



HAL
open science

Inhibitions de la digestion anaérobie : dynamiques écologiques, indicateurs microbiens et stratégies de résistance. Cas du phénol et de l'azote ammoniacal

Simon Poirier

► To cite this version:

Simon Poirier. Inhibitions de la digestion anaérobie : dynamiques écologiques, indicateurs microbiens et stratégies de résistance. Cas du phénol et de l'azote ammoniacal. Ecologie, Environnement. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2016. Français. NNT : 2016IAVF0001 . tel-03383726

HAL Id: tel-03383726

<https://pastel.hal.science/tel-03383726>

Submitted on 18 Oct 2021

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.

NNT° : 2017 IAVF 0001

THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Sciences de l'environnement

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Simon POIRIER

Inhibitions de la digestion anaérobie : dynamiques écologiques, indicateurs microbiens et stratégies de résistance *Cas du phénol et de l'azote ammoniacal*

Directeur de thèse : **Théodore BOUCHEZ**

Co-encadrement de la thèse : **Olivier CHAPLEUR**

Thèse présentée et soutenue à Paris, le vendredi 14 octobre 2016 :

Composition du jury :

M. Patrick DABERT, Directeur de recherche, Irstea, Rennes

Mme Guillermina HERNANDEZ-RAQUET, Directrice de recherche, INRA-LISBP, Toulouse

M. Nicolas BERNET, Directeur de recherche, INRA-LBE, Narbonne

Mme. Laure VIEUBLE-GONOD, Maître de conférence, AgroParisTech

M. Eric TRABLY, Ingénieur de recherche, INRA-LBE, Narbonne

M. Théodore BOUCHEZ, ICPEF, Irstea, Antony

M. Olivier CHAPLEUR, IPEF, Irstea, Antony

Président

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Encadrant de thèse

Irstea

1, rue Pierre Gilles de Gennes, 92160 Antony, France

Remerciements

Je ne pense pas me tromper en disant que l'on entame toujours ses remerciements de thèse submergé par un mélange intense d'émotions où se croisent satisfaction, soulagement, nostalgie, et parfois quelques regrets. Certains y préfèrent la sobriété. Pour ma part, je vois dans ces quelques pages, le seul intervalle de pure liberté que je puisse m'accorder au sein de ce manuscrit scientifique, et qui ponctuera en apportant une touche humaine et émotionnelle, ces trois années de travail intense. Sans compter que la majeure partie des lecteurs (non-initiés) en resteront là... Alors il est temps de lâcher la bride, sans limite de caractères et sans contrainte de style, et de remercier noir sur blanc, dans cette version publique et définitive de ma thèse, l'ensemble des personnes qui ont contribué à me faire grandir scientifiquement et humainement tout au long de cette tranche, ô combien savoureuse, de ma vie.

L'aboutissement d'un doctorat, se résume inexorablement à quelques minuscules heures, où l'on se tient debout face à une assemblée pour le moins hétéroclite, et qui condense à elle seule une grande partie de la vie d'un doctorant. Comme il me fallait suivre un fil directeur pour dérouler l'ensemble de mes remerciements, et pour éviter toute frustration liée à l'ordre d'apparition des protagonistes, j'ai choisi de me remettre en mémoire la disposition de cet amphithéâtre Coléou, et de remonter progressivement ses rangs.

Ce n'est bien évidemment pas une surprise de retrouver en premier lieu les membres de mon jury. Je tiens donc à remercier ces personnes qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail :

- M^{me} **Gullermina Hernandez Raquet** et M. **Nicolas Bernet**, pour avoir accepté le rôle de rapporteur du manuscrit, et consacré une partie de leurs congés estivaux à la lecture et à la correction de mon manuscrit. Merci également pour toutes vos remarques et questions pertinentes qui ont nourri une discussion passionnante lors de ma soutenance.
- M^{me} **Laure Vieublé-Gonod**, MM. **Patrick Dabert** et **Eric Trably** pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma soutenance, mais également des lecteurs très consciencieux de mon manuscrit. Merci à vous pour votre apport bienveillant lors de nos débats scientifiques.

Même si ces deux personnes font partie administrativement des membres du jury, elles y jouent un tout autre rôle qui démarre bien avant le début même du doctorat. Il s'agit bien évidemment de mon encadrant, **Olivier Chapleur**, et de mon directeur de thèse, **Théodore Bouchez**. Il revient donc à ces deux personnes une part non négligeable du succès de ce travail. De la rédaction du sujet, en passant par la recherche de financements, de collaborations, de matériels, d'un bureau, d'un PC, etc... de nombreuses étapes préétabliissent le démarrage de ce projet scientifique. De par ma précédente expérience, je peux vous certifier que ce sont ces étapes qui, à mon sens, garantissent le bon démarrage d'une thèse. Alors merci à vous deux pour m'avoir mis dans des conditions idéales dès mon arrivée.

- Théodore, je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse et d'avoir chapoté mes travaux tout en me laissant une grande autonomie. Je te remercie particulièrement pour ta disponibilité malgré ton emploi du temps surchargé, pour la pertinence scientifique de tes conseils lors de nos différentes réunions, pour la relecture des articles et pour ta bienveillance.
- Olivier, je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu m'as apporté tout au long de ces trois ans. Tout d'abord en faisant le choix de me recruter, puis pour tout ce que tu es tout simplement, à savoir un chercheur brillant, curieux, toujours avide de connaissance, efficace, mais également un homme intègre, altruiste, généreux, cultivé, ouvert d'esprit, et excellent cuisinier. J'ai eu énormément de chance de te rencontrer. Tu as su me faire prendre

confiance en mes capacités et m'initier à des domaines que j'exécrais tels que la programmation. Je pèse mes mots en disant que tu as été parfait dans ton encadrement, en sachant à la fois t'adapter à mon fonctionnement mais aussi en appliquant ta pâte sur mon travail. Tes futurs étudiants auront de la chance de travailler à tes côtés. Et je n'oublie pas le côté humain de la relation que nous avons nouée tout au long de ces trois ans. Bref, un énorme grazie mille ! J'espère que nous parviendrons à maintenir le contact durant nos carrières respectives.

Même s'ils ne pouvaient être présents durant ma soutenance, je tiens également à remercier tout particulièrement les directeurs successifs de l'unité de recherche (Hydrosystèmes et Bioprocédés) au sein de laquelle j'ai pu évoluer, à savoir M. **Didier Pont** et M^{me} **Nathalie Touze-Foltz** ainsi que la directrice scientifique associée à mon thème de recherche (Technologies et procédés pour l'eau et les déchets), M^{me} **Sylvie Gillot**. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein d'Irstea et d'avoir donné votre aval à la progression de mon travail de recherche.

Lors d'une thèse de doctorat, chaque étudiant est confronté à de nombreuses questions dont il peut notamment faire part à d'autres scientifiques durant ses comités de thèse. Je tiens donc à remercier M^{mes} **Ahlem Filali** et **Ariane Bize**, ainsi que MM. **Laurent Mazéas** et **Jérôme Hamelin** pour avoir su guider les orientations de mon travail.

Cette thèse a également été l'occasion d'établir ou de maintenir des collaborations avec des partenaires extérieurs tels que le **SIAAP**, la branche environnement du groupe **SUEZ** et l'entreprise **SOMEZ** qui m'ont permis de collecter des échantillons nécessaires à la mise en œuvre de mes différentes expérimentations scientifiques. Je les remercie donc pour leur soutien précieux.

Le contexte économique général et plus particulièrement du monde de la recherche rend de plus en plus difficile l'attribution des fonds nécessaires à des projets coûteux tels que les thèses. Je remercie donc vivement l'école doctorale ABIES et ses deux directeurs successifs MM. **Cyril Kao** et **Alexandre Pery** pour m'avoir attribué cette bourse doctorale ainsi que cette bourse de mobilité internationale qui m'ont permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions et d'étoffer mon réseau. Je remercie également du fond du cœur **Irina Vassileva** et **Corinne Fiers**, pour leur écoute, leur soutien indéfectible et leur extrême gentillesse. Je remercie également l'ensemble des formateurs de l'école doctorale, et notamment M. **Eric Birlouez**, pour la qualité de leurs interventions.

J'ai également eu la chance durant ma thèse d'être entouré d'une équipe de recherche (BIOMIC) agréable et dynamique et qui m'a apporté une aide indispensable au bon déroulement de ma thèse. Je pense notamment à **Chrystelle Bureau** et **Céline Madigou** qui ont extrait et séquencé à tour de bras un nombre incalculable d'échantillons que je leur fournissais régulièrement. Merci à vous d'avoir accepté de vous être investies dans mon travail de thèse et de m'avoir soulagé d'une partie des analyses de biologie moléculaire. Merci également à **Elie Desmond Le Quéméner** pour m'avoir aiguillé dans la jungle des pipelines de bio-informatiques et des arbres phylogénétiques. Merci également pour cette soirée beaujolais/fanfare qui a ré-illuminé Paris en Novembre 2015 ainsi que pour ta gentillesse et ton initiation à la boxe !

Ma thèse m'a également permis de réaliser une mission d'enseignement au sein de l'institut Villebon-Georges Charpak qui s'est extrêmement bien déroulé grâce au soutien de M^{mes} **Cécile Narce**, **Bnédicte Humbert** et d'**Isabelle Demeure**. Merci donc à toutes les trois ainsi qu'à **tous les étudiants**

de la promo 2016 pour cette expérience si enrichissante. La biofiltration n'a maintenant plus de secret pour vous... enfin presque !

J'ai également eu la chance d'évoluer dans un contexte humain extrêmement favorable au sein de l'unité de recherche HBAN. C'est pourquoi je tiens à remercier également tous les membres des équipes appartenant à cette unité pour leur aide tout au long de ces trois années :

- **L'équipe chimie** (Nina, Lénaïck, Nadine et Angéline) pour l'ensemble des analyses qu'elles ont réalisé
- **L'équipe MP2** (Sylvain, Matthieu, Georges, Antoine, Michel et Bernard) pour leur aide plus que précieuse lors de la mise en place des pilotes et des systèmes d'instrumentation
- **L'équipe Epure** (Yannick, Sylvain, Julien, Cédric et Pierre) pour leurs prêts de matériel et pour ce déménagement épique des pilotes.
- **L'équipe Hydro** (notamment Olivier et Pierre) pour m'avoir appris à réaliser des graphiques avec des lignes de code...
- **Nicolas** pour m'avoir aidé à me former sur l'utilisation du GC-MS
- **Nathalie et Laurence** pour leur soutien administratif sans faille
- **Roger et Sylvain** pour avoir été présent au moindre problème informatique

Je n'oublie pas également que l'émulation sportive au sein de cette unité m'a permis d'entretenir ma condition physique... Alors merci à tous les joueurs et joueuses de frisbee de volley de foot et de badminton (**Pierre(s), Vazken, Olivier, Léonard, David, Roger, Michel, Andrea, Laure, Louise, Florent, François, Valérie, Nastassia, Guillaume, Cédric, Carine, Thomas, Hocine, Julien(s), Sylvain, Yannick, Camillo, Adrien, Francis, Mickaël, Matthieu**, etc...).

Merci également à la fine équipe MPG pour tous ces bons moments partagés à se chamberer le lundi matin et pour ce magnifique T-shirt offert lors de ma soutenance (**Yannick, Sylvain, Matthieu, Francis, Andrea, Adrien, Julien, Léonard et Pierre**).

Merci à la dream-team Irstea du Portugal (**Laëtitia, Marine, Carolina, Gonçalo et Adrien**) pour ces merveilleux moments passés en soirées à Paris, à Lyon à Lisbonne ou dans le RER C ainsi que pour toutes ses parties de tarot. J'en garde d'excellents souvenirs.

Arrivé à la fin de mon parcours universitaire, je tiens aussi à remercier tous ceux qui m'ont permis de mes construire scientifiquement et qui m'ont apporté leurs connaissances lors de ma formation : **Hossam Abbas, Pascale Regnault-du-Mottier, Mary Elbaba, Bernard Maïsterrena, Bastien Doumèche, Charles Cunault, Eric Trably et Jean-Philippe Steyer**. Toutes ces personnes ont joué un rôle prépondérant dans ma réussite actuelle.

J'en arrive à tous ceux qui m'ont entouré en dehors de ma vie à Irstea. Je pense notamment à l'équipe de rugby des Sous-Bocks et notamment à François qui m'a fait le plaisir d'assister à ma soutenance, mais également à **Matthieu, Xavier et Morgan** présents pour la soirée. Je pense également à mes amis alésiens **Ben, Jen et Lory** qui ont toujours été présents pour moi et qui ont fait le voyage jusque dans le NORD pour venir partager ce moment avec moi. Merci encore !

Merci aussi à **Marie-Aimée et Daniel Pailhès** qui sont venus d'Ardèche pour me soutenir. Je pense également à **Simone Magniez** qui m'a beaucoup apporté et encouragé pour devenir « Docteur Poirier ».

J'ai également une pensée à la famille Guériot et à ma marraine, **Cathy**, qui même si elle n'a pu être présente lors de ce jour particulier, a toujours été à mes côtés depuis mes premiers pas.

Et puis comment aurai-je pu arriver au bout de ces trois ans sans avoir des amis les plus proches autour de moi. **Guillaume, Valentin, Maxime, Thibaut, Jérôme** et **Simon** vous avez tous été pour moi les personnes qui ont le plus compté tout au long de ma thèse. Je vous remercie vraiment du fond du cœur d'avoir été là, dans les bons moments comme dans les mauvais et notamment dans nos aventures au bout du monde. Vous êtes une vraie famille pour moi.

Enfin je te remercie toi, **Julie** qui m'a fait avancer tout au long de ces années, de l'IUT jusqu'à cette soutenance de doctorat. Tu as été pour moi une source de motivation constante et inépuisable. Tu as cru en moi-même lorsque tout n'a pas fonctionné comme prévu. Je te remercie du fond du cœur d'avoir été à mes côtés tout ce temps.

Résumé

La digestion anaérobie (DA) repose sur un processus biologique complexe impliquant un véritable écosystème microbien dont l'équilibre est parfois menacé par diverses perturbations induites par des substances inhibitrices. Afin d'augmenter la robustesse de ce bioprocédé, une meilleure compréhension des phénomènes d'inhibition et de leurs effets sur l'écosystème microbien est aujourd'hui nécessaire. Il est également souhaitable de développer de nouvelles solutions pour améliorer la résistance des digesteurs face à l'arrivée de ces perturbateurs. Au cours de ce travail, nous avons caractérisé en détail l'effet de l'azote ammoniacal (NH_4) et du phénol, deux inhibiteurs régulièrement impliqués dans le dysfonctionnement d'unités industrielles, sur la DA mésophile de biodéchets issus d'une plate-forme de déconditionnement.

Une première expérimentation en digesteurs batchs a consisté en l'étude de la réponse d'un écosystème microbien issu d'un digesteur industriel de boues à différents niveaux d'inhibition. Dix concentrations ont été testées pour chacun des inhibiteurs (échelonnées de 0 à 5 g/L de phénol et de 0 à 50 g/L de NH_4). Des concentrations inhibitrices médianes (CI_{50}), caractéristiques du niveau de résistance de l'inoculum, ont été déterminées : 1.5 g/L de phénol et 19.0 g/L de NH_4 . L'impact des différentes concentrations d'inhibiteur sur la diversité microbienne a été caractérisé par le biais d'un séquençage haut-débit du gène codant l'ARNr 16S. Ces observations ont montré que la résistance fonctionnelle de l'écosystème s'accompagnait d'importantes réorganisations de la diversité microbienne. Au sein des archées, les concentrations inhibitrices croissantes de ces deux composés ont favorisé l'implantation du genre *Methanoculleus* au détriment de *Methanosarcina*. La composition des populations bactériennes syntrophiques a également été altérée. Alors que la famille *Syntrophomonadaceae* était majoritaire en l'absence d'inhibition ; les familles *Synergistaceae* et *Spirochaetaceae* sont respectivement devenues prédominantes en présence de phénol et de NH_4 .

Lors d'une seconde expérimentation, cinq supports (2 zéolithes, 2 charbons actifs et du chitosane) ont été introduits en parallèle au sein de digesteurs batchs, afin d'évaluer leur capacité à limiter l'inhibition causée par une concentration équivalente à chacune des CI_{50} . En l'absence d'inhibition, il a été constaté que ces supports n'ont pas modifié les performances et la composition de l'écosystème. En présence de phénol, chacun des supports a amélioré la production de biogaz tout en accélérant la dégradation de cet inhibiteur. Certaines populations, telles que le genre *Methanosarcina*, présent en l'absence d'inhibition, ont pu être préservées. Bien que les supports n'aient pas influé sur la concentration en NH_4 , les zéolithes et l'un des charbons actifs ont limité son inhibition en favorisant la présence de nouvelles populations telles que la famille *Marinilabiaceae*. Les zéolithes ont également permis de maintenir le genre *Methanosarcina* au sein de l'écosystème.

Afin d'évaluer dans quelle mesure ces résultats pouvaient être transposés à d'autres configurations de réacteurs, une zéolithe et un charbon actif ont été parallèlement introduits dans des digesteurs semi-continus sur lesquels une inhibition graduelle par le phénol avait été appliquée. Les résultats acquis en digesteurs batchs ont été confirmés sur des systèmes se rapprochant du fonctionnement d'unités industrielles.

Ce travail a permis d'établir qu'il existait des corrélations entre les performances de la DA et la composition des communautés microbiennes, permettant ainsi de proposer, dans les configurations étudiées, des indicateurs microbiens spécifiques au niveau et au type d'inhibition. Ces résultats fournissent de nouvelles pistes dans l'optique d'une gestion écologique des bioprocédés. Par ailleurs, l'utilisation de supports en vue de la réduction des inhibitions liées au phénol et au NH_4 semble prometteuse.

Mots clés :

Méthanisation, biodéchet, perturbation, séquençage 16S, analyse multivariée, supports.

Abstract

Title: Anaerobic digestion inhibitions: ecological dynamics, microbial indicators and resistance strategies.

Examples of phenol and ammonia nitrogen

Anaerobic digestion (AD) is based on a complex biological network forming a real ecosystem. Nevertheless, the balance of this ecosystem is subjected to various perturbations induced by inhibitory molecules. In order to increase the robustness of this bioprocess, a better understanding of the inhibition effects on the microbial ecosystem is now needed. New solutions are also expected to enhance the resistance of digesters facing perturbations. During this work, we characterized in detail the effect of total ammonia nitrogen (TAN) and phenol, two inhibitors regularly involved in industrial units' disruptions, on the mesophilic AD of biowaste collected on a deconditioning platform.

A first set of experiment, conducted in batch digesters aimed at studying the response of a microbial ecosystem collected on an industrial digester treating aerobic sludge, to different inhibition levels. Ten concentrations were assessed for each of the inhibitors (ranging from 0 up to 5 g/L of phenol and from 0 up to 50 g/L of TAN). Half-inhibiting concentrations (IC_{50}) characterizing the resistance capacity of the inoculum, were determined: 1.5 g/L of phenol and 19.0 g/L of TAN. The impact of different inhibiting concentrations towards the microbial diversity was investigated with high throughput rRNA 16S sequencing. Results showed that the functional resistance of the ecosystem to highest inhibitors concentrations were associated with important rearrangements of the microbial diversity. Within methanogenic populations, increasing inhibiting concentrations of phenol and TAN led to the implantation of genus *Methanoculleus* at the expense of *Methanosarcina*. The composition of bacterial syntrophic populations was also altered by the presence of both inhibitors. While family *Syntrophomonadaceae* was predominant under non-inhibiting conditions, families *Synergistaceae* and *Spirochaetaceae* became more abundant in presence of phenol and TAN, respectively.

During the second set of experiment, five support media (2 zeolites, 2 activated carbons and chitosan) were introduced in parallel within batch digesters, so as to assess their capacity to limit the inhibition exerted by a concentration corresponding to each of the IC_{50} previously determined. Under non-inhibiting conditions, support materials neither influenced the performance nor the composition of the microbial ecosystem. With phenol, each of the support enhanced biogas production while accelerating this inhibitor degradation. Some of the populations, such as genus *Methanosarcina*, which were also present under non-inhibiting conditions, were preserved.

Moreover, even though support media did not influence TAN concentration, both zeolites and one of the activated carbons alleviated its inhibition by favoring the implantation of new populations such as family *Marinilabiaceae*. Both zeolites also maintained genus *Methanosarcina* within the ecosystem.

In order to assess how these results could be transposed to other reactor configurations; one zeolite and one activated carbon were introduced in parallel within semi-continuous digesters after a step-wise inhibition by phenol was applied. Results obtained in batch digesters were confirmed with digesters whose functioning is closer to industrial units.

This work revealed correlations between anaerobic digestion performance and structural modifications within archaeal and bacterial community composition. Microbial indicators, specific to the level and to the type of inhibition were evidenced. These results provide new insights with a view to conduct an ecological management of the anaerobic digesters. Furthermore, support material addition showed promising results to counteract inhibitions associated with phenol and TAN.

Key words:

Methanization, biowaste, perturbation, 16S sequencing, multivariate analysis, support media.

Laboratoire

Irstea (Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture)

Unité HBAN (Hydrosystèmes et Bioprocédés)

Equipe BIOMIC (Bioprocédés et bIOtechnologies MICrobiennes pour la valorisation des déchets)

1, rue Pierre-Gilles de Gennes CS 10030, 92761 Antony Cedex, France

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1	LA GESTION DES DECHETS EN FRANCE 24
1.1	<i>Éléments de contexte règlementaire</i> 24
1.2	<i>Production et caractérisation des flux de déchets</i> 25
1.3	<i>Les principales filières de traitement des déchets ménagers</i> 26
2	LA DIGESTION ANAEROBIE AU SERVICE DE LA GESTION DES DECHETS 29
2.1	<i>Définition</i> 29
2.2	<i>Historique</i> 29
2.3	<i>Positionnement au sein des filières de gestion des déchets</i> 30
2.4	<i>Le parc Français des unités de méthanisation</i> 31
3	DESCRIPTION DES PROCESSUS REGISSANT LA DIGESTION ANAEROBIE..... 33
3.1	<i>Les grandes étapes de la digestion anaérobie</i> 33
3.1.1	L'hydrolyse 33
3.1.2	L'acidogénèse 33
3.1.3	L'acétogénèse..... 33
3.1.4	La méthanogénèse 34
3.1.5	Les autres réactions associées..... 34
3.2	<i>Microbiologie de la digestion anaérobie</i> 35
3.2.1	Les populations hydrolytiques..... 35
3.2.2	Les populations fermentaires 36
3.2.3	Les populations acétogènes 36
3.2.4	Les populations méthanogènes..... 37
3.3	<i>Paramètres physico-chimiques influençant la digestion anaérobie</i> 37
3.3.1	Potentiel d'oxydoréduction (redox) 37
3.3.2	Température 38
3.3.3	pH et alcalinité..... 38
3.3.4	Besoins nutritionnels..... 38
4	LES INHIBITEURS DE LA DIGESTION ANAEROBIE 40
4.1	<i>Les inhibiteurs inorganiques</i> 40
4.1.1	L'azote ammoniacal..... 40
4.1.2	Le sulfure d'hydrogène..... 41
4.1.3	L'hydrogène..... 42
4.1.4	Les éléments minéraux..... 43
4.1.5	Les métaux lourds 44
4.2	<i>Les inhibiteurs organiques</i> 45
4.2.1	Les micropolluants organiques..... 45
4.2.2	Les acides gras 47
4.3	<i>Schéma récapitulatif des inhibitions rencontrées dans les digesteurs anaérobies</i> 49
5	LES STRATEGIES OPERATOIRES DE LUTTE CONTRE LES INHIBITIONS 50
5.1	<i>Optimisation de l'alimentation</i> 50
5.1.1	Prétraitements du substrat 50
5.1.2	Acclimatation et profils de perturbation 51
5.1.3	Les co-substrats 52
5.2	<i>Utilisation d'additifs</i> 53
5.2.1	Les additifs chimiques 53
5.2.2	Les additifs biologiques : le cas de la bioaugmentation 54
5.2.3	Les supports d'immobilisation de la biomasse 56
5.3	<i>Utilisation des paramètres opératoires</i> 59
5.3.1	La micro-aération 59

	5.3.2	La température.....	61
	5.3.3	Le pH.....	62
	5.4	<i>Récapitulatif des stratégies de lutte contre les inhibitions des digesteurs anaérobies.....</i>	63
6		COMMENT TENDRE VERS UN MANAGEMENT ECOLOGIQUE DES BIOPROCEDES ?.....	64
	6.1	<i>Les outils au service d'une description approfondie des bioprocédés.....</i>	64
	6.1.1	L'apport de la biologie moléculaire et des approches omiques	65
	6.1.2	Aperçu de quelques méthodes d'analyse de données	68
	6.2	<i>Premiers exemples de suivi écologique de la digestion anaérobie</i>	69
	6.2.1	Les populations méthanogènes.....	69
	6.2.2	Les populations bactériennes.....	70
	6.2.3	Bilan et perspectives	71
		PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	73
		MATÉRIELS ET MÉTHODES	77
1		SYSTEME EXPERIMENTAL	79
	1.1	<i>Inoculum</i>	79
	1.2	<i>Substrat.....</i>	80
	1.3	<i>Solution tampon</i>	81
	1.4	<i>Inhibiteurs.....</i>	81
	1.5	<i>Supports actifs</i>	81
	1.6	<i>Dispositifs expérimentaux.....</i>	82
	1.6.1	Digesteurs batchs	82
	1.6.2	Digesteurs semi-continus	84
	1.7	<i>Échantillonnage</i>	86
	1.7.1	Prélèvements liquides	86
	1.7.2	Prélèvements gazeux.....	87
2		METHODES ANALYTIQUES.....	88
	2.1	<i>Analyse du biogaz</i>	88
	2.1.1	Production.....	88
	2.1.2	Composition	88
	2.2	<i>Analyses physico-chimiques.....</i>	88
	2.2.1	pH	88
	2.2.2	Acides gras volatils	88
	2.2.3	Inhibiteurs	89
	2.2.4	Demande chimique en oxygène	89
	2.2.5	Analyse élémentaire.....	89
	2.2.6	Analyse du carbone organique et inorganique dissous.....	89
3		ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	90
	3.1	<i>Extraction d'ADN</i>	90
	3.2	<i>ARISA.....</i>	90
	3.3	<i>Séquençage 16S.....</i>	92
4		BIostatistique	94
	4.1	<i>Prétraitement des données de biologie moléculaire</i>	94
	4.1.1	Profils ARISA	94
	4.1.2	Données de séquençage.....	94
	4.2	<i>Analyse statistique.....</i>	95
5		PRESENTATION DES DIFFERENTES SERIES D'EXPERIMENTATION	96
	5.1	<i>Expérimentations menées en digesteurs batchs.....</i>	96
	5.1.1	Influence du niveau d'inhibition par le phénol et par l'azote ammoniacal sur la réponse d'un écosystème de la digestion anaérobie	96
	5.1.2	Influence de la présence de supports actifs sur la réponse d'un écosystème de la digestion anaérobie perturbé par le phénol et par l'azote ammoniacal.....	97

5.2	<i>Expérimentations menées en digesteurs semi-continus</i>	98
5.2.1	Influence d'une montrée progressive de la concentration en phénol sur les performances et la composition microbienne de réacteurs semi-continus	98
5.2.2	Effet de l'ajout de supports actifs sur les performances et la composition microbienne de réacteurs semi-continus perturbés par le phénol	98

RÉPONSE D'UN ÉCOSYSTÈME ANAÉROBIE À DIFFÉRENTS NIVEAUX D'INHIBITION PAR LE PHÉNOL ET L'AZOTE AMMONIACAL 101

1	ANAEROBIC DIGESTION OF BIOWASTE UNDER EXTREME AMMONIA CONCENTRATION: IDENTIFICATION OF KEY MICROBIAL PHYLOTYPES	105
1.1	<i>Introduction</i>	107
1.2	<i>Materials and methods</i>	109
1.2.1	Experimental set-up	109
1.2.2	Analytical methods.....	110
1.2.3	Analyses of microbial community	111
1.2.4	Data processing	112
1.2.5	Statistical analysis.....	112
1.3	<i>Results and discussion</i>	113
1.3.1	Effect of increasing ammonia concentrations on the characteristics of anaerobic digestion	113
1.3.2	Effect of increasing ammonia concentrations on microbial community dynamics	116
1.4	<i>Conclusions</i>	124
1.5	<i>Supplementary figures</i>	125
2	COMMUNITY SHIFTS WITHIN ANAEROBIC DIGESTION MICROBIOTA FACING PHENOL INHIBITION: TOWARDS EARLY WARNING MICROBIAL INDICATORS?	131
2.1	<i>Introduction</i>	133
2.2	<i>Materials and methods</i>	135
2.2.1	Experimental set-up	135
2.2.2	Analytical methods.....	135
2.2.3	Molecular analyses of microbial communities	136
2.2.4	Data processing	137
2.2.5	Statistical analysis.....	137
2.3	<i>Results and discussion</i>	138
2.3.1	Effect of increasing phenol concentrations on anaerobic digestion performance.....	138
2.3.2	Microbiota response	141
2.3.3	Identification of key phylotypes involved in microbial responses to different levels of inhibition by 16S rRNA sequencing	143
2.3.4	Towards the possibility of identifying microbial indicators associated with AD inhibition?	150
2.4	<i>Conclusions</i>	151
2.5	<i>Supplementary figures</i>	152
3	ANAEROBIC DIGESTION INHIBITIONS BY INCREASING CONCENTRATIONS OF PHENOL AND AMMONIA: COMPARATIVE ECOLOGICAL STUDY AND IDENTIFICATION OF KEY PHYLOTYPES	157
3.1	<i>Degradation performance</i>	157
3.2	<i>Effect of the inhibitors on microbial communities</i>	158
3.2.1	Archaea	160
3.2.2	Bacteria	162

INFLUENCE DE L'AJOUT DE SUPPORTS ACTIFS SUR LA RÉSISTANCE D'UN ÉCOSYSTÈME ANAÉROBIE AU PHÉNOL ET À L'AZOTE AMMONIACAL 165

1	INTRODUCTION	167
2	KEY ELEMENTS OF THE EXPERIMENTAL SET-UP	168

3	INFLUENCE OF SUPPORT MEDIA ADDITION ON ANAEROBIC DIGESTION OF BIOWASTE UNDER NON-INHIBITING CONDITIONS	170
3.1	<i>Anaerobic digestion performance</i>	170
3.1.1	Biogas production	170
3.1.2	VFA accumulation	171
3.2	<i>Microbiota response</i>	173
4	INFLUENCE OF SUPPORT MEDIA ADDITION ON ANAEROBIC DIGESTION OF BIOWASTE FACING PHENOL INHIBITION	176
4.1	<i>Anaerobic digestion performance</i>	176
4.1.1	Biogas production	176
4.1.2	VFA accumulation	179
4.1.3	Phenol concentration dynamics	181
4.2	<i>Microbiota response</i>	183
4.2.1	Archaea	184
4.2.2	Bacteria	187
5	INFLUENCE OF SUPPORT MEDIA ADDITION ON ANAEROBIC DIGESTION OF BIOWASTE FACING AMMONIA INHIBITION	191
5.1	<i>Anaerobic digestion performance</i>	191
5.1.1	Biogas production	191
5.1.2	VFA accumulation	194
5.1.3	Ammonia concentration dynamics	197
5.2	<i>Microbiota response</i>	198
5.2.1	Archaea	199
5.2.2	Bacteria	203
6	ANAEROBIC DIGESTION INHIBITIONS BY PHENOL AND AMMONIA IN PRESENCE OF DIFFERENT SUPPORT MEDIA: COMPARATIVE ECOLOGICAL STUDY AND IDENTIFICATION OF KEY PHYLOTYPES	209
6.1	<i>Anaerobic digestion performance</i>	209
6.2	<i>Microbiota response</i>	210
6.2.1	Archaea	212
6.2.2	Bacteria	214
TRANSPOSITION DES MEILLEURES STRATÉGIES DE RÉSISTANCE À DES RÉACTEURS SEMI-CONTINUS CONFRONTÉS À UNE INHIBITION PAR LE PHÉNOL		
1	INTRODUCTION	219
2	KEY ELEMENTS OF THE EXPERIMENTAL SET-UP	220
2.1	<i>Episode 1</i>	220
2.2	<i>Episode 2</i>	220
3	INFLUENCE OF A REGULAR STEP-WISE INHIBITION BY PHENOL ON THE MICROBIAL RESPONSE OF SEMI-CONTINUOUS REACTORS	222
3.1	<i>Anaerobic digestion performance</i>	222
3.2	<i>Microbiota response</i>	223
3.3	<i>Identification of key phylotypes</i>	225
3.3.1	Archaea	225
3.3.2	Bacteria	226
4	INFLUENCE OF SUPPORT MEDIA ADDITION ON THE MICROBIAL RESPONSE OF SEMI-CONTINUOUS REACTORS INHIBITED BY PHENOL PULSE FEEDINGS	228
4.1	<i>Anaerobic digestion performance</i>	228
4.1.1	Before support media addition	229
4.1.2	After support media addition	229
4.1.3	During phenol pulse feedings	230
4.2	<i>Microbiota response</i>	231
4.3	<i>Identification of key phylotypes</i>	232
4.3.1	Archaea	233
4.3.2	Bacteria	235

5	GENERAL DISCUSSION ON THE EXPERIMENT CONDUCTED WITH SEMI-CONTINUOUS DIGESTERS	238
	DISCUSSION GÉNÉRALE	241
1	PERTINENCE ET LIMITES DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	244
1.1	<i>Système d'étude</i>	244
1.1.1	Inoculum et substrat	244
1.1.2	Inhibiteurs	245
1.1.3	Supports actifs.....	245
1.1.4	Digesteurs batchs et semi-continus.....	246
1.2	<i>Les outils analytiques</i>	247
1.2.1	Suivi des performances de dégradation	247
1.2.2	Méthodes de biologie moléculaire.....	247
1.2.3	Analyse des données	248
2	DISCUSSION AUTOUR DES RESULTATS.....	250
2.1	<i>Réponses d'un écosystème anaérobie à différents niveaux d'inhibitions</i>	250
2.1.1	Variabilité de la résistance de l'écosystème.....	250
2.1.2	Vers la possibilité de déterminer des indicateurs microbiens de l'inhibition ?	251
2.2	<i>Intérêt de l'utilisation de supports actifs</i>	252
2.2.1	Quels sont leurs mécanismes d'action ?	252
2.2.2	Sont-ils transposables à l'échelle industrielle ?	253
3	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	255
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	257

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS**

Publications scientifiques

Acceptées

Poirier, S., Desmond-Le Quéméner, E., Madigou, C., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: identification of key microbial phylotypes. *Bioresource Technology*. **207**, 92-101.

Poirier, S., Bize, A., Bureau, C., bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Community shifts within anaerobic digestion microbiota facing phenol inhibition: towards early warning microbial indicators? *Water Research*. **100**, 296–305.

Madigou, C., **Poirier, S.**, Chapleur, O., 2016. Acclimation strategy to increase phenol tolerance of an anaerobic microbiota. *Bioresource Technology*. **216**, 77-86.

Soumises

Improving anaerobic digestion with support media: mitigation of ammonia inhibition and effect on microbial communities. (soumis à *Water Research* en Novembre 2016)

En préparation

Support materials counteract phenol inhibition and preserve *Methanosarcina* during the anaerobic digestion of biowaste. (soumission prévue en 2017)

Anaerobic digestion inhibitions by increasing concentrations of phenol and ammonia: Comparative ecological study and identification of key phylotypes. (soumission prévue en 2017)

Envisagées à partir des données générées pendant la thèse

Metatranscriptomic study in semi-continuous anaerobic digesters inhibited by phenol: Effect of support media addition.

Metabolomic analysis of anaerobic digesters inhibited with increasing ammonia concentrations: Identification of characteristic patterns.

Communications internationales (posters)

Poirier, S., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Enhancing anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration with support media: Identification of key microbial phylotypes. 16th International Symposium on Microbial Ecology, Montreal, 21-26 August 2016.

Poirier, S., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Microbial community shifts within anaerobic digesters facing ammonia inhibition: Towards early warning bioindicators? IWA Microbial Ecology in Water Engineering & Biofilms, Copenhagen, 4-7 September 2016.

Chapleur, O., **Poirier, S.**, Madigou, C. 2016. Acclimation of an anaerobic microbiota subjected to inhibitory phenol concentration. 16th International Symposium on Microbial Ecology, Montreal, 21-26 August 2016.

Chapleur, O., **Poirier, S.**, Madigou, C. 2016. Characterization of the acclimatization of an anaerobic microbiota subjected to inhibitory phenol concentration. IWA Microbial Ecology in Water Engineering & Biofilms, Copenhagen, 4-7 September 2016.

Communications orales nationales

Poirier, S., Bouchez, T., Chapleur, O., 2015. Les composés inhibiteurs de la digestion anaérobie : état de l'art et stratégies d'acclimatation. Journées Recherche et Industrie Biogaz Méthanisation, Rennes, 3-5 Février 2015.

Poirier, S., Chapleur, O., 2016. Influence de l'azote ammoniacal sur la composition d'un écosystème anaérobie issu d'un digesteur industriel. Journées de l'Association Française d'Ecologie Microbienne, Marseille, 31 Mai-1^{er} Juin 2016.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ces deux dernières décennies ont été marquées par une importante prise de conscience collective de l'ampleur des défis environnementaux et sociétaux auxquels l'humanité est désormais confrontée. Face aux problématiques de réchauffement climatique et de raréfaction des ressources causées notamment par l'accroissement de la population mondiale, l'industrialisation et le développement économique, l'urbanisation ou encore l'évolution des modes de vie, le développement des activités anthropiques doit maintenant évoluer vers une gestion durable.

En outre, la quantité de déchets générés par ces activités est étroitement liée aux modes de consommation et de production. Dans le contexte actuel, la croissance économique s'accompagne inéluctablement d'une exploitation accélérée des ressources naturelles et d'une augmentation de la production de déchets associés. De même, l'incitation au consumérisme, l'augmentation du pouvoir d'achat et l'individualisation des produits sous emballage sont autant de facteurs qui expliquent également ce phénomène. La production de déchets qui accompagne l'évolution des activités humaines est donc encore appelée à s'accroître dans des proportions considérables.

Cependant, les grandes mutations qui s'opèrent à l'échelle mondiale doivent maintenant composer avec de nombreuses contraintes environnementales liées notamment à l'épuisement des ressources et à une réglementation de plus en plus contraignante en matière de rejets et de protection de l'environnement. L'émergence de ces nouvelles exigences remet ainsi progressivement en cause les modes traditionnels de gestion des déchets. Cette problématique prend dorénavant une place prépondérante dans le débat politique et se traduit notamment par l'élaboration de nouveaux dispositifs réglementaires.

D'un point de vue économique, la situation actuelle laisse présager d'une augmentation significative du coût d'élimination de ces déchets du fait notamment de la saturation des installations de traitement et de la raréfaction des sites de décharge. La non valorisation d'un déchet constitue à présent un coût économique considérable. De fait, ne plus considérer le déchet comme un rebus mais plutôt comme une véritable ressource matière et énergétique est aujourd'hui devenu une vision de plus en plus partagée. Cependant, pour que les déchets acquièrent une valeur et que progressent parallèlement la croissance économique et l'amélioration de l'environnement, une réorientation technologique est indispensable afin d'exploiter leur potentiel.

A ce titre, les procédés de méthanisation connaissent un regain d'intérêt. En effet, les réactions biologiques inhérentes à ce type de bioprocédé permettent à la fois la réduction considérable de la charge polluante et du volume d'une large gamme de déchets organiques, tout en produisant des effluents valorisables que sont le biogaz et le digestat. Le biogaz, composé principalement de méthane et de dioxyde de carbone, et reconnu comme une énergie renouvelable au titre de la directive CE (2001/77/CE), est triplement valorisable sous forme de chaleur, d'électricité ou de biocarburant. Face à l'évolution du prix du pétrole, du gaz ou du charbon, il apparaît donc comme une source d'énergie substituable aux énergies fossiles. Le digestat, qui constitue quant à lui le résidu solide stabilisé de ce procédé, contient une part de matière organique et de composés fertilisants valorisables comme amendement ou comme engrais par épandage agricole.

La méthanisation peut être mise en œuvre au sein d'installations de stockage de déchets non dangereux (ISDND) ou dans des bioréacteurs hors-sol appelés aussi digesteurs appelés à recevoir divers types d'effluents agricoles, industriels, ou ménagers. L'ensemble des processus qui régissent le fonctionnement de ce procédé est communément appelé digestion anaérobie. Les réactions de dégradation qui les composent requièrent les actions successives et parallèles d'une grande variété de micro-organismes qui forment un véritable écosystème microbien complexe. Elles sont généralement

divisées en quatre étapes : i) l'hydrolyse, ii) l'acidogenèse, iii) l'acétogenèse iv) la méthanogenèse. A travers ce processus, les digesteurs anaérobies utilisent donc le potentiel naturel des populations microbiennes à dégrader la matière organique contenue dans les déchets.

Du fait des avantages environnementaux, énergétiques et économiques qu'elle procure, les exploitants ont en permanence cherché à maximiser le rendement de la méthanisation en optimisant leurs stratégies opératoires. Toutefois, ce bioprocédé repose sur un équilibre instable. Les nombreuses communautés microbiennes impliquées dans ce processus peuvent être sensibles aux variations de conditions environnementales qui définissent continuellement la composition de l'écosystème, les fonctions exprimées et par conséquent les performances macroscopiques du digesteur. De plus, une grande variété de composés chimiques inhibiteurs peut également perturber le fonctionnement de la digestion anaérobie. Leur arrivée est difficile à anticiper du fait de la variabilité de la production de déchets des populations et des industries au cours du temps, qui provoque des changements soudains et imprévisibles de quantité et de composition des déchets à traiter. De plus, ces composés peuvent également être générés au sein même des digesteurs lors de la dégradation de substrats spécifiques. Les conséquences liées aux dysfonctionnements d'un digesteur peuvent être catastrophiques tant sur le plan environnemental qu'économique, du fait notamment de l'accumulation de déchets non traités, et du manque de rentabilité causé par la chute de la production de biogaz. Ces limitations constituent un frein majeur au développement de cette filière. Afin d'assurer la pérennité et de favoriser l'essor de la méthanisation, il apparaît primordial de proposer des modes de gestion assurant la stabilité et la robustesse du procédé face à l'arrivée de perturbateurs.

Afin d'optimiser l'exploitation de ce bioprocédé, les digesteurs anaérobies ont été instrumentés par de nombreux dispositifs de suivi en ligne de l'évolution d'indicateurs physico-chimiques tels que le pH, la température ou le potentiel d'oxydoréduction. D'autres indicateurs comme l'alcalinité, la teneur en acides gras volatils, la teneur en méthane du biogaz, ainsi que la teneur en matière organique résiduelle de l'effluent permettent également d'avoir un aperçu du bon fonctionnement et de la stabilité des digesteurs. Toutefois, l'ensemble de ces indicateurs reste insuffisant pour résoudre les problématiques lors des phases de démarrage, ou encore lors d'un dysfonctionnement impromptu. En effet, le véritable moteur de la digestion anaérobie est de nature biologique. Durant de nombreuses années, les limitations méthodologiques ont empêché la communauté scientifique et les exploitants d'acquérir des connaissances quant au fonctionnement de ce moteur microbien et de mieux prendre en compte la composante biotique dans la gestion de l'exploitation des digesteurs. Ces limitations étaient principalement liées au fait que la plupart des micro-organismes impliqués dans ce processus sont actuellement non cultivables en laboratoire. Parallèlement, de nombreux outils moléculaires indépendants des méthodes de culture ont été développés lors des dernières décennies. Ces derniers permettent à présent de visualiser, de détecter, de quantifier ou d'identifier des populations microbiennes au sein d'écosystèmes complexes. Depuis 2006, la mise sur le marché des séquenceurs d'ADN de nouvelle génération (NGS) a été une réelle révolution technologique. Ces outils récents possèdent une résolution et un débit suffisamment importants pour obtenir rapidement une profondeur d'information largement supérieure aux systèmes utilisés jusqu'alors. De plus, la miniaturisation de ces technologies associée à la diminution des coûts de séquençage a favorisé leur démocratisation et leur implantation dans de nombreux centres de recherches. Leur avènement a engendré la naissance de nouveaux champs scientifiques tels que la bioinformatique afin de faire face au flux de données générés. Parallèlement, des bases de données ont été constituées pour stocker

et organiser le savoir sur les séquences nucléotidiques et protéiques obtenues. La convergence de ces technologies et des outils informatiques associés permet aujourd'hui d'envisager de nouvelles stratégies de compréhension de l'écologie microbienne des digesteurs.

De premières descriptions d'écosystèmes complexes réalisant la digestion anaérobie ont été réalisées. Ces dernières ont fourni des informations cruciales quant à l'identification certaines des populations impliquées dans les différentes étapes du processus. Toutefois, celles-ci sont loin d'être exhaustives et l'équilibre des différentes composantes de l'écosystème reste encore difficile à appréhender du fait notamment des nombreuses interactions trophiques et de la redondance fonctionnelle observée entre certaines communautés. De plus, la compréhension de l'influence des paramètres opératoires sur ce réseau écologique constitue également un verrou majeur pour l'optimisation du fonctionnement de l'écosystème de la digestion anaérobie. Dans ce contexte, le travail réalisé lors de cette thèse de doctorat consiste à étudier la réponse microbienne à diverses perturbations et à l'application de stratégies opératoires permettant de lutter contre ces mêmes perturbations.

Le travail réalisé au cours de cette thèse est retranscrit dans ce manuscrit. Celui-ci débute par une synthèse bibliographique dont l'objectif est d'introduire les notions clés nécessaires à la compréhension du sujet et des résultats obtenus, ainsi que les éléments de contexte qui ont mené à la définition de la problématique et des objectifs de ce travail. Cette synthèse donne un aperçu sur la gestion des déchets en France avant de se focaliser sur la méthanisation et sur les problématiques d'inhibitions associées à cette filière. Ce chapitre permet également de présenter les différentes stratégies opératoires mises en œuvre pour optimiser le rendement des digesteurs. La perspective d'une gestion écologique de ce type de bioprocédé y est également discutée. Cette synthèse bibliographique aboutit à la définition de la problématique de thèse et à la présentation de la démarche expérimentale élaborée dans le but d'y répondre. La partie suivante détaille l'ensemble des matériels et des méthodes utilisés pour appliquer cette démarche. Trois chapitres présentent les principaux résultats obtenus. Le premier se compose de deux articles portant sur les réponses microbiennes d'un écosystème réalisant la digestion anaérobie en présence de différents niveaux d'inhibiteurs. Le second contient également deux articles étudiant chacun l'influence de l'application de plusieurs stratégies opératoires sur les performances et la composition de ce même écosystème en présence de deux inhibiteurs distincts. Enfin, le dernier chapitre de ces résultats concerne la transposition de ces stratégies à un dispositif expérimental nouvellement mis en œuvre au laboratoire. À partir de l'ensemble des résultats obtenus, la définition d'indicateurs microbiens de la digestion anaérobie ainsi que la transposition des stratégies opératoires à l'échelle industrielle sont discutées.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude bibliographique a tout d'abord pour objectif de repositionner ce travail de thèse dans un contexte plus global d'optimisation de la gestion des déchets en France. Après avoir exposé l'ensemble des flux et des filières de traitement associées, une seconde partie s'attache à présenter plus spécifiquement la digestion anaérobie et les différents processus biophysico-chimiques qui régissent ce bioprocédé. Une attention particulière est ensuite portée aux différents inhibiteurs qui peuvent affecter son fonctionnement et qui limitent encore à ce jour son développement. En réponse à ces inhibitions, de nombreuses stratégies opératoires ont été développées afin de limiter l'impact de ces perturbateurs sur les performances des digesteurs anaérobies. Une partie de cette synthèse bibliographique est donc consacrée à la présentation de l'ensemble de ces techniques. Enfin, l'avancée fulgurante de la biologie moléculaire permet aujourd'hui de lever progressivement le voile sur le fonctionnement de l'écosystème microbien de la digestion anaérobie. Une meilleure prise en compte de la composante biotique de la digestion anaérobie permettrait d'envisager un management écologique de ce type de bioprocédé. Pour tendre vers cet objectif, de nouvelles approches analytiques couplant des techniques avancées de biologie moléculaire avec des méthodes statistiques multivariées ont récemment été développées. La dernière partie de cette synthèse s'intéresse donc à ces nouveaux outils et s'interroge quant à la possibilité de tendre vers l'objectif d'une gestion écologique des bioprocédés. L'ensemble de cette synthèse bibliographique permet ainsi de mieux mettre en lumière les différents enjeux de ce travail de thèse et de poser les premiers jalons de la démarche scientifique développée tout au long de ce manuscrit.

1 La gestion des déchets en France

1.1 Éléments de contexte réglementaire

Étymologiquement, le mot « déchet » vient de déchoir, du latin *cadere* « tomber, être abattu, succomber ». La racine "dis" traduisant l'éloignement et la séparation. La notion de déchet peut être abordée de façon économique ou sociale en fonction de sa nature. Du point de vue économique, un déchet est un bien qui n'a, a priori, aucune valeur marchande. Sociologiquement, le déchet est le témoin d'une culture et de ses valeurs. Il est le reflet du niveau social des populations et de l'espace dans lequel elles évoluent. Au niveau réglementaire, l'article 3 de la directive cadre 2008/98/CE du 19 novembre 2008 définit un déchet comme « toute substance ou tout objet, dont le détenteur se défait ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire ». Cette définition a été reprise dans le code de l'environnement (art. L.541-1-1) et dans l'ordonnance n° 2010-1579 du 17 décembre 2010 transposant la directive européenne en droit français.

Cependant, le statut de déchet n'est pas irréversible. C'est notamment le cas lors des évolutions qu'il pourra subir (opérations de collecte, tri, transformation primaire, recyclage) et qui lui confèrent des caractéristiques physiques, chimiques et mécaniques différentes, et de fait, une valeur économique. Ainsi, l'article 6 de la directive cadre 2008/98/CE prévoit que certains déchets cessent d'être des déchets lorsqu'ils ont subi une opération de valorisation ou de recyclage et répondent à des critères spécifiques. Néanmoins, ces autorisations de sortie de statut de déchets ne s'appliquent encore, au niveau communautaire, qu'à certains débris de métaux (fer, aluminium, cuivre, acier), au bois et au calcin de verre.

Depuis la directive cadre de 2008, la politique communautaire de gestion des déchets s'est attachée par le biais de différentes réglementations (Loi Grenelle II du 12 juillet 2010, décret du 11 juillet 2011 n°2011-828, loi du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte, programme national de prévention des déchets 2014-2020) à rompre progressivement le lien entre croissance économique et production de déchets. Des objectifs ont été fixés en termes de réduction de la production des différentes fractions de déchets mais également en matière de valorisation.

1.2 Production et caractérisation des flux de déchets

La production de déchets est l'aboutissement du cycle économique (ou cycle de vie) qui inclut l'extraction de matières, leur utilisation dans la production de biens et de service, la consommation des produits et leur fin de vie. Selon le dernier rapport ADEME, paru en septembre 2015 (ADEME, 2015a), la France a produit 345 millions de tonnes (Mt) de déchets lors de l'année 2012, soit un recul de 10 Mt par rapport à 2010. Le secteur de la construction est le principal poste de production de déchets avec 247 Mt. Les autres activités économiques génèrent quant à elle 63 Mt. Les ménages et les collectivités arrivent ensuite avec une production respective de 30 Mt et de 4 Mt.



Figure 1 : Tableau synoptique de la composition des déchets municipaux (ADEME, 2015a)

Entre 2006 et 2010, la production de déchets a sensiblement augmenté en passant de 312 Mt à 355 Mt. Cette tendance s'est inversée en 2012. Toutefois celle-ci est principalement guidée par le niveau d'activité du secteur de la construction. A l'échelle des ménages, la production annuelle des déchets ménagers et assimilés (DMA) a également connu un recul en passant de 590 kg/hab en 2011 à 570 kg/hab en 2013. Cette baisse de 3,5 % représente la moitié de l'objectif fixé par le programme national 2014-2020 de prévention des déchets. En 2013, selon les premiers résultats de l'Enquête collecte, les services publics de gestion des déchets ont collecté 37,6 Mt de DMA.

L'organisation de la collecte des DMA se répartit selon trois flux : les ordures ménagères résiduelles (OMR), la collecte séparative (verre, papier, emballages plastiques), et les déchets collectés en déchèteries. Grâce à la généralisation des collectes séparatives et à l'augmentation du parc de déchèteries, les OMR ont diminué de 2,8 Mt entre 2005 et 2011, puis de 1,1 Mt entre 2011 et 2013. Néanmoins, elles restent le principal flux de déchets collectés par le service public avec 17,7 Mt.

Les déchets ménagers (DM) représentent 80 % des DMA, le reste étant lié à des déchets de petites entreprises ou d'administrations collectés dans le même temps. Les ordures ménagères (OM) correspondent quant à elles aux déchets collectés auprès des ménages ou en déchetterie. Les déblais et gravats, considérés comme occasionnels, ne sont pas toutefois pas comptabilisés dans ce calcul. Ainsi, selon le dernier rapport de l'ADEME, chaque Français produisait 276 kg d'ordures ménagères (chiffre 2013) et 458 kg de déchets ménagers (chiffre 2012).

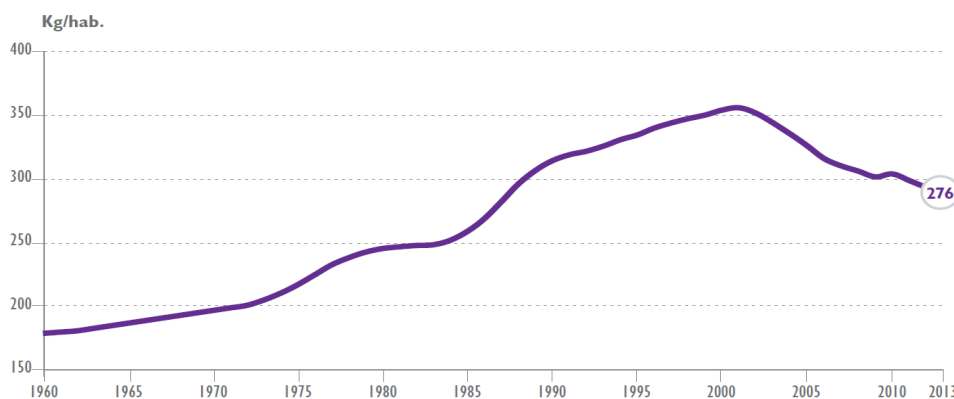


Figure 2 : Évolution de la *quantité d'ordures ménagères par habitant en France entre 1960 et 2013* (ADEME, 2015a)

Les ordures ménagères résiduelles (OMR) correspondent à la fraction non triée des OM. Leur composition n'a pas évolué entre 1993 et 2007. On peut néanmoins noter une forte proportion (32 %) de déchets putrescibles, potentiellement valorisables.

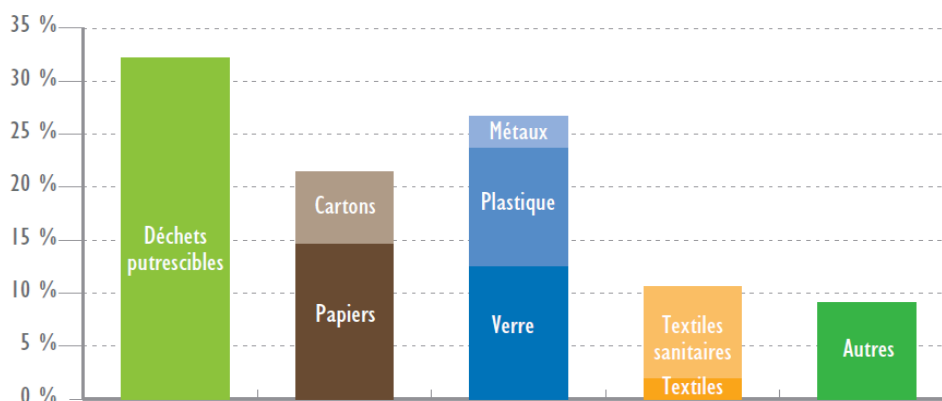


Figure 3 : *Composition de l'ensemble des ordures ménagères résiduelles et collectes séparées en 2007* (ADEME, 2015a)

1.3 Les principales filières de traitement des déchets ménagers

L'orientation d'un flux de déchets vers une filière de traitement est régie par la nature du déchet. On en distingue trois types :

- **Les déchets inertes.** Principalement issus de la construction, ils représentent 241 Mt. Ils peuvent être réutilisés comme remblais dans les carrières, broyés en granulats employés dans les soubassements de route, le terrassement ou les bétons. En 2012, 66 % des déchets minéraux ont été traités et recyclés. Les 34 % restants ont été envoyés en installations de stockage pour déchets inertes.
- **Les déchets dangereux.** Catégorisés comme potentiellement nocifs pour l'environnement ou la santé, ils peuvent être explosifs, inflammables, toxiques, cancérigènes, infectieux, mutagènes ou écotoxiques. Leur origine est variable (ménages, industries, activités de soins). L'ensemble des déchets dangereux représentait 8,8 Mt en 2012. Ces déchets font l'objet d'une collecte, d'un

acheminement et de traitements spécifiques (classe d'enfouissement, type d'incinérateur...)

- **Les déchets non dangereux et non inertes.** Ces derniers sont principalement constitués de DMA et de déchets non dangereux des entreprises. Des déchets non ménagers issus des activités économiques sont également inclus dans cette catégorie. En 2012, ils représentaient respectivement 47,7 Mt et 4,5 Mt. Leurs modes de traitement sont détaillés ci-dessous.

Les principales filières de traitement des déchets non dangereux et non inertes regroupent le stockage (ou enfouissement), l'incinération, le tri et la valorisation biologique. Deux procédés de valorisation biologique peuvent à ce jour accueillir ce type de déchet. Il s'agit du compostage et de la méthanisation. Le compostage est un procédé de transformation aérobie de matières fermentescibles dans des conditions contrôlées (aération/brassage) dans le but d'obtenir une matière fertilisante stabilisée riche en composés humiques, le compost. A l'inverse, la méthanisation (ou digestion anaérobie) est un procédé anaérobie qui peut être mis en œuvre au sein de méthaniseurs hors-sol ou d'installations de stockage. Ce bioprocédé est basé sur la dégradation de déchets organiques fermentescibles qui permet d'une part d'obtenir un résidu stabilisé, le digestat potentiellement fertilisant, et un biogaz riche en méthane valorisable énergétiquement.

Le parc français des installations de traitement des déchets non dangereux accueillant des déchets ménagers se compose de 588 centres de compostage, 390 centres de tri, 238 installations de stockage (ISDND), 126 unités d'incinération (UIOM) dont 113 permettent une valorisation énergétique des déchets, et enfin de 10 centres de méthanisation. La répartition du flux de déchets entrant dans les installations de traitement des OM est présentée en Figure 4.

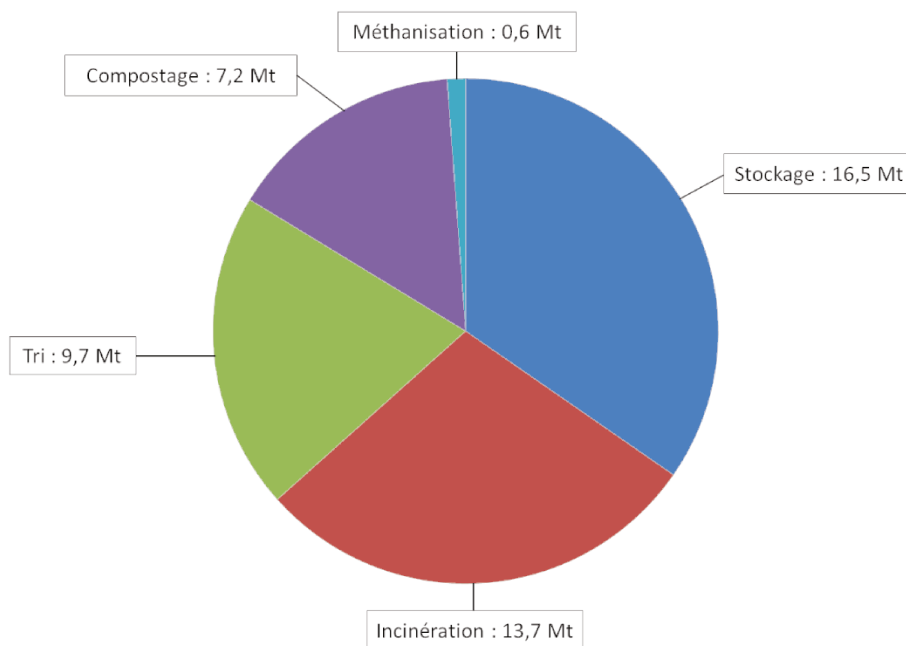


Figure 4 : Bilan des tonnages entrant dans les installations de traitement des ordures ménagères en 2012

Sur les 47,7 Mt arrivant dans les installations de traitement des OM, 32 % se dirigent directement vers les ISDND, 26 % vers les UIOM et 18 % vers les centres de tri. La filière de valorisation biologique des déchets comprenant les unités de compostage et de méthanisation reste encore en voie de développement. Ces dernières reçoivent respectivement 14 % et 1 % des flux d'OM.

Néanmoins, dans le contexte actuel, l'augmentation des contraintes environnementales a poussé les décideurs à réorienter leur politique de gestion des déchets. Des normes de rejets plus contraignantes ont ainsi été établies. De plus, les derniers objectifs en matière de croissance verte amènent progressivement l'ensemble des parties prenantes à considérer les déchets comme une ressource potentiellement valorisable matériellement, énergétiquement et économiquement. Un intérêt grandissant a donc été porté aux bioprocédés de traitement des déchets. Notamment, le parc des centres de compostage s'est considérablement accru passant de 278 sites en 2000 à 593 sites en 2011. Néanmoins, la France accuse toujours un retard conséquent sur ses voisins européens avec 86 kg de déchets envoyés en compostage par an et par habitant contre 110 kg en Allemagne ou encore 141 kg au Pays-Bas et 179 kg en Autriche.

En ce qui concerne la filière méthanisation, l'appel à projet « RAMETHA015 » porté par l'ADEME et contribuant aux objectifs nationaux du plan « Energie méthanisation autonomie azote » (EMAA) a fixé un objectif de 1500 projets de méthanisation sur la période 2015-2018. De plus, le développement de ce bioprocédé est encouragé par d'autres actions menées en parallèle dans le but de dégager de nouvelles voies d'approvisionnement et de pérenniser cette filière à l'échelle nationale. Notamment, l'appel à projet « Territoires Zéro Gaspillage, zéro déchet » lancé en juin 2015, promeut le développement de la collecte séparative de biodéchets et la mise en place de méthaniseurs individuels.

2 La digestion anaérobie au service de la gestion des déchets

2.1 Définition

La méthanisation, appelée aussi digestion anaérobie (DA), est un processus naturel de minéralisation de la matière organique biodégradable en un biogaz composé principalement de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone (CO_2) par un consortium microbien fonctionnant en l'absence d'oxygène (anaérobiose).

Cette transformation naturelle peut s'effectuer dans tous les milieux privés d'oxygène et contenant de la matière organique tels que les marais, les lacs ou les rizières. Les sols des zones humides tels que les forêts tropicales, la toundra et les tourbières participent aussi à la production du méthane atmosphérique. Par ailleurs, les processus de digestion des animaux (ruminants, termites) constituent également une source de production naturelle de méthane. Enfin, les phénomènes anaérobies qui se déroulent dans les sédiments marins sont responsables d'une partie du méthane dissout dans l'eau de mer.

2.2 Historique

Alessandro Volta (1745-1827) fût le premier à découvrir en 1776 que le gaz produit dans les marais était combustible. Par la suite, Antoine Laurent de Lavoisier (1743-1794) mit en évidence que ce gaz était du « gas hydrogenium carbonatum ». Le terme de "méthane" fut proposé en 1865 et confirmé en 1892 par un congrès international de nomenclature chimique. Parallèlement, Louis Pasteur montra au milieu du XIX^{ème} siècle, que ce gaz était produit par une fermentation bactérienne.

Du fait de son haut pouvoir calorifique (50 MJ/kg) et de son origine biologique, le méthane peut légitimement être envisagé comme une source d'énergie alternative et renouvelable, substituable au gaz naturel d'origine fossile. A titre indicatif, 1 m³ de méthane produit 8570 kcal ce qui correspond à 1,15 L d'essence, 0,94 m³ de gaz naturel, ou 1 L de mazout. Il permet la production de 9,7 kWh d'électricité. D'autre part, bien que le pouvoir calorifique du dihydrogène (120 MJ/kg) reste bien supérieur à celui du méthane, sa production par voie biologique nécessite encore la levée de plusieurs verrous technologiques.

Le processus naturel de production de méthane a ainsi progressivement été dompté par l'Homme afin de le mettre en œuvre dans des unités dédiées. Le premier digesteur fut construit à la léproserie de Mantuga, près de Bombay. En 1895, une installation produisant du méthane vit le jour à Exeter en Grande-Bretagne. Elle permit l'éclairage des rues de la ville. En 1907, l'allemand Karl Imhoff (1876-1965) mit au point un système de méthanisation qui aboutit à la célèbre « fosse Imhoff » assurant la décantation et la digestion des eaux usées. Le processus de méthanisation fut également appliqué au traitement des déchets agricoles et d'élevage pendant les années 1940 afin de produire de l'énergie à partir du fumier grâce aux travaux de Gilbert Ducellier et Marcel Isman (1906-1996). Dans les années 70, suite aux chocs pétroliers, la méthanisation s'est fortement développée en Europe. En France, plus d'une centaine d'installations ont été réalisées durant cette période. Mais la baisse du prix de

l'énergie consécutive au contre-choc pétrolier des années 90, le défaut de maîtrise technique et le poids des investissements financiers ont peu à peu stoppé le développement de ce procédé. Toutefois, depuis les années 2000, la recherche d'une nouvelle répartition du mix énergétique en faveur des énergies renouvelables a entraîné un regain d'intérêt pour ce bioprocédé.

2.3 Positionnement au sein des filières de gestion des déchets

La méthanisation est appliquée pour le traitement de certaines eaux usées industrielles car elle permet à la fois de produire de l'énergie sous forme de biogaz, tout en économisant du fait de l'absence d'une oxygénation contrôlée nécessaire au procédé de « boues activées ». Les quantités de boues obtenues sont 5 à 10 fois inférieures à celles retrouvées par voie aérobie. Enfin, à volume et à temps équivalents, un mètre cube de digesteur anaérobie est capable d'éliminer 10 fois plus de pollution qu'un système aérobie (ADEME, 2015b). La biomasse active y est en effet beaucoup plus concentrée. Ses besoins limités et sa capacité d'adaptation à des effluents très divers lui confèrent des avantages indéniables par rapport aux systèmes aérobies, notamment dans le traitement des effluents industriels ainsi que dans les effluents urbains des pays chauds.

Les déchets urbains, industriels ou agricoles peuvent aussi constituer des sources de matière très intéressantes pour ce type de bioprocédé. En effet la plupart des matières organiques sont susceptibles d'être décomposées et de produire du biogaz, avec un potentiel méthanogène toutefois très variable. On retrouve principalement dans les unités de méthanisation :

- Les déchets et effluents d'industrie agro-alimentaires (abattoirs, laiteries, fromageries, etc...)
- Les déchets et effluents agricoles (déjections animales, résidus de récolte, eaux de salle de traite, etc...)
- Les boues et graisses de station d'épuration des eaux urbaines
- Les déchets municipaux (fraction fermentescible des ordures ménagères, tontes de gazon, biodéchets, etc...)

La digestion anaérobie aboutit à la production de deux effluents, le biogaz et le digestat. Le biogaz est un mélange gazeux saturé en eau composé d'environ 50 à 80 % de méthane et de 20 à 50 % de gaz carbonique. Quelques éléments traces tels que le NH_3 , le N_2 ou l' H_2S peuvent également être retrouvés en fonction du flux de déchet traité et des conditions de fonctionnement du digesteur.

Le biogaz produit par les unités de méthanisation peut être valorisé sous différentes formes :

- Pour la **production de chaleur**. L'efficacité énergétique est intéressante, mais nécessite des débouchés à proximité afin de limiter le transport
- Pour la **production d'électricité**. L'efficacité énergétique est plus faible du fait des rendements énergétiques limitant des moteurs (33 %)
- Pour la production combinée de chaleur et d'électricité (**cogénération**). Le biogaz est transformé en électricité grâce à un module de cogénération constitué d'un

moteur à gaz qui entraîne un générateur de courant électrique pendant que la chaleur est récupérée au niveau du système de refroidissement

- Pour la **production de carburant véhicule** (gaz naturel véhicule) après une série d'étapes d'épuration/compression. Cette valorisation s'est principalement développée dans les pays scandinaves et en Suisse notamment pour les véhicules appartenant aux collectivités (bus, camions bennes de collecte des déchets)
- Pour l'**injection de biogaz épuré dans le réseau de gaz naturel**. Cette technique est usuelle dans des pays tels que l'Allemagne, les Pays-Bas, la Suisse et la Suède. Ce procédé est encore en voie de développement en France.

La digestion anaérobie mène à la production de digestat. Celui-ci est principalement composé de matière organique non biodégradable telle que la lignine, de matières minérales (azote, phosphore) et d'eau. Le digestat est principalement valorisé comme fertilisant ou comme amendement organique. Cependant, son utilisation dépend de sa qualité agronomique. Celle-ci est gouvernée par plusieurs facteurs tels que la nature des déchets traités et les conditions de fonctionnement du digesteur. Les digestats peuvent notamment subir une étape de maturation par compostage afin d'être stabilisés.

2.4 Le parc Français des unités de méthanisation

En janvier 2014, l'ADEME a recensé 447 méthaniseurs. La répartition par type d'unité est indiquée dans la Figure 5.

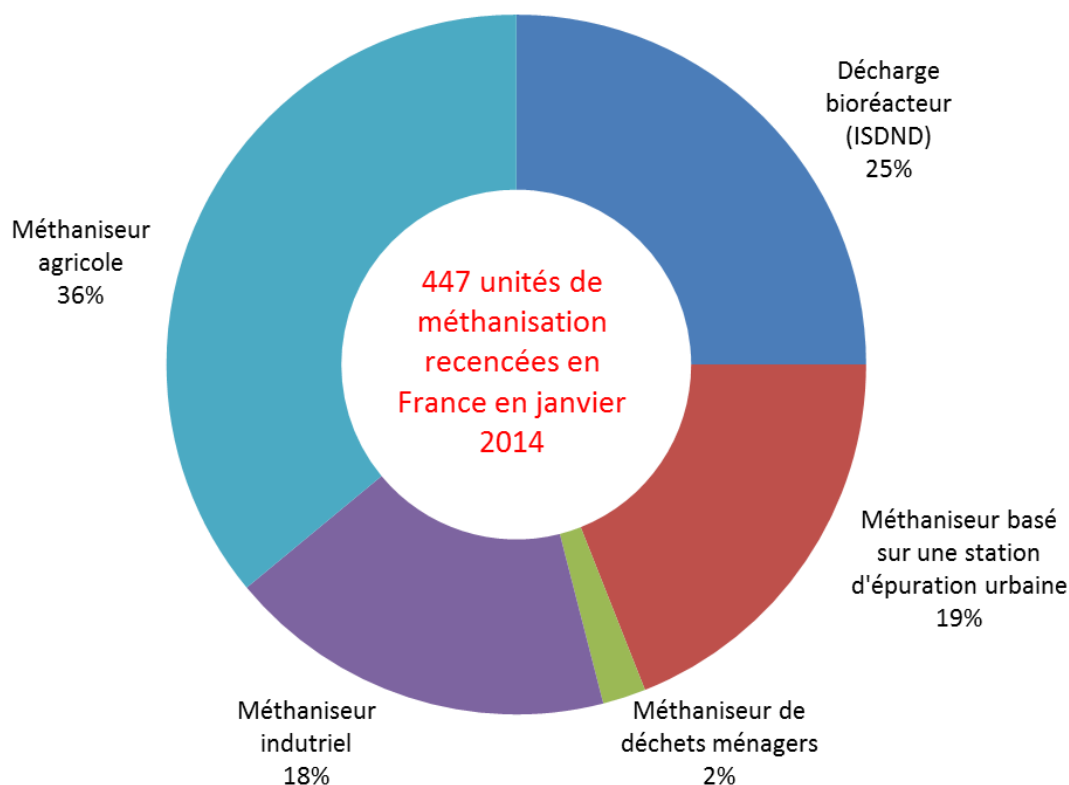


Figure 5 : Répartition du parc Français des centres de méthanisation selon la nature des installations, en 2014 (ADEME, 2015a)

Même si la proportion de centres de méthanisation accueillant des déchets ménagers reste faible, son nombre ne cesse d'augmenter depuis 2000, passant de 1 à 10 en 2012. Des dispositifs de soutien de cette filière ont fixé des objectifs ambitieux qui prévoient une multiplication par quatre de la production d'électricité (625 MW en 2020) et de chaleur (555 ktep en 2020) grâce au biogaz. Pour ce faire, un tarif d'achat garanti (entre 45 et 95 €/MWh) a été créé afin de rendre l'injection du biométhane dans les réseaux de gaz naturel plus attractive économiquement. De même, l'obligation d'achat de l'électricité « verte » produite grâce au biogaz (article L341-1 du code de l'énergie) par une entreprise de distribution d'énergie (EDF, etc...) à un tarif fixé par l'Etat et revalorisé au 19 mai 2011 (entre 111,9 et 199,7 €/MWh) constitue un soutien important pour le développement de cette filière.

3 Description des processus régissant la digestion anaérobie

3.1 Les grandes étapes de la digestion anaérobie

La production de méthane et de gaz carbonique à partir de matière organique nécessite la mise en œuvre d'un ensemble complexe de réactions catalysées par différentes populations de micro-organismes. L'équilibre des interactions trophiques qui régissent le processus de méthanisation est donc primordial pour assurer la dégradation complète des substrats. Classiquement, la digestion anaérobie est divisée en quatre étapes

3.1.1 L'hydrolyse

L'hydrolyse consiste à déstructurer un substrat constitué de matière organique complexe en molécules plus simples et facilement assimilables par les micro-organismes. Lors de cette étape, les macromolécules telles que les acides nucléiques ainsi que les biopolymères (polysaccharides, lipides, protéines) sont dégradés (hydrolysés) en fragments (monomères) hydrosolubles tels que les monosaccharides (glucose), les acides gras, les acides aminés et les bases azotées (Batstone et al., 2002; Cirne et al., 2007). Ces réactions sont catalysées par des exo-enzymes (Goel et al., 1998; Sanders et al., 2000; Zhang et al., 2007). Les vitesses de dégradation dépendent de la nature des substrats. Cette étape est donc généralement considérée comme limitante de l'ensemble du processus de dégradation et notamment lorsque la matière organique est composée de molécules complexes telle que la lignine ou la cellulose (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991; Philippidis & Smith, 1995; Tong et al., 1990; Zhang et al., 2007).

3.1.2 L'acidogenèse

Lors de l'acidogenèse, les monomères issus de l'étape d'hydrolyse sont principalement fermentés en acides organiques et en alcools. Des acides gras volatils (AGV) tels que le formate, l'acétate, le propionate, le butyrate ou le valérate, des alcools (propanol, butanol, éthanol...) ainsi que d'autres acides organiques (caproïque, succinique...) sont synthétisés (Batstone et al., 2002). Cette étape mène également à la formation de dihydrogène (H₂) et de gaz carbonique. Elle peut être 30 à 40 fois plus rapide que l'hydrolyse (Moletta, 1993).

3.1.3 L'acétogenèse

L'acétogenèse permet la transformation des différents intermédiaires métaboliques issus des phases précédentes en acétate, en dihydrogène et en gaz carbonique. Lors de cette étape, deux voies métaboliques ont été identifiées :

- La **voie homoacétogène** conduit uniquement à la production d'acétate. Celui-ci peut être synthétisé soit à partir de molécules organiques telles que certains sucres, soit à partir de produits finaux de dégradation tels que le formate, le dihydrogène et le dioxyde de carbone.

- La **voie hétéroacétogène** aboutit quant à elle à la production d'acétate, de dihydrogène et de dioxyde de carbone. Cette voie peut aussi induire la production d'AGV (propionate, butyrate...).

La thermodynamique des réactions hétéroacétogènes est défavorable car leur variation d'enthalpie libre (ΔG) est positive. L'augmentation de l'enthalpie associée à ces réactions implique la nécessité d'une élimination constante du dihydrogène produit permettant ainsi de transformer une réaction endergonique en réaction exergonique et donc de générer l'énergie nécessaire au micro-organisme (Barlaz et al., 1990; Siriwongrungson et al., 2007; Thauer et al., 1977).

3.1.4 La méthanogenèse

La méthanogenèse constitue l'ultime étape du processus de digestion anaérobie. Elle consiste en une minéralisation des produits de l'acétogenèse (principalement l'acétate, le dihydrogène, le dioxyde de carbone et le formate) en méthane. Deux voies métaboliques sont impliquées lors de cette dernière transformation:

- La **méthanogenèse acétoclaste** produit du méthane et du gaz carbonique à partir d'acétate.
- La **méthanogenèse hydrogénotrophe** utilise quant à elle le dihydrogène et le dioxyde de carbone pour produire du méthane

D'autre part, des études ont montré qu'une méthanogenèse méthylotrophe pouvait se produire à partir de composés méthylés (méthanol, sulfure de diméthyl, etc...) en présence d'eau et d' H_2 (Lovley & Klug, 1983).

3.1.5 Les autres réactions associées

De nombreuses réactions biochimiques se déroulant parallèlement à celles précédemment citées *interviennent lors d'un processus de digestion anaérobie*. Notamment, en présence de sulfates, des réactions de sulfato-réduction *permettent la transformation d'intermédiaires tels que l'acétate, le propionate, le butyrate ou l'éthanol en sulfure d'hydrogène (H_2S) et en dioxyde de carbone*. La concurrence pour la consommation de ces substrats peut venir parasiter le bon déroulement *de l'acétogenèse et de la méthanogenèse*. *D'autres réactions liées au cycle de l'azote telles que la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium (DNRA), la dénitrification des nitrates en diazote, ainsi que l'oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox) peuvent également se produire au sein des digesteurs anaérobies*. Enfin, la présence de xénobiotiques peut induire des réactions spécifiques associées à leur dégradation. Un schéma récapitulatif des principales réactions associées à la digestion

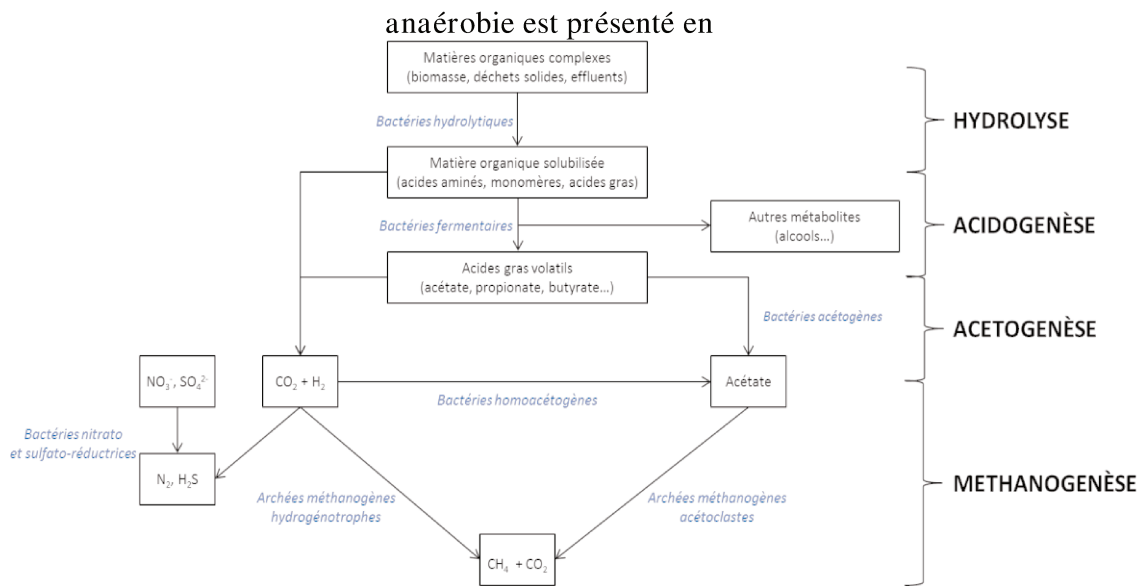


Figure 6.

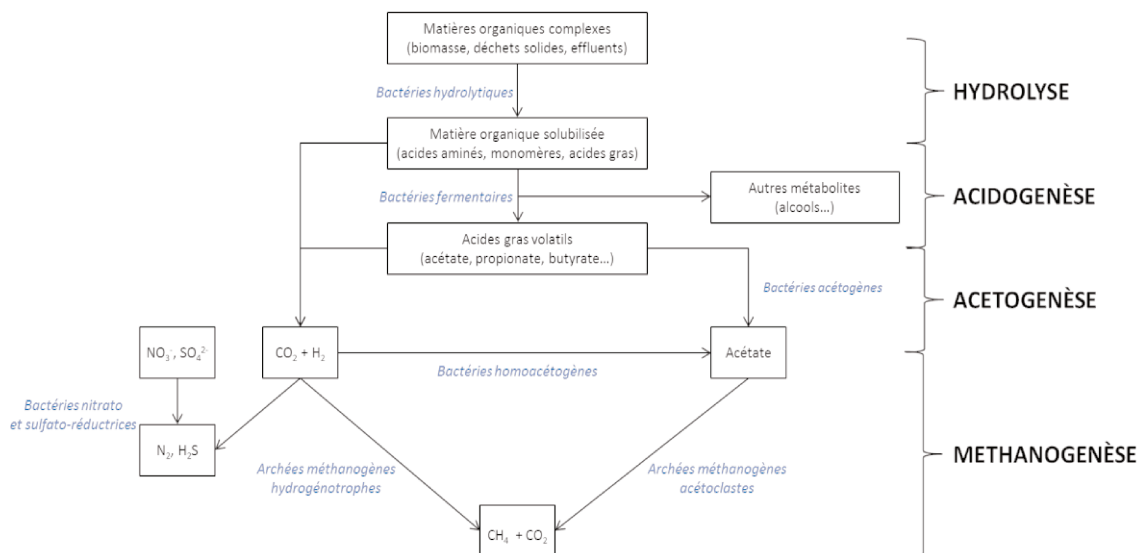


Figure 6 : Schéma réactionnel général de la digestion anaérobie

3.2 Microbiologie de la digestion anaérobie

3.2.1 Les populations hydrolytiques

Les bactéries hydrolytiques forment un ensemble phylogénétique hétérogène. De plus, certains groupes fongiques eucaryotes retrouvés dans le rumen sont également capables d'hydrolyser la matière organique complexe (Nsereko et al., 2000). Les bactéries hydrolytiques sont anaérobies, strictes ou facultatives. Leur vitesse de croissance est relativement rapide et leur temps de doublement peut atteindre quelques heures bien que cette étape soit souvent limitante dans le processus global de méthanisation. L'extrême diversité des communautés microbiennes impliquées dans cette étape rend impossible un inventaire exhaustif. Néanmoins, parmi les nombreux genres microbiens impliqués dans l'hydrolyse, il est possible de citer *Acetivibrio*, *Anaerovibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*,

Cillobacterium, Clostridium, Lachnospira, Micrococcus, Mocooccus, Peptococcus, Pseudomonas, Ruminococcus, Succinomonas, Staphylococcus ou Syntrophomonas en conditions mésophiles. En condition thermophile, une plus grande spécialisation des genres est observée. On retrouve en autres Acetomicrobium, Anaerocellum, Clostridium, Coprothermobacter ou Thermoanaerobacter (Moletta, 2015).

3.2.2 Les populations fermentaires

Les micro-organismes fermentaires sont anaérobies stricts. Ils ont un métabolisme et un rythme de croissance plus élevé que celui des méthanogènes, et peuvent survivre à des conditions extrêmes de pH ou de température (Bayard & Gourdon, 2001; Moletta, 2015). Le métabolisme rapide de ce groupe trophique vis à vis des étapes ultérieures (acétogénèse et méthanogénèse) peut néanmoins être une source d'inhibition pour la digestion anaérobie. En effet, un déséquilibre des espèces acidogènes par rapport aux méthanogènes pouvant notamment être causé par une surcharge en composés organiques, peut engendrer une accumulation de composés intermédiaires tels que l'acétate et l' H_2 , défavorables à la croissance des méthanogènes (Moletta, 2015; Siegert & Banks, 2005). Par conséquent, l'acidogénèse est une étape clé de la méthanisation dont les produits de réaction doivent être dégradés ou extraits le plus rapidement possible. Les acidogènes sont principalement constitués du genre Clostridium. Néanmoins, les genres Acetobacterium, Bacillus, Bacteroides, Pelobacter et Ulyobacter ainsi que la famille des Enterobacteriaceae sont régulièrement présents au sein de la flore acidogène (Ali Shah et al., 2014; Moletta, 2015).

3.2.3 Les populations acétogènes

Les bactéries acétogènes sont anaérobies strictes, très sensibles au pH et ont une croissance très lente (Ali Shah et al., 2014). Les deux voies métaboliques de l'acétogénèse sont réalisées par deux populations bactériennes distinctes. Certaines bactéries sulfato-réductrices peuvent également produire de l'acétate à partir de l'une ou l'autre de ces deux voies.

La voie hétérofermentaire est assurée par des micro-organismes syntrophes qui produisent obligatoirement du dihydrogène (appelés OHPA pour « Obligate Hydrogen Producing Acetogens »). La croissance des OHPA nécessite une très faible pression partielle en H_2 ($<10^{-4}$ atm). Celui-ci possède en effet une action inhibitrice sur la croissance microbienne et les réactions biochimiques (Moletta, 2015). Il doit donc être constamment éliminé par un second micro-organisme afin de rendre possible la consommation de l'acétate (Huiliñir et al., 2008; Nie et al., 2008; Schink, 1997). Les OHPA se développent donc obligatoirement avec des micro-organismes consommateurs de dihydrogène. Ils ont une croissance plutôt lente (temps de doublement de 1 à 7,5 jours) (Girguis et al., 2005) et sont principalement composées des genres : Syntrophobacter, Syntrophomonas, Syntrophus, Syntrophococcus ou Syntrophosphora (Ali Shah et al., 2014)

Les bactéries homoacétogènes productrices d'acétate sont divisées en deux groupes selon la provenance de l'acétate. Le groupe I utilise un substrat carboné (AGV, éthanol, etc...) alors que le groupe II réduit le dioxyde de carbone par le dihydrogène. Ces micro-organismes permettent notamment le maintien de concentrations non inhibitrices de

dihydrogène dans le milieu. Ainsi, les genres *Butyribacterium* et *Peptococcus* sont impliqués dans la production d'acétate à partir de substrat carboné, tandis que les genres *Acetoanaerobacterium*, *Acetobacterium*, *Acetofilamentum*, *Acetohalobium*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Acetotitomaculum*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Sporomusa* ou *Thermoanaerobacter* synthétisent l'acétate à partir de dioxyde de carbone et de dihydrogène (Ali Shah et al., 2014; Moletta, 2015).

3.2.4 Les populations méthanogènes

La production de méthane dans un digesteur est classiquement décrite comme étant réalisée par deux grandes catégories de micro-organismes méthanogènes anaérobies stricts appartenant au domaine Archaea : les hydrogénotrophes et les acétoclastes (Batstone et al., 2002; Demirel & Scherer, 2008). Certaines populations utilisent également les composés méthylés comme source de carbone. Les archées méthanogènes appartiennent à 7 ordres phylogénétiques : Methanococcales, Methanopyrales, Methanobacterales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanocellales and Methanoplasmatales (Borrel et al., 2013; Paul et al., 2012; Sakai et al., 2008).

Les archées méthanogènes hydrogénotrophes (ou hydrogénophiles) évoluent en association syntrophique avec les espèces productrices d'hydrogène (OPHA). Elles permettent ainsi de maintenir une faible pression en dihydrogène nécessaire au bon déroulement du processus global de digestion anaérobie. Hormis le genre *Methanosaeta*, la totalité des archées méthanogènes sont capables de réaliser cette réaction. Les genres les plus représentés sont *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanogenium* et *Methanocorpusculum* (Ali Shah et al., 2014; Moletta, 2015).

Les archées méthanogènes acétoclastes sont dominées par l'ordre Methanosarcinales et notamment par deux genres : *Methanosaeta* et *Methanosarcina*. Il est admis que *Methanosarcina* devient majoritaire vis-à-vis de *Methanosaeta* en présence de concentrations en acétate supérieures à 5mM. Malgré leur polyvalence métabolique, les *Methanosarcina* ne sont pas compétitives par rapport aux genres exclusivement hydrogénophiles.

Enfin, les principales archées méthylophiles appartiennent au genre *Methanosarcina* (Ali Shah et al., 2014; Moletta, 2015), à l'ordre Methanobacterales avec en outre *Methanosphaera stadtmanae* et à l'ordre Methanoplasmatales avec *Methanomassiliicoccus luminyensis* et *Candidatus Methanomethylophilus alvus* (Borrel et al., 2013).

3.3 Paramètres physico-chimiques influençant la digestion anaérobie

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

3.3.1 Potentiel d'oxydoréduction (redox)

Les premières étapes de la digestion anaérobie sont le fait de bactéries anaérobies strictes ou facultatives. Cependant la méthanogenèse est réalisée par des archées anaérobies

strictes. L'oxygène possède un effet bactériostatique ou même bactéricide pour la flore méthanogène. Le potentiel redox représente l'état de réduction du système et peut directement être relié à la concentration en oxygène du milieu. Pour que la méthanisation ait lieu, il est généralement admis que le potentiel redox doit être inférieur à -300 mV.

3.3.2 Température

La température est un paramètre important de la méthanisation qui peut affecter la croissance des micro-organismes et l'activité enzymatique. La digestion anaérobie est opérationnelle pour des températures comprises entre 4 et 70°C. Différentes stratégies de fonctionnement sont appliquées en fonction des objectifs de traitement mais également de l'environnement au sein duquel le digesteur est implanté. On distingue classiquement trois gammes de températures de fonctionnement : psychrophile (4-15°C), mésophile (20-40°C) et thermophile (45-70°C) (Batstone et al., 2002). Les modes mésophiles (35°C) et thermophiles (55°C) sont les plus couramment utilisés à l'échelle industrielle.

