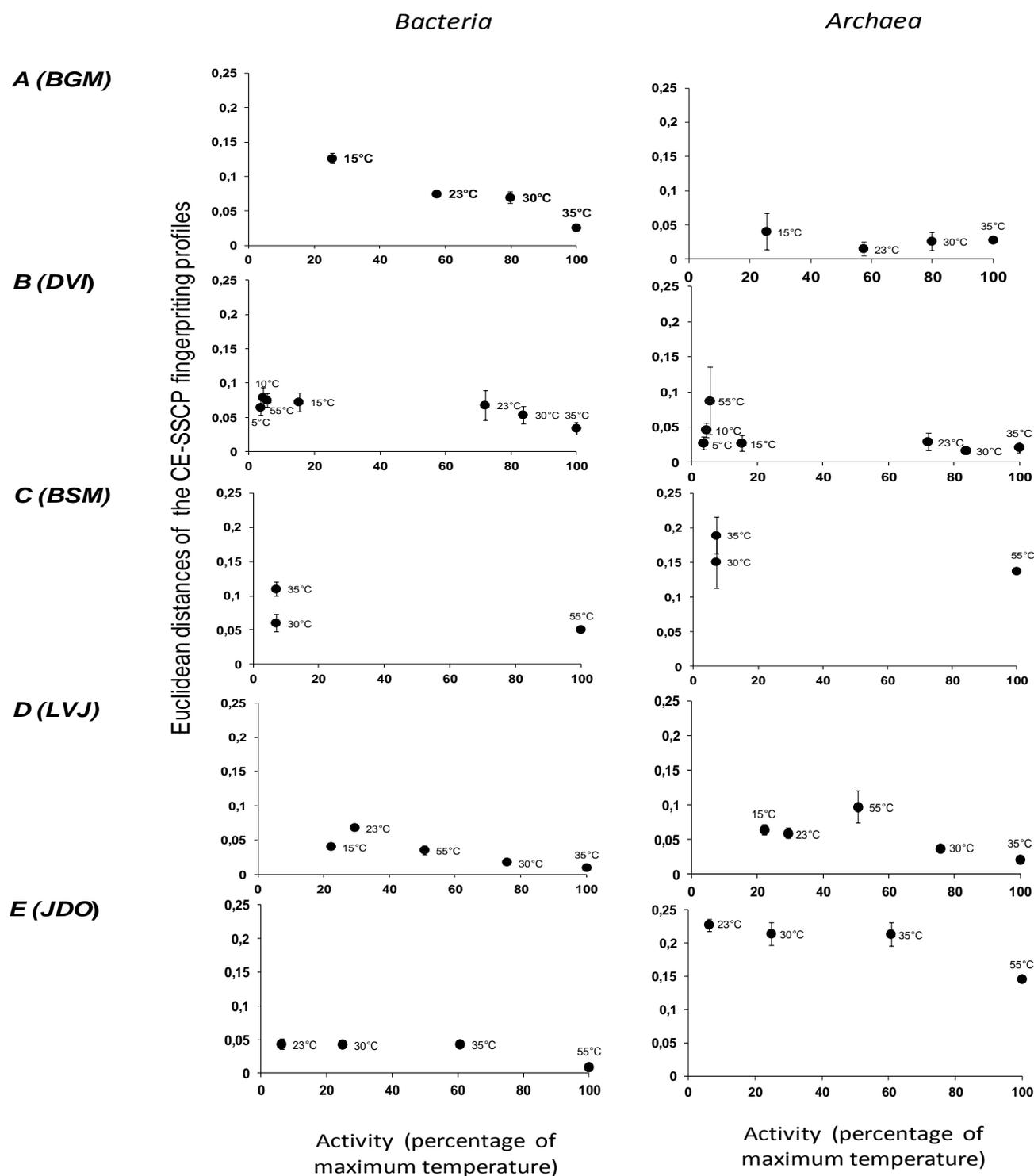


Figure 4.4: Genetic divergences of the five inoculums from bacterial and archaeal CE-SSCP fingerprinting profiles based on the inoculums activity at maximum temperature. The values of the genetic divergences for each bottle for a given temperature are in the white open circle. The average genetic divergences for each temperature are in the full black circles. For each temperature, the activity was obtained from the percentage of maximum temperature.

Changes in genetic divergence with changes in performance, for both bacterial and archaeal CE-SSCP fingerprinting profiles were compared by linear regression. Only *BSM* did not show any correlation between changes in bacterial genetic divergence and performance. The negative correlation between the activity and the genetic divergences of microbial populations was independent of the origin of the inoculum. In fact, two out of three mesophilic inoculums showed correlation between the changes in CE-SSCP fingerprinting profiles and activity, whereas half of thermophilic inoculums showed negative correlations. In archaeal populations, *DVI*, *LVJ* and *JDO* showed negative correlations between CE-SSCP fingerprinting profiles and performance. On the other hand, no correlation was found for the inoculums *BGM* and *BSM*. These results were in line with the literature. It has been shown that bioreactors operational conditions along with change in temperatures from mesophilic to thermophilic can greatly affect the activity and both bacterial and archaeal populations implicated in the anaerobic digestion process (Khemkhao et al., 2011).

Figure 4.5 represents the changes in communities structure of the inoculums grouped by origin according to the incubating temperature. Overall, there were slight changes in communities structure in bacteria fingerprinting profiles whatever the temperature. Whereas in Archaea fingerprinting profiles, important changes were seen as temperatures were decreased from thermophilic ranges to lower temperature ranges. No changes were seen when temperature was decreased from mesophilic ranges to psychrophilic ranges and when temperature was increased from mesophilic ranges to thermophilic ranges. This result indicates that for thermophilic inoculums, different archeal populations are presented in mesophilic and thermophilic temperature ranges.

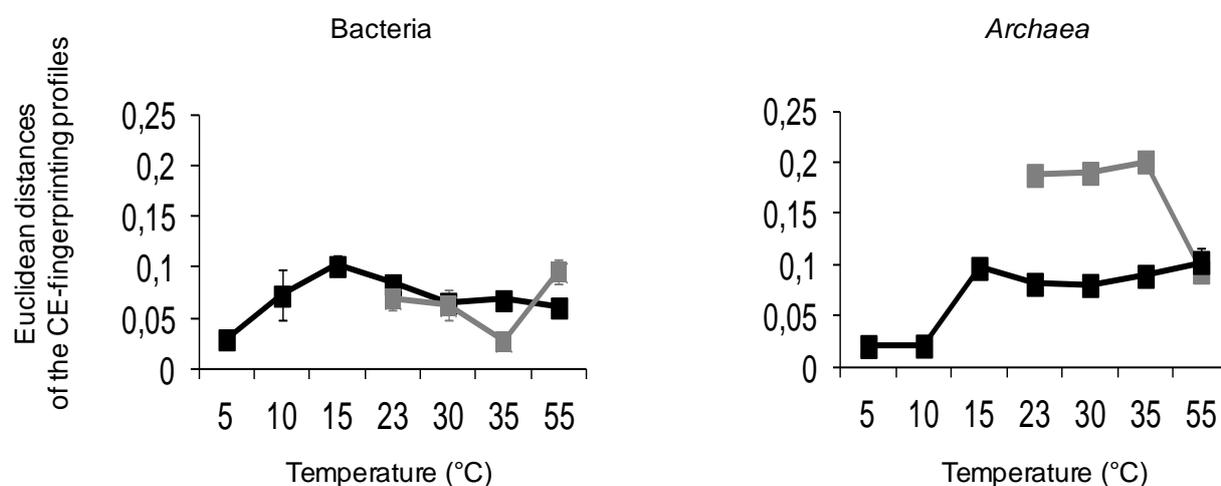


Figure 4.5: Divergence of mesophilic (*BGM, DVI, LVJ*) and thermophilic (*BSM, JDO*) microbial communities' structure according to the incubation temperatures. The Euclidean distances of the mesophilic inoculums are represented in black and the thermophilic inoculums are represented in grey.

4.4. Conclusion

Acclimation of five ethanol-adapted ecosystems was tested at psychrophilic, mesophilic and thermophilic temperature ranges. The optimum specific methanogenic activity was always obtained at the inoculum temperature of origin. The analyses of genetic divergences of CE-SSCP fingerprinting profiles showed that acclimation of mesophilic inoculums to psychrophilic temperatures was performed by similar microorganisms. On the other hand, these results pointed out that acclimation of mesophilic inoculums to higher (thermophilic) temperatures was performed by bacteria closely related; but genetically diverse archaeal populations. Likewise, acclimation of thermophilic inoculums to lower temperature was performed by genetically related *Bacteria* and genetically different *Archaea*.

Post-discussion

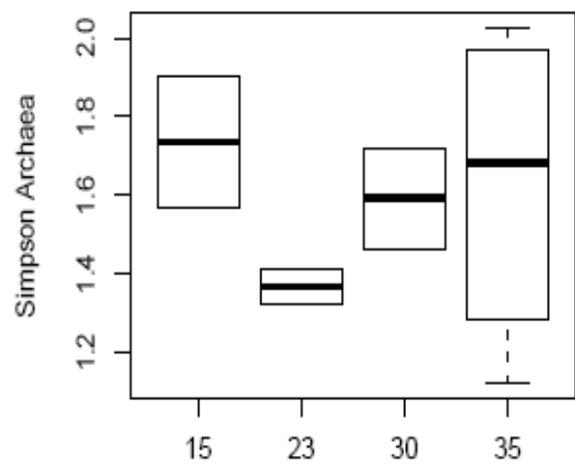
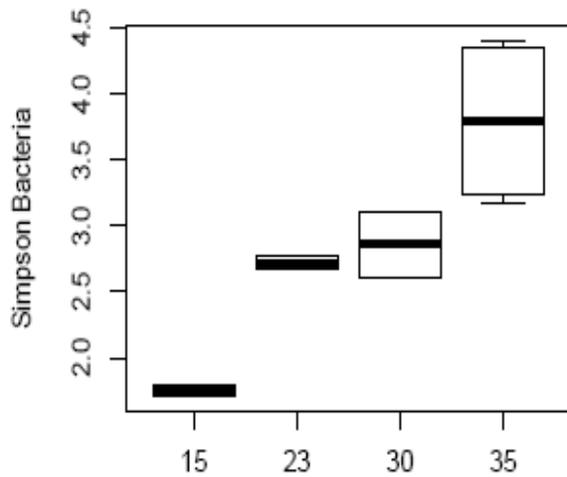
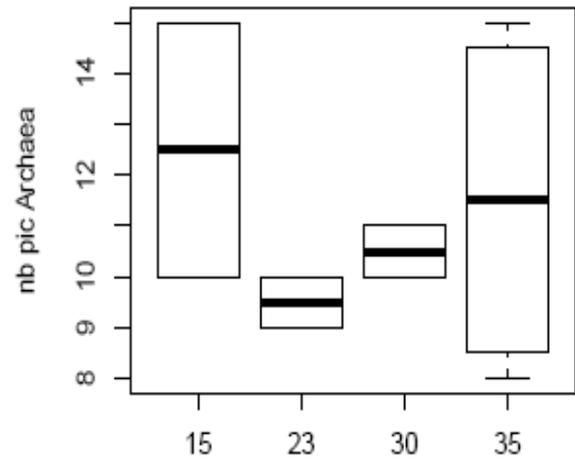
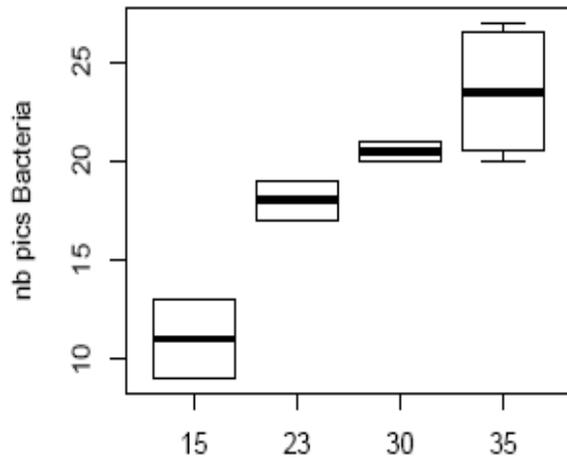
Rappel des principaux résultats

Les écosystèmes industriels adaptés à l'éthanol ont été acclimatés à des températures psychrophiles (5 °C, 10 °C, 15 °C), mésophiles (23 °C, 30 °C, 35 °C) et thermophiles (55 °C). La production de méthane a été obtenue aux températures psychrophiles uniquement avec des écosystèmes mésophiles. Le pourcentage de méthane dans le biogaz était dépendant de l'inoculum. De plus, ce pourcentage augmentait avec la baisse de température pour les températures auxquelles les réactions étaient complètes. L'activité spécifique maximale des méthanogènes était toujours obtenue à la température du fonctionnement du réacteur industriel d'où provenaient les écosystèmes. Aucun des écosystèmes thermophiles n'a pu être acclimaté aux températures psychrophiles. La structure des communautés bactériennes et archées en fonction de la température et de l'activité spécifique des méthanogène à la fin de la période d'acclimatation a été analysée par CE-SSCP et comparée par divergences euclidiennes. L'acclimatation des écosystèmes mésophiles à des températures psychrophiles modifie légèrement les communautés bactériennes et archées. En revanche, les changements les plus importants dans les communautés *Archées* ont été observés lorsque les écosystèmes mésophiles étaient incubés à 55°C.