La température affecte les équilibres des espèces chimiques présentes dans les milieux de digestion (azote ammoniacal, sulfures, AGV). Elle influe notamment sur les équilibres acides-bases, liquides/gaz ainsi que sur la dissolution des solides. La température a donc un impact considérable sur les processus physico-chimiques et biochimiques de la digestion anaérobie. Des variations de températures peuvent affecter les performances de ce procédé et la composition des communautés microbiennes (Chapleur et al., 2015; Wilson et al., 2008; Zinder et al., 1984).

3.3.3 pH et alcalinité

A l'instar de la température, le pH influe sur la croissance des micro-organismes et sur l'activité enzymatique (Boone & Xun, 1987; Veecken et al., 2000). Les méthanogènes sont extrêmement sensibles aux variations de ce paramètre. Le pH modifie notamment les équilibres physico-chimiques des acides et bases faibles tels que les AGV et l'azote ammoniacal (Mata-Alvarez et al., 2000) ou encore sur les équilibres liquides/gaz et notamment sur le couple $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{CO}_2$. Les conditions optimales pour la digestion anaérobie se situent autour de la neutralité entre 6,5 et 8,5. Cette gamme est le résultat du pH optimum de chaque population bactérienne. Les bactéries fermentatives acidifiantes se développent autour d'un pH optimal de 5,5-6 alors que celui des acétogènes et des méthanogènes se situe plutôt autour de la neutralité.

Par ailleurs, il est à noter que le maintien du pH au sein d'un digesteur est lié au pouvoir tampon du milieu et donc à l'alcalinité. Celle-ci peut être mesurée et dépend principalement de la concentration en bicarbonates (HCO_3^-) ou en phosphates (PO_4^{3-}), en AGV et parfois en ammonium.

3.3.4 Besoins nutritionnels

Chaque bactérie constituant la flore de la digestion anaérobie demande un apport suffisant en macroéléments (C, N, P, S) et en d'oligo-éléments pour sa croissance. Certains auteurs proposent des proportions (C/N/P) de 600/7/1 (Mata-Alvarez, 2003), ou encore des ratios C/N proches de 25 (Hills, 1979).

Les oligo-éléments sont nécessaires à la croissance des méthanogènes. Il s'agit notamment du nickel, du fer, du zinc et du cobalt qui prennent part dans la composition de certains coenzymes et de protéines impliquées dans leur métabolisme (Zhang et al., 2012b). Le magnésium et le sodium sont essentiels puisqu'ils entrent respectivement en jeu dans la réaction terminale de synthèse du méthane ainsi que dans le processus de synthèse de l'ATP. Cependant, les besoins sont difficiles à établir car la biodisponibilité de ces microéléments au sein des digesteurs est souvent sujette à caution (Moletta, 2015).

4 Les inhibiteurs de la digestion anaérobie

Une des principales critiques formulée à l'encontre de la digestion anaérobie concerne son instabilité. La mise en place de ce type de procédé suppose une certaine part d'incertitude liée au caractère biologique des processus régissant son fonctionnement. En effet, la digestion anaérobie implique une cascade de réactions biochimiques réalisées par une succession de micro-organismes spécialisés formant un véritable réseau trophique. Bien que l'avancée des techniques de biologie moléculaire lève peu à peu le voile sur leur compréhension, l'extrême complexité des communautés microbiennes et des interactions potentiellement mises en jeu au sein des digesteurs rend encore à ce jour difficile la maîtrise totale de ce type de bioprocédé. L'écosystème microbien de la digestion anaérobie se situe donc en permanence dans un état d'équilibre précaire qui peut aisément être déstabilisé par de brusques changements des paramètres opératoires, ou par la présence d'un certain nombre de composés chimiques inhibiteurs. L'arrivée de ces molécules reste encore difficilement prévisible du fait de la forte variabilité des flux de déchets traités. De plus, celles-ci peuvent être synthétisées au sein même des digesteurs lors de la dégradation de certains substrats spécifiques. A l'échelle industrielle, les conséquences d'une telle perturbation de la biomasse peuvent être dramatiques aussi bien sur le plan économique qu'environnemental, ce qui constitue encore à ce jour un frein majeur au développement de la méthanisation.

Les prochains paragraphes s'attacheront donc à réaliser un état de l'art portant sur les principaux inhibiteurs de la digestion anaérobie. Leur provenance, leurs mécanismes d'action, ainsi que les concentrations auxquelles ils ont pu être retrouvés au sein des flux de déchets et/ou des digesteurs seront également décrits. Les seuils d'inhibition de chacun de ces inhibiteurs ont généralement été déterminés, pour un substrat et à un pH donné, par la concentration inhibant 50 % de l'activité des micro-organismes. On parlera alors dans la suite du manuscrit de concentration inhibitrice 50 (abrévée CI_{50}). Dans le cas de la digestion anaérobie, celle-ci s'intéresse principalement à la production de méthane.

4.1 Les inhibiteurs inorganiques

4.1.1 *L'azote ammoniacal*

L'azote est un nutriment essentiel à la croissance des micro-organismes qui l'absorbent sous sa forme ammoniacale. Celle-ci est produite lors de la dégradation de l'azote organique contenu dans des molécules variées telles que les protéines ou l'urée (Rajagopal et al., 2013). Il est d'ailleurs généralement admis que des concentrations en azote ammoniacal inférieures à 200 mg/L sont bénéfiques au fonctionnement de la digestion anaérobie. Cependant au-delà de d'une certaine concentration, cette molécule peut devenir inhibitrice de la digestion anaérobie. Par conséquent, de nombreux effluents ou déchets contenant de fortes quantités de composés azotés (effluents et déchets d'industries agro-alimentaires, d'élevage, etc...) sont susceptibles d'inhiber la méthanisation (Chen et al., 2008; Rajagopal et al., 2013; Yenigün & Demirel, 2013).

L'azote ammoniacal existe sous deux formes : l'ion ammonium (NH_4^+) et la forme réduite appelée ammoniac (NH_3). L'équilibre chimique entre ces deux composés dépend

principalement du pH et de la température selon la formule suivante (Anthonisen et al., 1976) :

$$[\text{NH}_3] = \frac{10^{\text{pH}}}{\exp\left(\frac{6334}{T}\right) + 10^{\text{pH}}} \times [\text{NH}_4^+]$$

où T est la température (exprimée en K)

Une augmentation du pH et/ou de la température du milieu induit donc automatiquement une augmentation de la concentration en ammoniac. Or, le NH_3 est reconnu comme étant la forme la plus toxique de l'azote ammoniacal. En effet, son caractère hydrophobe lui permet de diffuser passivement à travers la membrane plasmique des micro-organismes et d'induire un déséquilibre du pH intracellulaire occasionnant notamment une déficience en potassium. D'autres auteurs ont également montré que la présence d'une trop forte quantité d'ammoniac au sein des cellules pouvait causer l'inhibition de certaines réactions enzymatiques (Wittmann et al., 1995).

Des réductions de 50 % de la production de méthane ont été observées pour des concentrations en azote ammoniacal s'étendant de 1,7 à 14,0 g/L (Chen et al., 2008; Sung & Liu, 2003). La grande disparité de ces concentrations inhibitrices peut s'expliquer par la variabilité des conditions environnementales dans lesquelles ont été réalisées chacune de ces expérimentations (Rajagopal et al., 2013; Yenigün & Demirel, 2013). En effet, de nombreux paramètres tels que la nature du substrat et de l'inoculum, la température, ou encore le pH peuvent influencer sur la capacité de résistance de l'écosystème. De même, dans certains écosystèmes préalablement acclimatés, la méthanogenèse reste fonctionnelle pour des concentrations en azote ammoniacal de plusieurs dizaines de grammes par litre (de Baere et al., 1984; Van Velsen, 1979). Certaines études ont permis de prouver que les archées méthanogènes étaient plus sensibles à l'azote ammoniacal que les populations bactériennes. Notamment, des recherches basées sur la comparaison de la production de méthane et du taux de croissance, indiquent qu'une augmentation de la concentration en azote ammoniacal inhiberait préférentiellement la méthanogenèse acétoclaste (Schnürer & Nordberg, 2008). Des études récentes ont également décrit la mise en place d'interactions syntrophiques entre des bactéries réalisant l'oxydation de l'acétate et des méthanogènes hydrogénotrophes lors d'un épisode de perturbation par l'azote ammoniacal (Li et al., 2015; Werner et al., 2014; Westerholm et al., 2012).

4.1.2 *Le sulfure d'hydrogène*

Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est le produit de réduction du sulfate par les bactéries sulfato-réductrices (BSR). Celles-ci utilisent comme accepteur terminal d'électron le sulfate (SO_4^-), qu'elles réduisent en sulfure (S^{2-}). Elles peuvent également utiliser les sulfites (SO_3^{2-}) et le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). De nombreux effluents et déchets provenant notamment des industries agro-alimentaires (laiteries, fromageries, brasseries, sucreries), des élevages intensifs (déjections animales), des usines pétrochimiques, des tanneries, ou encore des usines de gazéification du charbon, fortement concentrés en sulfates ou en protéines soufrées, sont

donc susceptibles d'activer ce réseau trophique et de favoriser la production d' H_2S (Appels et al., 2008; Chen et al., 2008).

Selon McCartney et al., (1991), le mécanisme d'inhibition lié à la sulfato-réduction se déroule en deux étapes. En présence d'une concentration non limitante en sulfate, les BSR entrent en compétition avec trois groupes de micro-organismes : d'une part avec les archées méthanogènes et les bactéries homoacétogènes pour l'hydrogène et/ou l'acétate, et d'autre part avec les bactéries acétogènes pour les AGV autres que l'acétate. Si les BSR parviennent à prendre le dessus sur les autres populations, alors la forte concentration d' H_2S produit devient toxique envers les archées méthanogènes. Son effet inhibiteur peut agir directement sur ces micro-organismes en affectant le pH intracellulaire et en dénaturant certaines protéines cytoplasmiques par l'établissement de ponts disulfures entre les chaînes polypeptidiques empêchant ainsi la fixation d'enzymes intervenant dans le métabolisme cellulaire. Mais l' H_2S peut aussi entraîner la précipitation de certains métaux essentiels à la croissance des méthanogènes tels que le cobalt ou le nickel ce qui a pour conséquence de réduire les performances de la digestion anaérobie (Karhadkar et al., 1987; McCartney & Oleszkiewicz, 1991). Le pH joue un rôle prépondérant dans l'inhibition du sulfure d'hydrogène en agissant sur l'équilibre entre sa forme ionique (HS^-) et sa forme gazeuse (H_2S). Par ailleurs, les interactions compétitives entre les BSR et les autres micro-organismes cités précédemment sont principalement régies par le rapport entre la quantité de matière organique et la quantité de sulfate DCO/SO_4^- de l'effluent.

Les valeurs des CI_{50} retrouvées dans la littérature sont très variables et s'échelonnent de 0,05 à 0,8 g/L d' H_2S dissous. Jeong et al., (2008) ont testé sur des bioréacteurs de digestion anaérobie, plusieurs ratios de DCO/SO_4^- entre 1,16 et 116 (Jeong et al., 2008). Selon leur étude, un ratio de 11,6 a causé une chute de 60 % du rendement spécifique en méthane par rapport à un bioréacteur alimenté sans sulfate. Selon Yamaguchi et al., (1999), la méthanogenèse acétoclaste semble être plus sensible à l' H_2S que la méthanogenèse hydrogénotrophe (Yamaguchi et al., 1999).

4.1.3 L'hydrogène

Le bon déroulement du processus de digestion anaérobie nécessite un équilibre entre la production d'hydrogène et sa consommation par les méthanogènes hydrogénotrophes (cf Figure 6). Lorsque cet équilibre n'est pas respecté, l'hydrogène devient alors un inhibiteur de la digestion anaérobie en affectant notamment le métabolisme des bactéries acétogènes. L'arrêt de l'acétogenèse induit donc un arrêt de la production de méthane, une hausse des concentrations en AGV (propionate, butyrate) et donc une diminution du pH amenant ainsi à l'arrêt du digesteur. Thermodynamiquement, il est admis que la pression partielle en hydrogène doit être maintenue entre 10^{-5} et 10^{-6} atm pour autoriser l'oxydation des AGV tels que le propionate et le butyrate (Ahring et Westermann, 1988). En pratique, on considère que la pression partielle en hydrogène doit être inférieure à 10^{-4} atm pour éviter tout phénomène d'inhibition (Moletta, 2015). Certains auteurs ont néanmoins observé une inhibition de la dégradation du butyrate à partir de pressions en hydrogène supérieure à 10^{-3} atm en condition thermophile (Ahring et Westermann, 1988).

4.1.4 Les éléments minéraux

Un certain nombre d'éléments minéraux entrent en jeu dans la digestion anaérobie (magnésium, potassium, calcium, sodium et aluminium). Bien qu'étant indispensables aux processus biologiques, ils deviennent toxiques à partir de certaines concentrations. Ils peuvent notamment être relargués dans les digesteurs au cours de la dégradation de la matière organique.

4.1.4.1 Le sodium

La présence de sodium est indispensable au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire car il entre notamment dans la réaction de synthèse de la molécule d'ATP ou dans l'oxydation du coenzyme NADH. Parmi les substrats fortement concentrés en sodium et potentiellement valorisables en digestion anaérobie, on peut notamment citer les effluents d'usines agroalimentaires (fruits de mer, charcuterie...) (Feijoo et al., 1995).

Le mécanisme d'inhibition par le sodium se traduirait par une perte de capacité des micro-organismes à produire des exopolysaccharides et donc à s'agréger pour former des granules. L'hydrolyse serait également inhibée par de fortes concentrations en sodium (Lefebvre et al., 2007).

Plusieurs études indiquent que la concentration optimale de sodium pour la digestion anaérobie se situerait autour de 0,1-0,35 g/L. Le seuil d'inhibition du sodium sur un écosystème non préadapté a été évalué autour de 3,5 à 5,5 g/L (Soto et al., 1991). Les CI_{50} pour ce type d'inhibition s'étendent de 5,6 à 53,0 g/L (Chen et al., 2008; Liu & Boone, 1991; Vallero et al., 2002). Certaines études rapportent quant à elles que l'activité méthanogène serait complètement inhibée pour des concentrations allant de 10,0 à 30,0 g/L (Chen et al., 2008).

4.1.4.2 Le potassium

Le potassium est un autre élément essentiel à la croissance des micro-organismes. De faibles concentrations (< 0,4 g/L) peuvent stimuler la production de méthane dans les digesteurs anaérobies. Au-delà, le potassium devient toxique en neutralisant le potentiel des membranes plasmiques. Des effluents d'élevage tels que le lisier porcin sont connus pour contenir de fortes teneurs en potassium (jusqu'à 4,0 g/L) (Chen & Cheng, 2007).

Kugelman et McCarty (1965) ont trouvé que la méthanogenèse acétoclaste était inhibée de 50 % pour une concentration de 5,85 g/L (Kugelman & McCarty, 1965). D'autres études ont montré que l'effet inhibiteur du potassium augmentait avec la température. A 50°C, la production de méthane était significativement inhibée dès 3,0 g/L (Appels et al., 2008).

4.1.4.3 Le calcium

Le calcium est un élément favorisant l'agrégation des micro-organismes (Yu et al., 2001). Il est également indispensable à la croissance cellulaire.

Cependant, une teneur trop élevée en calcium entraîne la précipitation des carbonates et des phosphates induisant une perte du pouvoir tampon du milieu réactionnel. Une

stratification de la biomasse limitant les transferts de masse a également été observée dans des digesteurs contenant de fortes concentrations en calcium (Chen et al., 2008).

Peu d'études se sont penchées sur l'effet inhibiteur du calcium sur la digestion anaérobie. Néanmoins, Ahn et al., (2006) ont proposé une concentration optimale en calcium à 3,0 g/L. Le calcium serait modérément inhibiteur entre 5,0 et 7,0 g/L. Il deviendrait fortement toxique au-delà de 7,0 g/L (Ahn et al., 2006). Ces résultats vont à l'encontre de ceux issus de l'étude de Kugelman et McCarty (1965) qui ont estimé que la concentration optimale se situait aux alentours de 0,2 g/L. Selon cette même étude, le calcium serait inhibiteur au-delà de 2,5 g/L (Kugelman & McCarty, 1965).

4.1.4.4 *Le magnésium*

Comme les éléments précédemment cités, le magnésium joue un rôle clé dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. Il intervient notamment dans la composition de cofacteurs de nombreux enzymes. Sous forme ionique, il est connu pour stimuler la croissance cellulaire.

La concentration optimale de magnésium dans le milieu réactionnel de la digestion anaérobie a été déterminée aux alentours de 0,3-0,7 g/L (Schmidt & Ahring, 1993). Cependant, son effet inhibiteur a été révélé par certaines études au-delà d'un seuil de 1,9 g/L (Kugelman & Chin, 1971).

4.1.4.5 *L'aluminium*

L'aluminium peut être présent sous sa forme Al^{3+} dans de nombreux types de déchets (industrie agro-alimentaires, boues de station d'épuration). A forte concentration, il entre en compétition avec le fer et le manganèse qui sont des éléments essentiels à la croissance bactérienne (Chen et al., 2008). En outre, l'aluminium peut adhérer aux membranes plasmiques et inhiber la croissance cellulaire.

Cabirol et al., (2003) ont étudié l'effet de différentes concentrations en aluminium sur la digestion anaérobie. Ils ont rapporté que 1,0 g/L de $Al(OH)_3$ pouvait inhiber 50 % de l'activité méthanogène et 72 % de l'activité acidogène (Cabirol et al., 2003).

4.1.5 *Les métaux lourds*

Des métaux lourds peuvent être retrouvés à des concentrations non négligeables dans différents effluents aptes à la digestion anaérobie telles que les boues de station d'épuration et les ordures ménagères. Les principaux métaux identifiés comme inhibiteurs de la méthanisation sont le cadmium, le chrome, le cobalt, le cuivre, le fer, le nickel et le zinc. Du fait de leur caractère non biodégradable, ces derniers peuvent s'accumuler dans les micro-organismes et atteindre des concentrations toxiques (Chen et al., 2014a; Chen et al., 2008).

L'effet inhibiteur des métaux lourds est dû à leur affinité avec certains groupements protéiques et notamment avec les groupements thiol, empêchant ainsi certaines réactions enzymatiques. Les métaux lourds peuvent également se substituer aux métaux naturellement présents dans la composition de certains enzymes. En effet, les métaux sont des constituants essentiels de la cellule. Leur toxicité dépend donc à la fois de leur concentration dans le milieu, de leur forme chimique, et des conditions environnementales (pH, potentiel redox).

Seule la forme libre, soluble des métaux lourds est considérée comme toxique car elle est facilement assimilable par les micro-organismes (Appels et al., 2008).

Les métaux lourds peuvent présenter des effets inhibiteurs sur la digestion anaérobie, même à des concentrations faibles, de l'ordre de 0,001 g/L (Mata-Alvarez, 2003). Cependant, à l'instar de l'ensemble des inhibiteurs de la digestion anaérobie, la gamme des seuils d'inhibition retrouvés dans la littérature s'étend de quelques milligrammes par litre à plusieurs grammes par litre. Ceci peut s'expliquer par la difficulté de déterminer la fraction biodisponible du métal dans le milieu. En effet, les métaux ont tendance à s'adsorber sur la fraction solide. Par ailleurs, les différents groupes trophiques impliqués dans la digestion anaérobie possèdent chacun une sensibilité différente et spécifique à chacun des métaux lourds. Des études ont reporté une plus faible tolérance des acidogènes par rapport aux méthanogènes. De plus, l'allongement du temps de rétention semble améliorer la résistance des méthanogènes, tout en réduisant la résistance des acidogènes (Lin & Chen, 1999). Un phénomène d'acclimatation semble ainsi être obtenu chez les souches méthanogènes (Zayed & Winter, 2000). Selon les études de Lin et al., les sensibilités des acidogènes et des méthanogènes envers les différents métaux lourds peut être classifiée selon les ordres suivants : Cu > Zn > Cr > Cd > Ni > Pb et Cd > Cu > Cr > Zn > Pb > Ni (Lin, 1993). Enfin la présence combinée de différents métaux lourds au sein d'un même milieu peut avoir des effets antagonistes ou synergiques sur le fonctionnement de la digestion anaérobie (Oleszkiewicz & Sharma, 1990).

4.2 Les inhibiteurs organiques

De nombreuses molécules organiques peuvent inhiber le processus de digestion anaérobie. Parmi elles, on retrouve notamment une grande variété de composés xénobiotiques toxiques pour les micro-organismes. Ces molécules de synthèse sont généralement retrouvées à de basses concentrations dans les effluents aptes à la digestion anaérobie (de l'ordre du µg au mg/kg). Ces micropolluants organiques sont classifiés en trois grands groupes : les hydrocarbures aliphatiques et leurs avatars halogénés, les composés aromatiques monocycliques (phénol, benzène, etc...) et les composés aromatiques polycycliques (PAH, dioxines, PCB, pesticides...). De plus, l'hydrolyse des lipides contenus dans certains déchets génère la formation d'acides gras à longue chaîne qui peuvent avoir un effet inhibiteur sur le processus de méthanisation. Il en est de même concernant les acides gras volatils produits lors de l'acidogenèse et l'acétogenèse.

4.2.1 Les micropolluants organiques

4.2.1.1 Les hydrocarbures aliphatiques

Les composés aliphatiques retrouvés dans les digesteurs sont pour la plupart des molécules de faible poids moléculaire, hydrosolubles et volatils, qui se retrouvent plutôt sous forme solubilisée. Ces molécules sont régulièrement utilisées dans les procédés industriels comme adjuvant de l'essence, comme solvants, comme intermédiaires réactionnels, ou comme insecticides (Appels et al., 2008). On les retrouve notamment dans les peintures, les vernis, les textiles, les plastiques, les composés pharmaceutiques. La plupart des

hydrocarbures aliphatiques retrouvés dans les digesteurs sont des xénobiotiques toxiques pour l'environnement et les organismes. Ils sont majoritairement récalcitrants, mais des études ont déjà montré que certains d'entre eux pouvaient être biodégradés en conditions anaérobies (Chen et al., 2008).

Quelques composés aliphatiques halogénés sont fréquemment retrouvés comme contaminants dans l'environnement (dichlorométhane, chloroforme, trichloréthylène et perchloroéthylène). Les seuils d'inhibition de ces molécules sont très faibles. Yu et Smith (2000) ont montré que la méthanogenèse était complètement inhibée par 0,09 mg/L de chloroforme, 3,9 mg/L de dichlorométhane ou par 18 mg/L de trichloréthylène (Yu & Smith, 2000). Leurs mécanismes d'inhibition restent encore sujets à discussion. Contrairement à d'autres micropolluants organiques, le nombre de substitués halogénés tels que le chlore n'a pas d'influence sur le niveau de toxicité du composé. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le chloroforme avait une affinité avec certains enzymes entrant en jeu dans le métabolisme de la méthanogenèse (Chen et al., 2014a).

4.2.1.2 Les composés monoaromatiques

Cette famille regroupe des composés comportant un seul cycle benzénique qui peut être substitué ou non par des groupements halogènes (chlorobenzène), hydroxyles (phénol, chlorophénols), carboxyles (phtalates, benzoate), méthyles (toluène), nitrés (nitrobenzène, trinitrotoluène). Lors de cette thèse, une partie des expérimentations s'est attachée à étudier l'action inhibitrice du phénol sur l'écosystème de la digestion anaérobie. C'est pourquoi, devant la grande variété de composés aromatiques potentiellement présents dans les digesteurs, il a été décidé de se focaliser dans cette synthèse sur les inhibitions provoquées par les composés phénoliques.

Ces molécules, d'origine anthropique ou naturelle, peuvent notamment être présentes en fortes quantités dans les effluents d'usines pétrochimiques, papetières, pharmaceutiques ou de cokeries (Appels et al., 2008). De plus, les composés phénoliques sont naturellement retrouvés dans les acides humiques, et dans les tannins. Ils peuvent également être relargués lors de l'hydrolyse de matériaux lignocellulosiques ou de pesticides. Les effluents d'usines agroalimentaires (huile d'olive, vin) ainsi que les déchets municipaux sont notamment susceptibles d'apporter des quantités non négligeables de composés phénoliques au sein des digesteurs anaérobies (Chen et al., 2008).

Certaines de ces molécules peuvent être substituées par un ou plusieurs atomes de chlore. Les chlorophénols sont en effet couramment utilisés comme produits phytosanitaires (pesticides, herbicides, fongicides, etc.). Bien qu'ils soient extrêmement persistants dans l'environnement, ils sont biodégradables en conditions anaérobies. Leur degré de toxicité augmente avec le nombre d'atomes de chlore qui les composent, et de la position de ces derniers. Les pentachlorophénols sont considérés comme étant les plus toxiques avec un seuil d'inhibition de 0,5-10 mg/L. Le mécanisme d'inhibition de ces composés se traduit principalement par une accumulation au sein de la membrane cytoplasmique entravant le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire (Boyd et al., 1983; Hernandez & Edyvean, 2008).

L'un des principaux composés phénoliques étudié dans la littérature est le phénol. Il peut être directement retrouvé dans les digesteurs anaérobies car il est communément utilisé

dans de nombreux procédés industriels comme réactif chimique pour la production de résines et de produits pharmaceutiques (Rosenkranz et al., 2013; Veeresh et al., 2005). Il est également présent dans des effluents agricoles (déjections animales, résidus de culture, etc.) (Fang et al., 2006) et constitue un intermédiaire métabolique crucial dans la dégradation des composés phénoliques. A forte concentration, cette molécule peut s'avérer toxique pour la digestion anaérobie. De nombreuses études se sont penchées sur son potentiel inhibiteur car des concentrations de plusieurs grammes par litre ont notamment été retrouvées dans certains digestats (Levén et al., 2006). Cependant, il reste encore difficile à ce jour d'établir une concentration inhibitrice représentative de tous les cas de figures. Ainsi, les CI_{50} pour ce composé varient de 1 à 2 g/L en fonction des substrats utilisés, du degré d'acclimatation de la biomasse et des paramètres environnementaux (Chapleur et al., 2016; Olguín-Lora & Razo-Flores, 2004; Wirth et al., 2015).

4.2.1.3 Les composés aromatiques polycycliques

Cette famille regroupe des composés qui comportent plusieurs cycles aromatiques condensés (HAP tels que le naphthalène et le phénanthrène) ou non (biphényles), substitués ou non par des atomes de chlore (polychlorobiphényle, dichlorodiphényltrichloroéthane, etc...) (Peng et al., 2008).

La majorité des HAP ont une origine pyrolytique naturelle (feux de forêts, éruptions volcaniques) ou anthropique (combustions domestiques et industrielles). Ils sont générés par des processus de combustion incomplète de la matière organique à haute température (Haritash & Kaushik, 2009). Certaines boues urbaines issues de station d'épuration peuvent être contaminées par ces molécules. Même si leur concentration reste infime (20 to 300 $\mu\text{g/L}$ de boue), les HAP sont extrêmement toxiques pour les micro-organismes et peuvent inhiber fortement le processus de digestion anaérobie (Cea-Barcia et al., 2013; Trably et al., 2005). Cependant, ils restent biodégradables sous certaines conditions (Haritash & Kaushik, 2009; Yuan & Chang, 2007).

D'autres études se sont également focalisées sur la dégradation de micropolluants organiques tels que les PCB (Kaya et al., 2013), les produits issus de l'industrie pharmaceutique et les résidus médicamenteux (Carballa et al., 2007b). Cependant, compte tenu de leur faible concentration dans les effluents traités par digestion anaérobie, aucune d'entre elles ne s'est intéressée aux seuils d'inhibition de ces molécules.

4.2.2 Les acides gras

4.2.2.1 Les acides gras à longue chaîne

Les effluents riches en huiles et graisses possèdent un excellent potentiel énergétique. Cependant, l'hydrolyse de ces molécules produit des acides gras à longue chaîne (AGLC) qui, au-delà d'une certaine concentration, peuvent devenir toxiques pour les micro-organismes anaérobies (Chen et al., 2008; Koster & Cramer, 1987). Le palmitate et l'oléate sont les deux AGLC saturés et insaturés les plus abondamment retrouvés dans les digesteurs (Cirne et al., 2007).

Il a été montré que les AGLC s'adsorbent sur la membrane plasmique des bactéries Gram+ ce qui a pour conséquence d'empêcher les transferts ioniques et la mise en œuvre des mécanismes de défense cellulaire (Hanaki et al., 1981; Rinzema et al., 1994). En outre, la présence d'AGLC peut entraîner une flottation de la biomasse ce qui a pour effet d'augmenter le risque de lessivage (Pereira et al., 2005).

Certaines études ont décrit des phénomènes d'inhibition par l'acide stéarique dès 1,0 g/L (Angelidaki & Ahring, 1992). Hwu et al., (1996) ont également étudié la toxicité de différents AGLC (Hwu et al., 1996). Selon Alves et al., (2001), les méthanogènes acétoclastes semblent être plus sensibles que les hydrogénotrophes (Alves et al., 2001). Enfin, Angelidaki et al., (1992) ont montré que les écosystèmes thermophiles sont inhibés à des concentrations plus faibles que les mésophiles.

4.2.2.2 Les acides gras volatils (à courte chaîne)

Les AGV sont des métabolites intermédiaires clés dans le processus de digestion anaérobie. Cependant, au-delà d'une certaine concentration, spécifique à chaque AGV, ces derniers deviennent toxiques pour les micro-organismes et notamment pour les méthanogènes. Dans des conditions idéales de digestion, les vitesses de production des AGV sont compensées par les vitesses de consommation et il existe donc un équilibre fonctionnel entre différentes populations microbiennes empêchant tout phénomène d'accumulation. Bien souvent l'augmentation de leur concentration est la conséquence d'une modification des conditions environnementales telles qu'une surcharge organique, un changement de température, ou encore la présence d'un autre inhibiteur. Celle-ci peut être associée à une accumulation d'alcools ainsi qu'à une augmentation de la pression partielle en hydrogène produit par les bactéries acidogènes et acétogènes. De plus, l'accumulation d'AGV peut engendrer une inhibition en chaîne des étapes d'acidogenèse et d'hydrolyse (Appels et al., 2008; Chen et al., 2008).

Bien que les effets toxiques de fortes concentrations en AGV aient souvent été rapportés, la baisse de pH afférente semble être la cause principale responsable de cette toxicité (Fang et al., 1995; Fukuzaki et al., 1990; Veeken et al., 2000). En effet, l'acidification du milieu entraîne une concentration accrue de la forme non dissociée des AGV (AGVH), qui pénètre plus facilement à travers la membrane plasmique. Une fois parvenus à l'intérieur de la cellule, les AGVH se dissocient et les ions H⁺ relargués provoquent une chute du pH intracellulaire (Chen et al., 2008).

De nombreuses études ont conclu que des concentrations en AGV pouvaient ralentir fortement les cinétiques hydrolytiques des composés particuliers (Siegert & Banks, 2005; Veeken et al., 2000). Cette étape étant souvent considérée comme limitante, cela affecte l'ensemble de la chaîne trophique. L'acidogenèse est quant à elle moins sensible à l'accumulation d'AGV que l'hydrolyse (Siegert & Banks, 2005). Cependant, l'étape d'acidogenèse peut rendre l'ensemble du processus de dégradation auto-inhibiteur due à la production d'AGV. En effet, pour des raisons thermodynamiques, le propionate et le butyrate ne peuvent être dégradés que lorsque l'acétate et l'hydrogène ont été dégradés (Boone & Bryant, 1980). La consommation du propionate est fortement inhibée par l'acétate à 3,0 g/L (Gorris et al., 1989; Van Lier et al., 1993). Une accumulation d'AGV formés par la phase

d'acidogénèse peut alors se produire causant la défaillance de l'ensemble du processus. Les travaux de Borzacconi et al., en 1997, concluent que la phase de méthanogénèse est l'étape la plus touchée par une accumulation d'AGV (Borzacconi et al., 1997). Une accumulation d'AGV inhibe fortement la méthanogénèse, ce qui va entraîner une hausse d'acétate, et, par conséquent, une hausse d'autant plus élevée des autres AGV.

Cependant, les effets observés varient en fonction des types de substrats et de procédés utilisés. Les concentrations inhibitrices en AGV peuvent varier de 1 g/L à plusieurs dizaines de grammes par litre (Appels et al., 2008). Cette forte disparité est notamment liée aux grandes capacités d'adaptation des micro-organismes et à la spécificité de chacune des situations.

4.3 Schéma récapitulatif des inhibitions rencontrées dans les digesteurs anaérobies

Un schéma récapitulant l'ensemble des éléments introduits dans cette partie est présenté en Figure 7.

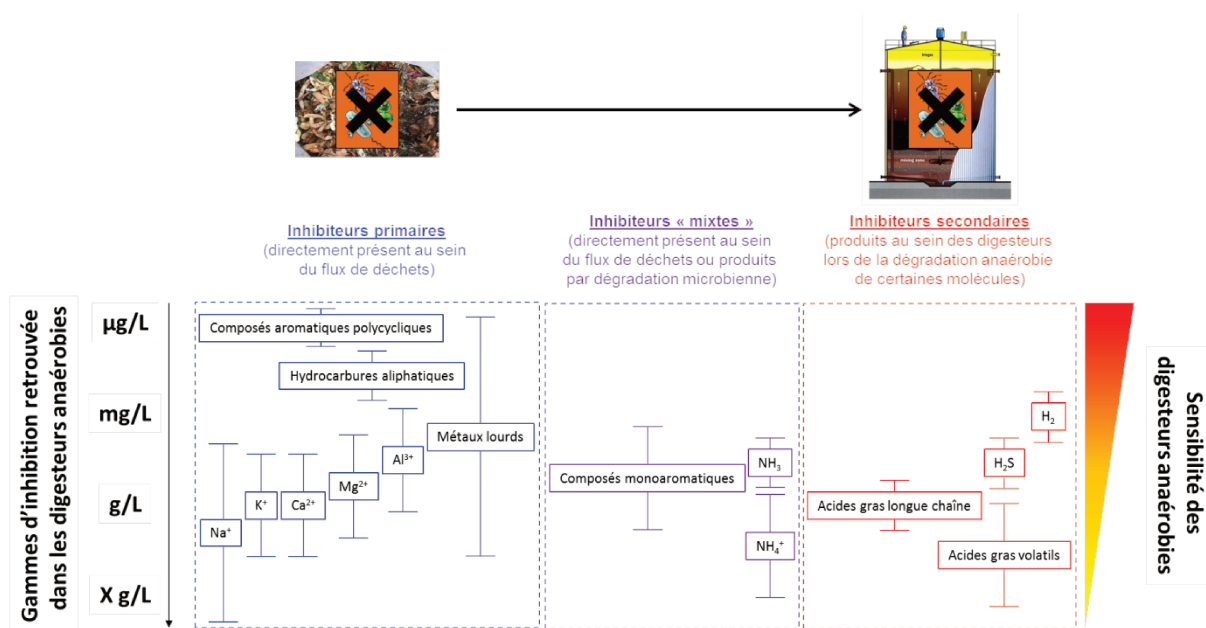


Figure 7 : Schéma récapitulatif des types et des seuils d'inhibitions rencontrées dans les digesteurs anaérobies

5 Les stratégies opératoires de lutte contre les inhibitions

Afin de lutter contre les nombreuses sources d'inhibitions susceptibles d'affecter les performances des digesteurs anaérobies, diverses stratégies opératoires ont été développées et mises en application à l'échelle industrielle. La plupart de ces stratégies visent à limiter la présence des inhibiteurs dans les réacteurs afin de réduire leurs effets sur les micro-organismes de la digestion anaérobie. Cependant, d'autres stratégies cherchent plutôt à favoriser la croissance ou l'acclimatation de la biomasse lors de l'arrivée de perturbateurs. Trois grandes classes de stratégies opératoires ont ainsi été distinguées lors de cette étude bibliographique. La première d'entre elles regroupe l'ensemble des techniques susceptibles d'optimiser l'alimentation d'un digesteur afin par exemple de réduire la présence d'inhibiteur. La seconde présente les divers additifs chimiques ou biologiques limitant l'impact des inhibiteurs sur la biomasse du digesteur. Enfin, la dernière classe rassemble les différents leviers opératoires susceptibles d'être activés lorsque qu'un digesteur est soumis à un épisode de perturbation.

5.1 Optimisation de l'alimentation

Différentes stratégies opératoires d'optimisation de l'alimentation peuvent être envisagées pour faire face à l'arrivée d'une perturbation. De nombreuses études se sont notamment penchées sur les prétraitements de déchets récalcitrants ou présentant un potentiel inhibiteur. Toutefois, si la présence de l'inhibiteur ne peut être évitée, différents modes d'alimentation peuvent être mis en œuvre afin de limiter son impact sur les performances du procédé. Enfin, des co-substrats peuvent également être ajoutés à l'alimentation pour faciliter la croissance de la biomasse.

5.1.1 Prétraitements du substrat

Une grande variété de prétraitements peuvent être appliqués aux déchets pour pallier les limites de la digestion anaérobie, notamment dans le cas de substrats difficilement biodégradables tels que les boues de station d'épuration, les déjections animales, les déchets solides, etc... Un des principaux objectifs des prétraitements consiste à accélérer voire remplacer l'étape d'hydrolyse, bien souvent limitante dans le cas de ces substrats. Il s'agit alors de rendre la matière plus facilement dégradable par le biais de traitements thermiques, thermochimiques, mécaniques, ou biologiques (Moletta, 2015). Différents phénomènes sont alors recherchés que ce soit l'hydrolyse physique ou chimique des composés récalcitrants, la solubilisation de la matière organique, la réduction de la taille des déchets permettant d'accroître l'accessibilité au substrat, ou encore l'hygiénisation. Mais le but des prétraitements peut aussi consister en l'élimination de composés inhibiteurs ou réfractaires à la méthanisation. Dans le cadre de cette étude bibliographique, seul cet aspect sera traité.

Dans le cas d'effluents d'élevage, de nombreuses études utilisent un procédé de stripping à l'air pour éliminer les excès d'azote ammoniacal (Bonmatí & Flotats, 2003; Zhang et al., 2012a). Par exemple, Bonmatí et Flotats (2003) ont utilisé ce procédé couplé à un chauffage à une température de 80°C et à un traitement alcalin sur du lisier porcin. Ces

derniers ont obtenu des rendements d'élimination de 90 % d'azote ammoniacal à un pH de 11.5. Certains déchets ont été irradiés par des micro-ondes afin de favoriser le relargage des nutriments tels que l'azote ammoniacal (Chan et al., 2013; Jin et al., 2009) ou la dégradation de micropolluants tels que les résidus hormonaux (Hamid & Eskicioglu, 2013). De même, l'ozone est utilisé comme prétraitement oxydatif pour retirer les composés pharmaceutiques des déchets (Carballa et al., 2007a); Beccari et al., (2001) ont quant à eux ajouté de la chaux (Ca(OH)_2) couplée à de la bentonite afin de séparer les lipides et les polyphénols présents dans les effluents de transformation des olives et potentiellement néfastes pour le fonctionnements de digesteurs anaérobies (Beccari et al., 2001). Les rendements d'élimination de ces deux types de composés étaient respectivement de 98 % et de 63 %.

Enfin, des prétraitements biologiques enzymatiques ou fongiques peuvent être appliqués pour favoriser la dégradation de molécules récalcitrantes. Par exemple, Domingues et al., (2015) ont utilisé avec succès des lipases pour dégrader les graisses contenues dans des effluents de laiterie (Domingues et al., 2015). De nombreuses études ont testé des prétraitements enzymatiques pour dégrader les composés lignocellulosiques (Čater et al., 2014). Des cultures fongiques telles que *Ceriporiopsis subvermispora* ou *Phanerochaete chrysosporium* sont également mises en œuvre pour dégrader respectivement la lignine et l'acide dehydroabiétique (Hodgson et al., 1998; Zhao et al., 2014). Enfin Cai et al., (2015) ont construit un consortium aérobie pour solubiliser la matière organique contenue dans un lisier porcin. Grâce à ce type de prétraitement, le temps de séjour au sein du digesteur anaérobie a été diminué de 50 % et la production de méthane a été augmentée de 45 % (Cai et al., 2015).

5.1.2 Acclimatation et profils de perturbation

Chaque population microbienne présente une capacité d'adaptation qui lui est propre et qui lui permet de résister à différents niveaux d'inhibition. Les épisodes de perturbation auxquels a pu être soumis une biomasse jouent donc un rôle prépondérant dans son aptitude à résister à certains inhibiteurs. C'est d'ailleurs pourquoi il est aujourd'hui très difficile de définir des niveaux d'inhibition standards, valables d'un digesteur à un autre. De nombreux auteurs ont essayé d'accroître le seuil de tolérance de biomasses issues de digesteurs anaérobies en les acclimatant plus ou moins progressivement à divers composés toxiques.

Angelidaki et Ahring (1993) ont montré qu'une adaptation progressive (de 1,5 à 6,0 g/L) était préférable à une augmentation brutale de la concentration en azote ammoniacal (Angelidaki & Ahring, 1993). De même, Gao et al., (2015) ont acclimaté un consortium anaérobie à un déchet riche en protéines de 2,0 à 4,5 g N-NH₄/L par palier de 0,5 g/L sans observer de baisse de performance (Gao et al., 2015). El Fantroussi et al., (1998) sont parvenus à adapter par palier de 0,01 g/L, un consortium anaérobie à différents composés phénoliques tels que le 2,4,6-trichlorophenol (TCP), le 1-naphthol et le 2-nitrophenol (2NP) (El Fantroussi et al., 1998). Cependant la dégradation de ces derniers n'a pu être corrélée à une augmentation de la production de méthane. D'autre part, d'après l'étude portant sur l'inhibition par l'acétate menée par Lins et al., (2012), le temps d'acclimatation influence grandement sur les capacités de résistance d'une biomasse méthanogène. Ainsi, plus les paliers

d'acclimatation sont longs, plus les performances de production de méthane sont améliorées lors de l'épisode de perturbation (Lins et al., 2012).

Plusieurs auteurs ont utilisé des systèmes batchs pour acclimater spontanément des biomasses par repiquages successifs. Feijoo et al., (1995) ont augmenté le seuil de tolérance au sodium d'une culture anaérobie de 17,0 à 24,0 g/L. Cette technique a également été utilisée par Wirth et al., (2015) pour adapter une biomasse méthanogène à des niveaux croissants de phénol. Une dégradation complète du phénol a pu être observée à partir d'un écosystème non acclimaté jusqu'à une concentration de 2,0 g/L (Wirth et al., 2015). De même, Abouelenien et al., (2009) ont montré qu'une biomasse dégradant des effluents avicoles pouvait rester fonctionnelle jusqu'à 14,0 g N-NH₄/kg grâce à des repiquages successifs (Abouelenien et al., 2009). Enfin, Rodriguez-Freire et al., (2015) ont observé qu'après une exposition prolongée (160 jours) à une concentration inhibitrice en arsenic (0.92 mM), la CI₅₀ pouvait être multipliée par 47 passant de 19 à 910 mM (Rodriguez-Freire et al., 2015). Selon Lefebvre et al., (2007), la capacité d'adaptation d'un inoculum dépendrait également de la complexité du substrat. Autrement dit, plus le substrat est simple à dégrader plus l'acclimatation de la biomasse à des concentrations élevées en inhibiteur sera facilitée (Lefebvre et al., 2007).

Toutes ces stratégies d'acclimatation de la biomasse montrent que l'écosystème de la digestion anaérobie présente une certaine plasticité ou élasticité fonctionnelle qui lui permet de s'adapter à différents types et niveaux d'inhibitions. Ces stratégies peuvent notamment être employées afin de construire des biomasses spécifiques pour l'inoculation de digesteurs. Cette stratégie est notamment proposée par Gonçalves et al., (2011) qui ont utilisé la biomasse préadaptée lors de l'étude menée par Cavaleiro et al., (2009) pour accélérer le démarrage d'un digesteur traitant des effluents riches en AGLC issus d'une usine de production d'huile d'olive (Cavaleiro et al., 2009; Gonçalves et al., 2011). Afin de conserver et d'entretenir cette plasticité, certains auteurs ont également proposé de perturber régulièrement l'alimentation de digesteurs avec des composés inhibiteurs (Benjamin et al., 1984). Par ailleurs, de Vrieze et al., (2013) ont observé qu'un digesteur subissant des variations de fréquence d'alimentation présentait une résistance accrue aux surcharges organiques (De Vrieze et al., 2013). De même, Gonçalves et al., (2012) ont montré que des interruptions dans l'alimentation d'un réacteur continu permettaient d'obtenir une meilleure dégradation de certains composés phénoliques (+20 %) et de AGLC (notamment oléate et palmitate) (Gonçalves et al., 2012). C'est pourquoi, selon ces auteurs, il serait préférable d'habituer les digesteurs à des variations d'alimentation (changements de substrats, variations de la fréquence d'alimentation, etc...) afin de conserver une certaine élasticité fonctionnelle.

5.1.3 Les co-substrats

La co-digestion anaérobie d'un mélange de deux ou plusieurs substrats avec des caractéristiques complémentaires, permet d'équilibrer les apports nutritifs (notamment le ratio C/N) de sorte qu'il y ait une augmentation de la production de biogaz par leur traitement conjoint. Cependant des co-substrats peuvent aussi être utilisés afin de limiter l'effet inhibiteur de certains effluents en permettant à la biomasse de disposer d'un substrat simple et non toxique facilitant ainsi sa croissance. Par exemple, le méthanol a été ajouté pour favoriser la digestibilité d'un effluent issu de l'industrie pétrochimique dans un réacteur UASB. Ce co-

substrat a permis de réduire la toxicité de l'effluent et d'augmenter le rendement de dégradation des composés phénoliques inhibiteurs (Wang et al., 2010). De même, Poggi-Varaldo et al., (2012) ont ajouté du saccharose pour traiter un effluent fortement inhibiteur contenant notamment du phénol et du 2,4,6-trichlorophnéol (Poggi-Varaldo et al., 2012). Kuang et al., (2006) ont également montré que l'ajout d'un co-substrat simple tel que le glucose ou la cystéine permettait à des digesteurs anaérobies de surmonter une inhibition à l'oléate et favorisait même la reprise de sa dégradation (Kuang et al., 2006). De même, différents mélanges de déchets ont été testés afin de limiter l'impact des AGLC (Astals et al., 2014). A l'issue de cette étude, l'addition de co-substrat n'augmentait pas le potentiel méthanogène ultime du déchet, mais permettait de limiter l'inhibition par un effet de dilution des composés inhibiteurs.

5.2 Utilisation d'additifs

Outre les stratégies portant sur l'alimentation des digesteurs, de nombreux additifs peuvent également être introduits au sein même du milieu réactionnel. Ces derniers peuvent être de nature chimique, biologique, ou minérale. Leurs mécanismes d'action sont variés. Ils peuvent aussi bien être dirigés contre les inhibiteurs en limitant leur concentration et/ou leur effet toxique, ou favoriser la croissance ou l'organisation spatiale de la biomasse.

5.2.1 Les additifs chimiques

Une grande variété d'additifs chimiques ont été utilisés au sein des filières de méthanisation (Romero-Güiza et al., 2016). Certains ions ou métaux lourds présentent notamment des effets antagonistes lorsqu'ils sont présents au sein du même digesteur. C'est le cas par exemple du nickel qui limite les inhibitions liées au cadmium, au cuivre ou au zinc. Il en est de même pour le sodium et le magnésium vis-à-vis du potassium (Chen et al., 2008). D'autres ions tels que les sulfures peuvent également être utilisés pour contrer l'action néfaste des métaux lourds (Zayed & Winter, 2000). De même, d'autres études ont tiré profit des interactions chimiques entre le magnésium et l'azote ammoniacal afin de forcer la précipitation de l'azote et du phosphore sous forme de struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Cette stratégie opératoire consistant à ajouter du magnésium (MgCl_2 ou $\text{Mg}(\text{OH})_2$) permet à la fois de réduire l'inhibition liée à l'azote ammoniacal, tout en permettant de récupérer facilement ces nutriments sous forme de cristaux solides afin de les valoriser comme d'engrais (Celen & Turker, 2001; Uludag-Demirer et al., 2005; Yilmazel & Demirer, 2013; Yilmazel & Demirer, 2011).

Parmi les stratégies utilisant des additifs dans le but de diminuer la concentration en inhibiteurs, on peut aussi citer le procédé de stripping qui consiste à faire circuler un gaz (air, biogaz...) dans la phase liquide ou solide des bioréacteurs afin de favoriser par exemple le transfert de l'ammoniac vers la phase gazeuse (Lei et al., 2007; Walker et al., 2011). Cette technique peut également être utilisée pour réduire l'inhibition par les sulfures (Sun et al., 2014). Cependant, la composition du biogaz, et notamment une trop forte teneur en CO_2 est susceptible d'avoir une influence négative sur les performances d'un tel procédé (Bousek et al., 2016).

D'autres additifs chimiques tels que le fer (Fe^{3+}) permettraient de favoriser la digestion anaérobie de déchets riches en composés soufrés (Liu et al., 2015). Il a notamment été montré que l'addition de fer zéro valent pouvait améliorer la dégradation de déchets contenant de fortes teneurs en protéines en accélérant les étapes d'hydrolyse tout en limitant la production de propionate (Feng et al., 2014; Zhang et al., 2015). Des études se sont également portées sur l'addition de solutions nutritives de macro (Phosphore, Azote, Soufre) et/ou de micronutriments (Nickel, Cobalt, Fer, Sélénium, etc..) afin de placer la biomasse dans des conditions optimales pour lutter contre les inhibitions (Romero-Güiza et al., 2016).

D'autre part, il a été montré que l'ajout de calcium ou de magnésium pouvait faciliter l'agrégation de la biomasse sous forme de floes en stimulant la production d'exopolysaccharides (Kleyböcker et al., 2012; Li et al., 2009). Le calcium a notamment été utilisé à faible concentration pour favoriser la rétention de la biomasse dans des digesteurs anaérobies (Ahn et al., 2006). Selon Liu et al., (2010), le magnésium augmenterait la diversité microbienne au sein des floes alors que le calcium influencerait plutôt les propriétés physiques des agrégats grâce à une neutralisation des charges membranaires (Liu et al., 2010). Cependant Ye et al., (2016) ont récemment observé que l'ajout de 0,15 g/L de calcium (Ca^{2+}) engendrait des shifts de populations et notamment l'apparition de Rhodobacteraceae et de Flavobacteria (Ye et al., 2016). Toujours d'après leur étude, l'addition de calcium augmenterait le seuil de résistance de l'écosystème à l'arrivée d'inhibiteurs. Enfin, des polymères synthétiques ou naturels tels que le chitosan ont été utilisés pour favoriser la granulation de la biomasse et améliorer le démarrage de réacteurs traitant des effluents difficilement dégradables (El-Mamouni et al., 1998; Kaseamchochoung et al., 2006; Show et al., 2004).

5.2.2 Les additifs biologiques : le cas de la bioaugmentation

Afin de contrer l'effet inhibiteur de certaines molécules, ou d'augmenter les performances de digesteurs anaérobies confrontés à l'arrivée de perturbateurs ou de substrats récalcitrants, de nombreuses études ont cherché à ajouter une biomasse exogène spécialisée et/ou plus robuste. On parle alors de bioaugmentation. Des enzymes ont également été introduits directement au sein de digesteurs anaérobies dans le but de dégrader des substrats complexes (lignocellulosiques, lipidiques...) susceptibles d'engendrer des phénomènes d'inhibition (Merlin Christy et al., 2014). Il s'agit principalement de lipases, de protéases ou de cellulases facilitant les étapes d'hydrolyse et d'acidogenèse (Bochmann et al., 2007; Yang et al., 2010). Néanmoins, parmi les études recensées, peu d'entre elle ont abouti à une amélioration significative de la production de méthane (Diak et al., 2012; Romano et al., 2009). Les prochains paragraphes se sont donc focalisés sur la bioaugmentation et ses différents objectifs.

5.2.2.1 Pour limiter l'inhibition liée à l'azote ammoniacal

Selon plusieurs auteurs, la présence de fortes concentrations en azote ammoniacal au sein de digesteurs anaérobies favoriserait la mise en place d'une relation syntrophique entre des archées méthanogènes hydrogénotrophes telles que Methanoculleus et des bactéries réalisant l'oxydation de l'acétate (Syntrophic Acetate Oxydation Bacteria ou SAOB)

(Schnürer & Nordberg, 2008). C'est pourquoi des études ont tenté d'inoculer des co-cultures de SAOB dans le but de stabiliser les performances de digesteurs soumis à une augmentation progressive de la concentration en azote ammoniacal. Notamment, Westerholm et al., (2012) ont bioaugmenté un réacteur anaérobie à l'aide d'une co-culture comprenant trois souches réalisant la SAO (*Clostridium ultunense*, *Syntrophaceticus schinkii* et *Tepidanaerobacter acetatoxydans*) ainsi qu'une souche méthanogène hydrogénotrophe (*Methanoculleus* sp. strain MAB1). Cependant, les souches utilisées dans cette co-culture ne sont pas parvenues à s'implanter dans le digesteur anaérobie. Fotidis et al., (2013) ont quant à eux utilisé une co-culture mêlant une SAOB (*Clostridium ultunense*) et un partenaire hydrogénotrophe (*Methanoculleus bourgensis*) afin de bioaugmenter un réacteur traitant des déchets riches en azote (3 g N-NH₄/L). Ces derniers ont obtenu une augmentation de 42 % de la production de méthane (Fotidis et al., 2013). Lors d'une seconde étude, une amélioration de 31,3 % de la production de méthane a également été constatée suite à l'inoculation d'une culture pure de *Methanoculleus bourgensis* dans un digesteur soumis à une concentration en azote ammoniacal de 5 g/L (Fotidis et al., 2014b).

5.2.2.2 Pour favoriser la dégradation de micropolluants et de substrats récalcitrants

De nombreuses études ont montré que l'inoculation d'une culture préadaptée à un substrat récalcitrant tel que la cellulose pouvait améliorer les performances de dégradation. Ainsi, Angelidaki et Ahring (2000) sont parvenus à augmenter de 30 % le rendement de production de méthane d'un digesteur dégradant du fumier bovin contenant des fibres cellulosiques en utilisant une culture cellulolytique (Angelidaki and Ahring, 2000). Une autre étude s'est attachée à employer une culture cellulolytique constituée majoritairement de micro-organismes appartenant au genre *Clostridium* afin de faciliter la dégradation de résidus de culture de maïs. La production de méthane a été augmentée de plus de 56% (Martin-Ryals et al., 2015). Cependant, l'implantation d'inocula exogènes au sein d'un écosystème n'est pas toujours aisée. Notamment, dans l'étude menée par Chapleur et al (2014), l'inoculum cellulolytique issu d'un rumen de bovin n'est pas parvenu à s'implanter au sein de l'écosystème (Chapleur et al., 2014).

L'utilisation de souches exogènes pourrait améliorer les capacités de dégradation de certains micropolluants tels que les composés phénoliques (Guiot et al., 2002; Hajji et al., 2000), le tetrachloroéthylène (Hörber et al., 1998) ou le 3-chlorobenzoate (Ahring et al., 1992). De même, Cirne et al., (2006) ont augmenté les rendements de production de méthane de digesteurs traitant des déchets lipidiques grâce à l'ajout d'une culture pure lipolytique : *Clostridium lundense* (Cirne et al., 2006). Nielsen et al., (2007) ont quant à eux utilisé différentes souches pures qui ont permis d'améliorer le rendement de production de méthane à partir de fumier bovin de 10 à 24 % (Nielsen et al., 2007). Enfin, l'ajout d'une biomasse issue de compost a divisé le temps de séjour d'hydraulique de réacteurs continus traitant des résidus de culture de betterave fourragère par quatre (Neumann & Scherer, 2011).

5.2.2.3 Pour faciliter la remise en route de digesteurs

Des inocula complexes ont été utilisés afin de réduire le temps de récupération de digesteurs anaérobies préalablement inhibés. Ainsi, après avoir subi un épisode de surcharge organique ayant mené à une forte dégradation des performances du digesteur, Tale et al., (2015) sont parvenus à réduire ce temps de latence de près de 100 jours grâce à une bioaugmentation (Tale et al., 2015). Celle-ci a été réalisée à l'aide d'une culture mixte partiellement aérée, enrichie en propionate et provenant d'un digesteur mésophile traitant des effluents de brasserie. De même, dans leur étude, Schauer-Gimenez et al., (2010) ont soumis un digesteur anaérobie à un stress oxydatif avant d'y introduire un inoculum constitué d'une culture anaérobie préalablement exposée à l'oxygène. Celle-ci se composait principalement de communautés hydrogénotrophes telles que *Methanoculleus* et *Methanospirillum*. Cette bioaugmentation a permis de réduire la période de récupération et d'augmenter les performances du digesteur (Schauer-Gimenez et al., 2010). Enfin, Town et al., (2016) ont utilisé avec succès une culture acétoclaste pour redémarrer un digesteur anaérobie ayant subi une surcharge organique (Town & Dumonceaux, 2016).

5.2.3 Les supports d'immobilisation de la biomasse

D'autres types d'additifs ont également été introduits au sein de digesteurs anaérobies dans le but d'immobiliser la biomasse sous forme de biofilm. L'aptitude des micro-organismes à se fixer naturellement sur un support a été utilisée pour éviter leur lessivage et accroître la quantité de biomasse active à l'intérieur des réacteurs. Ces supports peuvent être minéraux ou organiques, fixes ou mobiles. Dans le cadre de cette étude bibliographique, on s'intéressera principalement à deux supports (les zéolithes et le charbon actif) mis en œuvre dans des réacteurs à supports mobiles appelés « réacteurs à lit fluidisé ou turbulé » de dernière génération. Ces supports se caractérisent par une surface spécifique importante qui leur permet d'immobiliser au mieux la biomasse active et d'augmenter les performances de digestion anaérobie. Par ailleurs, leurs propriétés surfaciques leur permettent d'adsorber certains polluants organiques ou de réaliser des échanges cationiques et de limiter ainsi la présence d'inhibiteurs dans le milieu réactionnel.

5.2.3.1 Les zéolithes

Les zéolithes sont des aluminosilicates hydratés formés à partir de cendres ou de roches volcaniques et utilisés dans de nombreuses applications industrielles de dépollution (déchets radioactifs, effluents contenant des métaux lourds, etc...) grâce à leur capacité d'échange cationique (Rhodes, 2010). Il existe plusieurs dizaines de zéolithes naturelles découvertes à l'heure actuelle. Des centaines de zéolithes peuvent également être synthétisées chimiquement à partir de silice et d'alumine. Leur structure est un arrangement de tétraèdres de SiO_4 et d' AlO_4 reliés entre eux par les atomes d'oxygène. Dans le cadre de la digestion anaérobie, ces minéraux microporeux sont utilisés à la fois pour servir de support à la biomasse, ainsi que pour limiter l'impact de certains polluants tels que l'azote ammoniacal grâce à des propriétés d'échange cationique (Montalvo et al., 2012; Tada et al., 2005). Les zéolithes sont également reconnues pour réduire l'effet inhibiteur des AGLC (Nordell et al., 2013).

Des réacteurs à lit fluidisé contenant une zéolithe naturelle ont notamment été mis en œuvre pour traiter des effluents de distillerie riches en azote ammoniacal et en sulfates afin d'augmenter le rendement de production de méthane (Fernández et al., 2001; Fernández et al., 2008). D'autres auteurs ont utilisé des zéolithes naturelles pour favoriser le démarrage de réacteurs UASB confrontés à de fortes concentrations en nitrates (Montalvo et al., 2014). De même, de nombreuses études se sont attachées à mettre en œuvre différents types de zéolithes pour traiter des effluents agricoles riches en azote ammoniacal tels que le lisier porcin ou le fumier avicole (Fotidis et al., 2014a; Ho & Ho, 2012; Huiliñir et al., 2014; Lin et al., 2013). Afin d'optimiser l'utilisation de zéolithes au sein de digesteurs anaérobies plusieurs auteurs ont cherché à définir une concentration et une granulométrie optimales. Plusieurs études ont proposé des concentrations en zéolithes allant de quelques grammes à plusieurs dizaines de grammes par litre (Fotidis et al., 2014a; Huiliñir et al., 2014; Kotsopoulos et al., 2008). Yu et al., (2015) ont notamment disposé des sachets en nylon contenant différentes concentrations de zéolithe de synthèse dans des digesteurs batchs mésophiles afin de limiter l'inhibition par l'azote ammoniacal contenu dans les effluents porcins. Les meilleures performances en termes de production de méthane ont été obtenues avec une concentration en zéolithe de 10,0 g/L. Il a en outre été montré au cours de cette étude, que l'azote ammoniacal pouvait ensuite être désorbé et récupéré après traitement par l'ajout de Na_2SO_4 (Yu et al., 2015). Une étude similaire proposant une concentration optimale en zéolithe naturelle de 1,0 g/L a été menée par Montalvo et al., (2006). Ces derniers ont indiqué que les meilleures performances de dégradation étaient obtenues avec une granulométrie comprise entre 0,5 et 1 mm (Montalvo et al., 2006). Toutefois, Milán et al., (2001) ont observé un effet inhibiteur provoqué par l'addition d'une zéolithe naturelle au-delà de 6,0 g/L (Milán et al., 2001).

Des observations par microscopie ont été menées sur des réacteurs contenant de la zéolithe afin d'étudier la colonisation microbienne sur ce type de support. Fernandez et al., (2007) ont notamment observé que les principales méthanogènes immobilisées sur les zéolithes employées lors de leur étude appartenaient au genre *Methanosaeta* et à l'ordre *Methanosarcinaceae* (Fernández et al., 2007). Weiss et al., (2013) ont quant à eux utilisé un microscope à balayage électronique pour étudier la composition du biofilm développé sur une zéolithe naturelle dopée en éléments traces (Fe, Ni, Co, Mo). Les principaux micro-organismes isolés étaient affiliés aux genres *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Methanoculleus*. Enfin, Montalvo et al., (2014) ont indiqué que la présence de zéolithe engendrait une augmentation de la diversité de la communauté microbienne au sein d'un réacteur UASB (Montalvo et al., 2014). Toutes les études citées précédemment s'accordent à dire que la présence de zéolithe est susceptible d'orienter la composition de l'écosystème de la digestion anaérobie et d'améliorer son rendement, notamment lors de l'arrivée d'inhibiteur tel que l'azote ammoniacal.

5.2.3.2 Le charbon actif

Le charbon actif est un matériau constitué essentiellement de carbone. Il est produit industriellement à partir de toute matière organique riche en carbone par calcination à forte température. L'activation du charbon ainsi produit peut être ensuite réalisée chimiquement ou physiquement. Celle-ci consiste à créer des millions d'alvéoles qui vont augmenter sa surface spécifique et donc son pouvoir adsorbant en éliminant les impuretés obstruant ses pores. Ce type de matériau est déjà couramment utilisé dans les usines de production d'eau potable et dans certains procédés de traitement de l'air.

Le charbon actif peut également être introduit au sein de réacteurs anaérobies pour servir de support à la biomasse active. Ses propriétés surfaciques peuvent être mises à profit lors du traitement d'effluents contenant certains micropolluants organiques tels que les composés phénoliques (Kindzierski et al., 1992; Loh & Wang, 2006; Moteleb et al., 2001). En outre, Ng et al., (1988) ont montré que l'ajout de charbon actif en grain (CAG) pouvait éliminer l'effet inhibiteur de différentes molécules toxiques telles que le phénol, le nitrobenzène ou certains chlorophénols (2-4 dichlorophénol, 2 chlorophénol). L'ajout de CAG a permis de multiplier par trois le volume de biogaz finalement produit en présence de 0,3 g/L de 2-4 dichlorophénol (Ng et al., 1988). Le charbon actif est également utilisé pour favoriser la dégradation d'effluents récalcitrants tels que les vinasses issues de distillerie (Fernández et al., 2001) ou encore d'unités de production d'huile d'olive (Bertin et al., 2004a). Bertin et al., (2004) ont obtenu une augmentation de 60 % du rendement de production en biogaz provenant d'un réacteur à lit fluidisé grâce à la présence de charbon actif. De même, Carbajo et al., (2010) sont parvenus à dégrader 95 % des 3,34 g phénol/L/jour introduits dans un digesteur anaérobie continu contenant un lit de charbon actif. Certains auteurs ont utilisé du charbon non activé issu de la combustion de cèdre pour augmenter les performances de digesteurs anaérobies. Une augmentation significative de 60% de la production de méthane a ainsi été observée suite à l'ajout de ce support (Watanabe et al., 2013). Par ailleurs, selon Angelidaki et al., (1995) l'ajout de charbon actif permettrait de favoriser l'adsorption d'AGLC et de limiter leur effet inhibiteur sur l'écosystème (Angelidaki & Ahring, 1995). Enfin, Hansen et al., (1999) ont indiqué que la présence de charbon actif favorisait la production de méthane lors de la digestion thermophile en réacteurs batchs de lisier porcin contenant une forte teneur en azote ammoniacal (Hansen et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenus sur des réacteurs semi-continus traitant des effluents bovins (Kumar et al., 1987)

Des études ont cherché à étudier l'impact de l'ajout de charbon actif sur la composition de l'écosystème microbien de la digestion anaérobie. Watanabe et al., (2013) a révélé que le charbon modifiait sensiblement la distribution des populations et notamment des archées méthanogènes en augmentant la proportion d'hydrogénotrophes (Watanabe et al., 2013). De même, Chen et al., (2009) ont voulu caractériser les populations actives présentes au sein d'un réacteur à lit de charbon actif traitant des effluents phénoliques (Chen et al., 2009). Ils ont ainsi principalement identifié deux familles adsorbées sur le charbon actif au sein de ce réacteur : Methanosaetaceae et Syntrophorhabdaceae. De plus, de nombreuses études récemment publiées s'accordent à dire que la présence de matériaux conducteurs tels que le charbon (activé ou non), pourrait favoriser les transferts directs d'électrons entre micro-

organismes ce qui aurait pour conséquence de stimuler leur métabolisme et d'augmenter les performances de digestion anaérobie (Chen et al., 2014b; Liu et al., 2012). Dans ce contexte, l'ajout de charbon actif pourrait donc être utilisé au sein de digesteur pour orienter la composition de l'écosystème et favoriser les interactions entre espèces notamment lors d'épisodes de perturbation.

5.3 Utilisation des paramètres opératoires

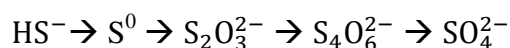
Plusieurs leviers opératoires peuvent être actionnés lors de l'arrivée d'un perturbateur au sein d'un digesteur anaérobie. Par exemple, la température et le pH sont facilement modifiables. Des systèmes de micro-aération peuvent également être mis en œuvre si le digesteur dispose d'un système de recirculation de biogaz. D'autre part, différents modules tels que des cellules de dessalement ou des membranes ont été utilisés avec succès pour limiter l'impact d'inhibiteurs sur le fonctionnement de la digestion anaérobie (Lauterbock et al., 2012; Zhang & Angelidaki, 2015). De même, la conception du réacteur peut jouer un rôle clé dans la résistance de l'écosystème aux inhibiteurs en évitant notamment leur lessivage. Enfin, différents modes d'agitation peuvent influencer sur les performances de la digestion anaérobie mais aucune étude n'a encore prouvé leur influence lors de la présence de perturbateur (Lindmark et al., 2014). Cette partie s'est donc axée sur les principaux paramètres susceptibles d'être aisément modulés lors d'une phase de fonctionnement d'un digesteur à savoir l'aération, le pH et la température.

5.3.1 La micro-aération

L'injection d'air ou d'oxygène au sein de digesteurs anaérobies et de centres d'enfouissement techniques produisant du biogaz a été principalement utilisée afin de favoriser l'implantation de populations aérobies ou anaérobies facultatives capables de d'oxyder certains inhibiteurs sans affecter la croissance des archées méthanogènes. Outre son effet biologique, la micro-aération permet de solubiliser une partie de la matière organique ce qui facilite l'étape d'hydrolyse et améliore les performances globales du processus de digestion anaérobie (Diak et al., 2013; Zhu et al., 2009). Certaines études ont également montré qu'elle pouvait augmenter la qualité du digestat (Jenicek et al., 2010).

5.3.1.1 Intérêt pour la désulfuration

La micro-aération (ou micro-oxydation) est couramment utilisée dans les digesteurs anaérobies traitant des effluents soufrés (Krayzelova et al., 2015). Elle consiste en l'injection d'une faible quantité d'air ou d'oxygène (< 1 L d'O₂/L d'alimentation) directement au sein de la phase liquide, ou au niveau du ciel gazeux. L'objectif est de favoriser l'oxydation biologiques des ions sulfures ou hydrogénosulfures (HS⁻) en soufre élémentaire (S⁰) et en sulfates (SO₄²⁻). L'oxygène devient alors l'accepteur final d'électron selon la chaîne réactionnelle suivante:



Diaz et al., (2011) ont ainsi observé une réduction de 98 % du sulfure d'hydrogène présent dans le ciel gazeux d'un digesteur de 200 L grâce à la mise en place d'une micro-aération débitant 0,25 L d'oxygène par litre d'alimentation (Diaz et al., 2011). Chávez-Fuentes et al., (2015) ont observé une réduction de 51 % de l'inhibition causée par le sulfure d'hydrogène grâce à une micro-aération régulée par la mesure en continu du potentiel Redox et dont la valeur maximale a été fixée à 25,0 mV (Chavez-Fuentes et al., 2015). Cette technique vise donc à favoriser la croissance de bactéries capables d'oxyder les sulfures (Sulfide-oxidizing bacteria ou SOB). La plupart des SOB retrouvées dans les digesteurs anaérobies appartiennent au phylum Proteobacteria et exceptionnellement au phylum Actinobacteria. Les espèces retrouvées régulièrement dans la littérature sont *Halothiobacillus* sp., *Acidithiobacillus* sp., et *Sulfuricurvum* sp (Krayzelova et al., 2015). Ces bactéries ont été majoritairement retrouvées à l'interface liquide-gaz ce qui tend à indiquer que l'oxydation des sulfures se déroule principalement dans cette zone. Par ailleurs, certaines études ont montré que la micro aération engendrait un shift de populations méthanogènes. En effet Tang et al., (2004) ont observé une augmentation dans la proportion de *Methanoculleus* au détriment de *Methanosarcina* (Tang et al., 2004). En revanche, Ramos et al., (2014) n'ont pas décrit de changement notable de population chez les archées suite à la mise en place d'une micro-aération (Ramos et al., 2014). Jenicek et al., (2011) ont quant à eux indiqué que la présence d'oxygène n'affectait pas la croissance des micro-organismes anaérobies stricts tant que ce dernier était consommé suffisamment rapidement par les bactéries anaérobies facultatives (Jenicek et al., 2010).

5.3.1.2 Nitrification

Afin de limiter la présence d'azote ammoniacal et empêcher ainsi les phénomènes d'inhibition associés, des systèmes d'aération séquentiels ont été mis en œuvre afin de stimuler la croissance de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes au sein de centres de stockage de déchets (He & Shen, 2006), mais également au sein de certains digesteurs traitant des effluents industriels (Li et al., 2008).

En présence d'oxygène, les bactéries nitrifiantes telles que *Nitrosomonas* oxydent les ions NH_4^+ en nitrites qui sont à leur tour oxydés en nitrates par d'autres populations bactériennes telles que *Nitrobacter*. L'objectif est donc d'éliminer l'azote ammoniacal grâce à l'implantation de populations nitrifiantes tout en évitant d'altérer les performances de la digestion anaérobie. He et al., (2006) sont parvenus à diminuer la concentration en azote ammoniacal d'un massif de déchet reconstitué de plus de 80% grâce à la mise en œuvre d'une aération intermittente. De même, Li et al., (2008) ont obtenu une réduction de 96% de l'azote total lors de la digestion anaérobie de déchets d'abattoirs au sein d'un réacteur discontinu séquentiel (SBR). Enfin Shao et al., (2008) ont obtenu des performances de dénitrification comprises entre 75 et 99% (Shao et al., 2008).

Cependant, des phénomènes de compétition pour l'accepteur d'électron ont été constatés lors de la recirculation de lixiviat nitrifié. En présence d' H_2S , des réactions de réduction des nitrates en ammonium ont été notamment observés par plusieurs études (Mazéas et al., 2008; Vigneron et al., 2007).

5.3.2 La température

La température joue, au même titre que le pH, un rôle clé sur le fonctionnement de la digestion anaérobie. Celle-ci affecte les équilibres acido-basiques et peut ainsi modifier le degré d'inhibition de certains polluants tels que l'azote ammoniacal. Des modifications incontrôlées de ce paramètre peuvent néanmoins affecter négativement l'activité des micro-organismes. Toutefois, la température, peut également être considérée comme un levier opératoire d'optimisation des processus microbiens, notamment lors de l'arrivée de composés inhibiteurs.

Dans le cas de l'azote ammoniacal, plusieurs études ont cherché à optimiser la température des digesteurs pour limiter l'impact de ce perturbateur sur leurs performances (Angelidaki & Ahring, 1994; Chae et al., 2008; Hejnfelt & Angelidaki, 2009). Une augmentation de la température entraîne une augmentation de la concentration de la forme toxique de l'azote ammoniacal à savoir l'ammoniac. Massé et al., (2010) ont utilisé un digesteur anaérobie psychrophile pour traiter du lisier porcin et diminuer ainsi la concentration en ammoniac de l'effluent (Masse et al., 2010). Hejnfelt et Angelidaki (2009) ont observé qu'une diminution de la température de 55°C à 37°C améliorerait sensiblement la production de biogaz lors de la digestion de déchets d'abattoirs. Cette différence de performance a principalement été attribuée à une diminution de la concentration en ammoniac. Garcia et al., (2009) ont toutefois observé que l'effet bénéfique d'une augmentation de la température de 25°C à 35°C d'un digesteur anaérobie était supérieur à l'inhibition causée par l'augmentation associée de la concentration en ammoniac de 100 à 250 mg/L (Garcia & Angenent, 2009). Cependant, les auteurs ont précisé qu'une élévation de la température ne pouvait être envisagée sur des digesteurs mésophiles fonctionnant déjà aux alentours de 35°C pour limiter l'inhibition liée à l'azote ammoniacal. Enfin, Wange et al., (2014) ont indiqué qu'une augmentation de la température sur un digesteur mésophile en présence d'une concentration inhibitrice en azote ammoniacal devait être accompagnée d'un ajout de substrat carboné afin de conserver un ratio C/N adéquat pour le bon fonctionnement de la digestion anaérobie (Wang et al., 2014).

Des chocs de température ont par ailleurs été appliqués à des digesteurs anaérobies mésophiles traitant des effluents soufrés (Omil et al., 1997; Visser et al., 1993). Cependant, il a constamment été montré que l'inhibition liée à la présence des BSR ne pouvait être éliminée grâce à ces modifications de températures, du fait principalement de leur capacité d'adaptation, et de leur temps de doublement plus courts que les méthanogènes. Toutefois, une étude menée par Pender et al., (2004) a montré qu'une élévation de température de 37°C à 55°C pouvait diminuer l'activité des BSR au profit des méthanogènes (Pender et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés par une analyse quantitative de la communauté microbienne qui indiquait une diminution de la proportion en BSR pour des températures supérieures à 45°C (Moestedt et al., 2013).

Outre son influence sur les inhibiteurs, la température peut être utilisée pour augmenter les performances de digesteurs anaérobies. En effet, Luo et al., (2015) ont perturbé différemment (à 25°C, 45°C et 55°C) trois réacteurs mésophiles fonctionnant normalement à 35°C. Ils se sont aperçus qu'à l'issue de chacune de ces perturbations, les performances des trois réacteurs ont toutes été améliorées de 10 % (Luo et al., 2015).

5.3.3 Le pH

De nombreux inhibiteurs tels que l'azote ammoniacal ou les sulfures présentent différents niveaux de toxicité envers l'écosystème de la digestion anaérobie selon la forme dans laquelle ils se présentent au sein du milieu réactionnel. Celle-ci dépend principalement du pH et de la température. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré qu'il était possible de limiter l'effet perturbateur de ces composés en régulant judicieusement le pH en fonction du type d'inhibiteur présent. En outre, ces modifications induisent des réorganisations importantes au sein de la composition de la communauté microbienne des digesteurs anaérobies.

Ainsi, Strik et al., (2006) ont cherché à limiter la présence d'ammoniac le digesteur, et dans le biogaz produit. Cependant, la diminution de pH à des valeurs inférieures à 6,5 a induit une forte inhibition du processus de digestion anaérobie, supérieure à celle engendrée par l'azote ammoniacal (Strik et al., 2006). En revanche, Ho et al., (2012) sont parvenus à multiplier la production de méthane de digesteurs batchs par 2,4 en diminuant le pH de 8,3 à 6,5 à l'aide d'acide chlorhydrique (Ho & Ho, 2012). D'autres études ont obtenu des améliorations de performance de la digestion anaérobie en utilisant cette méthode (Bhattacharya & Parkin, 1989; Boardman & McVeigh, 1997; Braun et al., 1981; Kroeker et al., 1979). Des traitements alcalins ont notamment été testés avec succès dans des réacteurs batchs pour favoriser la dégradation de substrats récalcitrants contenant notamment des composés lignocellulosiques (Liew et al., 2011; Mao et al., 2015).

5.4 Récapitulatif des stratégies de lutte contre les inhibitions des digesteurs anaérobies

Un schéma récapitulatif l'ensemble des éléments introduits dans cette partie est présenté en Figure 8.

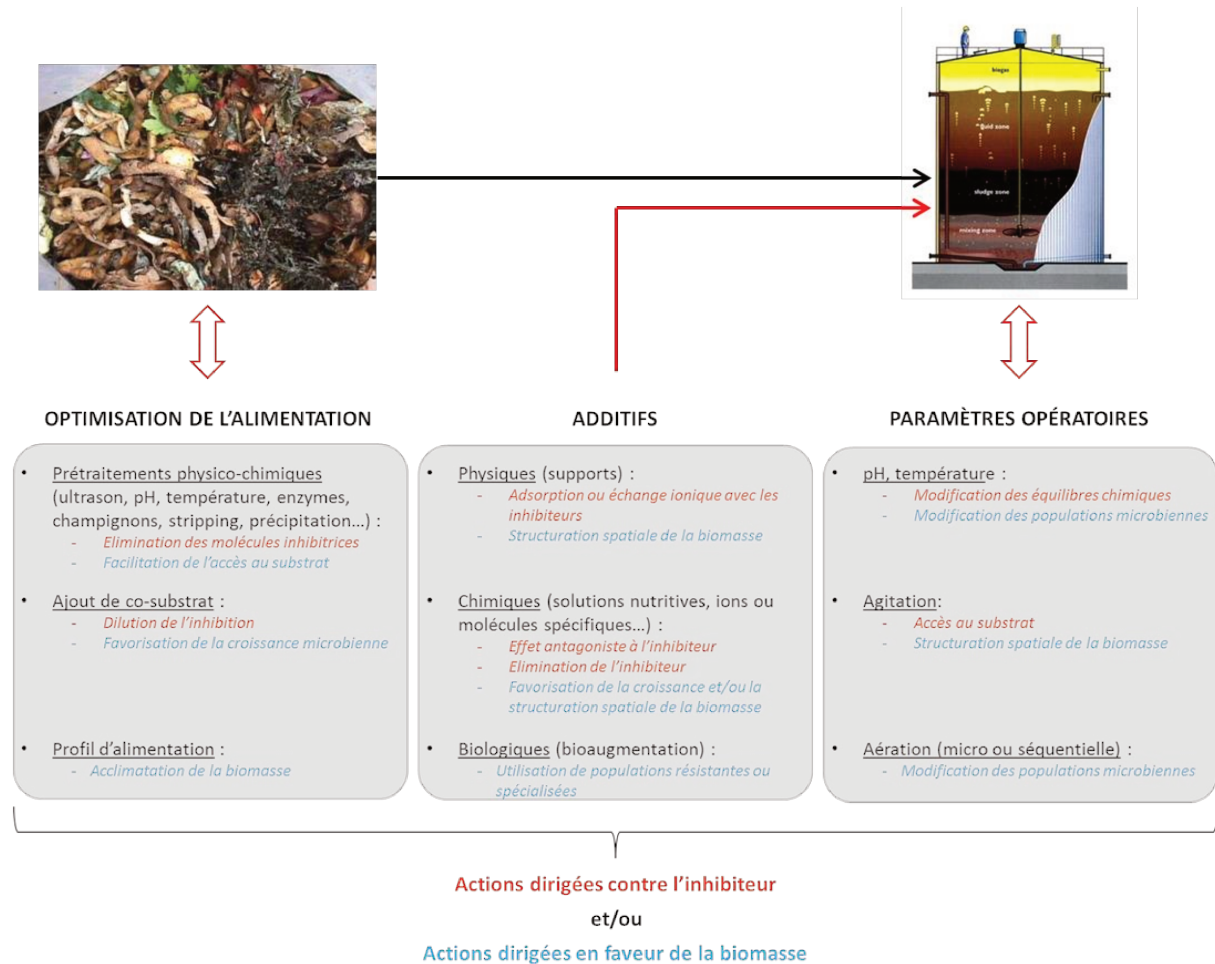


Figure 8 : Schéma récapitulatif des différentes stratégies opératoires de lutte contre les inhibitions des digesteurs anaérobies

6 Comment tendre vers un management écologique des bioprocédés ?

La digestion anaérobie est un bioprocédé dont l'optimisation des paramètres opératoires a reposé jusqu'à ce jour sur l'accumulation de connaissances empiriques exclusivement focalisées sur le suivi de données physico-chimiques. Toutefois, et même si cette technologie semble aujourd'hui consolidée, son développement reste encore limité par son manque de robustesse du fait notamment de la méconnaissance du fonctionnement de l'écosystème microbien sur lequel elle repose. Parmi les raisons qui peuvent expliquer ce manque d'information, on peut citer l'extrême complexité de la composition du microbiome et des interactions régissant le processus global de méthanisation, le grand nombre d'espèces encore non caractérisées, l'entrée continue de micro-organismes causée par l'utilisation de substrats non stériles ainsi que les limites posées par l'utilisation de techniques ADN dépendantes.

Cette diversité est bien évidemment bénéfique au fonctionnement de la digestion anaérobie puisque qu'elle lui confère une certaine adaptabilité liée notamment à l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les différentes populations qui composent l'écosystème. Toutefois, celle-ci peut nuire à la compréhension de leurs rôles respectifs. Des efforts doivent donc encore être réalisés dans le but de décrypter le fonctionnement d'un écosystème complexe ceci afin de mieux prendre en compte la composante biotique dans le management de la digestion anaérobie. Cela implique une meilleure compréhension du comportement des communautés microbiennes en fonctionnement stable mais également lors d'épisodes de perturbation liés par exemple à des modifications des conditions environnementales. Pour ce faire, des indicateurs microbiens de stabilité et d'instabilité du processus de digestion anaérobie doivent être définis dans le but de répondre et/ou d'anticiper au mieux les dysfonctionnements liés à ce type de process.

6.1 Les outils au service d'une description approfondie des bioprocédés

La description d'un écosystème microbien complexe nécessite l'utilisation de techniques de biologie moléculaire. Ce domaine a connu depuis quelques décennies des avancées considérables qui permettent aujourd'hui de disposer de méthodes perfectionnées à des coûts relativement abordables. Le traitement et la gestion des jeux de données produits sont donc devenus des enjeux majeurs pour tous les utilisateurs de ce type de technique. De plus, leur interprétation implique dorénavant l'utilisation de méthodes statistiques complexes d'analyse multivariée. L'objectif des prochains paragraphes sera donc de proposer un aperçu des différentes techniques de biologie moléculaire et d'analyse de données pouvant être appliquées, à ce jour, pour décrire le fonctionnement de l'écosystème de la digestion anaérobie.

6.1.1 L'apport de la biologie moléculaire et des approches omiques

La composition de la communauté microbienne de la digestion anaérobie peut être déterminée par le biais de l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et l'analyse de certaines régions de l'ADN ou de l'ARN des procaryotes. Par exemple, le gène codant l'ARN ribosomique constituant de la petite sous unité 16S (gène ARNr 16S) constitue l'un des marqueurs génétiques les plus utilisés. Celui-ci est présent en grande quantité et de manière universelle chez les procaryotes. En outre, il possède des régions hautement conservées et d'autres au contraire très variables.

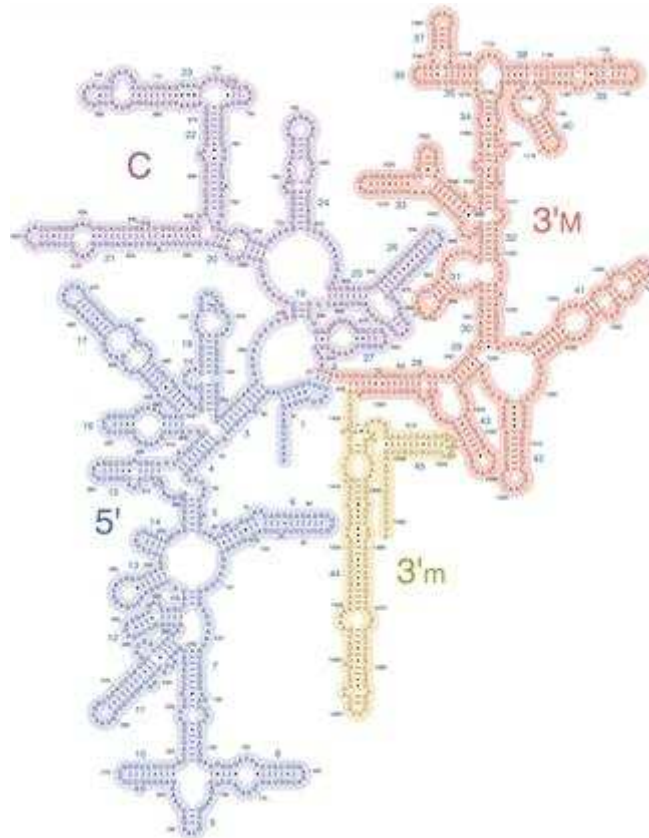


Figure 9 : Structure secondaire d'une molécule d'ARN16S.
(d'après rna.ucsc.edu/)

De nombreuses techniques d'empreinte moléculaire (ou fingerprinting) telles que l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE ou TGGE), le polymorphisme de conformation de simples brins (SSCP), ou de longueur des fragments de restriction (ARDRA ou RFLP) peuvent mettre en jeu ce type de marqueur moléculaire en se basant sur leur migration différentielle, notamment par électrophorèse capillaire. L'analyse automatisée de l'espace intergénique (ITS) de l'ADN ribosomal (ARISA) utilise quant à elle la taille hypervariable de la région située entre les gènes codants pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S.

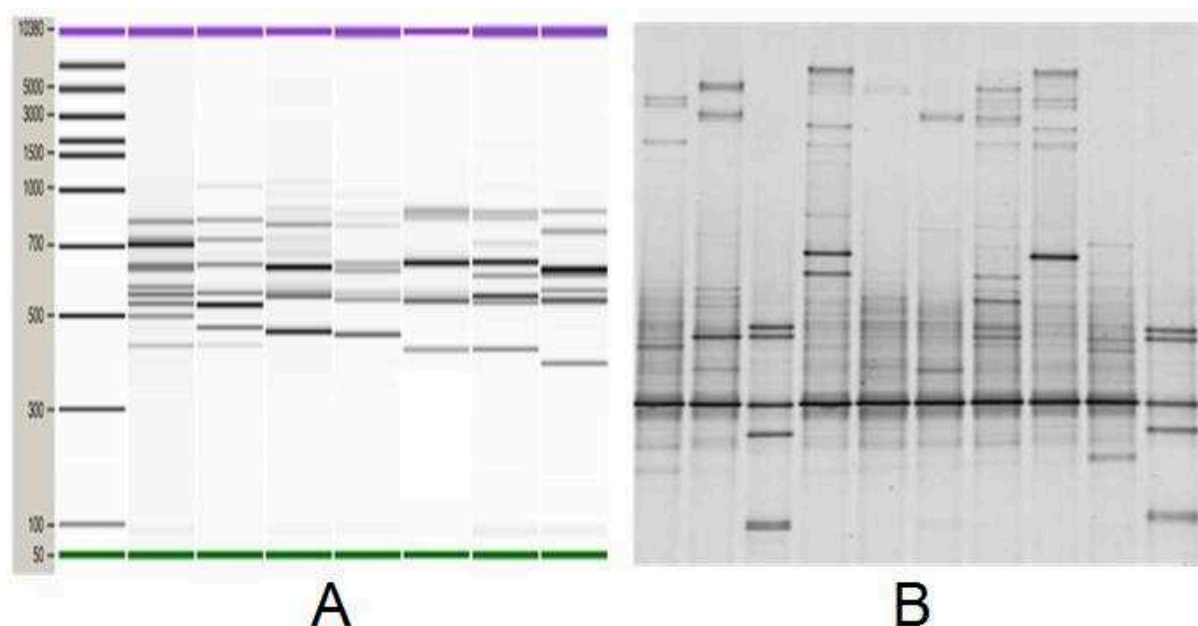


Figure 10: Exemples de profils obtenus par : (A) ARISA, et par (B) DGGE

Toutes ces techniques dont les principes ne seront pas développés dans cette synthèse bibliographique permettent d'obtenir des profils moléculaires de la communauté. Ces derniers offrent une vision globale sur le suivi des dynamiques d'évolution et de modification de la diversité des micro-organismes. Ces profils peuvent ainsi être comparés et associés à des variations de conditions opératoires. Cependant, ils ne donnent pas d'information quant à l'identification des micro-organismes impliqués. De plus, même si les profils générés par les techniques de fingerprinting représentent quantitativement les produits de la PCR, ils ne peuvent pas être considérés comme une représentation rigoureusement quantitative de la communauté initiale du fait de différents biais expérimentaux liés à l'utilisation de ces méthodes (extraction d'ADN non efficace ou préférentielle, choix de la séquence cible, spécificité des amorces, formation de chimères). Toutefois, ces techniques ont été employées pendant de nombreuses années pour leur rapidité et leur répétabilité, mais également car elles offraient à un coût raisonnable, une vision d'ensemble de la communauté d'un échantillon (Ali Shah et al., 2014).