Résultats complémentaires

L'effet sur le changement de diversité en terme de nombre de pics CE-SSCP et le changement de température pour chaque inoculum a été réalisé. Les résultats obtenus n'ont montré aucune corrélation entre le changement température et le changement de diversité pour les bactéries et les archées comme l'illustre la figure 4.6 pour l'ensemble des écosystèmes. Ce résultat est contradictoire avec ceux obtenus par Goberna et al (2010) qui avaient montré que l'augmentation de la température de 37°C à 55°C en imposant des conditions de croissance pourrait augmenter la diversité des populations des archées méthanogènes.

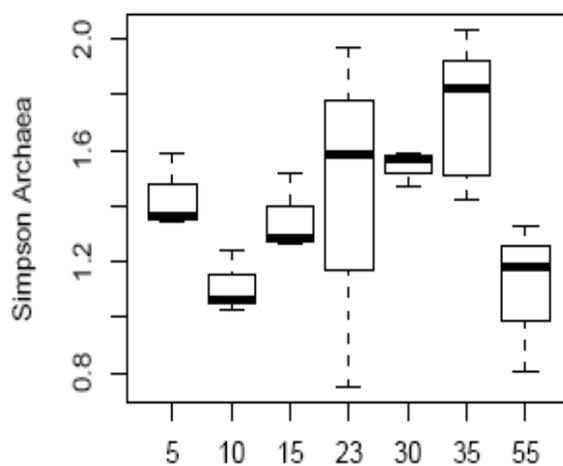
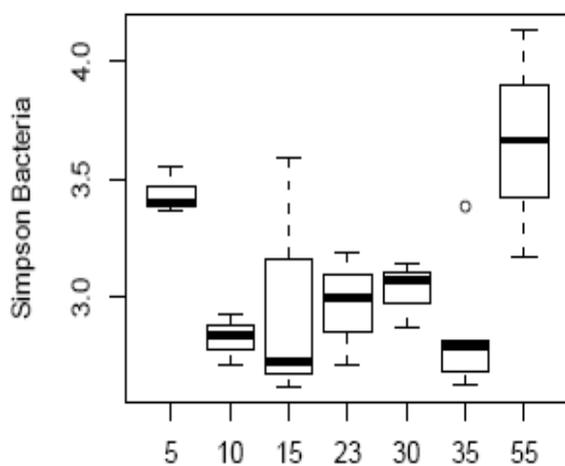
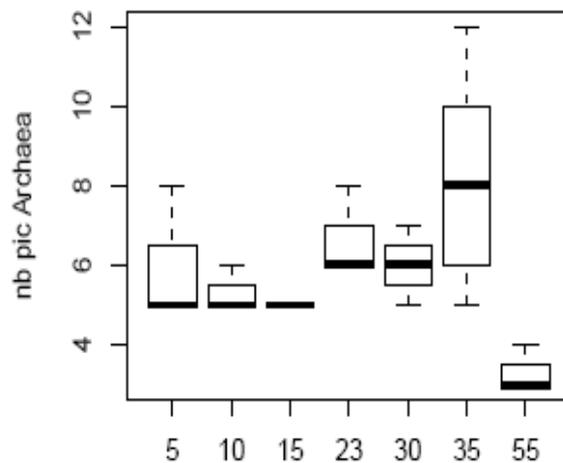
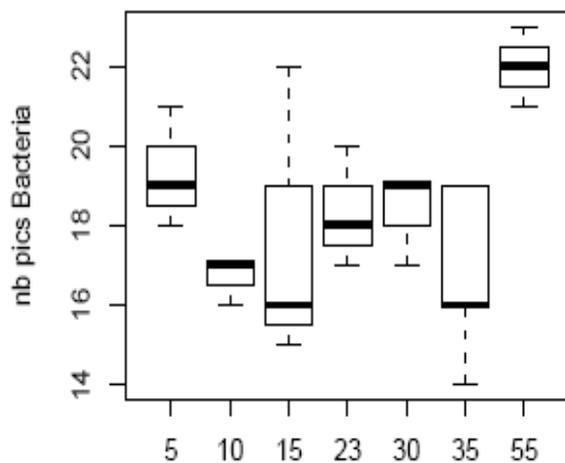
Inoculum BGM



Temperature (°C)

Temperature (°C)

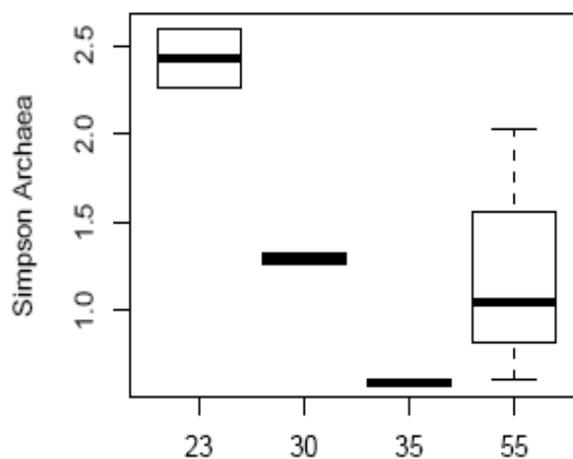
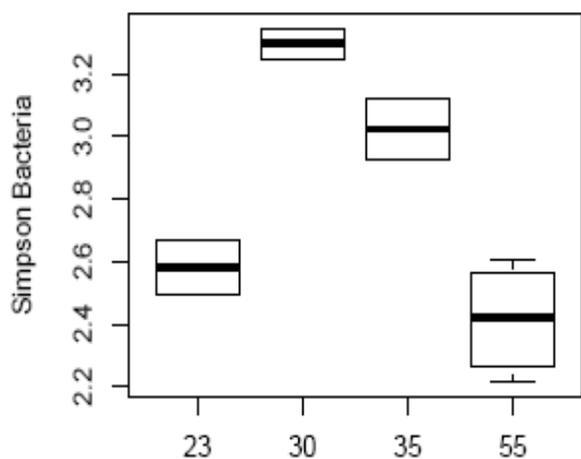
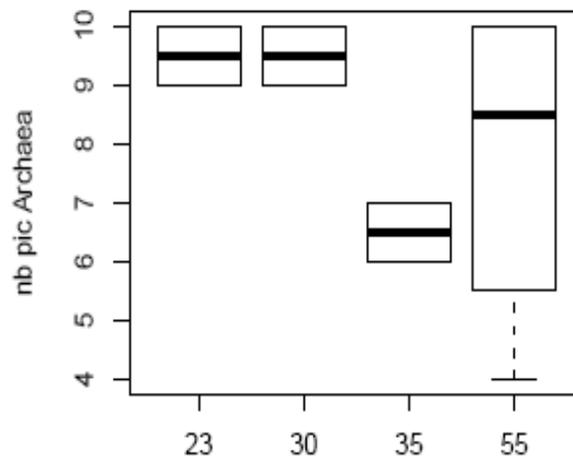
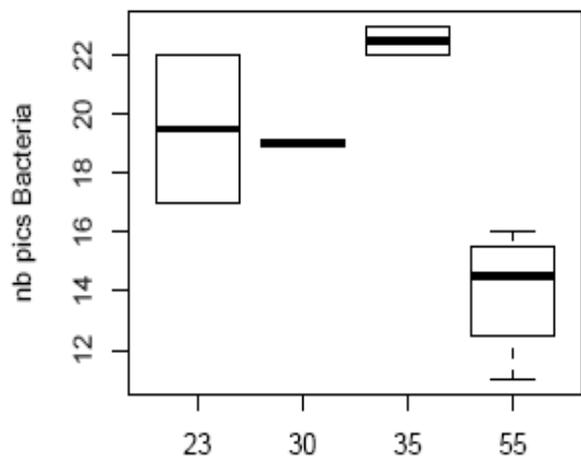
Inoculum DVI



Temperature (°C)

Temperature (°C)

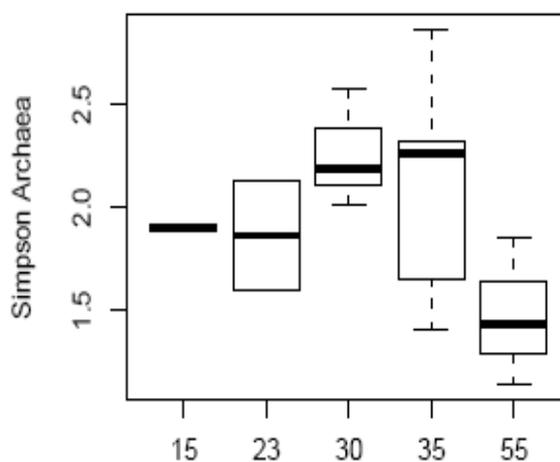
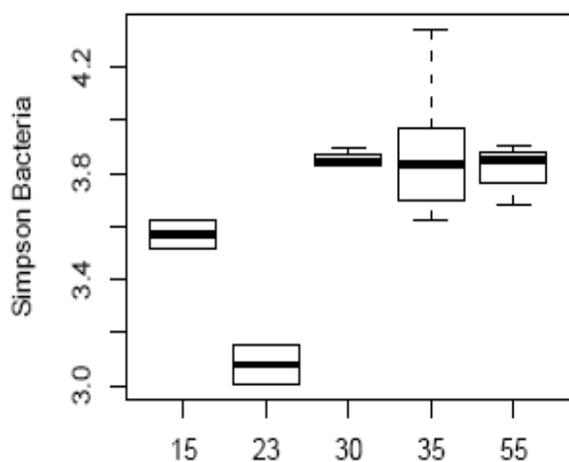
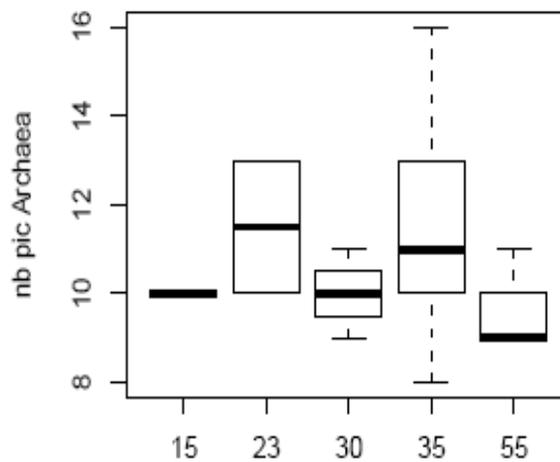
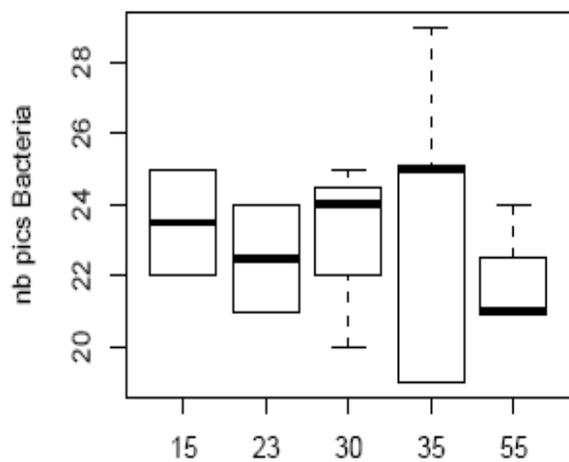
Ionculum BSM



Temperature (°C)

Temperature (°C)

Inoculum LVJ



Temperature (°C)

Temperature (°C)

Inoculum JDO

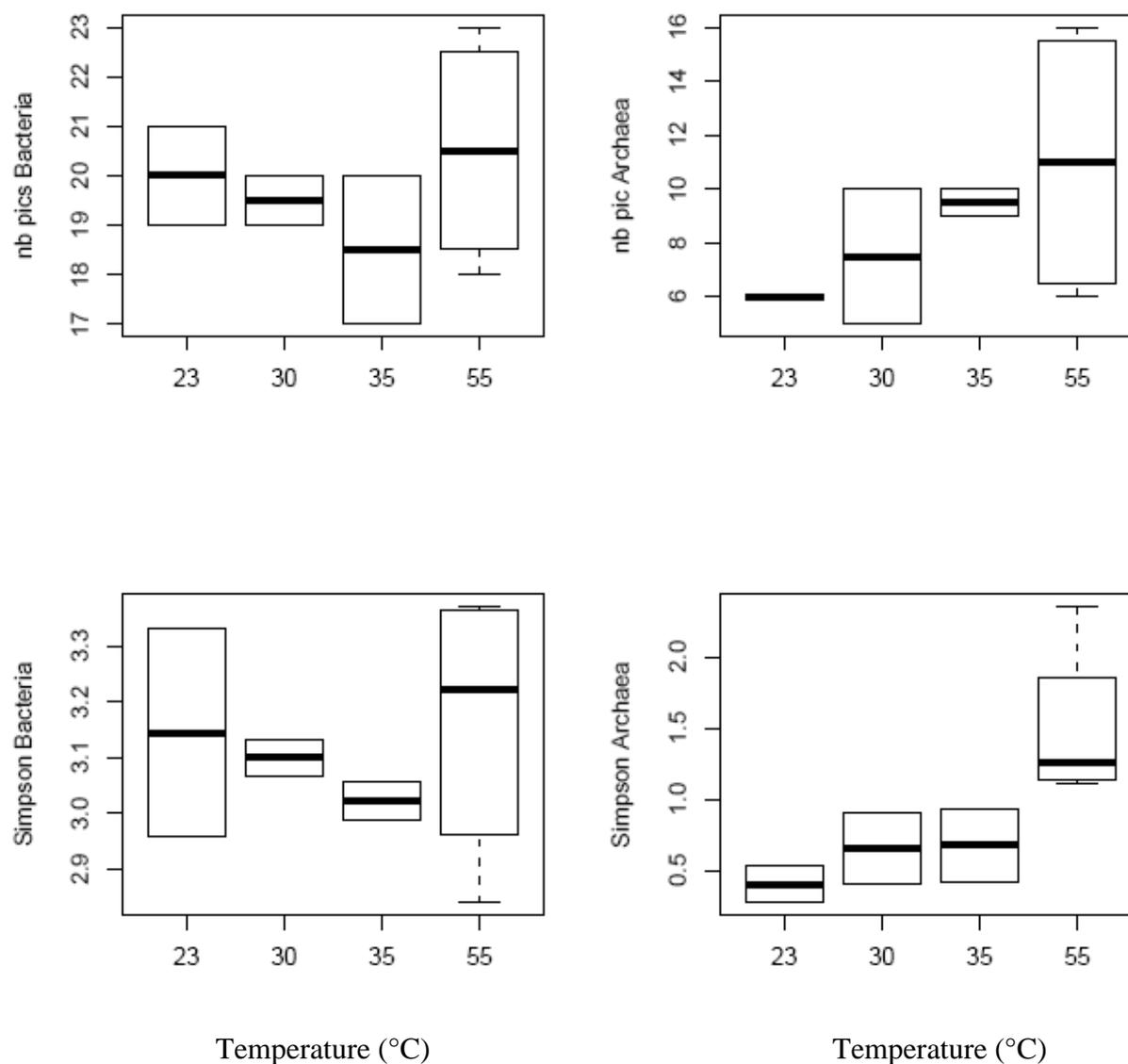


Figure 4.6: Niveau de diversité obtenu à partir des profils CE-SSCP en termes du nombre de pics bactéries (ligne en haut à gauche) et archées (ligne en haut à droite) et en termes d'indice de Simpson (ligne du bas à gauche et à droite) en fonction de la température.

Les divergences génétiques entre profils CE-SSCP bactéries et archées pour chaque inoculum pris séparément en considérant comme profil de référence le profil CE-SSCP à l'issue du conditionnement en réacteur sont présentés en figure 4.6. Les résultats obtenus étaient semblables à ceux pour lesquels les profils CE-SSCP de référence étaient ceux de l'inoculum à la température d'incubation de l'inoculum d'origine.

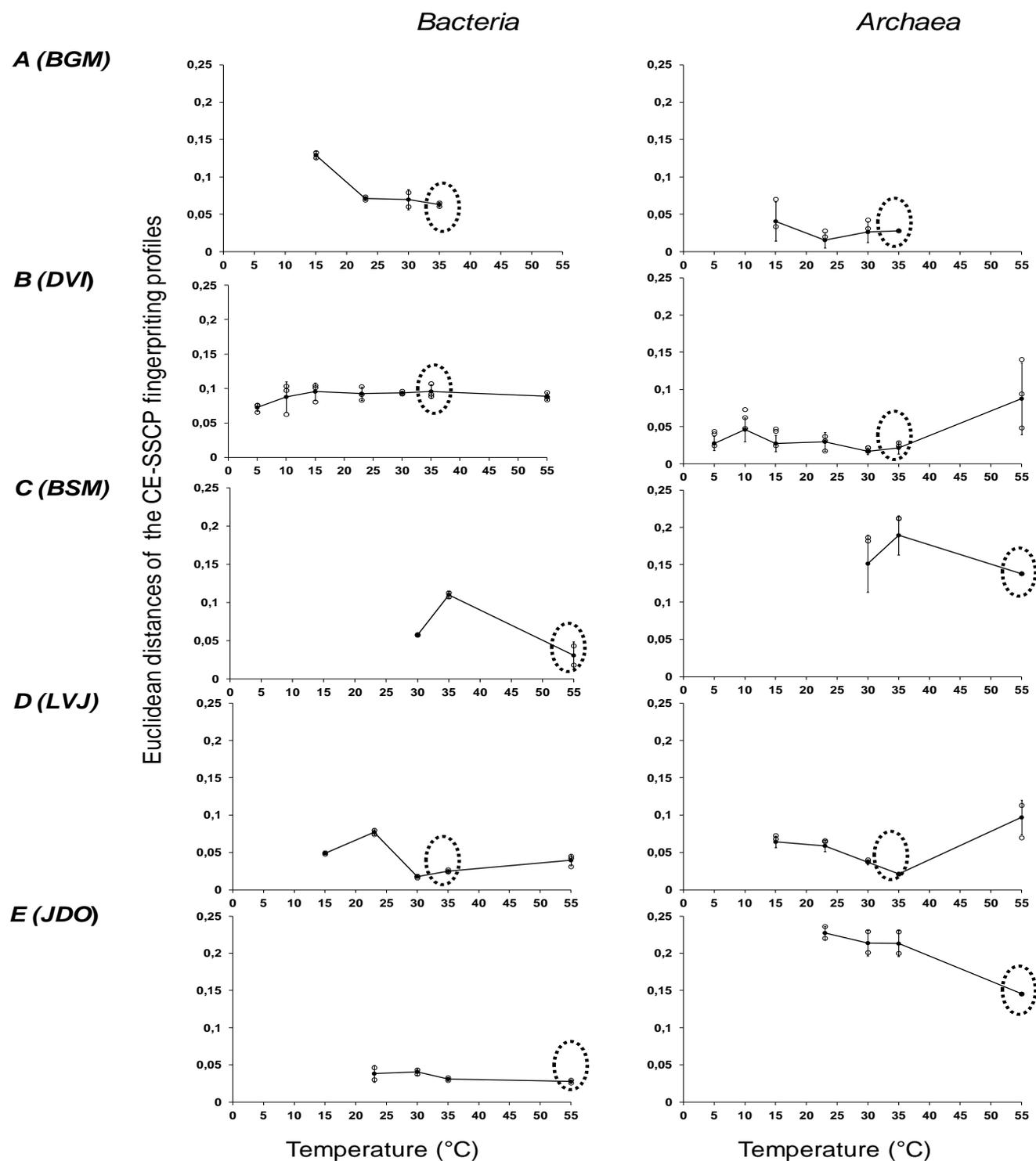


Figure 4.7: Divergences génétiques des profils CE-SSCP des bactéries et archées des cinq écosystèmes aux températures expérimentales avec comme profils de référence ceux des écosystèmes d'origine à la fin de la phase d'acclimation à l'éthanol. Les moyennes des divergences génétiques sont représentées par les cercles noirs. Les valeurs moyennes à la température de référence sont mises en évidence dans les cercles brisés

Perspectives

Au cours de cette étude nous avons cultivé les écosystèmes aux températures expérimentales. Dans le cas des températures pour lesquelles une activité méthanogène n'a pu être observée, il serait intéressant de vérifier l'activité méthanogène et d'apprécier le taux de mortalité en réincubant les fioles aux températures d'origine des inoculums. Kaparaju & Rintala (2003) ont par exemple montré qu'une augmentation de la température dans de gammes entre 5°C et 35°C contribuait à une amélioration de la production de méthane dans le traitement du fumier bovin. Par ailleurs, une caractérisation des communautés microbiennes avant et après le changement de températures permettrait d'observer la dynamique des populations microbiennes due au changement de températures.

Nous avons également limité l'étude sur la caractérisation des communautés microbiennes liée au changement de températures, à l'activité spécifique des méthanogènes. Il serait aussi utile d'étudier le lien entre la structure des communautés microbiennes et la production d'AGV. Tout comme dans le chapitre précédent, la quantification des micro-organismes en PCR quantitative ciblant les archées et les bactéries en début et en fin d'expérience ainsi que l'inventaire de gènes 16S permettrait d'identifier les espèces microbiennes impliquées dans la production de méthane et leur abondance en fonction des variables opératoires (température d'incubation et origine de l'inoculum). L'identification du gène *mcrA* pourrait aussi permettre de quantifier la capacité méthanogène des écosystèmes étudiés.

En introduction du chapitre 3, nous avons discuté de l'importance du ratio substrat/biomasse comme un des facteurs influant de la digestion anaérobie. Les expériences dans le cadre de cette thèse ont été faites en conditions de faibles croissances avec des ratios S/X très faibles. Ainsi, des tests à des ratios plus élevés pourraient être effectués tout comme l'utilisation de substrats plus complexes permettant l'étude de toute la chaîne trophique impliquée dans le processus de digestion anaérobie. L'extension de l'étude à d'avantage de températures thermophiles testées devraient également être effectuée. Tout ceci contribuerait certainement à mieux apprécier l'activité des écosystèmes.

**CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES**

Références bibliographiques

La digestion anaérobie est un processus biologique de transformation de la matière organique en absence d'oxygène en biogaz. Cette transformation se fait de manière spontanée dans plusieurs écosystèmes naturels (sédiments, rizières, marais, tractus intestinal de certains termites et mammifères, ...) par des consortia microbiens. En tant que procédé industriel, la digestion anaérobie se déroule dans des digesteurs anaérobies sous certaines conditions physico-chimiques. Elle permet ainsi de réduire la charge organique polluante de la matière organique tout en générant de l'énergie valorisable sous forme de biogaz. Le digestat, partie solide non digérée, issu du processus de digestion anaérobie peut être également valorisé soit en engrais organique, soit en amendement organique.

Le biogaz possède de nombreux débouchés possibles, analogues à ceux du «gaz naturel» tels que la production d'eau chaude et d'électricité, notamment par cogénération et l'utilisation en tant que carburant. A l'échelle industrielle les digesteurs anaérobies sont optimisés pour un fonctionnement à des gammes de températures mésophiles (35°C) et thermophiles (55°C).

Ainsi, l'objectif de cette thèse était d'évaluer **le rôle de l'écosystème microbien** sur la performance optimale de la digestion anaérobie et d'évaluer **le degré de spécialisation** des micro-organismes vis-à-vis d'un substrat et la température. Enfin, elle avait également pour but de déterminer **la capacité d'acclimatation** des communautés microbiennes à un substrat et à une température. Ces travaux nous ont ainsi permis d'établir le lien existant entre les trois variables étudiées : substrat, température et régime de l'écosystème microbien. De ce fait, dans un premier temps nous avons adapté plusieurs écosystèmes d'origines diverses à un substrat test de digestion anaérobie (éthanol). Cette approche avait pour but de vérifier les cinétiques de dégradation des consortia microbiens par ajouts successifs du substrat mais aussi sur un plan microscopique de comprendre le comportement des populations bactériennes et archées à la suite d'ajout d'éthanol. Cette étude s'inscrivait dans la recherche de bio-indicateurs du potentiel d'acclimatation des écosystèmes couvrant une variété de procédés et de conditions opératoires. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que les écosystèmes étudiés pouvaient être classés en fonction de leur performance intrinsèque. Par ailleurs, l'acclimatation au substrat éthanol a souvent permis d'améliorer la performance initiale des écosystèmes microbiens. De plus, différentes communautés bactériennes assuraient une performance efficace et une capacité d'acclimatation au substrat.

Nous avons enfin conclu cette étude en montrant que le potentiel d'acclimatation d'un écosystème était lié à l'activité des archées méthanogènes présentes au début de la phase d'acclimatation.

Références bibliographiques

Dans un second temps, les écosystèmes conditionnés dans la première étude ont été incubés à des températures couvrant toutes les gammes de fonctionnement des digesteurs anaérobies. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que les écosystèmes sont plus performants à leur température d'origine. Nous avons par la suite pu déduire que les écosystèmes mésophiles ont une meilleure capacité d'adaptation aux températures psychrophiles que leurs homologues thermophiles. L'acclimatation d'écosystèmes mésophiles aux températures psychrophiles se fait par des populations microbiennes très proches génétiquement. Cependant, lorsque l'acclimatation d'écosystèmes mésophiles aux températures thermophiles, des populations archées différentes sont impliquées. Enfin, l'acclimatation des écosystèmes thermophiles à des températures plus basses implique des populations bactéries proches génétiquement et des populations archées différentes.

Perspectives

Durant ces travaux, de nombreuses pistes de recherches ont été identifiées et mériteraient d'être exploitées afin de développer les connaissances en matière d'adaptation des écosystèmes anaérobies. Ces perspectives se classent en deux catégories. D'une part, celles s'orientant vers des pistes plus méthodologiques et applicables immédiatement en complément de ces travaux. Certaines d'entre elles ont déjà été évoquées dans les perspectives de chaque étude et se déclinent comme suit :

- 1) Pour une analyse complète à tous les régimes de températures, il serait intéressant d'élargir les expériences aux écosystèmes psychrophiles. Ceux utilisés dans le cadre de cette thèse n'ont malheureusement pas donné satisfaction. Ainsi pour étendre l'étude à ces écosystèmes, il serait important de se rapprocher de spécialistes des écosystèmes du froid.
- 2) D'autre part, il serait nécessaire avant l'étude des écosystèmes de procéder à une caractérisation fonctionnelle des écosystèmes avant le démarrage en réacteurs (gène fonctionnel *mcrA*). Il serait aussi utile de quantifier les micro-organismes présents au début et en fin d'expérience (PCR quantitative) ciblant les archées et les bactéries. De plus, les analyses par inventaires des gènes 16S seraient utiles afin de déterminer de potentiels bio-indicateurs de la digestion anaérobie psychrophile.
- 3) Les écosystèmes étudiés ont été inoculés à des températures bien définies tout au long de la période expérimentale. Il serait intéressant de voir le

Références bibliographiques

comportement des écosystèmes aux températures non fonctionnelles lorsqu'ils sont incubés à des températures pour lesquelles l'activité méthanogène est maximale. En outre, une caractérisation des communautés microbiennes avant et après changement de températures nous permettrait de comprendre la dynamique de ces communautés due à la variation de températures.