Pour aller plus loin dans la description de l'écosystème de la digestion anaérobie, l'identification des acteurs microbiens par des techniques de séquençage permet d'accéder à un niveau d'information supérieur. Depuis quelques années, ces techniques ont fait l'objet d'avancées notables qui ont permis de réduire drastiquement leur coût tout en augmentant exponentiellement la quantité de séquences produites. Parmi les méthodes de séquençage à haut débit (HTS pour high-throughput sequencing) aussi appelé NGS (pour next-generation sequencing) les plus couramment utilisées, on peut citer le séquençage par semi-conducteur (développé par Ion Torrent), le pyroséquençage 454 (développé par Roche), le séquençage par synthèse (Illumina) ou par ligation (SOliD, Life Technologie). Ces techniques peuvent notamment être appliquées à des marqueurs moléculaires tels que ceux cités précédemment. En outre, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S est à ce jour couramment utilisé pour étudier la composition et la dynamique des communautés microbiennes dans les digesteurs anaérobies. Des suivis écologiques à long terme ont ainsi pu être mis en œuvre à

l'échelle d'unités industrielles afin de mettre en lumière des corrélations entre la microbiologie du procédé et les variations de conditions opératoires. Certains exemples seront développés dans la partie 6.2 de cette synthèse bibliographique.

Des approches « omiques » ont récemment été développées afin d'augmenter le niveau d'information obtenu grâce aux techniques de séquençage classique. Celles-ci consistent à appréhender la complexité de l'écosystème microbien dans son ensemble, au moyen de méthodologies les moins restrictives possibles. Sur le plan moléculaire, il s'agit de la métagénomique qui s'intéresse au séquençage complet du génome, et de la métatranscriptomique qui cherche à séquencer l'ensemble des ARN ribosomiaux et/ou messagers présents dans les échantillons. La métagénomique permet d'étudier l'ensemble du contenu génétique de l'écosystème de la digestion anaérobie ceci afin d'obtenir une image de sa composition taxonomique et de son potentiel métabolique. La métatranscriptomique s'intéresse quant à elle à l'ensemble des informations génétiques exprimées. Elle cherche plutôt à caractériser l'écosystème d'un point de vue fonctionnel. Le séquençage des ARN messagers permet notamment d'obtenir une vision de l'ensemble des fonctions exprimées par les populations microbiennes actives au sein du digesteur. La métabolomique étudie quant à elle l'ensemble des intermédiaires de dégradation et donc des voies métaboliques employées par la communauté microbienne lors du processus de méthanisation. Elle donne elle aussi une vision plus fonctionnelle de l'écosystème. Enfin, la métaprotéomique permet l'analyse des fonctions réellement exprimées par l'étude de l'ensemble des protéines retrouvées dans l'échantillon. La puissance de ces outils sur le plan descriptif permet aujourd'hui une caractérisation des systèmes biologiques à une échelle et une profondeur jamais atteintes. Toutefois, l'intégration de ces jeux de données souvent massifs dans un cadre conceptuel cohérent constitue à ce jour un enjeu de recherche majeur du fait notamment du faible nombre de bases de données disponibles (Vanwonterghem et al., 2014).

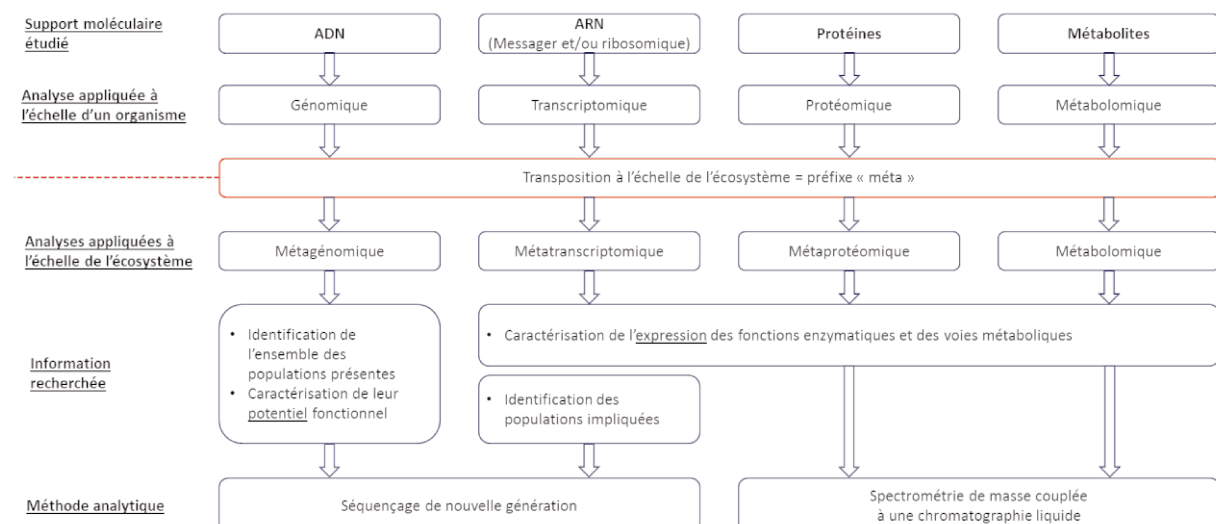


Figure 11 : Présentation des différentes analyses méta-omiques

6.1.2 *Aperçu de quelques méthodes d'analyse de données*

L'avancée des techniques de suivi des digesteurs anaérobies permet à ce jour d'obtenir des jeux de données de plus en plus complexes et multidimensionnels portant aussi bien sur les conditions opératoires que sur les paramètres physico-chimiques de fonctionnement ainsi que sur la composition de la communauté microbienne. L'interprétation de ces résultats nécessite à présent l'utilisation de méthodes d'analyses multivariées adaptées à ce type de jeu de données. Ces dernières ont pour objectif de construire un nouveau système de représentation qui permet de synthétiser l'information. On parle alors d'ordination.

L'analyse en composante principale (ACP) est une méthode d'exploration de données classiquement utilisée pour ce type de jeu de données. Elle cherche à réduire la dimensionnalité du problème par projection des observations dans un sous-espace, tout en conservant un maximum d'information. Elle consiste en un simple changement de base permettant de passer d'une représentation canonique des variables initiales à une représentation (généralement bidimensionnelle) dans la base des facteurs définis par les vecteurs propres (pouvant être caractérisés par la fraction de la variabilité de l'échantillon initial qu'ils permettent de prendre en compte) calculés à partir d'une matrice de covariance ou de corrélation. Elle vise donc à trouver des combinaisons linéaires non corrélées des variables de départ qui maximisent la prise en compte de la variance. Les résultats de l'ACP permettent donc de faire ressortir les corrélations qui existent entre les différents individus par une simple observation de la distance euclidienne.

Une autre méthode appelée analyse en coordonnées principales (PCoA), ou encore échantillonnage multidimensionnel ou Metric multiDimensional Scaling (MDS), est une généralisation de l'analyse des composantes principales. A la différence de l'ACP qui calcule la distance entre des points d'un espace au moyen de la distance euclidienne, la PCoA autorise l'utilisation d'autres mesures de distance susceptibles de mieux traduire la différence entre les différents échantillons telles que la distance de Bray Curtis.

Enfin la NMDS (Nonmetric Mutlidimensional Scaling) est une méthode se rapprochant de la PCoA. Elle peut ainsi se servir de différentes matrices de distance. La NMDS se différencie toutefois de la PCoA car elle cherche à préserver l'ordre des proximités entre individus et non leurs valeurs absolues ou relatives. Autrement dit, le but est de représenter les distances entre les objets, en respectant l'ordre entre les proximités plutôt que leurs valeurs exactes.

De nombreuses autres méthodes telles que l'analyse factorielle des correspondances (AFC), l'analyse en composantes indépendantes (ACI), l'analyse canonique de redondance et de correspondance (ACR et ACC) peuvent également être utilisées dans le but de traiter des jeux de données multivariés issus notamment des bioprocédés (Glasse, 2013). Toutefois celles-ci ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

6.2 Premiers exemples de suivi écologique de la digestion anaérobie

L'avancée des techniques de biologie moléculaire telles que le séquençage permet aujourd'hui à de nombreuses études de se pencher sur la dynamique des populations microbiennes impliquées dans la digestion anaérobie. Un nombre croissant d'auteurs s'est attaché à faire varier différents leviers opératoires tels que la température, le type de substrat, la charge organique, ou la concentration en azote ammoniacal afin de créer des états transitoires et d'étudier ainsi la réponse de l'écosystème à ces perturbations. Ce paragraphe cherchera donc à fournir un premier aperçu des tendances écologiques qui se dégagent de l'ensemble des études recensées dans cette synthèse bibliographique.

6.2.1 Les populations méthanogènes

Les populations méthanogènes jouent un rôle crucial dans le processus global de digestion anaérobie. En outre, ces populations présentent une grande sensibilité aux perturbations environnementales ainsi qu'un temps de doublement nettement supérieur à celui des autres acteurs bactériens. De ce fait, l'optimisation de leurs conditions de croissance constitue un verrou décisif pour le fonctionnement du processus global. Des suivis écologiques ont donc été réalisés afin de déterminer la réponse des populations méthanogènes à différentes perturbations et de définir d'éventuels indicateurs de bon fonctionnement et/ou de dysfonctionnement.

En fonctionnement stable, plusieurs auteurs s'accordent à dire que l'écosystème de la digestion anaérobie est généralement dominé par des archées acétoclastes et notamment par *Methanosaeta* (Chen & He, 2015; De Vrieze et al., 2012; Nelson et al., 2011). Plus largement les ordres *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales* ont été identifiés comme indicateurs de bon fonctionnement de digesteurs anaérobies mésophiles (Leclerc et al., 2004; Ziganshin et al., 2013). Rivière et al., (2009) ont notamment proposé la définition d'un « core » microbien de la digestion anaérobie composé de *Methanomicrobiales* de *Methanosarcinales* ainsi que du groupe phylogénétique Arc I (Riviere et al., 2009). D'autres auteurs ont également analysé la composition de la communauté méthanogène au sein de nombreux digesteurs et ont tenté de corréler les paramètres opératoires à l'occurrence de certains phylotypes (Hao et al., 2016; Rui et al., 2015).

Lors de l'application de conditions de stress, des shifts de populations ont également été identifiés. Notamment, l'émergence de genres tels que *Methanoculleus* et *Methanosarcina* a régulièrement été mise en avant. En outre, ce shift a pu être associé à un changement de métabolisme de la méthanogenèse qui passe de la voie acétoclaste à la voie hydrogénotrophe, grâce à la mise en place de l'oxydation syntrophique de l'acétate. C'est notamment le cas lors d'une surcharge organique ou lors d'une augmentation de la concentration en azote ammoniacal (Bialek et al., 2012; Ho & Ho, 2012; Schnürer & Nordberg, 2008; Ziganshina et al., 2015). Selon Lerm et al., (2012) la présence conjointe de ces deux métabolismes permettrait à l'écosystème de s'adapter à différents types de perturbations et de conserver des performances relativement stables (Lerm et al., 2012).

Selon certains auteurs, cette élasticité fonctionnelle lors d'épisodes de perturbation est grandement liée à la présence de *Methanosarcina*, seule archée méthanogène à posséder un double métabolisme acétoclaste et hydrogénotrophe (De Vrieze et al., 2012; Lins et al., 2014;

Qu et al., 2009). Cependant, Chen et He (2015) ont avancé que *Methanosaeta* pouvait également montrer une certaine adaptabilité vis-à-vis de plusieurs types d'inhibition tels qu'une augmentation de la concentration en acétate (Chen & He, 2015). Toutefois, seule cette étude a observé un tel phénomène. Par ailleurs, le rôle des ordres *Methanomicrobiales* (avec notamment *Methanoculleus*) et *Methanobacterales* (*Methanothermobacter*), qui sont également capables d'établir des interactions syntrophiques avec des SAOB, semble devenir prépondérant lorsque les *Methanosarcina* sont inhibées à leur tour (Hori et al., 2006).

6.2.2 Les populations bactériennes

La plupart des expérimentations portées sur le suivi écologique des communautés se sont intéressées aux populations méthanogènes, du fait notamment de leur plus grande sensibilité aux variations de conditions environnementales. Cependant, plusieurs études ont avancé que la réponse des populations bactériennes pouvait également revêtir une importance capitale dans le fonctionnement d'un digesteur anaérobie (Ali Shah et al., 2014; Regueiro et al., 2014c).

Les 4 principaux phyla retrouvés dans un ensemble d'unités industrielles sont les *Proteobacteria*, les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes* et les *Chloroflexi* (Nelson et al., 2011; Sundberg et al., 2013). En outre, de Vrieze et al., (2015) ont observé que trois de ces phylums (*Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*) couvraient à eux seuls $86.1 \pm 10.7\%$ de la communauté bactérienne totale de 29 digesteurs industriels (De Vrieze et al., 2015). Cette même étude a permis de distinguer différents clusters bactériens. Ainsi, les augmentations des abondances relatives de *Bacteroidales*, *Clostridiales* et de *Lactobacillales* pourraient être respectivement corrélées à des perturbations des conditions opératoires telles qu'une augmentation de la concentration en azote ammoniacal, en ammoniac ou encore de température. Ces derniers ont également été retrouvés dans l'étude menée par Li et al., (2015). Selon cette même étude, l'augmentation de la concentration en ammoniac sélectionnerait effectivement les *Firmicutes* et plus particulièrement le genre *Clostridium* (Li et al., 2015). Par ailleurs, les phyla *Bacteroidetes* et *Chloroflexi* prédomineraient plutôt à des températures mésophiles (Lee et al., 2012).

Leclerc et al., (2009) ont quant à eux identifié 6 OTUs appartenant à *Chloroflexi*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, et *Synergistetes* au sein d'un « core » microbien de la digestion anaérobie et (Leclerc et al., 2004). L'importance des classes *Clostridia* et *Bacilli* respectivement impliquées dans la dégradation des protéines et des lipides a été fréquemment soulignée (Ali Shah et al., 2014; Leclerc et al., 2004; Riviere et al., 2009; Sundberg et al., 2013). Le genre *Syntrophomonas* et l'ordre *Synergistales* capables de dégrader les AGV ont quant à eux été respectivement associés au bon fonctionnement de l'acétogenèse et de l'oxydation syntrophique de l'acétate. Enfin, les phyla *Thermotogae* et *Sphingobacteria* sont régulièrement retrouvés dans les digesteurs thermophiles.

La grande diversité bactérienne présente au sein des digesteurs rend difficile l'établissement d'indicateurs microbiens de bon fonctionnement du processus de digestion anaérobie. De plus, la redondance fonctionnelle présente entre les différentes populations complexifie encore un peu plus la compréhension de leurs rôles respectifs. Toutefois, ces

premières études ont permis de commencer à acquérir des premières données nécessaires à la définition de ces indicateurs.

6.2.3 Bilan et perspectives

La majorité des observations recensées lors de ces suivis écologiques ont permis d'émettre des hypothèses quant à l'importance de certaines populations méthanogènes et bactériennes sur le fonctionnement de digesteurs anaérobies. Cependant, la quantité de données générées par les nouvelles méthodes de biologie moléculaire devient extrêmement complexe et difficilement interprétable. De plus, la grande variabilité des systèmes étudiés, des techniques de séquençage employées ou encore des pipelines d'analyse utilisés pour gérer ces flux de données limitent encore une généralisation des conclusions tirées par ces différentes études.

De récentes revues bibliographiques telles que celles réalisées par Carballa et al., (2015) et Ali Shah et al., (2014) ont toutefois proposé quelques pistes de suivi microbiologique du fonctionnement de la digestion anaérobie en tentant d'agréger l'ensemble des résultats obtenus jusqu'alors. Carballa et al., (2015) ont mis en avant le fait qu'une stabilité de la composition de la communauté méthanogène ainsi qu'une forte diversité de la communauté bactérienne pourraient refléter le bon fonctionnement d'un méthaniseur (Carballa et al., 2015). Ali Shah et al., (2014) ont quant à eux établi une liste de micro-organismes régulièrement retrouvés dans les digesteurs anaérobies. Ils ont également indiqué leur rôle potentiel dans le processus global. Cependant, aucune de ces études n'a proposé d'indicateur microbien de stabilité ou d'instabilité du processus. A ce jour, il reste donc très difficile de prédire la réponse de biomasses issues de différents digesteurs anaérobies à divers types perturbations. Toutefois, des stratégies expérimentales telles que celle proposée par de los Reyes et al., (2015), utilisent des approches réciproques dites « Reciprocal transplant approach » où chaque modification d'un levier environnemental doit être testée simultanément sur plusieurs biomasses distinctes et dans des conditions opératoires identiques (de los Reyes et al., 2015).

L'incertitude quant à la réponse de l'écosystème aux perturbations nuit fortement au développement de la filière méthanisation. L'immense diversité des interactions écologiques possibles, et ce malgré l'existence d'une certaine convergence fonctionnelle liées aux conditions opératoires appliquées au sein des digesteurs, constitue un verrou technologique majeur. Pour y pallier, des efforts doivent être fournis afin de mieux comprendre et de conceptualiser le fonctionnement des écosystèmes microbiens. Une meilleure prise en compte de la composante biotique des bioprocédés devrait permettre dans le futur de définir des indicateurs biologiques représentatifs de la santé du moteur microbien du bioprocédé. Ces derniers constitueront un complément indispensable aux paramètres de suivi physico-chimiques déjà existants.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

Le chapitre précédent a rappelé que face aux enjeux énergétiques et environnementaux, la méthanisation apparaît aujourd'hui comme une filière incontournable dans la mise en place d'une gestion durable des déchets. De nombreuses études ont été menées pour optimiser la conduite des digesteurs et maximiser leur rendement. Celles-ci ont apporté des améliorations empiriques importantes. Toutefois, et ce malgré un potentiel énergétique indiscutable, la filière méthanisation tarde à s'ancrer plus profondément dans le parc français des filières de gestion des déchets. Ce constat s'explique notamment par le manque de robustesse affiché par les digesteurs face à l'arrivée, difficilement prévisible, d'une grande variété de composés inhibiteurs. L'instabilité des performances de ce type de bioprocédé constitue encore à ce jour un frein majeur à son développement. De nombreuses stratégies opératoires ont été mises en œuvre pour lutter contre l'effet néfaste des inhibiteurs sur les performances de l'écosystème de la digestion anaérobie. La plupart d'entre elles ont cherché à limiter la présence de ces composés au sein du milieu réactionnel, en optimisant l'alimentation des digesteurs, en modifiant les conditions opératoires ou par l'ajout d'additifs chimiques ou biologiques. Cependant, et du fait de limitations méthodologiques, peu d'études se sont intéressées à l'impact de ces stratégies sur l'état de l'écosystème microbien. Aujourd'hui, la levée de nombreux verrous technologiques associés aux développements des méthodes de biologie moléculaire permet de mieux prendre en considération la composante biotique de ce bioprocédé. La compréhension des mécanismes biologiques de dégradation de la matière organique et de la production de biogaz a déjà considérablement bénéficié de ces avancées. L'optimisation de la méthanisation passe maintenant par l'acquisition de nouvelles connaissances portant sur l'écophysologie de l'écosystème de la digestion anaérobie dans le cas de situations transitoires associées notamment à l'arrivée de composés inhibiteurs. Celles-ci fourniront des informations indispensables pour proposer et anticiper de nouveaux modes de gestion des bioprocédés.

Dans cette optique, le premier objectif du travail présenté dans ce manuscrit a consisté à étudier l'influence de différents niveaux d'inhibition sur les performances et la composition de l'écosystème de la digestion anaérobie. Ce travail visait à fournir une description approfondie des réactions des acteurs microbiens face à ces perturbations et d'affiner la compréhension du fonctionnement du moteur microbien de la digestion anaérobie. Des corrélations entre l'altération des performances macroscopiques et les modifications de la composition de l'écosystème microbien ont ainsi été proposées. Les comportements observés permettront l'obtention d'informations sur la stabilité des voies métaboliques exprimées, de circonscrire précisément les processus à l'origine des dysfonctionnements, et ainsi de mieux comprendre quelles pourraient être les conditions de l'obtention de digesteurs plus stables. La possibilité de définir des indicateurs microbiens associés à ces perturbations a ainsi été évaluée dans ce manuscrit. Ce travail s'est focalisé sur deux types de perturbation en particulier : l'azote ammoniacal et le phénol. Ces perturbateurs sont couramment retrouvés dans les digesteurs de déchets et ont régulièrement été mis en cause lors du dysfonctionnement de digesteurs industriels.

Le second objectif de cette thèse consistait à mettre en place des stratégies opératoires ciblées tenant compte de la composante microbienne des bioprocédés, afin d'obtenir une meilleure résistance des digesteurs anaérobies face aux perturbations. Parmi les éléments de contexte bibliographique présentés dans le chapitre précédent, il a notamment été montré

qu'une meilleure organisation spatiale semble faciliter à la fois la protection face à l'inhibiteur et les interactions entre micro-organismes, permettant ainsi de maintenir l'efficacité de la digestion anaérobie en présence de perturbateurs. Par conséquent, l'effet de différents supports tels que les zéolithes, les charbons actifs, ou encore le chitosane sur les dynamiques microbiennes et leur métabolisme a été caractérisé.

La démarche expérimentale menée durant cette thèse couplait à la fois une approche en digesteurs batchs et en réacteurs semi-continus. La dernière étape consistait donc à mettre en œuvre un dispositif expérimental constitué de réacteurs semi-continus afin de comparer les résultats obtenus sur les digesteurs batchs à des systèmes dont le fonctionnement se rapproche des unités industrielles.

Pour faciliter la compréhension de la démarche expérimentale menée lors de ce travail de thèse, un schéma récapitulatif est présenté en Figure 12.

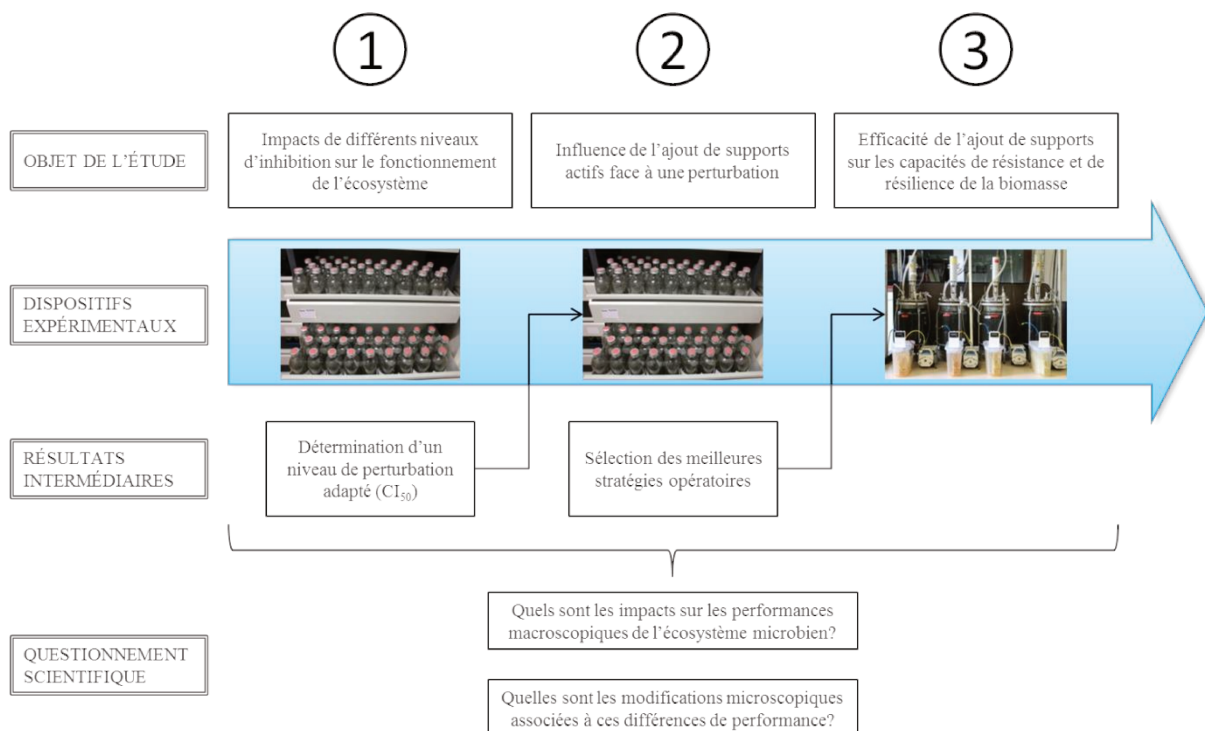


Figure 12 : Schéma de la démarche expérimentale développée au cours de cette thèse

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Système expérimental

1.1 Inoculum

La biomasse utilisée pour chacune des séries d'expérimentations a été prélevée dans un digesteur anaérobie mésophile fonctionnant à 35°C et alimenté par des boues issues des traitements primaires et secondaires, de la station d'épuration Seine Aval (Achères, 78).



Figure 13 : Inoculum issu du digesteur mésophile industriel

Dans le but de pré-adapter ce consortium microbien à un nouveau substrat, 30 L d'inoculum fraîchement prélevés ont été incubés en conditions anaérobies à 35°C en présence de 15 L de pulpe de biodéchet (voir 1.2) dans un réacteur de 50 L relié à une poche destinée à recueillir le biogaz. Une fois le substrat consommé et la production de biogaz terminée, des prélèvements de biomasse ont été réalisés puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 min. Les culots obtenus ont ensuite été directement utilisés pour inoculer les différentes incubations. Les caractéristiques physico-chimiques de cet inoculum préadapté sont présentées dans le Tableau I.

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques de l'inoculum préadapté

	pH	7,7
MS/MV	Matière sèche	2,5 ± 0,2 %
	Matière volatile	1,2 ± 0,1%
AGV	Acide acétique	1,1 ± 0,3 g/L
	Acide propionique	0,6 ± 0,0 g/L
	Acide butyrique	0,2 ± 0,0 g/L
	Acide lactique	0,1 ± 0,1 g/L
Analyse élémentaire	Carbone particulaire	41,7 ± 0,6 %
	Azote particulaire	2,5 ± 0,1 %
Cations	Na ⁺	6,4 ± 0,8 g/L
	NH ₄ ⁺	1,7 ± 0,1 g/L
	K ⁺	0,8 ± 0,2 g/L

1.2 Substrat

Le substrat est une pulpe de biodéchet issue d'un biodéconditionneur industriel basé à Chemaudin (23) et géré par le groupe SITA.



Figure 14 : Biodéchet issu du biodéconditionneur industriel

Cette unité pilote récolte des déchets alimentaires tels que des restes de cantines et de restaurants, des produits emballés périmés ou non-vendus des supermarchés, ainsi que des aliments industriels provenant d'entreprises agroalimentaires confrontées à une erreur de process et désignés impropres à la consommation. L'essentiel du traitement réalisé sur cette filière de déconditionnement consiste à séparer les emballages de la matière organique qui, une fois broyée et mixée, est stockée en citerne, avant d'être livrée à des installations de méthanisation agricole. Lors de la campagne de prélèvement, 300 L de biodéchet ont été récupérés au sein de la citerne de stockage. Les caractéristiques physico-chimiques de ce substrat sont présentées dans le Tableau II.

Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques du substrat

	pH	4,1
MS/MV	Matière sèche	12,5 ± 0,6 %
	Matière volatile	11,0 ± 0,4 %
AGV	Acide acétique	3,0 ± 0,2 g/L
	Acide propionique	n.d.
	Acide butyrique	n.d.
	Acide lactique	25,0 ± 0,8 g/L
Analyse élémentaire	Carbone particulaire	48,5 ± 0,9 %
	Azote particulaire	3,6 ± 0,2 %
	DCO	200 ± 3 g O ₂ /L
Cations	Na ⁺	2,7 ± 0,2 g/L
	NH ₄ ⁺	0,2 ± 0,1 g/L
	K ⁺	1,8 ± 0,1 g/L
	Ca ²⁺	2,4 ± 0,3 g/L
	Mg ²⁺	0,2 ± 0,1 g/L

Afin d'obtenir une granulométrie adéquate pour les différentes incubations, le biodéchet a de nouveau été broyé et mixé plus finement au laboratoire avant d'être aliquoté en flacons de 5 L puis stocké à -20°C.

1.3 Solution tampon

Un tampon d'incubation a été utilisé pour chacune des séries d'expérimentations. L'objectif était de limiter une éventuelle inhibition liée à une chute de pH en ne s'intéressant spécifiquement qu'aux effets des différents perturbateurs sur le processus global de dégradation. La composition du tampon, basée sur la norme NF EN ISO 11734 concernant l'évaluation de la biodégradabilité anaérobie "ultime" des composés organiques dans les boues de digesteurs, est décrite dans le tableau III. Cette solution, appelée BMP dans la suite du manuscrit, a été complétée par l'ajout d'hydrogénocarbonate de sodium afin de tamponner le milieu réactionnel dans la gamme de pH optimale pour la méthanogénèse.

Tableau III : Composition chimique du milieu réactionnel

Composé	Quantité
Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	0,270 g/L
Monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$)	1,120 g/L
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	0,530 g/L
Chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$)	0,100 g/L
Chlorure de fer (II) tétrahydraté ($\text{FeCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$)	0,020 g/L
Réazurine(indicateur d'oxygène)	0,001 g/L
Sulfure de sodium nonahydraté ($\text{Na}_2\text{S}, 9 \text{H}_2\text{O}$)	0,100 g/L
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3)	11,760 g/L
Eau distillée	q.s.p 1 L

1.4 Inhibiteurs






Afin d'étudier les différents processus d'inhibition de la digestion anaérobie, deux types de molécules couramment impliquées dans des baisses de performances de digesteurs industriels ont été sélectionnées. Il s'agit d'un inhibiteur inorganique, l'azote ammoniacal, introduit sous la forme de NH_4Cl (99.998 %, Sigma Aldrich) et d'un micropolluant organique, le phénol (99 %, ACROS Organics). Lors de chacune des séries d'expérimentations, ces inhibiteurs ont été dilués dans la solution tampon (BMP) afin de former une solution concentrée. Ils ont ensuite pu être introduits à partir de cette solution mère à différentes concentrations dans les dispositifs expérimentaux.

1.5 Supports actifs

Cinq supports actifs, dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau IV, ont été sélectionnés. L'objectif était d'étudier leur influence sur les performances de la digestion anaérobie en conditions inhibitrices. Afin de faciliter leur prélèvement, mais également d'offrir à la biomasse un support présentant une granulométrie homogène, les échantillons de zéolithes et de charbons actifs ont été tamisés entre 0,5 et 1,0 mm préalablement à leur introduction dans le milieu réactionnel. L'étude bibliographique menée préalablement à cette série d'expérimentation a permis de déterminer pour chaque support, une concentration

adéquate. Ainsi, 10,0 g/L de zéolithes et de charbons actifs ont été introduits dans les digesteurs batchs. La concentration de chitosane a quant à elle été fixée à 1,0 g/L.

Tableau IV : Description des différents supports actifs

Type	Nom commercial	Fournisseur	Référence produit	n° CAS	Description	
Zéolithe	SiliZ [®] 14	SARL SOMEZ	ZN-024-14	1318-02-1	Roche zéolithique naturelle concassée : Chabazite (60%±5); Aluminosilicate de Calcium Potassium Hydraté	
Zéolithe	SiliZ [®] 24	SARL SOMEZ	ZN-324-24	12173-10-3	Roche zéolithique naturelle concassée : Clinoptilolite (80%±5); Aluminosilicate de Potassium Sodium Magnésium Hydraté	
Charbon actif	-	SIGMA-ALDRICH	C2889	7440-44-0	Charbon actif non traité	
Charbon actif	DARCO [®]	SIGMA-ALDRICH	242241	7440-44-0	Charbon actif lavé à l'acide	
Chitosane	-	ACROS Organics	349050500	9012-76-4	Chitosane de bas poids moléculaire (100 000 - 300 000 g/mol)	

1.6 Dispositifs expérimentaux

1.6.1 Digesteurs batchs

Des incubations en digesteurs batchs ont été réalisées lors de deux premières séries d'expérimentations portant sur les processus d'inhibition, ainsi que lors de celles portant sur l'ajout de supports actifs. Ces dispositifs ont permis de tester un grand nombre de paramètres et d'obtenir un vaste jeu de données nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Des flacons à plasma de 1000 mL utiles (La Parisienne de Verrerie), en verre borosilicaté fermés hermétiquement par un septum en caoutchouc d'une épaisseur de 5,5 mm et une bague à vis en aluminium de 40 mm de diamètre (La Parisienne de Verrerie) ont été utilisés.



Figure 15 : Digesteur batch

Afin de faciliter le prélèvement des supports au cours de l'incubation, un dispositif de prélèvement constitué d'un tuyau de 2,5 mm de diamètre nominal, couplé à un robinet (diamètre de passage 2,1 mm, Vygon) a été mis en place.



Figure 16 : Dispositif de prélèvement des supports mis en place sur les digesteurs batchs

Les microcosmes anaérobies ont étéensemencés avec 20 g d'inoculum. Afin d'obtenir un ratio substrat/inoculum de 10 g DCO / g DCO, 50 g de biodéchet ont été ajoutés. Le volume utile de travail a été fixé à 500 mL, ceci dans le but de laisser un ciel gazeux suffisant pour éviter une montée en pression trop importante dans le flacon lors de la phase de production de biogaz. Chaque mélange a ensuite été complété avec 430 mL de tampon BMP contenant une certaine concentration d'inhibiteur. Les supports actifs ont été quant à eux ajoutés aux 500 mL obtenus. Afin d'établir des conditions anaérobies dès le lancement des incubations, le ciel gazeux a été flushé à l'azote (pureté > 99,99 %, Linde Gas) au moyen d'une rampe à vide. Après trois cycles de lavage vide-gaz, une analyse du ciel gazeux par microchromatographie a permis de vérifier l'absence d'oxygène (< 0,3 %). Après avoir homogénéisé les flacons par retournements successifs, un premier prélèvement liquide de 8 ml a été réalisé (appelé T₀) afin d'évaluer la reproductibilité des différents microcosmes à l'état initial du système. Les batchs ont ensuite été incubés à 35°C dans une pièce thermostatée, sans agitation et à l'obscurité.

1.6.2 Digesteurs semi-continus

Quatre bioréacteurs autoclavables (Applikon Biotechnology) en verre borosilicaté et d'un volume utile de 7 L (5,5 L de liquide / 1,5 L de ciel gazeux) ont été mis en œuvre lors de cette étude. La régulation de la température a été assurée par la circulation, à travers une double enveloppe, d'eau thermostatée provenant d'un bain marie. L'agitation du milieu réactionnel a été réalisée à l'aide d'une tige d'agitation équipée d'une hélice. Celle-ci a été alimentée par un moteur d'agitation P310 (Applikon Biotechnology) lui-même régulé par un régulateur de vitesse ADI 1032 (Applikon Biotechnology).

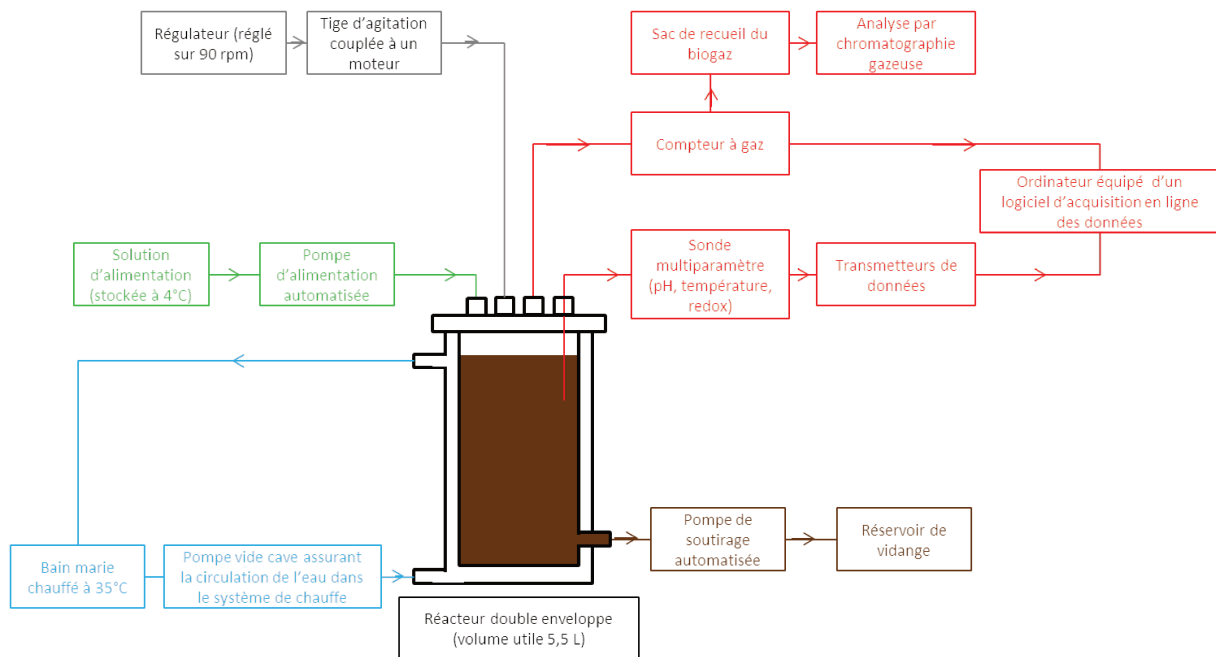


Figure 17 : Schéma de principe du montage expérimental associé à chaque digesteur semi-continu



Figure 18 : Dispositif expérimental composé des quatre digesteurs semi-continus automatisés

1.6.2.1 Caractéristiques de fonctionnement

Le temps de séjour hydraulique (TSH) a été fixé à 22 jours. L'alimentation en substrat ainsi que le soutirage des réacteurs ont été assurés de manière automatisée par des pompes péristaltiques (Beckman Coulter) dont le fonctionnement a été régi par des prises électriques programmables. Compte tenu de la gamme de débits de ces pompes et du volume de travail des réacteurs (5,5 L), il n'était pas envisageable d'assurer une alimentation et un soutirage continus. Quotidiennement, les bioréacteurs ont donc été alimentés et soutirés pendant 5 min à un débit de 50 mL/min.

La charge organique appliquée aux bioréacteurs en situation non perturbée était de 1 kg DCO/m³/jour. Les solutions d'alimentation ont été préparées chaque semaine pour tous les réacteurs. Celles-ci se composaient de 0,2 L de biodéchets dilués dans 1,8 L de tampon BMP. Afin d'éviter une éventuelle dégradation de la matière organique au sein des solutions d'alimentation, ces dernières ont été conservées à 4°C sous agitation dans un réfrigérateur percé permettant l'alimentation automatisée des réacteurs.

La température de fonctionnement des digesteurs semi-continus a été fixée à 35°C afin de conserver une cohérence lors de la transposition des stratégies opératoires testées en digesteurs batchs. La vitesse de rotation de la tige d'agitation a été réglée sur 90 rpm.

1.6.2.2 Instrumentation et système d'acquisition

Les principaux paramètres physico-chimiques (pH, température et potentiel RedOx) de chaque réacteur ont fait l'objet d'un suivi en ligne réalisé à l'aide d'une sonde multi paramètre InPro 4260i (Mettler Toldedo) reliée à un transmetteur numérique de type M300 (Mettler Toldedo). Les données des quatre digesteurs ont été continuellement transmises à une centrale d'acquisition reliée à un ordinateur.

La production de biogaz au cours du temps a pu être estimée grâce à la fabrication de compteurs à gaz à auget, d'un volume de 21 mL, équipés d'un compteur de basculement analogique. Le relevé de ces compteurs a été réalisé quotidiennement. La composition du biogaz, recueilli dans un sac Tedlar, a quant à elle été analysée de manière hebdomadaire.

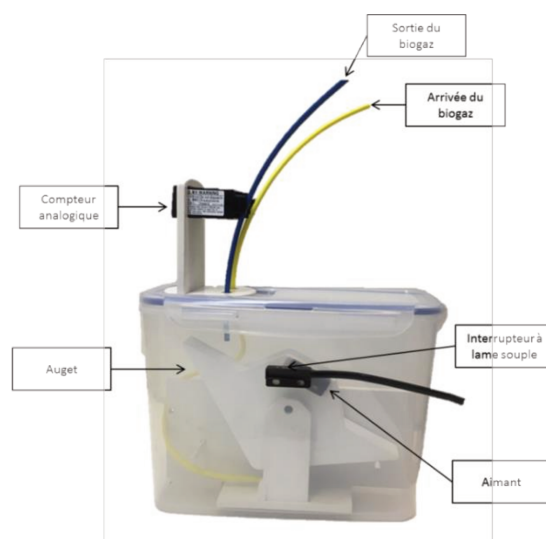


Figure 19 : Présentation des différents composants des compteurs à gaz

1.7 Échantillonnage

1.7.1 Prélèvements liquides

Les prélèvements liquides réalisés sur la première série de batchs ont été effectués après agitation des flacons, à l'aide d'une seringue couplée à une aiguille de 0,7 mm de diamètre (TERUMO stérile). Lors de l'expérimentation mettant en jeu les supports actifs, les échantillons ont été collectés sans aiguille au moyen du robinet possédant un raccord Luer-Lock directement compatible avec la seringue.

Lors des expérimentations en réacteurs semi-continus, les prélèvements hebdomadaires ont été réalisés quelques minutes avant la phase d'alimentation afin de ne pas biaiser le calcul du rendement épuratoire du procédé. Les échantillons ont été récoltés à l'aide de la pompe de soutirage activée manuellement.

Pour l'ensemble des prélèvements liquides précédemment décrit, 8 mL d'échantillon ont été récoltés et aliquotés dans quatre tubes Eppendorf de 2 mL. Ces tubes ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants ont ensuite été séparés des culots et disposés dans quatre tubes Eppendorf de 2 mL. Quatre des huit tubes ainsi obtenus (deux culots et deux surnageants) ont été plongés dans un vase Dewar contenant de l'azote liquide afin d'obtenir une congélation rapide. Ces échantillons, destinés aux analyses métaboliques, ont été conservés à -80°C. Les quatre échantillons restants ont été stockés à -20°C. Un tube supplémentaire de 2 mL a été prélevé sur les réacteurs semi-continus. Celui-ci a été directement placé à -20°C sans centrifugation afin de quantifier l'abatement de la matière organique au sein de ces dispositifs. La Figure 20 présente la méthode d'échantillonnage liquide et les analyses associées.

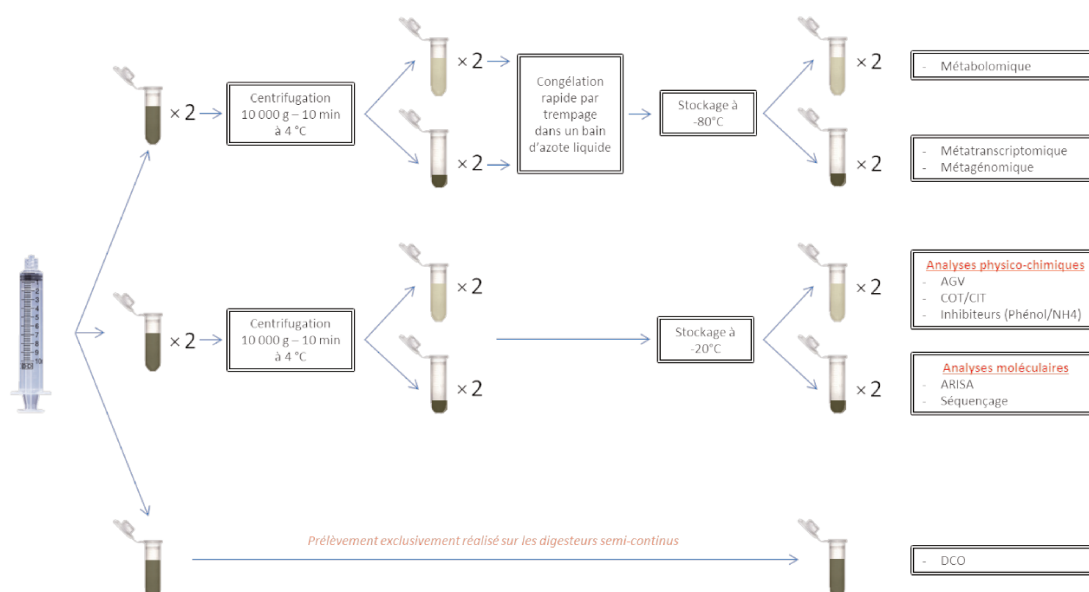


Figure 20 : Prélèvements liquides et analyses associées

1.7.2 Prélèvements gazeux

Les prélèvements gazeux n'ont été réalisés sur les digesteurs batchs que lorsque la pression différentielle interne des bouteilles permettait de récolter suffisamment de biogaz pour réaliser les différentes analyses sans atteindre une dépression. La mesure pression a toujours été effectuée à l'intérieur de la pièce thermostatée afin de s'affranchir d'un biais lié à une modification de la température au sein des digesteurs. Une pression différentielle interne supérieure à 80 mbar mesurée à 35°C permettait d'effectuer l'ensemble des prélèvements gazeux.

L'analyse de la composition du biogaz produit par les microcosmes anaérobies a été réalisée par le biais de prélèvements gazeux effectués directement dans la bouteille grâce à un montage reliant un système de microchromatographie en phase gazeuse (appelé μ GC) au flacon, soit au moyen d'une aiguille ($\varnothing = 0,45$ mm, TERUMO stérile) insérée dans le microcosme à travers le septum, soit directement au travers d'un robinet de prélèvement. La composition du biogaz produit par les réacteurs continus a été analysée en connectant directement les sacs Tedlar sur le μ GC.

2 Méthodes analytiques

2.1 Analyse du biogaz

2.1.1 Production

La production de biogaz a été suivie à partir de mesures régulières de la pression différentielle dans les microcosmes. Celles-ci ont été réalisées dans la chambre thermostatée à l'aide d'un manomètre différentiel (Digitron 2082P) équipé d'un tube relié à une aiguille ($\varnothing = 0,45$ mm, Terumo) ou à un raccord Luer-lock adaptable sur le robinet de prélèvement. La valeur de la pression atmosphérique a également été mesurée afin d'être prise en considération dans le calcul du volume de biogaz produit grâce à la loi des gaz parfaits. Après les différents prélèvements liquides et gazeux, la bouteille est dégazée jusqu'à atteindre une pression différentielle inférieure à 50 mbar. La pression finale a ensuite été de nouveau mesurée avant la remise en incubation des flacons.

2.1.2 Composition

La composition du biogaz a été analysée à l'aide d'un appareil de microchromatographie portable (μ GC) en phase gazeuse (Varian CP4900). Cet instrument permet de lancer des séquences d'analyses allant jusqu'à 15 flacons grâce à l'utilisation d'un système d'injection multiplexé. Il est équipé de quatre colonnes d'élution montées en parallèle. Trois de ces colonnes utilisant l'hélium en tant que gaz vecteur permettent de séparer et de quantifier les gaz suivants : O₂, N₂, CH₄, CO₂, N₂O, H₂S, H₂. La quatrième utilise quant à elle l'argon comme gaz vecteur afin de quantifier le NH₃. Les signaux obtenus sont analysés par un détecteur à conductivité thermique (TCD).

2.2 Analyses physico-chimiques

2.2.1 pH

Les mesures de pH ont été réalisées à partir des échantillons de surnageants recueillis juste après centrifugation des prélèvements liquides et ce avant leur stockage à -20°C. La mesure est réalisée avec un pH-mètre IQ160 de résolution 0,01. Après agitation, la sonde est plongée dans l'échantillon tout en étant lentement agitée jusqu'à stabilisation de la mesure.

2.2.2 Acides gras volatils

Les concentrations en acides gras volatils (AGV) ont été déterminées à partir des surnageants conservés à -20°C, à l'aide d'une chromatographie ionique (Dionex DX-120). Cet instrument est équipé d'une colonne échangeuse d'ions IONPAC® ICE-AS1 (9 * 250 mm) permettant de détecter différents AGV (formate, acétate, propionate, lactate, butyrate et isobutyrate). Ces derniers sont quantifiés grâce à un détecteur à conductivité. Les calibrations sont faites entre 10 et 500 mg/L pour chaque AGV. Les éluents employés sont l'acide heptafluorobutyrique à 0,4 mmol/L et l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH)

à 5 mmol/L. Les échantillons sont injectés à l'aide d'un passeur automatique Dionex AS-AP (Dionex).

2.2.3 Inhibiteurs

2.2.3.1 Phénol

Le dosage du phénol a été réalisé à l'aide de la micro méthode spectrophotométrique issue du kit LCK 346 (Hach Lange) à partir des échantillons de surnageants stockés à -20°C. La gamme de mesure de cette méthode s'étend de 5 à 200 mg/L. La mesure de la concentration en phénol de chaque échantillon a été réalisée au moyen du spectrophotomètre DR 2800 (Hach Lange).

2.2.3.2 Azote ammoniacal

Le dosage de l'azote ammoniacal a été réalisé par la méthode spectrophotométrique de Nessler à partir des échantillons de surnageants stockés à -20°C. Le réactif de Nessler (Grosseron) réagit en présence de tartrate double de potassium et de sodium ($C_4H_4O_6KNa, 4H_2O$). Le mélange (111 μ L de réactif de Nessler, 111 μ L de tartrate double de potassium et de sodium et 3 mL d'échantillon) est réalisé dans des cuves plastiques de 10 mm. La concentration en ions NH_4^+ est calculée à partir de la mesure de l'absorbance à 410 nm réalisée sur un spectrophotomètre (U-200, Hitachi) après 15 min à l'obscurité. Une gamme d'étalonnage s'étendant de 0 à 10 mg N- $NH_4^+L^{-1}$ a été réalisée avant chaque série de mesure.

2.2.4 Demande chimique en oxygène

Le dosage de la demande chimique en oxygène (DCO), a été réalisé à l'aide de la micro méthode spectrophotométrique issue du kit LCK 514 (Hach Lange) à partir des échantillons de surnageants stockés à -20°C. La gamme de mesure de cette méthode s'étend de 100 à 2000 mg O_2/L . La mesure de la concentration en DCO de chaque échantillon a été réalisée au moyen du spectrophotomètre DR-2800 (Hach Lange).

2.2.5 Analyse élémentaire

La quantité de carbone et d'azote contenue dans le substrat et l'inoculum a été analysée sur un échantillon broyé et séché à 105°C. Dix milligrammes de solides ont été placés dans des nacelles en étain pour l'analyse par analyseur élémentaire (VARIO EL III, Bioritech).

2.2.6 Analyse du carbone organique et inorganique dissous

La mesure du carbone inorganique dissous (CID) et du carbone organique dissous (COD) a été réalisée selon la norme NF EN 1484 sur le surnageant des échantillons centrifugés. L'échantillon est tout d'abord acidifié afin de transformer le carbone inorganique en CO_2 lui-même détecté par un analyseur infrarouge à double faisceau. Une oxydation est ensuite réalisée au persulfate de sodium à 95°C de façon à transformer le carbone organique en CO_2 . L'automate utilisé est le modèle 1010 de Bioritech. La calibration est faite en trois points (0, 10 et 50 mg C/L) à l'aide d'une solution de phtalate de potassium.

3 Analyses de biologie moléculaire

3.1 Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le kit MOBIO (PowerSoil™ DNA Isolation Kit) selon le protocole fourni. Celui-ci repose sur une double lyse des cellules. Des détergents tels que le sodium dodecyl sulfate sont ajoutés aux échantillons afin de réaliser une lyse chimique de la membrane. Puis, les échantillons contenant des billes sont vortexés pendant 10 minutes afin de briser les cellules mécaniquement. Le milieu est ensuite nettoyé des débris de cellules, de protéines et de composés inorganiques par plusieurs lavages sur une membrane ne retenant que l'ADN. Après élution, l'ADN obtenu est quantifié, par le système Quant-iT Assays (Invitrogen).

3.2 ARISA

L'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) est une technique de fingerprinting moléculaire reposant sur l'amplification d'une région de l'ADN de taille variable selon les micro-organismes située entre le gène codant l'ARN16S et celui codant l'ARN23S. Les ADN préalablement extraits ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les réactions de PCR ont été réalisées avec le kit ThermoStart (Abgene). La composition du mix pour un échantillon est présentée dans le tableau V. Le volume final du mix PCR a été fixé à 25 µL.

Tableau V : Composition du mix PCR destiné à l'analyse ARISA

Composés	Concentration
Tampon PCR	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM
dNTP Mix	0,4 mM
Amorce Forward	0,2 µM
Amorce Reverse	0,2 µM
Taq polymérase (ABGene Ltd)	0,75 U
Echantillon (ADN Extrait)	max 1 ng/µL

Au cours des expériences, l'évolution des populations d'archées et de bactéries ont été suivies. Deux jeux d'amorces généralistes (l'une spécifique aux archées, et l'autre aux bactéries) encadrant l'espace intergénique ont donc été utilisés pour amplifier l'ADN. La séquence de ces amorces est présentée dans le Tableau VI.

Tableau VI : Amorces utilisées pour la PCR destinée à l'analyse ARISA

Micro-organismes ciblés	Sens	Nom	Séquence
Archées	Forward	1389F	5'-CTT GCA CAC ACC GCC CGT-3'
	Reverse	71R	5'-TCG CAG CTT RSC ACG YCC TTC-3'
Bactéries	Forward	ITSF	5'-GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA-3'
	Reverse	ITSR eub	5'-GCC AAG GCA TCC ACC-3'

Les températures d'hybridation des amorces ont été déterminées après optimisation avec un gradient de température. Les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur Mastercycler® (Eppendorf). Les cycles de température nécessaires à l'amplification de l'ADN sont présentés dans le Tableau VII.

Tableau VII : Cycles de température utilisés lors de la PCR destinée à l'analyse ARISA

1 cycle	35 cycles			1 cycle
15 min	1 min	1 min	2 min	10 min
94,0°C	94,0°C	55,2°C	72,0°C	72,0°C

Les produits de PCR ont ensuite été analysés par électrophorèse capillaire réalisée sur des puces à ADN DNA Chip 1000 (Agilent Technologies) à l'aide d'un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies) selon le protocole du fournisseur.



Figure 21 : Puce DNA Chip 1000 (Agilent Technology)

Ces puces permettent d'obtenir une mesure précise de la taille de fragments d'ADN grâce à un marqueur fluorescent. Ainsi, chaque pic détecté sur les électrophorégrammes (ou de pseudo-gels) correspond à un fragment d'ADN. Les données qualitatives (temps de rétention) et quantitatives (intensité de fluorescence) récoltées ont ensuite été analysées statistiquement. Ces analyses statistiques sont présentées dans la partie Analyse statistique 4.2.

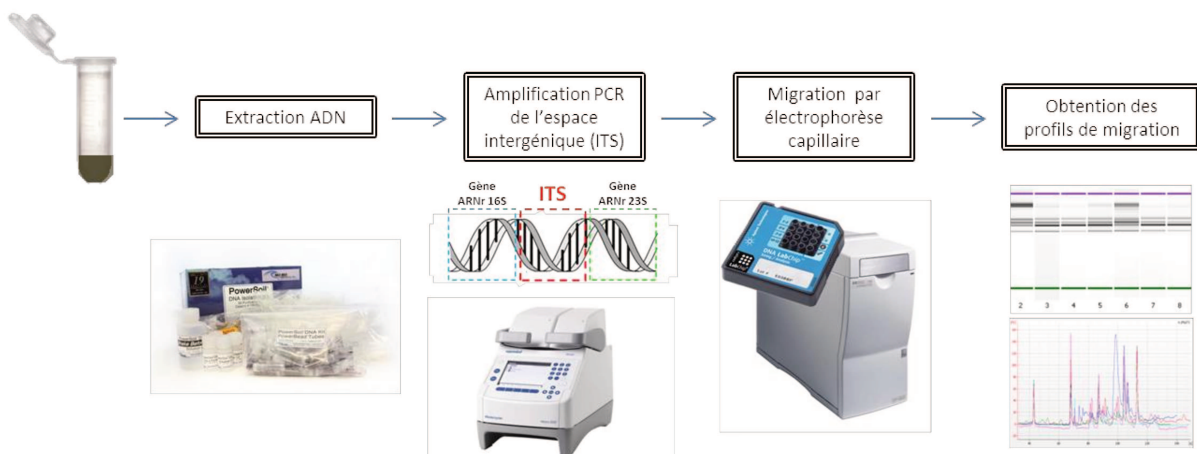


Figure 22 : Protocole ARISA

3.3 Séquençage 16S

Les ADN extraits ont été utilisés pour le séquençage par métabarcoding moléculaire du gène codant la région V4–V5 de l'ARN ribosomique 16S. Cette région a tout d'abord été amplifiée selon le protocole Platinum Pfx Supermix (Life Technologies) à l'aide de deux amorces de fusion généralistes (515F et 928R) dont les séquences sont présentées dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Amorces utilisées pour la PCR destinée au métabarcoding

Micro-organismes ciblés	Sens	Nom	Séquence
Archées & Bactéries	Forward	515F	5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3'
	Reverse	928R	5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3'

L'amorce forward (515F) a été modifiée par l'ajout d'un adaptateur PGM (A) et d'un barcode. L'adaptateur trP1 a quant à lui été ajouté à l'amorce reverse. Cette méthode, dite de fusion, a été réalisée selon le protocole de IonAmplicon Library Preparation (FusionMethod, Révision C). La composition du mix PCR ainsi que les cycles de températures nécessaires à l'amplification de l'ADN sont respectivement décrits dans le Tableau IX et le Tableau X ci-dessous.

Tableau IX : Composition du mix PCR destiné au séquençage

Composés	Concentration
Tampon PCR	1 X
MgSO ₄	1 mM
dNTP Mix	0,3 mM
Amorce Forward	0,3 μM
Amorce Reverse	0,3 μM
ADN polymérase (Platinum Pfx)	0,4 μL
Echantillon (ADN Extrait)	max 0,2 ng/μL

Tableau X : Cycles de température utilisés lors de la PCR destinée au métabarcoding

	30 cycles				
5 min	15 s	30 s	1 min	5 min	
94,0°C	94,0°C	50,0°C	68,0°C	68,0°C	

Afin de s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification, une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % a été réalisée. Les produits PCR obtenus ont alors été purifiés à l'aide du protocole Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). La quantification des produits PCR purifiés a été réalisée par électrophorèse capillaire à l'aide d'un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies) et du kit DNA 1000 (Agilent Technologies).

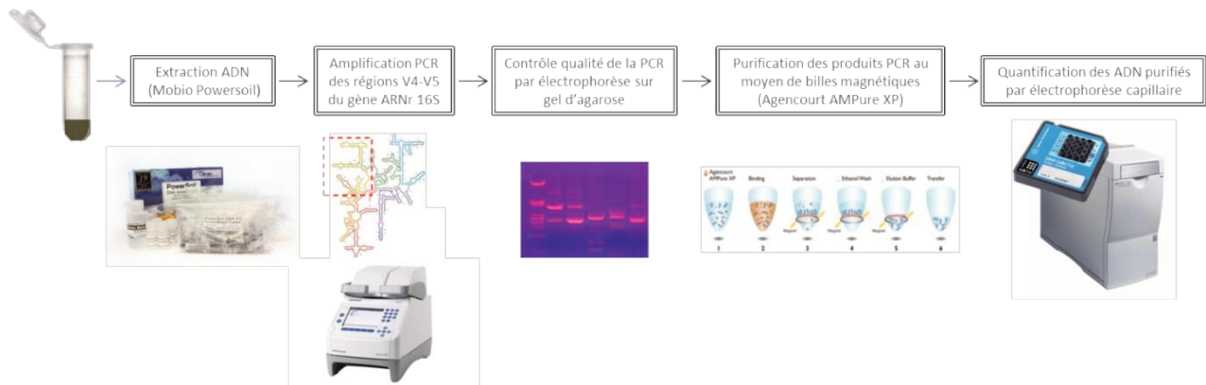


Figure 23 : Protocole de préparation de la librairie destinée au séquençage

Les librairies obtenues pour chaque échantillon ont été diluées à 100 pM avant d'être mélangées dans une solution équimolaire de 100 pM. Une PCR en émulsion a ensuite été réalisée sur le système Ion One-Touch™ 2 (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du kit Ion PGMTM Template OT2 400 afin de préparer la matrice de séquençage (template) contenant les Ion Sphere™ Particles (ISP). Les échantillons ont été séquencés grâce à l'automate Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) en utilisant des puces Ion 316 selon le protocole du kit Ion PGM Sequencing 400. Le logiciel du PGM a été programmé pour réaliser un contrôle qualité sur les séquences obtenues. Les séquences de faible qualité et les polyclonales ont été retirées du jeu de données final.

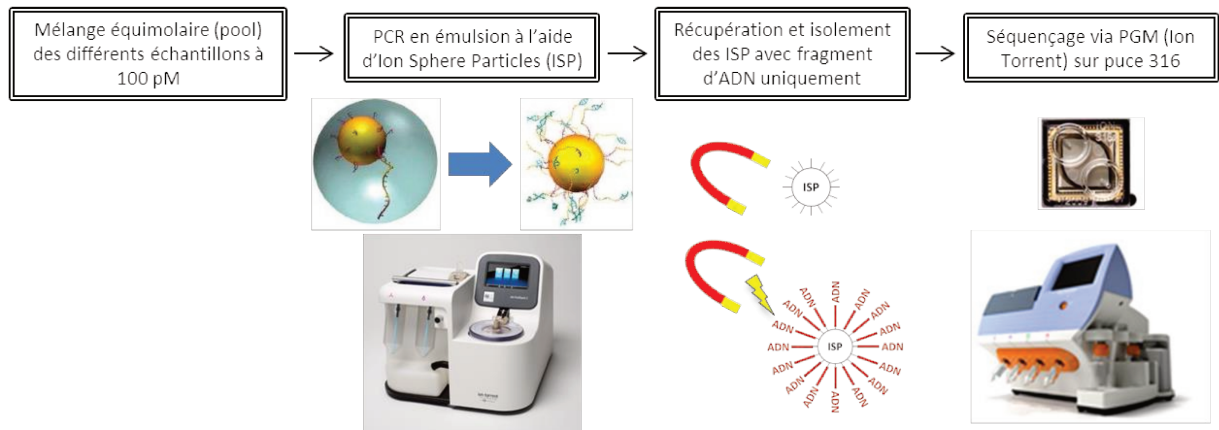


Figure 24 : Protocole de préparation de la matrice de séquençage

4 Biostatistique

4.1 Prétraitement des données de biologie moléculaire

4.1.1 Profils ARISA

Les profils d'ARISA ont été traités avec le package StatFingerprints 2.0 implémenté sous R 2.7.1. Celui-ci permet de réaliser des opérations d'alignement, et de normalisation des électrophorégrammes nécessaires à l'homogénéisation des données avant leur analyse statistique. Les différentes étapes de prétraitement des profils ARISA par ce package sont présentées dans la Figure 25.

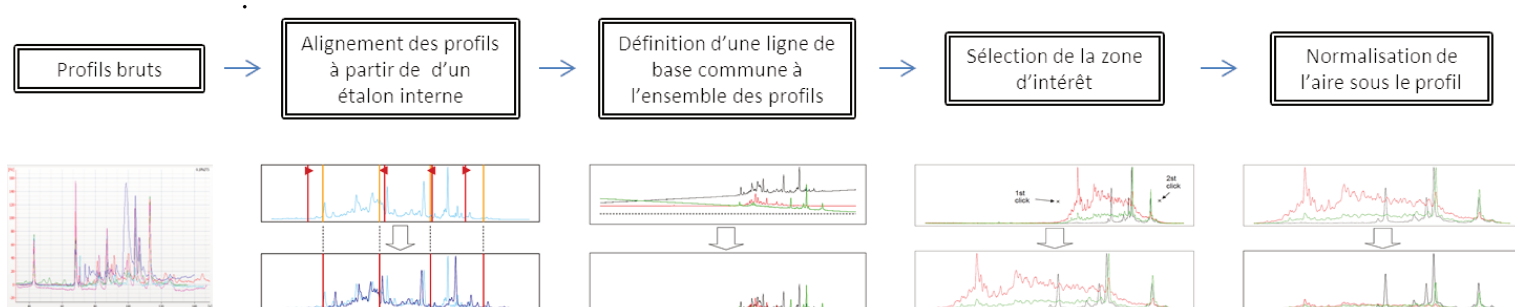


Figure 25 : Récapitulatif des principales étapes de prétraitement des profils ARISA

4.1.2 Données de séquençage

Les données issues du séquenceur PGM ont été traitées à l'aide d'un pipeline d'analyse développé au sein de l'équipe BIOMIC. Les séquences brutes ont tout d'abord été filtrées à l'aide du pipeline UPARSE mis en œuvre dans USEARCH v8.0.1623. La taille des séquences pour laquelle l'assignation taxonomique a été réalisée a été fixée à 200 paires de bases. Les séquences dont la longueur était inférieure à ce seuil ont été supprimées du jeu de données. Les séquences restantes ont quant à elle été tronquées à 200 paires de bases. Par ailleurs, les séquences comportant plus d'une erreur ont également été éliminées. Les séquences ont ensuite été triées par abondance. Les séquences n'ayant été retrouvées qu'une fois dans le jeu de données (appelées singletons) n'ont pas été conservées pour la suite de l'analyse. Afin de diminuer le temps d'analyse, seul un exemplaire de chacune des séquences restantes a été conservé pour l'assignation taxonomique. Les séquences chimériques ont été identifiées grâce au pipeline UCHIME en confrontant les séquences à la base de données « gold » (<http://drive5.com/uchime/gold.fa>). Les séquences restantes ont ensuite été regroupées en Operational Taxonomic Units (OTUs). Le seuil de similarité a été fixé à 97 % par une méthode de recherche des plus proches voisins. Les OTUs obtenues ont été assignées à une affiliation taxonomique grâce au pipeline mothur v.1.25.0 et à la base de données Silva 119. Le seuil de confiance a été fixé à 0.8. Cette assignation a été réalisée sous QIIME 1.8.0.

4.2 Analyse statistique

Les différents jeux de données issus des analyses physico-chimiques et de biologie moléculaire ont été examinés par la méthode d'analyse en composantes principales (ACP). Cette méthode d'analyse multivariée est une technique descriptive permettant d'étudier les relations qui existent entre différentes variables, sans tenir compte, a priori, d'une quelconque structure. Le but de l'ACP est d'identifier la structure de dépendance entre des observations multivariées afin d'obtenir une représentation compacte de ces dernières grâce à la projection des données sur différents axes factoriels. Les ACP ont été réalisées à l'aide du package ADE4 v1.7.2 sous R v3.1.2 dans l'environnement R Studio v0.98.1091. Les figures ont été produites grâce au package adegraphics 1.0.3.

5 Présentation des différentes séries d'expérimentation

5.1 Expérimentations menées en digesteurs batchs

5.1.1 Influence du niveau d'inhibition par le phénol et par l'azote ammoniacal sur la réponse d'un écosystème de la digestion anaérobie

Une première série d'expérimentation, menée dans des dispositifs batchs, avait pour objectif de caractériser l'influence de différents niveaux de perturbation sur les performances de la digestion anaérobie. Pour ce faire, une gamme de dix concentrations permettant d'obtenir un panel d'inhibition allant jusqu'à un blocage complet du système a été établie pour chacun des inhibiteurs à partir de la bibliographie existante. Ces dernières sont présentées dans le Tableau XI.

Tableau XI : *Gammes d'inhibition*

Inhibiteur	Gammes d'inhibition									
Phénol (g/L)	0,00	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	2,00	5,00
NH ₄ (g N-NH ₄ /L)	0,00	0,50	1,00	1,50	2,50	5,00	7,50	10,00	25,00	50,00

Les incubations étant réalisées en triplicat, 60 microcosmes ont été incubés lors de cette étude. La Figure 26 récapitule l'ensemble des prélèvements et des analyses effectuées lors de cette série d'expérimentation

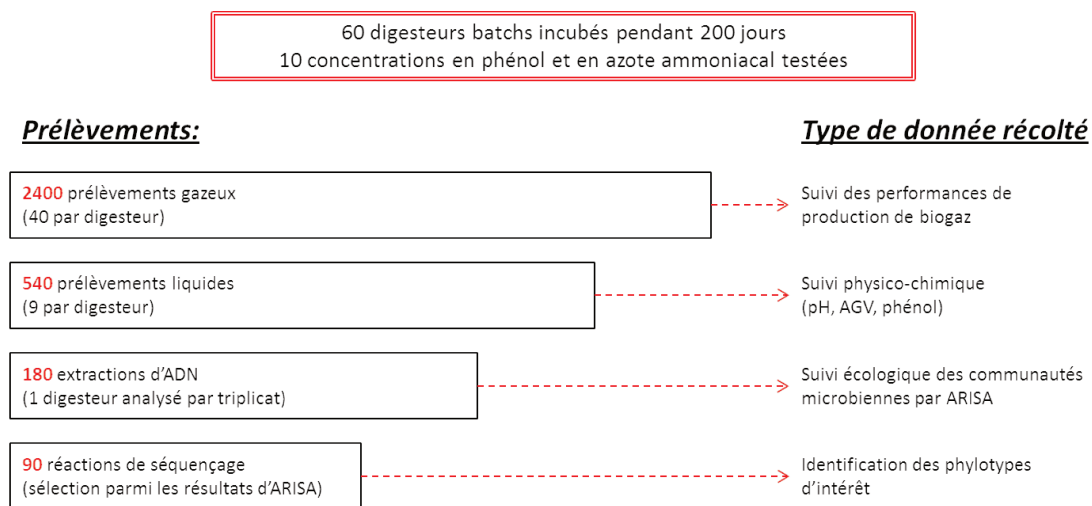


Figure 26 : Bilan analytique de la série d'expérimentation portant sur les inhibitions en digesteurs batchs

5.1.2 Influence de la présence de supports actifs *sur la réponse d'un écosystème de la digestion anaérobie perturbé par le phénol et par l'azote ammoniacal*

La deuxième série d'expérimentation visait à mettre en place des stratégies opératoires innovantes permettant de limiter les phénomènes d'inhibition. Pour ce faire, l'influence de l'apport de cinq supports actifs a été testée indépendamment en présence d'une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) pour chacun des deux inhibiteurs préalablement étudiés. Les concentrations en zéolithes et en charbon actifs ont été fixées à 10 g/L tandis que celle du chitosan a été fixée à 1,0 g/L. Un microcosme témoin ne contenant pas de support a également été étudié. Les incubations étant réalisées en triplicat, deux séries de 18 batchs ont ainsi été incubées ; l'une en présence d'azote ammoniacal, l'autre en présence de phénol. Une troisième série de microcosmes témoins constituée également de 18 batchs a également été préparée afin d'étudier l'effet de l'ajout de ces supports en l'absence d'inhibiteur. Une description schématique de cette série d'expérimentation est présentée en Figure 27.

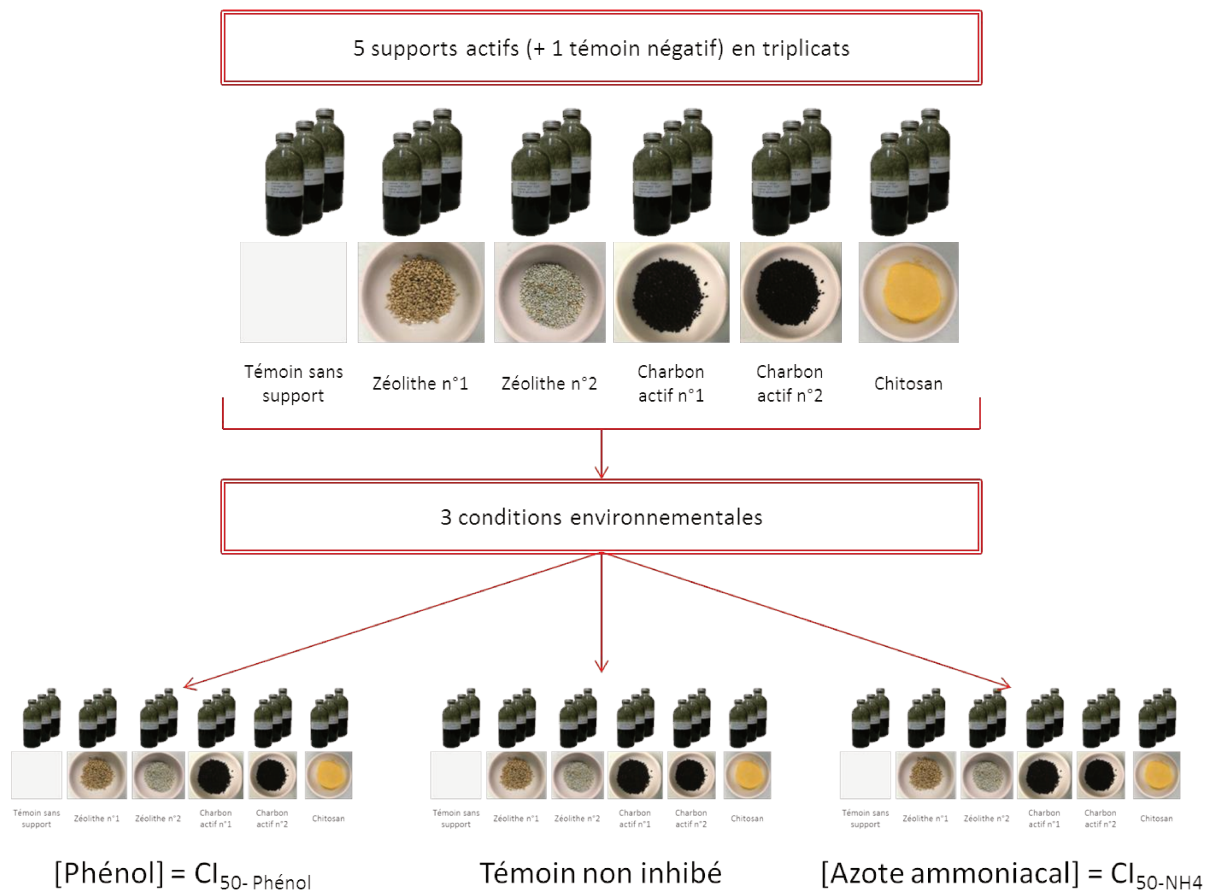


Figure 27 : Schéma récapitulatif de la série d'expérimentation portant sur l'utilisation de supports actifs en digesteurs batchs

L'effet des différentes stratégies sur les dynamiques microbiennes et leur métabolisme a été caractérisé afin de comprendre les potentiels mécanismes de résistance induits par ces supports. L'objectif de cette étude était de proposer des solutions opérationnelles transposables sur des réacteurs continus afin d'améliorer la stabilité des digesteurs anaérobies

face à différents types d'inhibition. Le bilan analytique associé à cette série d'expérimentation est présenté en Figure 28.

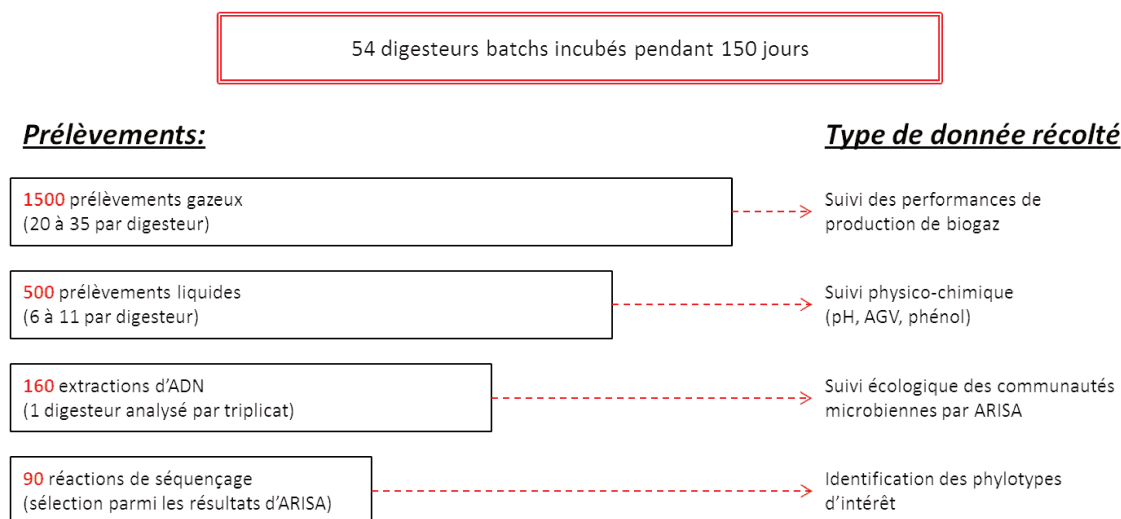


Figure 28 : *Bilan analytique de la série d'expérimentation portant sur les supports actifs*

5.2 Expérimentations menées en digesteurs semi-continus

5.2.1 Influence d'une montrée progressive de la concentration en phénol sur les performances et la composition microbienne de réacteurs semi-continus

L'objectif de cette première expérimentation consistait à perturber le fonctionnement de trois réacteurs semi-continus, inoculés initialement avec le même écosystème microbien, en augmentant progressivement la concentration en phénol au sein du milieu réactionnel. Le quatrième réacteur a été conservé comme témoin non inhibé.

L'épisode de perturbation par le phénol a été démarré après avoir observé une période de stabilisation des performances des quatre réacteurs d'une durée de 4 TSH, soit 88 jours en conditions non inhibitrices. Pour cela, l'alimentation de trois digesteurs a été dopée en phénol à hauteur de 2,5 g/L afin d'atteindre une concentration théorique équivalente à la CI_{50} -Phénol à l'issue d'un TSH. La concentration en phénol a ensuite été maintenue constante pendant un TSH.

L'effet de cet inhibiteur sur les performances de la digestion anaérobie a été étudié grâce au suivi de la production et de la composition du biogaz. La réponse des communautés microbiennes à cet épisode de perturbation a quant à elle été évaluée par séquençage. Les réponses macroscopiques et microscopiques d'un triplicat de digesteurs semi-continus ont ainsi pu être comparées.

5.2.2 Effet de l'ajout de supports actifs sur les performances et la composition microbienne de réacteurs semi-continus perturbés par le phénol

La seconde série d'expérimentation avait pour objectif d'étudier l'impact de l'ajout de deux supports actifs sur les performances des digesteurs semi-continus en présence d'une concentration inhibitrice en phénol.

Deux supports ont été sélectionnés à la suite de l'étude menée en réacteurs batchs pour leur efficacité à contrer l'action inhibitrice du phénol sur la digestion anaérobie. Il s'agit du charbon actif n°1 et de la zéolithe n°1. Ces deux supports ont été ajoutés parallèlement dans deux des réacteurs inhibés par le phénol afin d'obtenir une concentration de 10,0 g/L. Le troisième réacteur inhibé a été conservé comme témoin sans support. L'effet de ces supports sur les performances ainsi que sur la réponse des groupes microbiens fonctionnels composant l'écosystème des digesteurs ont été étudiés.

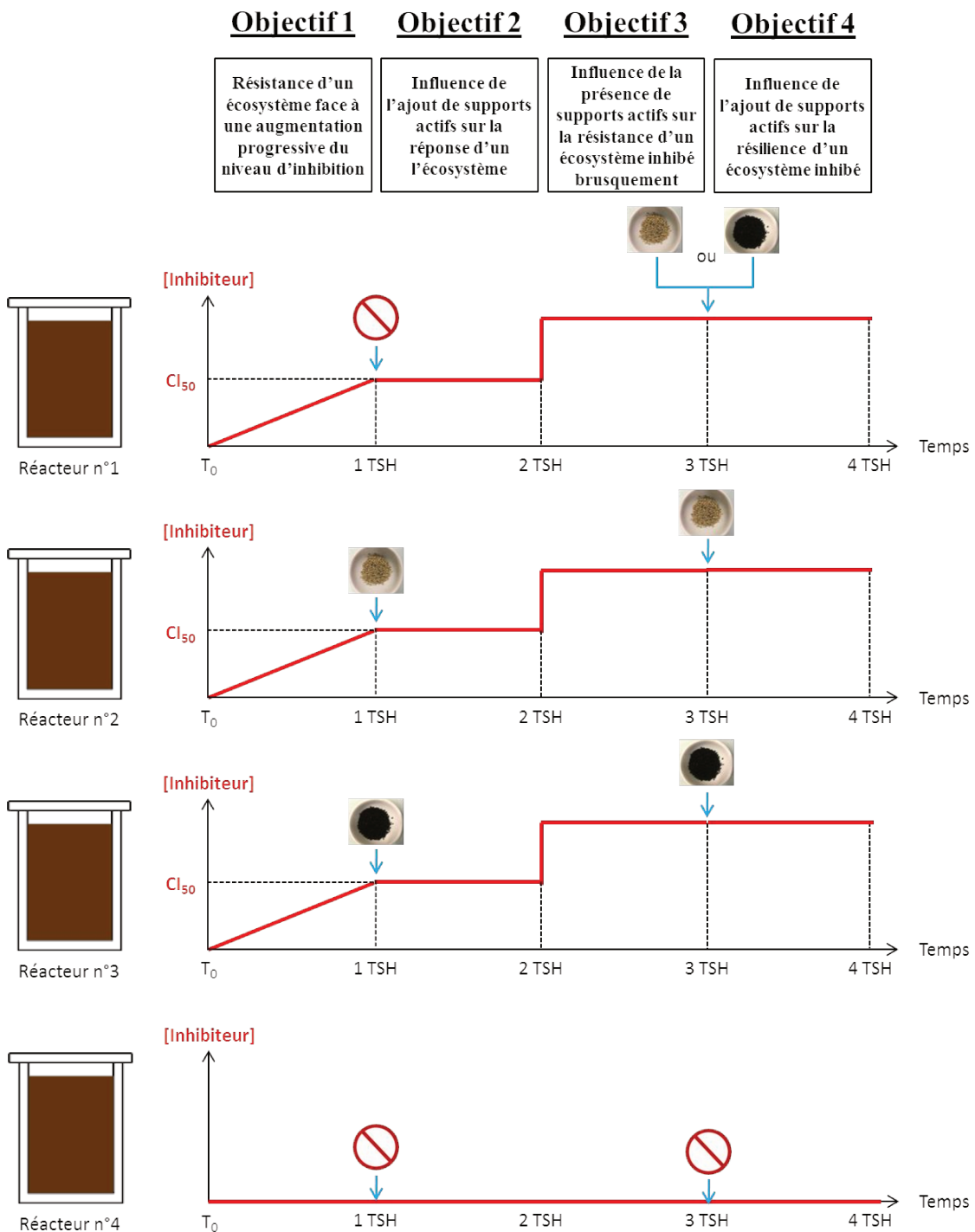


Figure 29 : Schéma récapitulatif des expérimentations menées en digesteurs semi-continus

RÉPONSE D'UN ÉCOSYSTÈME
ANAÉROBIE À DIFFÉRENTS NIVEAUX
D'INHIBITION PAR LE PHÉNOL ET
L'AZOTE AMMONIACAL

Devant la grande variété de composés chimiques susceptibles d'inhiber la digestion anaérobie, de nombreuses études ont cherché à caractériser la capacité de résistance d'inocula issus de digesteurs industriels. Cependant, plusieurs facteurs influent significativement sur les seuils d'inhibition obtenus pour chacun des perturbateurs étudiés. En effet, l'ensemble des paramètres environnementaux tels que l'origine de l'inoculum, le pH, le substrat, la température, ou encore le type et le mode de fonctionnement des digesteurs utilisés pour ce type d'étude ont une importance cruciale sur l'effet inhibiteur de chaque composé sur la digestion anaérobie. Par conséquent, il n'est pas rare de retrouver au sein de la littérature scientifique, et ce pour la même molécule, une large gamme de seuils d'inhibition. En outre, et du fait de limitations méthodologiques, la plupart de ces études se focalisaient essentiellement sur l'impact de différents niveaux de perturbation sur les performances macroscopiques de digesteurs anaérobies telles que la production de biogaz et la dégradation de la matière organique. Dans ce contexte, les premières séries d'expérimentations présentées dans ce manuscrit avaient pour objectif, pour le couple inoculum-substrat étudié, de caractériser d'un point de vue microbiologique la réponse d'un écosystème microbien soumis à différentes concentrations en inhibiteurs.

Pour ce faire, deux inhibiteurs ont été sélectionnés. Il s'agit de l'azote ammoniacal et du phénol. L'azote ammoniacal (sous sa forme libre NH_3 ou ionique NH_4^+) est notamment libéré lors de la décomposition des matières riches en protéines. Comme il n'existe pas de réaction efficace permettant d'éliminer l'azote ammoniacal en conditions anaérobies, celui-ci peut rapidement s'accumuler et devenir toxique pour les micro-organismes. Le phénol est quant à lui présent dans de nombreux effluents industriels issus des industries chimiques et alimentaires. Il peut également être formé au sein même des digesteurs lors de la dégradation de déchets lignocellulosiques. Il peut être dégradé en conditions anaérobies à faible concentration. Toutefois, et ce même à faible concentration, sa présence est néfaste pour le fonctionnement de la digestion anaérobie.

Une étude bibliographique a tout d'abord été menée en amont de cette expérimentation afin de définir, pour chacun des inhibiteurs étudiés, une gamme de dix concentrations inhibitrices permettant d'atteindre le blocage complet de la production de méthane. Les expérimentations ont été réalisées en digesteurs batchs et en triplicat. Afin de caractériser la réponse microbiologique de l'écosystème, une première approche a consisté à utiliser une méthode d'empreinte moléculaire (ARISA) pour définir des seuils structurels d'inhibition. Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide d'une méthode statistique d'analyse multivariée (l'ACP) afin de sélectionner des échantillons d'intérêt pour leur séquençage. Les résultats issus du séquenceur ont également été traités par ACP afin de déterminer les phylotypes représentatifs de la réponse de l'écosystème microbien aux différents niveaux de perturbation.

Les principaux résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme de deux publications. La première, portant sur l'inhibition par l'azote ammoniacal a été publiée dans «*Bioresource Technology* » et s'intitule «*Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration : Identification of key microbial phylotypes* ». Celle-ci s'attache à présenter les différents shifts de populations en réponse à divers niveaux de perturbation et notamment en présence d'une concentration extrême en azote ammoniacal pour laquelle peu d'études ont observé une production de méthane. La seconde, portant sur le phénol, a été publiée dans «*Water Research* » et s'intitule «*Community shifts within anaerobic digestion*

microbiota facing phenol inhibition: Towards early warning microbial indicators?”. Cet article décrit les modifications microbiologiques induites par des concentrations en phénol pour lesquelles les performances macroscopiques de la digestion anaérobie n'ont pas été affectées. La possibilité de définir des indicateurs microbiens précoces alertant sur la présence d'inhibiteurs a ainsi pu être discutée.

1 Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: identification of key microbial phylotypes

Author names and affiliations

Simon Poirier^{a*}, Elie Desmond-Le Quémener^a, Céline Madigou^a, Théodore Bouchez^a, Olivier Chapleur^a

^a Hydrosystems and Bioprocesses Research Unit, Irstea,

1 rue Pierre-Gilles de Gennes, CS 10030, 92761 Antony Cedex, France

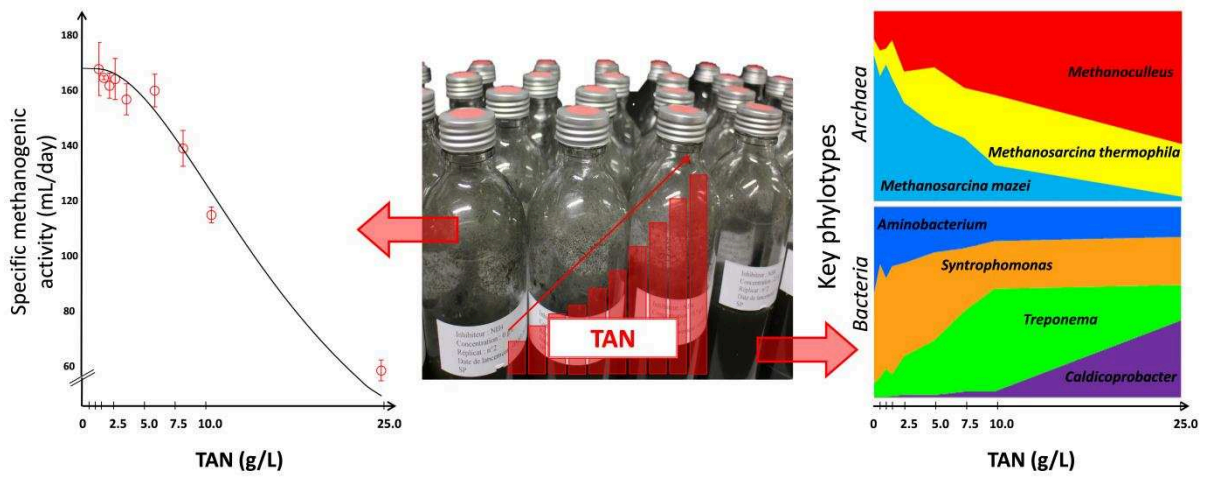
Abstract

Ammonia inhibition represents a major operational issue for anaerobic digestion (AD). In order to get more insights into AD microbiota resistance, anaerobic batch reactors performances were investigated under a wide range of Total Ammonia Nitrogen (TAN) concentrations up to 50.0 g/L at 35°C. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value was determined to be 19.0 g/L. Microbial community dynamics revealed that above a TAN concentration of 10.0 g/L, remarkable modifications within archaeal and bacterial communities occurred. 16S rRNA gene sequencing analysis showed a gradual methanogenic shift between two OTUs from genus *Methanosarcina* when TAN concentration increased up to 25.0 g/L. Proportion of potential syntrophic microorganisms such as *Methanoculleus* and *Treponema* progressively raised with increasing TAN up to 10.0 and 25.0 g/L respectively, while *Syntrophomonas* and *Ruminococcus* groups declined. In 25.0 g/L assays, *Caldicoprobacter* were dominant. This study highlights the emergence of AD key phylotypes at extreme ammonia concentrations.

Key words

Ammonia, IC₅₀, ARISA, 16S rRNA gene sequencing, Principal component analysis

Graphical abstract



1.1 Introduction

Anaerobic digestion (AD) is a bioprocess widely implemented to stabilize organic waste and simultaneously produce methane-rich biogas which can be used to generate energy and heat. However, anaerobic microorganisms responsible for biological conversion of organic material into methane (CH₄) are vulnerable to a wide variety of inhibitory substances or factors which result in decreased production yields and potentially in process failure (Chen et al., 2008). For example, high concentration of ammonia is regularly mentioned as the primary cause of digester failure (Yenigün & Demirel, 2013), even though nitrogen is an essential nutrient for the growth of microorganisms at low level. Many traditional AD substrates such as livestock manure, slaughterhouse byproducts and food industrial residues contain a high nitrogen concentration due to the presence of organic nitrogen such as urea and proteins which readily release ammonia upon digesters during their anaerobic degradation (Rajagopal et al., 2013).