- 4) Lors de la phase d'acclimatation, nous avons considéré uniquement l'étude de la caractérisation structurelle des communautés microbiennes liée au changement de températures et à l'activité spécifique des méthanogènes. D'autres données de performance (la concentration en AGV) et l'utilisation de substrat plus complexe (Cellulose) pourraient faire l'objet d'analyses.
- 5) . Au cours de nos travaux, nous avons utilisé des réacteurs fonctionnant en mode batch. L'utilisation des réacteurs en mode continu assurerait de façon optimale le mélange entre le substrat et la biomasse. De plus, cela permettrait d'appliquer plusieurs conditions opératoires afin de déterminer lesquelles assurent un meilleur rendement épuratoire et une meilleure production de biogaz comme il est de coutume lors de l'application de la digestion anaérobie à basse température.
- 6) A notre connaissance, il n'existerait pas de données sur le bilan économique de la digestion anaérobie à basse température. Les travaux dans ce domaine permettraient de déterminer les coûts inhérents à l'application de ce procédé à l'échelle industrielle.

D'autre part, des questions orientées vers des pistes plus cognitives permettront de déterminer la possibilité de l'existence d'un « cœur fonctionnel » d'espèces microbiennes responsables de l'acclimatation d'un écosystème aux différents régimes de températures. Ces questions de recherche pourraient révéler la présence d'espèces microbiennes spécifiques aux basses températures. La réponse à ces différentes questions permettrait ainsi de mieux appréhender la stratégie à adopter lors de l'inoculation d'un écosystème de digestion anaérobie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abbassi-Guendouz, A. (2012). Lien entre paramètres opératoires, microorganismes et performances de la digestion anaérobie par voie sèche, PhD, Université de Montpellier 2. Montpellier, pp. 176.
- ADEME. 2010. Etude de marché de la méthanisation et de la valorisation du biogaz. ADEME. 0706C0053
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. & Haser, R. (1998). Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure with Folding & Design*, **6**(12), 1503-1516.
- Akila, G. & Chandra, T. S. (2007). Performance of an UASB reactor treating synthetic wastewater at low-temperature using cold-adapted seed slurry. *Process Biochemistry*, **42**(3), 466-471.
- Álvarez, J. A., Armstrong, E., Gomez, M. & Soto, M. (2008). Anaerobic treatment of low-strength municipal wastewater by a two-stage pilot plant under psychrophilic conditions. *Bioresource Technology*, **99**(15), 7051-7062.
- Alvarez, J. A., Ruiz, I. & Soto, M. (2008). Anaerobic digesters as a pretreatment for constructed wetlands. *Ecological Engineering*, **33**(1), 54-67.
- Amani, T., Nosrati, M. & Sreerishnan, T. R. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - a review. *Environmental Reviews*, **18**, 255-278.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**(1), 143-169.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P. & van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, **59**(5), 927-934.
- Angenent, L. T., Banik, G. C. & Sung, S. W. (2001). Anaerobic migrating blanket reactor treatment of low-strength wastewater at low temperatures. *Water Environment Research*, **73**(5), 567-574.
- APHA. (1992). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 18th ed, American Public Health Association. Washington DC, USA.

Archer, D. B. & Bishop, B. H. (1990). The microbiology and control of anaerobic digestion. In *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology*, ed. e. Heatley A, Elsevier Science Publishing LTD. London, pp. 43-89.

B

Battimelli, A., Carrère, H. & Delgenès, J. P. (2009). Saponification of fatty slaughterhouse wastes for enhancing anaerobic biodegradability. *Bioresource Technology*, **100**(15), 3695-3700.

Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J. P. & Gerday, C. (2000). Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the Antarctic *Pseudomonas* sp TACII18. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(15), 11147-11153.

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

Boone, D. R. & Bryant, M. P. (1980). Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp-nov gen-nov from methanogenic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, **40**(3), 626-632.

Borrel, G., Jezequel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.-P., Peyret, P., Fonty, G. & Lehours, A.-C. (2011). Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in microbiology*, **162**(9), 832-47.

Bouchez, T. (2008). L'élimination et la méthanisation des déchets non dangereux en installation de stockage. In *La méthanisation*, ed. T. e. Toc, pp. 301-323.

Buffière, P. & Frédéric, S. (2008). Les technologies de la méthanisation des résidus solides. *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances*, Numéro Thématique "traitement anaérobies", Février 2008, 14-19.

C

Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C. & Cowan, D. A. (2010). Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends in Microbiology*, **18**(8), 374-381.

Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **4**(5), 331-343.

- Chen, Y., Cheng, J. J. & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, **99**(10), 4044-4064.
- Chernicharo, C. A. L. & Almeida, P. G. S. (2011). Feasibility of UASB/trickling filter systems without final clarifiers for the treatment of domestic wastewater in small communities in Brazil. *Water Science and Technology*, **64**(6), 1347-1354.
- Choi, E. & Rim, J. M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Science and Technology*, **23**(7-9), 1259-1264.
- Chong, S. C., Liu, Y. T., Cummins, M., Valentine, D. L. & Boone, D. R. (2002). *Methanogenium marinum* sp nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **81**(1-4), 263-270.
- Chu, C. P., Tsai, D. G., Lee, D. J. & Tay, J. H. (2005). Size-dependent anaerobic digestion rates of flocculated activated sludge: Role of intrafloc mass transfer resistance. *Journal of Environmental Management*, **76**(3), 239-244.
- Claverie, P., Vigano, C., Ruysschaert, J. M., Gerday, C. & Feller, G. (2003). The precursor of a psychrophilic alpha-amylase: structural characterization and insights into cold adaptation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, **1649**(2), 119-122.
- Collins, G., Connaughton, S., Enright, A. M., Scully, C., Mahony, T. & O'Flaherty, V. (2006). Application and biomolecular monitoring of psychrophilic anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **54**(2), 41-47.
- Collins, G., Foy, C., McHugh, S. & O'Flaherty, V. (2005). Anaerobic treatment of 2,4,6-trichlorophenol in an expanded granular sludge bed-anaerobic filter (EGSB-AF) bioreactor at 15 degrees C. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**(1), 167-178.
- Collins, G., McHugh, S., Connaughton, S., Enright, A. M., Kearney, A., Scully, C., Mahony, T., Madden, P. & O'Flaherty, V. (2006). New low-temperature applications of anaerobic wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **41**(5), 881-895.
- Collins, G., Woods, A., McHugh, S., Carton, M. W. & O'Flaherty, V. (2003). Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**(2), 159-170.

- Collins, T. (2008). Fundamentals of Cold-Adapted Enzymes. In *Psychrophiles : From Biodiversity to Biotechnology* eds. R. Margesin, F. Schinner, J. C. Marx & C. Gerday, pp. 211-227.
- Connaughton, S., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2006a). Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18 degrees C. *Water Research*, **40**(5), 1009-1017.
- Connaughton, S., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2006b). Psychrophilic and mesophilic anaerobic digestion of brewery effluent: A comparative study. *Water Research*, **40**(13), 2503-2510.
- Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, **28**(3), 193-202.
- Converti, A., Del Borghi, A., Zilli, M., Arni, S. & Del Borghi, M. (1999). Anaerobic digestion of the vegetable fraction of municipal refuses: mesophilic versus thermophilic conditions. *Bioprocess Engineering*, **21**(4), 371-376.
- Crawford, D. L. & Powers, D. A. (1992). Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Molecular Biology and Evolution*, **9**(5), 806-813.
- Cresson, R. (2006). Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm, Vol. PhD, Université de Montpellier II, pp. 272.
- Cresson, R., Dabert, P. & Bernet, N. (2009). Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. *Journal of Applied Microbiology*, **106**(3), 863-876.

D

- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G. & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *Embo Reports*, **7**(4), 385-389.
- Dague, R. R., Banik, G. C. & Ellis, T. G. (1998). Anaerobic sequencing batch reactor treatment of dilute wastewater at psychrophilic temperatures. *Water Environment Research*, **70**(2), 155-160.
- Damien, A. (2008). *La Biomasse Energie*. Dunod, Paris.

- De Baere, L., Mattheeuws, B. & Velghe, F. (2010). State of the art of anaerobic digestion in Europe. In *12th World Congress on Anaerobic Digestion*, International Water Association. Guadalajara.
- De Vos, D., Xu, X., Hulpiaw, P., Vergauwen, B. & Van Beeumen, J. J. (2007). Structural investigation of cold activity and regulation of aspartate carbamoyltransferase from the extreme psychrophilic bacterium *Moritella profunda*. *Journal of Molecular Biology*, **365**(2), 379-395.
- Delbès, C., Moletta, R. & Godon, J. J. (2001). Bacterial and archéesl 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, **35**(1), 19-26.
- Demirel, B. & Scherer, P. (2011). Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass & Bioenergy*, **35**(3), 992-998.
- Devos, N., Ingouff, M., Loppes, R. & Matagne, R. F. (1998). Rubisco adaptation to low temperatures: A comparative study in psychrophilic and mesophilic unicellular algae. *Journal of Phycology*, **34**(4), 655-660.
- Dhaked, R. K., Singh, P. & Singh, L. (2010). Biomethanation under psychrophilic conditions. *Waste Management*, **30**(12), 2490-2496.
- Dorigo, U., Volatier, L. & Humbert, J. F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, **39**(11), 2207-2218.

E

- Eastman, J. A. & Ferguson, J. F. (1981). Solubilization of particulate organic-carbon during the acid phase of anaerobic-digestion. *Journal Water Pollution Control Federation*, **53**(3), 352-366.
- Elbeshbishy, E., Nakhla, G. & Hafez, H. (2012). Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresource Technology*, **110**, 18-25.
- Elmitwalli, T. A., Oahn, K. L. T., Zeeman, G. & Lettinga, G. (2002a). Treatment of domestic sewage in a two-step anaerobic filter/anaerobic hybrid system at low temperature. *Water Research*, **36**(9), 2225-2232.
- Enright, A.-M., McGrath, V., Gill, D., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2009). Effect of seed sludge and operation conditions on performance and archéesl community structure of

low-temperature anaerobic solvent-degrading bioreactors. *Systematic and Applied Microbiology*, **32**(1), 65-79.

F

- Feller, G. (2003). Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **60**(4), 648-662.
- Feller, G. & Gerday, C. (1997). Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **53**(10), 830-841.
- Feller, G., Payan, F., Theys, F., Qian, M. X., Haser, R. & Gerday, C. (1994). Stability and structural-analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis*-A23. *European Journal of Biochemistry*, **222**(2), 441-447.
- Fermoso, F. G., Bartacek, J., Jansen, S. & Lens, P. N. L. (2009). Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. *Science of the Total Environment*, **407**(12), 3652-3667.
- Ferrer, I., Gamiz, M., Almeida, M. & Ruiz, A. (2009). Pilot project of biogas production from pig manure and urine mixture at ambient temperature in Ventanilla (Lima, Peru). *Waste Management*, **29**(1), 168-173.
- Ferrer, I., Garfi, M., Uggetti, E., Ferrer-Marti, L., Calderon, A. & Velo, E. (2011). Biogas production in low-cost household digesters at the Peruvian Andes. *Biomass & Bioenergy*, **35**(5), 1668-1674.
- Fey, A. & Conrad, R. (2000). Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(11), 4790-+.
- Fisher, M. M. & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(10), 4630-4636.
- Forster-Carneiro, T., Perez, M. & Romero, L. I. (2008). Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. *Bioresource Technology*, **99**(15), 6994-7002.
- Franzmann, P. D., Liu, Y. T., Balkwill, D. L., Aldrich, H. C., deMacario, E. C. & Boone, D. R. (1997). *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**(4), 1068-1072.

- Franzmann, P. D., Springer, N., Ludwig, W., Demacario, E. C. & Rohde, M. (1992). A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica - *Methanococcoides burtonii* Sp-Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**(4), 573-581.
- Frédéric, S. & Lugardon, A. (2007). Méthanisation des effluents industriels liquides. *Les Techniques de l'Ingénieur*.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. & Rossi, P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, **4**(11), 634-643.

G

- Galand, P. E., Juottonen, H., Fritze, H. & Yrjala, K. (2005). Methanogen communities in a drained bog: Effect of ash fertilization. *Microbial Ecology*, **49**(2), 209-217.
- Garcia, J. L., Patel, B. K. C. & Ollivier, B. (2000). Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic *Archées*. *Anaerobe*, **6**(4), 205-226.
- Garfi, M., Ferrer-Marti, L., Villegas, V. & Ferrer, I. (2011). Psychrophilic anaerobic digestion of guinea pig manure in low-cost tubular digesters at high altitude. *Bioresource Technology*, **102**(10), 6356-6359.
- Gobalt, J.M., Aragno, M., Matthey, M. 2003. *Le Sol vivant. 2nd ed.* Presses polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, Suisse.
- Goberna, M., Gadermaier, M., Garcia, C., Wett, B. & Insam, H. (2010). Adaptation of methanogenic communities to the cofermentation of cattle excreta and olive mill wastes at 37 degrees C and 55 degrees C. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(19), 6564-6571.
- Godon, J. J. (2008). Aspects biochimiques et microbiologiques de la méthanisation. In *La méthanisation*, Editions Tec et Doc, pp. 61-86.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. & Moletta, R. (1997). Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Water Science and Technology*, **36**(6-7), 49-55.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. & Moletta, R. (1998). Molecular inventory of an anaerobic digestion microbial ecosystem. *Genetics Selection Evolution*, **30**, S273-S285.