Total ammonia nitrogen, abbreviated as TAN, is a combination of unionized free ammonia (FAN or NH₃), and ammonium ion (NH₄⁺). The chemical equilibrium between FAN and TAN concentrations mainly depends on pH and temperature (Anthonisen et al., 1976). Additionally, ionic strength is also supposed to have a significant influence on FAN concentration particularly in concentrated solutions (Nielsen et al., 2008). FAN is considered more toxic to anaerobes than TAN. The most widely accepted mechanism explaining FAN inhibition is based on change of intracellular pH due to its passive diffusion through cell walls, increasing the maintenance energy requirement and inhibiting specific enzyme reactions (Wittmann et al., 1995).

TAN has been reported to induce 50% reduction in CH₄ production at a wide range concentrations varying from 1.7 g/L to 14.0 g/L (Chen et al., 2008). According to Sung and Liu, total inhibition occurs in the range of 8.0-13.0 g/L of TAN depending on pH and inoculum (Sung & Liu, 2003). Similarly, toxic effect of FAN was observed from 150 mg/L to 1200 mg/L (Rajagopal et al., 2013; Yenigün & Demirel, 2013). The wide range of inhibiting FAN or TAN concentrations can be ascribed to the differences in nature of substrates, environmental conditions (pH, temperature, hydraulic retention time) and acclimation of inoculum (Van Velsen, 1979).

The inhibitory effect of ammonia is known to mainly influence the phase of methanogenesis in bioreactors (Calli et al., 2005). Under ammonia stress, acetotrophic methanogens are usually considered to be more vulnerable than the hydrogenotrophic ones (Angelidaki & Ahring, 1993; Koster & Lettinga, 1984). Thanks to stable isotope-based analytical techniques, a metabolic shift in methanogenesis from the acetoclastic mechanism to the syntrophic pathway in which hydrogenotrophic methanogens are involved, was pointed out by Schnürer and Nordberg when ammonia concentration increases (Schnürer & Nordberg, 2008). Other studies revealed that increasing concentrations of ammonia induced a growth of Syntrophic Acetate Oxidation Bacteria (SAOB) and hydrogenotrophic methanogens (Karakashev et al., 2006; Westerholm et al., 2012). Nevertheless, in these latter studies, acetoclastic methanogens were still detected. Conflicting results tended to demonstrate that acetoclastic methanogenesis was predominant under ammonia stress (Calli et al., 2005; Fotidis et al., 2014b). Furthermore, Hao et al. indicated that besides the SAO pathway,

acetoclastic methanogenesis catalyzed by *Methanosarcina* spp was still activated at high ammonia levels (Hao et al., 2015).

The aim of the present study was to assess the amplitude of the inhibition effect of ammonia on AD over a wide range of concentrations. AD performance degradation patterns were investigated until reaching a total inhibition of biogas production at extremely high ammonia levels up to 50.0 g/L of TAN. Further objectives were to describe the impact on microbial communities' dynamics and to identify the key phylotypes involved in ammonia resistance within AD microbiota.

1.2 Materials and methods

1.2.1 Experimental set-up

30 anaerobic batch bioreactors were set up using serum bottles (1000 mL, working volume of 500 mL). All digesters were initially seeded with 20 g of centrifuged methanogenic sludge as inoculum. 50 g of mashed biowaste were added as substrate corresponding to an initial organic loading of 10 (12 g COD as substrate vs 1.2 g COD as inoculum). Biochemical CH₄ potential buffer (International Standard ISO 11734 (1995)) was added to reach a total working volume of 500 mL. Mashed biowaste was provided by an industrial food waste deconditioning unit (Chemaudin, France). Inoculum was sampled from a 50 L laboratory anaerobic bioreactor incubated at 35°C. This reactor had been previously inoculated with 20 L of methanogenic sludge collected from a full-scale mesophilic digester treating wastewater primary and excess biological sludge in a municipal wastewater treatment plant (Achères, France) and fed with mashed biowaste in order to acclimatize the microbial consortium to this substrate.

NH₄Cl (99.998%, Sigma Aldrich) was added in order to reach 10 different TAN concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 25.0 and 50.0 g/L). Consequently, pH was measured for each sample in order to determine FAN concentration. Resultant TAN and FAN concentrations at the beginning of each digestion test were slightly different from the planned ones. This was mainly attributed to the background TAN concentrations contained in the substrate and inoculum. Initial equivalent FAN concentrations ranged from 47 mg/L up to 494 mg/L. All incubations were performed in triplicates.

The 30 bioreactors thus set up were sealed with a screw cap and a rubber septum and headspaces were flushed with N₂ (purity>99.99%, Linde gas SA) in order to assure anaerobic conditions. Time zero (T₀) samples were taken and all reactors were incubated statically, in the dark, at 35°C. Liquid samples (8 mL) were periodically taken through the septum and centrifuged at 10 000 x g for 10 minutes. The pellets and supernatant thus obtained were stored separately at -20°C for analysis of biomass and chemical parameters respectively. Digestion tests were run for 160 days until all daily biogas productions decreased below 10 mL.

1.2.2 Analytical methods

Biogas accumulation in the headspace was measured using a differential manometer (Digitron 2082P). Headspace gas analysis was performed using a micro GC (CP4900, Varian) as described in Chapleur et al., (2014). These data were used to calculate gas production and composition, at standard temperature and pressure. Grofit package of R CRAN software (version 3.1.2) was employed to fit the cumulative CH₄ production data to a modified Gompertz three-parameter model (Eq 1) where M(t) is the cumulative CH₄ production (mL) at time t (d); P is the ultimate CH₄ yield (mL); R_{max} is the maximum CH₄ production rate (mL/d); λ is the lag phase (d); e is the exponential.

$$M(t) = P \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{\max} \times e}{P} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \text{ (Eq.1)}$$

The impact of ammonia on AD performance was evaluated by calculating the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value. R_{max} values were plotted for the different incubation as a function of initial TAN concentration. As described in Chapleur et al. (2015), this curve was fitted to the Hill model by non-linear regression using the algorithm of Marquard and a non-linear regression program proposed by Duggleby (Chapleur et al., 2016).

Volatile Fatty Acids (VFA) concentrations were measured by ionic chromatography coupled to conductometric detection, using a Dionex 120 equipped with IonPac ICE-AS1 column (9 mm x 250 mm). The mobile phases were heptafluorobutyric acid (0.4 mmol/L) and tetrabutylammonium hydroxide (5 mmol/L). Acetate, propionate, butyrate, lactate, formate and valerate were quantified.

Ammonium concentration was measured according to the Nessler's reagent colorimetric method following the French standard (NF T 90-015). FAN concentration was calculated from the equilibrium of Eq.2 (Anthonisen et al., 1976):

$$FAN = \frac{10^{pH}}{\exp\left(\frac{6334}{T}\right) + 10^{pH}} \times TAN \text{ (Eq.2)}$$

Where T represents the temperature (K).

1.2.3 Analyses of microbial community

Total DNA was extracted from the pellet using Powersoil™ DNA isolation kit (Mobo Laboratories Inc. Carlsbad) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA concentrations were quantified using a quantifying fluorescent dye assay (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen, Eugene) and Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, Eugene).

ARISA method was performed with a capillary electrophoresis bioanalyzer (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara) using the Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies) to analyze Bacteria and Archaea as described in Chapleur et al., (2015).

The DNA extracted by the above mentioned method was used for the amplification of the bacterial and archaeal hypervariable region V4-V5 of the 16S rRNA genes with the primers 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3') (Wang et al., 2007) and 928R (5'-CCCGYCAATTCMTTTRAGT-3') (Wang & Qian, 2009). More precisely, fusion method was employed (IonAmplicon Library Preparation (FusionMethod) Protocol, Revision C). The forward primer was modified by the addition of a PGM sequencing adaptor (adaptor A: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') and a barcode (5'-adaptor A-Barcode-515F-3'). The reverse primer was modified by the addition of a PGM sequencing adaptor (adaptor trP1: 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3') (5'-adaptor trP1-928R-3'). V4-V5 region was amplified according Platinum Pfx Supermix protocol (Life Technologies) in a 50 µL reaction mixture containing 5µL of Pfx amplification buffer (10X), 1.5 µL of dNTP mix (10mM each), 1µL of MgSO₄ (50mM), 1.5 µL of each primer (10µM) 0.4µL of PlatinumPfx DNA polymerase, 38.1µL of water and 1µL extracted DNA (10 to 200 pg). The mixture was held at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 15 sec, 50°C for 30 sec and 68°C for 1 min, and a final extension step at 68°C for 5 min. Quality and specificity of the amplification was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel. PCR products were cleaned using the Agencourt AMPure XP magnetic beads purification system (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions except that 60 µL of beads were used instead of 90 µL. Quantification was realized with a capillary electrophoresis bioanalyzer (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara) using the Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies). Purified libraries were diluted (in a first step at 500 pM and then at 100 pM). Equal volumes of amplicons were then combined in equimolar concentrations (100pM) for sequencing. Emulsion PCR was carried out to prepare template-positive ISPs containing clonally amplified DNA, using the Ion PGM™ Template OT2 400 Kit with the Ion OneTouch™ 2 Instrument. The template-positive ISPs were enriched with the Ion OneTouch™ ES according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed on Ion Torrent Personal Genome Machine using Ion 316 chip and the Ion PGM Sequencing 400 Kit according to the manufacturer's instructions. The PGM software filtered out low quality and polyclonal sequence reads, and quality filtered data was exported as FastQ file. 10000 to 40000 high quality reads were generated for each sample. Representative sequences of major OTUs were introduced in the ARB software (Ludwig et al., 2004) to check the quality of taxonomic assignments and infer bacterial species when possible.

1.2.4 Data processing

ARISA profiles were imported into the StatFingerprints R package and processed as described in Chapleur et al., (2015) before statistical analysis. 16S rRNA tag reads were quality checked by three amplicon read processing pipelines (mothur v.1.25.0 (Schloss, 2009), QIIME 1.8.0 (Caporaso et al., 2010) and UPARSE as implemented in USEARCH v8.0.1623 (Edgar, 2013)). Raw sequence reads were filtered before subsequence analyses to minimize the effect of random sequencing errors. Short sequences with less than 200 bp were discarded; the remaining ones were arbitrarily truncated to 200 bp and filtered for quality, keeping only those with expected errors below 1. Sequences were then dereplicated, and sorted by abundance. Sequences occurring only once (singletons) were removed from the dataset. Reads checked as chimeric artifact were eliminated using UCHIME (Edgar et al., 2011) against the “gold” database (<http://drive5.com/uchime/gold.fa>). Resulting sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity levels using furthest neighbor approach. OTU sequences were assigned to a taxonomic lineage using QIIME against Silva database release 119 with a minimum confidence of 0.8 (Quast et al., 2013). OTU tables and taxonomy summary files were generated with QIIME. Representative sequences of major OTUs were introduced in the ARB software (Ludwig et al., 2004) to check the quality of taxonomic assignments and infer bacterial species when possible. The phylogenetic tree was computed with PhyML using the GTR model with optimized equilibrium frequencies, a gamma correction to take into account the heterogeneity of evolutionary rates across sites (four discrete classes of sites, an estimated alpha parameter and an estimated proportion of invariable sites) and SPR & NNI topology searches with five random starting trees. It was then edited with the ape package from R software.

1.2.5 Statistical analysis

R CRAN software (version 3.1.2) was used to compare all molecular data statistically. In order to get more insights into the similarity between sample community structures and to investigate the relationships between samples among molecular and physicochemical data, centered not scaled principal component analyses (PCA) were implemented by using ADE4 R package on both ARISA profiles and 16S rRNA tags datasets. Archaeal and bacterial diversities were analyzed separately. As ARISA analyses were performed at different dates (generally immediately after samples collection), within-class PCAs were performed for ARISA data to ensure that no methodological aspect linked to the date of analysis brought any bias. With a view to evaluate the influence of ammonia on microbial dynamics, profiles were plotted and clustered within the PCA with color scales corresponding to initial TAN concentration. Figures were produced with Adegraphics R package.

1.3 Results and discussion

1.3.1 Effect of increasing ammonia concentrations on the characteristics of anaerobic digestion

1.3.1.1 Ammonia concentration dynamics

Data about TAN, FAN and pH are shown in Figure 36. Initial TAN values within the bioreactors varied from 0.8 to 43.5 g/L. Slight spontaneous increases in TAN levels were observed in the early days of incubation. This was mainly attributed to release of ammonia during degradation of protein from the biowaste. TAN values remained stable throughout the experiment indicating no ammonia was released in the headspace in gaseous form. Since 50% reduction in CH₄ production had been reported between 1.7 g/L to 14.0 g/L of TAN (Chen et al., 2008), 8 out of the ten TAN levels assays were selected below 10.0 g/L. Nonetheless, since de Baere et al. had reported initial TAN inhibition at 30.0 g/L, two extreme concentrations (25.0 and 50.0 g/L which respectively resulted in initial TAN concentrations of 21.0 and 43.5 g/L) were also chosen to reach complete inhibition of AD (de Baere et al., 1984).

pH values were relatively constant circa 7.5-8.0 for each operating condition except for the highest initial TAN concentration for which it dropped under 7.0. The lack of remarkable variations in pH values could be attributed to the biochemical CH₄ potential buffer used as liquid media but also to ammonia which plays an important buffering role and thus stabilizes pH in the AD process (Rajagopal et al., 2013).

Consequently, initial FAN levels which were calculated from TAN and pH values varied between 47 and 494 mg NH₃-N/L. This range of concentrations was comparable to literature in which toxic effect of FAN was reported from 150 mg/L to 1200 mg/L.

1.3.1.2 Influence of increasing levels of ammonia on biogas production kinetics

Figure 30A shows the evolution during time of the cumulated CH₄ production of the different assays. CO₂ cumulated productions are presented in supplementary material (Figure 37). As TAN concentration increased, rate and level of total CH₄ production decreased progressively. Ultimate CH₄ production declined respectively with increasing TAN concentration from 4900 mL in the control assays to 4050 mL at 25.0 g/L. In 50.0 g/L bioreactors, methanogenesis was completely inhibited after 10 days. To analytically compare the cumulative production curves, kinetic constants derived by fitting experimental data with Eq.1 (Gompertz equation) were calculated and presented in supplementary material (Tableau XII).

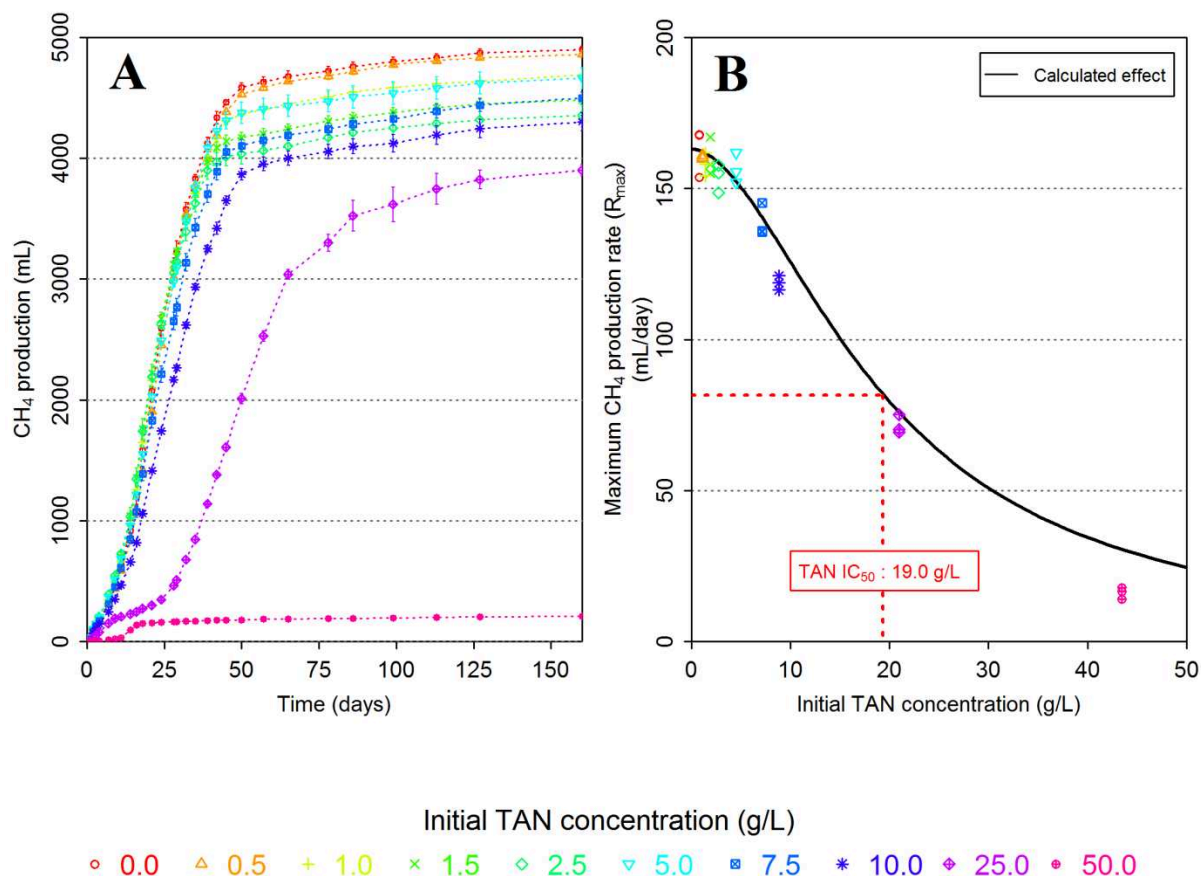


Figure 30 : (A) Cumulated CH₄ production (mL) over time (number of days) and (B) specific methanogenic activity for the different concentrations of TAN (g/L). Mean values of triplicate bioreactors are presented for CH₄ production, error bars represent standard deviation within triplicates. All experimental specific methanogenic activities (mL/day) values are shown for as well as the average SMA for each triplicate. Calculated fitting of experimental values to the Hill model is shown as well as TAN IC₅₀.

Different inhibition thresholds were observed for the three Gompertz model parameters calculated for both gases. Maximum CH₄ production rates (R_{max}) were not impaired by TAN up to 7.5 g/L. Comparatively, while TAN concentration did not exceed 10.0 g/L, lag times (λ) values were not significantly increased by ammonia concentration. Additionally, CO₂ and CH₄ kinetic constants were not likewise affected by increasing TAN levels. Indeed, CO₂ production started instantly in all bioreactors. CH₄ production was more impaired by ammonia than carbon dioxide implying that archaeal populations were probably more affected than fermenting bacteria. Previous studies reported the same observation (Kayhanian, 1994; Yenigün & Demirel, 2013) even if recent conflicting results were also reported (Wang et al., 2015). Moreover, ammonia seemed to have a greater influence on biogas production kinetics than on final carbon conversion efficiency. Gompertz modeling data obtained from the 25.0 g/L assays demonstrated that, although this extreme TAN concentration strongly slowed down CH₄ production by 56±2%, and increased the lag time by 14 days, ultimate CH₄ yield was only impaired by 19±5%. Comparatively, ultimate CO₂ yields were not significantly affected by TAN up to 25.0 g/L for which 12±3% decrease was observed. It

could be hypothesized that this longer acclimatization phase might be related to rearrangements in microbial community structure.

Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) which limits the specific methanogenic activity by 50% was determined from the correlation plot between R_{max} and TAN concentration and occurred at 19.0 g/L. Figure 30B illustrates this sigmoid correlation. Considering inhibiting TAN concentrations reported in literature, TAN IC_{50} was surprisingly higher (Chen et al., 2008). Similar batch toxicity assays conducted by Sung and Liu, determined 50% decrease in SMA at TAN range of 8.0 - 13.0 g/L with acclimated biomass (Sung & Liu, 2003). De Baere et al., (1984) was the only study in which comparable ammonia resistance was reported. They observed a 50% inhibition in CH_4 production after a shock treatment at 34 g/L of TAN, but in flow-through reactors where biomass was immobilized on polyurethane carrier (de Baere et al., 1984). Due to the high buffering capacity of BMP solution, corresponding FAN IC_{50} was found circa 333 mg/L. FAN IC_{50} calculated was comparable to literature (Rajagopal et al., 2013). This observation confirmed previous results which demonstrated that FAN is more toxic to methanogenesis than TAN (Kayhanian, 1994).

1.3.1.3 VFA accumulation under different ammonia concentrations

VFA accumulation was monitored as shown in supplementary material (Figure 38). Acetic, propionic and butyric acids were detected in the incubations.

TAN level did not significantly influence acetate and propionate accumulation kinetics up to 10.0 g/L. Contrary to these results, butyrate production was impaired by increasing TAN concentrations which tended to limit its accumulation up to 25.0 g/L of TAN. At 25.0 and 50.0 g/L, maximum acetate and propionate concentrations reached the same levels as those observed at lower TAN concentrations. Nevertheless, these VFAs accumulation kinetics were delayed by ammonia. Complete inhibition of these VFAs consumption was induced by 50.0 g/L of TAN. Comparatively to acetate, propionate consumption phase occurred later. Indeed, within the cascade of metabolic interactions of the AD process, propionate oxidation is more thermodynamically unfavorable than butyrate and acetate degradation (Thauer et al., 1977). Therefore, propionate consumption is linked to hydrogen and acetate uptake and occurs preferentially after other VFAs consumption as described by Chapleur et al., (2014).

These results are consistent with CH_4 production kinetics. VFAs accumulation observed in these bioreactors suggested that VFA oxidation communities and archaeal CH_4 producers were potentially impaired by these ammonia levels. High TAN concentrations can induce metabolic shifts in CH_4 formation from acetate by preferentially inactivating aceticlastic methanogens and thus switching to syntrophic pathway, involving acetate-oxidizing bacteria (SAO) and hydrogenotrophic Archaea (Hao et al., 2012; Schnürer & Nordberg, 2008). Hence, acetate accumulation in these bioreactors suggested that at least one of these two syntrophic populations was impaired by ammonia. Propionic and butyric acids degradation is mainly carried by syntrophic VFA oxidizers involved in propionate (Ariunbaatar et al.) and butyrate (SBO) consumption. These populations were similarly inactivated at 50.0 g/L of TAN. Their inhibition can potentially be directly attributed to bactericidal effect of ammonia. Nonetheless, VFA consumption is also inhibited by high levels of hydrogen and acetate.

Thus, inhibition of SPO and SBO could also result from inhibition of hydrogenotrophic methanogens or high acetate level due to SAO populations' inactivation.

1.3.2 Effect of increasing ammonia concentrations on microbial community dynamics

1.3.2.1 Investigation of resistance patterns to ammonia by ARISA fingerprinting

In order to get a general qualitative view of the dynamic of microbial communities, ARISA was selected in a first approach. Although it does not provide information on the identification of the microorganisms, this method enables to analyze a large number of samples. Hence, it provides a sufficient replicated dataset to identify ecological patterns associated with different ammonia levels. 6 out of 10 different sampling dates were processed. Regarding the low standard deviation observed within each triplicate for all previous physicochemical parameters presented, one replicate per initial TAN concentration was used for ARISA analysis. This corresponds to 60 samples for both Archaea and Bacteria. PCAs achieved on all archaeal and bacterial ARISA profiles are presented on Figure 31. Profiles of samples taken in the same incubation were clustered together and presented with different colors.

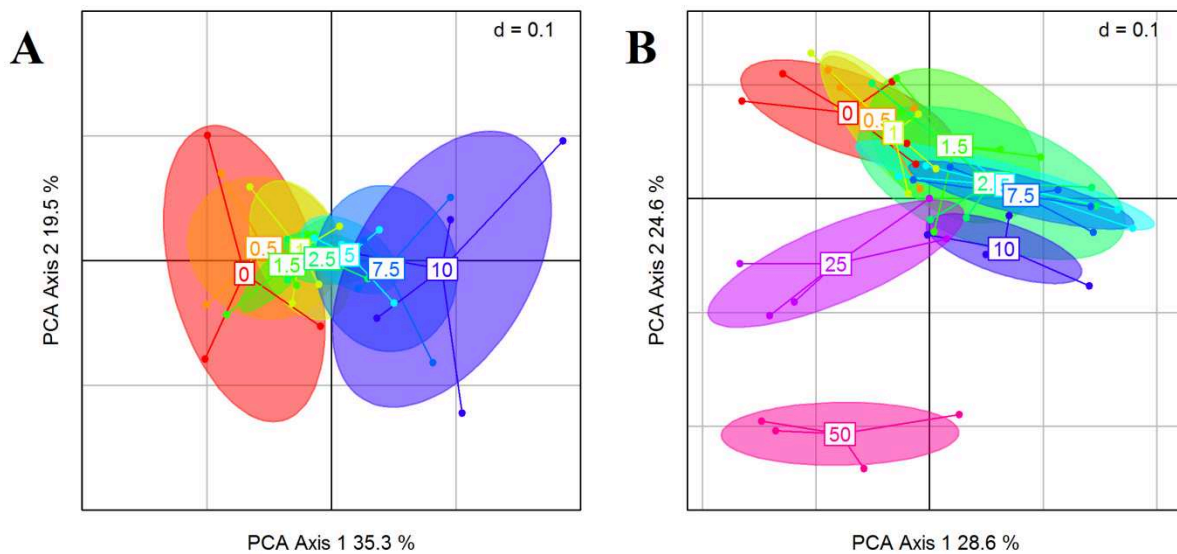


Figure 31 : Principal Component Analysis (PCA) of archaeal (A) and bacterial (B) microbial diversity profiles generated by ARISA. The color scale represents the initial level of Total Ammonia Nitrogen (TAN, g/L). For both Archaea and Bacteria, the first and second axes of the PCA provided the clearest distribution of ARISA profiles with respectively 35.3%-28.6% and 19.5%-24.6% of the total variance.

PCA clearly distinguished different groups of Bacteria profiles. Noticeably, from 0.0 to 10.0 g/L, initial TAN concentrations clusters were mostly recovered on the top part of the factorial plane and evenly distributed along the first principal axis (PCA1). This homogeneous organization could suggest that bacterial communities were progressively affected by TAN up to 10.0 g/L. Contrary to lower concentrations, great changes seemed to occur within bacterial communities of bioreactors initially supplemented with 25.0 and 50.0 g/L. For these latter

levels, clustered samples were clearly isolated from the rest of the profiles, suggesting highly different bacterial communities. Regarding PCA factorial plane, 10.0 g/L appeared as a threshold beyond which bacterial communities seemed more deeply modified by TAN.

PCA computed with all archaeal profiles was less contrasted and did not enable to identify clear inhibition patterns. Indeed, beyond 10.0 g/L of TAN, PCA demonstrated that archaeal populations fluctuated importantly, resulting in a great dispersion within the factorial plane for both 25.0 and 50.0 g/L groups. This could be due to difficult biomass adaptation to these extreme TAN levels throughout the experiment. Since this dispersion compromised interpretations, PCA presented in Figure 31A was performed without including these clusters. Archaeal clusters were uniformly ordered along PCA1 from 0.0 to 10.0 g/L. Similarly to Bacteria results, methanogenic communities were gradually changed up to 10.0 g/L of TAN.

Comparable ammonia thresholds, beyond which microbial communities seemed clearly reshaped, were noticed for both archaeal and bacterial populations. These similar patterns could imply that the inoculum was able to adapt itself to different environmental pressure by simultaneously adapting both community structures and thus maintaining stable microbial interactions. These microbial analyses were consistent with physicochemical results. Up to 10.0 g/L, microbiota was able to rapidly and gradually modify its composition to resist to increasing levels of TAN and thus preserve stable carbon conversion performance. However, CH₄ production as well as VFA consumption delays observed in 25.0 g/L bioreactors could probably be correlated with strong shifts occurring within bacterial and archaeal populations. Contrary to 50.0 g/L assays for which resultant ecosystem was inoperative, these important microbial changes allowed the global ecosystem to overpass the inhibition and thus trigger the methanogenesis. Until now, few studies focused on microbial dynamics using fingerprinting techniques at extreme TAN level. Hao et al. did not detect major change in both archaeal and bacterial communities until 7.0 g/L of TAN (Hao et al., 2015). According to Su et al., DGGE analyses did not reveal microbial shift for TAN levels ranging between 1.00 to 5.97 g/L (Su et al., 2015).

1.3.2.2 Overview of microbial community distribution identified with 16S rRNA sequencing

In order to get more insights into the microbial dynamics patterns revealed by ARISA and identify key microorganisms potentially involved in community structures changes at remarkable TAN inhibition thresholds, 16S rRNA high-throughput sequencing was performed. 41 out of the 60 samples used for ARISA analysis were processed. For both Archaea and Bacteria, several thousands of sequences were identified and respectively assembled into 51 and 1782 OTUs. Considering the dispersion recovered in the total number of reads identified in each sample, relative abundances of archaeal genera and bacterial families were first calculated and presented in Figure 32. T₀ sample collected just before the beginning of the incubation was considered as the initial inoculum.

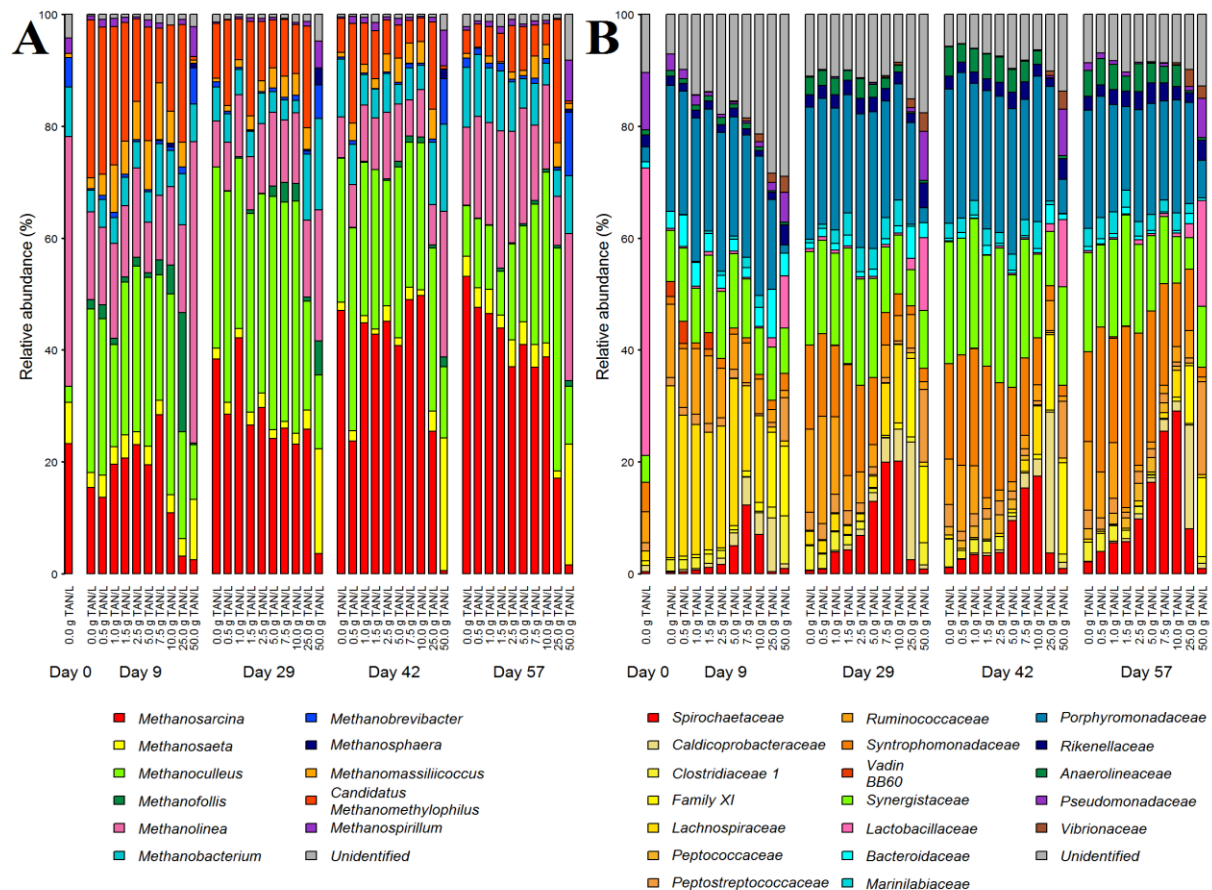


Figure 32 : Relative abundances of the archaeal genera (A) and bacterial families (B) generated by 16S rRNA gene sequencing. Samples were clustered by collection date (number of days) and by initial TAN concentration (g/L).

Methanogenic archaea detected in the inoculum mainly belonged to *Methanolinea* with a relative abundance of 44%. *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, and *Methanobrevibacter* respective relative abundances were 23% and 9%, 7% and 5%. *Methanosarcina* relative abundance remained below 5% in all bioreactors where methanogenesis occurred. In opposition, from 0.0 to 10.0 g TAN/L, *Methanosarcina* progressively became predominant along the experiment with a relative abundance varying respectively between 38% and 56 % by day 57. This genus remained relatively abundant at 25.0 g/L even though its maximum relative abundance noticeably decreased compared to lower TAN levels with only 17% by day 57. These results tended to confirm Calli et al. study which reported that *Methanosarcina*, which is an exclusive acetoclastic methanogen was more vulnerable to ammonia than *Methanosarcina* which can use both methanogenesis metabolisms (Calli et al., 2005). An increased proportion of *Methanoculleus* was also detected during AD process. Except at 50.0 g/L for which methanogenesis was inactivated, this genus was predominant at all TAN levels with a relative abundance of 20% up to 45% between 9 and 29 days of incubation. Contrary to *Methanosarcina*, its relative abundance increased under ammonia stress conditions. By day 57, while 9% of the total sequences were assigned to *Methanoculleus* in the control assay, 39% were detected in 25.0 g/L bioreactor. This ammonia tolerant genus has already been used in bioaugmentation by Fotidis et al.,

(2014) to increase CH₄ production from an ammonia-rich substrate. Moreover, Methanoculleus was revealed to be the predominant group of methanogens in digesters with SAO (Schnürer et al., 1999). Hence, its increasing abundance along TAN concentrations could suggest that Methanoculleus could play a key role in the great resistance of the inoculum to ammonia by enhancing syntrophic interactions. Candidatus Methanomethylophilus relative abundance increased up to 10-28% in all bioreactors where methanogenesis was activated during the early days of incubation. However, by 57 days, it decreased to 4-8% except in 25.0 g/L bioreactors in which it remained at 22%. This latter result could be attributed to the strong delay observed in methanogenesis at this TAN concentration. It could also be due to the production of methanol due to the initial hydrolysis of proteins. Hence, Candidatus Methanomethylophilus was supposed to take part in the activation of methanogenesis up to this extreme TAN level.

98 bacterial orders were obtained in all analyzed samples. Among these orders, 84 represented individually less than 1% of the total sequences. The remaining core of 14 orders accounted for more than 94.5% of the total number of bacterial sequences in all the samples was kept for the histogram representation. Lactobacillales had the highest percentage in the inoculum sample with a relative abundance of 36% followed by Clostridiales (18%), Bacteroidales (7%), Anaerolinales (7%) and Pseudomonales (7%). 1% of the total number of the inoculum sequences was assigned to Spirochaetales. After 9 days of incubation, distribution of bacterial communities remained stable along the experiment in all bioreactors. Throughout the experiment Clostridiales and Bacteroidales relative abundance reached respectively 32-47% and 21-38% in all bioreactors. Both orders seemed to be resistant to ammonia stress since they remained predominant at all TAN levels. Similarly, Anaerolinales and Synergistales relative abundances varied respectively between 1-8% and 6-17% independently of initial TAN concentration. However, Spirochaetales relative abundance appeared to be positively correlated with ammonia stress up to 10.0 g/L. It rose along with initial TAN level from 4% in the control assay to 22% at 10.0 g/L by day 57. Lee et al. recently indicated, that Spirochaetales were clearly involved in SAO with hydrogenotrophic methanogens (Lee et al., 2015). Hence, this observation could suggest ammonia enhanced SAO by selecting SAOB such as Spirochaetales in this range of concentrations. Nevertheless, since their relative abundance remained below 5% throughout the AD process at 25.0 and 50.0 g/L, Spirochaetales seemed to be inhibited at these TAN levels. Since methanogenesis still occurred in 25.0 g/L assays, other metabolic interactions must have been implemented among archaeal and microbial communities.

1.3.2.3 Key phylotypes involved in ammonia inhibition resistance

In order to go deeper into microbial communities' analysis, PCAs were performed to statistically analyze 16S rRNA tags at the OTU level. Inoculum sample was firstly included in PCA analysis. Nonetheless, considering its great difference with other samples, it was highly isolated in the factorial plane. Hence, Archaeal and bacterial PCAs were computed without inoculum and presented respectively in Figure 33A and Figure 33B. Associated correlation circles shown in Figure 33C and Figure 33D were used to identify principal representative OTUs responsible for communities' dynamics facing increasing ammonia stress.

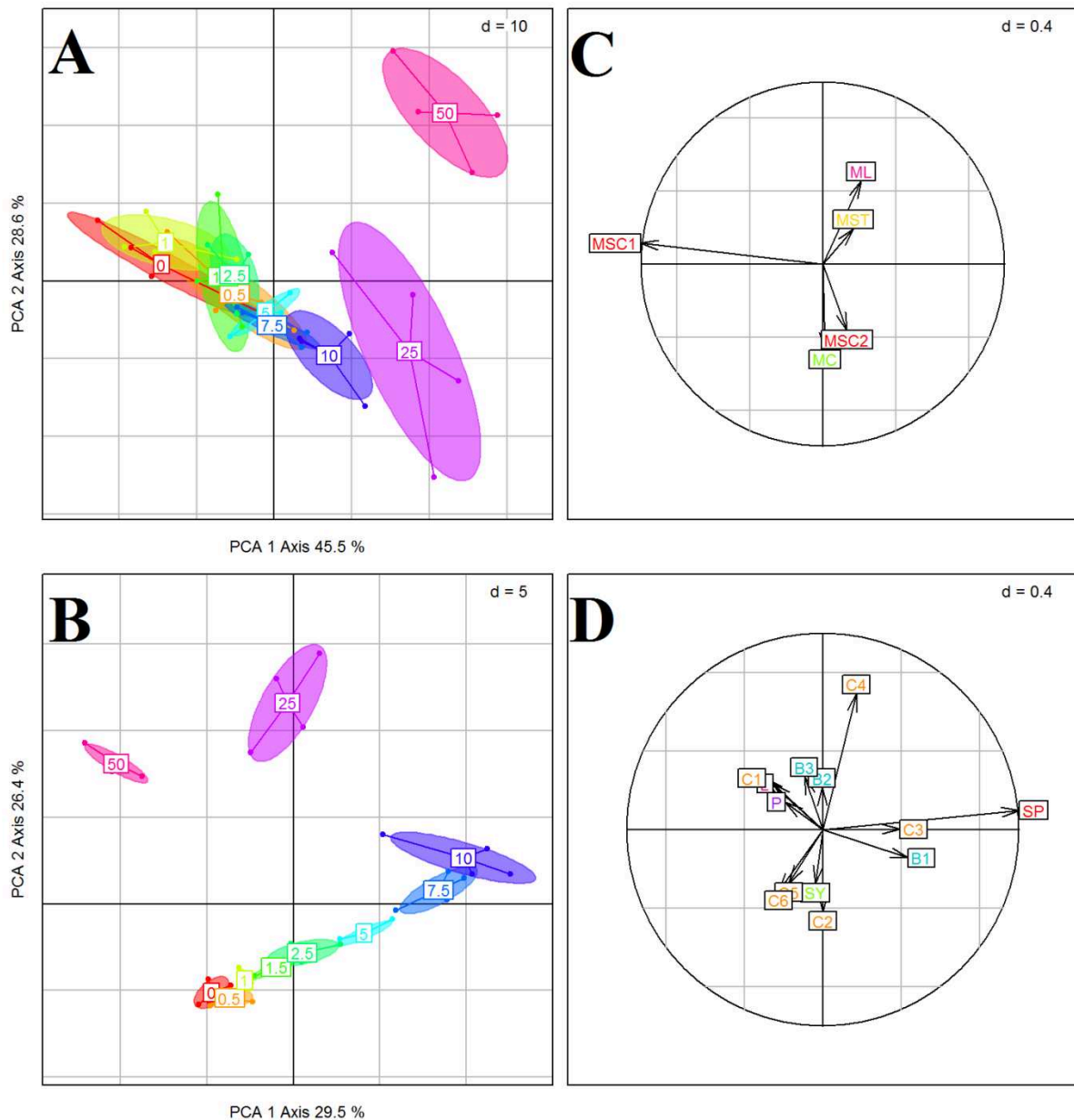


Figure 33 : Principal Component Analysis (PCA) of archaeal OTUs (A) and bacterial families (B) distribution generated by 16S rRNA gene sequencing. The color scale represents the initial level of Total Ammonia Nitrogen (TAN). For both Archaea and Bacteria, the first and second axes of the PCA provided the clearest distribution of OTUs influence with respectively 45.5%-29.5% and 28.6%-26.4% of the total variance. The influence of the principal archaeal OTUs and bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circles for Archaea (C) and Bacteria (D).

Consistently with ARISA results, PCA analysis of 16S rRNA tags revealed that increasing ammonia levels affected progressively archaeal communities. From 0.0 to 10.0 g/L of TAN, samples were clustered together and hierarchically distributed along PCA1. 25.0 g/L group seemed to follow the same trend but with higher dispersion. At 50.0 g/L, methanogenic communities tended to be highly correlated with ML and MST respectively assigned to genera Methanolinea and Methanosaeta that were already predominant in the inoculum. Since methanogenesis was quickly inhibited in this assay, it can be assumed that archaeal

populations were inactivated and thus did not evolve throughout the experiment at 50.0 g/L. PCA correlation circle indicated that five principal OTUs were governing this PCA representation. MSC1 assigned to genus *Methanosarcina* seemed to be mostly recovered in clusters associated with low initial TAN concentrations. In opposition, MC and MSC2 respectively assigned to genera *Methanoculleus* and *Methanosarcina* appeared to be mostly detected in samples where ammonia level was higher. This statistical analysis revealed that a methanogenic shift seemed to emerge progressively within *Methanosarcina* along increasing TAN levels. Indeed, MSC2 appeared to be more resistant to ammonia than MSC1. To confirm this hypothesis, specific relative abundances were calculated only between MSC1 and MSC2 for each sample. Furthermore, phylogenetic tree was generated by ARB software to confirm that these OTUs were clearly distinct. This tree, presented in supplementary material (Figure 39), revealed that MSC1 was rather assigned to *Methanosarcina mazei* while MSC2 was rather assigned to *Methanosarcina thermophila*. Data presented in Figure 34 showed that even though in inoculum MSC1 relative abundance was higher than MSC2, a progressive shift clearly occurred between these two *Methanosarcina* along increasing TAN concentrations. From 0.0 to 7.5 g/L, MSC1 remained predominant throughout the incubation. In opposition, at 10.0 and 25.0 g/L, MSC2 became predominant respectively by day 9 and 29. At 10.0 g/L, MSC1 relative abundance remained circa 35-45% indicating that both *Methanosarcina* remained abundant in the same proportion in the microbiota. Nevertheless, at 25.0 g/L, MSC2 relative abundance remained above 90% after 29 days of incubation indicating that MSC2 was clearly predominant at the expense of MSC1. This result was consistent with TAN inhibition thresholds revealed by ARISA and physicochemical analyses which indicated that deep modification in the microbiota distribution was induced by 25.0 g/L. Moreover, it confirmed previous studies results which revealed that *Methanosarcina* was able to resist to high TAN concentrations (Hao et al., 2015).

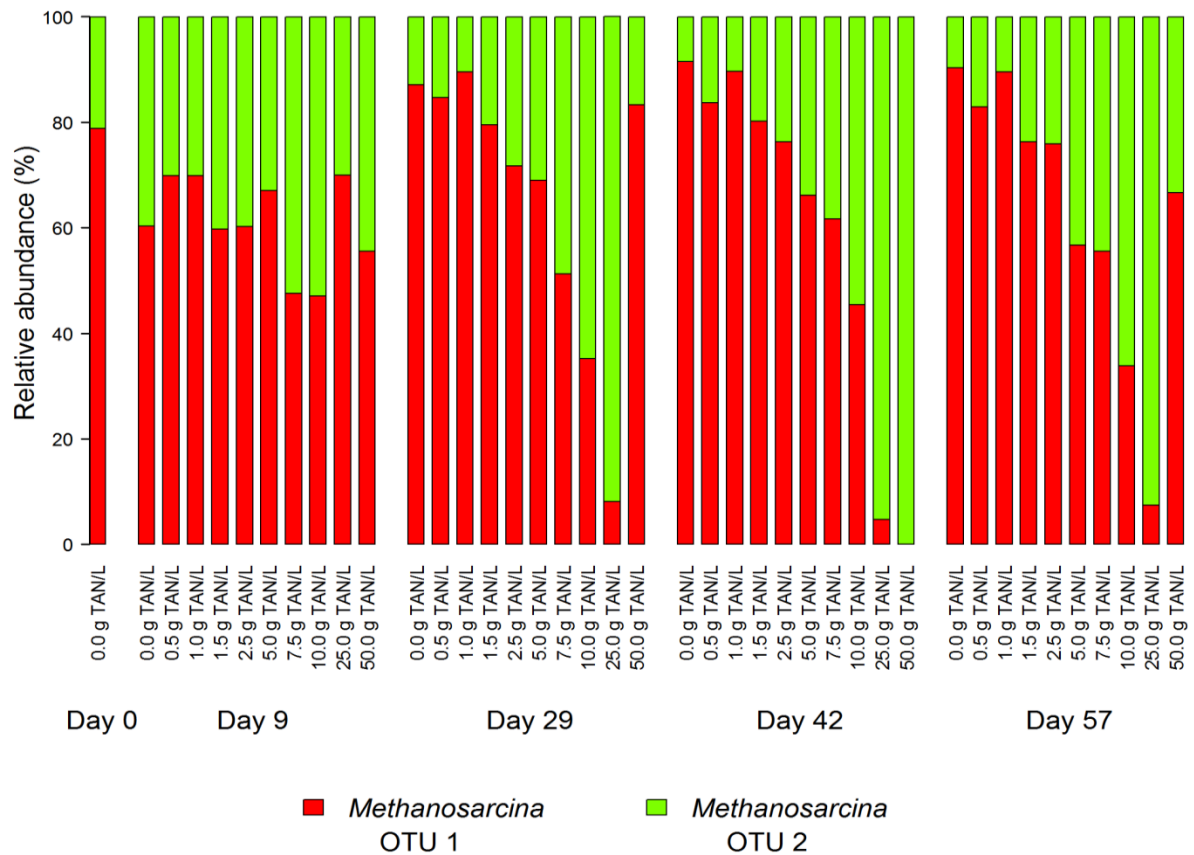


Figure 34 : Relative abundances of two *Methanosarcina* OTUs over time (number of days) exposed to increasing concentrations of TAN (g/L). Samples were clustered by collection date (number of days) and by initial TAN concentration (g/L).

PCA computed with bacterial 16S rRNA tags also confirmed previous results. From 0.0 to 10.0 g/L, initial TAN levels clusters were homogeneously distributed along the first principal axis. Considering the correlation circle, increasing ammonia concentrations up to 10.0 g/L tended to be strongly correlated with the emergence of a single OTU (abbreviated SP for order Spirochaetales) assigned to genus *Treponema*. This gradual bacterial adaptation to this range of TAN concentration was also linked to the increasing abundance of two other OTUs belonging to order Clostridiales (C3) and order Bacteroidales (B1) and respectively assigned to family Lachnospiraceae and genus *Petrimonas*. On the other hand, low initial TAN level seemed to be associated with C2, C5 and C6 OTUs all belonging to order Clostridiales and respectively assigned to genus *Syntrophomonas*, families Lachnospiraceae and Ruminococcaceae. Genus *Aminobacterium* (abbreviated SY for order Synergistales) was also representative of low TAN levels bioreactors. Samples collected from 25.0 g/L bioreactor were highly isolated on the upper part of the factorial plane. They appeared to be highly linked with an OTU (C4) assigned to genus *Caldicoprobacter* which also belongs to order Clostridiales. Two other OTUs belonging to phylum Bacteroidetes (B2) and order Bacteroidales (B3) also seemed to be correlated with this TAN level. Bacterial distribution acquired with 25.0 g/L bioreactor samples was also highly isolated on the left of the factorial plane and mostly linked with C1, L and P OTUs respectively assigned to genera *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* and *Pseudomonas*.

Since 6 out of the 13 most influent OTUs involved in the PCA representation of bacterial distribution belonged to order Clostridiales, further investigations focused on a specific view of the composition of this order and presented in Figure 35. Contrasted situations revealed by PCA analysis were confirmed. OTU assigned to genus *Caldicoprobacter* was clearly enhanced by TAN, especially from 7.5 to 25.0 g/L for which relative abundances varied respectively from 11% to 32% by day 42, and from 7% to 37% by day 57. In opposition, its relative abundance remained below 2% at lower TAN concentrations. Similarly, OTUs assigned to Family XI (*Anaerosalibacter*, *Tepidimicrobium* and *Tissierella*) only dominated only 25.0 and 50.0 g/L assays. On the other hand, *Syntrophomonas* became predominant by day 29 from 0.0 to 5.0 g/L whereas its relative abundance remained below 20% from 7.5 to 25.0 g/L at the same date. They only became predominant by 42 days from 7.5 and 10.0 g/L. Eventually, their relative abundances reached 22% at 25.0 g/L by day 57. *Syntrophomonas* managed to progressively emerge by overpassing initial ammonia inhibition. Since this genus is involved in SAO, it could indicate that delays observed in 25.0 g/L could be attributed to the longer acclimatization of *Syntrophomonadaceae* and thus to delayed methanogenesis. In 50.0 g/L bioreactors, *Caldicoprobacter* and *Syntrophomonas* relative abundances remained respectively below 4% and 10%. This could signify that those families could be related to the sustained methanogenesis up to 25.0 g/L of TAN.

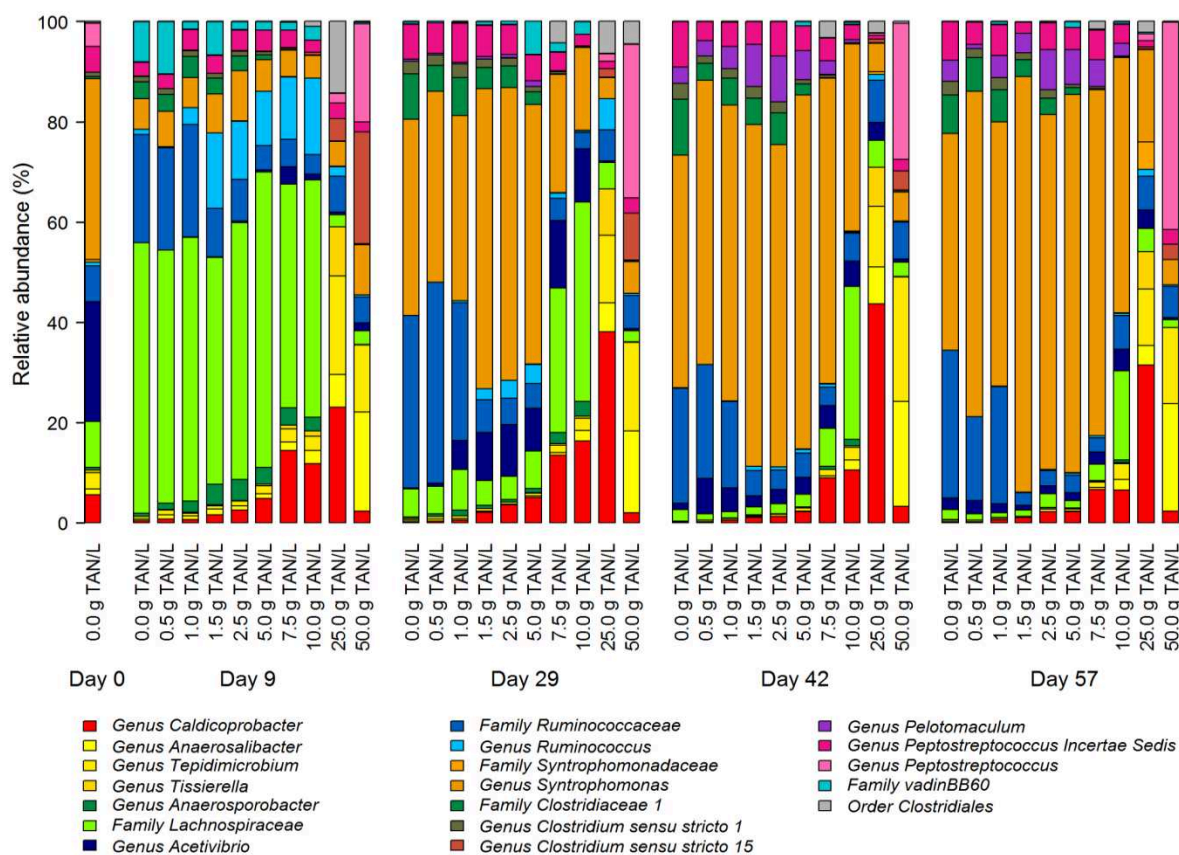


Figure 35 : Relative abundances of genera from Clostridiales order over time (number of days) exposed to increasing concentrations of TAN (g/L). Samples were clustered by collection date (number of days) and by initial TAN concentration (g/L). Genera belonging to the same family were represented with the same color palette.

1.4 Conclusions

Incubation with increasing TAN concentrations revealed that progressive microbial shifts implicating key SAO phylotypes occurred without impairing AD performance up to 10.0 g/L. Low TAN concentration bioreactors were dominated by *Syntrophomonas* and *Methanosarcina mazei*. On the other hand, higher ammonia level led to the emergence of *Treponema* and *Methanosarcina thermophila*. At 25.0 g/L, AD was strongly delayed, but native microbiota managed to deeply rearrange its distribution to reach comparable carbon conversion efficiency. In these assays, archaeal populations were equally dominated by *Methanosarcina thermophila* and *Methanoculleus* while great changes occurred within Clostridiales with the emergence of *Caldicoprobacter*.

1.5 Supplementary figures

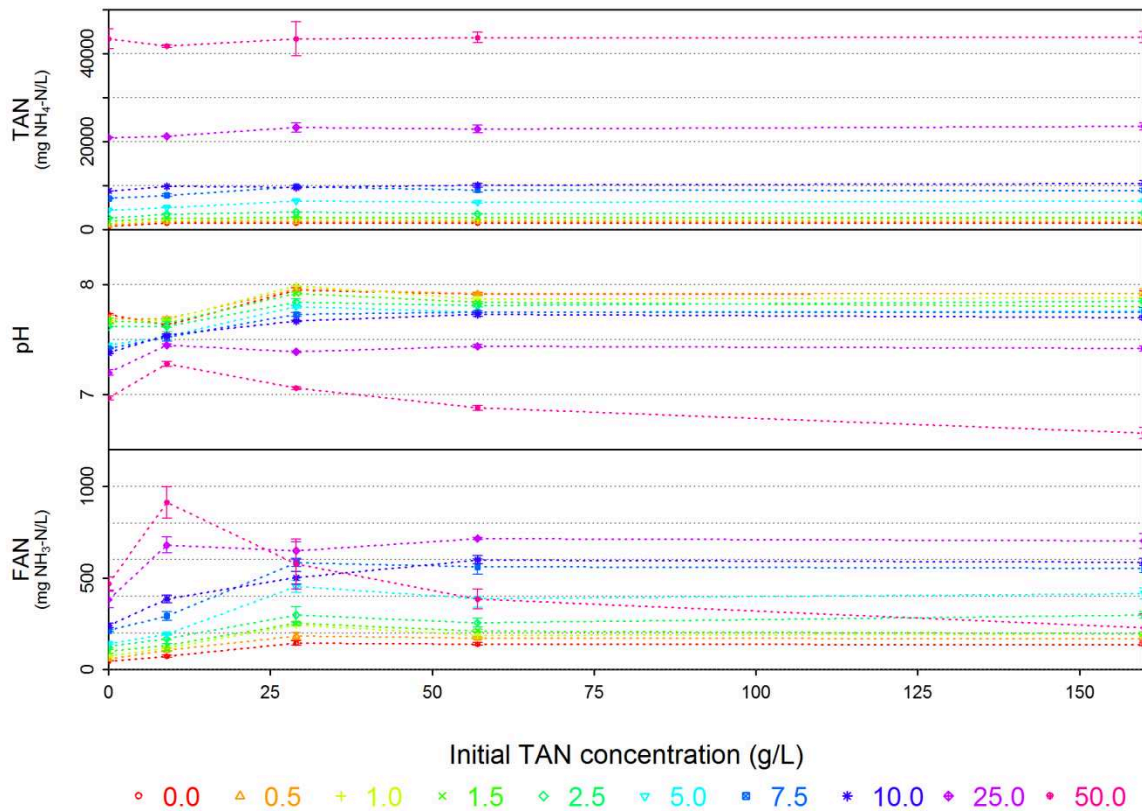


Figure 36 : Ammonia concentration dynamics and pH over time. Total Ammonia Nitrogen (TAN, mg/L) concentration, pH and Free Ammonia Nitrogen (FAN, mg NH₃-N/L) concentration over time (number of days) for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates).

Tableau XII : Kinetic constants for CH₄ and CO₂ production using modified-Gompertz model. CH₄ and CO₂ production kinetic constants for the different groups of triplicate (mean values and standard deviation)

Initial TAN concentration (g/L)	Ultimate production yield P (mL)		Maximum production rate R _{max} (mL/day)		Lag phase λ (day)	
	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂
0.0	4827 ± 87	2472 ± 37	163 ± 8	70 ± 3	8.1 ± 0.6	0 ± 0
0.5	4787 ± 37	2450 ± 9	160 ± 1	66 ± 1	8.7 ± 0.1	0 ± 0
1.0	4596 ± 77	2360 ± 25	158 ± 4	69 ± 2	7.4 ± 0.4	0 ± 0
1.5	4382 ± 83	2238 ± 30	160 ± 6	70 ± 3	7.0 ± 1.0	0 ± 0
2.5	4523 ± 181	2180 ± 92	154 ± 5	69 ± 2	6.7 ± 0.1	0 ± 0
5.0	4591 ± 182	2358 ± 81	157 ± 5	70 ± 1	7.7 ± 0.2	0 ± 0
7.5	4380 ± 96	2282 ± 40	139 ± 5	65 ± 2	7.8 ± 0.4	0 ± 0
10.0	4210 ± 142	2209 ± 62	119 ± 2	57 ± 1	9.0 ± 0.2	0 ± 0
25.0	3889 ± 227	2183 ± 81	72 ± 3	27 ± 1	22.0 ± 0.7	0 ± 0
50.0	183 ± 18	734 ± 63	16 ± 2	34 ± 3	0.0 ± 0.0	0 ± 0

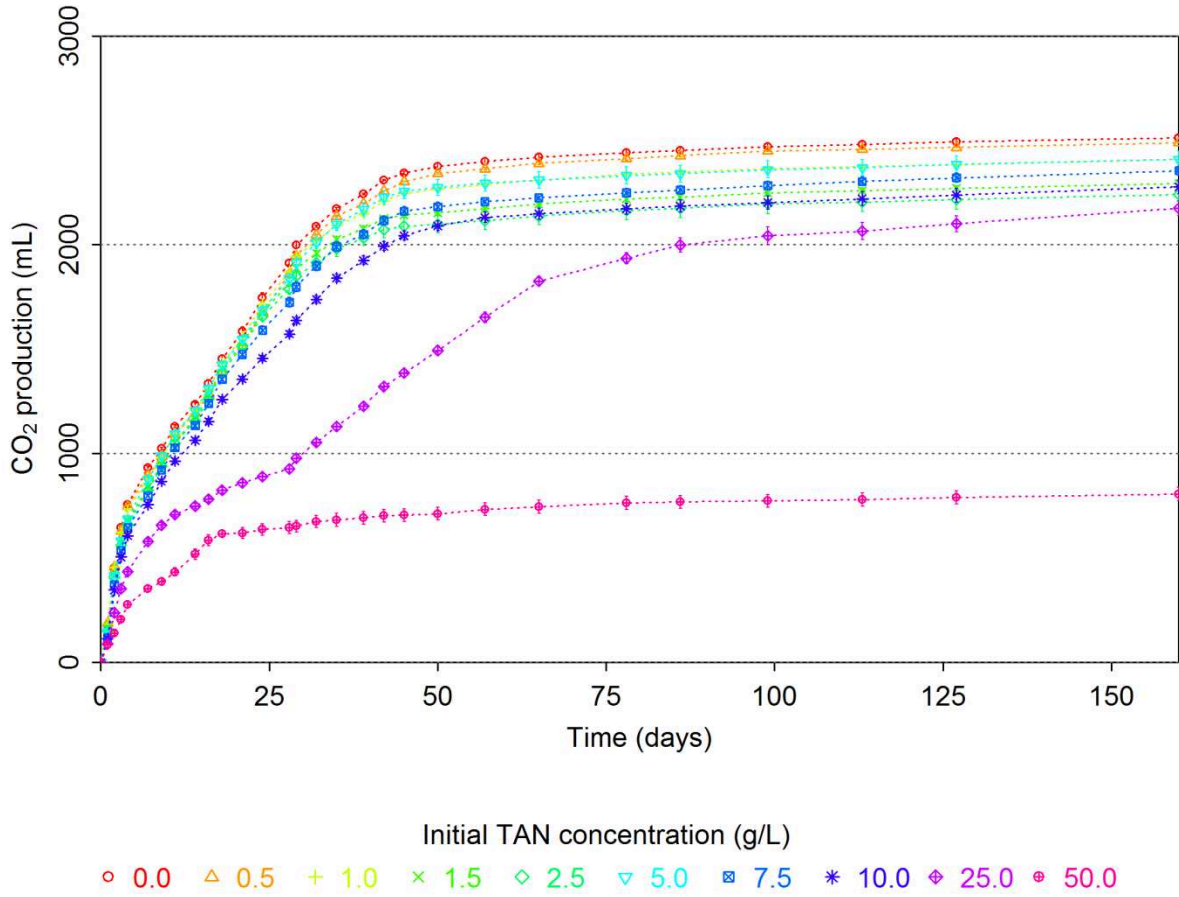


Figure 37 : Cumulated CO₂ production (mL) over time (number of days) for the different TAN concentrations (g/L).

CO₂ production (mL) over time (number of days) for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates).

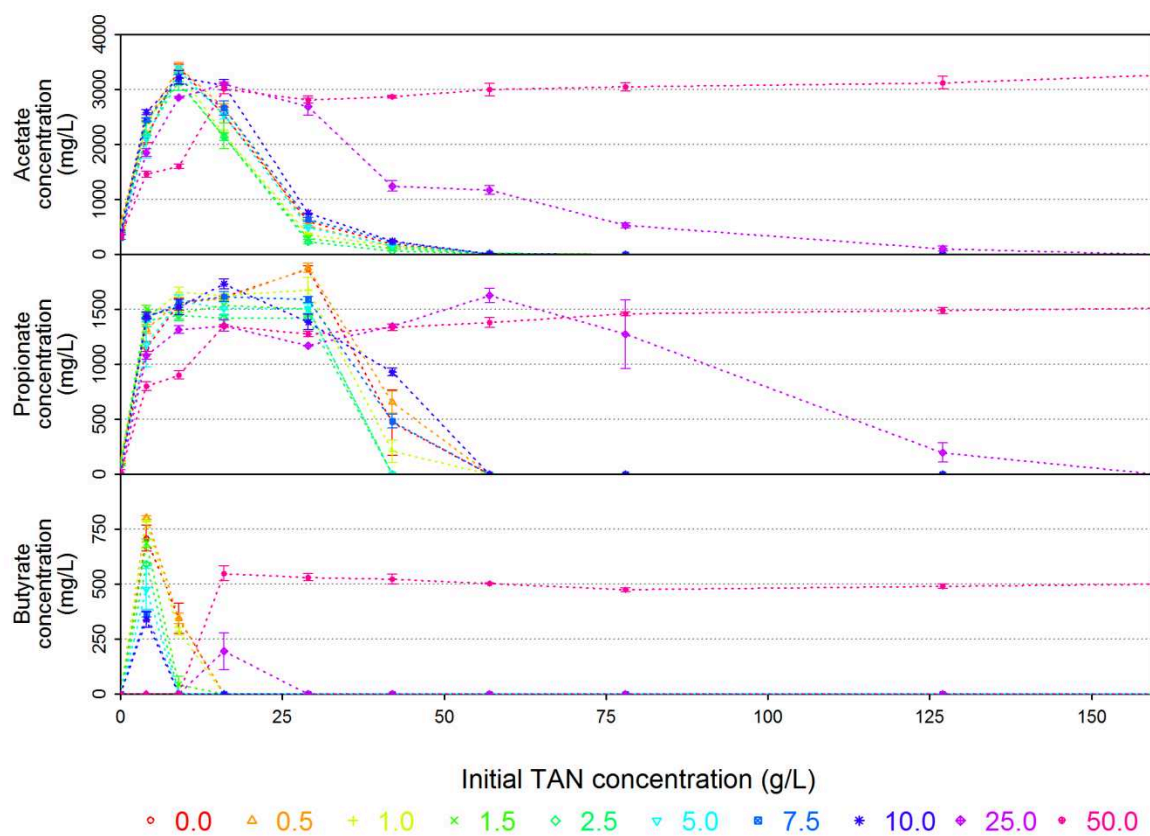


Figure 38 : Volatile fatty acids accumulation over time.

Acetate, propionate and butyrate accumulation (mg/L) over time (number of days) for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates).

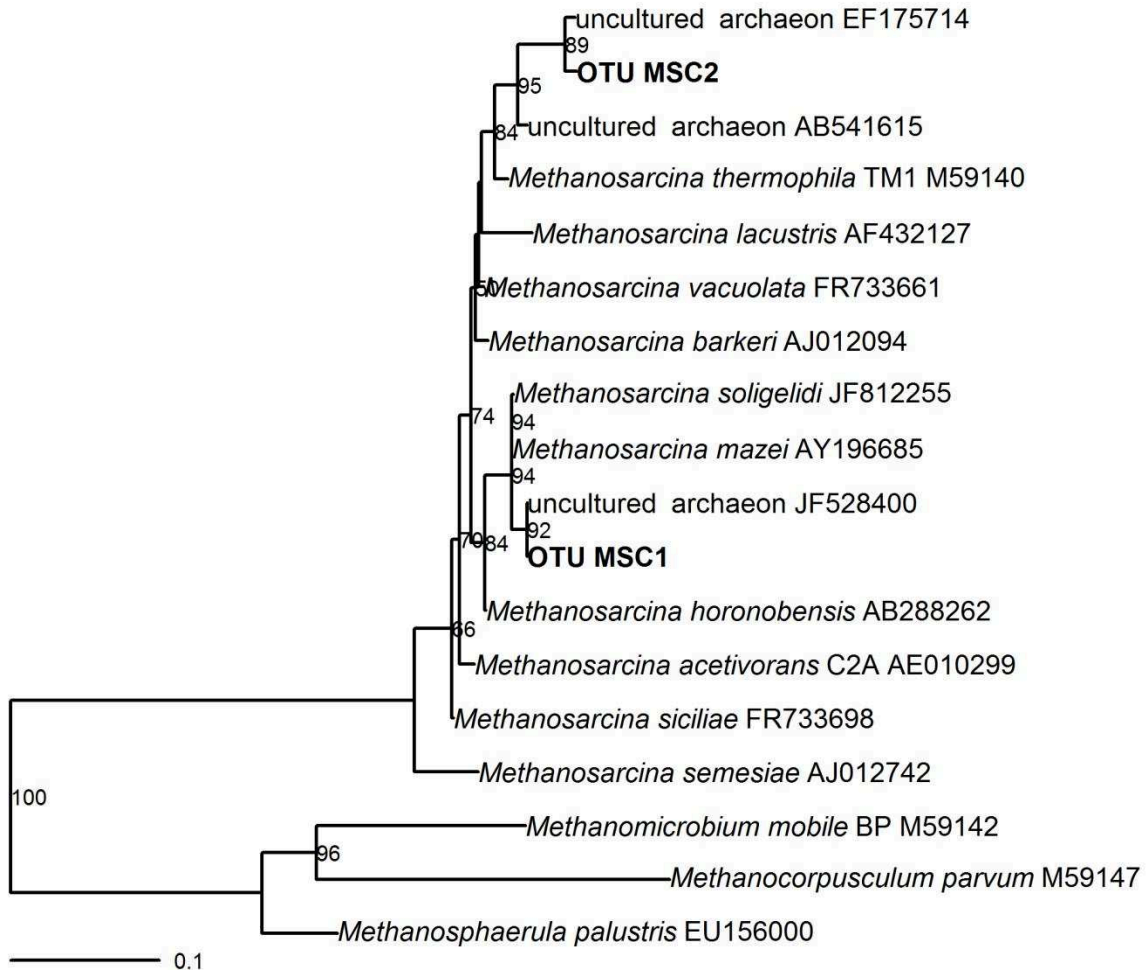


Figure 39 : Phylogenetic placement of two sequences affiliated to genus *Methanosarcina* and involved in a methanogenic shift occurring along increasing ammonia concentrations. Maximum likelihood phylogeny of 18 archaeal 16S rRNA sequences inferred from 1835 unambiguously aligned positions. OTUs are identified by their OTU IDs, sequences of reference bacterial species and of uncultured species are indicated with their NCBI accession numbers. Sequences of Methanomicrobiales were included as an outgroup. The scale bar represents the average number of substitutions per site, and numbers at nodes indicate statistical support calculated by non-parametric bootstrapping. Only bootstrap values above 50% are shown

2 Community shifts within anaerobic digestion microbiota facing phenol inhibition: Towards early warning microbial indicators?

Author names and affiliations

Simon Poirier^{a*}, Ariane Bize^a, Chrystelle Bureau^a, Théodore Bouchez^a, Olivier Chapleur^a
^a Irstea, Hydrosystems and Bioprocesses Research Unit,
1 rue Pierre-Gilles de Gennes, F-92761 Antony, France

Highlights:

- Final AD performance was impaired by initial phenol concentrations above 1.00 g/L
- Beyond an initial phenol concentration of 2.00 g/L methanogenesis was totally blocked
- Methanosarcina and Syntrophomonadaceae proportions declined from 0.50 g/L of phenol
- Methanoculleus and Synergistaceae proportions increased from 0.50 g/L of phenol
- Phenol was totally degraded up to an initial concentration of 1.50 g/L

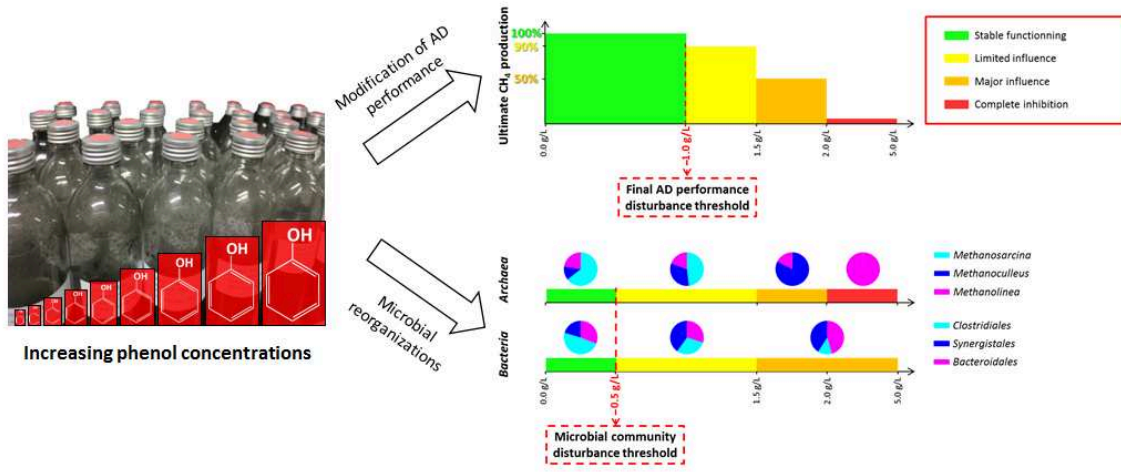
Abstract

Performance stability is a key operational issue for anaerobic digestion (AD) and phenolic compounds are regularly mentioned as a major cause of digester failures. To get more insights into AD microbiota's response to a wide range of inhibition levels, anaerobic batch toxicity assays were conducted with ten phenol concentrations up to 5.00 g/L. Final AD performance was not impaired up to 1.00 g/L. However, progressive shifts in microbial community structure were detected from 0.50 g/L. The methanogenic function was maintained along with increasing initial phenol concentrations up to 2.00 g/L thanks to the emergence of genus *Methanoculleus* at the expense of *Methanosarcina*. Within syntrophic populations, family Syntrophomonadaceae proportion was gradually reduced by phenol while Synergistaceae gained in importance in the microbiome. Moreover, at 2.00 g/L, the relative abundance of families belonging to order Clostridiales dropped, leading to the predominance of populations assigned to order Bacteroidales even though it did not prevent final AD performance deterioration. It illustrates the high level of adaptability of archaeal and bacterial communities and suggests the possibility of determining early warning microbial indicators associated with phenol inhibition.

Key words

Phenol, ARISA, 16S rRNA gene sequencing, Microbial indicators, Methanization

Graphical abstract



2.1 Introduction

Anaerobic digestion (AD) is a sustainable, economically and environmentally attractive bioprocess simultaneously enabling organic waste stabilization and valorization. It provides methane-rich biogas that can be converted into energy and heat, digestion sludge used as an organic amendment for soil as well as other valuable compounds such as alcohols and volatile fatty acids. Nonetheless, this microbially driven process still remains vulnerable to a wide variety of inhibitory substances that induce poor operational stability, preventing AD wide commercialization (Chen et al., 2008). These compounds can be either contained in organic waste, or formed during their degradation within industrial digesters.

Among AD inhibitors, various natural or anthropogenic phenolic compounds are mentioned as the primary cause of digester failure. They are regularly detected at concentrations reaching up to several grams per liter in different types of effluents from coal gasification, coking, petroleum refining, petrochemical manufacturing and paper industry (Rosenkranz et al., 2013; Veeresh et al., 2005). Phenols can also be produced from biodegradation of naturally occurring aromatic polymers such as humic acids and tannins or from degradation of xenobiotic compounds such as pesticides (Fang et al., 2006). Some pre-treatments applied to increase biogas production efficiency from lignocellulosic materials are also known to result in the production of phenolic compounds (Monlau et al., 2014). Their detrimental effects on anaerobic microorganisms have been observed in anaerobic systems treating municipal solid waste, olive mill wastes and wine distillery wastewater (Busca et al., 2008). Among phenolic compounds, phenol is an essential component widespread in many industries producing plastics, resins and pharmaceuticals (Busca et al., 2008). Moreover, phenol concentrations up to 4288 mg/kg were measured in digestion sludge of anaerobic digesters degrading different types of organic waste such as pig manure, biowaste and plant materials (Levén et al., 2012). Although phenol can be biodegraded to harmless compounds under methanogenic conditions, high concentrations are toxic to different groups of microorganisms involved in methane production (Chapleur et al., 2015; Olgúin-Lora et al., 2003; Rosenkranz et al., 2013). Unexpected phenol shock loadings within unacclimated anaerobic digesters can induce major disruptions in AD bioprocess, leading to the decrease of biogas production rate and longer treatment durations (Veeresh et al., 2005). The functioning of methanogenic bioreactors degrading phenol as the sole carbon source and operated under various conditions is abundantly described in the literature (Hoyos-Hernandez et al., 2014; Veeresh et al., 2005). Metabolic pathways are also well documented, as well as the impact of phenol on AD performance such as degradation rates, lag times, cumulated biogas production, VFA accumulation and limiting concentrations of anaerobic phenol degradation (Hernandez & Edyvean, 2008; Schink et al., 2000). Indeed, many studies used batch toxicity assays to determine inhibition thresholds such as half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) (Fang & Chan, 1997; Fang et al., 2004; Fedorak & Hruday, 1984).

However, few studies investigated the microbial response of an unacclimated methanogenic microbiota exposed to different levels of phenol during sudden shock loadings. Some of them characterized pre-adapted microbial consortia within digesters degrading phenol (Chen et al., 2008; Levén & Schnürer, 2010; Zhang et al., 2005). A recent study also described the acclimatization of a microbial consortium up to 2.0 g/L of phenol (Wirth et al.,

2015). Chapleur et al (2015) qualitatively monitored by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) the microbial community dynamics in batch bioreactors facing increasing phenol concentrations. They reported major shifts in both archaeal and bacterial populations occurring at different inhibition thresholds. Our study combines an extended ecological approach linking ARISA fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing in order to provide further information to overcome some bottlenecks and bring into focus potential key phylotypes involved in phenol resistance within a methanogenic mixed culture.

In this framework, the present study aims at studying the effect of a wide range of phenol concentrations on an unadapted anaerobic microbiota. The objective is to give more insights into the microbial community shifts occurring in response to increasing levels of inhibition. The possibility of identifying early warning microbial indicators correlated with the decrease of AD performance on the basis of key microbial phylotypes is discussed.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Experimental set-up

A total of 30 anaerobic batch digesters (glass plasma bottles, total working volume of 500 mL) were seeded with 20 g of sludge pellets obtained by centrifugation of samples from a 50 L stable laboratory bioreactor incubated at 35°C. This bioreactor had previously been inoculated with sludge collected in an industrial mesophilic digester treating both primary and excess biological sludge on a municipal wastewater treatment plant (Achères, France). The reactor was fed with mashed biowaste provided by an industrial food waste deconditioning unit (Chemaudin, France) in order to acclimatize the microbial consortium to this substrate. This industrial unit is supplied with residual food waste from restaurants, supermarkets, and food industries. Batch digesters were supplemented with 50 g of the same mashed biowaste (C [wt% dry solids] = 49.5 %, N [wt% dry solids] = 3.6 %; K⁺ = 2.48 mg/g; NH₄⁺ = 2.18 mg/g; Mg²⁺ = 3.3 mg/g; Ca²⁺ = 1.11 mg/g) corresponding to an initial substrate/inoculum ratio of 10 g COD / g COD (12 g COD substrate / 1.2 g COD inoculum). Phenol (99%, ACROS Organics) was added in order to reach 10 different concentrations (0.00, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 2.00, 5.00 g/L) corresponding respectively from 0.00 up to 10.20 g COD per incubation. Biochemical methane potential buffer (International Standard ISO 11734 (1995)) was introduced in all bioreactors to reach a final working volume of 500 mL. All incubations were performed in triplicates. The 30 bioreactors were subsequently hermetically sealed with a screw cap and a rubber septum and headspaces were flushed with N₂ (purity > 99.99%, Linde gas SA) in order to ensure anaerobic conditions. Time zero samples were collected before starting incubation of the reactors under anaerobic conditions at 35°C, without agitation, in the dark. Liquid samples (8 mL) were periodically collected through the septum and centrifuged at 10,000 x g for 10 min. The pellets and supernatants thus obtained were stored separately at -20°C for analysis of biomass and chemical indicators, respectively. Digestion tests were run for 203 days until the daily biogas productions of each of the reactors decreased below 10 mL.

2.2.2 Analytical methods

Biogas accumulation was measured using a differential manometer (Digitron 2082P) in order to calculate biogas production at standard temperature and pressure. Headspace gas composition was analyzed using a micro GC (CP4900, Varian) as described in Chapleur et al. (2015). Groot package of R CRAN software (version 3.1.2) was used to fit the cumulative CH₄ and CO₂ production data to a modified Gompertz three-parameter model (Eq 1) where M(t) is the cumulative methane production (mL) at time t (days); P is the ultimate methane yield (mL); R_{max} is the maximum methane production rate (mL/days); λ is the lag phase (days); e is the exponential constant.

$$M(t) = P \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{\max} \times e}{P} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Eq.1})$$

Phenol half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined by plotting R_{max} values as a function of initial phenol concentrations. This curve was fitted to the Hill model

by non-linear regression using the algorithm of Marquard and a non-linear regression program as described by Chapleur et al. (2015).

Acetate, propionate, butyrate, lactate, formate and valerate were quantified by conductometric detection, using a Dionex 120 equipped with IonPac ICE-AS1 column (9 mm x 250 mm). The mobile phases were heptafluorobutyric acid (0.4 mmol/L) and tetrabutylammonium hydroxide (5 mmol/L). Dissolved organic carbon (DOC) was measured in the samples' supernatant (Bioritech Model 700) as described in Chapleur et al., (2015). Phenol concentrations were measured with LCK346 kit (Hach Lange) according to the manufacturer's instructions.

2.2.3 Molecular analyses of microbial communities

Total DNA was extracted from the pellets using Powersoil™ DNA isolation kit (Mobio Laboratories Inc. Carlsbad) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA concentrations were quantified using Qubit 2.0 Fluorometer (dsDNA HS or BR Assay Kit, Invitrogen, Life Technologies, Eugene) and DNA integrity was checked by EtBr staining and electrophoresis on a 1% agarose gel.

ARISA method was applied to analyze Bacteria and Archaea members from the extracted DNA. PCR procedures are described in Chapleur et al. (2015). Bacterial primer set ITSf/ITSr (5'-GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA-3'/5'-GCC AAG GCA TCC ACC-3') was used to amplify the bacterial 16S-23S ITS region, and primer set 71R/1389F (5'-TCG CAG CTT RSC ACG YCC TTC-3'/5'-CTT GCA CAC ACC GCC CGT C-3') was used for the archaeal 16S-23S ITS region. To ensure a fast processing of samples, ARISA was performed with a capillary electrophoresis bioanalyzer (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara) using the Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies).

Extracted DNAs were also used to sequence bacterial and archaeal hyper variable region V4-V5 of the 16S rRNA gene with the primer 515F and 928R as described in Poirier et al. (2016). Fusion method was employed (IonAmplicon Library Preparation (FusionMethod) Protocol, Revision C). The forward primer was modified by the addition of a PGM sequencing adaptor (adaptor A: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') and a barcode (5'-adaptor A-Barcode-515F-3'). The reverse primer was modified by the addition of a PGM sequencing adaptor (adaptor trP1: 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3') (5'-adaptor trP1-928R-3'). V4-V5 region was amplified according to Platinum Pfx Supermix protocol (Life Technologies). PCR cycle characteristics are detailed in Poirier et al. (2016). PCR products were cleaned using the Agencourt AMPure XP magnetic beads purification system (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instruction. Quantification was realized with a capillary electrophoresis bioanalyzer (2100 Electrophoresis Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara) using the Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies). Purified libraries were diluted and combined in an equimolar concentration of 100 pM for sequencing. Emulsion PCR was carried out to prepare template-positive Ion Sphere Particles (ISPs) containing clonally amplified DNA, using the Ion PGM™ Template OT2 400 Kit with the Ion OneTouch™ 2 Instrument. The template-positive ISPs were enriched with the Ion OneTouch™ ES according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed on an Ion Torrent Personal Genome Machine using Ion 316 chip and the Ion PGM Sequencing

400 Kit according to the manufacturer's instructions. The PGM software filtered out low quality and polyclonal sequence reads, and quality filtered data were exported as a FastQ files. 10,000 to 50,000 high quality reads were generated for each sample.

2.2.4 Data processing

ARISA profiles were imported into the StatFingerprints R package in order to be aligned as described in Chapleur et al. (2015) before statistical analysis.

Sequencing data were processed with the same pipelines as described previously (Poirier et al., 2016). 16S rRNA tag reads were quality checked and filtered by UPARSE as implemented in USEARCH v8.0.1623. Raw sequence reads were filtered before subsequent analyses to minimize the effect of random sequencing errors. Short sequences with less than 200 bp were discarded; the remaining ones were arbitrarily truncated to 200 bp and filtered for quality, keeping only those with expected errors below 1. Sequences were then dereplicated, and sorted by abundance. Sequences occurring only once (singletons) were removed from the dataset. Reads detected as chimeric artifacts were identified and discarded, using UCHIME against the "gold" database (<http://drive5.com/uchime/gold.fa>). Resulting sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity levels using furthest neighbor approach. OTU sequences were assigned to a taxonomic lineage using mothur v.1.25.0 against Silva database release 119 with a minimum confidence of 0.8, in the QIIME 1.8.0 environment. OTU tables and taxonomy summary files were also generated with QIIME.

2.2.5 Statistical analysis

R CRAN software (version 3.1.2) was used to statistically examine molecular data. Centered not scaled principal component analyses (PCA) were implemented to separately analyze archaeal and bacterial diversities by using ADE4 R package both for ARISA profiles and 16S rRNA tags datasets. The effect of phenol on microbial community dynamics was investigated by coloring and clustering the individuals with a color scale corresponding to initial phenol concentrations. Correlation circles were drawn in order to examine the influence of different OTUs on the distribution of the samples within the factorial plane. Figures were produced with Adegraphics R package.

2.3 Results and discussion

2.3.1 Effect of increasing phenol concentrations on anaerobic digestion performance

2.3.1.1 Biogas production

Figure 40A presents the average cumulated CH_4 production of each triplicate of reactors. CO_2 cumulated productions are presented in supplementary material (Figure 45). As phenol concentration increased, rates and levels of total CH_4 and CO_2 production overall decreased progressively. Methanogenesis occurred up to 2.00 g/L of initial phenol concentration, whereas at 5.00 g/L, no CH_4 was produced. Other studies indicated that unadapted inocula produced CH_4 up to 1.50-2.00 g/L of initial phenol (Chapleur et al., 2016; Wang et al., 1991) before being totally inhibited at higher concentrations. Cumulative production curves were analytically compared by fitting experimental data with Eq.1 (Gompertz equation, see Materials and Methods) in order to calculate kinetic constants (ultimate production, maximum production rate and lag time) presented in supplementary material (Tableau XIII).

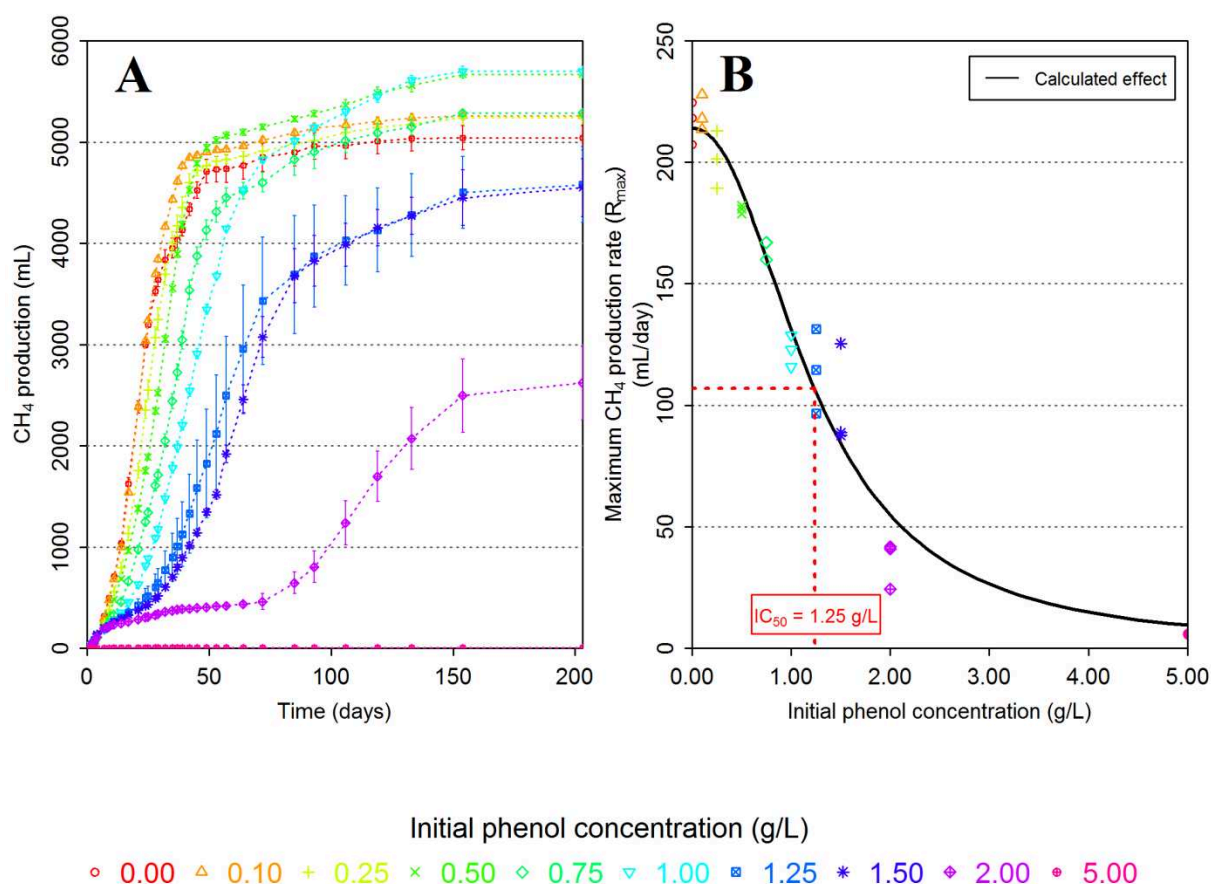


Figure 40 : (A) Cumulated CH_4 production (mL) over time (number of days) and (B) maximum CH_4 production rate for the different initial concentrations of phenol. Mean values of triplicate bioreactors are presented for CH_4 production and error bars represent standard deviation within triplicates. All experimental maximum CH_4 production rates are shown for each triplicate. Calculated fitting of experimental values to the Hill model is shown as well as IC_{50} .

The inhibitory effect of phenol on ultimate biogas production was very limited up to initial concentrations of 1.00 g/L. From 0.00 g/L up to 1.00 g/L, final CH₄ production increased from 5067 mL up to 5733 mL respectively. CO₂ ultimate production increased from 2312 mL in the control assays up to 2464 mL at 1.50 g/L of phenol. Increases of ultimate biogas production compared to the control suggested that phenol conversion to biogas occurred along with biowaste degradation, as already observed in previous studies (Chapleur et al., 2016; Fedorak & Hruday, 1984; Wang et al., 1991) with other substrates. Nevertheless, at 1.25 g/L and 1.50 g/L, average ultimate CH₄ productions respectively declined down to 4729 mL and 4626 mL before dropping more significantly down to 2763 mL at 2.00 g/L. Contrary to CH₄, 333 mL of CO₂ were still produced at 5.00 g/L indicating that methanogenic communities were more sensitive to phenol than bacterial populations involved in fermentative steps. Recent studies corroborate this result (Chapleur et al., 2016; Wirth et al., 2015).