- Gomec, C. Y., Eroglu, V. & Wilderer, P. A. (2009). Identifying acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens in psychrophilic and mesophilic granular sludges treating synthetic sewage by means of fish and cslm. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **17**(2), 135-153.
- Görish, U. & Helm, M. (2008). *La production de Biogaz. Les Editions Eugen Ulmer ed*, Paris.
- Gujer, W. & Zehnder, A. J. B. (1983). Conversion processes in anaerobic-digestion. *Water Science and Technology*, **15**(8-9), 127-167.
- Guyot, J. P. (1990). Etude de quelques interactions microbiennes lors de la digestion anaérobie de la matière organique par des cultures mixtes définies ou naturelles Vol. PhD, Université de Provence Aix-Marseille 1, pp. 124.

H

- Habouzit. (2010). Rôle des matériaux-supports sur la mise en place du biofilm: Application au démarrage d'un procédé de la méthanisation, Vol. PhD, Université de Montpellier 2. Montpellier, pp. 244.
- Habouzit, F., Gévaudan, G., Hamelin, J., Steyer, J.-P. & Bernet, N. (2010). Influence of support material properties on the potential selection of Archées during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource Technology*, **102**(5), 4054-4060.
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M. & DeLong, E. F. (2003). Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archées. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(9), 5483-5491.
- Harper, S. R. & Pohland, F. G. (1986). Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological waste-water treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**(4), 585-602.
- Helland, R., Larsen, A. N., Smalas, A. O. & Willassen, N. P. (2006). The 1.8 angstrom crystal structure of a proteinase K-like enzyme from a psychrotroph *Serratia* species. *Febs Journal*, **273**(1), 61-71.
- Hochheimer, A., Hedderich, R. & Thauer, R. K. (1998). The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*: induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme. *Archives of Microbiology*, **170**(5), 389-393.

- Holmer, M. & Kristensen, E. (1994). Coexistence of sulfate reduction and methane production in an organic-rich sediment. *Marine Ecology-Progress Series*, **107**(1-2), 177-184.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006). Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(2), 1623-1630.
- Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., Francois, J. M., Baise, E., Feller, G. & Gerday, C. (2001). Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4), 1529-1535.
- Huser, B. A., Wuhrmann, K. & Zehnder, A. J. B. (1982). *Methanothrix soehngeni* gen-nov-sp-nov, a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology*, **132**(1), 1-9.

J

- Jewell, W. J., Switzenbaum, M. S. & Morris, J. W. (1981). Municipal wastewater-treatment with the anaerobic attached microbial film expanded bed process. *Journal Water Pollution Control Federation*, **53**(4), 482-490.
- Jirka, A. M. & Carter, M. J. (1975). Micro semiautomated analysis of surface and wastewaters for chemical oxygen demand. *Analytical Chemistry*, **47**(8), 1397-1402.
- Johns, G. C. & Somero, G. N. (2004). Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A(4)-Lactate dehydrogenases of pacific damselfishes (*Chromis* spp.). *Molecular Biology and Evolution*, **21**(2), 314-320.
- Juottonen, H., Galand, P. E., Tuittila, E. S., Laine, J., Fritze, H. & Yrjala, K. (2005). Methanogen communities and *Bacteria* along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environmental Microbiology*, **7**(10), 1547-1557.
- Juottonen, H., Galand, P. E. & Yrjala, K. (2006). Detection of methanogenic *Archées* in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. *Research in Microbiology*, **157**(10), 914-921.
- Juottonen, H., Tuittila, E. S., Juutinen, S., Fritze, H. & Yrjala, K. (2008). Seasonality of rDNA- and rRNA-derived archéesl communities and methanogenic potential in a boreal mire. *Isme Journal*, **2**(11), 1157-1168.

K

- Kaparaju, P. L. N. & Rintala, J. A. (2003). Effects of temperature on post-methanation of digested dairy cow manure in a farm-scale biogas production system. *Environmental Technology*, **24**(10), 1315-1321.
- Kawahara, H. (2008). Cryoprotectants and ice-binding proteins. In *Psychrophiles : From Biodiversity to Biotechnology*, eds. R. Margesin, F. Schinner, J. C. Marx & C. Gerday, pp. 229-246.
- Khemkhao, M., Nuntakumjorn, B., Techkarnjanaruk, S. & Phalakornkule, C. (2011). Effect of chitosan on UASB treating POME during a transition from mesophilic to thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, **102**(7), 4674-4681.
- King, S. M., Barrington, S. & Guiot, S. R. (2011). In-storage psychrophilic anaerobic digestion of swine manure: Acclimation of the microbial community. *Biomass & Bioenergy*, **35**(8), 3719-3726.
- Koller, E. (2005). Boues résiduaires. In *Dictionnaire Encyclopédique du Génie des Procédés*, ed. Dunod. Paris, pp. 516.
- Kotsyurbenko, O. R. (2005). Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**(1), 3-13.
- Kotsyurbenko, O. R., Friedrich, M. W., Simankova, M. V., Nozhevnikova, A. N., Golyshin, P. N., Timmis, K. N. & Conrad, R. (2007). Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenes is in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic Methanobacterium strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(7), 2344-2348.

L

- Laggoun-Défarage, F. & Muller, F. (2008). Les tourbières et leur rôle de stockage de carbone face aux changements climatiques. *Zones Humides Info* (59-60), 22-24.
- Lambert, G., Chappellaz, J., Foucher, J. P. & Ramstein, G. (2006). *Le méthane et le destin de la Terre: Les hydrates de méthanes: Rêve ou cachemar ?* EDP SCIENCES ed, Les Ulis.

- Leclerc, M., Delgenès, J. P. & Godon, J. J. (2004). Diversity of the archéesl community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology*, **6**(8), 809-819.
- Lefebvre, O., Quentin, S., Torrijos, M., Godon, J. J., Delgenès, J. P. & Moletta, R. (2007). Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**(1), 61-69.
- Leiros, I., Moe, E., Lanes, O., Smalas, A. O. & Willassen, N. P. (2003). The structure of uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (*Gadus morhua*) reveals cold-adaptation features. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **59**, 1357-1365.
- Lesteur, M., Latrille, E., Maurel, V. B., Roger, J. M., Gonzalez, C., Junqua, G. & Steyer, J. P. (2010). First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*, **102**(3), 2280-2288.
- Lettinga, G. (1995). Anaerobic-digestion and waste-water treatment systems. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **67**(1), 3-28.
- Lettinga, G., Rebac, S., Parshina, S., Nozhevnikova, A., van Lier, J. B. & Stams, A. J. M. (1999). High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(4), 1696-1702.
- Lettinga, G., Rebac, S. & Zeeman, G. (2001). Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, **19**(9), 363-370.
- Levén, L., Eriksson, A. R. B. & Schnurer, A. (2007). Effect of process temperature on bacterial and archéesl communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**(3), 683-693.
- Lin, J. J. & Somero, G. N. (1995). Thermal adaptation of cytoplasmic malate-dehydrogenases of Eastern Pacific Barracuda (*Sphyraena Spp*) - the role of differential isoenzyme expression. *Journal of Experimental Biology*, **198**(2), 551-560.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(11), 4516-4522.

- Liu, Y. & Tay, J. H. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, **22**(7), 533-563.
- Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C. E., Feller, G., Gerday, C. & Bouriotis, V. (2001). Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *Journal of Molecular Biology*, **310**(2), 291-297.
- Lopes, W. S., Leite, V. D. & Prasad, S. (2004). Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technology*, **94**(3), 261-266.
- Lu, S.-G., Imai, T., Ukita, M. & Sekine, M. (2007). Start-up performances of dry anaerobic mesophilic and thermophilic digestions of organic solid wastes. *Journal of Environmental Sciences-China*, **19**(4), 416-420.

M

- Mackelprang, R., Waldrop, M. P., DeAngelis, K. M., David, M. M., Chavarria, K. L., Blazewicz, S. J., Rubin, E. M. & Jansson, J. K. (2011). Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature*, **480**(7377), 368-U120.
- Madden, P., Chinalia, F. A., Enright, A. M., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2010). Perturbation-independent community development in low-temperature anaerobic biological wastewater treatment bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **105**(1), 79-87.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. (2009). *Biology of microorganisms*. 12th ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Margesin, R. & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, **162**(3), 346-361.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z. T., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang,

- S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P. G., Begley, R. F. & Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**(7057), 376-380.
- Masse, D. I., Masse, L., Hince, J. F. & Pomar, C. (2008). Psychrophilic anaerobic digestion biotechnology for swine mortality disposal. *Bioresource Technology*, **99**(15), 7307-7311.
- McHugh, S., Carton, M., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2004). Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16-37 degrees C. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**(3), 369-378.
- McHugh, S., Carton, M., Mahony, T. & O'Flaherty, V. (2003). Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters*, **219**(2), 297-304.
- McInerney, J. O., Wilkinson, M., Patching, J. W., Embley, T. M. & Powell, R. (1995). Recovery and phylogenetic analysis of novel archéesl ribosomal-rna sequences from a deep-sea deposit feeder. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(4), 1646-1648.
- McKeown, R. M., Scully, C., Enright, A. M., Chinalia, F. A., Lee, C., Mahony, T., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2009). Psychrophilic methanogenic community development during long-term cultivation of anaerobic granular biofilms. *ISME Journal*, **3**(11), 1231-1242.
- McKeown, R. M., Scully, C., Mahony, T., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2009a). Long-term (1243 days), low-temperature (4-15 degrees C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: Bioprocess performance and physiological characteristics. *Water Research*, **43**(6), 1611-1620.
- Metje, M. & Frenzel, P. (2005). Effect of temperature on anaerobic ethanol oxidation and methanogenesis in acidic peat from a northern wetland. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(12), 8191-8200.
- Metje, M. & Frenzel, P. (2007). Methanogenesis and methanogenic pathways in a peat from subarctic permafrost. *Environmental Microbiology*, **9**(4), 954-964.
- Michaud, S., Bernet, N., Roustan, M. & Delgenès, J. P. (2003). Influence of hydrodynamic conditions on biofilm behavior in a methanogenic inverse turbulent bed reactor. *Biotechnology Progress*, **19**(3), 858-863.
- Michelland, R. J. (2009b). Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores: approche comparée vache/lapin, Vol. PhD, Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, pp. 363.

- Michelland, R. J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L. & Cauquil, L. (2009a). StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources*, **9**(5), 1359-1363.
- Moletta, R. (2008). Technologies de la méthanisation de la biomasse Déchets ménagers et agricoles. In *La méthanisation*, ed. T. e. Doc. Paris, pp. 181-196.
- Moletta, R. (2008). Technologies de traitement des effluents industriels par la méthanisation. In *La méthanisation*. ed. T. e. Doc. Paris, pp. 137-157.
- Monroy, O., Fama, G., Meraz, M., Montoya, L. & Macarie, H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. *Water Research*, **34**(6), 1803-1816.
- Monteiro, M. D., Schwantes, M. L. B., Schwantes, A. R. & Silva, M. R. D. (1998). Thermal stability of soluble malate dehydrogenase isozymes of subtropical fish belonging to the orders Characiformes, Siluriformes and Perciformes. *Genetics and Molecular Biology*, **21**(2), 191-199.
- Montero, B., Garcia-Morales, J. L., Sales, D. & Solera, R. (2009). Comparative analysis of different microbial techniques of quantification applied to anaerobic digestion. In *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, World Scientific Publ Co Pte Ltd. Singapore, pp. 126-130.
- Montero, B., Garcia-Morales, J. L., Sales, D. & Solera, R. (2008). Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **99**(8), 3233-3243.
- Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L. & Huner, N. P. A. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**(1), 222-252.
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic *Bacteria*. *Bacteriological Reviews*, **39**(2), 144-167.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-rna. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(3), 695-700.

N

- Nelson, M. C., Morrison, M. & Yu, Z. (2011). A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, **102**(4), 3730-3739.

- Noya, A. (2008). Technologies de traitement des effluents urbains dans les pays chaud. In *La méthanisation*, ed. T. e. Toc. Paris, pp. 161-180.
- Nozhevnikova, A. N., Kotsyurbenko, O. R. & Parshina, S. N. (1999). Anaerobic manure treatment under extreme temperature conditions. *Water Science and Technology*, **40**(1), 215-221.
- Nozhevnikova, A. N., Nekrasova, V., Ammann, A., Zehnder, A. J. B., Wehrli, B. & Holliger, C. (2007). Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries. *FEMS Microbiology Ecology*, **62**(3), 336-344.
- Nozhevnikova, A. N., Simankova, M. V., Parshina, S. N. & Kotsyurbenko, O. R. (2001). Temperature characteristics of methanogenic archées and acetogenic bacteria isolated from cold environments. *Water Science and Technology*, **44**(8), 41-48.

O

- O'Reilly, J., Chinalia, F. A., Mahony, T., Collins, G., Wu, J. & O'Flaherty, V. (2009b). Cultivation of low-temperature (15 degrees C), anaerobic, wastewater treatment granules. *Letters in Applied Microbiology*, **49**(4), 421-426.
- O'Reilly, J., Lee, C., Collins, G., Chinalia, F., Mahony, T. & O'Flaherty, V. (2009a). Quantitative and qualitative analysis of methanogenic communities in mesophilically and psychrophilically cultivated anaerobic granular biofilms. *Water Research*, **43**(14), 3365-3374.
- ODE. (2011). Elimination des boues d'assainissement.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R. B. & Simpson, G. L. (2010). Community Ecology Package. R package version 1.17-4.
- Oremland, R. S. & Boone, D. R. (1994). *Methanlobus taylorii* sp-nov, a new methylotrophic, estuarine methanogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**(3), 573-575.
- Ortega, L., Barrington, S. & Gulot, S. R. (2008). Thermophilic adaptation of a mesophilic anaerobic sludge for food waste treatment. *Journal of Environmental Management*, **88**(3), 517-525.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F. L. & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel

electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(9), 3367-3373.