Even though phenol did not negatively affect final carbon conversion efficiency up to initial concentration of 1.00 g/L, its inhibitory effect was clearly visible on biogas production kinetics at higher concentrations. From 0.25 g/L to 2.00 g/L, CH₄ and CO₂ maximum production rate values (R_{max}) gradually decreased along with increasing phenol levels from 217 mL/day and 70 mL/day respectively down to 36 mL/day and 16 mL/day. Furthermore, CH₄ lag times (λ) gradually increased from 7.2 days at 0.00 g/L up to 32.4 days at 2.00 g/L of phenol. Consequently, these results indicated that, up to 1.00 g/L, the inhibitory effect of phenol on AD was mainly characterized by slower CO₂ production kinetics and both delayed and slower CH₄ production kinetics. Similar general patterns of inhibition of CH₄ production by phenol have been reported by other authors on different substrates (Chapleur et al., 2016; Fedorak & Hruday, 1984; Olguín-Lora et al., 2003).

In order to compare the resistance of this inoculum to phenol with other studies, AD inhibition was more precisely quantified by calculating an IC₅₀ value. Figure 40B revealed that an initial phenol concentration of 1.25 g/L induced a 50 % reduction of the control assays CH₄ R_{max} value. This IC₅₀ was consistent with values reported by other authors. Acetate conversion to CH₄ was indeed reported to be half inhibited by phenol at 1.25 g/L according to Wang et al., (1991). Chapleur et al., (2015a) indicated that maximum CH₄ rate during cellulose AD was half inhibited by phenol at 1.40 g/L. Various inhibiting phenol concentrations can be attributed to the differences in nature of substrates, environmental conditions (pH, temperature) and acclimation of inoculum.

2.3.1.2 Phenol degradation

Phenol degradation dynamics are presented in Figure 41. Phenol was completely degraded in all bioreactors up to 1.50 g/L (except in the 2nd replicate of 1.25 g/L assays). Other studies using unacclimated inoculum reported comparable results (Chapleur et al., 2016; Wang et al., 1991). At higher concentrations (2.00 g/L and 5.00 g/L) phenol degradation did not occur suggesting that specific bacterial populations involved in phenol degradation were completely inhibited. However, regarding biogas production results, methanogenesis still occurred at 2.00 g/L. Moreover, it was interesting to notice that methanogenesis started in all bioreactors before phenol started to be degraded. Both

observations tended to corroborate other results indicating that archaeal methanogenic populations were less susceptible to phenol than specific bacterial populations involved in phenol degradation (Fedorak & Hrudehy, 1984).

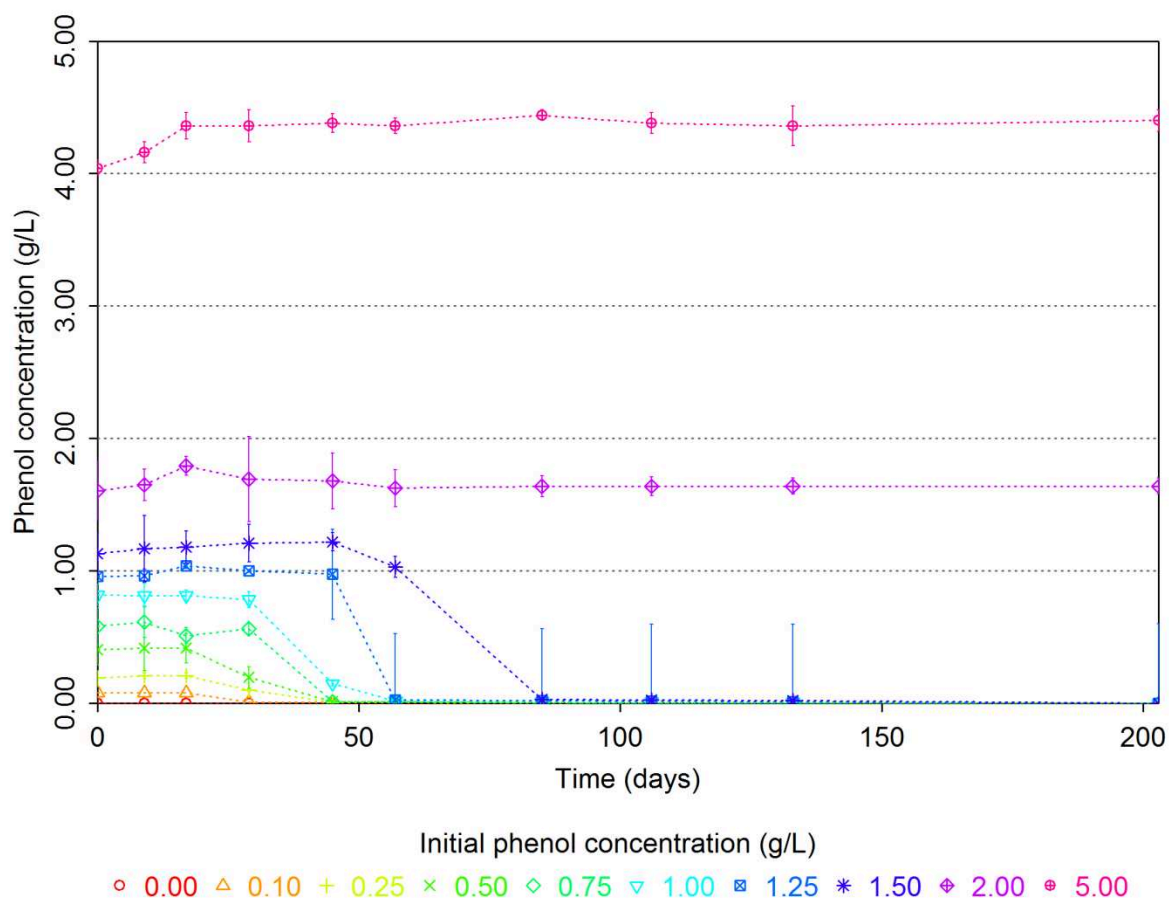


Figure 41 : Phenol concentration dynamics over time. Phenol concentration (g/L) over time (number of days) for the different groups of triplicate bioreactors (mean values are shown and error bars represent standard deviation within triplicates).

2.3.1.3 VFA accumulation and DOC dynamics

Acetic, propionic and butyric acids were detected in all the incubations. VFA accumulation dynamics are presented in supplementary material (Figure 46). At lowest phenol concentrations (up to 0.25 g/L), cumulated VFA concentration dynamics were virtually similar to the control. However, for all concentrations between 0.50 g/L and 2.00 g/L, maximum acetate concentrations were higher than in the control assays. Same results were also observed for butyrate up to 1.50 g/L of phenol. From 0.00 g/L up to 1.50 g/L, acetate and butyrate accumulation peaks occurred before phenol degradation. Therefore, their increases were attributed to the inhibition of acetate and butyrate degraders rather than to phenol degradation. Moreover, at 2.00 g/L, phenol degradation was completely inhibited throughout the incubation. Thus, acetate accumulation was probably also due to the inhibition of acetate degraders, probably methanogens. By contrast, propionate maximum concentration was lowered when initial phenol concentration was superior to 0.75 g/L, probably because propionate producers were partially inhibited by phenol. Nonetheless, a second significant

accumulation phase of propionic acid, starting after 29 days of incubation, was noticed when phenol concentration varied between 1.25 g/L and 2.00 g/L. Since no phenol was degraded at 2.00 g/L, this production was not attributed to phenol degradation but rather to process instability as reported by other authors (Chapleur et al., 2016).

DOC concentrations, presented in supplementary material (Figure 47) validated hypothesis laid out above. Up to phenol concentrations of 2.00 g/L, DOC values increased after 17 days of incubation, indicating that biowaste hydrolysis still occurred and was thus not totally inhibited by phenol. By contrast, in 5.00 g/L incubations, DOC never increased, confirming that anaerobic digestion was inhibited and that biowaste was not degraded. DOC dynamics were consistent with VFA and CH₄ kinetics. From 0.00 g/L up to 2.00 g/L, DOC decrease which corresponds to the conversion of organic substrate into CH₄ was also progressively delayed with increasing phenol concentration. After 85 days of incubation, DOC concentrations of batch digesters for which initial phenol concentration was between 0.00 and to 0.75 g/L was inferior to 0.10 g/L. By contrast, higher phenol concentrations led to delayed DOC consumption which remained over 0.25 g/L at the same sampling date. Residual DOC at higher phenol concentrations could be either attributed to phenol degradation metabolites which were not completely converted into CH₄, or to phenol itself in 2.00 g/L assays. But it could also reveal that phenol induced a less efficient degradation of the biowaste.

2.3.2 Microbiota response

Microbial community dynamics were firstly studied with ARISA. Since low standard deviation was observed within each triplicate for all previous physicochemical indicators, one replicate per initial phenol concentration was selected for ARISA analysis apart for the 1.25 g/L assays which were highly variable and for which the three replicates (R1, R2 and R3) were used. PCAs performed on archaeal and bacterial ARISA profiles are presented on Figure 42. As CH₄ production was gradually delayed along with increasing initial phenol concentrations, a first approach consisted in computing independent PCAs for each sampling date. The objective was to identify potential patterns in microbial responses to different inhibition levels. To avoid any bias linked to microbial reorganizations caused by substrate depletion, samples collected after 9, 29 and 45 days of incubation were selected. A color scale depending on the initial phenol concentration in the bioreactors was used. The PCA axes that best separated these groups were PCA Axes 1 and 2 for all PCAs.

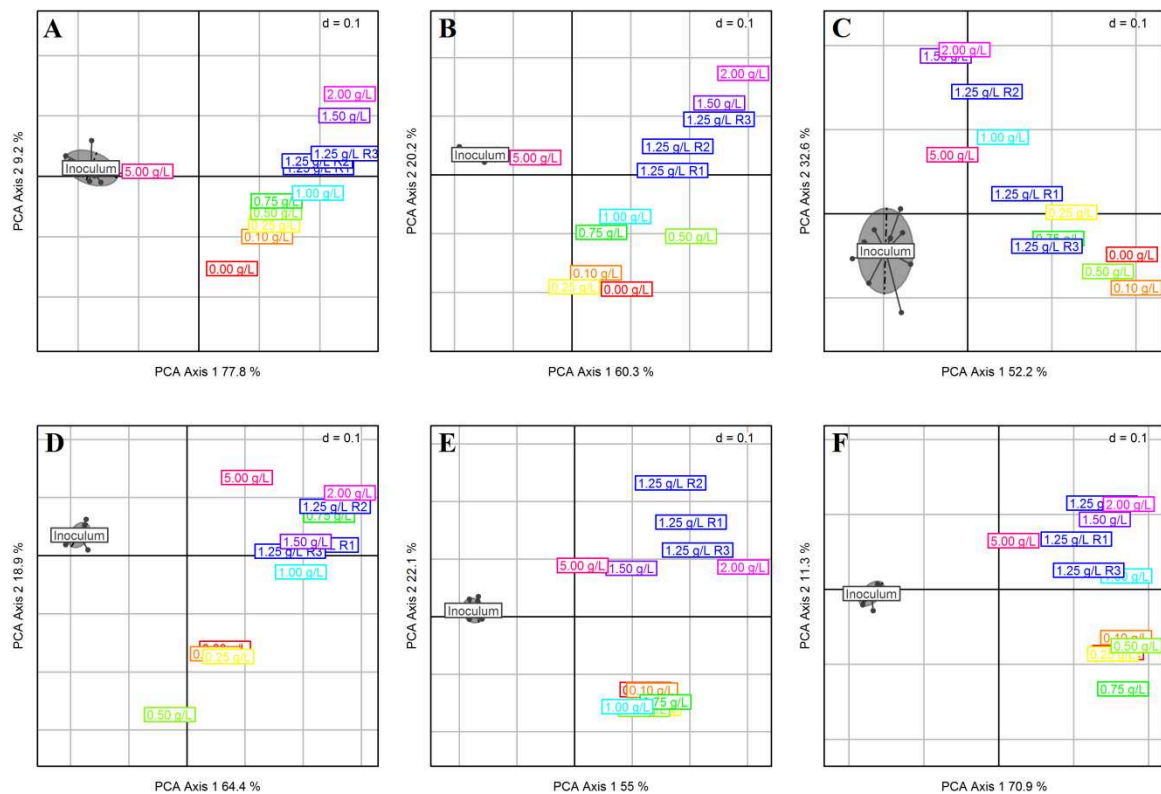


Figure 42 : Principal Component Analysis (PCA) of archaeal (A, B, C) and bacterial (D, E; F) diversity profiles generated by ARISA respectively after 9, 29 and 45 days of incubation. The color scale represents the initial concentration of phenol. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution of ARISA profiles with respectively 77.8-9.2% (A), 60.3-20.2% (B), 52.2-32.6% (C), 64.4-18.9% (D), 55.0-22.1% (E) and 70.9-11.3% (F) of the total variance.

Archaeal and bacterial responses to increasing initial levels of phenol clearly suggested two distinct inhibition patterns. After 9, 29 and 45 days of incubation, archaeal profiles were regularly distributed along Axes 2 of the PCAs from 0.00 g/L up to 2.00 g/L, indicating the gradual influence of phenol on these communities (Figure 42A,B,C). Nevertheless, beyond this threshold concentration, profiles recovered in the 5.00 g/L assay remained closer to the inoculum than the other profiles up to 29 days of incubation, suggesting that Archaea were strongly inhibited at this concentration. This corroborated CH_4 production kinetics which showed that methanogenesis was inhibited at this concentration. However, although they remained inactive throughout the experiment at this concentration, archaeal populations seemed to evolve after 45 days of incubation (Figure 42C). This was mainly attributed to an analytic artefact induced by biomass decay.

By contrast, bacterial ARISA profiles were clustered into two groups, suggesting that phenol initially shaped bacterial communities at an initial concentration threshold varying around 1.00 g/L according to the sampling date (Figure 42D,E,F). Phenol had a limited effect on bacterial communities throughout the incubation as long as its initial concentration did not exceed 0.50 g/L, since the corresponding profiles were close to the profile obtained in absence of phenol (0.00 g/L on Figure 42) at each of the three time points. Above 0.75-1.25 g/L, bacterial communities evolved, from the earliest days of incubation, toward a distinct stable

composition and they were probably more resistant to phenol. Moreover, since the composition remained relatively constant within each group throughout the experiment, it suggested that phenol degradation over time did not induce major bacterial reorganizations. Consequently, it could be hypothesized that phenol initial inhibitory effect towards Bacteria was possibly irreversible.

ARISA results tended to indicate that phenol induced microbial reorganizations from the lowest concentrations for Archaea, and from 0.50 g/L for Bacteria whereas AD final performance were not impaired up to 1.00 g/L of phenol. In order to confirm previous hypotheses and to verify if these adaptation patterns were permanent throughout the experiment, two additional PCAs, respectively presented in supplementary material (Figure 48), were computed. Instead of comparing all profiles corresponding to the same sampling date, PCAs were computed on all the ARISA profiles for which CH₄ production was active. Hence, profiles for which CH₄ cumulated production had reached more than 90% of its ultimate yield were not considered representative of the active microbiota and were thus excluded from the analysis. It implied that additional sampling dates were included in these analyses, corresponding to the highest initial phenol concentrations for which ultimate CH₄ production was delayed. So as to evidence potential patterns in samples distribution during time, symbols' size was correlated with the progression of the incubations.

These additional PCAs confirmed both the distinct inhibition patterns previously observed for Archaea and Bacteria. Figure 48A (Archaea) revealed that within PCA factorial plane, samples were regularly distributed along with increasing phenol concentrations, confirming that the composition of active archaeal communities was gradually influenced by phenol up to 2.00 g/L. Nonetheless, samples collected in the ultimate days of incubation tended to cluster together, implying that archaeal communities tended to evolve toward a less differentiated composition. This pattern could be related to phenol degradation that allowed, once phenol concentration declined below a certain threshold, the progressive emergence of initially inhibited methanogens. Figure 48B showed that bacterial populations were modified by phenol at an initial concentration threshold comprised between 1.00 g/L and 1.25 g/L which seemed to remain constant throughout the experiment. These results confirmed that inhibitory effect of phenol on bacterial communities was probably irreversible. Level-dependent inhibition of phenol was already observed by Chapleur et al., (2015) who described different thresholds from 0.50 g/L up to 2.00 g/L, between which great modifications of archaeal and bacterial communities were evidenced while methanogenesis still occurred.

2.3.3 Identification of key phylotypes involved in microbial responses to different levels of inhibition by 16S rRNA sequencing

In order to further investigate patterns revealed by ARISA in microbial community dynamics and to identify key microorganisms potentially involved in community structure changes along increasing phenol inhibition levels, 16S rRNA gene high-throughput sequencing was performed. A total of 44 out the 70 samples used for ARISA analysis were processed. Several thousands of sequences were identified. They were assembled into 1693 and 42 OTUs for Bacteria and Archaea, respectively. Relative abundance of archaeal and

bacterial OTUs were used for the analysis. In histogram representations, samples were aggregated by initial phenol concentration and by sampling date. Two PCAs were performed to statistically analyze Archaea and Bacteria 16S rRNA gene tags. For the sake of clarity of the PCA representation, T₀ sample, which was collected just before the beginning of the incubation and thus considered as an image of the initial inoculum, was not included in analysis. In order to evidence potential patterns in sample distribution during time, symbols' size was correlated with the number of days of incubation. Associated correlation circles were used to identify principal representative OTUs differentiating samples within the factorial plane. Key phylotypes' phylogenetic assignments were abbreviated.

2.3.3.1 Archaea

Archaeal OTU dynamics are presented on Figure 43. Methanogenic Archaea detected in the inoculum mainly belonged to an OTU assigned to genus *Methanolinea* with a relative abundance of 42% (ML1). Genera *Methanosarcina* and *Methanosaeta* as well as order WCHA1-57 were also relatively abundant with relative abundances of 23%, 7% and 11%, respectively. Figures 43B and 43C respectively showed associated PCA and correlation circle. According to the correlation circle, archaeal composition dynamics in all the samples appeared to be highly influenced by a core consisting of three OTUs: *Methanosarcina* OTU 2 (MS2), *Methanoculleus* OTU 1 (MC1) and *Methanolinea* OTU 1 (ML1). Therefore, the minor effect of all the other archaeal OTUs throughout the incubation is not discussed hereafter.

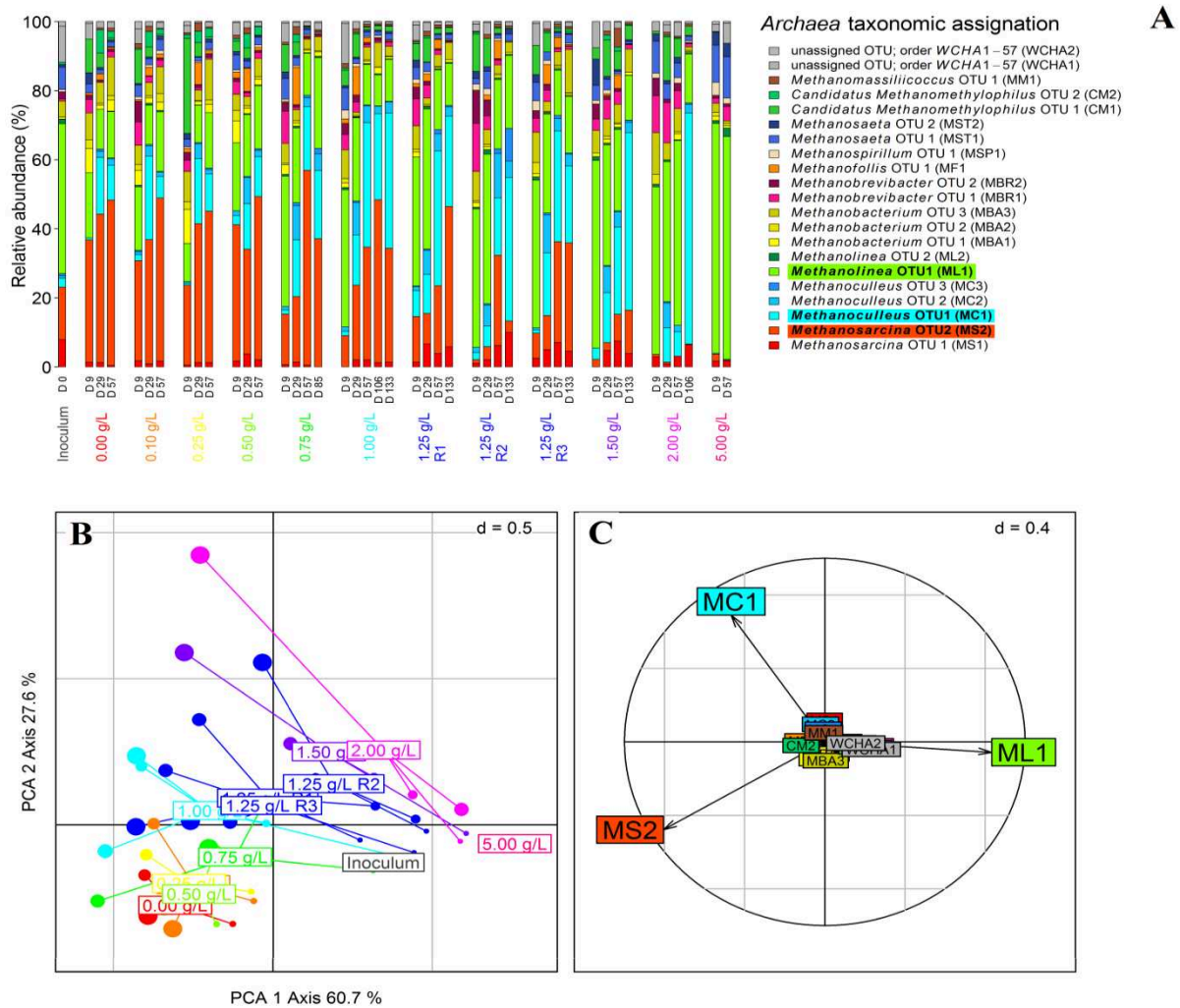


Figure 43 : Relative abundances of the archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing (A) statistically analyzed by Principal Component Analysis (B). For the histogram representation (A), samples were clustered by initial phenol concentration (g/L) and by collection date (number of days). Different shades of the same color were used to represent archaeal OTUs belonging to the same genus. The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (C). Within PCA, the color scale represents the initial concentration of phenol. The size scale of the symbols represents the percent of total cumulative methane production. OTUs belonging to the same genera were represented with the same color palette. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 60.7% and 27.6% of the total variance.

As long as archaeal communities were not able to overpass phenol inhibition and thus produce CH_4 , their composition remained relatively close to the inoculum. Hence, ML1 was predominant in all samples for which methanogenesis remained inactive, indicating that members of this OTU were not involved in active CH_4 production. In particular, complete inhibition of methanogenic communities at 5.00 g/L was associated with the great dominance of this OTU (65%) throughout the incubation. In 2.00 g/L assays, ML1 abundance remained circa 40-53% until 57 days of incubation whereas it dropped under 20% as early as between 9 and 29 days in lower phenol-concentrated bioreactors. However, when methanogenesis became active after 133 days, ML1 proportion eventually decreased down to 20%. These

observations were confirmed by PCA analysis. Indeed, from 0.75 g/L up to 2.00 g/L, the distribution of the samples collected during the early days of incubation seemed to be highly correlated with the relative abundance of ML1.

Phenol had a great influence on shaping archaeal communities throughout the incubation. In particular, a gradual shift between MS2 and MC1 seemed to occur along with increasing phenol concentrations from 0.50 g/L up to 2.00 g/L, corroborating the gradual inhibition pattern observed with ARISA.

Up to 0.50 g/L, phenol did not seem to influence archaeal composition since the relative abundance of these two OTUs remained respectively circa 43-47% and 6-11% all along the incubation. By contrast, from 0.75 g/L up to 1.50 g/L, MC1 proportion gradually increased from 19% to 51% at the expense of MS2 which dropped from 36% down to 12%. Since MS2 became predominant over time in the microbiota at lower initial phenol concentrations (up to 1.00 g/L), it suggested that this OTU played a key role in AD performance. Moreover, a recent study reported *Methanosarcina* as a sign of process stability (De Vrieze et al., 2012; Moset et al., 2015). On the other hand, *Methanoculleus* was revealed to be the predominant group of methanogens in digesters with syntrophic acetate oxidation (SAO) (Schnürer et al., 1999). It has been reported to be highly tolerant to environmental pressures such as ammonia and high VFA concentrations (Franke-Whittle et al., 2014; Poirier et al., 2016). The emergence of *Methanoculleus* has also been previously proposed as a potential warning indicator of acidosis (Goux et al., 2015). Hence, its increasing abundance along phenol concentrations suggested that MC1 played a key role in the maintenance of active methanogenesis through the establishment of specific syntrophic interactions probably with bacterial syntrophic acetate oxidizers. However, ultimate CH₄ yields began to decrease from an initial phenol concentration of 1.25 g/L indicating that beyond a certain threshold comprised between 1.00 and 1.25 g/L, despite MC1 members were in turn affected by the presence of phenol. At 2.00 g/L, MS2 proportion remained below 2% while MC1 became highly predominant (66%). It could thus be hypothesized that MC1 seemed to be the only OTU able to grow despite this inhibitory level and thus produce CH₄. However, ultimate CH₄ production was greatly impaired at 2.00 g/L, which could be related to the complete inhibition of phenol degradation inducing a constant pressure on the microbiota. This archaeal shift was clearly visible on PCA factorial plane within which bioreactors with increasing phenol concentrations were gradually positioned along PCA Axis 2. Furthermore, the correlation circle confirmed the antagonistic influences of MC1 and MS2 on this distribution.

Wirth et al., (2015) observed a strong shift from a *Methanosarcinales* dominated composition at low concentrations of phenol (up to 0.10 g/L) to an equal distribution of *Methanosarcinales*, and *Methanobacteriales* during the progressive adaptation of an inoculum up to 2.00 g/L of phenol corroborating the sensitivity of *Methanosarcina* to this inhibitor. These reorganizations within archaeal communities could potentially be associated with a shift in methanogenesis metabolic pathway. Indeed, several studies described an inhibition of acetoclastic methanogens by phenolic compounds (Olguín-Lora et al., 2003; Wang et al., 1991). Since *Methanoculleus* is an exclusive hydrogenotrophic methanogen, its gradual predominance along with increasing phenol concentrations tended to indicate that CH₄ was only produced via the hydrogenotrophic pathway at high inhibitory levels.

2.3.3.2 Bacteria

In total, Bacteria sequences were affiliated to 216 families. Among them, 189 represented individually less than 2% of the total sequences. The remaining core of 27 families, accounting together for more than 70% of the total number of bacterial sequences in each of the samples, was kept for the histogram representation on Figure 44A as well as for PCA analysis. Figure 44B and Figure 44C respectively show PCA and associated correlation circle.

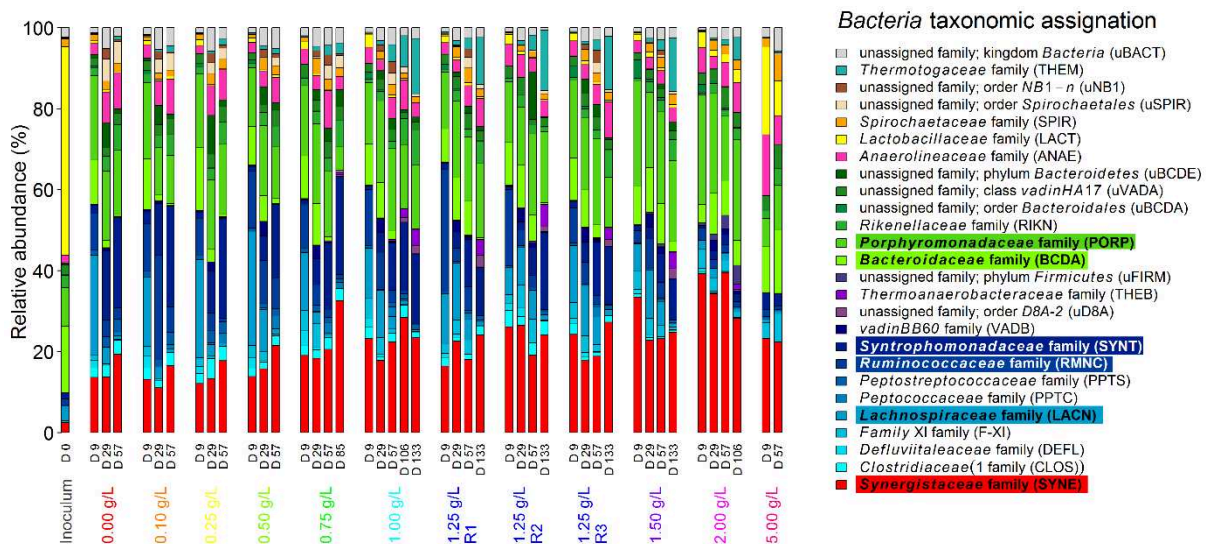


Figure 44 : Relative abundances of the bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing (A) statistically analyzed by Principal Component Analysis (B). For the histogram representation (A), samples were clustered by initial phenol concentration (g/L) and by collection date (number of days). Different shades of the same color were used to represent archaeal OTUs belonging to the same genus. The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (C). Within PCA, the color scale represents the initial concentration of phenol. The size scale of the symbols represents the percent of total cumulative methane production. OTUs belonging to the same genera were represented with the same color palette. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 43.5% and 23.9% of the total variance.

Most of the OTUs recovered in the inoculum belonged to family Lactobacillaceae (LACT) (51%) and to several families affiliated to order Bacteroidales (32%). Throughout the experiment, Bacteria recovered in every sample for which biogas was produced, were dominated by families belonging to three major orders: Synergistales, Clostridiales and Bacteroidales. Nonetheless, within these orders, bacterial populations revealed distinct adaptation patterns towards increasing phenol concentrations. Correlation circle associated to PCA evidenced six bacterial families which had the greatest influence on sample distribution: Synergistaceae (SYNE) affiliated to order Synergistales; Lachnospiraceae (LACN), Ruminococcaceae (RMNC) and Syntrophomonadaceae (SYNT) belonging to order Clostridiales; Bacteroidaceae (BCDA) and Porphyromonadaceae (PORP) assigned to order Bacteroidales. Therefore, the minor impact of other families is not discussed hereafter.

Similarly to Archaea, from 0.00 g/L up to 0.50 g/L, it appeared that bacterial composition dynamics was not influenced by phenol. Although Synergistaceae (SYNE) proportion in inoculum was recovered at only circa 2%, OTUs affiliated to this family significantly emerged from the earliest days of incubation in all bioreactors within this range of concentrations and relative abundances varying between 15% and 22% were reached. Moreover, the total proportion of families belonging to orders Bacteroidales and Clostridiales remained relatively stable circa 36%-42% and 23-39% respectively. Within order Clostridiales, an important shift seemed to occur over time. In the early days of incubation, it was dominated by families Lachnospiraceae (LACN) and Ruminococcaceae (RMNC) before Syntrophomonadaceae (SYNT) became predominant. This shift was clearly visible on PCA factorial plane and associated correlation circle. Order Clostridiales consists of fermentative organisms thought to use hydrocarbon intermediates to generate organic acid precursors. Due to their capacity to process a wide range of substrates, their importance has been stood out by many authors (Carballa et al., 2015). Moreover, they were also identified in many studies as aromatic hydrocarbon degraders (Rosenkranz et al., 2013). Lachnospiraceae and Ruminococcaceae were identified as two of the most abundant families from the order Clostridiales found in the mammalian gut environment and have been suggested to play important roles in protein hydrolysis (Biddle et al., 2013). They were reported to hydrolyze a variety of polysaccharides by different mechanisms. Consequently, these families were probably involved in the early steps of biowaste degradation. OTUs affiliated to family Syntrophomonadaceae (SYNT) were all assigned to genus *Syntrophomonas*, which has already been associated with efficient acetogenic performance, as well as with SAO (Carballa et al., 2015; Schnürer et al., 1999). Hence, it could be hypothesized that these families played a key role in AD process ranging from hydrolysis to acetogenesis and to SAO. Some of them could also be probably involved in phenol degradation according to Rosenkranz et al. (2013).

From 0.75 g/L up to 1.50 g/L, increasing phenol concentrations seemed to cause important modifications within dominant communities. Since these reorganizations occurred from the early days of incubation and remained relatively unchanged throughout the experiment, it suggested that contrary to Archaea, phenol degradation did not influence Bacteria response during time. Therefore, within this range of concentration, it could be hypothesized that Bacteria were only shaped by the initial selection pressure induced by phenol. In particular, relative abundance of Synergistaceae (SYNE) increased along with increasing initial phenol concentrations until reaching 24%-33%. Bacteria affiliated to this

family have been described as anaerobic amino-acid degraders and syntrophic acetate oxidizers able to cooperate with *Methanosaeta* (Ito et al., 2011). Their presence is also associated to efficient acetotrophic performance (Carballa et al., 2015). Moreover, this family has also been recovered in hexadecane-degrading culture (Cheng et al., 2013). To the best of our knowledge, their role in phenol resistance or their potential role in SAO with *Methanoculleus*, which was the predominant methanogen at high inhibitory concentrations, has not been described yet. By contrast, total proportions of families belonging to order Clostridiales slightly decreased from 31% at 0.75 g/L, down to 21 % at 1.50 g/L. This decrease was similar to that of Syntrophomonadaceae (SYNT) whose relative abundance dropped from 24% down to 10%. Consequently, the inhibition of these families seemed associated to the gradual emergence of Synergistaceae (SYNE). It could be hypothesized that this shift could lead to the implementation of new syntrophic interactions with Archaea. It also suggested that SAO could be maintained due to a possible functional redundancy between Syntrophomonadaceae and Synergistaceae. Within this range of concentrations, final AD performance were only impaired when initial phenol concentration was superior to 1.00 g/L while bacterial shifts occurred from a threshold comprised between 0.50 and 0.75 g/L. It evidenced that Bacteria started to adapt at initial phenol concentrations where the final CH₄ production was not deteriorated.

At 2.00 g/L, modifications seemed to be greatly accentuated compared to those observed between 0.75 g/L and 1.50 g/L. Synergistaceae (SYNE) relative abundance increased up to 40% evidencing its high phenol resistance, while the total proportion of families belonging to order Clostridiales (LACN, RMNC, and SYNT) dropped down to 13%. Nevertheless, resulting AD performance were strongly disturbed. Consequently, despite the emergence of Synergistaceae, the decline of families belonging to order Clostridiales and especially of Syntrophomonadaceae (SYNT) possibly evidenced the limits of microbiota adaptation ability, leading to deteriorated biodegradation. Moreover, since phenol degradation was completely inhibited at this concentration, it suggested that some of the OTUs belonging to Clostridiales could potentially be involved in related degradation pathways, as previously suggested (Rosenkranz et al., 2013). By contrast, total relative abundance of order Bacteroidales, which remained relatively constant circa 20-30% throughout the experiment up to initial phenol concentration of 1.50 g/L, increased up to 32-41% at 2.00 g/L. This order mainly consisted of OTUs affiliated to families Bacteroidaceae (BCDA) and Porphyromonadaceae (PORP) which were reported as the dominant families of the phylum Bacteroidetes in cattle manure (Moset et al., 2015). Family Porphyromonadaceae was suggested to play an important role in the degradation of the accumulated volatile fatty acids (Regueiro et al., 2014a) while members of Bacteroidaceae have been characterized as important cellulolytic microorganisms (Patel et al., 1980). The maintenance of important percentages of Bacteroidales within a digester has already been suggested to be responsible for the ability of the anaerobic microbiota to counteract disturbances such as shock loadings (Regueiro et al., 2015). Since families Bacteroidaceae (BCDA) and Porphyromonadaceae (PORP) seemed to be resistant to phenol even up to 2.00 g/L, it suggested that they could be part of bacterial key players at high phenol concentrations.

As a result, it could be assumed that while families assigned to Clostridiales which are able to perform a wide range of metabolic steps within AD process in uninhibited conditions,

were progressively inhibited by phenol, families belonging to Bacteroidales and Synergistales gained in importance within the microbiota at different thresholds. Increasing phenol concentrations also induced increasing selection pressure that also modified syntrophic populations. Since they are known to have extremely specific functions, their role is crucial to preserve the overall system performance (Carballa et al., 2015). This could be one of the reasons why, syntrophic families such as Syntrophomonadaceae (SYNT) were the first to be gradually substituted by Synergistaceae (SYNE) from lower initial phenol concentrations, thus contributing to the stability of methanogenesis. On the other hand, when selection pressure was too strong for Clostridiales hydrolytic families such as Lachnospiraceae (LACN), Ruminococcaceae (RMNC), other families from order Bacteroidales such as Bacteroidaceae (BCDA) and Porphyromonadaceae (PORP) supplanted them.

2.3.4 Towards the possibility of identifying microbial indicators associated with AD inhibition?

Phenol induced level-dependent modifications of the microbial community composition. Results moreover revealed that archaeal and bacterial major shifts occurred at lower concentration thresholds than those for which AD performance was impaired. It evidenced the difficulty to establish a direct correlation between degradation performance and community structure. It also raised the question whether microbial indicators could be used to anticipate anaerobic digester disruptions rather than remediate them.

In particular, genus *Methanosarcina* and family Syntrophomonadaceae both appeared as key players in efficient AD performance under uninhibited conditions. We hypothesized that their predominance within the microbiota explained why AD final performance were not deteriorated up to an initial phenol concentration of 1.00 g/L. Recent assumptions corroborated these observations by proposing robust methanogenesis microbiota based on Syntrophomonas and *Methanosarcina* for intensive energy production reactor systems (Ali Shah et al., 2014). However, from 0.50 g/L up to 2.00 g/L, the dominant *Methanosarcina* tended to be supplanted by *Methanoculleus* along increasing initial phenol concentrations while among syntrophic populations, Synergistaceae progressively emerged at the expense of Syntrophomonadaceae. The microbiome ability to adapt to increasing phenol concentrations and avoid the total process disruption was probably allowed by an ecological plasticity that was evidenced by both archaeal and bacterial shifts. Since these shifts began to occur while final AD performance was still not impaired, we believe that they could be possible early warning microbial indicators portending phenol inhibitory effect.

The perspective of identifying microbial indicators associated with AD performance could produce new management tools for anaerobic digestion. In this objective, other analyses are needed to provide statistical robustness and to explore the different factors that have a strong influence on the microbial community composition (e. g. substrate, inoculum, environmental conditions, type of reactor etc.). A globalized database built with a standardized method of microbial characterization could then allow the determination of benchmark values useful to conduct microbial resource management and apply microbial based control prior to the process deterioration. These insights could pave the way to reach an

optimal digestion rate despite the presence of various types of inhibitors, and thus improve waste treatment efficiency.

2.4 Conclusions

Up to 0.50 g/L, optimized AD performance was preserved regardless initial phenol concentration and AD microbiota composition remained unchanged. OTUs belonging to archaeal genus *Methanosarcina* and to bacterial orders Clostridiales, Bacteroidales and Synergistales were predominant within the microbiota.

From 0.50 g/L up to 1.00 g/L, microbial reorganizations started to occur without AD final performance being impaired. These changes were mainly evidenced by an increasing proportion of genus *Methanoculleus* and family Synergistaceae. These increases were suggested as early warning indicators portending phenol inhibition towards AD microbiota.

From 1.00 g/L up to 2.00 g/L, AD performance was gradually impaired. Community structural changes observed at lower initial phenol levels were more pronounced: *Methanoculleus* and Synergistaceae progressively became predominant. By contrast, *Methanosarcina* and Syntrophomonadaceae proportions decreased. Moreover, the proportion of OTUs affiliated to order Bacteroidales gained in importance at 2.00 g/L at the expense of Clostridiales.

At an initial phenol concentration of 5.00 g/L, methanogenesis was completely inhibited. Genera *Methanosarcina* and *Methanoculleus* were not detected. Orders Bacteroidales and Synergistales were predominant whereas Clostridiales was inhibited.

2.5 Supplementary figures

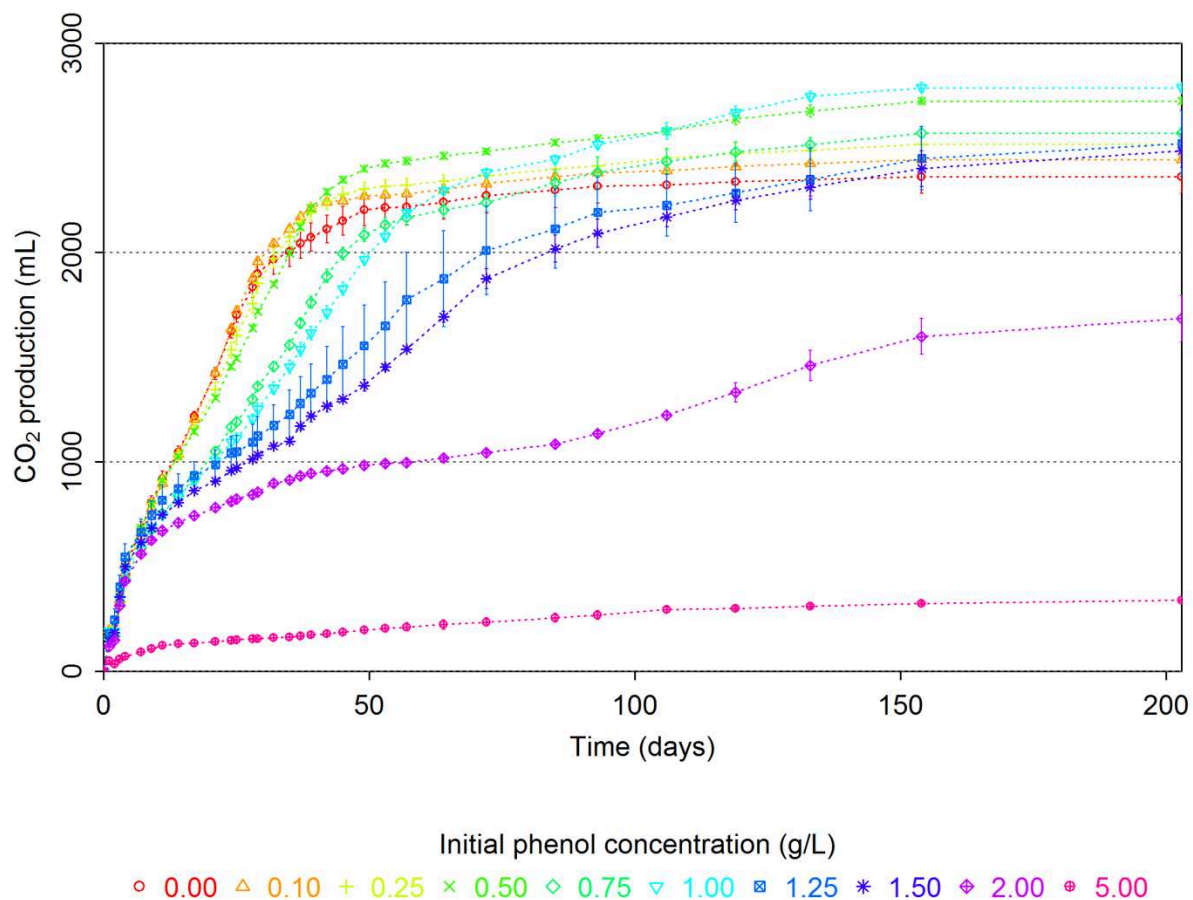


Figure 45 : Cumulated CO₂ production (mL) over time (number of days) for the different initial phenol concentrations (g/L). Mean values and error bars corresponding to +/- one standard deviation are shown for each group of triplicate bioreactors.

Tableau XIII : Kinetic constants for CH₄ and CO₂ production using modified-Gompertz model. The data are shown for the different groups of triplicate (mean values and standard deviation)

Initial phenol concentration (g/L)	Ultimate production yield P (mL)		Maximum production rate R _{max} (mL/day)		Lag phase λ (day)	
	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂
0.00	5067 ± 252	2312 ± 167	217 ± 9	70 ± 3	7.2 ± 0.5	0 ± 0
0.10	5322 ± 46	2393 ± 10	220 ± 7	73 ± 1	8.9 ± 0.3	0 ± 0
0.25	5261 ± 126	2460 ± 71	201 ± 12	66 ± 3	10.3 ± 0.7	0 ± 0
0.50	5699 ± 87	2638 ± 37	181 ± 2	60 ± 1	12.5 ± 0.2	0 ± 0
0.75	5234 ± 125	2498 ± 87	165 ± 4	44 ± 2	14.1 ± 0.4	0 ± 0
1.00	5733 ± 76	2755 ± 39	123 ± 7	38 ± 1	17.4 ± 0.7	0 ± 0
1.25	4729 ± 352	2472 ± 239	114 ± 17	28 ± 9	22.7 ± 6.5	0 ± 0
1.50	4626 ± 302	2464 ± 166	101 ± 22	24 ± 1	24.0 ± 2.1	0 ± 0
2.00	2763 ± 361	1513 ± 282	36 ± 10	16 ± 7	32.4 ± 9.9	0 ± 0
5.00	10 ± 2	333 ± 5	6 ± 0.4	3 ± 1	n.d	0 ± 0

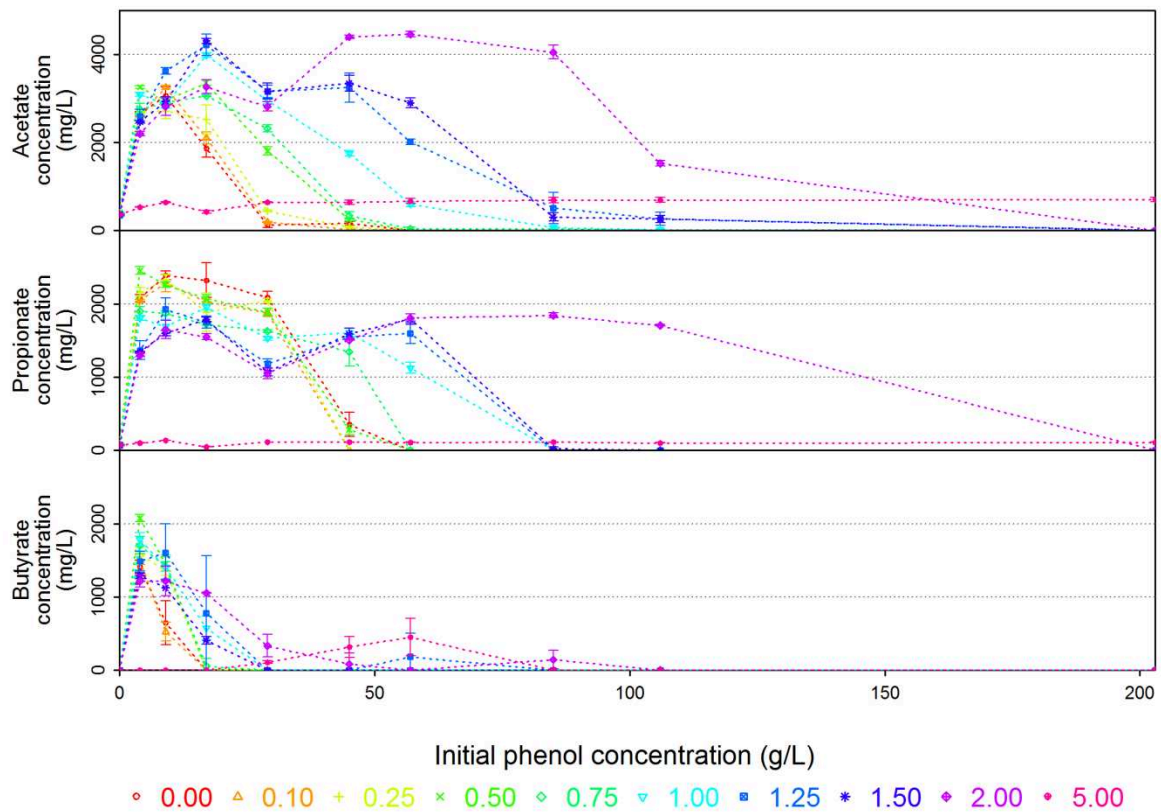


Figure 46 : Volatile fatty acids concentrations over time. Acetate, propionate and butyrate concentrations (mg/L) in the liquid phase over time (number of days), for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates).

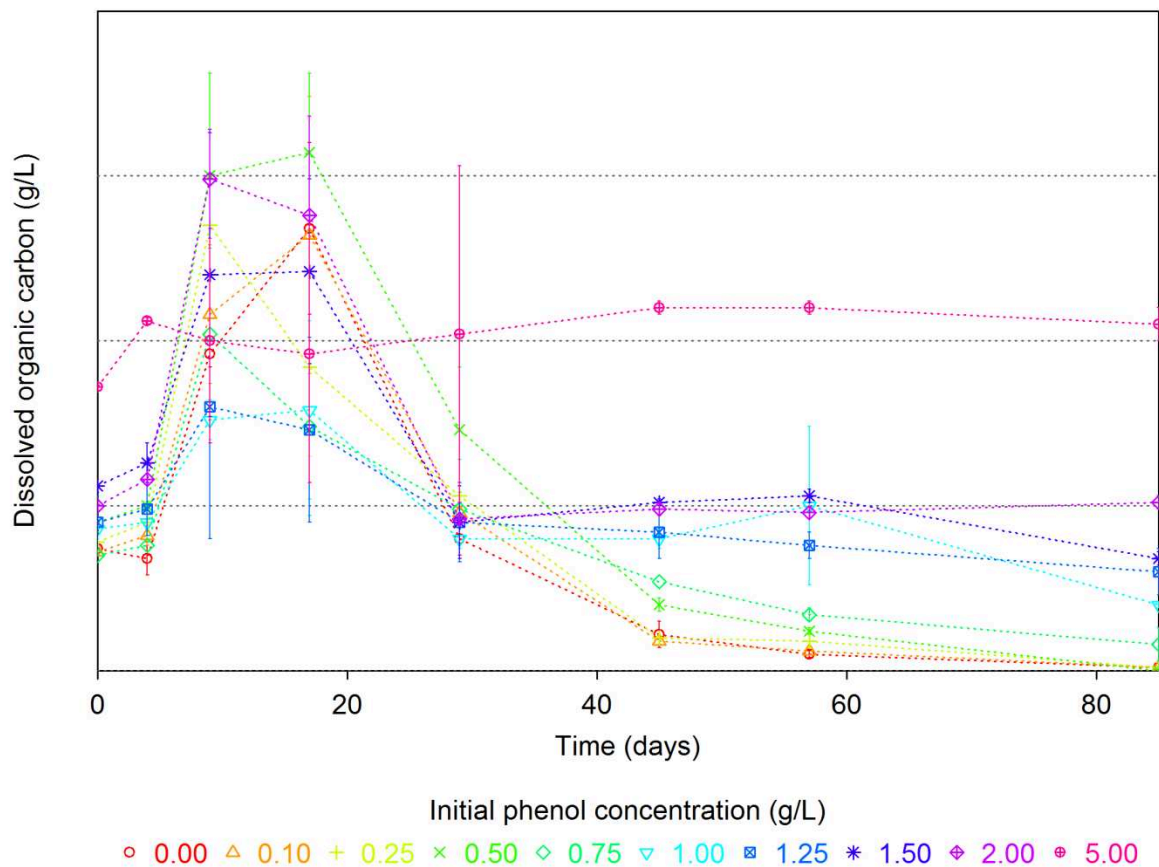


Figure 47 : Dissolved organic carbon concentrations over time. DOC (g/L) in the liquid phase over time (number of days), for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates).

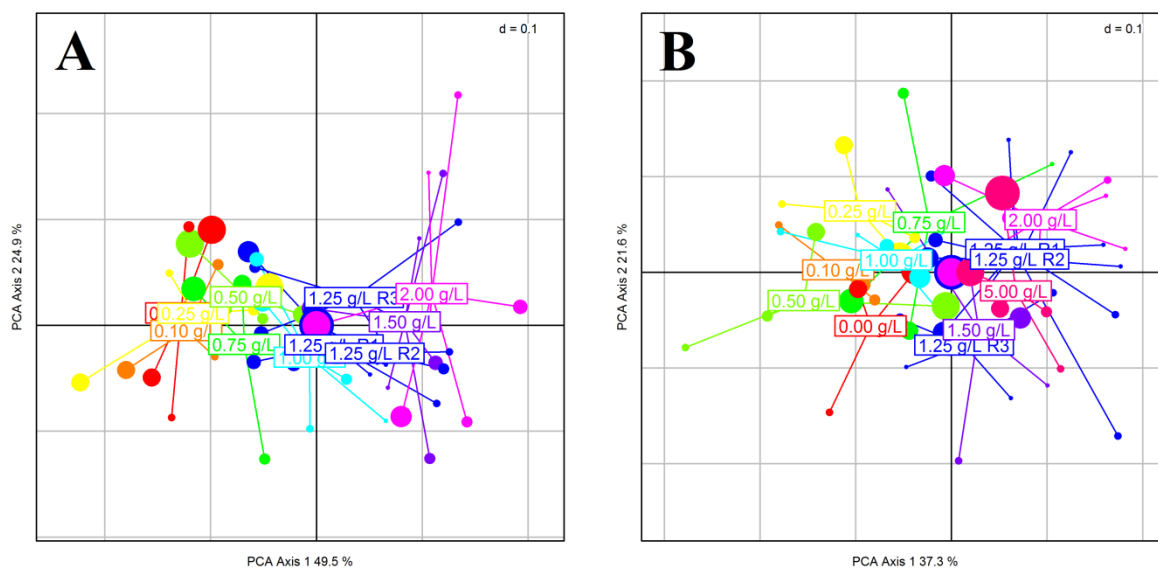


Figure 48 : Principal Component Analysis (PCA) of archaeal (A) and bacterial (B) diversity profiles generated by ARISA

Samples for which CH₄ production had reached more than 90% of its ultimate yield were not included in these PCAs. The color scale represents the initial concentration of phenol. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution of ARISA profiles with respectively 49.5-24.9% (A) and 37.3-21.6% (B) of the total variance.

3 Anaerobic digestion inhibitions by increasing concentrations of phenol and ammonia: Comparative ecological study and identification of key phylotypes

Previous pages of this chapter presented a parallel analysis of the inhibiting effects of phenol and ammonia on the performance and on the microbial dynamics of digesters incubated simultaneously with exactly the same anaerobic inoculum (same starting point). We tried to identify key phylotypes involved in community changes related to both specific inhibitions. To conclude this chapter we now present a joint analysis of the results of both experiments to compare the effect of the inhibitors on the degradation and on the related microbial communities.

3.1 Degradation performance

One triplicate of control digesters was incubated without inhibitory compound for each experiment. As expected, both triplicates showed comparable anaerobic digestion performance. They led an ultimate CH₄ production yield of circa 5000 mL after a lag time of 7-8 days. However, increasing levels of phenol and ammonia led to distinct inhibiting patterns. Biogas production kinetics was progressively delayed by phenol with lag times increasing from 9 days at 0.1 g/L to 33 days at 2.00 g/L. By contrast, up to 10.0 g/L of TAN, lag time was not influenced by this inhibitor and fluctuated between 7 and 9 days. Lag time only increased at 25.0 g/L of TAN for which it reached 22 days. Both maximal inhibitory concentrations (5.0 g/L of phenol and 50.0 g/L of TAN) led to a complete disruption of methanogenesis. Consequently, no lag time could be calculated. Ultimate CH₄ production yields were also differently impaired by both inhibitors. Up to 1.00 g/L of phenol initially added, final CH₄ production was not significantly impaired and even enhanced thanks to the degradation of phenol. At 1.25 and 1.5 g/L, final CH₄ production slightly decreased before dropping by 50 % at 2.00 g/L. In presence of TAN, ultimate CH₄ production yields were progressively impaired from lowest concentrations (1.00 g/L). Figure 49 gives an overview of both experiments in terms of CH₄ production.

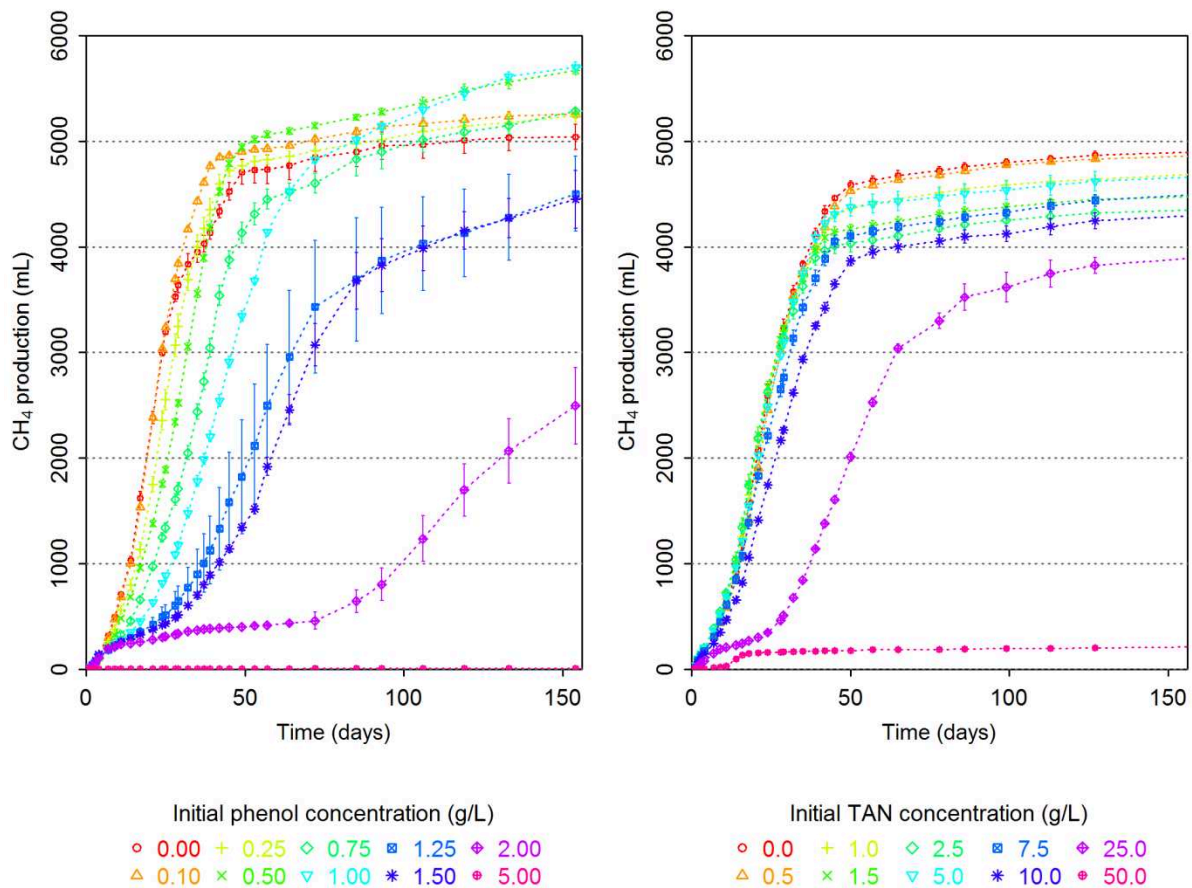


Figure 49 : Cumulated CH₄ production (mL) over time (number of days) for the different concentrations of (A) phenol and (B) TAN (g/L). Mean values of triplicate bioreactors are presented, error bars represent standard deviation within triplicates.

3.2 Effect of the inhibitors on microbial communities

In order to investigate if key phylotypes, identified for each inhibition, were recovered in both experiments, a global analysis of molecular data was performed. Reads generated by 16S rRNA gene sequencing for both experiments were thus clustered and simultaneously processed with the bioinformatics pipeline as described page 112. Archaeal and bacterial resulting OTUs were separately treated. Only samples for which biogas production was active were selected for this global analysis. Therefore, digesters incubated with 5.00 g/L of phenol and 50.0 g/L of TAN, which were totally inhibited, were not conserved. Samples in the earliest days of incubation (no or low biogas production) were also removed. Moreover, OTUs relative abundances were transformed with a square root transformation in order to give more importance to minor OTUs before being statistically analyzed with centered not scaled principal component analyses (PCA). PCAs performed on archaeal OTUs and bacterial families are presented on Figure 50. On this figure, samples were clustered by the type of inhibitor initially added in the digesters.

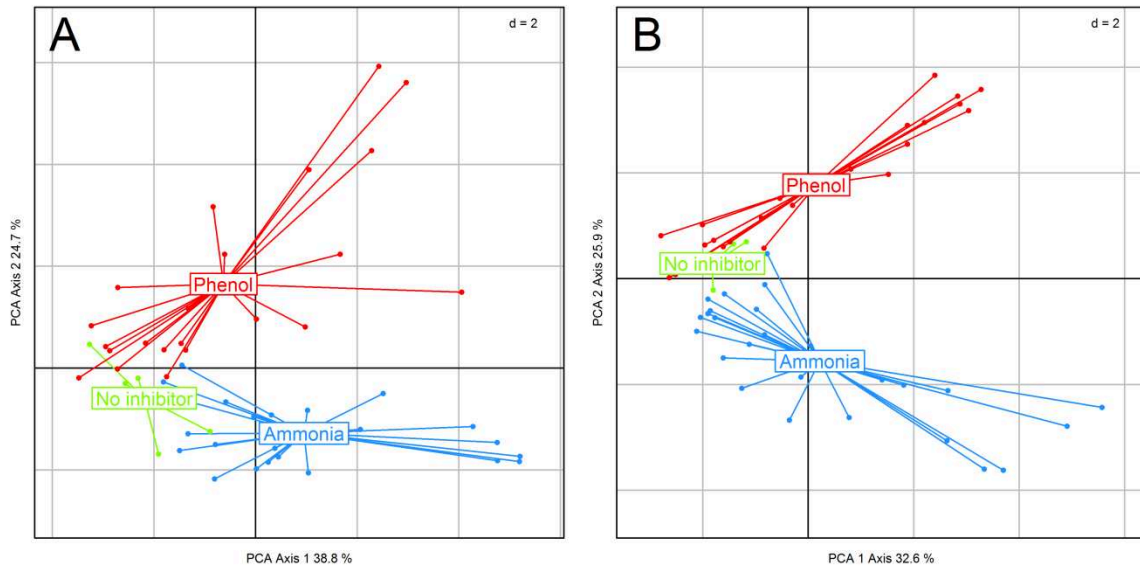


Figure 50 : Principal component analysis of (A) archaeal OTUs and (B) bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 38.8 %, 32.6 % and 24.7 %, 25.9 % of the total variance.

Samples distribution within both PCA factorial planes indicated that archaeal and bacterial responses to increasing levels of inhibitors clearly revealed two distinct adaptation patterns. Consequently, it can be assumed that phenol and ammonia differently shaped the same initial anaerobic microbiota. It also suggested that key archaeal OTUs and bacterial families could be specifically correlated to both types of inhibition.

In order to further investigate patterns revealed by these first analyses and identify key microorganisms potentially involved in community structure changes, PCA legends were modified and correlation circles were plotted to visualize the contribution of the different OTUs. Within PCAs, samples were clustered and colored by initial inhibitor concentration. Same color scale was used for phenol and ammonia. Therefore; within each concentration cluster, phenol was abbreviated with P and ammonia with N. The size of the symbols is correlated to the collection dates: the later the bigger. Within correlation circles, different colors were used to represent archaeal OTUs belonging to the same genus. As done in previous results, bacterial OTUs were aggregated at the family level. Similarly to Archaea, different colors were used to represent bacterial families belonging to the same order.

3.2.1 Archaea

Figure 51 shows results obtained from the statistical analysis performed on archaeal OTUs and the associated correlation circle.

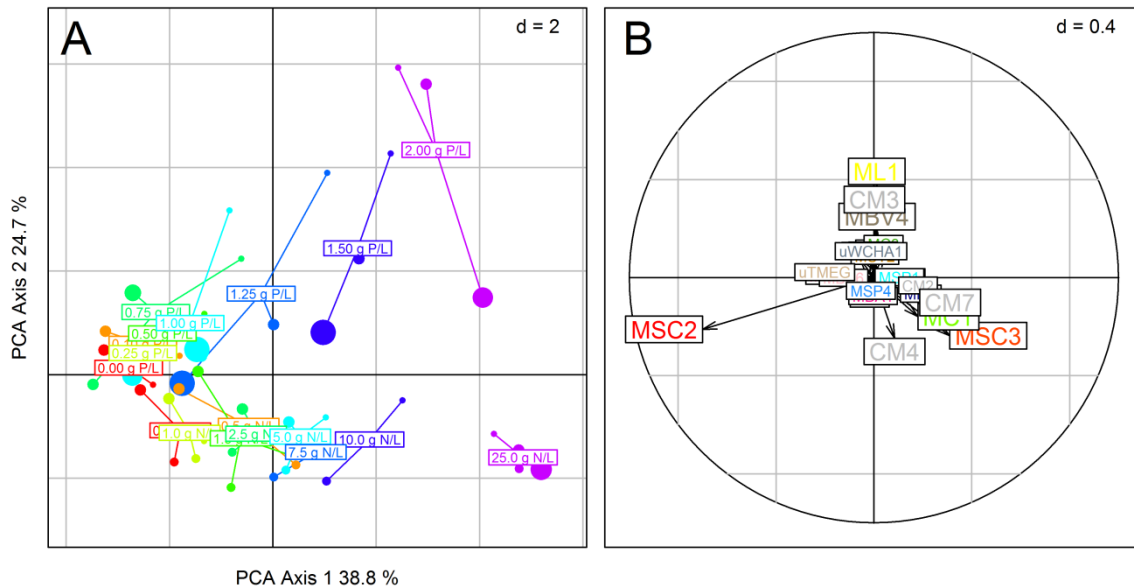


Figure 51 : Principal Component Analysis of the archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 38.8 % and 24.7 % of the total variance.

Samples distribution indicated that the first PCA axis was clearly correlated with the inhibition level while the second PCA axis was correlated to the inhibitor. Digesters incubated with ammonia were mostly recovered on the lower part of the PCA factorial plane whereas those incubated with phenol were mainly located in the upper part.

Interestingly, increasing concentrations were not similarly distributed along the first PCA axis from the left to the right part of the PCA factorial plane for both inhibitors. Up to 0.75 g/L of phenol, samples were highly clustered while they were more dispersed from 1.00 g/L. By contrast, samples were more homogeneously distributed along with increasing TAN concentrations confirming observations made on biogas production kinetics.

Lower concentrations of both inhibitors were strongly linked to the presence of a single OTU assigned to genus *Methanosarcina* (MSC2). Increasing levels of phenol and TAN tended to reduce the abundance of this OTU suggesting that *Methanosarcina* (MSC2) was sensitive to both inhibitors.

Increasing levels of ammonia induced a progressive shift towards an archaeal community consisting of OTUs affiliated to genus *Methanoculleus* (MC1), genus *Methanosarcina* (MSC3) and two OTUs belonging to genus *Candidatus Methanomethylophilus* (CM4 and CM7). Throughout the CH₄ production phase, samples distribution within each ammonia concentration cluster revealed that each digester's archaeal composition remained highly stable (low variation of samples within each concentration

group). It suggested an early and stable shaping of archaeal populations by the initial ammonia level.

By contrast with ammonia clusters, phenol clusters were highly dispersed when phenol initial concentration was superior to 0.75 g/L. It revealed that above this concentration, phenol induced deep modifications into the archaeal community even during biogas production phase. These rearrangements can be attributed to the degradation of phenol during the experiment which modified the inhibitory stress all along the incubation. Hence, archaeal populations probably reorganized according to the instant phenol inhibition level whereas ammonia inhibition, which remained stable throughout the incubation, led to an initial selection of archaeal resistant populations.

When phenol concentration remained high during the early days of incubation, three OTUs different from those recovered during the TAN experiment were recovered. They belonged to genus *Methanobrevibacter* (MBV4), *Candidatus Methanomethylophilus* (CM3) and *Methanolinea* (ML1). It was hypothesized that these OTUs were dominant because of the inhibition caused by the high phenol concentration to sensitive populations such as *Methanosarcina* OTU2 (MSC2). Once phenol was degraded up to 1.50 g/L, samples collected in these digesters got closer to the left part of the factorial plane confirming the emergence of *Methanosarcina* (MSC2). Hence, the more phenol was degraded, the closer from the non-inhibited digesters the archaeal composition was. However, samples were still distributed along the first principal axis indicating the growing influence of OTUs which were similarly recovered at high ammonia levels such as *Methanoculleus* (MC1) and *Methanosarcina* (MSC3).

Consequently, ammonia seemed to have a strong remanent effect on archaeal populations. Since this inhibitor could not be degraded, it induced a constant inhibitory pressure that led to stable archaeal compositions within each digester. Incubations conducted with increasing phenol concentrations led to contrasted results. As soon as phenol could be degraded, OTUs which were active under non-inhibiting conditions, managed to emerge after increasing delays correlated with the initial phenol concentration. It suggested that archaeal populations such as *Methanosarcina* OTU1 (MSC2) could be resilient to this type of inhibition. However, when phenol level remained high long enough, archaeal community evolved towards a different composition closer to those recovered in digesters incubated with highest ammonia concentration. Hence, the main genus recovered at high inhibition levels regardless the type of inhibition consisted of one major OTU, *Methanoculleus* OTU1 (MC1). Nevertheless, some OTUs belonging to *Methanosarcina* were also recovered at extreme ammonia concentrations did not grow at highest phenol concentrations.

3.2.2 Bacteria

The statistical analysis performed on bacterial families and the associated correlation circle are presented on Figure 52.

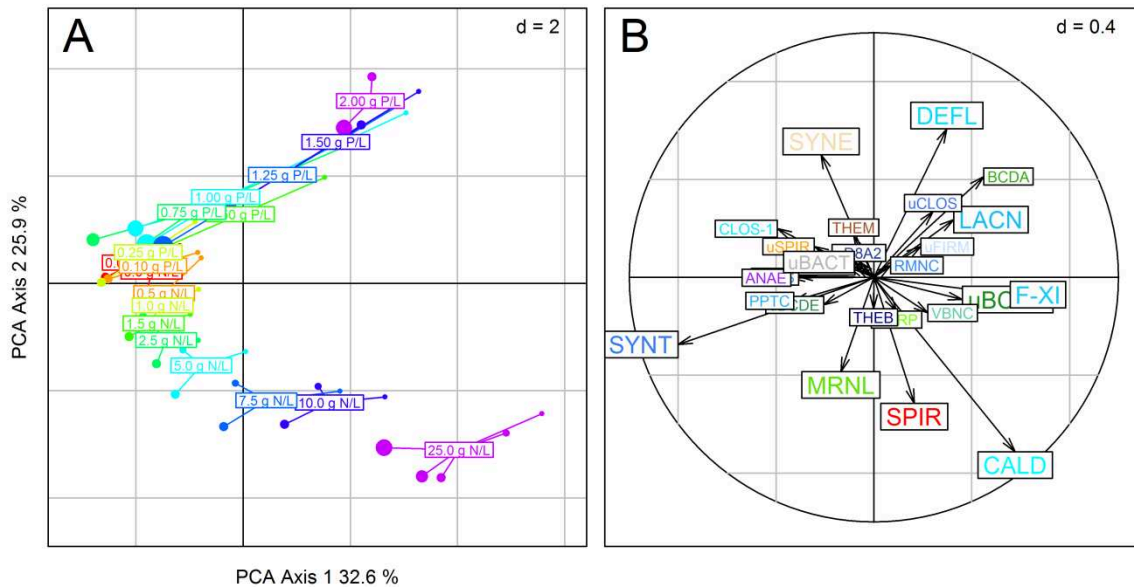


Figure 52 : Principal Component Analysis of the bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The influence of the principal bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 32.6 % and 25.9 % of the total variance.

Similarly to Archaea, samples distribution indicated that the first PCA axis was correlated with the inhibition level while the second PCA axis was correlated to the inhibitor. Increasing concentrations of inhibitors were homogeneously distributed along the first PCA axis from the left to the right part of the PCA factorial plane. Digesters incubated with ammonia were mostly recovered on the lower part of the PCA factorial plane whereas those incubated with phenol were mainly located in the upper part.

Lowest inhibitors concentrations were clustered together and led to bacterial composition consisting of one major family assigned to Syntrophomonadaceae (SYNT) and to other families with minor influence such as Anaerolinaceae (ANAE), Peptostreptococcaceae (PPTC) and to an unassigned family belonging to phylum Bacteroidetes (uBCDE).

Increasing levels of ammonia led to a progressive shift towards families affiliated to Marinilabiaceae (MRNL), Spirochaetaceae (SPIR) and Caldicoprobacteraceae (CALD). Similarly to Archaea, each inhibiting ammonia concentration led to a stable bacterial community composition during time. Indeed, for each ammonia concentration cluster, PCA factorial plane revealed that all samples were tightly clustered together. However, each cluster was homogeneously distributed along the first principal axis indicating that increasing concentrations led to the emergence of different populations. This observation confirmed the remanent inhibiting effect of ammonia already observed for archaeal community.

By contrast, increasing phenol concentrations progressively promoted the emergence of different families, assigned to Synergistales (SYNE), Defluviitaleaceae (DEFL), Bacteroidaceae (BCDA), and to Lachnospiraceae (LACN). Some families such as Family XI (F-XI) and an unassigned family belonging to order Bacteroidales (uBCDA) seemed to be present in all inhibited incubations regardless the type of inhibition. Nonetheless, within digesters for which phenol was completely degraded (up to 1.50 g/L), samples distribution revealed that final bacterial compositions were tightly close to the one recovered in presence of lowest phenol concentrations. This result tended to indicate that phenol firstly inhibited representative populations of non-inhibited digesters. But after phenol concentration dropped down to a certain threshold, these bacterial populations were able to emerge and to become predominant within the community suggesting their great resilience capacity. Contrary to Archaea, once phenol was degraded, this inhibitor had less important effect on bacterial composition. Nevertheless, at 2.00 g/L, phenol degradation was completely inhibited which consequently led to a stable bacterial composition which remained highly different from other bioreactors.

Globally, both inhibitors led to an increased proportion of OTUs affiliated to orders Clostridiales and Bacteroidales. However, within these orders, discriminating bacterial families involved in these community changes were distinct for both inhibitions. Other families were also evidenced such as Synergistales (SYNE) at lower phenol concentration while ammonia tended to enhance the emergence of Marinilabiaceae (MRNL) and Spirochaetaceae (SPIR).

These promising results should be confirmed with other experiments conducted with different types and levels of inhibitors on continuous digesters. A global study on anaerobic digestion inhibitions associated with a massive 16S rRNA gene sequencing analysis could thus be useful to try to define some early warning microbial indicators specific to each inhibition. These bioindicators could thus be helpful to identify the inhibitor responsible for a digester failure and maybe to prevent it from being affected.

INFLUENCE DE L'AJOUT DE
SUPPORTS ACTIFS SUR LA
RÉSISTANCE D'UN ÉCOSYSTÈME
ANAÉROBIE AU PHÉNOL ET À
L'AZOTE AMMONIACAL

1 Introduction

Microorganisms can grow either independently in a planktonic state, or attached to surfaces within complex aggregates. In bioprocesses, specific biofilm arrangements like flocs or granules are widespread. They allow a greatly increased rate of organic matter breakdown as compared to what occurs in bioreactors within which planktonic communities are not organized in consortia (de Bok et al., 2004). Proximity of microorganisms in aggregates favors cross-feeding, metabolic end products of one species becoming substrates for nearby species until the final end products. In particular, syntrophic associations of anaerobic digestion benefit a lot from this type of structures as they require that the pool size of the shuttling intermediate has to be kept low to allow efficient cooperation. Direct interspecies electron transfer may also be possible in aggregates. It is particularly interesting as it may be a more effective mechanism for interspecies electron exchange than is indirect transfer via the production of reduced molecules such as H₂ and formate (Subramanyam, 2013). Moreover, excellent examples of resistance to perturbations and of functional stability are found in biofilms and granules (Briones & Raskin, 2003). For these reasons, different studies have been conducted to promote microbial growth and spatial structuring. Upflow anaerobic sludge blanket technology (UASB) is a well-known example of anaerobic reactor designed to select and favor microbial granules over planktonic microorganisms (Subramanyam, 2013). Support media that can provide a high-surface area for microbial attachment have also been used. Among them, several have been reported to positively influence microbial and enzymatic transformation of a variety of substances. For example, the supplementation of the reactors with polymers, such as chitosan, can enhance the granulation and the specific methanogenic activity (Lertsittichai et al., 2007). Moreover, electrically conductive material may promote electron transfer through microorganisms: biochar has sufficient conductivity to promote direct electron transfer between syntrophic partners and enhance methane production (Chen et al., 2014b), as well as activated charcoal (Liu et al., 2012). Authors also reported that zeolites, presenting a high local conductivity, caused an increase in the apparent kinetic constant of the process resulting in values twice as high as those observed in control reactor (Montalvo et al., 2012). Even if the benefits of these aggregation methods on digestion performance have been investigated, the underlying effects of support materials towards microorganisms are poorly known. To go further in the optimization of this operating strategy in industrial processes, a better understanding of key phylotypes steering the microbial community towards enhanced biodegradation performance is needed. In this context, various support media such as two distinct zeolites, two distinct activated carbons and chitosan were selected for this study. Their effect on anaerobic digestion performance were assessed under non-inhibiting conditions. Moreover, molecular analyses such as 16S rRNA gene sequencing were performed to study their influence on microbial communities. Simultaneously, two similar experiments were conducted with digesters inhibited with phenol and ammonia nitrogen. Emerging knowledge will help to select the most propitious support regarding the type of inhibition and to favor the development of specific microbial arrangements.

2 Key elements of the experimental set-up

This study was conducted in batch digesters. All incubations were performed in triplicates. Bioreactors (glass plasma bottles, total working volume of 500 mL) were seeded with 20 g of sludge pellets obtained by centrifugation of samples from a 50 L stable laboratory bioreactor incubated at 35°C. This bioreactor had previously been inoculated with sludge collected in an industrial mesophilic digester treating both primary and excess biological sludge on a municipal wastewater treatment plant (Achères, France). The reactor was fed with mashed biowaste provided by an industrial food waste deconditioning unit (Chemaudin, France) in order to acclimatize the microbial consortium to this substrate. This industrial unit is supplied with residual food waste from restaurants, supermarkets, and food industries. Batch digesters were supplemented with 50 g of the same mashed biowaste (C [wt% dry solids] = 49.5%, N [wt% dry solids] = 3.6%; K^+ = 2.48 mg/g; NH_4^+ = 2.18 mg/g; Mg^{2+} = 3.3 mg/g; Ca^{2+} = 1.11 mg/g) corresponding to an initial substrate/inoculum ratio of 10 g COD/g COD (12 g COD substrate/1.2 g COD inoculum).

Five support materials were separately added within batch digesters. Control assays without support were also implemented. Consequently, a total of 18 digesters were incubated for each experiment. Before being added into the digesters at a concentration of 10 g/L, zeolites and activated carbons were sifted in order to obtain a comparable grain size comprised between 0.5 mm and 1 mm. Chitosan was added to reach a final concentration of 1 g/L. Support media main characteristics are presented in Table 1.

Tableau XIV : Support media main characteristics

Support material	Supplier	Product name	Granulometry (mm)	Surface (m ² /g)	Composition
Zeolite 1	Somez	Natural zeolite, Siliz [®] 14, Chabazite 60%	0.50 - 1.00	-	SiO ₂ : 50-53 %; Al ₂ O ₃ : 16-18 %; CaO : 5-6 %; K ₂ O : 4-5 %; Fe ₂ O ₃ : <5 %; MgO : 0.5-2 %
Zeolite 2	Somez	Natural zeolite, Siliz [®] 24, Clinoptilolite >80%	0.70 - 1.20	-	SiO ₂ : 65-72 %; Al ₂ O ₃ : 11-14 %; CaO : 2.5-5.5 %; K ₂ O : 2-3.5 %; Fe ₂ O ₃ : 0.5-2 %; MgO : 0.5-1.5 %
Activated carbon 1	Sigma Aldrich	Untreated activated carbon	0.84 - 2.38	600 - 800	C
Activated carbon 2	Sigma Aldrich	Acid washed activated carbon, Darco [®]	0.84 - 1.68	600	C
Chitosan	Acros Organics	Chitosan, Molecular weight: 100,000-300,000	-	-	(C ₆ H ₁₁ NO ₄) _n

Three sets of 18 digesters were incubated under different inhibiting conditions. One set, considered as the control experiment, was implemented without any inhibitor in order to assess the influence of support materials on anaerobic digestion performance under non inhibiting conditions. It was abbreviated as the NIC experiment in the rest of the manuscript. Phenol was added in a second set of 18 batch digesters so as to reach a concentration of 1.5 g/L corresponding to the IC₅₀ calculated in our previous study presented from page 131. The third set of 18 batch digesters was incubated with NH₄Cl (99.998 %, Sigma Aldrich) in order to reach an initial concentration of 19 g/L of TAN also corresponding to the IC₅₀

calculated in our study presented from page 105. Biochemical methane potential buffer (International Standard ISO 11734 (1995)) was introduced in all bioreactors to reach a final working volume of 500 mL.

The 54 bioreactors were subsequently hermetically sealed with a screw cap and a rubber septum and headspaces were flushed with N₂ (purity > 99.99 %, Linde gas SA) in order to ensure anaerobic conditions. Time zero samples were collected before starting incubation of the reactors under anaerobic conditions at 35°C, without agitation, in the dark. Liquid samples (8 mL) were periodically collected through the septum and centrifuged at 10,000 g for 10 min. The pellets and supernatants thus obtained were stored separately at -20°C for analysis of biomass and chemical indicators, respectively. Digestion tests were run until the daily biogas productions of each of the reactors decreased below 10 mL. Figure 27 gives an overview of this experiment.

3 Influence of support media addition on anaerobic digestion of biowaste under non-inhibiting conditions

3.1 Anaerobic digestion performance

3.1.1 Biogas production

Figure 53 presents average cumulated CH_4 and CO_2 productions of each triplicate of reactors without inhibitory compound.

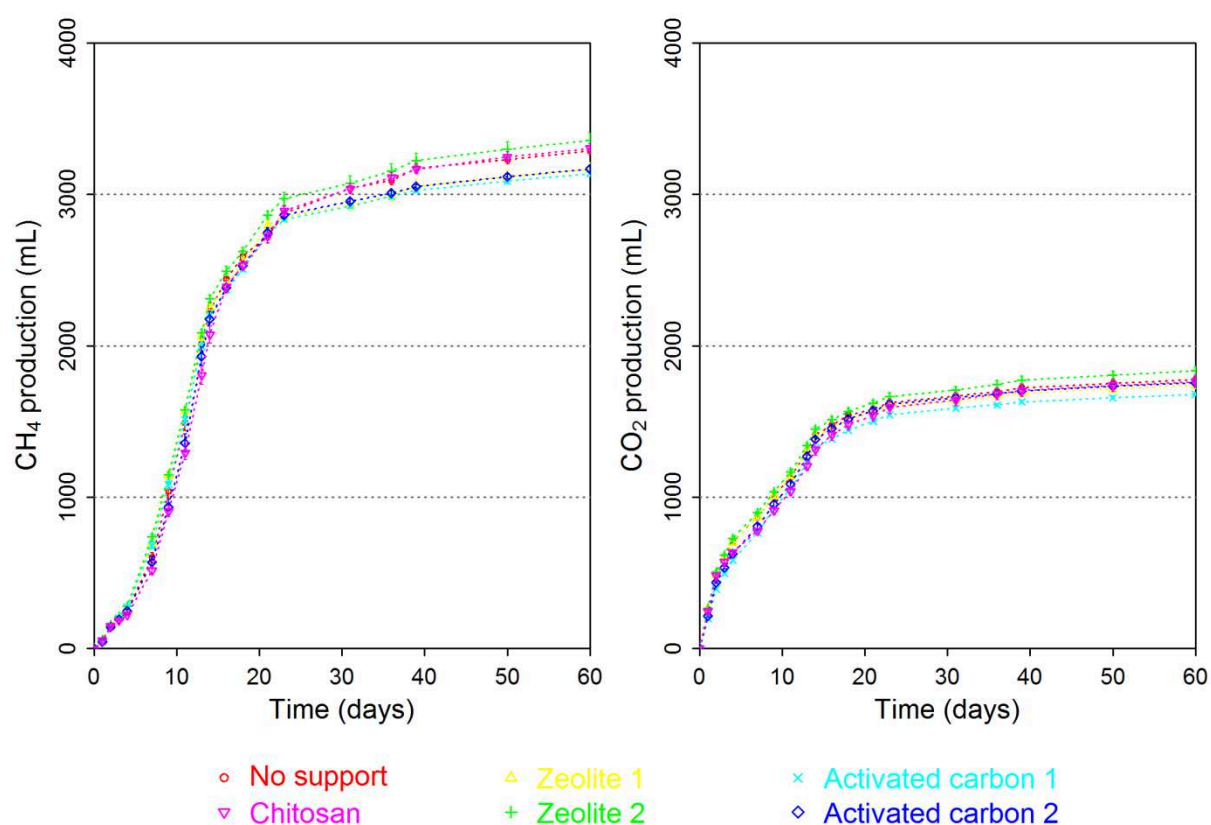


Figure 53 : Cumulated (A) CH_4 and (B) CO_2 productions (mL) over time (number of days). Mean values of triplicate bioreactors are presented. Error bars represent standard deviation within triplicates.

Cumulative production curves were analytically compared by fitting experimental data with Gompertz equation. Three kinetic parameters (ultimate production, maximum production rate and lag time) were calculated with Gompertz model for both gases and presented in Tableau XV.

Tableau XV : Kinetic constants for CH₄ and CO₂ production using modified-Gompertz model. The data are shown for the different groups of triplicate (mean values and standard deviation)

Support	Ultimate production yield P (mL)		Maximum production rate R _{max} (mL/day)		Lag phase λ (day)	
	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂
No support	3172 ± 60	1727 ± 44	261 ± 7	122 ± 1	4 ± 0	0 ± 0
Zeolite 1	3064 ± 87	1691 ± 50	246 ± 6	112 ± 3	4 ± 0	0 ± 0
Zeolite 2	3238 ± 98	1776 ± 52	255 ± 4	112 ± 8	4 ± 0	0 ± 0
Activated carbon 1	3048 ± 36	1639 ± 20	244 ± 1	103 ± 5	4 ± 0	0 ± 0
Activated carbon 2	3080 ± 25	1717 ± 22	286 ± 4	114 ± 3	4 ± 0	0 ± 0
Chitosan	3200 ± 59	1726 ± 80	270 ± 7	107 ± 6	4 ± 0	0 ± 0

Regardless supports addition, CH₄ production kinetics remained relatively similar. CH₄ lag phase lasted 4 ± 0 days while CO₂ production started almost immediately in all batch digesters. Final CH₄ production varied between 3048 ± 36 mL and 3238 ± 98 mL for bioreactors with supports while it reached 3172 ± 60 mL without support. Likewise, CO₂ ultimate production in the digesters incubated without support (1727 ± 60 mL) was comparable to those obtained in presence of supports, varying between 1639 ± 20 mL and 1776 ± 52 mL. Moreover, maximum CH₄ production rates (R_{max}) calculated in the digesters without support (218 ± 60 mL/day) were also equivalent to those obtained in presence of the different supports (244 ± 1 – 286 ± 4 mL/day). Same observations were noticed for maximum CO₂ production rates. Consequently, these results indicated that supports did not seem to affect biogas production performance.

3.1.2 VFA accumulation

Acetate, propionate, butyrate and lactate were detected in all the incubations. VFA accumulation dynamics are presented in Figure 54. Each batch digester contained an initial concentration of 1265 ± 70 mg/L of lactate originally present in the substrate (data not shown). This VFA was completely degraded after 3 days of incubation in all digesters. VFA accumulation kinetics were slightly influenced by supports addition. However, considering biogas production kinetics, these differences did not seem to influence global anaerobic digestion performance.

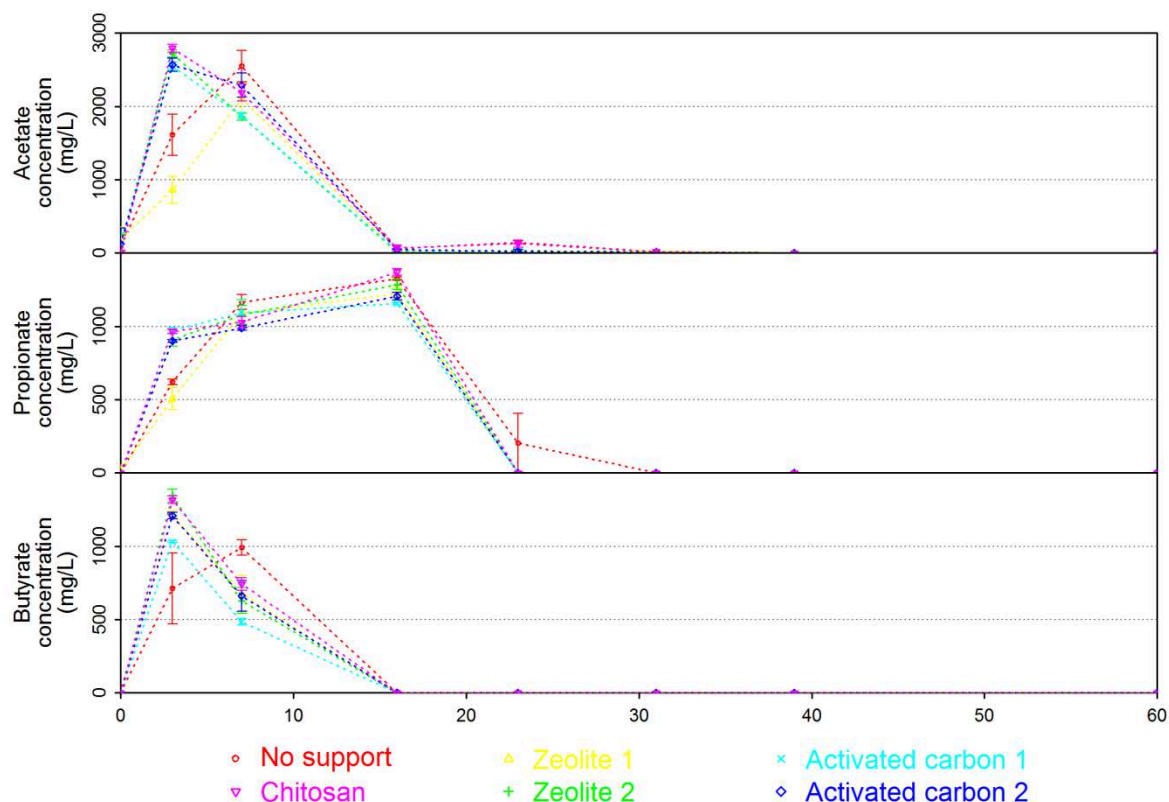


Figure 54 : Volatile fatty acids concentrations over time. Acetate, propionate and butyrate concentrations (mg/L) in the liquid phase over time (number of days), for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates).

Maximum acetate concentration in the digesters without support reached 2550 ± 213 mg/L after 7 days of incubation. A comparable peak varying between 2554 ± 53 mg/L and 2795 ± 54 mg/L was observed for all supports after only 3 days except for zeolite 1 for which maximum acetate accumulation also occurred after 7 days. Regardless support addition, acetate was completely degraded after 16 days of incubation in all bioreactors.

Propionate accumulation kinetics were also greatly similar. Without support, maximum propionate concentrations reached 1324 ± 11 mg/L after 17 days of incubation. Comparable maximum levels varying between 1157 ± 1022 mg/L and 1370 ± 22 mg/L were observed for all supports at the same date. Propionate was completely degraded after 23 days indicating with all supports while it took 31 days without support.

Butyrate accumulated up to 992 ± 52 mg/L after 7 days of incubation without support. The maximum level of butyrate in presence of supports varied between 1031 ± 7 mg/L and 1347 ± 52 mg/L. Contrary to the digester incubated without support these peaks were reached after 3 days of incubation. Nonetheless, butyrate was not detected anymore after 16 days for all batch digesters.

All supports except zeolite 1 seemed to slightly accelerate the production of VFAs compared to the digester incubated without support. Moreover, propionate degradation was also accelerated in presence of these different supports. These results suggested that they could enhance early steps of anaerobic digestion such as hydrolysis, acidogenesis and

acetogenesis. However, since these differences were no longer recovered in biogas production kinetics, it seemed that methanogenesis was not improved by these supports.

3.2 Microbiota response

In order to investigate microbial community dynamics patterns and to identify key microorganisms potentially involved in community structure changes induced by supports additions, 16S rRNA gene high-throughput sequencing was performed.

Seven samples were selected for 16S ribotag sequencing. One sample, collected before the incubation started, was considered as an image of the initial mix consisting of the inoculum and the substrate. Since all biogas production kinetics were greatly similar within triplicates, one sample per triplicate was sequenced. It was collected after 16 days of incubation, when biogas production rate reached its maximum. The objective was to assess the potential influence of each support on the active microbial community composition.

Several thousands of sequences were identified for each sample. They were assembled into 1972 and 36 OTUs for Bacteria and Archaea, respectively. Relative abundance of archaeal and bacterial OTUs were used for the analysis. Archaeal and Bacterial abundances were respectively summarized at the genus and the family level for the histogram representation in Figure 55. Only OTUs that exceeded 1 % in at least one sample have been represented for the analysis. After this trimming step, 10 archaeal OTUs and 15 bacterial families were conserved for the analysis. OTUs belonging to the same archaeal genus and bacterial families belonging to the same bacterial order were represented with the same color palette.

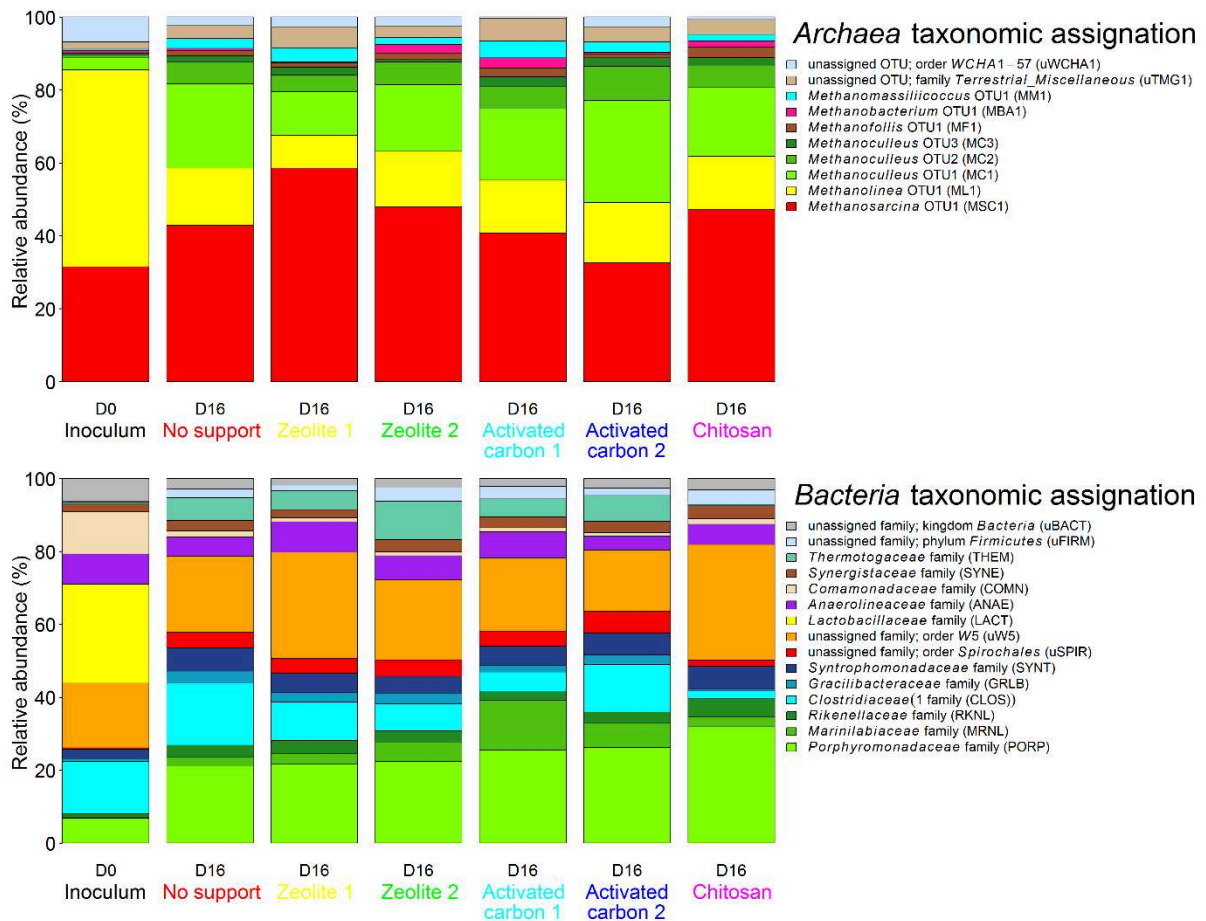


Figure 55 : Relative abundance of the archaeal dominant OTUs and bacterial dominant families.

Methanogenic Archaea detected in the inoculum mainly belonged to two OTUs assigned to genus *Methanolinea* (ML1) and genus *Methanosarcina* (MSC1) with respective relative abundances of 54 % and 32 %. After 16 days of incubation, while CH₄ production reached its maximum activity, the archaeal composition of all microbiota in all digesters showed great similarities. *Methanolinea* OTU1 (ML1) relative abundance noticeably decreased down to 9-15 % while *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) became predominant by reaching 32-58 %. Therefore, it suggested that *Methanolinea* OTU1 (ML1) did not take part in methanogenesis as already observed in our previous studies presented from pages 105 and 131, respectively. Moreover, three OTUs assigned to genus *Methanoculleus* (MC1, MC2, MC3) emerged regardless support addition. The total relative abundance of these three OTUs varied between 19 % and 39%. Among them, *Methanoculleus* OTU1 (MC1) was the most abundant, with relative abundance varying between 12 % and 28 %. Since total remaining archaeal OTUs accounted for less than 20 % in all digesters after 16 days, it can be assumed that all microbiota tended to evolve towards a composition mainly consisting of *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) and *Methanoculleus* OTU1 (MC1).

Similarly to Archaea, bacterial composition was not significantly influenced by supports addition. Most of the OTUs recovered in the inoculum belonged to family *Lactobacillaceae* (LACT) (27 %), *Comamonadaceae* (COMN) (12 %), *Clostridiaceae* (CLOS) (14 %), *Anaerolinaceae* (ANAE) (8 %), *Porphyromonadaceae* (PORP) (7 %), and to

an unassigned family affiliated to order W5 (uW5) (18 %). Lactobacillaceae (LACT) were not detectable after 16 days in all incubations. Family Comamonadaceae (COMN) relative abundances also decreased regardless support material addition below 2 %. OTUs assigned to class Spirochaetes (uW5 and uSPIR) tended to be more predominant during the incubation in most of the digesters except in presence of activated carbon 2. uW5 relative abundance varied between 21 % without support up to 32 % with chitosan. Even though uSPIR relative abundance was below 0.5 % in the inoculum, it reached between 4 % and 6 % in all digesters except in presence of chitosan where it only attained 1.7 %. Similarly, OTUs affiliated to order Bacteroidales (Porphyromonadaceae (PORP) and Marinilabiaceae (MRNL)) were more represented than in the inoculum. Their relative abundances reached respectively 22-32 % and 2-7%. Interestingly, Marinilabiaceae (MRNL) attained 13 % in presence of activated carbon 1. Within Clostridiales order, family Syntrophomonadaceae and an unassigned family affiliated to phylum Firmicutes also emerged until reaching 5 - 7 % and 2 - 4 % respectively. However the total relative abundance of OTUs assigned to this order seemed to be higher without support (28 %) than in presence of different supports (13-21 %).

Without inhibitory compound, support media addition did not seem to significantly influence the microbial community composition. Consequently, molecular data corroborated anaerobic digestion performance results which were greatly similar regardless support addition. Under non-inhibiting conditions, the inoculum tended to evolve during the active CH₄ production phase toward a stable archaeal composition consisting of Methanosarcina and Methanoculleus. However the balance between both OTUs could slightly fluctuate without impairing final anaerobic digestion performance. In our previous studies, presented from pages 105 and 131, respectively, same observations were noticed under non-inhibiting conditions. Methanosarcina was predominant in non-inhibited digesters even though Methanoculleus proportion was also significant. The part of CH₄ produced by both OTUs under non-inhibiting inhibition cannot be quantified but it can be assumed that both OTUs seemed to play a key role in methanogenesis.

Bacterial populations also reached comparable composition at the same date indicating that, without inhibitory compound, supports did not induce strong modification within their community. Interestingly, even if predominant populations such as families Porphyromonadaceae, Synergistaceae, Lachnospiraceae, Syntrophomonadaceae, or Ruminococcaceae were still recovered some differences could still be noticed with the inoculum used during the experiments conducted with increasing levels of phenol and ammonia. Among them, a higher proportion of family Spirochaetaceae and Marinilabiaceae were evidenced. Bacterial populations seemed to be more versatile during time than archaeal populations. It can be explained by the greater diversity and functional redundancy within Bacteria than within Archaea. Moreover, since both inocula were collected a year apart, it can also be assumed the industrial digester was either operating under different conditions which could have led to variations within its microbiota or to the great plasticity of bacterial populations (Zumstein et al., 2000).

4 Influence of support media addition on anaerobic digestion of biowaste facing phenol inhibition

4.1 Anaerobic digestion performance

4.1.1 Biogas production

Figure 56 presents average cumulated CH_4 and CO_2 productions of each triplicate of reactors in presence of 1.5 g/L of phenol. Average cumulated CH_4 and CO_2 productions of all reactors incubated without inhibitory compound (NIC experiment) were calculated and plotted on this figure to assess the effect of phenol on biogas production kinetics.

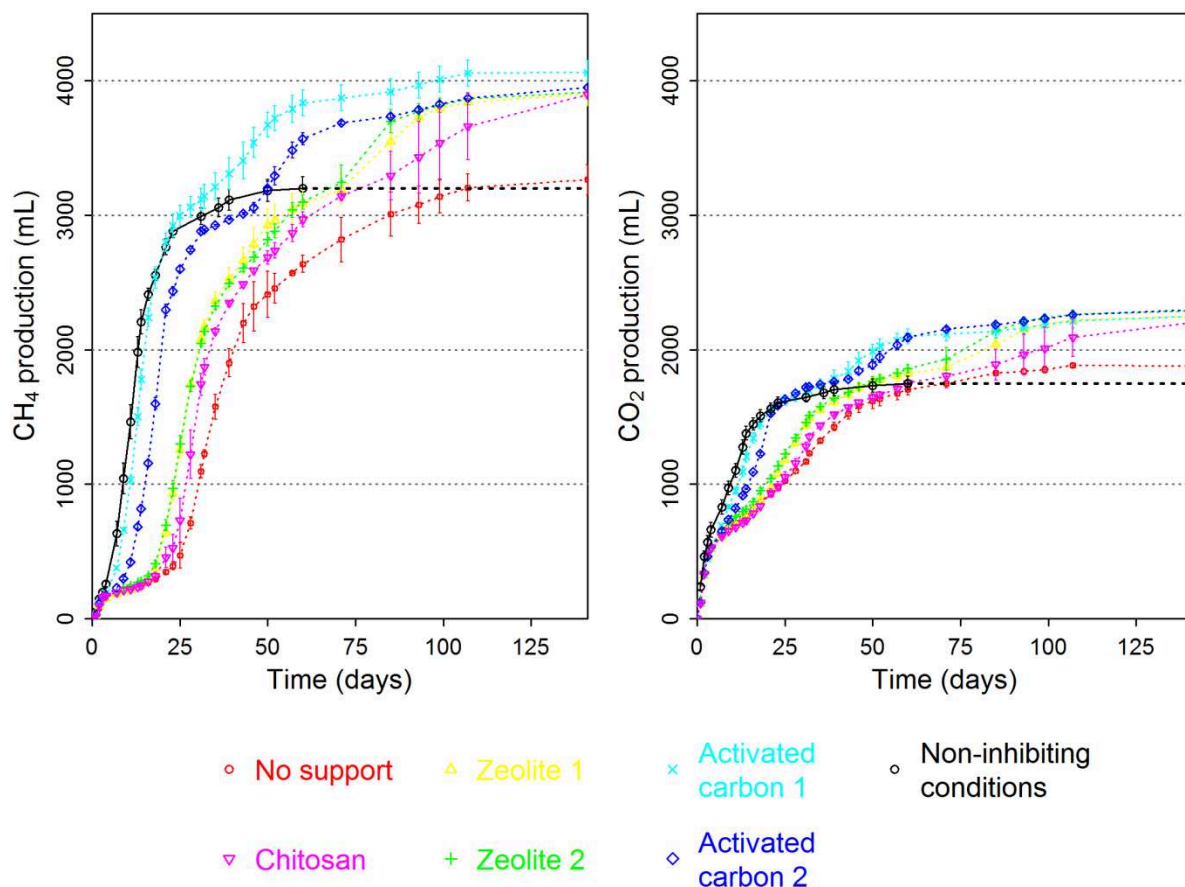


Figure 56 : Cumulated (A) CH_4 and (B) CO_2 productions (mL) over time (number of days) in presence of 1.5 g/L of phenol. Average CH_4 and CO_2 production kinetics under non-inhibiting conditions are presented in black. Mean values of triplicate bioreactors are presented for CH_4 and CO_2 production, error bars represent standard deviation within triplicates

Cumulative production curves were analytically compared by fitting experimental data with Gompertz equation. Three kinetic constants (ultimate production yield, maximum production rate and lag time) are presented in Tableau XVI.

Tableau XVI : Kinetic constants for CH₄ and CO₂ production using modified-Gompertz model. Data are shown for the different groups of triplicate (mean values and standard deviation)

Support material	Ultimate production yield P (mL)		Maximum production rate R _{max} (mL/day)		Lag phase λ (day)	
	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂
No support	3200 ± 86	1750 ± 51	144 ± 12	64 ± 4	16 ± 2	0 ± 0
Zeolite 1	3904 ± 92	2249 ± 29	172 ± 6	60 ± 1	11 ± 1	0 ± 0
Zeolite 2	3918 ± 49	2290 ± 26	165 ± 6	57 ± 2	10 ± 1	0 ± 0
Activated carbon 1	4062 ± 91	2249 ± 50	269 ± 9	112 ± 1	4 ± 0	0 ± 0
Activated carbon 2	3951 ± 22	2297 ± 16	232 ± 2	100 ± 3	5 ± 0	0 ± 0
Chitosan	3899 ± 30	2203 ± 51	183 ± 18	70 ± 4	14 ± 1	0 ± 0
Non-inhibiting conditions	3134 ± 78	1713 ± 45	260 ± 15	112 ± 6	4 ± 0	0 ± 0

Contrary to the NIC experiment, support media addition had a strong influence on CH₄ and CO₂ cumulated production kinetics in presence of 1.5 g/L of phenol. Every support material enhanced anaerobic digestion of the substrate compared to inhibited incubations without support.

Ultimate CH₄ production yield increased from 3200 ± 86 mL without support up to 4062 ± 91 mL with activated carbon 2. Zeolites, activated carbon 2 and chitosan induced an average gain of 700 - 750 mL of CH₄, corresponding to an ultimate production yield circa 3900 - 3950 mL. Increases were also noticed for CO₂ kinetics. While incubations without support produced 1750 ± 51 mL of CO₂, all other bioreactors supplemented with support media showed an increase of the ultimate CO₂ production yield of 500 - 600 mL. During the NIC experiment, CH₄ and CO₂ ultimate production yields reached respectively 3134 ± 78 mL and 1713 ± 45 mL. Increases observed in presence of supports could be attributed to the degradation of phenol during the incubation. However, within digesters incubated without support, no significant increase was detected. This loss in biogas production could be attributed to the sampling during which a higher quantity of degradable carbon was withdrawn from this digesters compared to the others with a more advanced biogas production.

Even though all support materials induced similar final performance, their influence on biogas production rate was highly unequal. CH₄ and CO₂ production kinetics were better enhanced by activated carbons. Incubations supplemented with activated carbon 1 reached 269 ± 9 mL CH₄/day and 112 ± 1 mL CO₂/day while in presence of activated carbon 2, they attained 232 ± 2 mL CH₄/day and 100 ± 3 mL CO₂/day. Interestingly, activated carbon 1 showed better results than activated carbon 2 for which maximum CH₄ and CO₂ production rates were 11 % lower. Kinetic constants calculated for these two support media were comparable to those observed during the NIC experiment (260 ± 15 mL CH₄/day and 112 ± 6 mL CO₂/day) indicating that their addition effectively mitigated biogas production inhibition caused by phenol. Indeed, in the digesters incubated without support, R_{max} only reached 144 ± 12 mL CH₄/day and 65 ± 4 mL CO₂/day. Zeolite 1, zeolite 2 and chitosan induced intermediate maximum CH₄ production rates (R_{max}), with 172 ± 6 mL CH₄/day, 165 ± 6 mL CH₄/day and 183 ± 18 mL CH₄/day. Despite these support materials enhanced

R_{\max} by 15 - 27 % compared to incubations without support, they showed lower performance than activated carbons.

CH₄ lag times calculated in presence of phenol and activated carbons 1 and 2 (respectively 4 and 5 days) were also similar to those observed under non-inhibiting conditions (4 days). These support media greatly enhanced anaerobic digestion since without support CH₄ lag time was 16 ± 2 days. Once again, activated carbon 1 showed slightly better results than activated carbon 2 since for this support, lag phase was delayed by one day. CH₄ lag phases calculated for zeolite1 and zeolite 2 were delayed up to 11 ± 1 days and 10 ± 1 days, respectively. This delay was even increased with chitosan for which CH₄ lag time lasted 14 ± 1 days. However, CH₄ lag phase was still reduced compared to digesters incubated without support indicating that zeolites and chitosan still slightly limited phenol inhibition. By contrast, CO₂ production started instantly within all incubations. Lag times were thus all approximated to 0 as observed in the NIC experiment. Hence, CH₄ production was more impaired by phenol than CO₂ indicating that archaeal populations were probably more affected than fermenting Bacteria. This result confirmed observations revealed in our previous study presented from page 131.

Activated carbons has been used for decades to mitigate the inhibition caused by organic toxic compounds such as phenols (Bertin et al., 2004b; Chen et al., 2009; Khan et al., 1981; Lao, 2002). These support media possess perfect adsorption ability for relatively low-molecular-weight organic compounds such as phenols (Dąbrowski et al., 2005). Hanaki et al., (1997) indicated that increases of phenol concentration up to 4.0 g/l did not affect CH₄ production of a fluidized bed reactor containing activated carbon. They concluded that adsorption and desorption capacity by granular activated carbon were sufficient to counteract phenol inhibition. Therefore, it could be hypothesized that activated carbon 1 and activated carbon 2 led to a decrease of phenol concentration in the liquid phase which allowed different anaerobic populations to grow and keep stable performance of CH₄ production. However, both activated carbons led to different anaerobic digestion performance. Since both activated carbons had different physico-chemical characteristics such as specific surface, pore volume, and were submitted to different pretreatment during their respective production, it could be assumed these properties influenced their efficiency to mitigate phenol inhibition towards anaerobic digestion microbiota. For instance, it could be hypothesized that the greater surface of activated carbon 1 compared to activated carbon 2 led to a better sorption of phenol and consequently led to a faster decrease its inhibiting concentration.

Furthermore, zeolites have been used to counteract ammonia inhibition thanks to their cationic exchange abilities. Nordell et al., (2013) suggested that zeolites could also relived inhibitory stress from high concentrations of long chain fatty acids which were probably adsorbed on these support media (Nordell et al., 2013). However, these support materials have not already been tested to alleviate inhibition caused by phenolic compound. To the best of our knowledge, no study investigated the influence of chitosan on the microbial composition of anaerobic digesters. This natural biomaterial has only been used as a coagulant to aggregate microbial populations into granules (Parthasarathy et al., 2016).

4.1.2 VFA accumulation

VFA accumulation dynamics are presented in Figure 57. Acetate, propionate, butyrate were detected in all the incubations. Each batch digester also contained an initial concentration of 1265 ± 70 mg/L of lactate originated from the substrate (data not shown). This VFA was completely degraded after 3 days of incubation in all digesters.

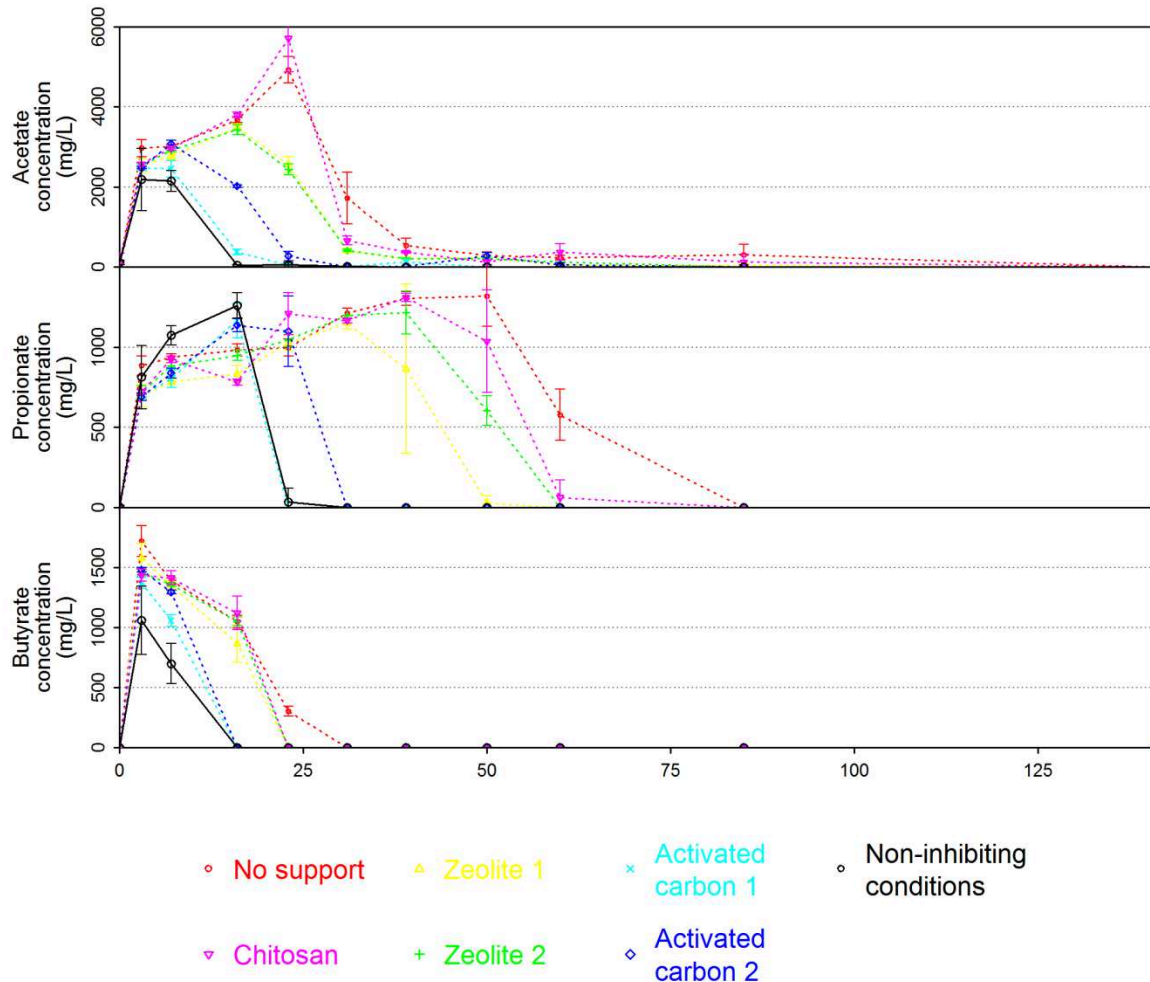


Figure 57 : Volatile fatty acids concentrations over time in presence of 1.5 g/L of phenol. Acetate, propionate and butyrate concentrations (mg/L) in the liquid phase over time (number of days), for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates). Average VFA accumulation kinetics under non-inhibiting conditions are presented in black

Acetate accumulation dynamics in presence of phenol were highly correlated with biogas production kinetics. Without support media, maximum acetate concentrations reached 4929 ± 325 mg/L after 23 days of incubation before being mostly degraded after 50 days. In digesters incubated with chitosan, acetate accumulation kinetics were relatively similar, reaching 5717 ± 845 mg/L and being totally degraded at same dates. This result tended to indicate that chitosan did not significantly influence acetate accumulation. In presence of activated carbon 1, which led to the best performance in terms of biogas production kinetics, acetate only accumulated up to 2485 ± 65 mg/L after 3 days of incubation before this VFA was completely degraded after 16 days of incubation. Activated carbon 2 also limited acetate

accumulation and enhanced its degradation. Within digesters supplemented with this support material, maximum acetate accumulation reached a level of 3088 ± 78 mg/L and its complete degradation occurred after 23 days of incubation. However, slight differences between both activated carbons tended to confirm previous results observed for CH₄ production kinetics. Hence, activated carbon 1 seemed to better mitigate the inhibition of anaerobic digestion and acetate accumulation than activated carbon 2. Zeolites 1 and 2 led to acetate accumulation peaks of 3501 ± 79 mg/L and 3426 ± 124 mg/L, respectively. Complete acetate degradation was achieved in both triplicates of digesters after 39 days. These support media also mitigated acetate accumulation compared to the digester without support as they enhanced CH₄ production. However, their effect was less important than that of activated carbons. Compared to non-inhibited conditions, the presence of phenol led to higher levels of acetate and delayed degradation of this VFA. Indeed, within non-inhibited digesters, maximum acetate concentration only reached 2186 ± 777 mg/L after 3 days of incubation. Acetate level remained relatively stable during 4 days before being completely degraded after 16 days of incubation. Thus, these results indicated that some support materials such as activated carbons and zeolites could limit the accumulation of acetate and promote its degradation.

Maximum propionate concentrations reached 1261 ± 80 mg/L under non-inhibited conditions, while it varied between 1152 ± 38 mg/L and 1320 ± 189 mg/L in presence of phenol, regardless support addition. However, consistently with biogas production and acetate accumulation kinetics, propionate degradation was delayed by phenol. Moreover, propionate degradation occurred after acetate degradation in all digesters. This result was consistent with thermodynamics since propionate degradation less thermodynamically favorable than acetate degradation. Under non-inhibited conditions, propionate accumulated until 16 days before being completely degraded after 23 days. Despite the initial presence of phenol, same trends were observed with activated carbon 1 suggesting that this support greatly alleviated phenol inhibition. Nonetheless, with activated carbon 2, propionate complete degradation was slightly delayed by 8 days compared to digesters incubated with activated carbon 1. This delay was more pronounced with zeolites 1 and 2. In presence of these support materials, propionate concentration increased up to 31 and 39 days respectively before dropping to 0 mg/L after 50 and 60 days. Moreover, in presence of chitosan, propionate was also mostly degraded after 60 days of incubation. The longest delay was observed in incubations without support for which propionate complete degradation occurred after 85 days of incubation.

Without support, maximum butyrate concentration reached 1719 ± 128 mg/L. By contrast, in presence of zeolite 1 and zeolite 2, butyrate reached lower levels with respectively 1579 ± 119 mg/L and 1459 ± 29 mg/L. Activated carbons 1 and 2 also tended to limit this VFA accumulation. In presence of these support media, butyrate maximum concentrations reached 1371 ± 46 mg/L and 1480 ± 17 mg/L, respectively. This peak occurred after 7 days of incubation in all bioreactors. However, butyrate degradation was differently inhibited depending on the type of support added in the digesters. Delays observed for this VFA degradation were also correlated with CH₄ production performance. Thus, total butyrate degradation occurred after 16 days with activated carbons, 23 days with zeolites and chitosan, and 31 days without support indicating that all supports media still enhanced its degradation. Compared to the NIC experiment, phenol induced an increased accumulation of butyrate. Without phenol, maximum butyrate concentration only reached 1057 ± 284 mg/L while it

varied between 1371 ± 46 mg/L and 1719 ± 128 mg/L in presence of phenol. This result was interesting since in presence of 19.0 g/L of TAN, butyrate production was greatly inhibited.

VFAs accumulation kinetics indicated that without support, phenol led to higher accumulation levels of acetate and butyrate. Furthermore, phenol also induced longer degradation phases for all VFAs including propionate. These results suggested that phenol mainly inhibited VFA degraders while producers did not seem to be impaired. VFA accumulation kinetics also confirmed previous observation made on CH₄ production kinetics. Support media all mitigated phenol inhibition but with various efficiencies. Nevertheless, activated carbons led to better VFAs degradation than zeolites and chitosan.

4.1.3 Phenol concentration dynamics

Phenol concentration dynamics are presented in Figure 58. Regardless support material addition, phenol was completely consumed in all bioreactors. Times after which phenol concentration decreases started to occur were influenced by the type of support present in the digester. Phenol concentration dynamics were also consistent with biogas production kinetics. The quicker phenol concentration decreased, the more efficient anaerobic digestion was observed indicating the strong correlation between the level of phenol in the liquid phase and the performance of the ecosystem.

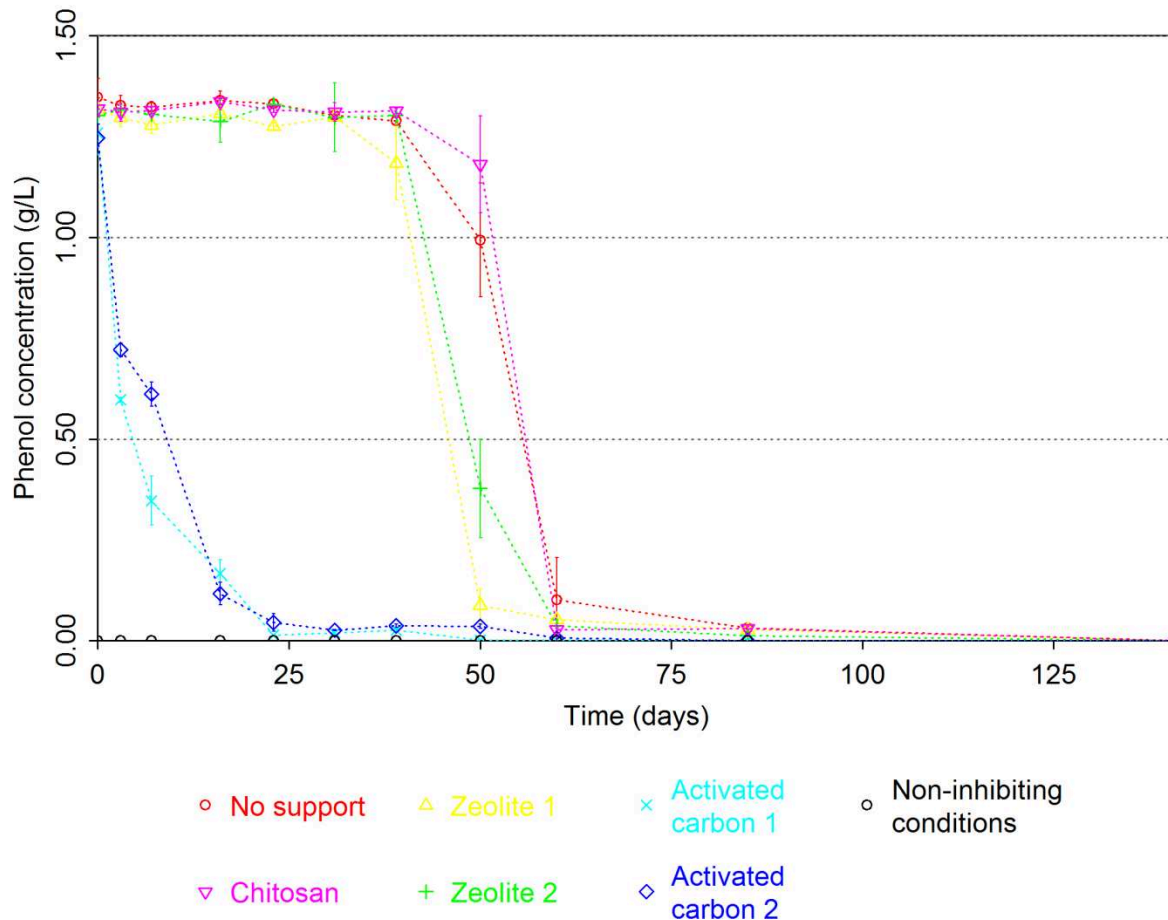


Figure 58 : Phenol concentration dynamics over time. Phenol concentration (g/L) over time (number of days) for the different groups of triplicate bioreactors (mean values are shown and error bars represent standard deviation within triplicates).

In digesters incubated without support, phenol degradation started after 39 days of incubation and ended after 85 days of incubation when it was completely degraded. Similar dynamics were observed in presence of chitosan indicating that this support material did not significantly influence phenol degradation. However, chitosan mitigated phenol inhibitory effect by reducing biogas production lag time and improving ultimate production yield and maximum production rate of both CH_4 and CO_2 . Thus, it could be hypothesized that chitosan had a positive effect on microbial community without influencing phenol concentration.

Phenol concentration remained stable up to 31 days of incubation in both triplicates of digesters incubated with zeolites 1 and 2. This result tended indicated phenol was not adsorbed on zeolites during this period. Compared to the digester incubated without support, phenol degradation was enhanced by zeolites. After 50 days, 83 % and 71 % of the initial phenol concentration was respectively degraded in presence of zeolites 1 and 2 while at the same date, only 26 % was degraded within the digester incubated without support. Therefore, it can be assumed that zeolites enhanced phenol degradation and consequently biogas production.

After 3 days of incubation, phenol concentration dropped in all digesters supplemented with activated carbons. These support media are widely used for their adsorption properties

(Dąbrowski et al., 2005). Therefore, it can be assumed that phenol was quickly adsorbed on activated carbons surface. Interestingly, activated carbon 1 seemed to better adsorb phenol than activated carbon 2 since after 7 days of incubation, phenol concentration respectively decreased down to 28 % and 49 % of its initial concentration. This could be related to the difference of surface between both activated carbons. Indeed activated carbon 1 had a surface of 800 m²/g whereas activated carbon 2 had a surface of 600 m²/g. This could explain why activated carbon 1 adsorbed phenol faster than activated carbon 2 during this period of time. This difference between both activated carbons was no longer observed after 16 days for which similar phenol concentrations were recovered in both triplicates. However, even though phenol could not be quantified on the surface of activated carbons, increases in final biogas production tended to indicate that phenol was degraded throughout the experiment. This degradation probably occurred at the surface of activated carbons before 50 days of incubation. Indeed at this date, a second production phase of CO₂ and CH₄ was observed for both activated carbons. Therefore, it can be assumed that the biogas produced during this second phase probably resulted from phenol conversion into biogas.

4.2 Microbiota response

Microbial community dynamics patterns were investigated with 16S rRNA gene high-throughput sequencing. The objective was to assess the potential influence of each support on microbial community composition and identify key microorganisms involved in structural modifications of the microbiota.

Twenty two samples were selected depending on the biogas production kinetics advancement. One sample was used to characterize the initial microbial composition of the digesters. Several thousands of sequences were identified for each sample. They were assembled into 1972 and 36 OTUs for Bacteria and Archaea, respectively. Relative abundance of archaeal and bacterial OTUs were used for the analysis. Only OTUs that exceeded 1 % in at least one sample have been taken into account for the analysis. Due to the large number of bacterial OTUs, relative abundances were aggregated at the family level. After this trimming step, 18 archaeal OTUs and 22 bacterial families were conserved for the analysis. OTUs belonging to the same archaeal genus and bacterial families belonging to the same bacterial order were represented with the same color palette.

Principal component analysis (PCA) was performed to statistically analyze Archaea and Bacteria 16S rRNA gene tags data. T₀ sample which was considered as an image of the inoculum was not included in this analysis. In order to evidence potential patterns in PCA representation, samples were clustered by the type of support material initially added. The size of the symbols is correlated to the collection dates: the later the bigger. Associated correlation circles were used to identify principal representative OTUs differentiating samples within the factorial plane. Key phylotypes' phylogenetic assignation was abbreviated for this representation.

4.2.1 Archaea

Archaeal relative abundances were represented at the OTU level in Figure 59.

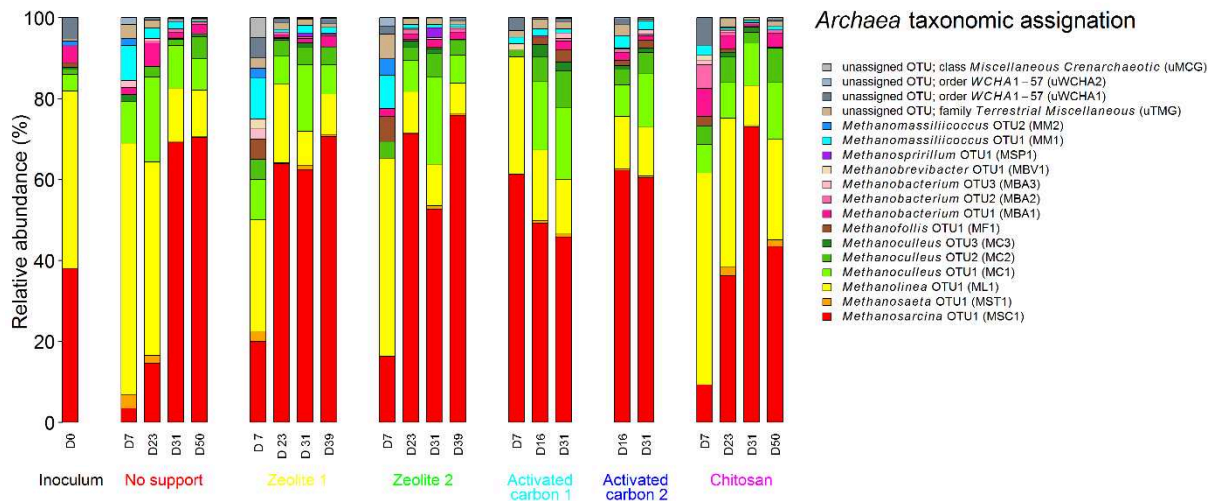


Figure 59 : Relative abundance of the archaeal dominant OTUs in presence of 1.5 g/L of phenol.

In order to support observations made on the histogram representation, PCA was performed with these data and is presented in Figure 60.

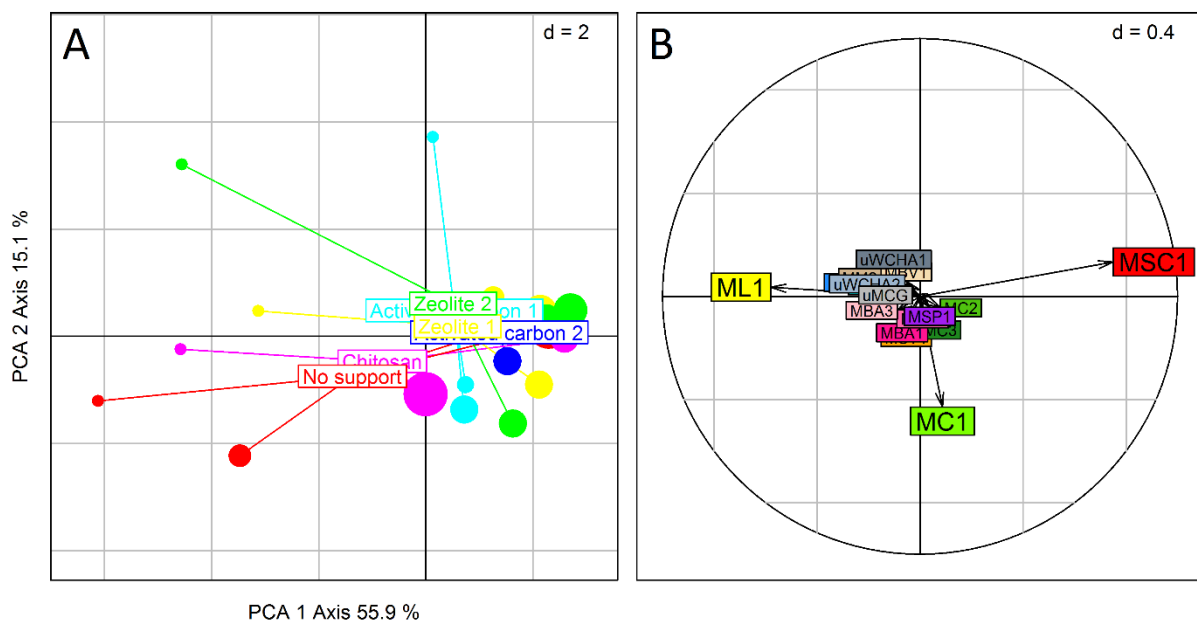


Figure 60 : Principal component analysis of archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 55.9 % and 15.1 % of the total variance. The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Methanogenic Archaea detected in the inoculum mainly belonged to OTUs assigned to genus *Methanolinea* (ML1) and genus *Methanosarcina* (MSC1) with respective relative abundances of 44 % and 38 %. Remaining minor OTUs were assigned to genus

Methanoculleus (6 %), order WCHA1 (5 %) and genus Methanobacterium (4 %). This composition was relatively comparable to our previous studies presented from pages 105 and 131, respectively, and conducted with an inoculum collected in the same digester a year apart.

Under inhibiting phenol concentration, archaeal community was governed by three major OTUs assigned to Methanosarcina (MSC1), Methanoculleus (MC1) and Methanolinea (ML1). This observation was confirmed by the correlation circle associated to the PCA which revealed that samples distribution was greatly influenced by these three OTUs. The first principal axis of the PCA factorial plane seemed to be highly correlated with the advancement of the incubation. Indeed, samples collected in the earliest days of incubation were predominated by Methanolinea (ML1) and recovered on the left part of the factorial plane while throughout the experiment all samples seemed to be clustered on the right and dominated by Methanosarcina (MSC1) and Methanoculleus (MC1). However, this final composition was not reached at the same sampling date for all digesters indicating that support media had a significant influence on the evolution of the archaeal community during time. Therefore the specific dynamics of these three OTUs is discussed.

4.2.1.1 Without support

Without support, phenol initially inhibited the OTU affiliated to genus Methanosarcina (MSC1). While CH₄ production was still not active, its abundance dropped down to 4 % after 7 days of incubation and genus Methanolinea became highly predominant within the microbiota (62 %). After 23 days, CH₄ production started. At this date, and despite phenol inhibiting level of 1.3 g/L, Methanosarcina OTU1 (MSC1) and Methanoculleus OTU1 (MC1) gained importance within the microbiota with relative abundances of 15 % and 21 % respectively. After 31 days, phenol was still not degraded. However, CH₄ production reached 28 % of its final yield. This was probably related to the growing emergence of Methanosarcina OTU1 (MSC1) which relative abundance reached 70 %. This percentage remained stable up to 50 days of incubation indicating that the microbiota evolved toward a stable and efficient composition. This composition was similar to the one observed under non-inhibited conditions within which Methanosarcina OTU1 (MSC1) was the predominant genus. Nonetheless, phenol seemed to limit the implantation of genus Methanoculleus OTU1 (MC1) since its proportion remained circa 12 % during the active CH₄ production phase while it was 25 % without support during the NIC experiment. It could thus be hypothesized that phenol inhibitory effect mainly delayed the evolution of the archaeal microbiota by inhibiting Methanosarcina OTU1 (MSC1) and Methanoculleus OTU1 (MC1). Eventually, Methanosarcina OTU1 (MSC1) managed to overcome this inhibition to become the most dominant genus and produce CH₄ while Methanoculleus OTU1 (MC1) did not reach the same proportion as under non-inhibiting conditions.

4.2.1.2 In presence of supports

Archaeal composition of the digesters incubated with support media indicated that delay effect caused by phenol in CH₄ production kinetics seemed to be highly correlated with the delay in the emergence of Methanosarcina OTU1 (MSC1).

In presence of activated carbons 1 and 2, Methanosarcina OTU1 (MSC1) was not inhibited by phenol. This was probably due to the sorption of phenol on the surface of activated carbons that quickly limited its presence in the liquid phase and let Methanosarcina OTU1 (MSC1) grow. Methanoculleus OTU1 (MC1) also emerged in both digesters as already observed during the NIC experiment but still in lower proportions. Interestingly, in presence of activated carbon 2, Methanosarcina OTU1 (MSC1) and Methanoculleus OTU1 (MC1) relative abundances were respectively 60 % and 20 % while in presence of activated carbon 1, this balance between both OTUs was significantly different. Methanosarcina OTU1 (MSC1) was less abundant (50 %), which probably promoted the emergence Methanoculleus OTU1 (MC1) (30 %). This difference could be attributed to the faster sorption of phenol with activated carbon 1 which led to a final composition closer to the one recovered during the NIC experiment.

In presence of zeolites 1 and 2, Methanosarcina OTU1 (MSC1) was only inhibited until day 7. At this date, its relative abundance was respectively 20 % and 16 % in both digesters. This proportion was already significantly higher than in digester without support at the same date although biogas production had not started yet. From day 23, this OTU became predominant even though phenol was not degraded yet. Its relative abundance increased and remained between 52 % and 76 % for both zeolites throughout the experiment. Moreover, Methanoculleus OTU1 (MC1) also emerged after 7 days of incubation but its abundance remained constant, varying between 16 % and 22 % for both zeolites. Hence, similarly to chitosan, zeolites did not affect the final composition of the ecosystem. However, they seemed to accelerate its transition by limiting phenol inhibition towards Methanosarcina OTU1 (MSC1).

Chitosan slightly accelerated anaerobic digestion kinetics compared to the digester incubated without support. However, its influence on CH₄ production was not clearly visible on archaeal composition dynamics which was greatly similar to the one observed without support. Methanosarcina OTU1 (MSC1) was greatly inhibited in this digester up to 23 days before becoming predominant after 31 days (73 %) despite phenol was not degraded yet. Methanoculleus (MC1) proportion (14 %) was also comparable to the one recovered in the digester without support.

The presence of Methanosarcina OTU1 (MSC1) was highly correlated with anaerobic digestion performance and to the level of phenol within the digesters. OTUs belonging to this genus has been reported as a sign of process stability by many studies (De Vrieze et al., 2012; Lins et al., 2014; Moset et al., 2015). The predominance of Methanosarcina OTU1 (MSC1) during the active CH₄ production phase within all the digesters incubated with 1.30 g/L of phenol suggested that this genus was able to grow again once phenol concentration had dropped sufficiently. Activated carbons, which quickly adsorbed phenol, efficiently preserved this OTU and consecutively led to accelerated CH₄ production. Zeolites also led to faster phenol degradation than without support. Therefore, Methanosarcina OTU1 (MSC1) could grow earlier and CH₄ production reached comparable final performance as in presence of activated carbons despite a higher delay. Chitosan, which did not influence phenol degradation, still led to better anaerobic digestion performance without accelerating the emergence of Methanosarcina OTU1 (MSC1). Therefore, it could be assumed that it had other positive effects on the microbiota and potentially towards bacterial populations.

4.2.2 Bacteria

Bacterial relative abundances were represented at the family level in Figure 61.

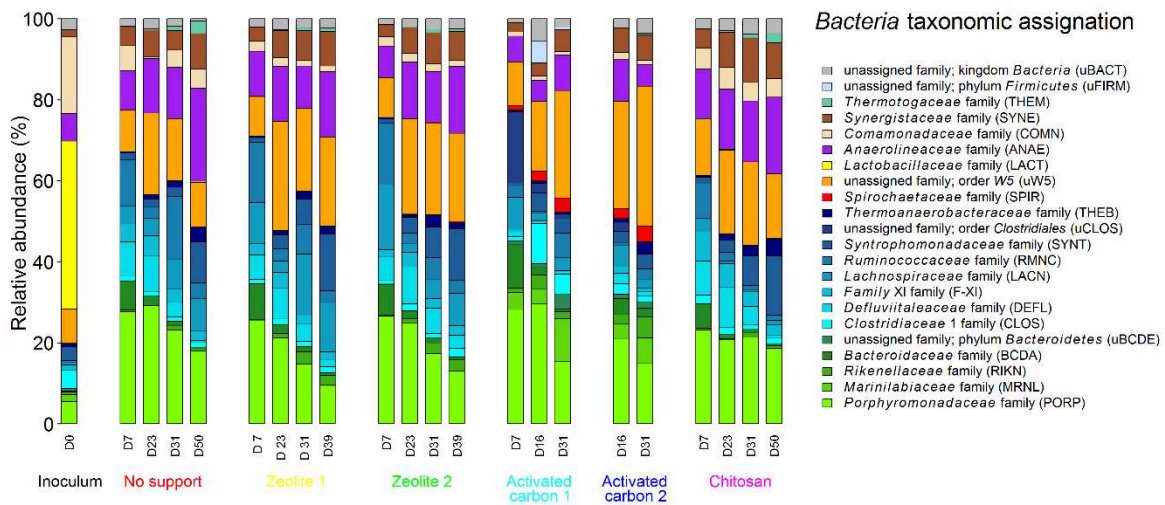


Figure 61 : Relative abundance of the bacterial dominant families in presence of 1.5 g/L of phenol.

In order to support observations made on the histogram representation, PCA was performed with these data and is presented in Figure 62.

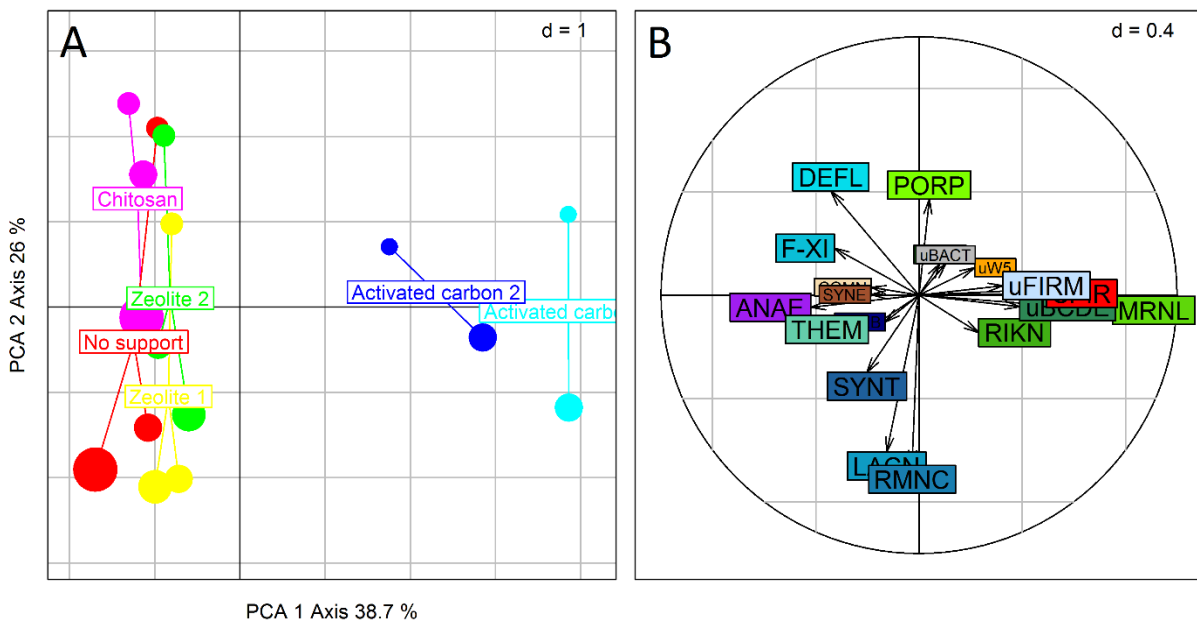


Figure 62 : Principal component analysis of bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 38.7 % and 13.3 % of the total variance. The influence of the principal bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Most of the bacterial OTUs recovered in the inoculum belonged to family *Lactobacillaceae* (LACT) (41 %), *Comamonadaceae* (COMN) (19 %), *Anaerolineaceae* (ANAE) (8 %), and to an unassigned family affiliated to order W5 (uW5) (8 %). Total relative

abundance of families belonging to orders Clostridiales and Bacteroidales were 11 % and 8 %, respectively. This composition was greatly similar to our previous studies presented from pages 105 and 131, respectively.

Similarly to the NIC experiment, Lactobacillaceae were not detectable after 7 days in all incubations. Moreover, the relative abundance of family Comamonadaceae also dropped below 6 % in all digesters. Orders Bacteroidales and Clostridiales both emerged to become predominant in the microbiota. However the balance between these two orders was influenced by the type of support media initially added in the digesters. Furthermore, phenol did not inhibit family Anaerolinaceae and the unassigned family belonging to order W5 which were also present during the active biogas production phase in the NIC experiment. However, histogram representation did not clearly evidence the potential influence of each support on bacterial composition dynamics. Nonetheless, PCA representation gave other interesting clues.

Samples distribution within the PCA factorial plane tended to indicate that the second axis of this PCA was correlated to the advancement of the incubation. By contrast, the first axis of the PCA clearly illustrated the influence of the support media on the bacterial composition of the microbiota. PCA factorial plane revealed that bacterial dynamics within digesters incubated with activated carbons were greatly different from those recovered in all other digesters. It tended to confirmed that, similarly to Archaea, both activated carbons played a key role in shaping bacterial populations. By contrast, and although they accelerated anaerobic digestion dynamics, zeolites and chitosan addition did not influence bacterial composition compared to the digester without support.

4.2.2.1 In presence of activated carbons

Activated carbons seemed to enhance the emergence of different families assigned to order Bacteroidales at the expense of families assigned to order Clostridiales. Indeed, the total proportion of OTUs belonging to Bacteroidales order varied between 42 % and 25 % for activated carbon 1 and between 31 % and 28 % for activated carbon 2. This difference was mainly attributed to the emergence of family Marinilabiaceae (MRNL), family Rikenellaceae (RIKN), and of an assigned family belonging to this order (uBCDE) which did not seem to grow in absence of activated carbons. The influence of these families was highly discriminating on the PCA factorial plane. By contrast, total abundance of order Clostridiales remained between 12 % and 20 % throughout the experiment in presence of activated carbons. This difference was noticeably attributed to family Syntrophomonadaceae (SYNT) which relative abundance remained below 5 % in presence of activated carbons. Hence, since phenol was quickly adsorbed on activated carbons, it seemed that this family could not emerge within the microbiota. Interestingly, activated carbons also promoted the emergence of OTUs assigned to family Spirochaetaceae (SPIR) which was also present during the NIC experiment. Relative abundance of this family remained below 0.1 % in all other digesters while it reached 4 % for both activated carbons. A recent study evidenced that Spirochaetales were clearly involved in SAO with hydrogenotrophic methanogens (Lee et al., 2015). It suggested that SAO could be maintained in absence of activated carbons due to a possible

functional redundancy between Syntrophomonadaceae and Spirochaetaceae. Furthermore, in presence of both activated carbons, a significant reduction in the proportion of OTUs assigned to Anaerolinaceae (ANAE) was also noticed compared to the digester without support. In the digester without support, the proportion of this family reached 23 % while it only reached 9 % - 10 % in presence of activated carbons. During the NIC experiment, the proportion of this family remained below 8 % within all digesters. Since it only reached 10 % in presence of activated carbons, it could be hypothesized that this family was more abundant under inhibiting conditions.

4.2.2.2 In presence of zeolites, chitosan and without support

Since zeolites and chitosan did not clearly influence bacterial composition during time compared to the digester without support, the dynamics of the different populations present in these three digesters was overall discussed. Bacterial populations were dominated by orders Bacteroidales and Clostridiales, by families Anaerolinaceae (ANAE) and Synergistaceae (SYNE) and by an unassigned family belonging to order W5 (uW5). Proportions of families Anaerolinaceae (ANAE), Synergistaceae (SYNE) and uW5 remained relatively constant throughout the experiment, all varying from 10 % to 20 % within these digesters. Total relative abundance of OTUs belonging to order Bacteroidales increased up to 30-40 % before declining down to 19-14 % suggesting their potential importance in the early steps of substrate degradation. This order mainly consisted in family Porphyromonadaceae (PORP). This family was reported as one of the dominant families of the phylum Bacteroidetes in cattle manure (Moset et al., 2015). It was also suggested to play an important role in the degradation of the accumulated volatile fatty acids (Regueiro et al., 2014b). Within these digesters, order Clostridiales proportion fluctuated between 20 % and 33 % throughout the experiment. Members of this order were reported to hydrolyze a variety of polysaccharides by different mechanisms. Due to their capacity to process a wide range of substrates, their importance has been stood out by many authors (Ali Shah et al., 2014; Carballa et al., 2015). Interestingly, this order composition greatly evolved during time. During the early days of incubation this order was dominated by Defluviitaleaceae (DEFL) (9-12 %) and Ruminococcaceae (RMNC) (15-18 %). However, their relative abundances dropped to 1-2 % after 31 days of incubation. They were substituted by Lachnospiraceae (LACN) and Syntrophomonadaceae (SYNT) with proportions reaching 10-15 %. Syntrophomonadaceae (SYNT) has already been associated with SAO as well as with phenol degradation (Rosenkranz et al., 2013). Therefore, it can be hypothesized that its presence could be correlated either with CH₄ production thanks to the implementation of syntrophic interactions or to phenol concentration decrease. This family could thus play a key role in anaerobic digestion in presence of phenol, regardless zeolites or chitosan addition.

4.2.2.3 Conclusions

All these observations indicated that the duration of the inhibition strongly influenced bacterial community. It appeared that if phenol concentration did not decrease in the earliest days of incubation as in digesters incubated with activated carbons, bacterial community was shaped for the rest of the incubation. Indeed, despite phenol was completely degraded within

all digesters after 50-60 days in digesters incubated with zeolites, chitosan or without support, it seemed that the decrease of the inhibitory stress did not affect bacterial populations compared to the initial days of these incubations. It could be hypothesized that a constant level of phenol induced a non-reversible selection within these populations. Activated carbons, which induced a quick decrease of this stress level, led to the preservation of bacterial populations already present during the NIC experiment such as families Spirochaetaceae (SPIR), Marinilabiaceae (MRNL), Rikenellaceae (RIKN), and of an assigned family belonging to this order (uBCDE). By contrast, other support media such as zeolites and chitosan, which slightly accelerated phenol degradation, did not prevent these populations from being inhibited and led to the implantation of more families belonging to order Clostridiales which seemed to be able to resist to this constant level of phenol inhibition.

5 Influence of support media addition on anaerobic digestion of biowaste facing ammonia inhibition

5.1 Anaerobic digestion performance

5.1.1 Biogas production

Figure 63 presents average cumulated CH_4 and CO_2 productions of each triplicate of reactors in presence of 19 g/L of Total Ammonia Nitrogen (TAN). Average cumulated CH_4 and CO_2 productions of all reactors incubated without any inhibitory compound (NIC experiment) were also plotted on this figure to assess the effect of TAN on biogas production kinetics.

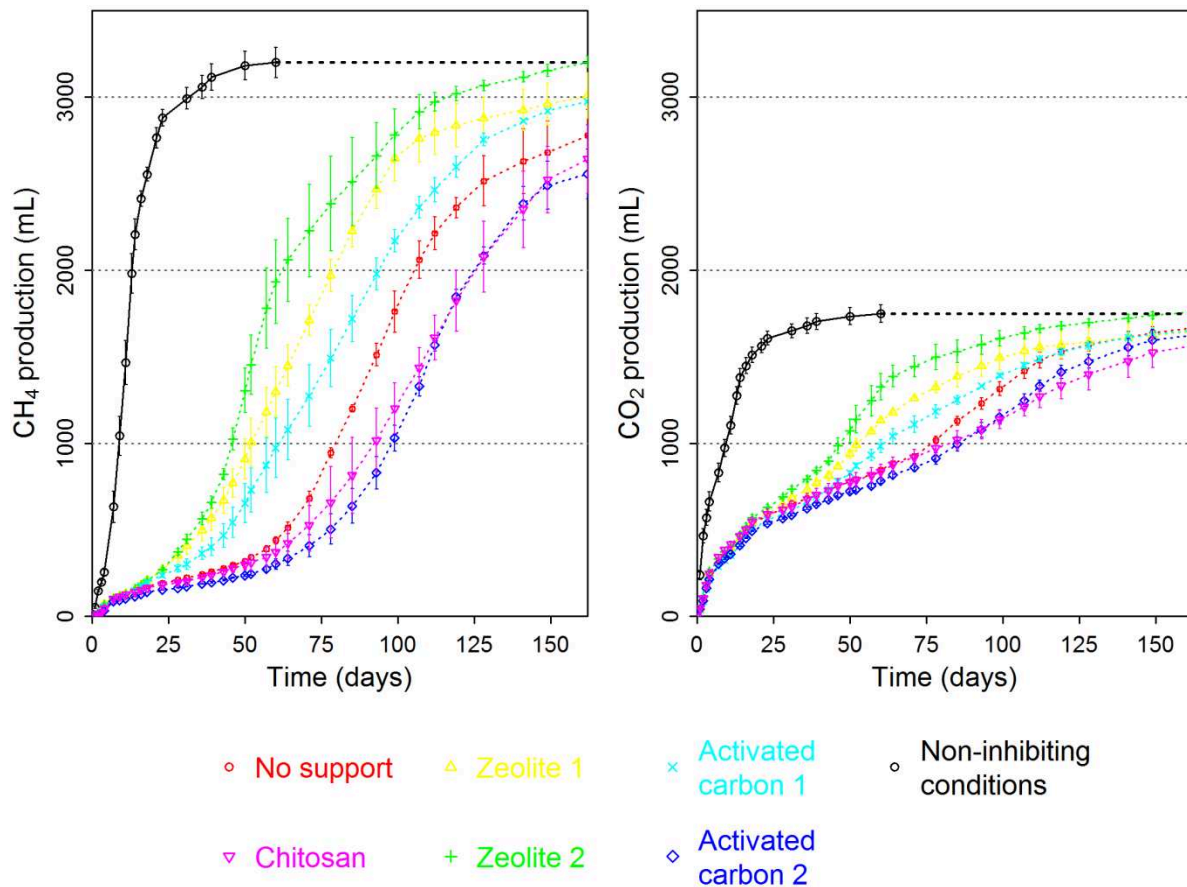


Figure 63 : Cumulated (A) CH_4 and (B) CO_2 productions (mL) over time (number of days). Average CH_4 and CO_2 production kinetics under non-inhibiting conditions are presented in black. Mean values of triplicate bioreactors are presented for CH_4 and CO_2 production, error bars represent standard deviation within triplicates.

Cumulative production curves were analytically compared by fitting experimental data with Gompertz equation. Three kinetic parameters (ultimate production, maximum production rate and lag time) are presented in Tableau XVII.

Tableau XVII : Kinetic constants for CH₄ and CO₂ production using modified-Gompertz model. Data are shown for the different groups of triplicates (mean values and standard deviation)

Support material	Ultimate production yield P (mL)		Maximum production rate R _{max} (mL/day)		Lag time λ (day)	
	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂	CH ₄	CO ₂
No support	2800 ± 125	1675 ± 29	42 ± 4	24 ± 2	45 ± 1	0 ± 0
Zeolite 1	3050 ± 131	1653 ± 82	49 ± 5	26 ± 3	25 ± 3	0 ± 0
Zeolite 2	3143 ± 34	1768 ± 18	74 ± 2	34 ± 2	23 ± 3	0 ± 0
Activated carbon 1	3007 ± 10	1663 ± 37	39 ± 1	28 ± 1	35 ± 1	0 ± 0
Activated carbon 2	2621 ± 142	1635 ± 64	48 ± 3	22 ± 4	58 ± 3	0 ± 0
Chitosan	2670 ± 200	1574 ± 86	34 ± 9	24 ± 4	65 ± 6	0 ± 0
Non-inhibiting conditions	3134 ± 78	1713 ± 45	260 ± 15	112 ± 6	4 ± 0	0 ± 0

Contrary to the NIC experiment, support media had a strong influence on CH₄ and CO₂ cumulated production kinetics in presence of 19 g/L of TAN. Zeolite 1, zeolite 2 and activated carbon 1 seemed to mitigate TAN inhibition and enhance anaerobic digestion compared to inhibited digesters without support. By contrast, activated carbon 2 and chitosan led to slower CH₄ and CO₂ production kinetics.

While without support media CH₄ production lag time was 45 ± 1 days, this kinetic parameter decreased by 20, 22 and 10 days in presence of zeolite 1, zeolite 2 and activated carbon 1, respectively. Nevertheless, with activated carbon 2 and chitosan, CH₄ production lag time was increased by 13 and 20 days, reaching 58 ± 3 days and 65 ± 6 days. During the NIC experiment, lag time only lasted 4 ± 0 days suggesting that even if some of the support media alleviated TAN inhibition, CH₄ production was still highly delayed by this inhibitory compound. By contrast, CO₂ production started instantly in all incubations. Lag times were thus all approximated to 0 as observed in the NIC experiment. However, even though CO₂ was quickly produced since the first day of incubation regardless support media addition, it seemed that after 25 days, a second production phase occurred. During this phase, supports had a clear influence on CO₂ accumulation kinetics. It can thus be assumed that the first production phase was linked to the fermentation of easily degradable compounds by bacterial CO₂ producers resistant to this extreme TAN level. CH₄ production lag time was thus more impaired by TAN than CO₂ indicating that archaeal populations were firstly more affected than fermenting Bacteria. Previous studies reported the same observation (Kayhanian, 1994; Yenigün & Demirel, 2013).

Zeolite 2 was the only support media for which both maximum CH₄ and CO₂ production rates were significantly improved. In these incubations, R_{max} reached 74 ± 2 mL CH₄/day and 34 ± 2 mL CO₂/day while without support these kinetic constants only reached 42 ± 4 mL CH₄/day and 24 ± 2 mL CO₂/day. Maximum CH₄ production rates calculated for digesters incubated with zeolite 1, activated carbon 1, activated carbon 2 and chitosan were comparable to the digester without support with 49 ± 5, 39 ± 1, 48 ± 3 and 34 ± 9 mL CH₄/day respectively. Same observations were noticed for maximum CO₂ production rates. In presence of these support media, it varied between 22 ± 4 and 28 ± 1 mL CO₂/day. Even though zeolite 2 enhanced maximum CH₄ and CO₂ production rates, these

kinetics parameters were still greatly inhibited by TAN. Indeed, during the NIC experiment, CH₄ and CO₂ maximum production rates reached 260 ± 15 mL CH₄/day and 112 ± 6 mL CO₂/day. Consequently, maximum CH₄ production rate calculated for digesters without support were reduced by 85 % without support and by 72 % in presence of zeolite 2. In our previous study, conducted with increasing TAN levels and presented from page 105, 19.0 g/L of TAN half inhibited maximum CH₄ production rate. Thus, this inoculum was less resistant than previously observed. Both inocula were collected in the same digester a year apart. This difference of resistance to ammonia could be explained by the evolution of the biomass in this digester. Indeed, many studies reported that ammonia resistance of anaerobic microbiota could be highly variable, depending on various operating parameters, and potential previous inhibition episodes faced by the biomass (Chen et al., 2008; Rajagopal et al., 2013; Yenigün & Demirel, 2013).

Ultimate CH₄ production yields were enhanced by three support media. In presence of zeolites 1 zeolite 2 and activated carbon 1, they respectively reached 3050 ± 131 mL, 3143 ± 34 mL and 3007 ± 10 mL while without support, only 2800 ± 125 mL of CH₄ were produced. Activated carbon 2 and chitosan led to comparable ultimate CH₄ production with 2621 ± 142 mL 2670 ± 200 mL. By contrast, ultimate CO₂ production yield was only improved in presence of zeolite 2 with 1768 ± 18 mL. In the digesters without support, this kinetic constant reached 1675 ± 29 mL. The addition of the other support media led to comparable ultimate CO₂ productions varying between 1574 ± 86 mL and 1663 ± 37 mL. These results tended to indicate that TAN had a greater influence on biogas production kinetics than on carbon final conversion efficiency. Indeed, final biogas production was less significantly impaired than previous kinetic parameters. While ultimate CH₄ production reached 3134 ± 78 mL during the NIC experiment, all digesters incubated with TAN reached at least 85 % of this yield. Same trends were observed for CO₂ for which all digesters reached at least 91 % of the non-inhibiting assays ultimate production. These small losses could be attributed to the sampling during which a higher quantity of degradable carbon was withdrawn in the inhibited digesters than in those for which biogas production was more advanced. Therefore, it can be assumed that even though TAN inhibitory effect slowed down anaerobic digestion, final performance were still relatively maintained. Consequently, microbial communities seemed to be able after a certain delay, probably correlated with rearrangements within the microbiota, to overcome this inhibition level and produce the same volume of biogas as under non-inhibiting condition. This observation was also reported in our previous study presented from page 105.

Many studies also used zeolites to alleviate the inhibition caused by TAN but at lower inhibiting concentrations ranging from 1.0 to 4.5 g TAN/L (Montalvo et al., 2012). Authors used ion exchange properties in order to lower TAN concentration and immobilize biomass (Rhodes, 2010) either in batch assays or in anaerobic fluidized bed reactors (AFBR) (Fernández et al., 2008). Ho et al., (2012) used natural zeolite in batches at different concentrations (10 – 20 g/L) to counteract the inhibitory effect of 2.0 g/L of TAN contained in swine manure (Ho & Ho, 2012). They enhanced final CH₄ production by 27 % with 10 g/L up to 60 % with 20 g/L of natural zeolite. Kotsopoulos et al., (2008) also observed that 12 g/L of natural zeolite could enhance CH₄ production performance from pig waste in batch digesters under thermophilic conditions (Kotsopoulos et al., 2008). Montalvo et al., (2006)

indicated that 0.40 g zeolite/g VSS could improve the digestibility of piggery waste containing 0.25 g/L of TAN (Montalvo et al., 2006). Another study conducted in batches by Tada et al., (2005) implemented higher TAN concentration (4.5 g/L) to demonstrate the efficiency of natural zeolite (mordenite) to mitigate ammonia inhibition. In presence of this support CH₄ production was increased by three times. Furthermore, Fotidis et al., (2014) also used zeolite to improve the digestibility of ammonia-rich poultry manure. They managed to increase CH₄ production by 110 % in presence of 10 g/L of zeolite. Few studies tested activated carbon to alleviate ammonia inhibition because this support media does not have physico-chemical properties to limit TAN concentration. However, in presence of 6 g TAN/L, Hansen et al., (1999) observed that 1.5% (w/w) of activated carbon, resulted in an increase of the methane yield from 67 ml CH₄/g-VS up to 126 ml CH₄/g VS (Hansen et al., 1999). Kumar et al., (1987) also noticed a stimulation of biogas production from cattle dung by addition of charcoal. Augmentations of gas production by 17 % and 34.7 % in batch and semi-continuous fermenters were respectively observed in presence of 5 % (w:w) of activated carbon (Kumar et al., 1987). However, to the best of our knowledge, no study was conducted with chitosan in order to alleviate ammonia inhibition.

5.1.2 VFA accumulation

VFA accumulation dynamics are presented in Figure 64. Acetate, propionate, butyrate and lactate were detected in all the incubations. Each batch digester contained an initial concentration of 1265 ± 70 mg/L of lactic acid originated from the substrate (data not shown). This VFA was completely degraded after 3 days of incubation in all digesters.

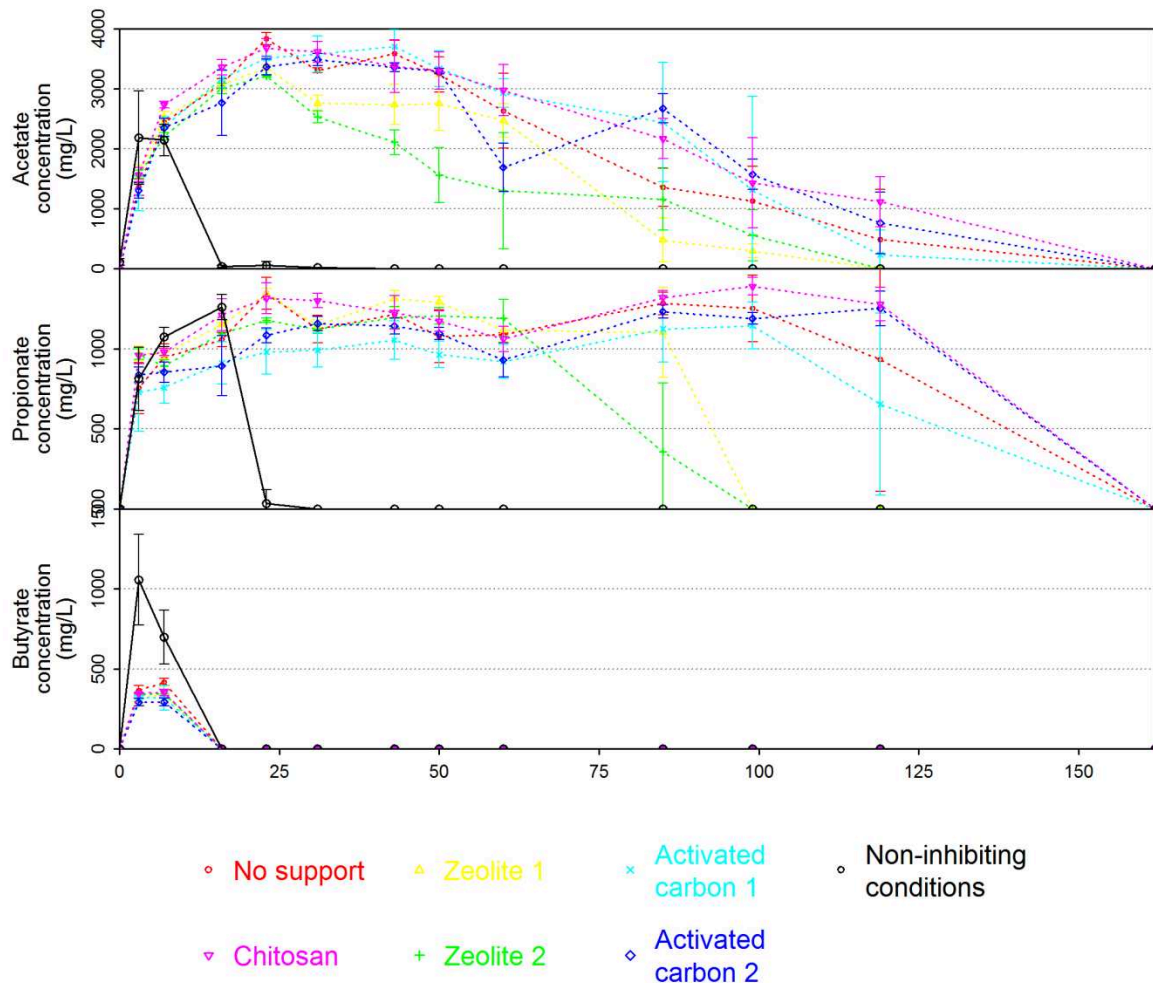


Figure 64 : Volatile fatty acids concentrations over time.

Acetate, propionate and butyrate concentrations (mg/L) in the liquid phase over time (number of days), for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates). Average VFA accumulation kinetics under non-inhibiting conditions are presented in black

The presence of supports media slightly influenced acetate production and accumulation. Without support, this VFA reached maximum concentration of 3836 ± 71 mg/L after 23 days. This peak was also observed at the same date in all other incubations. However, zeolite 1 and zeolite 2 led to lower maximum levels of accumulation with 3351 ± 50 mg/L and 3216 ± 23 mg/L, respectively. Activated carbon 2 also led to lower accumulation of acetate with 3485 ± 101 mg/L. This smaller acetate accumulation probably revealed a better stability of anaerobic digestion in presence of these support media. With activated carbon 1 and chitosan, comparable maximum concentrations of this VFA were observed (3705 ± 276 mg/L and 3681 ± 151 mg/L respectively) indicating that they had no significant effect on acetate accumulation. Zeolites, which enhanced anaerobic digestion, improved complete acetate degradation, achieved after 119 days, while in other incubations, total degradation was completed after 161 days only. Consequently, zeolites may have played a positive role on acetate degraders whereas other supports did not seem to alleviate TAN inhibition on these populations. By contrast, during the NIC experiment, acetate only accumulated up to 2186 ± 777 mg/L after 3 days of incubation before being completely degraded after 16 days.

Hence, the presence of TAN led to an increased acetate accumulation phase and to a longer degradation phase probably caused by the inhibition of acetate degraders.

Contrary to acetate, maximum propionate accumulation levels were not influenced by supports addition. It varied between 1145 ± 147 mg/L and 1391 ± 55 mg/L. However, propionate concentration dropped to 0 mg/L after 99 days with zeolites while it took up to 161 days in other incubations. This result was consistent with acetate degradation and biogas kinetics, confirming that zeolites enhanced anaerobic degradation of VFAs and consequently accelerated CH₄ production. During the NIC experiment, comparable propionate levels were reached with 1261 ± 80 mg/L suggesting that ammonia did not influence propionate accumulation and thus propionate producers. It could be hypothesized that the biowaste used as substrate for this study constantly led to comparable propionate accumulation peaks regardless TAN inhibition which also suggested that propionate producers were probably resistant to this extreme TAN level. Nevertheless, consistently with acetate, TAN greatly delayed propionate degradation since during the NIC experiment, this VFA was totally degraded only after 23 day. This delayed degradation was consistent with previous observations on acetate results and tended to indicate that VFA degraders were more affected than VFA producers.

Contrary to other VFAs, support media did not seem to influence butyrate production. In presence of this inhibitor, maximum butyrate concentration varied between 393 ± 22 mg/L and 417 ± 25 mg/L regardless support media. Moreover, they neither impaired butyrate degradation since it was completely degraded after 16 days in all digesters. However, butyrate production was greatly inhibited by TAN. Under non-inhibiting conditions its maximum concentration reached 1057 ± 284 mg/L indicating that 19.0 g TAN/L reduced its accumulation by circa 50 %. During the NIC experiment, complete degradation also took 16 days but higher concentrations of butyrate were degraded.

In our previous work, conducted with increasing TAN concentrations and presented from page 105, this inhibitor also impaired butyrate accumulation while acetate and propionate production were not significantly inhibited. Delays in acetate and propionate degradation in presence of 19.0 g TAN/L were attributed to the inhibition of VFA degraders or archaeal CH₄ producers which were initially present in the inoculum. But TAN was also reported to induce metabolic shifts in CH₄ formation towards syntrophic acetate oxidation (SAO) involving acetate oxidizing Bacteria and hydrogenotrophic Archaea (Schnürer & Nordberg, 2008). Consequently, these delays could be attributed to slow rearrangements within the microbiota and to the delayed emergence of new syntrophic populations. It could thus be hypothesized that the positive influence of zeolites on acetate and propionate degradation was either linked to a reduction of TAN inhibition towards sensitive populations or to the enhancement of new syntrophic populations. A recent study also revealed that VFAs accumulated in lower concentrations in a fixed zeolite reactor but SAO populations were not specifically identified (Ziganshina et al., 2015). Nonetheless, in our cases, zeolites did not allow the microbiota to reach comparable performance as those obtained during NIC experiment.

5.1.3 Ammonia concentration dynamics

Data about Total Ammonia Nitrogen (TAN), Free Ammonia Nitrogen (FAN) and pH are shown in Figure 65. Previous experiments revealed that 19.0 g/L of TAN half-inhibited the CH₄ maximum production rate calculated for this inoculum. Therefore, this concentration was selected to assess the influence of supports on anaerobic digestion performance. Initial TAN values within the bioreactors varied from 20.1 ± 0.3 g/L to 20.8 ± 0.5 g/L. This difference between expected concentration and measures was attributed to the initial TAN content of the biowaste.

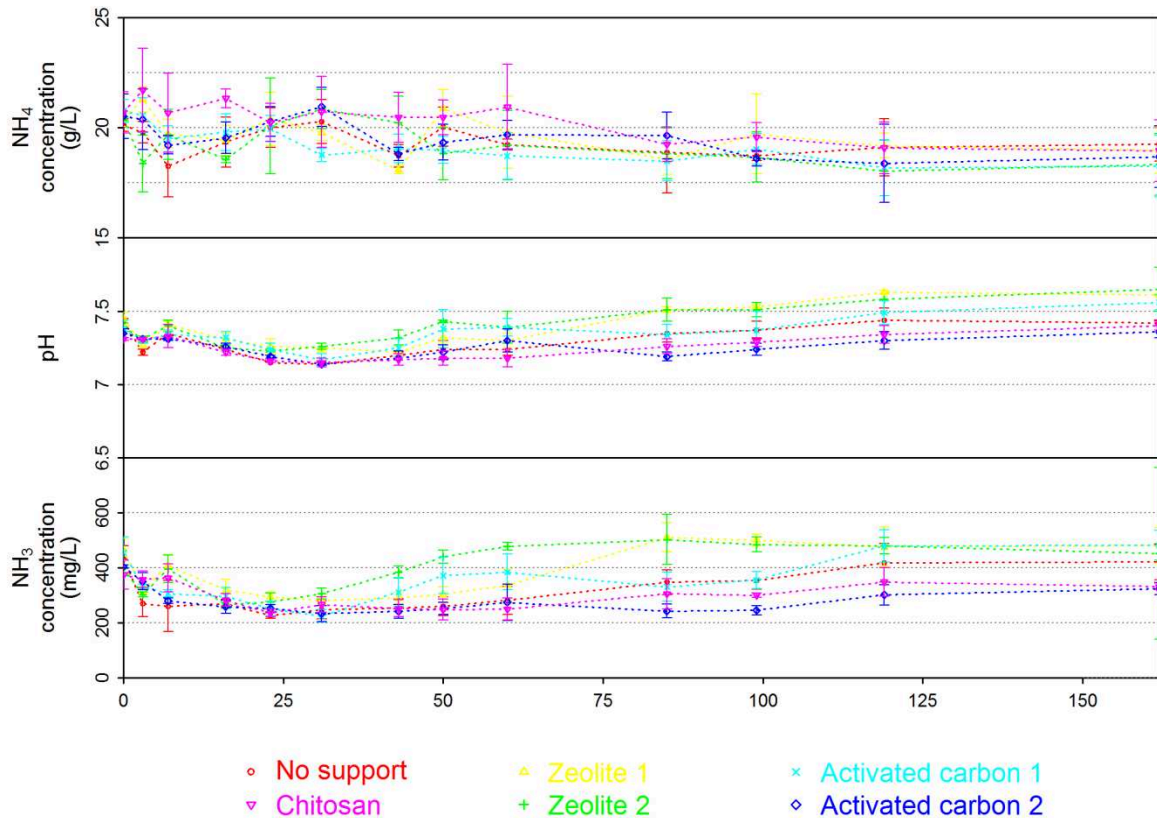


Figure 65 : Ammonia concentration dynamics and pH over time.

Total Ammonia Nitrogen (TAN, mg/L) concentration, pH and Free Ammonia Nitrogen (FAN, mg NH₃-N/L) concentration over time (number of days) for the different groups of triplicate bioreactors (mean values, error bars represent standard deviation within triplicates).

Slight variations in TAN levels were observed throughout the incubation. This was mainly attributed to release of ammonia during degradation of protein from the biowaste and to the variation of pH. Furthermore, no ammonia was released in the headspace in gaseous form. pH values were also relatively constant circa 7.0–7.5 for each operating condition. Slight increases were observed up to 7.7 in the latest days of the experiment in presence of zeolite 1, zeolite 2 and activated carbon 1 for which CH₄ production was almost over. The lack of remarkable variations in pH values could be attributed to the biochemical methane potential buffer used as liquid media but also to ammonia which plays an important buffering role and thus stabilizes pH in the AD process. Consequently, initial FAN levels which were

calculated from TAN and pH values slightly varied between 426 ± 28 mg/L and 511 ± 28 mg/L.

Interestingly, zeolites, which are used to limit the presence of TAN and FAN thanks to their ion-exchange properties did not influence their concentration in the digesters. However, since these supports enhanced anaerobic digestion, they probably had another positive effect on microbial communities. Similarly, activated carbon 1 had improved anaerobic digestion kinetics without influencing TAN concentration.

5.2 Microbiota response

Microbial community dynamics patterns were investigated with 16S rRNA gene high-throughput sequencing. The objective was to assess the potential influence of each support on microbial community composition and identify key microorganisms involved in structural modifications of the microbiota.

Thirty samples were selected depending on the biogas production kinetics advancement. One sample was used to characterize the initial microbial composition of the digesters. Several thousands of sequences were identified for each sample. They were assembled into 1972 and 36 OTUs for Bacteria and Archaea, respectively. Relative abundance of archaeal and bacterial OTUs were used for the analysis. Only OTUs that exceeded 1 % in at least one sample have been taken into account for the analysis. Due to the large number of bacterial OTUs, relative abundances were aggregated at the family level. After this trimming step, 22 archaeal OTUs and 21 bacterial families were conserved for the analysis. OTUs belonging to the same archaeal genus or to the same bacterial order were represented with the same color palette.

Principal component analysis (PCA) was performed to statistically analyze Archaea and Bacteria 16S rRNA gene tags data. T₀ sample which was considered as an image of the inoculum was not included in this analysis. In order to evidence potential patterns in PCA representation, samples were clustered by the type of support media initially added. The size of the symbols is correlated to the collection dates: the later the bigger. Associated correlation circles were used to identify principal representative OTUs differentiating samples within the factorial plane. Key phylotypes' phylogenetic assignment was abbreviated for this representation.

5.2.1 Archaea

Archaeal relative abundances were represented at the OTU level in Figure 66.

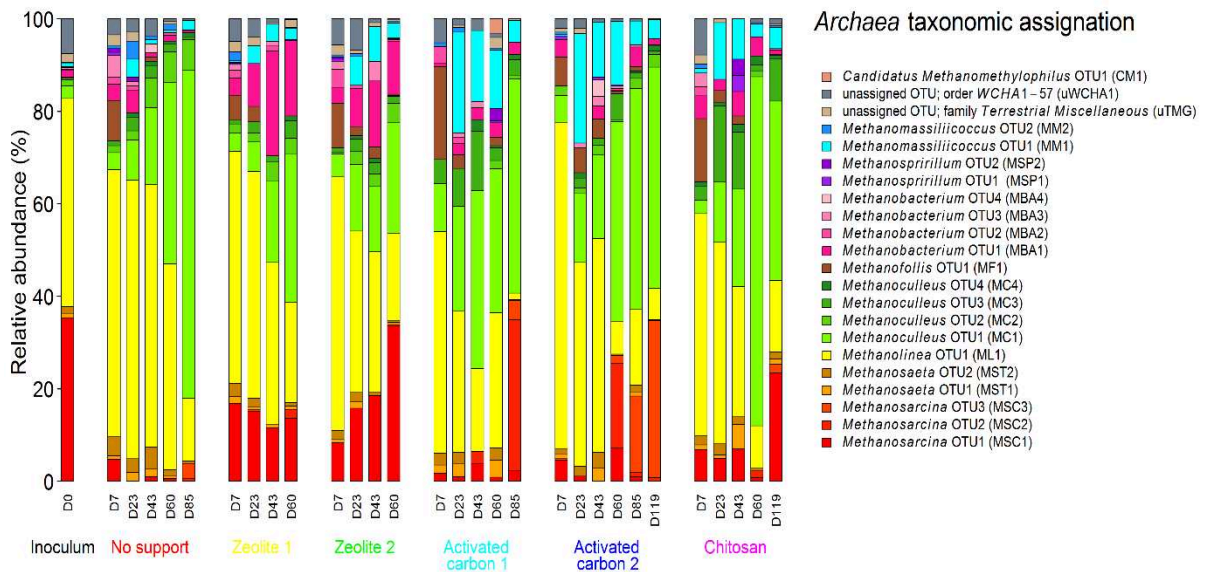


Figure 66 : Relative abundance of the archaeal dominant OTUs.

In order to support observations made on the histogram representation, PCA was performed with these data and is presented in Figure 67.