P

Panoff, J. M., Corroler, D., Thammavongs, B. & Boutibonnes, P. (1997). Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic Gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Journal of Bacteriology*, **179**(13), 4451-4454.

Pavlostathis, S. G. & Giraldo-Gomez, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology*, **24**(8), 35-59.

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

Pfeffer, J. T. (1979). Anaerobic digestion process. In *Anaerobic digestion*, eds. D. A. Stafford, B. I. Wheatley & D. E. Hughes, Applied Science Publishers LTD. Cardiff, pp. 528.

Pfeffer, J. T. (1974). Temperature effects on anaerobic fermentation of domestic refuse. *Biotechnology and Bioengineering*, **16**(6), 771-787.

Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, **6**, 125-136.

Piétrasanta, Y. & Bondon, D. (1994). *Le lagunage écologique*. *ECONOMICA ed*, Paris.

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

Q

Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J. P., Carrère, H. & Trably, E. (2011). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(4), 3150-3159.

R

Raposo, F., De la Rubia, M. A., Fernandez-Cegri, V. & Borja, R. (2011a). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane

- yields and experimental procedures. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **16**(1), 861-877.
- Raposo, F., Fernandez-Cegri, V., De la Rubia, M. A., Borja, R., Beline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernandez, B., Fernandez-Polanco, M., Frigon, J. C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Mendez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I. & de Wilde, V. (2011b). Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **86**(8), 1088-1098.
- Riise, E. K., Lorentzen, M. S., Helland, R., Smalas, A. O., Leiros, H.-K. S. & Willassen, N. P. (2007). The first structure of a cold-active catalase from *Vibrio salmonicida* at 1.96 angstrom reveals structural aspects of cold adaptation. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **63**, 135-148.
- Rivkina, E., Laurinavichius, K., McGrath, J., Tiedje, J., Shcherbakova, V. & Gilichinsky, D. (2004). Microbial life in permafrost. In *Space Life Sciences: Search for Signatures of Life, and Space Flight Environmental Effects on the Nervous System*, Vol. 33, pp. 1215-1221.
- Rivkina, E., Shcherbakova, V., Laurinavichius, K., Petrovskaya, L., Krivushin, K., Kraev, G., Pecheritsina, S. & Gilichinsky, D. (2007). Biogeochemistry of methane and methanogenic archées in permafrost. *FEMS Microbiology Ecology*, **61**(1), 1-15.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S. & Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and Ph on microbial-growth. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(2), 610-616.
- Roy, F., Samain, E., Dubourguier, H. C. & Albagnac, G. (1986). *Synthrophomonas sapovorans* sp-nov, a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long-chain fatty-acids. *Archives of Microbiology*, **145**(2), 142-147.
- Rozzi, A. & Remigi, E. (2004). Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **3**(2), 93-115.
- Russel, N. J. (2008). Membrane components and cold sensing. In *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology* eds. R. Margesin, F. Schinner, J. C. Marx & C. Gerday, Springer pp. 117-190.

S

- Sabri, A. (2001). Mise en évidence d'un mécanisme biochimique empêchant la croissance de la souche psychrophile *Rhodotorula Aurantianca A19* aux températures modérées. In *Centre Wallon de Biologie Industrielle Service de Technologie Microbienne*, Vol. PhD, Université de Liège. Liège, pp. 140.
- Sayed, S. K. I. & Fergala, M. A. A. (1995). Two-stage UASB concept for treatment of domestic sewage including sludge stabilization process. *Water Science and Technology*, **32**(11), 55-63.
- Sboner, A., Mu, X. J., Greenbaum, D., Auerbach, R. K. & Gerstein, M. B. (2011). The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biology*, **12**(8), 10.
- Schellinkhout, A. & Collazos, C. J. (1992). Full-scale application of the uasb technology for sewage-treatment. *Water Science and Technology*, **25**(7), 159-166.
- Schulz, S. & Conrad, R. (1996). Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiology Ecology*, **20**(1), 1-14.
- Schulz, S., Matsuyama, H. & Conrad, R. (1997). Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiology Ecology*, **22**(3), 207-213.
- Scully, C., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2006). Anaerobic biological treatment of phenol at 9.5-15 degrees C in an expanded granular sludge bed (EGSB)-based bioreactor. *Water Research*, **40**(20), 3737-3744.
- Scully, C., Collins, G. & O'Flaherty, V. (2007). Granular biofilm-based anaerobic digestion: molecular biomonitoring and high-rate psychrophilic treatment of phenolic wastewater. *Water Science and Technology*, **55**(1-2), 43-49.
- Seghezzi, L., Zeeman, G., van Lier, J. B., Hamelers, H. V. M. & Lettinga, G. (1998). A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, **65**(3), 175-190.
- Senthilkumar, M., Gnanapragasam, G., Arutchelvan, V. & Nagarajan, S. (2011). Treatment of textile dyeing wastewater using two-phase pilot plant UASB reactor with sago wastewater as co-substrate. *Chemical Engineering Journal*, **166**(1), 10-14.

- Shin, S. G., Lee, S., Lee, C., Hwang, K. & Hwang, S. (2010). Qualitative and quantitative assessment of microbial community in batch anaerobic digestion of secondary sludge. *Bioresource Technology*, **101**(24), 9461-9470.
- Shivaji, S. & Prakash, J. S. S. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature? *Archives of Microbiology*, **192**(2), 85-95.
- Siddiqui, K. S. & Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. In *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 75, pp. 403-433.
- Siggins, A., Enright, A. M. & O'Flaherty, V. (2011). Methanogenic community development in anaerobic granular bioreactors treating trichloroethylene (TCE)-contaminated wastewater at 37 degrees C and 15 degrees C. *Water Research*, **45**(8), 2452-2462.
- Siles, J. A., Brekelmans, J., Martin, M. A., Chica, A. F. & Martin, A. (2010). Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **101**(23), 9040-9048.
- Simankova, M. V., Kotsyurbenko, O. R., Lueders, T., Nozhevnikova, A. N., Wagner, B., Conrad, R. & Friedrich, M. W. (2003). Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, **26**(2), 312-318.
- Simankova, M. V., Parshina, S. N., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Zehnder, A. J. B. & Nozhevnikova, A. N. (2001). *Methanosarcina lacustris* sp nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**(3), 362-367.
- Singh, N., Kendall, M. M., Liu, Y. T. & Boone, D. R. (2005). Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococcoides alaskense* sp nov., and emended description of *Methanosarcina baltica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 2531-2538.
- Skalova, T., Dohnalek, J., Spiwok, V., Lipovova, P., Vondrackova, E., Petrokova, H., Duskova, J., Strnad, H., Kralova, B. & Hasek, J. (2005). Cold-active beta-galactosidase from *Arthrobacter* sp C2-2 forms compact 660 kDa hexamers: Crystal structure at 1.9 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*, **353**(2), 282-294.
- Sorensen, A. H. & Ahring, B. K. (1993). Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **40**(2-3), 427-431.

- Soto, M., Mendez, R. & Lema, J. M. (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity tests - theoretical basis and experimental set-up. *Water Research*, **27**(8), 1361-1376.
- Sowers, K. R. & Ferry, J. G. (1985). Trace-metal and vitamin requirements of *Methanococcoides methylutens* grown with trimethylamine. *Archives of Microbiology*, **142**(2), 148-151.
- Speece, R. E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Pr, Nashville, TN, USA.
- Stams, A.J.M., Plugge, C.M. 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archées. *Nature Reviews Microbiology*, **7**(8), 568-577.

T

- Takashima, M., Shimada, K. & Speece, R. E. (2011). Minimum requirements for trace metals (Iron, Nickel, Cobalt, and Zinc) in thermophilic and mesophilic methane fermentation from glucose. *Water Environment Research*, **83**(4), 339-346.
- Tale, V. P., Maki, J. S., Struble, C. A. & Zitomer, D. H. (2011). Methanogen community structure-activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters. *Water Research*, **45**(16), 5249-5256.
- Team, R. D. C. (2009). R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing Vienna.
- Thiele, J. H. (1991). Mixed-culture interactions in methanogenesis. In *Mixed cultures in biotechnology*, ed. M. G. Hill, Zeikus, G. Johnson E.A. New York, pp. 261-292.
- Tosco, A., Birolo, L., Madonna, S., Lolli, G., Sannia, G. & Marino, G. (2003). GroEL from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: molecular characterization and gene cloning. *Extremophiles*, **7**(1), 17-28.
- Toyota, E., Ng, K. K. S., Kuninaga, S., Sekizaki, H., Itoh, K., Tanizawa, K. & James, M. N. G. (2002). Crystal structure and nucleotide sequence of an anionic trypsin from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in comparison with Atlantic salmon (*Salmo salar*) and bovine trypsin. *Journal of Molecular Biology*, **324**(3), 391-397.

U

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

Ueno, Y., Tataru, M., Fukui, H., Makiuchi, T., Goto, M. & Sode, K. (2007). Production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation of anaerobic process. *Bioresource Technology*, **98**(9), 1861-1865.

V

van Lier, J. B., Boersma, F., Debets, M. & Lettinga, G. (1994). High-rate thermophilic anaerobic waste-water treatment in compartmentalized upflow reactors. *Water Science and Technology*, **30**(12), 251-261.

van Lier, J. B., Rebac, S. & Lettinga, G. (1997). High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions. *Water Science and Technology*, **35**(10), 199-206.

Veeken, A. & Hamelers, B. (1999). Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource Technology*, **69**(3), 249-254.

Violot, S., Aghajari, N., Czjzek, M., Feller, G., Sonan, G. K., Gouet, P., Gerday, C., Haser, R. & Receveur-Brechot, V. (2005). Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *Journal of Molecular Biology*, **348**(5), 1211-1224.

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

Von Klein, D., Arab, H., Volker, H. & Thomm, M. (2002). *Methanosarcina baltica*, sp nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea. *Extremophiles*, **6**(2), 103-110.

W

Wang, E., Koutsioulis, D., Leiros, H. K. S., Andersen, O. A., Bouriotis, V., Hough, E. & Heikinheimo, P. (2007). Crystal structure of alkaline phosphatase from the Antarctic bacterium TAB5. *Journal of Molecular Biology*, **366**(4), 1318-1331.

- Wang, K. (1994). Integrated anaerobic and aerobic treatment of sewage, PhD, University of Wageningen. Wageningen, The Netherlands.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J. & Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, **99**(17), 7928-7940.
- Weiland, P. (2009). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**(4), 849-860.
- Werner, J. J., Knights, D., Garcia, M. L., Scalfone, N. B., Smith, S., Yarasheski, K., Cummings, T. A., Beers, A. R., Knight, R. & Angenent, L. T. (2011). Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(10), 4158-4163.
- Whiticar, M. J., Faber, E. & Schoell, M. (1986). Biogenic methane formation in marine and fresh-water environments - CO₂ reduction vs acetate fermentation isotope evidence. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **50**(5), 693-709.

Y

- Ye, N. F., Lu, F., Shao, L. M., Godon, J. J. & He, P. J. (2007). Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(4), 1055-1065.
- Yu, H. Q., Fang, H. H. P. & Gu, G. W. (2002). Comparative performance of mesophilic and thermophilic acidogenic upflow reactors. *Process Biochemistry*, **38**(3), 447-454.

Z

- Zeeman, G. & Lettinga, G. (1999). The role of anaerobic digestion of domestic sewage in closing the water and nutrient cycle at community level. *Water Science and Technology*, **39**(5), 187-194.
- Zhang, D. D., Zhu, W. B., Tang, C., Suo, Y. L., Gao, L. J., Yuan, X. F., Wang, X. F. & Cui, Z. J. (2011). Bioreactor performance and methanogenic population dynamics in a low-temperature (5-18 degrees C) anaerobic fixed-bed reactor. *Bioresource Technology*, **104**, 136-143.
- Zhang, G. S., Tian, J. Q., Jiang, N., Guo, X. P., Wang, Y. F. & Dong, X. Z. (2008). Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic

- characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC-I. *Environmental Microbiology*, **10**(7), 1850-1860.
- Zinder , S. H. (1993). Physiological Ecology of Methanogens. In *Methanogenesis*, Chapman & Hall. New York, pp. 128-206.
- Zumstein, E., Moletta, R. & Godon, J. J. (2000). Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, **2**(1), 69-78.

ANNEXES

Annexe 1 : Mesure de la biodégradabilité anaérobie avec le système Oxitop à surpression

Annexe 2 : Cinétiques de production de biogaz pour les différents écosystèmes après incubation aux différentes températures

Annexe 1 : Mesure de la biodégradabilité anaérobie système oxitop

Matériel en commun:

- 1 Contrôleur infrarouge OC 110 (LBE), posté dans la halle paillasse physico-chimique
- Logiciel de récupération des données Achat_OC (responsable informatique) à installer sur son PC
- Système de contrôle pneumatique des têtes

Matériel spécifique à la biodégradabilité anaérobie :

- 24 Flacons 1L, 2 prises latérales « type GL 25 »
- 12 Flacons 1L, 2 prises latérales type « fioles à pénicilline » (Fabriqué par la verrerie Legallais)
- 24 Tête de mesure (LBE1-12, EM1-12),
- 24 adaptateurs,
- septums jaunes pour GL25,
- septums roses pour pénicilline
- 4 Agitateurs magnétiques 6 postes (LBE 1, LBE 2, EM1, EM2)
- D'autres équipements Oxitop (têtes, tables agitantes, ...) sont réservés en priorité pour la biodégradabilité aérobie

Réactifs spécifiques à la biodégradabilité anaérobie :

- Inoculum de boue anaérobie
- Solution tampon : phosphate ou bicarbonate, stockée à 4°C
- solution oligoéléments, stockée à 4°C
- solution macroéléments (cf protocole Biodégradabilité anaérobie, Pierre Buffière), stockée à 4°C
- Substrat biodégradable de référence (éthanol, glucose, ...)