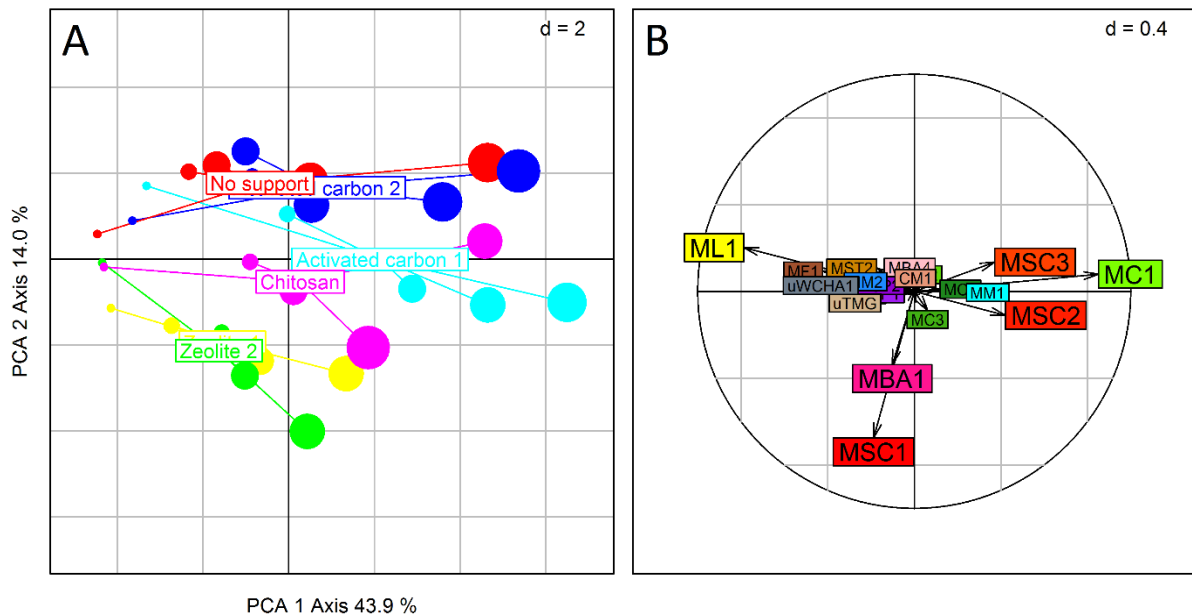


Figure 67 : Principal component analysis of archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing (A), The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 43.9 % and 14.0% of the total variance. The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Methanogenic Archaea detected in the inoculum mainly belonged to two OTUs assigned to genus *Methanolinea* (ML1) and genus *Methanosarcina* (MSC1) with respective relative abundances of 45 % and 35 %. Most of the remaining minor OTUs were assigned to order WCHA1 (8 %), and genus *Methanoculleus* (5 %). This composition was relatively comparable to our previous study conducted with an inoculum collected in the same digester.

5.2.1.1 Without support

Without support, TAN greatly inhibited one of the major OTU initially present in the inoculum and assigned to genus *Methanosarcina* (MSC1). Its relative abundance dropped down to 5 % after 7 days and remained below 1 % throughout the experiment. While CH₄ production was still inhibited, from 7 up to 43 days, *Methanolinea* (ML1) was the predominant within the archaeal community. It can thus be assumed that this OTU did not play a role in methanogenesis even if it was probably resistant to this TAN inhibiting concentration. By contrast, CH₄ production phase tended to be correlated with the emergence of *Methanoculleus* OTU1 (MC1). Its abundance increased at the expense of *Methanolinea* OTU1 (ML1) until reaching a proportion of 70 % after 85 days, when CH₄ production rate reached its maximum. Therefore, it seemed that ammonia significantly shaped the archaeal community by modifying the balance between *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) and *Methanoculleus* OTU1 (MC1). During the NIC experiment *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) was predominant with a relative abundance of 32-58 % while *Methanoculleus* OTU1 (MC1) proportion varied between 12 and 28 %. Hence, ammonia inhibition induced to a strong rearrangement between both OTUs which led to the selection of the most resistant OTU: *Methanoculleus* OTU1 (MC1). Comparable archaeal dynamics were also noticed in our previous study at 25 g/L of TAN confirming that this extreme TAN concentration completely inhibited *Methanosarcina* and let *Methanoculleus* become predominant within the archaeal community. This genus is known to be ammonia tolerant and has been used in bioaugmentation by Fotidis et al., (2014) to increase CH₄ production from an ammonia-rich substrate (Fotidis et al., 2014b). Moreover, Schnürer et al., (1999) suggested that *Methanoculleus* could play a key role in syntrophic acetate oxidation under inhibiting conditions (Schnürer et al., 1999). It has also been reported that under stressed environmental conditions, the syntrophs of acetate oxidizing Bacteria and hydrogenotrophic methanogens outcompeted the acetoclastic methanogens to be the dominant acetate utilizers (Hao et al., 2011; Hattori, 2008; Ho et al., 2013). It corresponds to the results of present study. Nearly all species of genus *Methanoculleus* can grow on H₂/CO₂ or formate as substrates for methanogenesis (Maus et al., 2012). The increased abundance of *Methanoculleus* may thus be associated with the alteration of previously predominant pathway for methanogenesis. The emergence of *Methanoculleus* OTU1 (MC1) was clearly visible on the PCA factorial plane. Samples without support media were homogeneously distributed along the first principal axis. In the early days of incubation, samples were correlated to the presence of *Methanolinea* OTU1 (ML1) before *Methanoculleus* OTU1 (MC1) emerged within samples collected in the latest days of incubation.

5.2.1.2 In presence of different support

Both zeolites had a comparable influence on archaeal community. Contrary to the digesters incubated without support media, they limited TAN inhibition towards *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) which was predominant in the inoculum. They also promoted the emergence of a single OTU belonging to genus *Methanobacterium* (MBA1) which emerged after 7 days. Consequently, samples collected in digesters incubated with zeolites were mostly recovered in the lower part of the PCA factorial plane and correlated to the presence of these two OTUs. *Methanobacterium* (MBA1) relative abundance reached 22 % and 14 % for zeolites 1 and 2 respectively while this OTU was not present in significant proportions, even in presence of zeolites, during the NIC experiment. With zeolite 1, the relative abundance of *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) remained relatively constant varying between 12 % and 17 %. Contrastingly, with zeolite 2, *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) was firstly inhibited before becoming progressively predominant throughout the CH₄ production phase. Its relative abundance increased from 8 % at day 7 up to 33 % after 85 days. Due to the presence of both latter OTUs, *Methanoculleus* OTU1 (MC1) also emerged but in lower maximum proportion than without support media. Its relative abundance reached 32 % and 24 % in presence of zeolites 1 and 2, respectively. Hence, with these supports, the archaeal population tended to evolve toward a composition consisting of three major OTUs: *Methanosarcina* OTU1 (MSC1), *Methanoculleus* OTU1 (MC1) and *Methanobacterium* OTU1 (MBA1). Since the great predominance of *Methanoculleus* OTU1 (MC1) without support led to lower anaerobic digestion performance, it was hypothesized that the preservation of *Methanosarcina* (MSC1), even in lower proportions than in the NIC experiment, coupled with the emergence of *Methanobacterium* OTU1 (MBA1), led to improved CH₄ production. Conflicting results concerning the colonization of zeolites were recently indicated by different authors. A study conducted in a fixed zeolite reactor showed that archaeal community was dominated by various members of genus *Methanobacterium* at moderate TAN level (Ziganshina et al., 2015). Nevertheless, after increasing TAN concentration, they observed the predominance of genus *Methanosarcina*. Fernandez et al., (2008) observed that predominant anaerobic microorganisms colonizing natural zeolite were found to be assigned to genus *Methanosaeta* and family *Methanosarcinaceae* under non-inhibiting conditions (Fernández et al., 2008). By contrast, without any inhibitory compound, Weiss et al., (2013) determined that zeolites could also be colonized by *Methanoculleus* (Weiss et al., 2013).

In presence of activated carbons, archaeal microbiota also showed distinct behaviors. Both supports enhanced the emergence of a single OTU assigned to *Methanomassiliicoccus* (MM1). Its relative abundance increased up to 22 – 24 % after 23 days before progressively dropping down to 5 % for both digesters. Since CH₄ production was still highly inhibited at this date, it suggested that this genus was probably resistant to TAN but its role remained unclear. Similarly to the digesters without support, *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) was inhibited throughout the experiment in presence of both activated carbons indicating that contrary to zeolites, activated carbons did not mitigate TAN inhibition towards this OTU. Surprisingly, both activated carbons seemed to promote the emergence of new OTUs affiliated to genus *Methanosarcina* (MSC2 and MSC3) which were not present during NIC

experiment. In presence of activated carbon 1, *Methanosarcina* OTU2 (MSC2) emerged after 85 days of incubation. But CH₄ production already reached 57 % of the ultimate production at this date. Therefore, its role in methanogenesis remained unclear. Within digesters incubated with activated carbon 2, *Methanosarcina* OTU2 (MSC2) also emerged, but earlier than with activated carbon 1. Its relative abundance reached 18 % after 60 days which corresponded to the beginning of the CH₄ production phase of this digester. But the proportion of this OTU already dropped down to 1 % after 85 days. *Methanosarcina* OTU3 (MSC3) seemed to take its place by reaching a proportion of 16 % after 85 days and 33 % after 119 days. However, despite the presence of these OTUs, lower CH₄ production performance was observed in the digester incubated with activated carbon 2. Therefore, it seemed that MSC2 and MSC3 did not play a significant role in CH₄ production. Similarly to digesters incubated without support, *Methanoculleus* OTU1 (MC1) emerged in both cases. Its influence on the distribution of the samples on the PCA factorial plane was more clearly visible than MSC2 and MSC3. Interestingly, this OTU became predominant earlier in presence of activated carbon 1, than with activated carbon 2. After 43 days, its relative abundance already reached 39 % with activated carbon 1 while it only reached 18 % with activated carbon 2 and 16 % without support. This difference could thus be correlated to CH₄ production performance. Indeed, compared to digesters incubated without support, activated carbon 1 accelerated CH₄ production while activated carbon 2 slowed it down. Therefore, this observation could suggest that *Methanoculleus* OTU1 (MC1) played a key role in promoting CH₄ production when *Methanosarcina* OTU1 was inhibited. However, the difference between both activated carbons effect on *Methanoculleus* OTU1 (MC1) apparition timing remains unclear. To the best of our knowledge, no study investigated the archaeal composition of digesters supplemented with activated carbon to counteract ammonia inhibition. Most of digesters were implemented to treat phenolic or olive mill wastewaters (Bertin et al., 2004b; Chen et al., 2009; Na et al., 2016). In accordance with Xu et al., (2015), activated carbon could facilitate the enrichment of methanogens and accelerate the startup of methanogenesis in a UASB reactor under non-inhibiting conditions. High throughput sequencing revealed that genus *Methanosarcina* abundance increased in the tightly absorbed fraction on the powdered activated carbon surface, leading to the promoted syntrophic associations. Nonetheless, genus *Methanoculleus* was also found in digesters augmented with activated carbon, suspended in solution or loosely attached to this support (Xu et al., 2015).

In presence of chitosan, archaeal composition dynamics was also different from digester incubated without support. *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) relative abundance remained below 7 % up to 60 days of incubation. During this phase, CH₄ production was also inhibited. By contrast, *Methanoculleus* OTU1 (MC1) became progressively predominant until reaching a proportion of 75 % within the microbiota after 60 days of incubation. Similarly to activated carbons, chitosan tended to promote the development of a single OTU assigned to *Methanomassiliicoccus* (MM1). Its relative abundance increased up to 12 % after 23 days of incubation before decreasing below 5 % throughout the rest of the incubation. Surprisingly, after 119 days, CH₄ production rate reached its maximum and archaeal community composition evolved significantly. *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) seemed to overpass TAN inhibition since its proportion reached 23 %. Its emergence led to a decrease of *Methanoculleus* OTU1 (MC1) proportion down to 38 % indicating the probable competition

between these two OTUs. But the delayed emergence of *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) remains unclear. To the best of our knowledge, no study investigated its influence on the microbial composition of anaerobic digesters. This natural biomaterial has only been used as a coagulant (Parthasarathy et al., 2016).

Under inhibiting TAN concentration, archaeal community was governed by three major OTUs. The persistence of *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) coupled with the emergence of *Methanobacterium* OTU1 (MBA1) in presence of zeolites, led to the best anaerobic digestion performance. However, although these OTUs did not grow with activated carbon 1 CH₄ production was still enhanced compared to digesters without support. This improvement tended to be linked to the rapid emergence of *Methanoculleus* OTU1 (MC1) which grew faster than without support. By contrast activated carbon 2 led to lower anaerobic digestion performance which seemed to be correlated with the presence of OTUs such as *Methanosarcina* OTU2 (MSC2) or *Methanosarcina* OTU3 (MSC3) which delayed the predominance of *Methanoculleus* OTU1 (MC1). Nevertheless, lower anaerobic performance observed in presence of chitosan was not clearly explained by the archaeal community dynamics.

5.2.2 Bacteria

Bacterial relative abundances are represented at the family level in Figure 68.

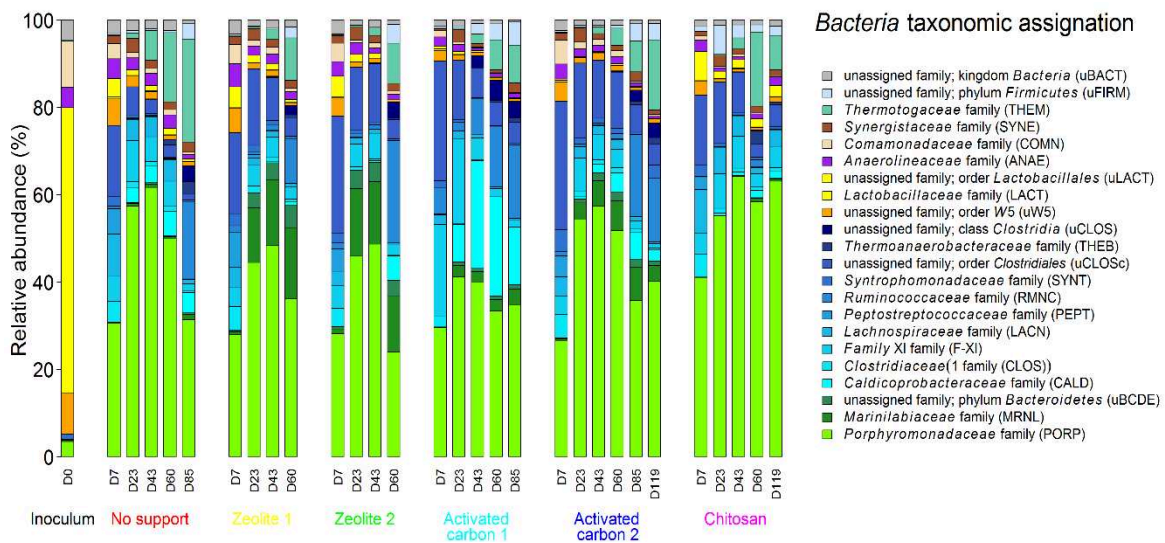


Figure 68 : Relative abundance of the bacterial dominant families.

In order to support observations made on the histogram representation, PCA was performed with these data and is presented in Figure 69.

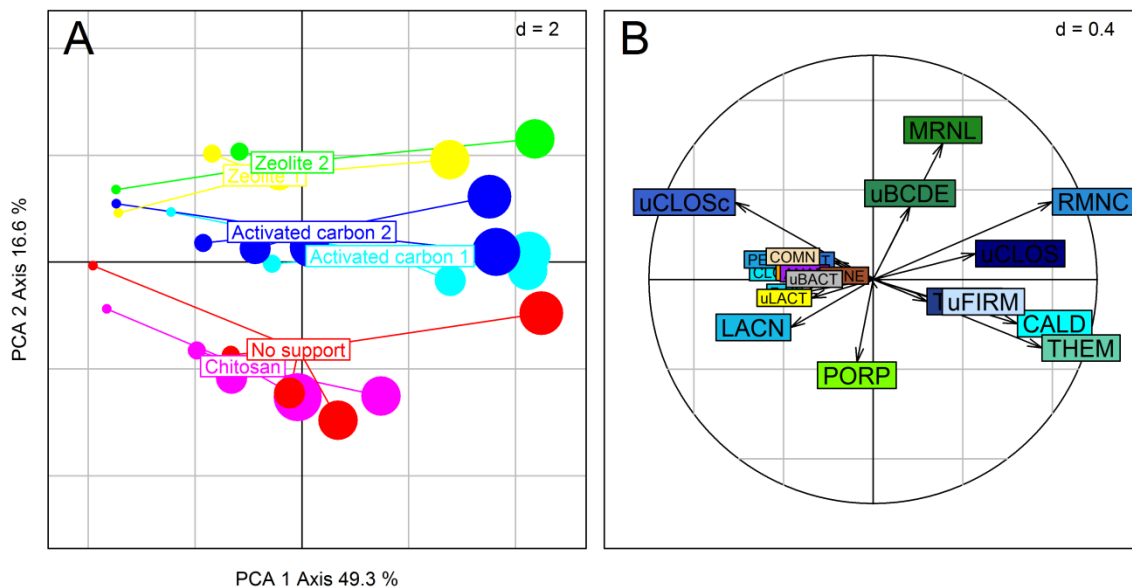


Figure 69 : Principal component analysis of bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing (A), The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 49.3 % and 16.6% of the total variance. The influence of the principal bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Within the initial mix, OTUs assigned to family Lactobacillaceae were highly predominant with a relative abundance of 70 %. Main remaining OTUs belonged to family Comamonadaceae (11 %), order W5 (9 %), family Anaerolinaceae (5 %) and family Porphyromonadaceae (3 %). This composition was greatly similar to the one observed in our previous study.

After 7 days of incubation, bacterial community present in the digester incubated without support was dominated with OTUs affiliated to family Porphyromonadaceae (PORP) (31 %), belonging to order Bacteroidales and to several families assigned to order Clostridiales (44 %). Orders Clostridiales and Bacteroidales were already present at high proportion under extreme ammonia stress in our previous work presented from page 105. This inhibiting TAN concentration completely inhibited OTUs belonging to class Spirochaetes while they were significantly abundant (25 % - 40 %) in NIC experiment. OTUs assigned to order Clostridiales seemed also to be promoted since their proportion only reached 13 % - 28 % under non-inhibiting conditions.

Throughout the experiment, total relative abundance of the different families assigned to order Clostridiales highly fluctuated. Nonetheless, their total proportion decreased down to 19 - 27% in the latest days of incubation. Order Clostridiales consists of fermentative organisms thought to use hydrocarbon intermediates to generate organic acid precursors. Due to their capacity to process a wide range of substrates, their importance has been stood out by many authors (Carballa et al., 2015). Moreover, their abundance has been correlated to ammonia concentration in industrial digesters (Hao et al., 2016). They hydrolyze a variety of

polysaccharides by different mechanisms. Consequently, families belonging to this order were probably involved in the early steps of biowaste degradation despite TAN concentration. Moreover, PCA factorial plane revealed that deep reorganizations occurred within this order. Throughout the incubation, some families such as Lachnospiraceae (LACN) and an unassigned family belonging to order Clostridiales (uCLOSc) were mostly recovered in the earliest days while other families such as Caldicoprobacteraceae (CALD) and Ruminococcaceae (RMNC) emerged in the latest days. Family Caldicoprobacteraceae (CALD) was reported as tolerant to extreme ammonia concentration in our previous study. Surprisingly, family Ruminococcaceae (RMNC) was completely inhibited since 1.5 g/L of TAN in our previous study.

While relative abundance of order Clostridiales globally decreased, family Porphyromonadaceae (PORP) remained predominant throughout the incubation. Its relative abundance varied between 50 and 62 % from day 23 to day 60 before finally decreasing down to 32 % after 85 days. Family Porphyromonadaceae (PORP) was reported as one of the dominant families of the phylum Bacteroidetes in cattle manure. This family was suggested to play an important role in the degradation of the accumulated volatile fatty acids which could explain its constant abundance throughout the incubation (Regueiro et al., 2014b). Furthermore, the maintenance of important percentages of Bacteroidales within a digester has already been suggested to be responsible for the ability of the anaerobic microbiota to counteract disturbances such as shock loadings (Regueiro et al., 2014b).

Interestingly, OTUs assigned to family Thermotogaceae (THEM) also gained more importance throughout the experiment. They emerged after 23 days (1.2 %) until reaching 24 % after 85 days of incubation. This family has recently been reported as tolerant to stress conditions in anaerobic digesters (Hao et al., 2016).

Hence, during the active biogas production, the microbiota mainly consisted of family Porphyromonadaceae (PORP) (32 %), family Thermotogaceae (24 %) and of different families assigned to order Clostridiales (27 %). Bacterial community dynamics in the digester without support was clearly visible on the PCA factorial plane. Samples were distributed along the first principal axis and clearly correlated to shifts between families belonging to order Clostridiales and to the emergence of family Thermotogaceae. Moreover, the high proportion of family Porphyromonadaceae (PORP) all along the incubation was strongly correlated to the absence of support media.

Similarly to the digester without support, in presence of zeolite 1, family Porphyromonadaceae (PORP) became predominant, but in a lower proportion of 44 % and 48 % after 23 and 43 days, respectively. Meanwhile, other families belonging to order Bacteroidales also emerged. The proportion of family Marinilabiaceae (MRNL) increased from 1 % after 7 days of incubation, up to 13 – 16 % between day 23 and day 60. Another unassigned family belonging to phylum Bacteroidetes (uBCDE) also gained importance. Finally, after 60 days of incubation, total abundance of this phylum reached 58 %. Similar observations were made in presence of zeolite 2. Families Marinilabiaceae (MRNL) and uBCDE had a strong influence on samples distribution within the PCA factorial plane. They clearly distinguished samples incubated with zeolites from other digesters. Interestingly, Ziganshina et al., (2015) also reported that the largest groups recovered in a digester operated with zeolite to remove toxic ammonia were unclassified Bacteroidales, Marinilabiaceae, and

Porphyromonadaceae. These families are members of order Bacteroidales which belongs to fecal anaerobic bacteria detected in various digestive systems and feces (Ziganshina et al., 2015). Members of family Marinilabiaceae are anaerobic mesophilic bacterium thought to ferment various substrates with the production of propionate, acetate, and succinate. Furthermore, representatives of family Porphyromonadaceae also produce various organic acids from carbohydrates and proteins. Hence these ammonia tolerant families are probably involved in various steps of anaerobic digestion. The great dominance of phylum Bacteroidetes in presence of zeolites was also correlated to a lower proportion of OTUs assigned to order Clostridiales. Indeed, in presence of zeolite 1, their final abundance after 60 days was 19 % while they reached 36 % in presence of zeolite 2. Even though members of order Clostridiales were reported to be resistant to TAN at extreme concentrations, it seemed that zeolites promoted the growth of OTUs assigned to order Bacteroidales and especially to family Marinilabiaceae (MRNL) and to another unassigned family (uBCDE). Moreover, compared to the digester without support, zeolites did not enhance the emergence of Thermotogaceae which only emerged after 60 days of incubation.

In presence of activated carbon 1, family Porphyromonadaceae (PORP) predominance was relatively lower than in the digester incubated without support throughout the experiment. Its relative abundance varied between 29 % and 41 %. However, similarly to zeolites, activated carbon 1 seemed to slightly enhance the emergence of families belonging to order Bacteroidales such as Marinilabiaceae whose relative abundance reached 4 % throughout the incubation. Within the factorial plane of the PCA, this difference in the bacterial composition was visible. Samples collected in this digester, were located between those incubated with zeolites and the digester without support probably because of the lower proportion of both latter families present in these bioreactors. Meanwhile, proportion of OTUs assigned to order Clostridiales was significantly higher than without support. It varied from 61 % after 7 days to 37 % after 85 days. This order was firstly dominated by family XI (F-XI) (20 %) and by an unassigned family (uCLOS) (27 %) before family Ruminococcaceae (RMNC) (16 %) and family Caldicoprobacteraceae (CALD) (25 %) emerged. It confirmed that abundances of Bacteroidales and Clostridiales were probably tightly correlated. Hence, activated carbon 1 tended to promote members of order Clostridiales at the expense of family Porphyromonadaceae (PORP).

Within incubations supplemented with activated carbon 2, family Porphyromonadaceae (PORP) reached similar relative abundance than without support. It varied between 27 % up to 52 – 58 % from day 23 to day 60 before decreasing down to 36 – 40 % after 85 and 119 days of incubation. Since lower proportions of family Porphyromonadaceae (PORP) were recovered in digesters incubated with zeolites and activated carbon 1 for which CH₄ production was significantly enhanced, it could be hypothesized that the proportion of this family could be correlated with anaerobic digestion performance. Family Marinilabiaceae (MRNL) relative abundance with activated carbon 2 were superior to those observed without support, reaching up to 8 %. The presence of this OTU tended to explain the great proximity between both activated carbons within the factorial plane. However, the link between the presence of this family and anaerobic digestion performance remains unclear since CH₄ production was more inhibited in presence of activated carbon 2 than with activated carbon 1 and even than without support media. Furthermore, total proportion of order Clostridiales

decreased down to 28 – 32 % while family Thermotogaceae (THEM) emerged until reaching 16 % after 119 days. Final bacterial compositions between both activated carbons were highly similar, as observed on the PCA factorial plane. However, both supports did not induce comparable effects on anaerobic digestion. This could be explained by differences in specific areas available for microorganisms which was slightly higher for activated carbon 1 (800 m²/g) than for activated carbon 2 (600 m²/g) which could lead to a better adsorption of microbial populations. Xu et al., (2015) observed an increase of the proportion of Bacteroidales, Desulfuromonas and Thermotogaceae in the liquid fraction of batch digesters in presence of activated carbon. They concluded that this support led to an increase of syntrophic metabolism of alcohol and VFAs to produce CH₄ (Xu et al., 2015). However, no study was conducted with high ammonia concentration. In our case, it appeared that in presence of activated carbon 2 which led to lower anaerobic performance, family Porphyromonadaceae (PORP) and Thermotogaceae (THEM) reached slightly higher proportions than without support media. These populations, which were less abundant in presence of zeolites and activated carbon 1 could potentially be identified as a sign of instability.

Chitosan also led to lower anaerobic digestion performance than without support. Samples collected in this digester were tightly close to those collected in the digester without support within the PCA factorial plane. This proximity was mainly explained by the absence of families Marinilabiaceae (MRNL) and uBCDE which were more abundant with all other supports. Nevertheless, it was interesting to notice that similarly to digesters incubated without support or with activated carbon 2, family Porphyromonadaceae (PORP) remained highly predominant throughout the incubation with a proportion varying between 55 % and 65 %. These relative abundances were significantly higher than those recovered in digesters incubated with zeolites or activated carbon 1 which enhanced anaerobic digestion. Moreover, family Thermotogaceae (THEM) also reached comparable proportion as within digesters incubated without support or with activated carbon 2 with a proportion of 17 % after 60 days. Thus it could be hypothesized that both latter families could be related to anaerobic digestion performance.

Bacterial dynamics within digesters incubated with different support media tended to evidence potential populations related with anaerobic digestion performance. Zeolites seemed to lead to the emergence of families belonging to order Bacteroidales such as Marinilabiaceae (MRNL) and an unassigned family (uBCDE) while activated carbon 1 tended to limit the inhibition of TAN towards families belonging to order Clostridiales without promoting the emergence of both later families. Furthermore, in presence of zeolites and activated carbon 1 which enhanced biogas production, proportions of families Porphyromonadaceae (PORP) and Thermotogaceae (THEM) remained respectively below 49 % and 9 % while they reached 60 - 65 % and 17 - 20 % within digesters which were more inhibited by ammonia. . Since they were still present regardless support media addition, it could be hypothesized that their higher abundance within reactors incubated with activated carbon 2, chitosan or without support was due to the absence of families which were preserved by zeolites and activated carbon 1 and which were probably more sensitive to ammonia. The effect on anaerobic digestion performance associated to each support could be related to modifications within bacterial populations. However, the role of the different

families involved in these rearrangements remains difficult to understand. These effects were also probably correlated to archaeal populations which were more distinctly shaped by the support. It can thus be assumed that the supports induced the implementation of different interactions between Archaea and Bacteria. However, the preferential influence of the supports towards one of these two communities remains difficult to establish. It can still be hypothesized that the inhibition of archaeal populations which are generally more sensitive than Bacteria firstly occurred and induced reorganizations within bacterial populations in order to maintain syntrophic interactions and biogas production.

6 Anaerobic digestion inhibitions by phenol and ammonia in presence of different support media: comparative ecological study and identification of key phylotypes

Previous pages of this chapter presented a parallel analysis of the effects of different support media on the performance and on the microbial dynamics of digesters incubated simultaneously with exactly the same anaerobic inoculum (same starting point) under different inhibiting conditions (without inhibitor, with 1.5 g/L of phenol and with 19.0 g/L of TAN). We tried to identify key phylotypes involved in community changes specifically related to each support media addition. To conclude this chapter we now present a joint analysis of the results of the three experiments to compare the effect of the inhibitors on the degradation and on the related microbial communities.

6.1 Anaerobic digestion performance

The NIC experiment revealed that supports did not significantly influence anaerobic digestion performance. Therefore, all cumulated CH₄ production kinetics were presented as a sole average curve. In order to make a visual comparison of the influence of both inhibitors on anaerobic digestion performance. Figure 70 gathers cumulated CH₄ production kinetics obtained for both experiments.

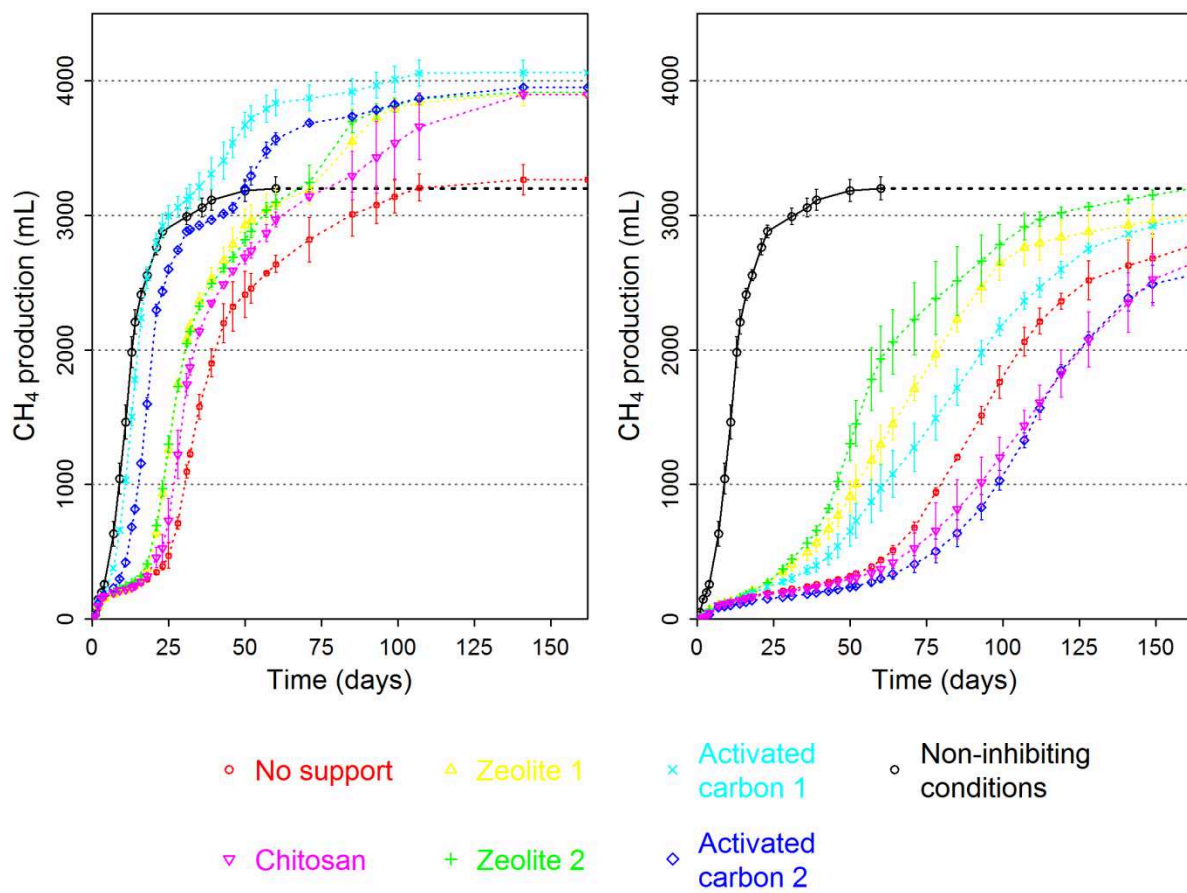


Figure 70 : Cumulated CH₄ production (mL) over time (number of days) in presence of (A) 1.5 g/L of phenol and (B) 19.0 g/L of TAN. Mean values of triplicate bioreactors are presented, error bars represent standard deviation within triplicates.

This figure showed that, despite both concentrations were determined as IC₅₀ for an inoculum collected in the same digester a year apart, 19.0 g/L of TAN more impaired CH₄ production performance than 1.5 g/L of phenol. Without support, lag phase increased from 16 ± 2 days in presence of phenol up to 42 ± 4 days in presence of TAN. To give a comparison, both inhibiting concentrations led to comparable lag times of 22-23 days during the experiments presented from pages 105 and 131. Moreover, while final CH₄ production without support reached the same cumulated volume in presence of 1.5 g/L of phenol as under NIC conditions, it was reduced (also without support) by more than 20 % in presence of 19.0 g/L of TAN. Therefore, both levels of inhibition selected for this experiment led to anaerobic digestion performance which was significantly different from our expectations.

6.2 Microbiota response

In order to investigate if key phylotypes, identified for each inhibition, were recovered in both experiments, a global analysis of molecular data was performed. Reads generated by 16S rRNA gene sequencing were clustered and simultaneously processed with the bioinformatics pipeline as described page 112. Archaeal and bacterial resulting OTUs were separately treated. OTUs relative abundances were normalized with a square root

transformation in order to give more importance to minor OTUs before being statistically analyzed with centered not scaled principal component analyses (PCA). PCAs performed on archaeal OTUs and bacterial families are presented on Figure 71. On this figure, samples were clustered by the type of inhibitor initially added in the digesters.

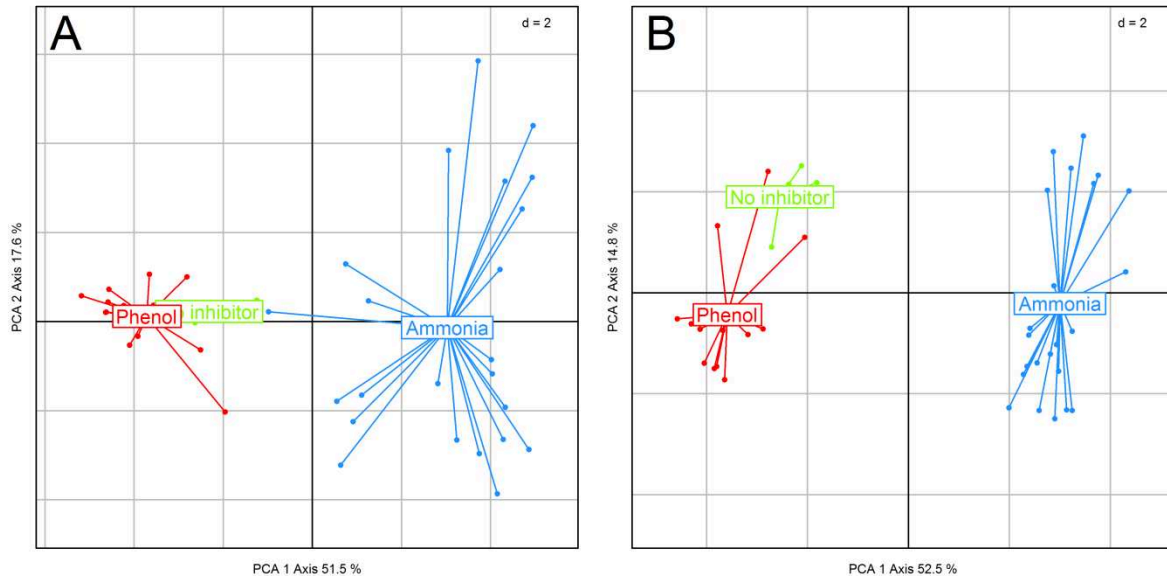


Figure 71 : Principal component analysis of archaeal (A) and bacterial (B) OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution of archaeal OTUs and bacterial families with respectively 51.5 %, 51.8 % and 17.6 %, 15.3 % of the total variance.

Similarly to previous analyses, both PCA factorial planes clearly indicated that archaeal and bacterial communities were differently shaped by phenol and ammonia. Inhibitors' effects were strongly correlated with the first principal axis. Samples incubated with 1.5 g/L of phenol and without inhibitor were clearly clustered on the left part of the factorial plane while samples incubated with 19.0 g/L of ammonia were mostly recovered on the right part of the factorial plane. Interestingly, samples collected in digesters incubated with phenol were significantly closer to those collected in digesters without inhibitor than to those inhibited with TAN. This observation suggested that 1.5 g/L of phenol had a lower effect on the microbiota composition than 19.0 g/L of TAN. It also suggested that key archaeal OTUs and bacterial families could be specifically correlated to these different operating conditions.

In order to further investigate patterns revealed by these first analyses and identify key microorganisms potentially involved in community structure changes, PCA legends were modified and correlation circles were plotted to visualize the contribution of the different OTUs. Samples were clustered and colored by initial inhibitor concentration and by support media. Same color scale was used for phenol and ammonia. Therefore; within each concentration cluster, phenol was abbreviated with P and ammonia with N. The size of the symbols is correlated to the collection dates: the later the bigger. Within correlation circles, different colors were used to represent archaeal OTUs belonging to the same genus. As done in previous results, bacterial OTUs were aggregated at the family level. Similarly to Archaea, different colors were used to represent bacterial OTUs belonging to the same order.

6.2.1 Archaea

Figure 72 shows results obtained from the statistical analysis performed on archaeal OTUs and the associated correlation circle.

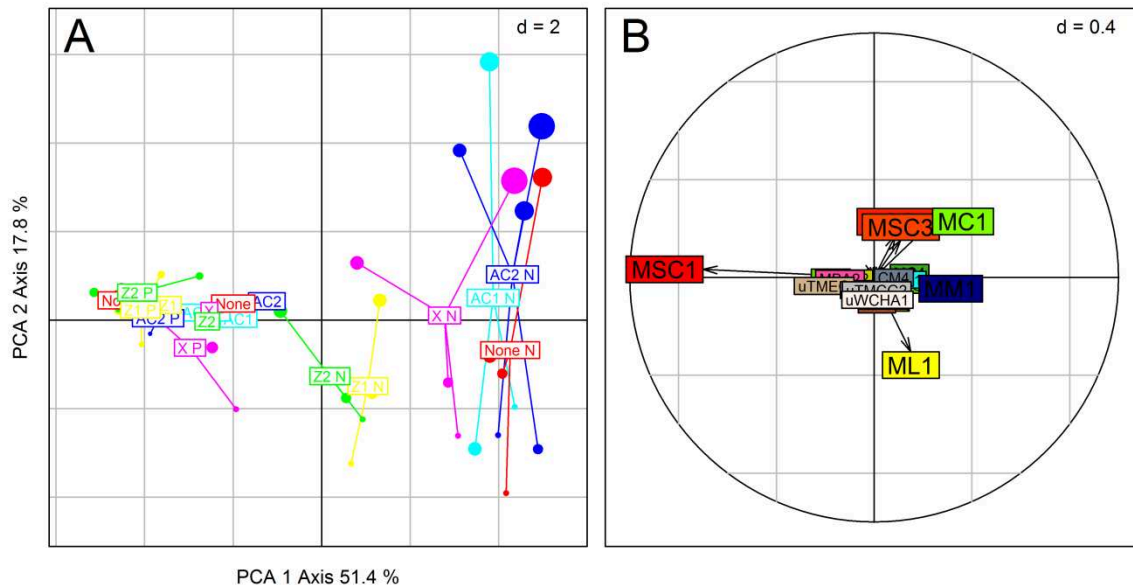


Figure 72 : Principal Component Analysis of the archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 51.5 % and 17.8 % of the total variance.

Samples incubated with phenol and without inhibitor were strongly correlated to a single OTU assigned to Methanosarcina OTU1 (MSC1). This result was consistent to previous observations made during the experiment conducted with increasing phenol concentrations which revealed that an OTU assigned Methanosarcina could grow as soon as phenol was degraded in the digester. Since phenol was completely degraded regardless support media addition, this OTU became predominant in the same proportion as under non-inhibiting conditions. However, a global analysis should be conducted on both experiments to investigate if both tags were assigned to the same OTU.

By contrast, level of ammonia remained stable throughout the incubation in all digesters regardless support media addition. Within each support cluster, samples were highly dispersed. This dispersion was explained by the great proportion of Methanolinea (ML1) in early collected samples which were still inhibited by ammonia. Samples collected in digesters incubated with zeolites were significantly apart from those incubated with other supports. This observation was previously correlated to the preservation of Methanosarcina OTU1 (MSC1) thanks to both zeolites. However, even if this OTU could grow despite ammonia inhibition, its proportion was lower than in presence of phenol or without inhibitor. This explains its intermediary position within the factorial plane. In presence of activated carbons, chitosan and without support media, archaeal community mainly consisted of a core of three OTUs assigned to genus Methanosarcina (MSC2 and MSC3) and genus Methanoculleus (MC1). This result was consistent with previous observations made during the experiment

conducted with increasing ammonia concentrations. During this latter study, PCA analysis also revealed a shift from a non-inhibited archaeal community mainly consisted of *Methanosarcina mazei* toward a resistant community consisting of *Methanosarcina Thermophila* and *Methanoculleus*. Hence, this shift was also observed in presence of 19.0 g/L of TAN. Activated carbons and chitosan did not influence this shift while zeolites partly preserved *Methanosarcina* OTU1 (MSC1).

Interestingly, this global analysis summarized key phylotypes involved in these inhibitions and underlined the positive effect of zeolites towards ammonia inhibition. Within this inoculum, key role was played by *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) which led to the best anaerobic digestion performance under non-inhibiting conditions. In presence of phenol, every support media had a positive effect on anaerobic digestion performance which could be strongly correlated to the preservation of this OTU. However, since final archaeal composition of digesters incubated with phenol was identical to those recovered in digesters operating under non-inhibiting conditions, the effect of this inhibitor on archaeal community could not be clearly evidenced with this global-analysis. By contrast, since ammonia concentration remained stable throughout the incubation, archaeal community needed to adapt to this constant stress. This inhibitor induced lower anaerobic digestion performance. Furthermore, a more diverse archaeal composition was observed. It was dominated by new OTUs assigned to *Methanosarcina* and *Methanoculleus*. This PCA also revealed, as previously observed, that zeolites could preserve the presence of *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) in presence of a constant inhibition of 19.0 g/L of TAN. This result evidenced that the presence of this OTU was determinant in anaerobic digestion performance. However, mechanisms related to this observation remained unclear. It could be hypothesized that these support media could have released ions which enhanced the growth of *Methanosarcina* OTU1 (MSC1).

6.2.2 Bacteria

The statistical analysis performed on bacterial families and the associated correlation circle are presented on Figure 73.

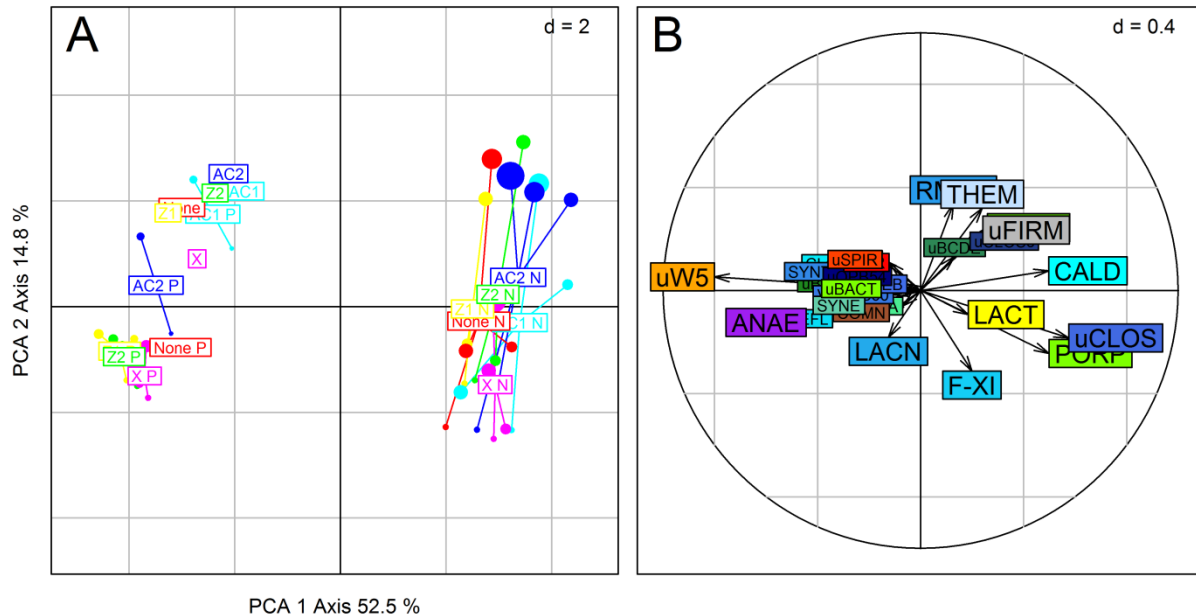


Figure 73 : Principal Component Analysis of the bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The influence of the principal bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 52.5 % and 14.8 % of the total variance.

Bacterial community composition recovered within samples incubated without inhibitor or in presence of 1.50 g/L of phenol were strongly linked to the presence of families belonging to order W5 (uW5), to family Anaerolinaceae (ANAE) and to several minors families which seemed to be strongly inhibited in presence of 19.0 g/L of TAN. This inhibitor mainly led to the emergence of families assigned to orders Clostridiales and Bacteroidales but also to Thermotogaceae.

Moreover, similarly to Archaea, a great dispersion was evidenced within each digester incubated with TAN indicating that bacterial community evolved throughout the experiment. Samples collected in the early days of CH₄ production were related to family Porphyromonadaceae (PORP), family XI (F-XI) and to an unassigned family belonging to order Clostridiales (uCLOS). The presence of family Lactobacillaceae (LACT) which was highly abundant in the inoculum indicated that these digesters were still inhibited by TAN. Throughout the experiment, digesters bacterial community evolved toward a composition mainly consisting of family Caldicoprobacteraceae (CALD), Ruminococcaceae (RMNC), Marinilabiaceae (MRNL), Thermotogaceae (THEM) and of an unassigned family belonging to phylum Firmicutes (uFIRM). This confirmed results presented in our study presented from page 105, which suggested the great importance of orders Bacteroidales and Clostridiales under extreme TAN concentration.

For each inhibiting condition, final bacterial compositions were relatively similar regardless support addition. Therefore, within the PCA factorial plane, no effect could be clearly attributed to any of the support initially added. Therefore, this global analysis indicated that bacterial populations were more impaired by the type of inhibition than by the support media added. This observation was also made on archaeal community. Since they did not influence bacterial populations without inhibitor, it suggested that support media could be useful only under inhibiting conditions, by helping the microorganisms to face perturbations. Discriminating bacterial phylotypes, representative of TAN inhibition, could be identified. Their great influence on samples distribution was attributed to the fact that, at these concentrations, TAN concentration induced a higher inhibitory stress towards bacterial populations than phenol. Since both concentrations were supposed to half inhibit an inoculum collected in the same digester, it also suggested that, even though similar populations could be recovered a year apart, the resistance of both inocula towards phenol and TAN could evolve during time. Nevertheless, this experiment suggested that zeolite 1, zeolite 2 and activated carbon 1 showed promising results to alleviate both types of inhibition.

TRANSPOSITION DES MEILLEURES
STRATÉGIES DE RÉSISTANCE À DES
RÉACTEURS SEMI-CONTINUS
CONFRONTÉS À UNE INHIBITION
PAR LE PHÉNOL

1 Introduction

La troisième étape de la démarche expérimentale développée au cours de cette thèse visait à transposer, sur des réacteurs semi-continus, les stratégies opératoires ayant montré les meilleures potentialités à réduire les pertes de performances causées par la présence d'un composé inhibiteur.

Lors de l'étude menée en digesteurs batchs, il a été montré qu'en présence de 1,5 g/L de phénol, l'ensemble des supports testés permettait d'accroître et d'accélérer la production de biogaz. Par conséquent, cet inhibiteur a été sélectionné pour cette étude. Il était attendu que l'ajout de charbons actifs, capables d'adsorber le phénol et donc de réduire sa concentration dans le milieu réactionnel, induirait une amélioration des performances de la digestion anaérobie. Toutefois, nous avons pu constater que les caractéristiques inhérentes à chacun des charbons actifs testés avaient une influence considérable sur l'adsorption du phénol, et par conséquent sur leur efficacité à réduire son inhibition vis-à-vis des communautés microbiennes. Les meilleures performances en terme de production de biogaz ont été obtenues en présence de charbon actif 1, qui présente notamment une plus grande surface active que le charbon actif 2. Par ailleurs, l'ajout de zéolithes, qui ne possèdent pourtant pas de propriété surfacique leur permettant de capter les molécules organiques telles que le phénol, ont considérablement amélioré la production de biogaz. Des hypothèses ont ainsi été émises quant à leur capacité à réduire l'inhibition et à préserver certaines populations microbiennes, notamment par le relargage d'ions favorisant la croissance de certaines populations méthanogènes. Le type de zéolithe ajouté a également eu une influence significative sur les performances de production de méthane. La zéolithe 1 a ainsi démontré de meilleures potentialités à réduire l'inhibition par le phénol que la zéolithe 2. Compte tenu de ces résultats prometteurs, il a été décidé de focaliser cette étude sur l'inhibition par le phénol et sur l'influence de l'ajout de charbon actif 1 et de zéolithe 1 pour parer à cette inhibition.

A l'instar des expérimentations menées en digesteurs batchs, l'étude conduite sur les réacteurs semi-continus s'est décomposée en deux étapes. Celles-ci sont présentées plus longuement et récapitulées sous forme de figure (Figure 29). Tout d'abord, et après avoir observé une période de stabilisation des performances des digesteurs, la concentration en phénol a été progressivement augmentée jusqu'à atteindre la CI_{50} de 1,5 g/L. L'objectif de cette étude était d'étudier la réponse d'un écosystème microbien au sein d'un système semi-continu et de le comparer à celle obtenue dans des digesteurs batchs. Puis, le charbon actif 1 et la zéolithe 1 ont été ajoutés parallèlement dans deux des trois réacteurs. Des perturbations brutales en phénol ont alors été appliquées jusqu'à obtenir une inhibition importante des digesteurs. L'influence de ces supports sur les performances de production de biogaz et sur la composition des communautés microbiennes a ainsi pu être évaluée et comparée à celle observée en digesteurs batchs.

2 Key elements of the experimental set-up

A triplicate of continuously stirred tank reactors (Applikon, total volume 7 L, working volume 5.5 L) was set-up in mesophilic conditions. Temperature was maintained at 35°C by recirculating water into the jacket of the double walled bioreactors. Mixing speed was controlled and maintained at 90 rpm throughout the experiment. At start-up, bioreactors were inoculated with 500 g of sludge pellet obtained by centrifugation of samples from a 50 L stable laboratory bioreactor incubated at 35°C. This bioreactor had previously been inoculated with sludge collected in an industrial mesophilic digester treating both primary and excess biological sludge on a municipal wastewater treatment plant (Achères, France). Inocula were mixed with 5 liters of biochemical methane potential buffer (BMP, ISO 11734:1995). The reactors were daily fed with a solution of mashed biowaste (100 mL of mashed biowaste per L in BMP buffer). Mashed biowaste (COD: 220 ± 10 g O₂/L) was provided by an industrial food waste deconditioning unit supplied with residual food waste from restaurants, supermarkets, and food industries. Feeding was followed by reactor mixture removal to maintain a constant volume. In total 250 mL per day were added and removed. Consequently hydraulic retention time (HRT) was 22 days and organic loading rate (OLR) was circa 1.0 kg COD/m³. Bioreactors were closed hermetically to maintain anaerobic conditions. Biogas was collected through a port at the top of the bioreactor and production rate was measured with a tipping bucket gas counter (volume of the bucket 21 mL). Biogas was ultimately collected in a bag to measure its composition. The pH and the temperature in the reactors were continuously measured. Samples were collected weekly through a sampling pipe, centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C, frozen directly in liquid nitrogen and kept at -80°C until used for analysis of biomass and chemical parameters.

2.1 Episode 1

Reactors reached a steady state after nearly 4 HRT and were maintained in stable functioning conditions for more than 1 HRT (29 days) before being disturbed by phenol. To set-up these perturbation episode, feeding solution was supplemented with 2.89 g/L of phenol (99 %, ACROS Organics). The objective was to reach a concentration of 1.5 g/L of phenol (corresponding to the IC₅₀ determined in batch digesters) within each reactor in one HRT.

2.2 Episode 2

Previous perturbation episode led to contrasted situations within the triplicate of reactors. Phenol degradation only occurred within reactors 1 and 2 while it was completely inhibited in reactor 3. At day 69, it was thus decided to adjust phenol concentration in all reactors at 1.5 g/L, corresponding to the concentration used in the batch experiments conducted with different supports. Consequently reactor 1, 2 and 3 were respectively supplemented with 1.4 g/L, 1.4 g/L and 0.6 g/L of phenol. Moreover, in order to induce a higher inhibition, phenol concentration within the feeding solutions was increased up to 5.0 g/L.

After a stabilization period of 1 HRT, support media were directly added into two reactors (Day 84). Since reactor 1 showed the best phenol degradation performance, it was selected to be used as a control without support. Reactor 2 and 3 received respectively 10 g/L of zeolite 1 and activated carbon 1. To assess the influence of these supports on anaerobic digestion performance under strong inhibiting conditions, and as the inhibitor was degraded, phenol pulse feedings were regularly applied to the three reactors (Days 97, 104, 110 and 114). The objective was to induce a great disruption of biogas production.

Once all reactors were inhibited, a second support media supplementation was performed at day 117. Reactor 1 received 10 g/L of zeolite 1 while reactors 2 and 3 were supplemented with respectively the same amount of zeolite 1 and activated carbon 1 as previously described.

3 Influence of a regular step-wise inhibition by phenol on the microbial response of semi-continuous reactors

3.1 Anaerobic digestion performance

Figure 74 presents the performance of each bioreactor in terms of biogas production rate and biogas composition. Feeding solutions were weekly prepared to avoid any bias linked to their aging. Biogas productions were averaged over each week. CH_4/CO_2 ratio was calculated by dividing the percentage of CH_4 by the percentage of CO_2 within the biogas.

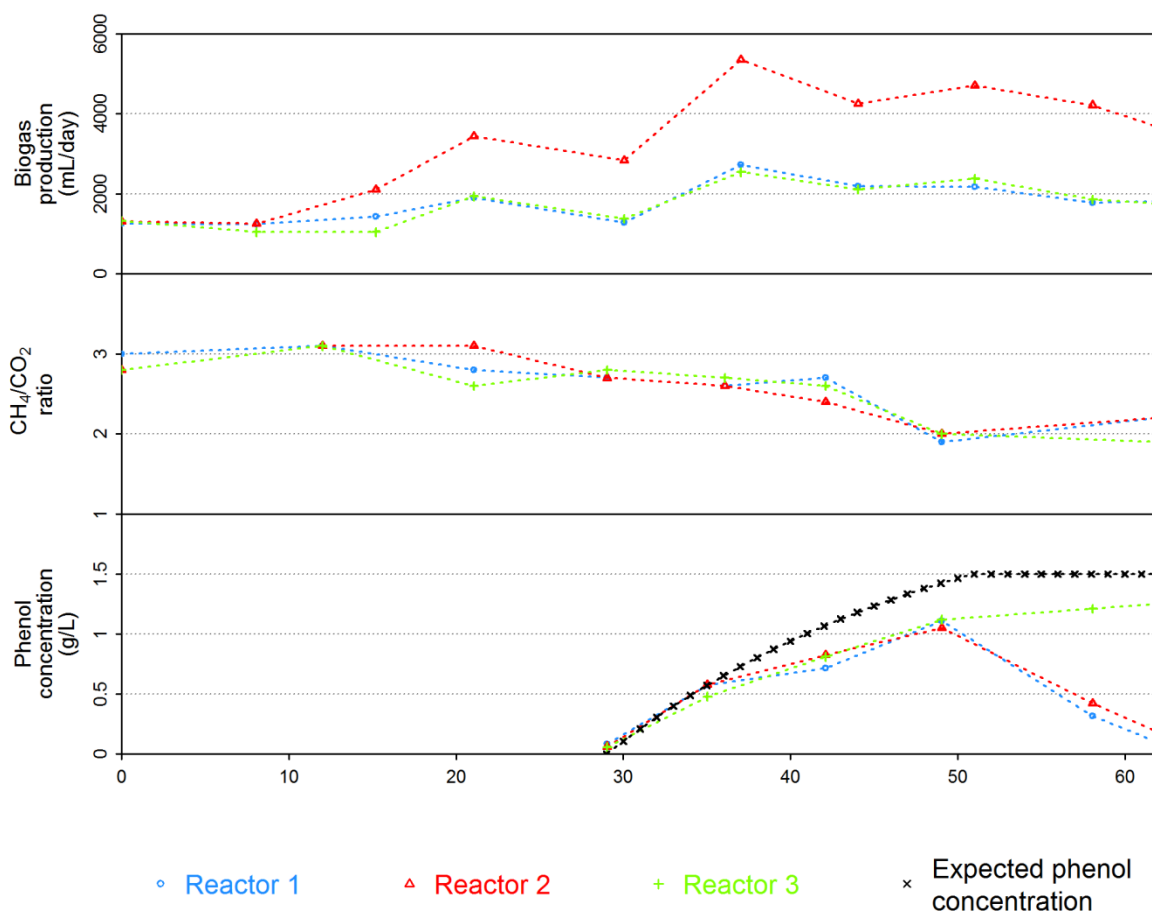


Figure 74 : Reactors performance during time.

(A) Daily biogas production (mL/day), (B) CH_4/CO_2 ratio and (C) phenol concentration (g/L)

Until day 10, biogas production rate was relatively similar between the three reactors. Daily production rate varied between 1045 mL/day and 1326 mL/day over the first two weeks. Surprisingly, after 18 days and until the rest of this experiment, the reactor 2 showed a significantly higher biogas production rate than reactor 1 and reactor 3. In this reactor, it ranged from 2107 mL/day up to 3439 mL/day between day 15 and day 30. By contrast, biogas production rate remained relatively constant in both other reactors, fluctuating between 1044 mL/day and 1937 mL/day over the same period. Nevertheless, although biogas production rates differed, biogas composition dynamics were comparable within the triplicate of reactors. CH_4/CO_2 ratio varied between 2.6 and 3.1 during this period.

After 29 days of stable functioning, phenol was supplemented to feeding solutions. Considering that phenol could not be degraded within the reactors, a final concentration of 1.5 g/L of phenol was expected after 1 HRT, at day 51. We observed that during this period, phenol accumulated in the same range of concentration in the three bioreactors. However, its concentration reached 1.11 g/L, 1.05 g/L and 1.12 g/L in reactor 1, 2 and 3, respectively while it was expected to be circa 1.42 g/L at the same date. Consequently, $23 \pm 3\%$ of the phenol introduced in the reactor was not recovered in the liquid phase. It can be hypothesized that phenol was either partly degraded or adsorbed on solid particles within the reactors. When phenol concentration reached 0.6 g/L at day 37, biogas production rate almost doubled in all reactors while CH_4/CO_2 ratio remained stable. These increases could be partly attributed to the slight phenol degradation occurring throughout this period. But phenol only represented approximately 30 % of the OLR. Therefore, other factors should have contributed to the increase of biogas production. It can be hypothesized that these increases could be due to the inhibitory pressure exerted by phenol towards a fraction of the biomass, which could have led to cell lysis and release of biodegradable organic matter. This organic matter could have been consecutively used by the phenol resistant microbial community remaining in the digester. Important shifts in community composition during that period could support this hypothesis. From day 37 to day 51, phenol concentration increased from 0.6 g/L to 1.1 g/L. Biogas production rate slightly decreased in all reactors but remained higher than in absence of phenol. Nonetheless, contrary to lower phenol concentrations, CH_4/CO_2 ratio dropped down to circa 2.0 indicating that methanogenesis was impaired by this increase of phenol concentration. Interestingly, after 58 days, phenol was importantly degraded within reactors 1 and 2. Phenol concentration dropped down to 0.3 g/L and 0.4 g/L at day 58, and down to 0.1 g/L and 0.2 g/L after 62 days in reactors 1 and 2, respectively. It suggested that phenol degraders within these reactors were able to degrade more phenol than what was contained in the feeding solutions. Moreover, in these reactors, CH_4/CO_2 ratio increased up to 2.2 at day 62 which tended to indicate that methanogenic populations were more active when phenol concentration was lowered. By contrast, no important phenol degradation was recorded in reactor 3. Phenol kept accumulating up to 1.25 g/L. Although biogas production rate was not influenced by this inhibitory level, CH_4/CO_2 ratio remained circa 2.0 contrary to reactors 1 and 2 suggesting that up to 1.25 g/L, methanogenic activity was impaired by increasing phenol concentration.

3.2 Microbiota response

Microbial community dynamics were studied by 16S ribotag sequencing. A total of 292,562 tags were obtained. They were assembled into 1138 and 30 OTUs for Bacteria and Archaea, respectively. Relative abundance of archaeal and bacterial OTUs were used for the analysis. Only OTUs that exceeded 1 % in at least one sample have been taken into account. After this trimming step, 8 archaeal OTUs and 28 bacterial OTUs were conserved for the analysis. Bacterial OTUs relative abundances were aggregated at the family level. A total of 17 bacterial families were obtained. OTUs belonging to the same archaeal genus or to the same bacterial order were represented with the same color palette. Data are summarized in Figure 75 at the OTU level for Archaea and at the family level for Bacteria.

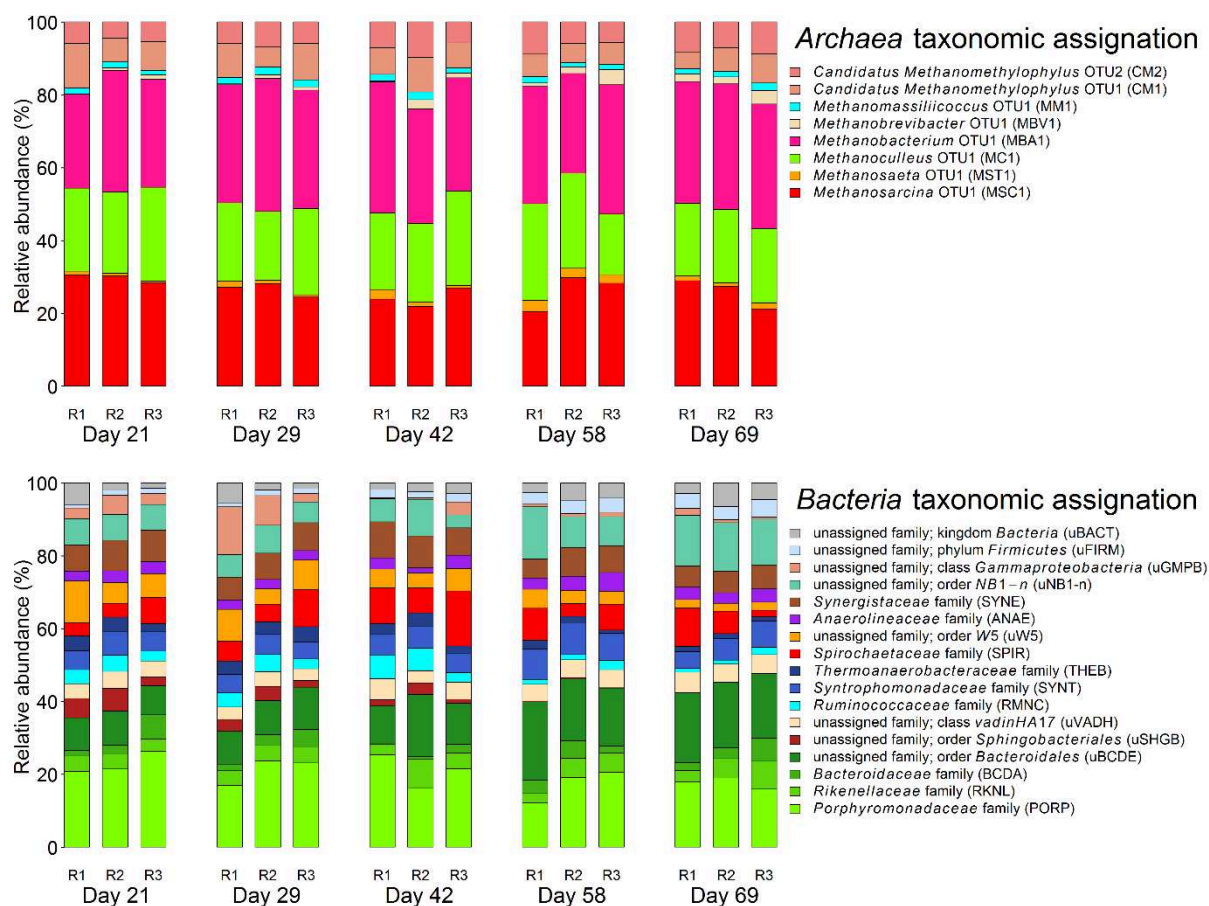


Figure 75 : Relative abundance of the archaeal dominant OTUs and bacterial dominant families

Histogram representation tended to indicate that, even though reactors behaved differently in terms of biogas production and phenol degradation, no major microbial distinction could be easily evidenced.

Methanogenic archaea detected in this triplicate of reactors mainly belonged to three OTUs assigned to genus *Methanosarcina* (MSC1) (20-30 %) genus *Methanoculleus* (MC1) (17-26 %) and genus *Methanobacterium* (MBA1) (26-37 %). Throughout this experiment their total relative abundance remained relatively stable and accounted for more than 76 %. Most of the remaining OTUs were assigned to genus *Candidatus Methanomethylophilus* (CM1 and CM2) which total proportion varied between 13 % and 21 % during time. OTUs belonging to genus *Methanobrevibacter* (MBV1), *Methanomassiliicoccus* (MM1) and *Methanosaeata* (MST1) were also recovered in the three reactors, but their total abundance never exceeded 8 % throughout this experiment.

Bacterial populations within the three reactors were predominated by families belonging to order Bacteroidales regardless phenol addition. Their total abundance remained quite stable throughout the experiment, varying between 32 % and 47 %. Families affiliated to this order were Porphyromonadaceae (PORP), Bacteroidaceae (BCDA), Rikenellaceae (RKNL) and an unassigned family (uBCDE). OTUs belonging to families Synergistaceae (SYNE) Anaerolineaceae (ANAE) and to order vadinHA17 (uVADH) accounted respectively for 5-9 %, 2-5 %, and 3-5 % throughout the experiment and did not seem to be impaired by phenol.

The total proportion of families assigned to class Clostridia such as Ruminococcaceae (RMNC), Syntrophomonadaceae (SYNT) and Thermoanaerobacteraceae (THEB) also remained relatively constant during time, ranging from 8 % to 14 %.

Nevertheless, phenol seemed to inhibit OTUs belonging to Ruminococcaceae (RMNC). Their relative abundance fluctuated between 4 % and 7 % before phenol addition while it dropped below 2 % in presence of this inhibitor. Same trends were observed for families assigned to Porphyromonadaceae (PORP), class Gammaproteobacteria (uGMPB), order Spingobacteriales (uSHGB), and order W5 (uW5).

By contrast, in presence of phenol, the proportion of an unassigned family belonging to order NB1-n (uNB1-n) seemed to be increased. It fluctuated between 12 % and 22 % during the phenol accumulation phase while it ranged from 5 % and 9 % before phenol addition. Moreover, another unassigned family affiliated to order Bacteroidales also took more importance within bacterial community during phenol supplementation by reaching 14 %.

Unfortunately, even at the OTU level, no major modification within the bacterial composition could discriminate reactor 3 within which phenol degradation did not take place significantly.

3.3 Identification of key phylotypes

In order to put forward the observations made with the histogram representation and identify potential key OTUs correlated with reactors performance, two PCAs computed with archaeal and bacterial sequences data are respectively presented in Figure 76 and Figure 77. Within each figure, samples were clustered by reactor. The size of the symbols is correlated to the collection dates: the later the bigger.

3.3.1 Archaea

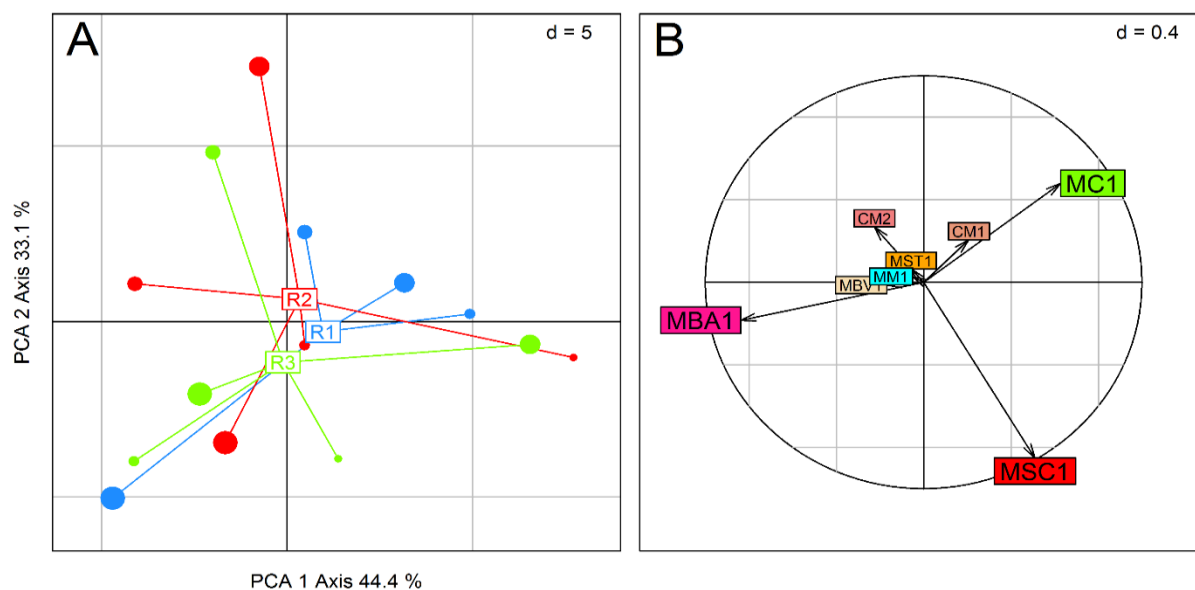


Figure 76 : (A) Principal component analysis of archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing clustered by reactor. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 44.4 % and 33.1 % of the total variance. The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Consistently with observations made on the histogram representation, PCA realized within Domain Archaea showed that the composition of this community during time was similar between the three reactors. Samples distribution was influenced by the three dominant OTUs of the archaeal community. Great dispersion was observed within each reactor. Considering the histogram representation, it suggested that slight variations of these major OTUs had a great influence on sample distribution. Another PCA was also performed with a square root transformation in order to give more importance to minor OTUs. However, these OTUs could not discriminate the reactors. This result suggested that differences in biogas production between reactor 2 and both other reactors could not be related to modifications within the archaeal community. Moreover, it evidenced that this step-wise phenol perturbation up to 1.1 g/L did not significantly influence the composition of the archaeal populations. It corroborated biogas production rates which were relatively constant for each reactor despite phenol supplementation. Moreover, sequencing results also revealed that phenol degradation occurring within reactors 1 ad 2 neither influenced the archaeal community.

Madigou et al., (2016) observed in a semi-continuous reactor degrading cellulose that increasing levels of phenol led to the selection a single OTU belonging to Methanobacterium. Increases of order Methanobacteriales proportion at the expense of order Methanosarcinales in AD bioreactors inhibited by phenol had also been reported by Wirth et al., (2015). However, these shifts were observed while biogas production was highly inhibited. Therefore, our inoculum was able to maintain a constant composition involving populations resisting to this step-wise perturbation and to produce a stable biogas production rate, it can be assumed that this perturbation episode was not sufficient to induce an inhibition.

3.3.2 Bacteria

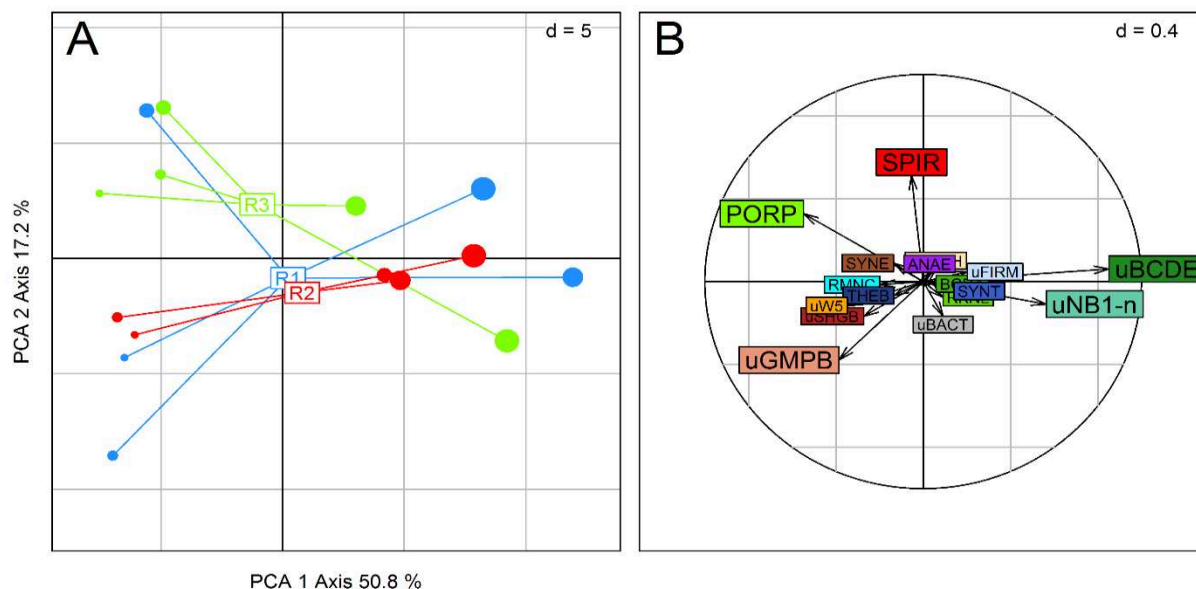


Figure 77 : (A) Principal component analysis of bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing clustered by reactor. The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 50.8 % and 17.2 % of the total variance. The influence of the principal bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

PCA realized with Bacteria showed that samples were mainly distributed along the first axis of the factorial plane. This distribution was strongly correlated with the advancement of the experiment. It also revealed that bacterial populations were more differentiated before phenol addition than during the perturbation episode.

Indeed, samples collected in the early days of the experimentation were recovered on the left part of the factorial plane and highly correlated with the presence of family Porphyromonadaceae (PORP), of an unassigned family belonging to class Gammaproteobacteria (uGMPB) and to minor unassigned families belonging to orders Sphingobacteriales (uSHGB) W5 (uW5) and to families Ruminococcaceae (RMNC), Spirochateaceae (SPIR) and Thermoanaerobacteraceae (THEB). During time, samples progressively clustered on the right part, confirming previous observations made on the histogram representation and suggesting that these populations were inhibited by phenol.

Correlation circle also evidenced the discriminating effect of members of unassigned families belonging to orders Bacteroidales (uBCDE) and NB1-n (uNB1-n) during the phenol perturbation. Madigou et al., (2016) also evidenced that increased phenol resistance was correlated to an increased proportion of OTUs belonging to orders Bacteroidales at the expense of Sphingobacteriales and Clostridiales. Nonetheless, in our study, phenol accumulation did not seem to impair order Clostridiales. To the best of our knowledge, the influence of families belonging to order NB1-n was not evidenced yet.

Surprisingly, all samples collected during the latest days of experiment were tightly clustered while phenol degradation only occurred in reactor 1 and 2. Thus, populations involved in its degradation, which were probably not predominant, could not be clearly evidenced. Since all reactors seemed to follow the same trend, it indicated that phenol probably shaped the bacterial community towards a relatively constant composition which was less diverse than under non-inhibiting conditions.

During this first part of experiment, differences in terms of biogas production and phenol degradation were observed. However, they could not be correlated with modifications within the microbial community. Archaeal populations did not seem to be influenced by this progressive perturbation. By contrast, bacterial composition was significantly influenced by phenol. However, populations involved in phenol degradation could not be evidenced with 16S sequencing. It showed that this technique may not be appropriate to reveal active populations involved in this specific metabolic pathways.

4 Influence of support media addition on the microbial response of semi-continuous reactors inhibited by phenol pulse feedings

4.1 Anaerobic digestion performance

Figure 78 presents the performance of each bioreactor in terms of biogas production rate, and biogas composition for the second episode of the experiment. Contrary to the previous experiment, phenol pulse feedings were applied every week. Consequently, biogas production data were not averaged per week in order to keep a good overview of phenol inhibition on daily reactors performance.

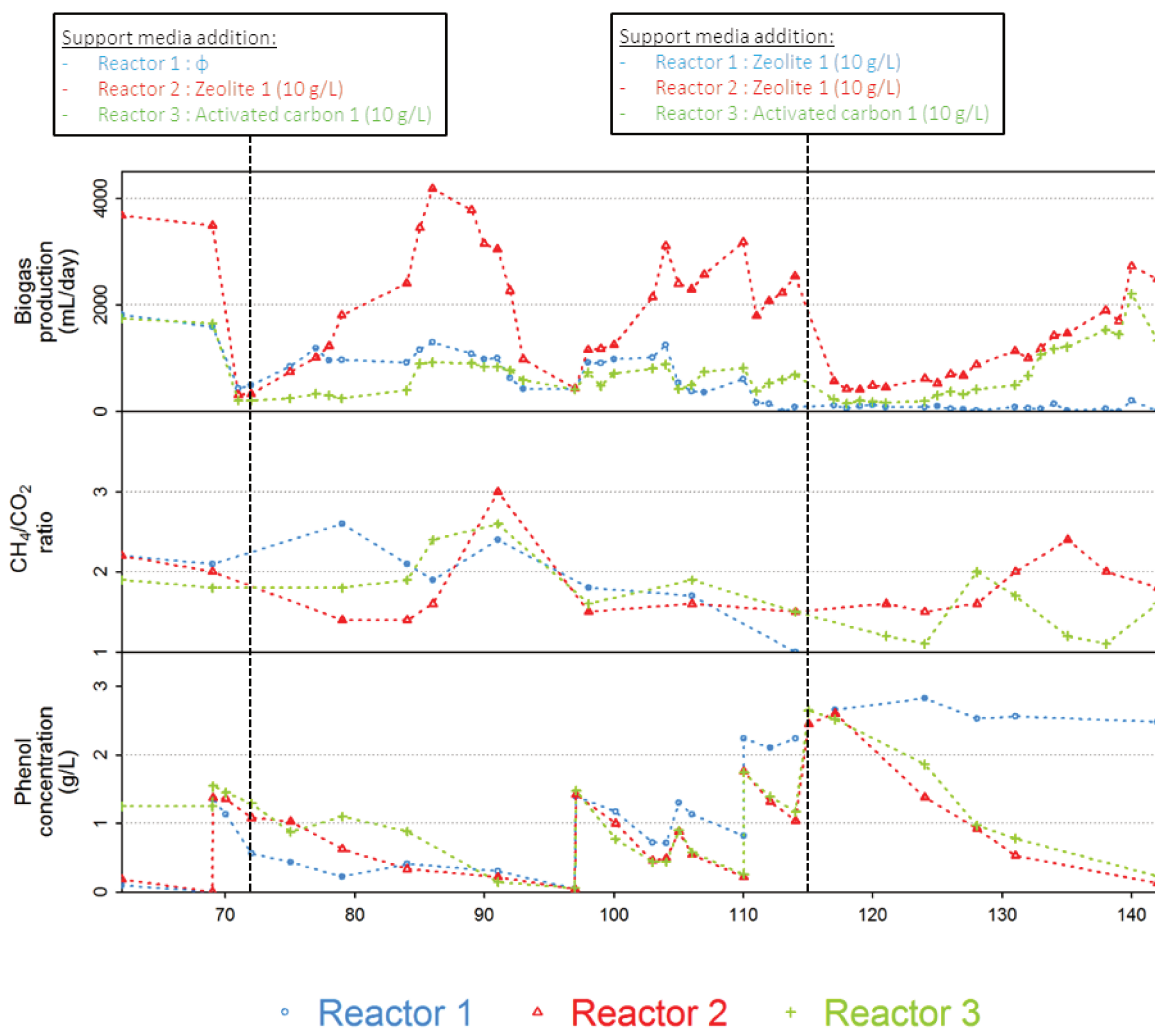


Figure 78 : Reactors performance during time.

(A) Daily biogas production (mL/day), (B) CH₄/CO₂ ratio and (C) phenol concentration (g/L)

4.1.1 Before support media addition

At day 69, phenol concentration was adjusted at 1.5 g/L. Within all reactors, this inhibitory pulse led to a strong inhibition of biogas production rate at day 71 which dropped down to circa 100 mL/day in reactors 2 and 3 and to 343 mL/day in reactor 1. After this pulse, from day 71 to day 79, biogas production rate again increased in reactors 1 and 2, reaching respectively 977 mL/day and 1806 mL/day. This result tended to show that microbial community managed to overcome this inhibition. However, biogas quality highly differed between both reactors. At day 79, while CH₄/CO₂ ratio in reactor 1 increased up to 2.6, it dropped down to 1.4 in reactor 2 suggesting that methanogenesis was more impaired in reactor 2 than in reactor 1. This result was correlated with the different phenol levels in both reactors. At day 79, phenol concentration in reactor 1 was 0.22 g/L while it was circa 0.62 g/L in reactor 2 indicating that, phenol degradation was significantly more efficient in reactor 1 than in reactor 2. By contrast to these two reactors, biogas production remained highly inhibited in reactor 3. It varied between 100 mL/day and 250 mL/day from day 70 to day 79. This inhibition was also strongly correlated to phenol inhibitory pressure which remained superior to 1.0 g/L throughout this period.

4.1.2 After support media addition

Zeolite 1 and activated carbon 1 were respectively added in reactors 2 and 3 at day 84 while reactor 1 was used as a control without support. From day 84 to day 91, biogas production rate was relatively constant within this reactor, varying between 927 mL/day and 1302 mL/day. Phenol concentration remained below 0.4 g/L indicating that this reactor was able to degrade continuously phenol feeding supplemented with the substrate. CH₄/CO₂ ratio was fluctuating between 2.7 and 1.9. Nevertheless, from day 91 to day 97, biogas production rate progressively decreased down to 426 mL/day while CH₄/CO₂ ratio kept varying between 1.8 and 2.4 and phenol concentration reached 0.0 g/L. This result tended to indicate the plateau phase observed in biogas production rate dynamics from day 84 to day 91 was probably linked to the delayed conversion of the high quantity of phenol brought at day 69 into biogas. But once this high quantity of metabolites were completely degraded, it seemed, that selected phenol resistant populations were less efficient in producing biogas than those producing circa 1000-1300 mL/day during the stable functioning phase without phenol (from day 0 to day 29).

Within reactor 2, a strong increase of biogas production rate was observed consecutively to zeolite addition. It reached 4179 mL/day at day 86. But, similarly to reactor 1, this performance indicator also decreased down to 436 mL/day at day 97 corroborating the hypothesis which assumed that this peak of biogas production rate was rather linked to the degradation of the great amount of phenol added at day 69 than to zeolite addition. A peak in CH₄/CO₂ ratio was also observed suggesting an increased methanogenic activity up to day 92. However, it also dropped at day 97 despite phenol concentration was circa 0.0 g/L at this date. Consequently, it seemed that zeolite addition did not have a significant effect on the reactor 2 performance. It can be hypothesized that either this reactor was sufficiently adapted to phenol, or that zeolite did not induce any effect up to this date.

As expected, within reactor 3, activated carbon addition led to a great decrease of phenol concentration. It dropped below 0.2 g/L at day 92 but it can be assumed that this concentration was reached before this date thanks to activated carbon surface properties. Consecutively, biogas production rate increased up to 800 – 900 mL/day from day 85 to day 92. Meanwhile, CH₄/CO₂ ratio also increased up to 2.4 – 2.6. However, similarly to reactors 1 and 2, biogas production rate and CH₄/CO₂ ratio respectively decreased down to 420 mL/day and 1.8 at day 97. Hence, activated carbon alleviated phenol inhibition by reducing its concentration within the reactor, but it did not seem to influence anaerobic digestion performance once phenol was completely adsorbed.

4.1.3 During phenol pulse feedings

From day 97 up to day 114, increasing phenol pulse feedings were regularly performed to induce a strong disruption of the digesters and assess the potential positive effect of the support media previously added on anaerobic digestion performance. Meanwhile, feeding solutions also contained 5.0 g/L of phenol.

During, the first phenol pulse feeding, 1.5 g/L of phenol was directly introduced within each reactor at day 97. Until day 104, phenol concentration similarly decreased within reactors 2 and 3 down to 0.5 g/L while its concentration remained circa 0.7 g/L in reactor 1. However, at this date, biogas production rate increased in all reactors up -to 1250 mL/day, 3105 mL/day and 887 mL/day in reactors 1, 2 and 3 respectively.

A second pulse of 0.5 g/L of phenol at day 105 led to a partial inhibition of reactor 1. Its biogas production rate decreased down to 612 mL/day at day 110. Moreover, phenol degradation was also partly inhibited since phenol concentration only reached 0.8 g/L at day 110. By contrast, biogas production rate of reactor 2 and 3 remained stable relatively stable. At day 110, they respectively reached 3127 mL/day and 823 mL/day while phenol concentration decreased down to 0.5 g/L in both reactors. This result suggested that both support media had a positive effect on anaerobic digestion performance by limiting phenol concentration within reactors. CH₄/CO₂ ratio remained circa 1.9-1.6 in all reactors.

A third pulse of 2.0 g/L of phenol at day 110 led to phenol concentration of 2.2 g/L which induced a complete disruption of reactor 1 at day 113. CH₄/CO₂ ratio was close to 0 indicating that methanogenesis was totally blocked. Nevertheless, CO₂ was still produced since biogas production rate remained circa 50-100 mL/day. Consecutively, phenol accumulated until day 117. At his date, phenol was no longer supplemented in the feeding solution and 10 g/L of zeolite 1 were introduced in order to counteract phenol inhibition. But this attempt aborted suggesting that once methanogenic populations were inhibited, zeolite could not help to recover CH₄ production at least during the next 35 days.

Within reactors 2 and 3 the third phenol pulse led to final concentrations of 1.8 g/L. However, after only 4 days, phenol concentration declined down to 1.0 and 1.1 g/L, respectively while biogas production rates increased in both reactors. Therefore, 1.5 g/L of phenol was newly introduced in both reactors during a fourth pulse at day 114. Final concentrations reached circa 2.5 g/L. This last pulse induced a strong inhibition of biogas production rate in both reactors which dropped respectively to 573 mL/day and 235 mL/day at day 117. Nonetheless, despite the different pulses, CH₄/CO₂ ratio remained stable circa 1.7 in

reactor 2 while it decreased down to 1.1 in reactor 3. Therefore, it can be assumed that zeolite 1 seemed to better preserved methanogenesis than activated carbon 1.

However, a second addition of support was performed at day 117 to avoid a complete disruption of these reactors. 10 g/L of zeolite 1 and activated carbon 1 were respectively introduced in reactors 2 and 3. Consecutively to these additions, phenol degradation occurred and biogas production rates progressively increased. It reached 2024 mL/day in reactor 2 and 1547 mL/day in reactor 3 confirming that these support media had a positive influence on anaerobic digestion.

4.2 Microbiota response

Microbial community dynamics were studied by 16S ribotag sequencing. A total of 322,442 tags were obtained. They were assembled into 1138 and 30 OTUs for Bacteria and Archaea, respectively. Relative abundance of archaeal and bacterial OTUs were used for the analysis. Only OTUs that exceeded 1 % in at least one sample have been taken into account. After this trimming step, 10 archaeal OTUs and 26 bacterial OTUs were conserved for the analysis. Bacterial OTUs relative abundances were aggregated at the family level. A total of 18 bacterial families were obtained. OTUs belonging to the same archaeal genus or to the same bacterial order were represented with the same color palette. Data are summarized in Figure 79 at the OTU level for Archaea and at the family level for Bacteria.

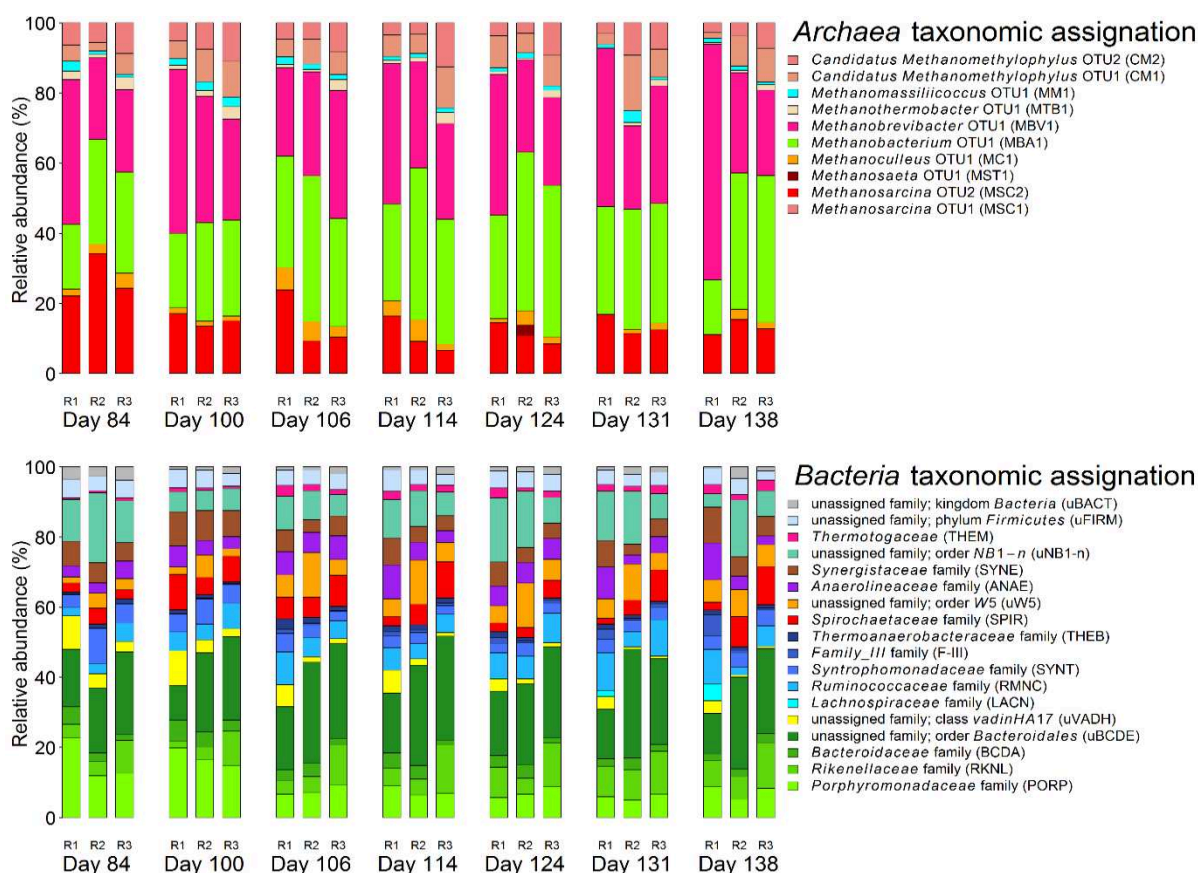


Figure 79: Relative abundance of the archaeal dominant OTUs and bacterial dominant families.