Procédure de détermination de la biodégradabilité anaérobie :

Préparation des fioles :

- Si nécessaire, préparer la solution tampon.

En fonction des essais il est possible d'utiliser une solution bicarbonate ou phosphate.

*Pour la préparation des solutions voir partie 2.2.2

- Préparer l'inoculum

Les boues anaérobies sont sensibles à l'oxygène, utiliser des boues « fraîches » issues d'un digesteur dont l'activité est élevée.

Caractériser la teneur en MVS de l'inoculum afin de déterminer la quantité nécessaire correspondant à la charge initiale requise. (cf tableur). Attention cette manip nécessite plus de 24H.

- Si nécessaire, stérilisation préalable des fioles et accessoires en contact avec le liquide (adaptateur, bouchons, septum) et des solutions inorganiques (macro, micro, tampon).
Voir avec les personnes habilitées à utiliser l'autoclave
- Fixer de façon étanche les septums sur les prises latérales, utiliser des septums neufs à chaque nouvelle manip

Calculer les volumes et masses nécessaires de chaque constituant à partir du tableur.

- Préparer le substrat

Le substrat doit contenir une quantité de DCO comprise entre *** et *** pour avoir un volume (ou une masse pour les solides) significatif et pouvant être contenu dans les flacons d'1L.

- Mélanger les solutions (tampon, macro, micro) dans les fioles, à l'exception de l'inoculum et du substrat à tester, selon les quantités préalablement calculées sur le tableur
- Mettre en température les fioles contenant les solutions avant d'inoculer, selon la température de travail (35°C, 55°C, etc.), en général 2H suffisent
- Ajouter l'inoculum dans les fioles, sans le substrat à tester, selon la quantité préalablement calculée sur le tableur

- Purger le ciel gazeux à l'azote (si tampon bicarbonate utiliser un mélange CO₂/N₂ à 70/30 ou 80/20) pendant 5 minutes, en utilisant la rampe de dégazage ou un simple tube, sans le plonger dans le liquide (risque de modification des équilibres chimiques).

Démarrage des mesures :

- Mettre sous tension en appuyant sur ON/OFF
- Appuyer sur GLP/Tools
- Descendre avec la flèche sur Settings, valider en appuyant sur RUN/ENTER
- Valider de nouveau sur RUN/ENTER pour aller dans « Operation mode »
- Appuyer encore sur RUN/ENTER pour choisir le mode « Pressure p » en déplaçant les choix avec les flèches– Accept avec RUN/ENTER, sortir du menu en validant « Back »
- Descendre avec les flèches sur « Measuring Time » Régler la durée avec les flèches haut et bas et valider
- Descendre sur « Date/Time » pour régler la date et l'heure, si nécessaire
- Préparer la mesure en appuyant sur , puis valider « Start sample »
- Remonter sur I.D. Number , valider avec RUN/ENTER, choisir un numéro d'échantillon en déplaçant les flèches, puis valider
- Descendre sur « Start »
- Avant de lancer l'acquisition, ajouter le substrat dans les fioles
- Viser les têtes de mesure sur les fioles (le système est normalement étanche, ne pas utiliser de graisse ou lubrifiant sur les pas de vis)
- Démarrer immédiatement l'acquisition de données par le contrôleur en validant « Start » : appuyer sur RUN/ENTER en pointant le contrôleur à moins de 5cm de la tête à lancer
- Lorsque l'acquisition a bien été effectuée, un bip signale le démarrage des mesures et l'écran affiche « ! started ! »
- Placer les fioles sur la table agitante, si l'agitation est suffisante se placer en mode « low power »

- Généralement analyser la composition initiale du ciel gazeux par CPG et éventuellement de la phase liquide (COT, DOC ,etc.)

Mesures :

- Prélèvements, éventuellement en cours et en fin d'expérience par les septums (pour CPG Gaz, DCO, etc.), en tenant compte de l'impact sur les volumes et la pression
- Acquisition des données intermédiaires par le contrôleur

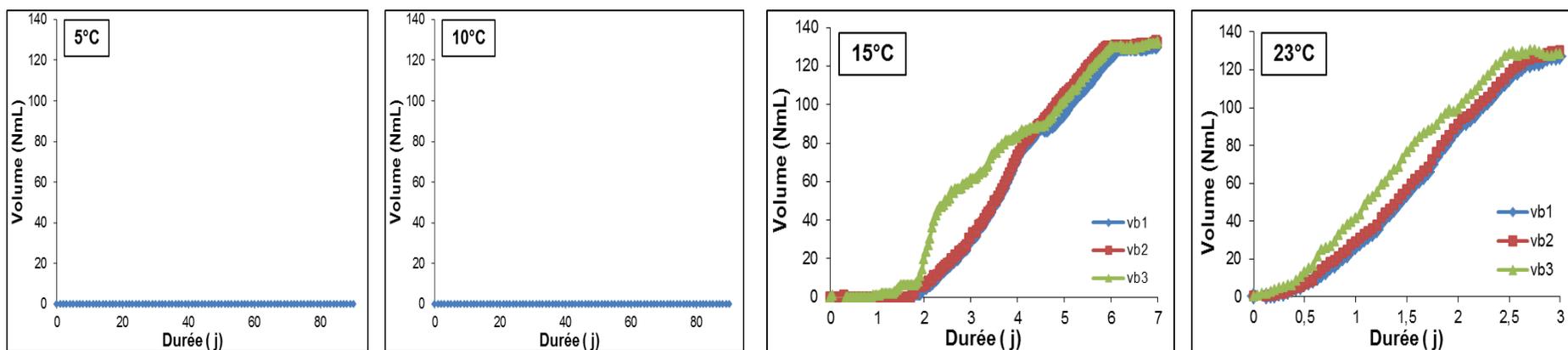
Arrêt

- Arrêt (automatique ou forcé) de l'acquisition des données par le contrôleur,
- Caractérisation finale du ciel gazeux et de la phase liquide,
- Ouverture et vidange des fioles,
- Nettoyage du matériel,
- Récupération des données sur PC, par le logiciel Achat_OC

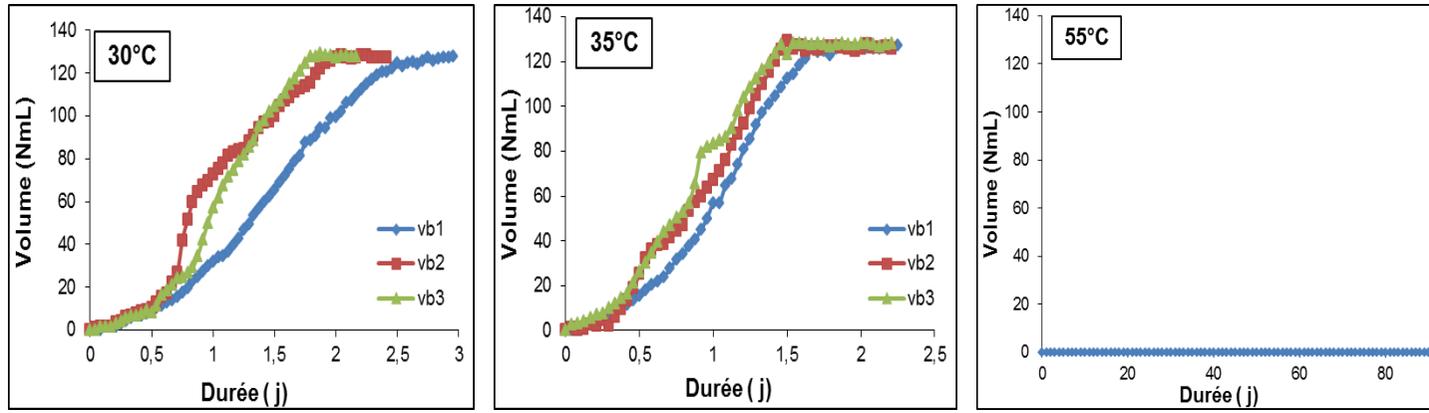
Annexe 2 : Cinétiques de production de biogaz pour les différents écosystèmes après incubation aux différentes températures (les moyennes sont représentées pour les différents batches successifs).

*** Les écartypes ne sont représentés que pour les écosystèmes (*BSM, JDO, LVJ*) dont les volumes ont été obtenus à l'aide du manomètre portable. Pour les écosystèmes restants (*BGM, DVI*) les moyennes ont été obtenues sur un total de 360 valeurs pour chaque batch. Ainsi au vue de l'ampleur des données et pour une meilleure lisibilité des courbes, les écartypes ne sont pas représentés.**

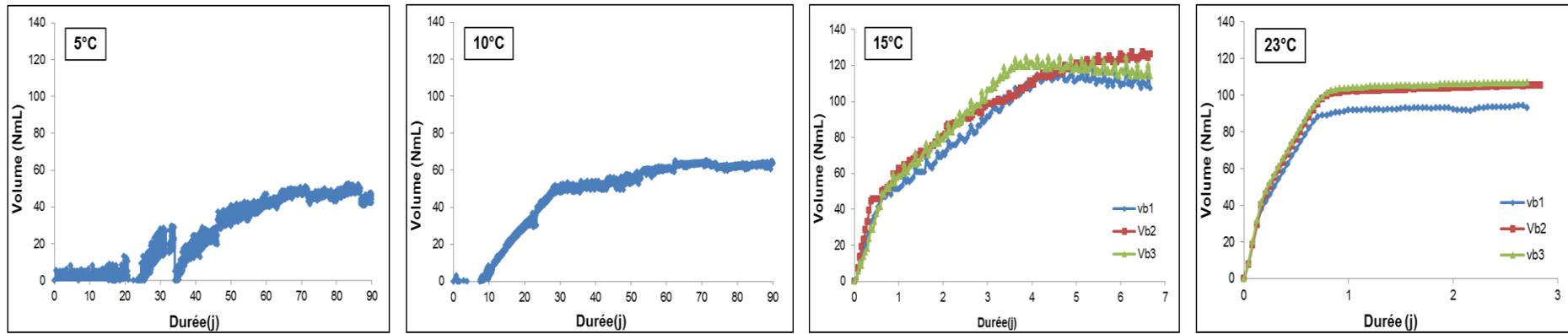
Inoculum *BGM*



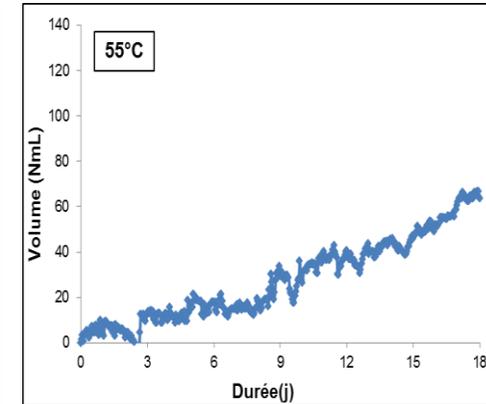
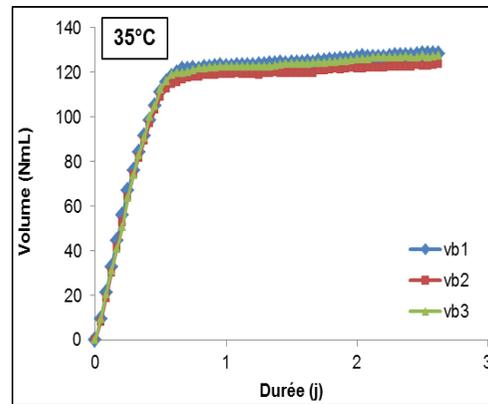
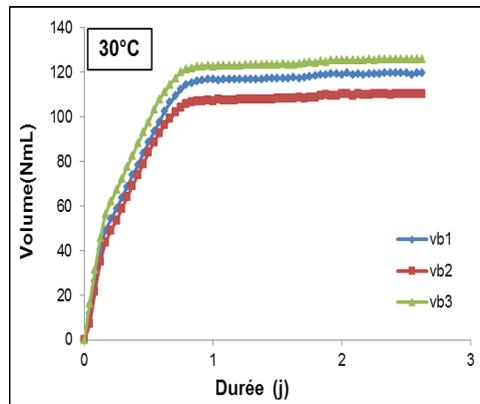
Cinétiques de production de biogaz



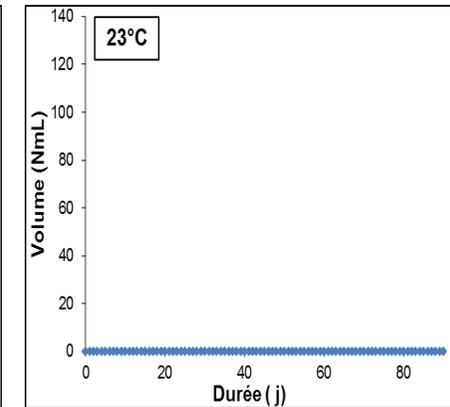
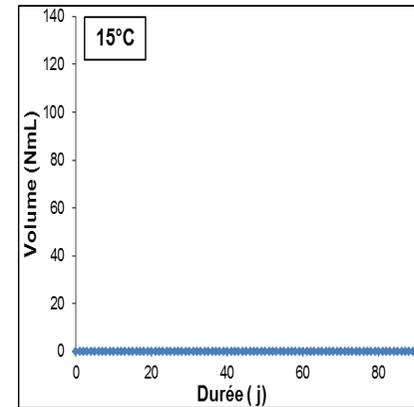
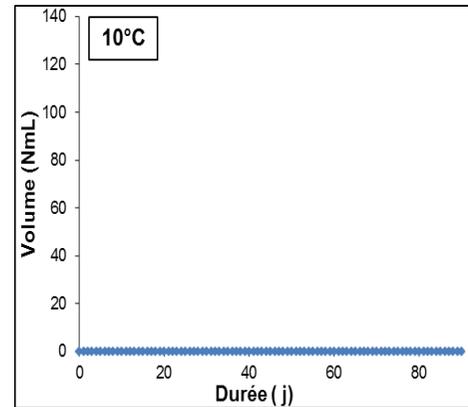
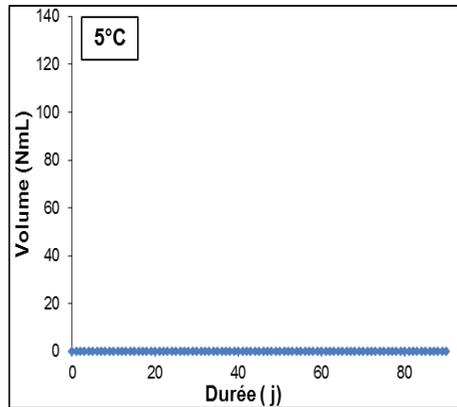
Inoculum *DVI*



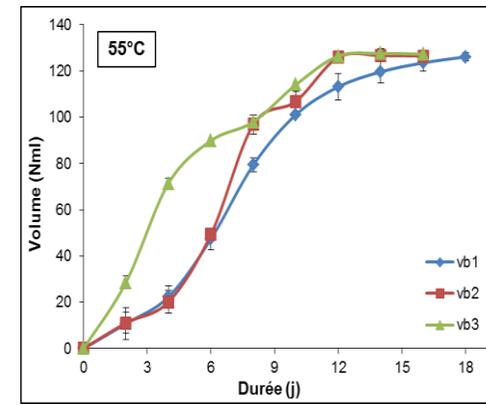
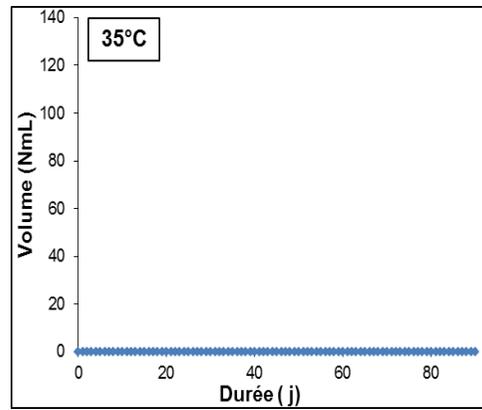
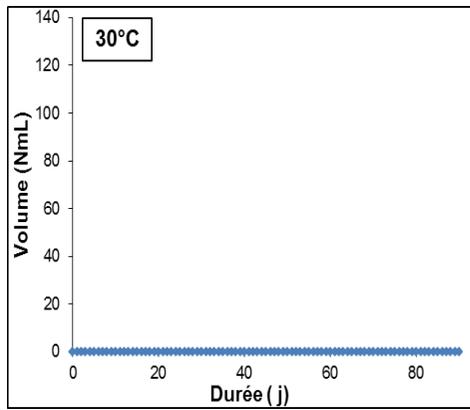
Cinétiques de production de biogaz



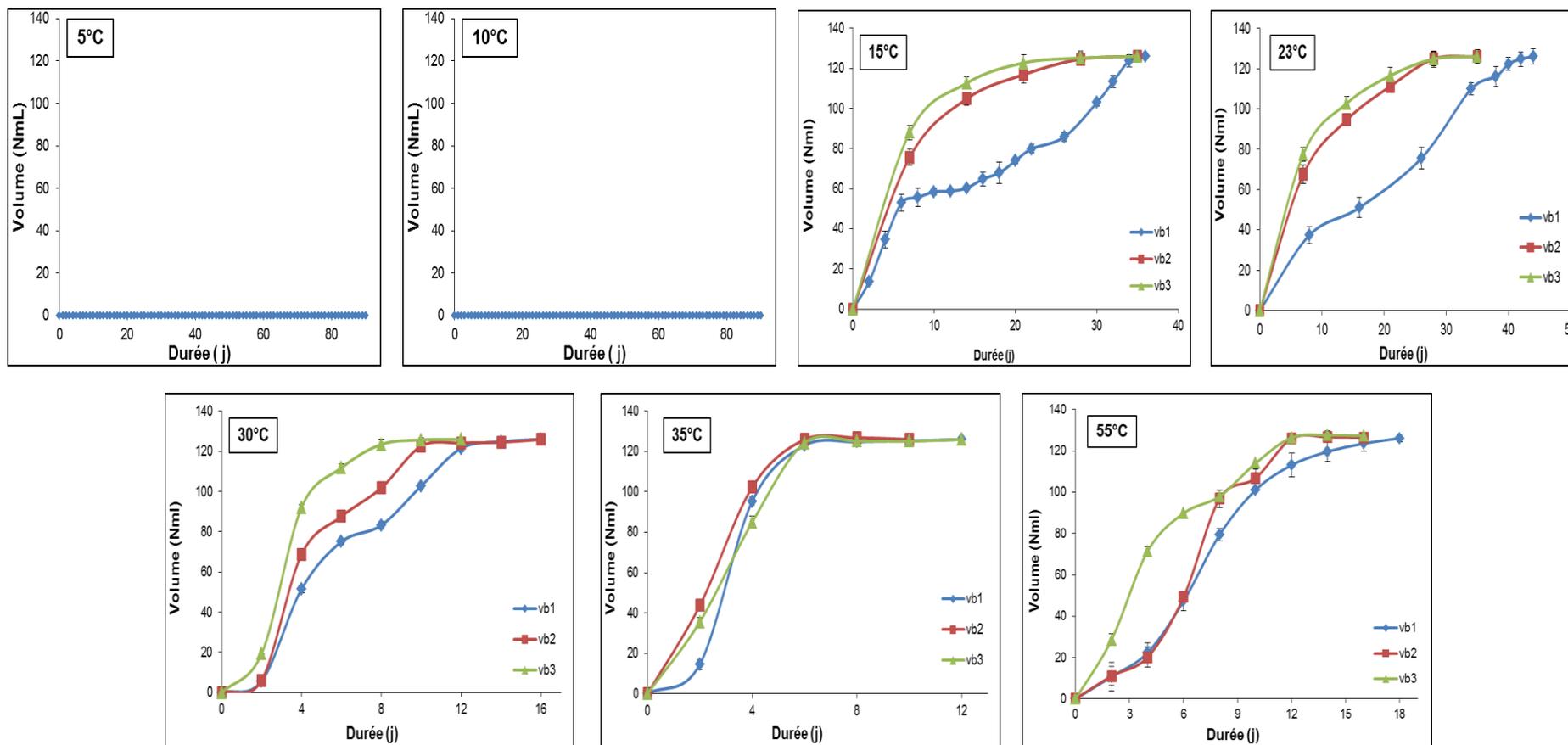
Inoculum BSM



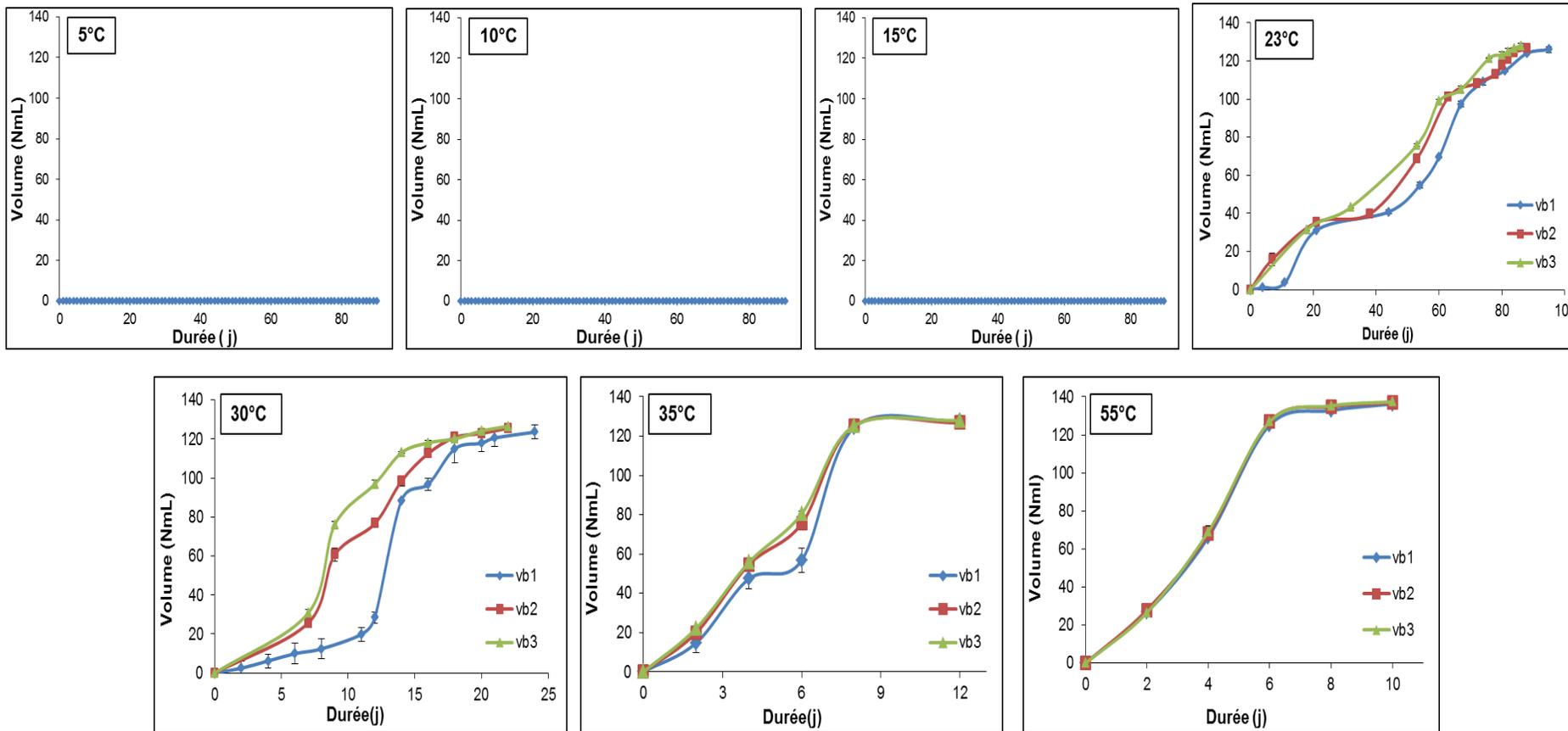
Cinétiques de production de biogaz



Inoculum *LVJ*



Inoculum *JDO*





Abstract

The process of anaerobic degradation of organic matter is a natural phenomenon widespread in many ecosystems (eg, marshes, lakes, rice fields, digestive systems of animals and humans). A high microbial diversity is maintained during this process, reflecting a diversity of metabolic pathways involved. When complete, the anaerobic digestion results in the formation of biogas (mixture of methane and carbon dioxide). In terms of biotechnology, anaerobic treatment of organic pollution reduces the volume of waste and generates energy as methane recoverable in several forms (electricity, heat, natural gas, biofuels). Industrial digesters are mostly operated at 35°C or 55°C which requires exogenous energy. The objective of the thesis was to study the adaptability of ecosystems sourced from anaerobic industrial scale reactors treating different range of wastes from different processes to convert ethanol into biogas at various temperatures. The first phase of the study was to adapt, in laboratory reactors ecosystems to their original temperature with a readily biodegradable substrate (ethanol). Then, the performances of microbial communities (the maximum methanogenic potential and degradation kinetics) were estimated on a temperature gradient from 5°C to 55°C in batch reactors. The adaptation phase of the ecosystems in lab-scale reactors showed that the biogas averaged theoretical production and this production was followed by a decrease in reaction time with successive addition of the substrate. In addition, the kinetics of the biogas obtained varied greatly from one ecosystem to another. Molecular fingerprinting profiles (CE-SSCP) of bacterial and archaeal communities were performed at the beginning and at the end of conditioning. These community profiles were compared with each other by principal component analysis (PCA). Bacterial populations that ensured efficient performance were different from those that ensured a good adaptability. In addition, the potential for adaptation depended on the presence of very specific methanogenic Archaea populations. When placing the adapted ecosystems in temperatures different from the original temperature, only mesophilic ecosystems adapted to psychrophilic temperatures. As expected, specific methanogenic activity was always obtained at the original temperature of the ecosystem. Analysis of bacterial and archaeal communities at the end of the acclimation period revealed that acclimation of thermophilic and mesophilic ecosystems to lower temperatures only modified slightly the structure of microbial communities. On the other hand, more significant changes were obtained when the incubation temperature was increased in comparison to the original temperature of the ecosystem. In summary, the study of the effect of incubation temperature (5°C to 55°C) on the fermentation activity and microbial population structure is a good model for laboratory study to understand the impact of abiotic factor on the structural and functional dynamics of a complex microbial community.

(PhD thesis in French including journal articles in English)

Defended on October 3rd, 2012 at :



with the financial support of :



INRA



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement UR50

Avenue des Etangs F-11100 NARBONNE – France

Tel. +00 33 (0)468 425 151 · Fax +00 33 (0) 468 425 160 Email: lbe.contact@supagro.inra.fr

<http://www.montpellier.inra.fr/narbonne/>