Histogram representation tended to indicate that, even though reactors behaved differently in terms of biogas production and phenol degradation, it was difficult to evidence clear modifications of microbial composition induced by supports or by phenol pulse feedings.

Similarly to the first experiment conducted with the semi-continuous reactors and presented from page 222, the same three major archaeal OTUs assigned to genus *Methanosarcina* (MSC1), genus *Methanoculleus* (MC1) and genus *Methanobacterium* (MBA1) were recovered throughout this experiment. It seemed that the phenol pulse feeding performed at day 97 clearly inhibited *Methanosarcina* OTU1 (MSC1) for which the proportion dropped from 22-34 % to 8-16 % until the end of the experiment. The absence of support also seemed to limit the abundance of *Methanosarcina* OTU1 (MSC1), and *Methanoculleus* OTU1 (MC1) while *Methanobacterium* OTU1 (MBA1) took more importance within the archaeal community. Indeed, in reactor 1, its proportion increased from 40 % up to 67 % when biogas production was totally inhibited while it remained between 23 % and 33 % in both other reactors. Minor OTUs were also progressively impaired by phenol when biogas production was inhibited from day. Their total proportion dropped from 12-18 % down to 7 % at day 131 and to 6 % at day 138 while it fluctuated between 20 % and 30 % in presence of support media in reactors 2 and 3 at the same dates. *Methanosaeta* OTU1 (MST1) was not even detectable within reactor 1 after day 131 while its proportion remained circa 2-3 % in both other reactors. This observation evidenced that *Methanobacterium* OTU1 (MBA1) seemed to be resistant to phenol as previously described by Madigou et al., (2016). However, in our case, its presence did not lead to biogas production. It can be hypothesized that this OTU became predominant when inhibited populations were washed out.

Bacterial populations within the three reactors were predominated by families belonging to order Bacteroidales regardless phenol and support additions. Their total abundance remained quite stable throughout the experiment, varying between 30 % and 50 %. Families affiliated to this order were Porphyromonadaceae (PORP), Bacteroidaceae (BCDA), Rikenellaceae (RKNL) and an unassigned family (uBCDE). OTUs belonging to families Synergistaceae (SYNE) Anaerolinaceae (ANAE) and to order vadinHA17 (uVADH) accounted respectively for 4 - 10 %, 3 - 11 %, and 2 – 10 % throughout the experiment and did not seem to be impaired neither by phenol nor by support additions. The total proportion of families assigned to class Clostridia such as Ruminococcaceae (RMNC), Syntrophomonadaceae (SYNT) and Thermoanaerobacteraceae (THEB) also remained relatively constant during time, ranging from 8 % to 15 %. However, once reactor 1 was inhibited, order Clostridiales relative abundance reached 19 % and 25 % at day 110 and day 117, respectively. During this period, the proportion of an unassigned family belonging to order NB1-n (uNB1-n) decreased below 4 % while it remained above 10 % in other reactors.

4.3 Identification of key phylotypes

In order to put forward the observations made with the histogram representation and identify potential key OTUs, two PCAs computed with archaeal and bacterial sequences data are respectively presented in Figure 80 and Figure 82. OTUs relative abundances were transformed with a square root transformation in order to give more importance to minor

OTUs before being statistically analyzed with centered not scaled principal component analyses (PCA). The size of the symbols is correlated to the collection dates: the later the bigger

4.3.1 Archaea

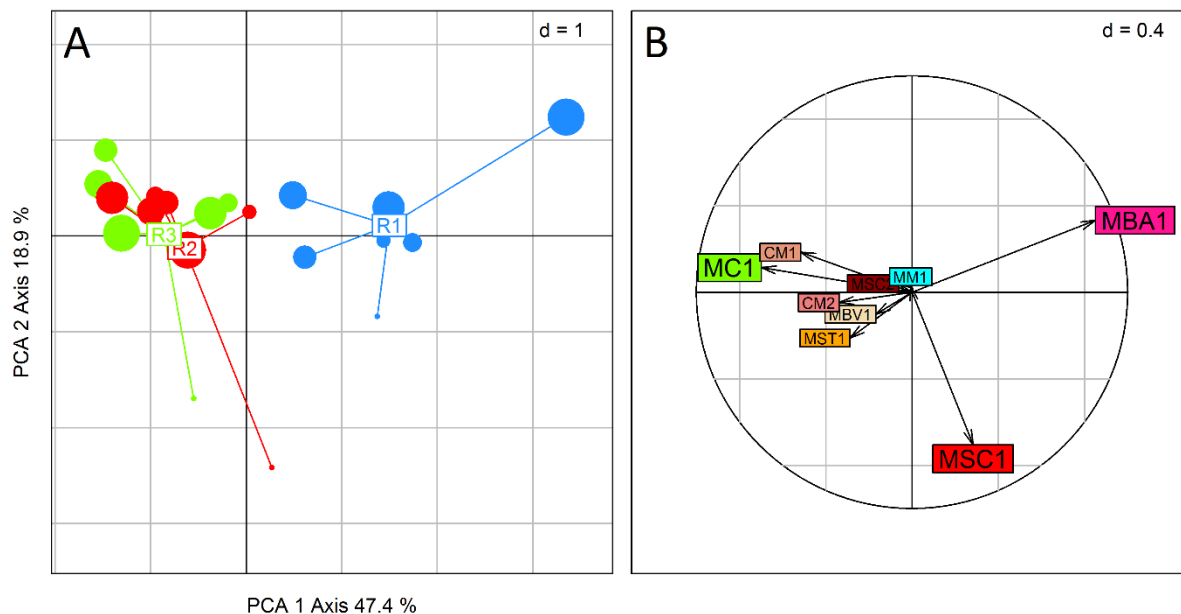


Figure 80 : Principal component analysis of archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 68.9 % and 20.5 % of the total variance. The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Analysis realized with Archaea showed that samples were mainly distributed on the first axis of the factorial plane. Nevertheless samples collected at day 84, before the first phenol pulse feeding performed at day 97 were highly correlated with the presence of Methanosarcina OTU1 (MSC1). This OTU was not discriminant after day 97 which suggested that after this date, Methanosarcina OTU1 (MSC1) no longer played a key role in the sample distribution. Since its proportion remained lower than before this inhibitory pulse, it can be hypothesized that when phenol concentration had reached a certain concentration, this OTU was partially inhibited and never managed to reach again its former proportion within the microbiota. While all reactors were not differentiated during the first part of the experiment, this PCA suggested distinct archaeal compositions between the three reactors. Most discriminated samples belonged to reactor R1. Their position within the factorial plane was highly correlated with the presence of Methanobacterium OTU1 (MBA1). By contrast, samples collected in reactors 2 and 3 were tightly clustered and mainly related to Methanoculleus OTU1 (MC1) and most of the minor OTUs. This distribution tended to indicate that within reactors which could still produce CH₄ despite phenol pulse feeding, Methanoculleus OTU1 (MC1) and remaining minor OTUs were probably preserved. Consequently, it also suggested that zeolite and activated carbon additions had a positive effect on their growth. It can be hypothesized that the preservation of this diversity within archaeal community allowed the maintenance of efficient anaerobic digestion.

In order to assess if zeolite 1 and activated carbon 1 had distinct effects on archaeal populations, another PCA was performed without samples collected in reactor 1. Moreover, samples collected before day 97 were also discarded in order to avoid the discriminating effect of Methanosarcina OTU1 (MSC1). This PCA and its associated correlation circle are presented in Figure 81.

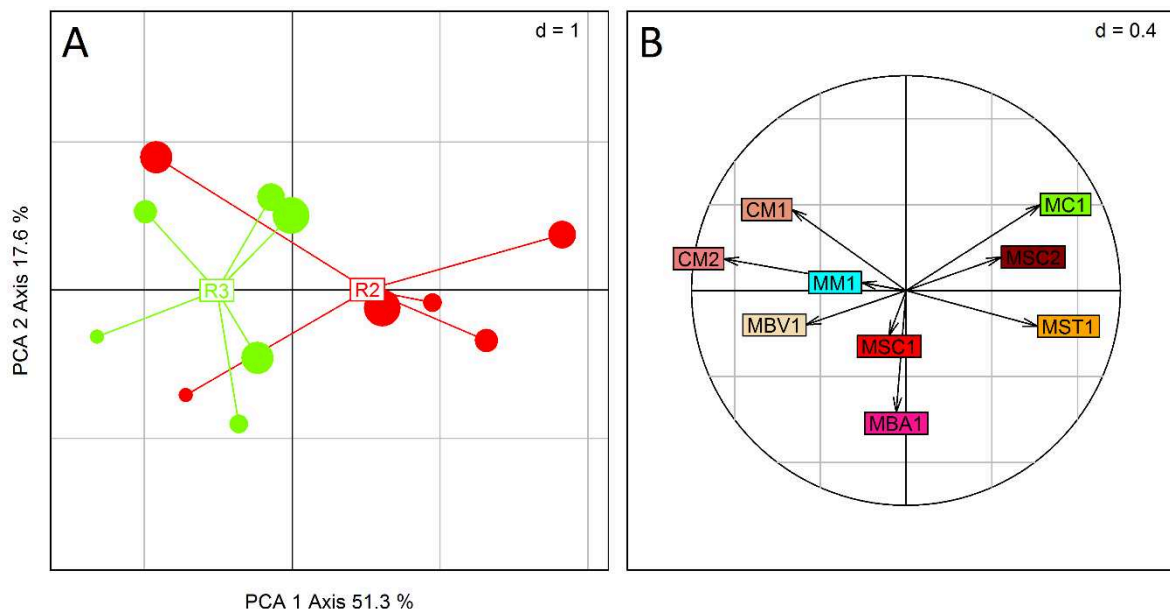


Figure 81 : Principal component analysis of archaeal OTUs generated by 16S rRNA gene sequencing (A) in presence of support media .The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 51.3 % and 17.6 % of the total variance. The influence of the principal archaeal OTUs on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Figure 81 seemed to evidence differences between reactor 2 and reactor 3 archaeal compositions suggesting that zeolite 1 and activated carbon 1 had distinct effects on the composition of archaeal populations. Most of the samples collected in reactor 2 were clustered on the right part of the factorial plane and correlated with Methanoculleus OTU1 (MC1), Methanosaeta OTU1 (MST1) and Methanosarcina OTU2 (MSC2). By contrast, samples collected in reactor 3 were recovered in the left part of the factorial plane and mainly related to OTUs assigned to Candidatus Methanomethylophilus (CM1 and CM2), and to Methanobrevibacter OTU1 (MBV1). However, archaeal composition of two samples collected in reactor 2 was similar to the one observed in reactor 3. Consequently it seemed that both support media differentiated influences on archaeal composition, but these modifications tended to be so slight that they could not be evidenced for the totality of the samples. This observation can be linked to the small amount of sequences (400-700) obtained for Archaea.

4.3.2 Bacteria

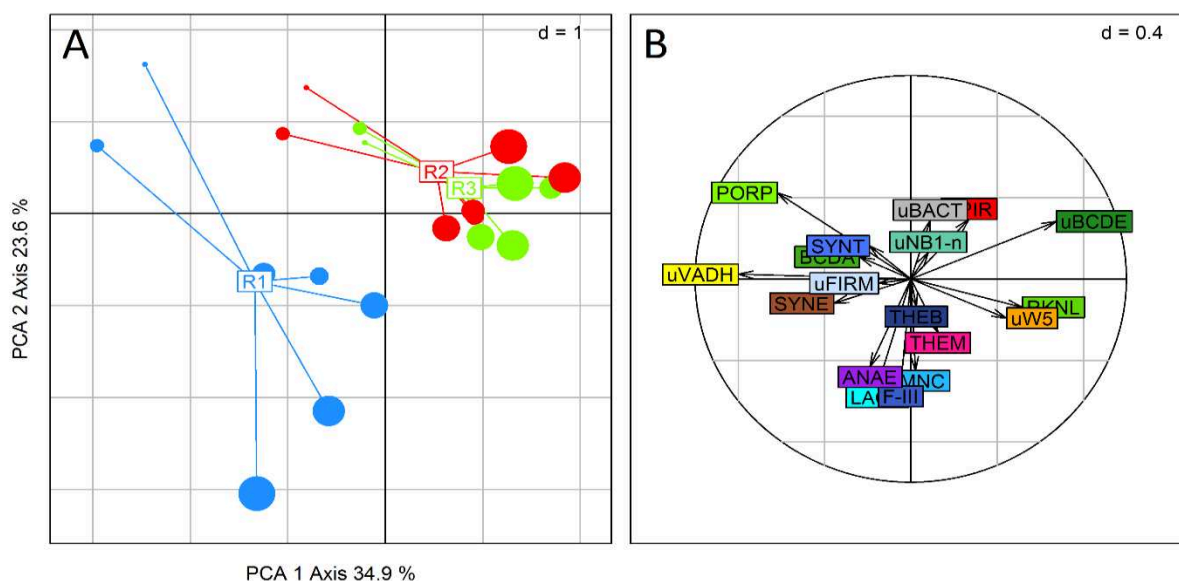


Figure 82 : Principal component analysis of bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 34.9 % and 23.6 % of the total variance. The influence of the principal bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

PCA performed with Bacteria evidenced that support media influenced bacterial community composition. Samples collected in reactor 1, within which no support was added up to day 117, were clearly apart on the PCA factorial plane from samples collected in reactors 2 and 3. Moreover, within each reactor, the advancement of the experiment also had a significant effect on sample distribution. Within reactors 2 and 3, this influence was correlated to the first principal axis.

Firstly, it seemed that phenol concentration adjustment performed at day 69 led to differentiated bacterial communities within all digesters between day 69 and day 84. Samples collected in reactor 1 within which phenol was more quickly degraded than in both other reactors were strongly linked to the presence of family Porphyromonadaceae (PORP) and an unassigned family belonging to order VadinHA17 (uVADH). During time, increased phenol concentration within all reactors led to the partial inhibition of these families and to other minor families such as Synergistales (SYNE) or Syntrophomonadaceae (SYNT).

In absence of support, phenol pulse feedings led to the emergence of several families belonging to order Clostridiales such as Ruminococcaceae (RMNC), Lachnospiraceae (LACN) and Family XIII (F-XIII) but also of families Anaerolinaceae (ANAE) and Thermotogaceae (THEM). Samples collected in the latest days of experiment during which biogas production rate was completely inhibited were highly correlated with these latter bacterial populations. It confirmed the observation previously made which indicated that families belonging to order Clostridiales took more importance within the bacterial community. Families belonging to this order had already been described as phenol tolerant. It can be assumed that they managed to overcome the phenol inhibition and take part in anaerobic digestion despite this increasing inhibition.

By contrast, bacterial community composition within reactors 2 and 3 seemed to be highly similar and correlated to the presence of families such as Spirochaetaceae (SPIR), Rikenellaceae (RKNL), and to unassigned families belonging to orders W5, NB1-n and Bacteroidales (uW5, uNB1-n and uBCDE). The presence of zeolite 1 and activated carbon 1 seemed to preserve these populations. Both latter unassigned families were also discriminant in Figure 77 indicating that they were probably tolerant to phenol. The second part of the experiment also revealed that above a certain phenol inhibitory concentration, both support media led to their preservation within the reactors 2 and 3. However, their role within the bacterial community remained unclear. It can be hypothesized that they had an influence on biogas production and could be involved in syntrophic interactions with Archaea which led to the maintenance of biogas production.

In order to assess if zeolite 1 and activated carbon 1 had distinct effects on bacterial populations, another PCA was performed without samples collected in reactor 1. Moreover, samples collected before day 97 were also discarded in order to avoid the discriminating effect of family Porphyromonadaceae (PORP) and the unassigned family belonging to order VadinHA17 (uVADH). This PCA and its associated correlation circle are presented in Figure 83.

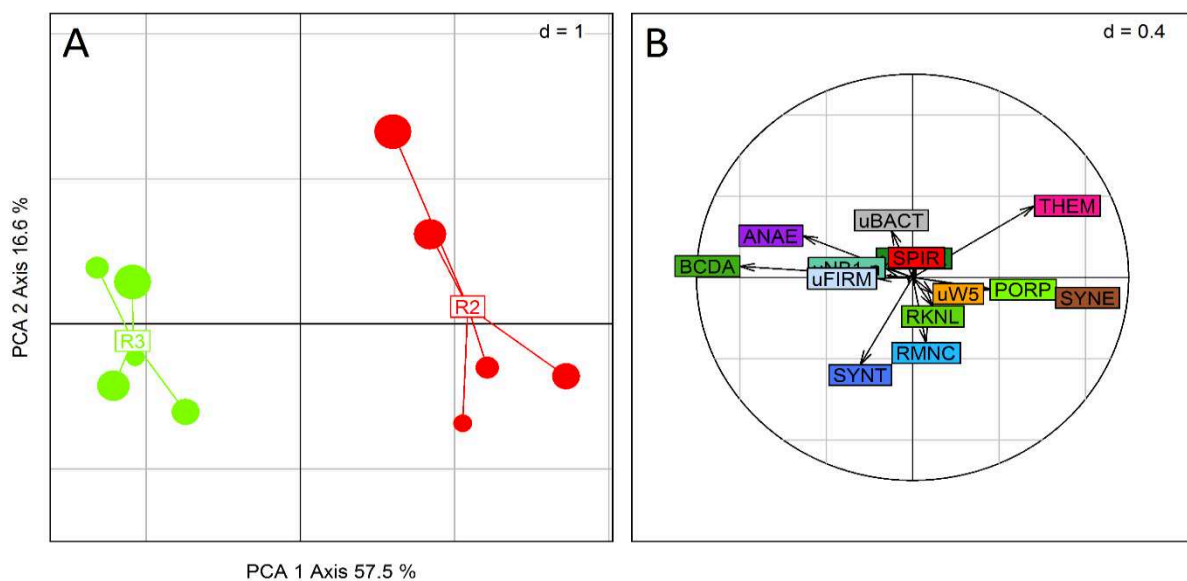


Figure 83 : Principal component analysis of bacterial families generated by 16S rRNA gene sequencing (A). The first and second axes of the PCA provided the clearest distribution with respectively 57.5 % and 16.6 % of the total variance. The influence of the principal bacterial families on the PCA is shown with the arrows in the correlation circle (B).

Sample distribution tended to show that both support had distinct effects on bacterial populations. Samples collected in reactor 2 in presence of zeolite 1 were related to the presence of families assigned to Thermotogaceae (THEM), Synergistaceae (SYNE) and Porphyromonadaceae (PORP). By contrast, samples collected in reactor 3 in presence of activated carbon 1 were more correlated with families affiliated to Bacteroidaceae (BCDA) and Anaerolinaceae (ANAE). The role of the different populations within the bacterial community remains unclear. But this analysis clearly indicated that both supports could lead to different microbiota showing comparable responses to phenol inhibition. This result confirmed the high functional redundancy within bacterial populations.

5 General discussion on the experiment conducted with semi-continuous digesters

In the first part of this chapter, three semi-continuous reactors faced an identical perturbation episode by phenol. The objective was to progressively increase the concentration within all reactors so as to reach a concentration of 1.5 g/L of phenol after 1 HRT. The digesters responses were assessed in terms of degradation performance (biogas production rate, biogas quality and phenol degradation) but also in terms of microbial community composition dynamics. However, even before the perturbation episode, all digesters showed different biogas production rates. Although degradation performances were not similar from one reactor to another, 16S sequencing results did not reveal any major difference within archaeal and bacterial communities. This result tended to indicate that the uncertainty linked to 16S rRNA sequencing and to its analysis could not allow us to evidence slight modifications within the microbiota. During the phenol perturbation episode, digesters still produced biogas but with a lower proportion of CH₄. Nevertheless, archaeal populations did not seem to be impaired while bacterial community seemed to evolve towards a more stable composition. This result was also surprising since phenol degradation only occurred in two reactors. Unfortunately, similarly to previous observations, populations involved in this degradation could not be evidenced by 16S rRNA sequencing.

In our previous study conducted in batch digesters and presented from page 131, methanogenic function was maintained along with increasing initial phenol concentrations thanks to the emergence of genus *Methanoculleus* at the expense of *Methanosarcina*. Moreover, within syntrophic populations, family Syntrophomonadaceae proportion was gradually reduced by phenol while family Synergistaceae and Porphyromonadaceae gained in importance in the microbiome. These adaptation patterns were no longer evidenced in semi-continuous reactors. This was mainly attributed to two reasons. First able, we decided to study the effect of a progressive inhibition of phenol on the performance of continuous reactors in order to avoid their complete disruption. Consequently, phenol concentration was progressively increased by 0.1 g/L/day whereas during the batch experiment microbial community had to adapt to an initial inhibitory concentration which strongly shaped the microbiota. Inhibition was thus less stressful towards microbial populations which had more time to adapt to increasing inhibitory levels. Hence, it evidenced the fact that the inhibition kinetics has a strong influence on the microbiota composition. Secondly, the set-up of continuous reactors induced daily biomass introduction consecutive to non-sterile substrate addition but also daily biomass washout to maintain the volume stable within the reactor. Consequently, microbial populations did not grow in the same conditions as in batch reactors. The initial inoculum significantly evolved even before the perturbation to reach a stable composition which was highly different from the inoculum used in batch experiments which was dominated by *Methanolinea*, *Methanosarcina* and *Lactobacillus*. Within semi-continuous digesters, *Methanolinea* was not even detected while *Methanobacterium* and *Methanoculleus* were more abundant than *Methanosarcina*. Bacterial populations were more diverse and dominated by order Bacteroidales.

During the second part of this chapter, the influence of zeolite 1 and activated carbon 1 on microbial community composition and performance were assessed. Phenol pulse feedings were regularly applied to reach strong disruption of biogas production and not to let the time to the biomass to adapt. Interestingly, both supports increased the phenol resistance threshold of the microbiota. Moreover, they both had a significant and specific influence on archaeal and bacterial populations. The archaeal community was relatively similar in presence of zeolite 1 or activated carbon 1 but bacterial populations were differently shaped by these supports. Another promising result indicated that, contrary to previous experiments conducted in batch digesters, zeolite 1 had a similar influence to activated carbon 1. Both support media led to identical phenol degradation dynamics. However, it could be assumed that, after a certain period, activated carbon was probably saturated by phenol and could not adsorb the continuous income of this inhibitor within the digester. Therefore, since after this period both supports did not influence the concentration of the inhibitor, it suggested that they might have a positive impact on phenol degrading populations. Statistical analyses revealed that they both allowed the preservation of minor populations which were initially present in the reactors. It can be hypothesized that they potentially played a role as support, aggregating and protecting the biomass. Nevertheless, microscopic observations should have been made to confirm this hypothesis.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La thématique de recherche développée au cours de cette thèse visait à proposer de nouvelles stratégies opératoires de gestion des digesteurs anaérobies confrontés à l'arrivée de composés inhibiteurs. Ce chapitre est donc l'occasion de discuter de la pertinence et des limites de la démarche expérimentale et des résultats obtenus. Il permettra également de fournir des perspectives de recherche portant notamment sur l'identification d'indicateurs microbiens de la digestion anaérobie, sur l'utilisation de supports actifs dans ce type de bioprocédé, et sur leur transposition à l'échelle industrielle.

1 Pertinence et limites de la démarche expérimentale

1.1 Système d'étude

1.1.1 Inoculum et substrat

L'étude de la digestion anaérobie à l'aide de réacteurs de laboratoire entraîne nécessairement des choix expérimentaux. Il convient dès lors de s'interroger sur l'influence de ces choix sur les résultats obtenus et, par voie de conséquence, sur le caractère générique ou au contraire très particulier des conclusions issues de notre étude.

Le choix de l'inoculum en particulier est important. Les inocula utilisés ont été prélevés sur le même digesteur anaérobie traitant des boues de station d'épuration. Bien qu'ils ne soient pas représentatifs de l'ensemble des digesteurs anaérobies, nous avons fait le choix de travailler avec des inocula frais et contenant une quantité importante de micro-organismes actifs et une diversité (richesse) importante. L'objectif était alors de disposer d'un écosystème complexe composé d'une communauté ayant développé un réseau d'interactions écologiques et de se rapprocher d'une communauté telle qu'usuellement rencontrée dans les installations industrielles. Toutefois, il faut souligner que les deux prélèvements d'inocula ont été réalisés à un an d'intervalle exactement au même endroit. Bien que leur composition respective ait été relativement semblable, il a été constaté que dans des conditions opératoires identiques, leur dynamique d'évolution ainsi que leurs performances macroscopiques pouvaient varier. Cette observation a donc permis de mieux appréhender le degré d'influence de l'inoculum sur les résultats obtenus au cours de cette étude.

Un autre choix expérimental pouvant potentiellement avoir une forte influence sur la nature et la portée des conclusions obtenues est celui du choix du substrat. Il a été considéré a priori que la variabilité du substrat était de nature à induire une variabilité expérimentale telle qu'elle pourrait potentiellement masquer l'influence des facteurs (inhibiteurs) que l'on souhaitait étudier. Toutefois, nous souhaitions conserver un substrat présentant une bonne représentativité. Ainsi, le substrat sélectionné pour cette étude est un substrat industriel qui a été prélevé lors d'une seule campagne d'échantillonnage, ceci afin de disposer d'un stock suffisamment important pour assurer l'ensemble des expérimentations et de conserver une bonne reproductibilité. En effet, contrairement à l'inoculum, et même s'il contient des micro-organismes, il a été considéré que la congélation du biodéchet n'altérerait pas ou peu sa composition en tant que substrat. 300 L de substrat ont ainsi été récupérés sur une unité industrielle produisant un biodéchet à partir du déconditionnement de rebus issus d'industries agroalimentaires ou de restauration collective. Ce biodéchet était destiné à l'alimentation d'unités de méthanisation industrielles. Les raisons justifiant de travailler avec un déchet complexe rejoignent celles évoquées lors du choix de l'inoculum. Nous avons voulu utiliser des matrices issues de systèmes industriels afin de maximiser la représentativité de notre étude.

1.1.2 Inhibiteurs

Paramètre majeur de notre étude, le choix des inhibiteurs a été l'objet d'une étude bibliographique et d'une réflexion au démarrage de la thèse. Nous avons finalement choisi de focaliser notre étude sur l'effet de deux molécules inhibitrices : l'azote ammoniacal et le phénol. Ces dernières sont régulièrement mises en cause lors de dysfonctionnements de digesteurs anaérobies industriels. Le choix de ces deux perturbateurs nous permettait d'obtenir deux types d'inhibition, les plus variés possibles. Le phénol est un composé organique mono-aromatique dégradable, en conditions anaérobie alors que l'azote ammoniacal n'est pas métabolisé en l'absence d'oxygène et s'accumule donc dans les digesteurs. En présence de phénol, le niveau d'inhibition est donc amené à fluctuer en fonction de la capacité de dégradation de la biomasse. La diminution de la concentration en phénol dans les différentes incubations permet en outre d'évaluer un type de résilience particulière de l'écosystème, qu'on pourrait qualifier de "résilience adaptative" : une capacité de l'écosystème à surmonter le phénomène d'inhibition en dégradant l'inhibiteur. Ainsi, l'émergence de groupes fonctionnels particuliers, capables d'initier la dégradation de l'inhibiteur pourrait dans ce cas être à l'origine de la résilience, et permettre au reste de la communauté de reprendre son activité. En revanche, l'azote ammoniacal exerce une pression inhibitrice a priori continue lors des incubations. L'adaptation de la biomasse à ce type d'inhibition ne peut pas provenir d'une modification de la concentration en inhibiteur. Elle nécessite donc une adaptation des groupes fonctionnels en place à la pression de sélection imposée par l'inhibiteur.

1.1.3 Supports actifs

Une grande variété de supports est mise en œuvre à l'échelle industrielle dans de nombreux bioprocédés d'épuration des eaux ou des déchets. Ces supports visent principalement à augmenter la teneur en micro-organismes des réacteurs tout en permettant une structuration spatiale de la biomasse. Toutefois, outre de rôle de substratum pour l'adhésion et la croissance des micro-organismes, il a été montré que la nature et les caractéristiques du support peuvent avoir une importance significative (Habouzit 2010).

Notre choix s'est focalisé sur le charbon actif et la zéolithe pour leurs capacités à ne pas simplement fixer la biomasse mais également à influencer sur la concentration en inhibiteur dans le milieu réactionnel. De plus, des études récentes ont également indiqué que la présence de charbon actif, en augmentant la conductivité électrique du milieu, pouvait favoriser les échanges électroniques et les interactions entre micro-organismes.

Par ailleurs, afin d'évaluer si les propriétés intrinsèques d'un même type de support pouvaient également avoir une influence sur leur efficacité, nous avons décidé de comparer deux charbons actifs et deux zéolithes. Le chitosane a quant à lui été testé en tant que support potentiellement biodégradable. Les caractéristiques physico-chimiques propres à chacun de ces supports nous permettaient donc d'essayer d'évaluer l'influence relative de la simple présence d'un support per se, en tant que substratum pour l'adhésion et ma croissance de la biomasse, de celle de l'influence de la nature du support utilisé.

Certains de ces supports ont déjà été mis en œuvre dans des digesteurs anaérobies à lit fluidisé pour des applications spécifiques. Par exemple, le charbon actif adsorbe efficacement

certaines molécules organiques telles que le phénol. Les zéolithes sont quant à elles capables de réduire la concentration en azote ammoniacal dans le milieu par échange cationique. Une des nouveautés apportées par cette étude résidait dans le fait d'élargir le champ d'application de ces supports à d'autres types d'inhibition en s'affranchissant de leurs propriétés physico-chimiques connues.

Enfin, la concentration et la granulométrie de chacun des supports ont été fixées à l'aide d'une étude bibliographique. Cependant, il a été constaté que les études recensées définissaient arbitrairement ces paramètres sans prendre en considération les caractéristiques intrinsèques des supports telles que la surface active, la conductivité, ou encore la concentration en inhibiteur à éliminer. Des améliorations auraient ainsi pu être apportées en uniformisant, par exemple, lors de l'ajout de chaque support, la quantité de surface active disponible pour les micro-organismes.

1.1.4 Digesteurs batchs et semi-continus

Le type de réacteur et leur mode de conduite peuvent avoir une influence majeure sur la réponse des écosystèmes microbiens. C'est pourquoi, la démarche expérimentale développée au cours de cette thèse couplait une approche en digesteurs batchs et en digesteurs semi-continus. Les digesteurs batchs ont été utilisés en première approche afin de dessiner les contours des expérimentations menées en digesteurs semi-continus. Ainsi, les premières séries d'incubations ont permis de caractériser le niveau médian de résistance de l'inoculum face aux inhibiteurs et de déterminer quels supports présentaient les meilleures potentialités pour lutter contre ces inhibitions. Cependant, les propriétés inhérentes à chacun de ces deux systèmes d'étude induisent de nombreux biais méthodologiques qui limitent la comparaison des résultats qu'ils fournissent. Notamment, les conditions de croissance des micro-organismes sont radicalement différentes d'un système à l'autre.

Les digesteurs batchs, moins coûteux et plus faciles à mettre en œuvre, présentent l'avantage de permettre la réalisation d'un grand nombre d'incubations en parallèle. Leur fonctionnement « fermé » permet également de fixer des conditions opératoires plus stringentes que les systèmes dits « ouverts ». Ce milieu non renouvelé induit donc une croissance microbienne « finie » qui se termine lors de l'épuisement du substrat. Les populations ne participant pas ou plus à la dégradation du déchet ne sont pas éliminées et sont donc susceptibles d'être détectées lors d'analyses de biologie moléculaire.

Les réacteurs semi-continus se rapprochent quant à eux du fonctionnement des unités industrielles car ils permettent notamment un renouvellement constant du milieu réactionnel et de sa biomasse. D'une part, l'utilisation de substrat non stérile implique une arrivée constante de micro-organismes qui influent sur la composition de l'écosystème du digesteur. Par ailleurs, ce type de fonctionnement nécessite des opérations de soutirage ou de surverse afin de conserver un volume de travail constant au sein du digesteur. Une partie de la biomasse est alors continuellement lessivée. Les populations se maintenant au sein des digesteurs doivent donc être capables de se développer dans ces conditions hydrodynamiques. De fait, on peut considérer que la biomasse présente au sein d'un digesteur en fonctionnement stable participe de manière plus ou moins directe au processus de digestion anaérobie. Cependant, ces bioréacteurs modèles simplifient encore fortement le fonctionnement des

digesteurs industriels. En effet, la géométrie, les conditions de mélange et donc l'hydrodynamique des réacteurs de laboratoire ne correspondent pas toujours à leurs homologues industriels. On peut penser que ces variations peuvent induire des différences significatives de conditions de contact entre les micro-organismes et les différents inhibiteurs. Il apparaît donc nécessaire de rester prudent concernant l'extrapolation des résultats obtenus en laboratoire, que ce soit en digesteurs batchs ou en digesteurs semi-continus, à des systèmes plus complexes.

1.2 Les outils analytiques

Les écosystèmes de digestion anaérobie sont des systèmes complexes dont la caractérisation nécessite l'emploi de méthodes analytiques potentiellement très nombreuses. Des choix doivent être effectués, en fonction des questions de recherche posées. Il faut garder présent à l'esprit que les outils analytiques retenus conditionnent en partie notre interprétation du comportement du système.

1.2.1 Suivi des performances de dégradation

Ce sujet de recherche possédait une forte composante « écologie microbienne ». C'est pourquoi, tout au long de cette thèse, un effort considérable a été porté sur l'analyse des populations impliquées dans le processus de digestion anaérobie. Le suivi des performances de l'écosystème a principalement été tourné vers la production de biogaz, de métabolites et la dégradation du phénol. Le suivi de la dégradation de la matière organique par exemple, n'a pas été jugé prioritaire, même s'il aurait pu apporter des informations complémentaires mais non cruciales à l'interprétation des résultats.

1.2.2 Méthodes de biologie moléculaire

Deux méthodes de biologie moléculaire ont été appliquées au suivi des populations microbiennes : l'ARISA et le séquençage de la région V4-V5 du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S.

L'ARISA est une technique d'empreinte moléculaire peu coûteuse, facile à mettre en œuvre et reproductible. Celle-ci a été employée en première approche afin de générer rapidement et à grande échelle des profils de composition de la communauté microbienne. Cette technique a ainsi permis d'avoir un premier aperçu qualitatif de la dynamique des populations bactériennes et archées, de définir des seuils d'inhibition structurelle et de sélectionner des échantillons représentatifs pour séquençage. Toutefois, l'ARISA ne permettait pas d'avoir une information sur l'identité des populations caractéristiques des différents types et niveaux d'inhibition. Grâce à de récents développements méthodologiques, un protocole de séquençage de la région V4-V5 du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S fournissant des résultats hautement reproductibles a été mis en place au sein du laboratoire et a pu être appliqué sur de nombreux échantillons. Cette analyse bien que plus coûteuse, nous permettait alors d'identifier les populations présentes.

Ces deux types d'analyse de biologie moléculaire restent toutefois soumis à plusieurs biais méthodologiques, inhérents à l'utilisation de ces techniques. Ils sont liés notamment à

l'étape d'amplification de l'ADN par PCR, à la taille et au type de région ciblée ainsi qu'au modèle d'analyseur utilisé. Des biais peuvent également être associés à l'échantillonnage et à la conservation de l'échantillon, mais ces derniers ne seront pas discutés dans ce manuscrit. Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué précédemment, la biomasse collectée dans les digesteurs n'est pas forcément active ou directement impliquée dans le processus de dégradation au moment de l'échantillonnage. De plus, les méthodes basées sur la génomique ne fournissent pas d'informations sur l'activité réelle des populations. Par conséquent, il reste difficile de conclure quant à leurs rôles respectifs au sein de l'écosystème. D'autres méthodes de biologie moléculaire telles que la PCR quantitative, ou les techniques basées sur l'analyse d'ARN nous auraient permis d'autres types d'informations portant respectivement sur la quantification des populations ou sur leur activité métabolique. Par ailleurs, les approches omiques permettront d'obtenir une profondeur d'analyse encore inégalée. Des premiers tests d'analyse métatranscriptomique et métabolomique ont été réalisés en fin de thèse, mais les résultats n'ont pas pu être inclus à temps dans ce manuscrit.

1.2.3 Analyse des données

Les profils ARISA ont été alignés et normalisés à l'aide d'un package de R, StatFingerprints afin d'obtenir un jeu de données homogène pour la réalisation d'analyses statistiques. Les reads de séquençage ont quant à eux été triés, regroupés sous forme d'OTUs et enfin assignés taxonomiquement grâce à un pipeline d'analyse développé au sein de l'équipe et mettant en jeu différents sous-pipeline tels que UPARSE, USEARCH. La dernière version de la base de données 16S Silva (v119) a également été utilisée pour réaliser les assignations taxonomiques. Les différents paramètres de tri et d'affiliation appliqués au sein du pipeline sont en constante évolution. Toutefois, lors de cette étude, la dernière version du pipeline d'analyse de l'équipe a été utilisée pour traiter les données de séquençage. Son paramétrage ne sera donc pas discuté. Par ailleurs, les analyses ont été réalisées chapitre par chapitre. Une analyse globale de l'ensemble des échantillons séquencés serait intéressante dans le but de comparer la présence de certains OTUs d'intérêt lors des différentes séries d'expérimentations. Toutefois, celle-ci n'a pas pu être réalisée dans le temps imparti. Enfin, de nouveaux outils d'analyse de séquences de 16S tels que FROGS ont vu le jour durant cette thèse. Compte tenu du jeu de données de séquençage dont nous disposons, il pourrait être intéressant de tester l'influence du type de pipeline utilisé sur les résultats obtenus.

La méthode statistique d'analyse multivariée qui a été retenue pour l'ensemble de cette thèse est l'analyse en composante principale. Là encore, de nombreuses autres méthodes telles que l'analyse en coordonnées principales (PCoA), l'analyse en composantes indépendantes (ACI), etc., auraient pu également être utilisées. Certaines ont d'ailleurs été testées sur certains jeux de données. Cependant, les résultats obtenus étaient relativement comparables à ceux de l'ACP. C'est pourquoi, il a été décidé d'uniformiser le type d'analyse statistique présenté dans ce manuscrit.

Par ailleurs, au sein même de l'ACP, des critères analytiques peuvent être discutés. Les OTUs n'étant pas représentés au moins une fois à hauteur d'1 % ont été retirés de l'analyse car leur présence au sein du jeu de données n'a pas été jugée significative. De même, nous avons choisi de normaliser nos jeux de données par pourcentage (abondance relative) car le

nombre de séquences obtenu pouvait varier significativement d'un échantillon à un autre. Cependant, d'autres transformations ont parfois été nécessaires (racine ou logarithmiques) afin de mieux prendre en considération l'influence des OTUs minoritaires. Enfin, les OTUs bactériens ont en permanence été agrégés au niveau taxonomique « famille » afin de faciliter leur représentation graphique au sein des histogrammes. Dans un souci d'homogénéité, cette agrégation a été conservée lors de l'analyse statistique. Cependant, il aurait également pu être intéressant de réaliser les ACP sans agréger les données afin d'affiner nos interprétations au niveau de l'OTU.

2 Discussion autour des résultats

2.1 Réponses d'un écosystème anaérobie à différents niveaux d'inhibitions

2.1.1 Variabilité de la résistance *de l'écosystème*

Un des objectifs de la première série d'expérimentation menée en digesteurs batchs consistait à déterminer, pour chacun des deux composés inhibiteurs testés, la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) caractérisant le niveau de résistance de notre inoculum, dans les conditions opératoires fixées lors de cette étude. Pour déterminer ces CI_{50} , nous avons choisi de nous baser sur l'évolution d'un paramètre relatif à l'activité méthanogène de notre écosystème, à savoir la vitesse maximale spécifique de production de CH_4 . Certaines études utilisent quant à elles le rendement final de production de CH_4 . Cependant, ce critère n'était pas applicable à l'étude de l'effet inhibiteur du phénol du fait de son caractère dégradable en conditions anaérobies.

Les CI_{50} ont ensuite été utilisées pour le reste des expérimentations menées au cours de cette thèse. Cependant, il a été constaté, lors de l'étude mettant en jeu différents supports actifs en digesteurs batchs, qu'en présence de ces mêmes CI_{50} , les performances de l'écosystème pouvaient être différentes. Toutefois, nous avons pu noter que cette différence était hautement répétable au sein des triplicats. L'hypothèse d'une variation liée à une évolution stochastique de l'inoculum lors des différentes incubations a donc été écartée. L'influence du prélèvement de l'inoculum a déjà été évoquée page 244. Il existe donc une réelle variabilité de la capacité de résistance d'un écosystème à une même perturbation malgré la mise en place de conditions opératoires identiques. Même si cette observation était prévisible, elle souligne l'importance de l'historique du digesteur sur ses capacités de résistance. Il n'est donc pas possible de déterminer avec précision la résistance d'un digesteur aux perturbations à partir d'une mesure à un temps donné, mais ceci ouvre des perspectives quant à des possibilités d'acclimatation des digesteurs à des perturbations, en particulier quand celles-ci sont connues et fréquentes/répétées. De plus, les analyses moléculaires réalisées sur les inocula prélevés à un an d'intervalle ont montré que ces derniers possédaient des compositions quasi-identiques. Cette observation peut être due à un manque de profondeur d'analyse lié notamment à notre capacité de séquençage. Certains OTUs ultraminoritaires non détectés par nos analyses, ont peut être ainsi eu une influence fondamentale sur les variations de résistance de l'écosystème. En s'affranchissant de ce biais méthodologique, cette variabilité peut également s'expliquer par l'élasticité fonctionnelle de la biomasse au sein d'un même écosystème. Une meilleure compréhension de ce type de phénomène impliquerait donc l'utilisation de techniques dotées d'une meilleure résolution telles qu'une approche de type métagénomique, ou de méthodes basées sur un autre type de médiateur biologique, à savoir l'ARN.

Par ailleurs, lors de l'étude menée en réacteurs semi-continus, il a été décidé de réaliser une perturbation progressive par le phénol jusqu'à une concentration équivalente à la CI_{50} , ceci afin d'éviter une inhibition complète de la digestion anaérobie qui aurait occasionné une perte de temps trop conséquente pour la suite de la thèse. Les conditions d'inhibition étaient

cependant différentes de celles mises en œuvre au sein des digesteurs batchs. En effet, les systèmes batchs, fermés, induisaient la présence d'une d'inhibition initialement présente lors du démarrage de l'incubation et donc assimilable à une perturbation « instantanée ». L'expérimentation en réacteurs semi-continus a permis d'observer que contrairement à des systèmes batchs, la biomasse était capable de s'adapter à une inhibition progressive sans modifier significativement sa composition, soulignant ainsi encore une fois l'élasticité fonctionnelle de l'écosystème de la digestion anaérobie.

Par conséquent, caractériser avec précision le niveau de résistance d'un digesteur aux inhibitions demeure difficile. L'inoculum de départ, le substrat, ainsi que l'ensemble des conditions opératoires sont susceptibles d'influer sur la réponse de l'écosystème. Cependant, cette variabilité ouvre des perspectives de recherche prometteuses sur la possibilité d'utiliser cette élasticité dans le but de modéliser les écosystèmes complexes et d'augmenter ainsi leurs capacités de résistance à différents types d'inhibition. Une première étude, menée par Madigou et al., (2016), a d'ailleurs permis de montrer qu'une stratégie d'augmentation progressive de l'inhibition par le phénol augmentait le seuil de tolérance de la biomasse à ce composé.

2.1.2 *Vers la possibilité de déterminer des indicateurs microbiens de l'inhibition ?*

Les premières séries d'expérimentation menées en digesteurs batchs ont permis de mettre en évidence des phénomènes d'adaptation et/ou d'inhibition de la communauté microbienne en présence de différents niveaux de phénol et d'azote ammoniacal. Les variations de performance mesurées en termes de production de biogaz ont indiqué la présence de seuils d'inhibition dite « fonctionnelle ». Par ailleurs, l'apport des données de biologie moléculaire a également permis de révéler que le niveau d'inhibition induisait également des modifications majeures de la composition de l'écosystème et donc l'existence d'un autre type de seuil d'inhibition dite « structurelle ». La confrontation des deux types de seuils a mis en exergue la capacité de l'écosystème de la digestion anaérobie à conserver des performances stables tout en adaptant sa composition, notamment dans le cas du phénol.

Par ailleurs, un des objectifs de ce type d'expérimentation consistait également à vérifier si d'éventuels phylotypes pouvaient être utilisés en tant que bioindicateurs pouvant être corrélés au niveau d'inhibition et donc par transitivité à l'état de santé de l'écosystème de la digestion anaérobie. A l'aide des analyses statistiques mises en œuvre lors de ces études, quelques phylotypes caractéristiques du niveau et du type d'inhibition appliquée à l'écosystème ont pu être identifiés.

Cependant, ces résultats ne constituent qu'un premier pas dans la démarche de définition de bioindicateurs. En effet, l'application encore récente des méthodes de biologie moléculaire aux bioprocédés de digestion anaérobie rend difficile l'interprétation des résultats. Comme cela a été évoqué précédemment, de nombreux facteurs peuvent influencer sur la réponse des écosystèmes et les phylotypes identifiés peuvent être variables d'une étude à une autre. Ceci peut s'expliquer par l'extrême complexité des interactions régissant le fonctionnement et la composition des communautés microbiennes. De même, la présence d'une redondance fonctionnelle élevée au sein des populations impliquées dans le processus de digestion anaérobie complexifie encore un peu plus les interprétations. Enfin, l'ensemble

des biais méthodologiques des techniques de biologie moléculaire utilisées lors de cette étude confine également la représentativité de nos conclusions.

Malgré tout l'intérêt qu'ils suscitent, il reste donc encore prématuré de prétendre à l'identification formelle de bioindicateurs microbiens de la digestion anaérobie. Ceci nécessiterait une démarche d'uniformisation des protocoles expérimentaux et la constitution de bases de données permettant de définir des intervalles de quantification de ces indicateurs. Toutefois, l'accumulation de données de biologie moléculaires devrait permettre, à moyen terme, de différencier les modifications de composition microbienne inhérente à l'évolution normale d'un bioprocédé, de celles qui relèvent d'une perturbation.

2.2 Intérêt de l'utilisation de supports actifs

2.2.1 Quels sont leurs mécanismes d'action ?

L'étude réalisée en digesteurs batchs a indiqué que les supports actifs pouvaient avoir une influence positive sur les performances de la digestion anaérobie, mais uniquement dans le cas d'une situation perturbée. Leur présence n'induit toutefois aucun effet significatif en l'absence d'inhibition. En conditions inhibées, les analyses de biologie moléculaire ont montré que la présence de ces supports modifiaient sensiblement la composition de l'écosystème microbien soit en préservant les espèces présentes en l'absence d'inhibition, soit en favorisant l'émergence de nouvelles populations.

Il était attendu que les charbons actifs favoriseraient la digestion anaérobie en présence de phénol grâce à leur propriété surfacique d'adsorption des molécules organiques. Leur présence a donc levé l'inhibition par le phénol grâce à une diminution rapide de sa concentration dans le milieu. Toutefois, l'un des charbons actifs a également permis de réduire l'inhibition causée par l'azote ammoniacal sans pour autant influencer sa concentration. De même, lors de sa transposition dans les réacteurs continus, ce charbon actif n'a plus semblé adsorber le phénol au-delà d'une certaine concentration, mais a pourtant limité son impact sur les performances du digesteur. Il semble donc que l'effet positif lié à l'ajout de ce support ne soit pas seulement associé à une modification de la concentration en inhibiteur. Des observations similaires ont été réalisées en présence de zéolithes. Bien qu'elles n'aient pas modifié la concentration en azote ammoniacal au sein des réacteurs batchs, celles-ci ont significativement accéléré la cinétique de production de biogaz. De manière plus inattendue, elles ont également permis d'améliorer la dégradation du phénol, en batchs et en réacteurs semi-continus, ce qui a eu pour effet de limiter l'inhibition et de favoriser la production de biogaz.

Ces résultats prometteurs interrogent donc quant aux mécanismes d'action mis en jeu par ces supports. Les modifications de la composition de la communauté microbienne, observées à l'aide du séquençage, résultent probablement d'un changement des conditions de croissance de la biomasse et qui peut être de nature physique ou chimique. La première hypothèse envisagée serait que ces supports aient servi de base physique au développement de la biomasse. Ils ont également pu faire l'objet d'une colonisation spécifique comme cela a pu être évoqué dans l'étude de Weiss et al., (2013) menée avec des zéolithes. Cependant, nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse. En effet, la granulométrie et la friabilité des

supports ont rendu difficile leur prélèvement et ne nous ont pas permis de différencier la biomasse libre de la biomasse fixée sur les supports lors du séquençage. D'autre part, des observations de type Fluorescence In Situ Hybridation ont également été réalisées. Mais elles se sont avérées infructueuses du fait de l'important signal parasite généré par le biodéchet. De plus, la proportion de micro-organismes récupérés sur les supports était relativement faible et donc difficilement observable. Ceci peut s'expliquer par les différentes étapes de prélèvement et de préparation d'échantillons (centrifugation) qui ont détérioré la surface des supports ou les ont fractionnés. D'autres techniques d'observation telles que la microscopie électronique pourraient être envisagées pour réaliser ce type d'analyse. Elles nous auraient notamment permis d'étudier la microstructure spécifique à chacun de ces matériaux.

Par ailleurs, il a également été évoqué dans plusieurs études récentes que le charbon actif, en tant que matériau conducteur, favorisait l'échange direct d'électrons (Direct Interspecies Electron Transfer) et donc les interactions entre différentes espèces microbiennes (Lee et al., 2016; Liu et al., 2012; Zhao et al., 2015). On peut donc facilement imaginer que la présence de ce support ait pu stimuler certaines relations syntrophiques indispensables au bon déroulement du processus de digestion anaérobie. Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée avec les moyens méthodologiques disponibles au laboratoire. Des mesures de conductivité auraient pu être réalisées mais elles n'auraient pas permis de mettre en évidence ce type de mécanisme. Il aurait donc fallu caractériser les réactions d'oxydoréduction à l'aide de mesures électrochimiques telles que la voltampérométrie cyclique afin d'évaluer si le transfert d'électrons était amélioré dans ces incubations comme le suggère l'étude de Lee et al., (2016).

La levée de ces inhibitions pourrait également être expliquée par des mécanismes chimiques. Par exemple, les zéolithes possèdent des capacités d'échange cationique qui ont été mises à profit dans le traitement de nombreux effluents (gaz industriels, sols pollués aux métaux lourds, biofiltration des eaux usées, etc.). Ces dernières ont ainsi pu influencer sur la composition chimique du milieu dans lequel évoluait la biomasse anaérobie. Des analyses élémentaires, qui n'ont pu être réalisées lors de la thèse du fait de la défaillance de cet automate sont envisagées pour la valorisation des expérimentations portant sur ces supports.

Enfin, l'ajout de chitosane et du charbon actif 2 ont produit des résultats intéressants mais contrastés. En effet, ces derniers ont favorisé la digestion anaérobie en présence de phénol. Toutefois, ils ont tous deux eu une influence négative sur la production de biogaz en présence d'azote ammoniacal, visible sur l'ensemble des réplicats de manière équivalente. De fait, il semble que leur effet puisse être associé à la nature et/ou au degré d'inhibition. Des analyses de la composition chimique du milieu pourraient éventuellement donner de nouvelles informations quant à la cause de cette sur-inhibition liée à ces deux supports.

2.2.2 Sont-ils *transposables* à l'échelle industrielle ?

Des digesteurs à lit fluidisé utilisant la zéolithe et le charbon actif sont déjà utilisés à l'échelle industrielle mais restent limités à des applications spécifiques. Les résultats acquis lors de cette étude, même s'ils se confinent à des pilotes de laboratoire, semblent indiquer que l'utilisation de ces supports pourrait être étendue au-delà de leurs applications habituelles. Par exemple, la zéolithe qui est utilisée pour le traitement des effluents concentrés en azote

ammoniacal pourrait également être mise en œuvre pour le traitement d'effluents contenant des micropolluants organiques. D'un point de vue économique, cette utilisation pourrait être bénéfique pour les exploitants. En effet, la zéolithe est un minéral naturel coûtant 4 à 5 fois moins cher que le charbon actif.

3 Conclusion et perspectives

Le développement et la pérennisation de la digestion anaérobie passent par une amélioration de la robustesse de ce bioprocédé. En effet, les conséquences du dysfonctionnement d'un digesteur industriel peuvent être dramatiques aussi bien sur le plan environnemental qu'économique. Bien que la maîtrise totale des processus biologiques qui régissent son fonctionnement reste encore inenvisageable à l'heure actuelle, l'avancée des techniques de biologie moléculaire permet de lever progressivement le voile sur les acteurs microbiens et sur les fonctions biologiques qu'ils expriment au sein de cet écosystème complexe.

Les travaux menés au cours de cette thèse avaient pour premier objectif de mieux comprendre l'effet de différents niveaux d'inhibition par le phénol et par l'azote ammoniacal sur la composition microbienne et les performances de digesteurs anaérobies. Les résultats obtenus ont permis de suggérer l'identification de bioindicateurs caractéristiques du niveau et du type d'inhibition appliquée. Ces expérimentations ont mis en lumière la plasticité de ces écosystèmes et la versatilité de leur capacité de résistance. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives de recherche sur l'étude des inhibitions et sur les stratégies d'acclimatation permettant de mettre à profit cette plasticité fonctionnelle. Des efforts doivent donc continuer à être fournis afin d'acquérir de nouvelles connaissances portant sur l'écophysiologie de l'écosystème de la digestion anaérobie dans le cas de situations transitoires associées notamment à l'arrivée de composés inhibiteurs. Celles-ci fourniront des informations indispensables pour proposer et anticiper de nouveaux modes de gestion des bioprocédés. Pour ce faire, les approches omiques fournissent actuellement de nouveaux outils méthodologiques très prometteurs. Toutefois, leur puissance analytique reste encore difficile à canaliser en termes d'interprétations.

Les stratégies expérimentales basées sur l'ajout de supports actifs ont également révélé des potentialités intéressantes de lutte contre ces inhibitions, en systèmes batchs ainsi qu'en réacteurs semi-continus, en modifiant notamment la composition de la biomasse. Des analyses complémentaires pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces supports et leur influence sur l'écologie microbienne du bioprocédé. Ces expérimentations élargissent ainsi le champ des stratégies opératoires pouvant être appliquées aux digesteurs anaérobies et offrent des perspectives de recherche à échelles multiples allant de l'étude des transferts électroniques en présence de supports conducteurs à l'optimisation de la mise en œuvre de ces stratégies lors de leur transposition industrielle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abouelenien, F., Nakashimada, Y., Nishio, N. 2009. Dry mesophilic fermentation of chicken manure for production of methane by repeated batch culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **107**(3), 293-295.
- ADEME. 2015a. Chiffres-clés Déchets.
- ADEME. 2015b. Fiche technique : Méthanisation.
- Ahn, J.H., Do, T.H., Kim, S.D., Hwang, S. 2006. The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, **30**(1), 33-38.
- Ahring, B.K., Christiansen, N., Mathrani, I., Hendriksen, H.V., Macario, A.J., Conway de Macario, E. 1992. Introduction of a de novo bioremediation ability, aryl reductive dechlorination, into anaerobic granular sludge by inoculation of sludge with *Desulfomonile tiedjei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(11), 3677-3682.
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., Ahmad Asad, S. 2014. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, **2014**, 183752.
- Alves, M.M., Vieira, J.A., Pereira, R.M., Pereira, M.A., Mota, M. 2001. Effects of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part II: Oleic acid toxicity and biodegradability. *Water Research*, **35**(1), 264-70.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K. 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature. *Water Research*, **28**(3), 727-731.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K. 1992. Effects of free long-chain fatty-acids on thermophilic anaerobic-digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **37**(6), 808-812.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K. 1995. Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic 55°C enrichment culture degrading long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(6), 2442-5.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K. 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**(4), 560-564.
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B., Srinath, E.G. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **48**(5), 835-52.
- Appels, L., Baeyens, J., Degève, J., Dewil, R. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**(6), 755-781.
- Ariunbaatar, J., Panico, A., Esposito, G., Pirozzi, F., Lens, P.N.L. 2014. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Applied Energy*, **123**, 143-156.
- Astals, S., Batstone, D.J., Mata-Alvarez, J., Jensen, P.D. 2014. Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes. *Bioresource Technology*, **169**, 421-427.
- Barlaz, M.A., Ham, R.K., Schaefer, D.M., Isaacson, R. 1990. Methane production from municipal refuse: A review of enhancement techniques and microbial dynamics. *Critical Reviews in Environmental Control*, **19**(6), 557-584.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T., Siegrist, H., Vavilin, V.A. 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*, **45**(10), 65-73.
- Bayard, R., Gourdon, R. 2001. Traitement biologique des déchets. *Techniques de l'ingénieur*.
- Beccari, M., Majone, M., Papini, M.P., Torrisi, L. 2001. Enhancement of anaerobic treatability of olive oil mill effluents by addition of Ca(OH)₂ and bentonite without intermediate solid/liquid separation. *Water Science and Technology*, **43**(11), 275-82.
- Benjamin, M.M., Woods, S.L., Ferguson, J.F. 1984. Anaerobic toxicity and biodegradability of pulp mill waste constituents. *Water Research*, **18**(5), 601-607.

- Bertin, L., Berselli, S., Fava, F., Petrangeli-Papini, M., Marchetti, L. 2004a. Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with granular activated carbon and “Manville” silica beads. *Water Research*, **38**(14–15), 3167-3178.
- Bertin, L., Colao, M.C., Ruzzi, M., Fava, F. 2004b. Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**(3), 413-23.
- Bhattacharya, S.K., Parkin, G.F. 1989. The effect of ammonia on methane fermentation processes. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **61**(1), 55-59.
- Bialek, K., Kumar, A., Mahony, T., Lens, P.N., O'Flaherty, V. 2012. Microbial community structure and dynamics in anaerobic fluidized-bed and granular sludge-bed reactors: influence of operational temperature and reactor configuration. *Microbial Biotechnology*, **5**(6), 738-52.
- Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., Leschine, S. 2013. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*, **5**(3), 627.
- Boardman, G., McVeigh, P. 1997. Use of UASB technology to treat crab processing wastewaters. *Journal of Environmental Engineering*, **123**(8), 776-785.
- Bochmann, G., Herfellner, T., Susanto, F., Kreuter, F., Pesta, G. 2007. Application of enzymes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **56**(10), 29-35.
- Bonmatí, A., Flotats, X. 2003. Air stripping of ammonia from pig slurry: characterisation and feasibility as a pre- or post-treatment to mesophilic anaerobic digestion. *Waste Management*, **23**(3), 261-272.
- 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), 626-32.
- Boone, D.R., Xun, L. 1987. Effects of pH, Temperature, and Nutrients on Propionate Degradation by a Methanogenic Enrichment Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(7), 1589-1592.
- Borrel, G., O'Toole, P.W., Harris, H.M., Peyret, P., Brugere, J.F., Gribaldo, S. 2013. Phylogenomic data support a seventh order of Methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of Methanogenesis. *Genome Biology and Evolution*, **5**(10), 1769-80.
- Borzacconi, L., Lopez, I., Anido, C. 1997. Hydrolysis constant and VFA inhibition in acidogenic phase of MSW anaerobic degradation. *Water Science and Technology*, **36**(6–7), 479-484.
- Bousek, J., Scroccaro, D., Sima, J., Weissenbacher, N., Fuchs, W. 2016. Influence of the gas composition on the efficiency of ammonia stripping of biogas digestate. *Bioresource Technology*, **203**, 259-266.
- Boyd, S.A., Shelton, D.R., Berry, D., Tiedje, J.M. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**(1), 50-54.
- Braun, R., Huber, P., Meyrath, J. 1981. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biotechnology Letters*, **3**(4), 159-164.
- Briones, A., Raskin, L. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**(3), 270-276.
- Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., Arrighi, L. 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials*, **160**(2-3), 265-88.

- Cabirol, N., Barragan, E.J., Duran, A., Noyola, A. 2003. Effect of aluminium and sulphate on anaerobic digestion of sludge from wastewater enhanced primary treatment. *Water Science and Technology*, **48**(6), 235-40.
- Cai, J., Mo, X., Cheng, G., Du, D. 2015. Pretreatment of piggery wastewater by a stable constructed microbial consortium for improving the methane production. *Water Science and Technology*, **71**(5), 769-775.
- Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B., Yenigun, O. 2005. Methanogenic diversity in anaerobic bioreactors under extremely high ammonia levels. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**(4), 448-455.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, **7**(5), 335-6.
- Carballa, M., Manterola, G., Larrea, L., Ternes, T., Omil, F., Lema, J.M. 2007a. Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products. *Chemosphere*, **67**(7), 1444-1452.
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J.M. 2007b. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, **41**(10), 2139-2150.
- Carballa, M., Rigueiro, L., Lema, J.M. 2015. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology*, **33**, 103-11.
- Čater, M., Zorec, M., Marinšek Logar, R. 2014. Methods for Improving Anaerobic Lignocellulosic Substrates Degradation for Enhanced Biogas Production. *Springer Science Reviews*, **2**(1), 51-61.
- Cavaleiro, A.J., Salvador, A.F., Alves, J.I., Alves, M. 2009. Continuous High Rate Anaerobic Treatment of Oleic Acid Based Wastewater is Possible after a Step Feeding Start-Up. *Environmental Science and Technology*, **43**(8), 2931-2936.
- Cea-Barcia, G., Carrère, H., Steyer, J.P., Patureau, D. 2013. Evidence for PAH Removal Coupled to the First Steps of Anaerobic Digestion in Sewage Sludge. *International Journal of Chemical Engineering*, **2013**, 1-6.
- Celen, I., Turker, M. 2001. Recovery of ammonia as struvite from anaerobic digester effluents. *Environmental Technology*, **22**(11), 1263-72.
- Chae, K.J., Jang, A., Yim, S.K., Kim, I.S. 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology*, **99**(1), 1-6.
- Chan, I., Srinivasan, A., Liao, P.H., Lo, K.V., Mavinic, D.S., Atwater, J., Thompson, J.R. 2013. The effects of microwave pretreatment of dairy manure on methane production. *Natural Resources*, **4**(3), 246.
- Chapleur, O., Bize, A., Serain, T., Mazéas, L., Bouchez, T. 2014. Co-inoculating ruminal content neither provides active hydrolytic microbes nor improves methanization of ¹³C-cellulose in batch digesters. *FEMS Microbiology Ecology*, **87**(3), 616-29.
- Chapleur, O., Madigou, C., Civade, R., Rodolphe, Y., Mazéas, L., Bouchez, T. 2016. Increasing concentrations of phenol progressively affect anaerobic digestion of cellulose and associated microbial communities. *Biodegradation*, **27**(1), 15-27.
- Chapleur, O., Mazéas, L., Godon, J.J., Bouchez, T. 2015. Asymmetrical response of anaerobic digestion microbiota to temperature changes. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

- Chavez-Fuentes, J.J., Hutnan, M., Bodik, I., Zakhar, R., Czolderova, M. 2015. Anaerobic digestion of waste biomass from the production of L-cystine in suspended-growth bioreactors. *Water Science and Technology*, **72**(4), 585-92.
- Chen, C.L., Wu, J.H., Tseng, I.C., Liang, T.M., Liu, W.T. 2009. Characterization of active microbes in a full-scale anaerobic fluidized bed reactor treating phenolic wastewater. *Microbes and Environments*, **24**(2), 144-53.
- Chen, J.L., Ortiz, R., Steele, T.W.J., Stuckey, D.C. 2014a. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. *Biotechnology Advances*, **32**(8), 1523-1534.
- Chen, S., He, Q. 2015. Persistence of *Methanosaeta* populations in anaerobic digestion during process instability. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **42**(8), 1129-37.
- Chen, S., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Liu, F., Fan, W., Nevin, K.P., Lovley, D.R. 2014b. Promoting Interspecies Electron Transfer with Biochar. *Scientific Reports*, **4**, 5019.
- Chen, Y., Cheng, J.J. 2007. Effect of Potassium Inhibition on the Thermophilic Anaerobic Digestion of Swine Waste. *Water Environment and Research*, **79**(6), 667-674.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, **99**(10), 4044-64.
- Cheng, L., Rui, J., Li, Q., Zhang, H., Lu, Y. 2013. Enrichment and dynamics of novel syntrophs in a methanogenic hexadecane-degrading culture from a Chinese oilfield. *FEMS Microbiology Ecology*, **83**(3), 757-766.
- Cirne, D.G., Björnsson, L., Alves, M., Mattiasson, B. 2006. Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81**(11), 1745-1752.
- Cirne, D.G., Paloumet, X., Björnsson, L., Alves, M.M., Mattiasson, B. 2007. Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. *Renewable Energy*, **32**(6), 965-975.
- Dąbrowski, A., Podkościelny, P., Hubicki, Z., Barczak, M. 2005. Adsorption of phenolic compounds by activated carbon—a critical review. *Chemosphere*, **58**(8), 1049-1070.
- De Baere, L.A., Devocht, M., Van Assche, P., Verstraete, W. 1984. Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water Research*, **18**(5), 543-548.
- De Bok, F.A., Plugge, C.M., Stams, A.J. 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research*, **38**(6), 1368-75.
- De los Reyes Iii, F.L., Weaver, J.E., Wang, L. 2015. A methodological framework for linking bioreactor function to microbial communities and environmental conditions. *Current Opinion in Biotechnology*, **33**, 112-118.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., Verstraete, W. 2012. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology*, **112**, 1-9.
- De Vrieze, J., Saunders, A.M., He, Y., Fang, J., Nielsen, P.H., Verstraete, W., Boon, N. 2015. Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Research*, **75**, 312-323.
- De Vrieze, J., Verstraete, W., Boon, N. 2013. Repeated pulse feeding induces functional stability in anaerobic digestion. *Microbial Biotechnology*, **6**(4), 414-424.
- Demirel, B., Scherer, P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **7**(2), 173-190.
- Diak, J., Ormeci, B., Kennedy, K.J. 2012. Effect of enzymes on anaerobic digestion of primary sludge and septic tank performance. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **35**(9), 1577-89.

- Diak, J., Ormecı, B., Kennedy, K.J. 2013. Effect of micro-aeration on anaerobic digestion of primary sludge under septic tank conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**(4), 417-24.
- Diaz, I., Perez, S.I., Ferrero, E.M., Fdz-Polanco, M. 2011. Effect of oxygen dosing point and mixing on the microaerobic removal of hydrogen sulphide in sludge digesters. *Bioresource Technology*, **102**(4), 3768-75.
- Domingues, R.F., Sanches, T., Silva, G.S., Bueno, B.E., Ribeiro, R., Kamimura, E.S., Franzolin Neto, R., Tommaso, G. 2015. Effect of enzymatic pretreatment on the anaerobic digestion of milk fat for biogas production. *Food Research International*, **73**, 26-30.
- Edgar, R.C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, **10**(10), 996-8.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, **27**(16), 2194-200.
- El-Mamouni, R., Leduc, R., Guiot, S.R. 1998. Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Science and Technology*, **38**(8-9), 341-347.
- El Fantroussi, S., Giot, R., Naveau, H., Agathos, S.N. 1998. Acclimation of a methanogenic consortium to a mixture of hydroxylated aromatic compounds. *Chemosphere*, **36**(7), 1575-1583.
- Fang, H., Li, Y., Chui, H. 1995. UASB Treatment of Wastewater with Concentrated Mixed VFA. *Journal of Environmental Engineering*, **121**(2), 153-160.
- Fang, H.H.P., Chan, O.C. 1997. Toxicity of phenol towards anaerobic biogranules. *Water Research*, **31**(9), 2229-2242.
- Fang, H.H.P., Liang, D.W., Zhang, T., Liu, Y. 2006. Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. *Water Research*, **40**(3), 427-434.
- Fang, H.H.P., Liu, Y., Ke, S.Z., Zhang, T. 2004. Anaerobic degradation of phenol in wastewater at ambient temperature. *Water Science and Technology*, **49**(1), 95-102.
- Fedorak, P.M., Hrudıy, S.E. 1984. The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water Research*, **18**(3), 361-367.
- Feijoo, G., Soto, M., Méndez, R., Lema, J.M. 1995. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**(2), 180-188.
- Feng, Y., Zhang, Y., Quan, X., Chen, S. 2014. Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron. *Water Research*, **52**, 242-50.
- Fernández, N., Fdz-Polanco, F., Montalvo, S.J., Toledano, D. 2001. Use of activated carbon and natural zeolite as support materials, in an anaerobic fluidised bed reactor, for vinasse treatment. *Water Science and Technology*, **44**(4), 1-6.
- Fernández, N., Montalvo, S., Borja, R., Guerrero, L., Sánchez, E., Cortés, I., Colmenarejo, M.F., Travieso, L., Raposo, F. 2008. Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater. *Renewable Energy*, **33**(11), 2458-2466.
- Fernández, N., Montalvo, S., Fernández-Polanco, F., Guerrero, L., Cortés, I., Borja, R., Sánchez, E., Travieso, L. 2007. Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors. *Process Biochemistry*, **42**(4), 721-728.
- Fotidis, I.A., Karakashev, D., Angelidaki, I. 2013. Bioaugmentation with an acetate-oxidising consortium as a tool to tackle ammonia inhibition of anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **146**, 57-62.

- Fotidis, I.A., Kougias, P.G., Zaganas, I.D., Kotsopoulos, T.A., Martzopoulos, G.G. 2014a. Inoculum and zeolite synergistic effect on anaerobic digestion of poultry manure. *Environmental Technology*, **35**(9-12), 1219-25.
- Fotidis, I.A., Wang, H., Fiedel, N.R., Luo, G., Karakashev, D.B., Angelidaki, I. 2014b. Bioaugmentation as a solution to increase methane production from an ammonia-rich substrate. *Environmental Science and Technology*, **48**(13), 7669-7676.
- Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C., Insam, H. 2014. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Manag*, **34**.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., Nagai, S. 1990. Inhibition of the Fermentation of Propionate to Methane by Hydrogen, Acetate, and Propionate. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(3), 719-723.
- Gao, S., Zhao, M., Chen, Y., Yu, M., Ruan, W. 2015. Tolerance response to in situ ammonia stress in a pilot-scale anaerobic digestion reactor for alleviating ammonia inhibition. *Bioresource Technology*, **198**, 372-9.
- Garcia, M.L., Angenent, L.T. 2009. Interaction between temperature and ammonia in mesophilic digesters for animal waste treatment. *Water Research*, **43**(9), 2373-82.
- Girguis, P.R., Cozen, A.E., DeLong, E.F. 2005. Growth and Population Dynamics of Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(7), 3725-3733.
- Glassey, J. 2013. Multivariate data analysis for advancing the interpretation of bioprocess measurement and monitoring data. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **132**, 167-91.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T. 1998. Comparison of hydrolytic enzyme systems in pure culture and activated sludge under different electron acceptor conditions. *Water Science and Technology*, **37**(4-5), 335-343.
- Gonçalves, M.R., Costa, J.C., Marques, I.P., Alves, M.M. 2011. Inoculum acclimation to oleate promotes the conversion of olive mill wastewater to methane. *Energy*, **36**(4), 2138-2141.
- Gonçalves, M.R., Costa, J.C., Marques, I.P., Alves, M.M. 2012. Strategies for lipids and phenolics degradation in the anaerobic treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, **46**(6), 1684-92.
- Gorris, L.G.M., Vandeursen, J.M.A., Vanderdrift, C., Vogels, G.D. 1989. Inhibition of Propionate Degradation by Acetate in Methanogenic Fluidized-Bed Reactors. *Biotechnology Letters*, **11**(1), 61-66.
- Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T., Benizri, E., Delfosse, P. 2015. Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for Biofuels*, **8**(1), 1-18.
- Guiot, S.R., Tartakovsky, B., Lanthier, M., Lévesque, M.J., Manuel, M.F., Beaudet, R., Greer, C.W., Villemur, R. 2002. Strategies for augmenting the pentachlorophenol degradation potential of UASB anaerobic granules. *Water Science and Technology*, **45**(10), 35-41.
- Hajji, K.T., Lepine, F., Bisailon, J.G., Beaudet, R., Hawari, J., Guiot, S.R. 2000. Effects of bioaugmentation strategies in UASB reactors with a methanogenic consortium for removal of phenolic compounds. *Biotechnology and Bioengineering*, **67**(4), 417-23.
- Hamid, H., Eskicioglu, C. 2013. Effect of microwave hydrolysis on transformation of steroidal hormones during anaerobic digestion of municipal sludge cake. *Water Research*, **47**(14), 4966-77.

- Hanaki, K., Matsuo, T., Nagase, M. 1981. Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, **23**(7), 1591-1610.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K. 1999. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research*, **33**(8), 1805-1810.
- Hao, L., Bize, A., Conteau, D., Chapleur, O., Courtois, S., Kroff, P., Desmond-Le Quémener, E., Bouchez, T., Mazéas, L. 2016. New insights into the key microbial phylotypes of anaerobic sludge digesters under different operational conditions. *Water Research*.
- Hao, L., Lü, F., He, P., Li, L., Shao, L.M. 2011. Predominant contribution of syntrophic acetate oxidation to thermophilic methane formation at high acetate concentrations. *Environmental Science and Technology*, **45**(2), 508-13.
- Hao, L., Lü, F., Li, L., Shao, L.M., He, P. 2012. Shift of pathways during initiation of thermophilic methanogenesis at different initial pH. *Bioresource Technology*, **126**, 418-24.
- Hao, L., Lü, F., Mazéas, L., Desmond-Le Quémener, E., Madigou, C., Guenne, A., Shao, L., Bouchez, T., He, P. 2015. Stable isotope probing of acetate fed anaerobic batch incubations shows a partial resistance of acetoclastic methanogenesis catalyzed by *Methanosarcina* to sudden increase of ammonia level. *Water Research*, **69**, 90-9.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, **169**(1-3), 1-15.
- Hattori, S. 2008. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments*, **23**(2), 118-27.
- He, R., Shen, D.-s. 2006. Nitrogen removal in the bioreactor landfill system with intermittent aeration at the top of landfilled waste. *Journal of Hazardous Materials*, **136**(3), 784-790.
- Hejnfelt, A., Angelidaki, I. 2009. Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. *Biomass and Bioenergy*, **33**(8), 1046-1054.
- Hernandez, J.E., Edyvean, R.G.J. 2008. Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials*, **160**(1), 20-28.
- Hills, D.J. 1979. Effects of carbon: Nitrogen ratio on anaerobic digestion of dairy manure. *Agricultural Wastes*, **1**(4), 267-278.
- Ho, D.P., Jensen, P.D., Batstone, D.J. 2013. Methanosarcinaceae and Acetate-Oxidizing Pathways Dominate in High-Rate Thermophilic Anaerobic Digestion of Waste-Activated Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(20), 6491-6500.
- Ho, L., Ho, G. 2012. Mitigating ammonia inhibition of thermophilic anaerobic treatment of digested piggery wastewater: use of pH reduction, zeolite, biomass and humic acid. *Water Research*, **46**(14), 4339-50.
- Hodgson, J., Laugero, C., Leduc, R., Asther, M., Guiot, S.R. 1998. Fungal pretreatment by *Phanerochaete chrysosporium* to reduce the inhibition of methanogenesis by dehydroabietic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**(5), 538-544.
- Hörber, C., Christiansen, N., Arvin, E., Ahring, B.K. 1998. Improved Dechlorinating Performance of Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors by Incorporation of *Dehalospirillum multivorans* into Granular Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(5), 1860-1863.
- 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), 1623-30.

- Hoyos-Hernandez, C., Hoffmann, M., Guenne, A., Mazéas, L. 2014. Elucidation of the thermophilic phenol biodegradation pathway via benzoate during the anaerobic digestion of municipal solid waste. *Chemosphere*, **97**, 115-9.
- Huiliñir, C., Quintriqueo, A., Antileo, C., Montalvo, S. 2014. Methane production from secondary paper and pulp sludge: Effect of natural zeolite and modeling. *Chemical Engineering Journal*, **257**, 131-137.
- Huiliñir, C., Roa, E., Vargas, D., Roeckel, M., Aspé, E. 2008. Kinetics of syntrophic acetogenesis in a saline medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **83**(10), 1433-1440.
- Hwu, C.-S., Donlon, B., Lettinga, G. 1996. Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Water Science and Technology*, **34**(5-6), 351-358.
- Ito, T., Yoshiguchi, K., Ariesyady, H.D., Okabe, S. 2011. Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to Synergistes group 4 in anaerobic digester sludge. *The ISME Journal*, **5**(12), 1844-56.
- Jenicek, P., Koubova, J., Bindzar, J., Zabranska, J. 2010. Advantages of anaerobic digestion of sludge in microaerobic conditions. *Water Science and Technology*, **62**(2), 427-34.
- Jeong, T.-Y., Cha, G.-C., Seo, Y.-C., Jeon, C., Choi, S.S. 2008. Effect of COD/sulfate ratios on batch anaerobic digestion using waste activated sludge. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **14**(5), 693-697.
- Jin, Y., Hu, Z., Wen, Z. 2009. Enhancing anaerobic digestibility and phosphorus recovery of dairy manure through microwave-based thermochemical pretreatment. *Water Research*, **43**(14), 3493-502.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Trably, E., Angelidaki, I. 2006. Acetate Oxidation Is the Dominant Methanogenic Pathway from Acetate in the Absence of Methanosaetaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(7), 5138-5141.
- Karhadkar, P.P., Audic, J.-M., Faup, G.M., Khanna, P. 1987. Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Water Research*, **21**(9), 1061-1066.
- Kaseamchochoung, C., Lertsutthiwong, P., Phalakornkule, C. 2006. Influence of chitosan characteristics and environmental conditions on flocculation of anaerobic sludge. *Water Environment and Research*, **78**(11), 2210-6.
- Kaya, D., Imamoglu, I., Dilek Sanin, F. 2013. Impact of PCB-118 and transformer oil toxicity on anaerobic digestion of sludge: anaerobic toxicity assay results. *Chemosphere*, **92**(7), 821-7.
- Kayhanian, M. 1994. Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **59**(4), 349-352.
- Khan, K.A., Suidan, M.T., Cross, W.H. 1981. Anaerobic Activated Carbon Filter for the Treatment of Phenol-Bearing Wastewater. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **53**(10), 1519-1532.
- Kindzierski, W.B., Gray, M.R., Fedorak, P.M., Hruday, S.E. 1992. Activated Carbon and Synthetic Resins as Support Material for Methanogenic Phenoldegrading Consortia: Comparison of Surface Characteristics and Initial Colonization. *Water Environment and Research*, **64**(6), 766-775.
- Kleyböcker, A., Liebrich, M., Kasina, M., Kraume, M., Wittmaier, M., Würdemann, H. 2012. Comparison of different procedures to stabilize biogas formation after process failure in a thermophilic waste digestion system: Influence of aggregate formation on process stability. *Waste Management*, **32**(6), 1122-1130.

- Koster, I.W., Cramer, A. 1987. Inhibition of Methanogenesis from Acetate in Granular Sludge by Long-Chain Fatty Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(2), 403-409.
- Koster, I.W., Lettinga, G. 1984. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agricultural Wastes*, **9**(3), 205-216.
- Kotsopoulos, T.A., Karamanlis, X., Dotas, D., Martzopoulos, G.G. 2008. The impact of different natural zeolite concentrations on the methane production in thermophilic anaerobic digestion of pig waste. *Biosystems Engineering*, **99**(1), 105-111.
- Krayzelova, L., Bartacek, J., Díaz, I., Jeison, D., Volcke, E.I.P., Jenicek, P. 2015. Microaeration for hydrogen sulfide removal during anaerobic treatment: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **14**(4), 703-725.
- Kroeker, E.J., Schulte, D.D., Sparling, A.B., Lapp, H.M. 1979. Anaerobic Treatment Process Stability. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **51**(4), 718-727.
- Kuang, Y., Pullammanappallil, P., Lepesteur, M., Ho, G.E. 2006. Recovery of oleate-inhibited anaerobic digestion by addition of simple substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81**(6), 1057-1063.
- Kugelman, I.J., Chin, K.K. 1971. Toxicity, synergism, and antagonism in anaerobic waste treatment processes. in: *Anaerobic Biological Treatment Processes*, Vol. 105, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, pp. 55-90.
- Kugelman, I.J., McCarty, P.L. 1965. Cation Toxicity and Stimulation in Anaerobic Waste Treatment. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **37**(1), 97-116.
- Kumar, S., Jain, M.C., Chhonkar, P.K. 1987. A note on stimulation of biogas production from cattle dung by addition of charcoal. *Biological Wastes*, **20**(3), 209-215.
- Lao, S.G. 2002. Mechanisms of granular activated carbon anaerobic fluidized-bed process for treating phenols wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, **14**(1), 132-5.
- Lauterbock, B., Ortner, M., Haider, R., Fuchs, W. 2012. Counteracting ammonia inhibition in anaerobic digestion by removal with a hollow fiber membrane contactor. *Water Research*, **46**(15), 4861-9.
- Leclerc, M., Delgenes, J.P., Godon, J.J. 2004. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology*, **6**(8), 809-19.
- Lee, J.-Y., Lee, S.-H., Park, H.-D. 2016. Enrichment of specific electro-active microorganisms and enhancement of methane production by adding granular activated carbon in anaerobic reactors. *Bioresource Technology*, **205**, 205-212.
- Lee, S.-H., Park, J.-H., Kim, S.-H., Yu, B.J., Yoon, J.-J., Park, H.-D. 2015. Evidence of syntrophic acetate oxidation by Spirochaetes during anaerobic methane production. *Bioresource Technology*, **190**, 543-549.
- Lee, S.H., Kang, H.J., Lee, Y.H., Lee, T.J., Han, K., Choi, Y., Park, H.D. 2012. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. *Journal of Environmental Monitoring*, **14**(7), 1893-905.
- Lefebvre, O., Quentin, S., Torrijos, M., Godon, J.J., Delgenes, 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), 61-9.
- Lei, X., Sugiura, N., Feng, C., Maekawa, T. 2007. Pretreatment of anaerobic digestion effluent with ammonia stripping and biogas purification. *Journal of Hazardous Materials*, **145**(3), 391-397.
- Lerm, S., Kleybocker, A., Miethling-Graff, R., Alawi, M., Kasina, M., Liebrich, M., Wurdemann, H. 2012. Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. *Waste Management*, **32**(3), 389-99.

- Lertsittichai, S., Lertsutthiwong, P., Phalakornkule, C. 2007. Improvement of upflow anaerobic sludge bed performance using chitosan. *Water Environment and Research*, **79**(7), 801-7.
- Levén, L., Nyberg, K., Korkea-Aho, L., Schnürer, A. 2006. Phenols in anaerobic digestion processes and inhibition of ammonia oxidising bacteria (AOB) in soil. *The Science of the Total Environment*, **364**(1-3), 229-38.
- Levén, L., Nyberg, K., Schnürer, A. 2012. Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste--a review of important microorganisms and impact of temperature. *Journal of Environmental Management*, **95 Suppl**, S99-103.
- Levén, L., Schnürer, A. 2010. Molecular characterisation of two anaerobic phenol-degrading enrichment cultures. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **64**(6), 427-433.
- Li, J., Rui, J., Yao, M., Zhang, S., Yan, X., Wang, Y., Yan, Z., Li, X. 2015. Substrate type and free ammonia determine bacterial community structure in full-scale mesophilic anaerobic digesters treating cattle or swine manure. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1337.
- Li, J.P., Healy, M.G., Zhan, X.M., Rodgers, M. 2008. Nutrient removal from slaughterhouse wastewater in an intermittently aerated sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, **99**(16), 7644-7650.
- Li, X.M., Liu, Q.Q., Yang, Q., Guo, L., Zeng, G.M., Hu, J.M., Zheng, W. 2009. Enhanced aerobic sludge granulation in sequencing batch reactor by Mg²⁺ augmentation. *Bioresource Technology*, **100**(1), 64-67.
- Liew, L.N., Shi, J., Li, Y. 2011. Enhancing the solid-state anaerobic digestion of fallen leaves through simultaneous alkaline treatment. *Bioresource Technology*, **102**(19), 8828-8834.
- Lin, C.-Y. 1993. Effect of heavy metals on acidogenesis in anaerobic digestion. *Water Research*, **27**(1), 147-152.
- Lin, C.-Y., Chen, C.-C. 1999. Effect of heavy metals on the methanogenic UASB granule. *Water Research*, **33**(2), 409-416.
- Lin, L., Wan, C., Liu, X., Lei, Z., Lee, D.J., Zhang, Y., Tay, J.H., Zhang, Z. 2013. Anaerobic digestion of swine manure under natural zeolite addition: VFA evolution, cation variation, and related microbial diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(24), 10575-83.
- Lindmark, J., Eriksson, P., Thorin, E. 2014. The effects of different mixing intensities during anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. *Waste Management*, **34**(8), 1391-1397.
- Lins, P., Reitschuler, C., Illmer, P. 2012. Development and evaluation of inocula combating high acetate concentrations during the start-up of an anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **110**, 167-73.
- Lins, P., Reitschuler, C., Illmer, P. 2014. *Methanosarcina* spp., the key to relieve the start-up of a thermophilic anaerobic digestion suffering from high acetic acid loads. *Bioresource Technology*, **152**, 347-54.
- Liu, F., Rotaru, A.E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., Lovley, D.R. 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy and Environmental Science*, **5**(10), 8982-8989.
- Liu, L., Gao, D.-W., Zhang, M., Fu, Y. 2010. Comparison of Ca²⁺ and Mg²⁺ enhancing aerobic granulation in SBR. *Journal of Hazardous Materials*, **181**(1-3), 382-387.
- Liu, Y., Boone, D.R. 1991. Effects of salinity on methanogenic decomposition. *Bioresource Technology*, **35**(3), 271-273.

- Liu, Y., Zhang, Y., Ni, B.J. 2015. Evaluating enhanced sulfate reduction and optimized volatile fatty acids (VFA) composition in anaerobic reactor by Fe (III) addition. *Environmental Science and Technology*, **49**(4), 2123-31.
- Loh, K.-C., Wang, Y. 2006. Enhanced Cometabolic Transformation of 4-Chlorophenol in the Presence of Phenol by Granular Activated Carbon Adsorption. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, **84**(2), 248-255.
- Lovley, D.R., Klug, M.J. 1983. Methanogenesis from Methanol and Methylamines and Acetogenesis from Hydrogen and Carbon Dioxide in the Sediments of a Eutrophic Lake. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(4), 1310-1315.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, **32**(4), 1363-71.
- Luo, G., De Francisci, D., Kougiyas, P.G., Laura, T., Zhu, X., Angelidaki, I. 2015. New steady-state microbial community compositions and process performances in biogas reactors induced by temperature disturbances. *Biotechnology for Biofuels*, **8**(1), 1-10.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G. 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **45**, 540-555.
- Martin-Ryals, A., Schideman, L., Li, P., Wilkinson, H., Wagner, R. 2015. Improving anaerobic digestion of a cellulosic waste via routine bioaugmentation with cellulolytic microorganisms. *Bioresource Technology*, **189**, 62-70.
- Masse, D.I., Masse, L., Xia, Y., Gilbert, Y. 2010. Potential of low-temperature anaerobic digestion to address current environmental concerns on swine production. *Journal of Animal Science*, **88**(13 Suppl), E112-20.
- Mata-Alvarez, J. 2003. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA Publishing, **323**.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, **74**(1), 3-16.
- Maus, I., Wibberg, D., Stantscheff, R., Eikmeyer, F.G., Seffner, A., Boelter, J., Szczepanowski, R., Blom, J., Jaenicke, S., König, H., Puhler, A., Schluter, A. 2012. Complete genome sequence of the hydrogenotrophic, methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2(T), Isolated from a sewage sludge digester. *Journal of Bacteriology*, **194**(19), 5487-8.
- Mazéas, L., Vigneron, V., Le-Menach, K., Budzinski, H., Audic, J.M., Bernet, N., Bouchez, T. 2008. Elucidation of nitrate reduction pathways in anaerobic bioreactors using a stable isotope approach. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **22**(11), 1746-50.
- McCartney, D.M., Oleszkiewicz, J.A. 1991. Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Research*, **25**(2), 203-209.
- Merlin Christy, P., Gopinath, L.R., Divya, D. 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **34**, 167-173.
- Milán, Z., Sánchez, E., Weiland, P., Borja, R., Martí, amp, x, n, A., Ilangoan, K. 2001. Influence of different natural zeolite concentrations on the anaerobic digestion of piggery waste. *Bioresource Technology*, **80**(1), 37-43.

- Moestedt, J., Nilsson Påledal, S., Schnürer, A. 2013. The effect of substrate and operational parameters on the abundance of sulphate-reducing bacteria in industrial anaerobic biogas digesters. *Bioresource Technology*, **132**, 327-332.
- Moletta, R. 2015. La méthanisation. 3ème édition. Tec & Doc. Editions Lavoisier. Paris.
- Moletta, R. 1993. Les bases biochimiques de la méthanisation. *Biofutur*, **Janvier 1993**.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quemeneur, M., Trably, E., Steyer, J.P., Carrere, H. 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, **32**(5), 934-51.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., Angeles de la la Rubia, M. 2012. Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Applied Clay Science*, **58**, 125-133.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Travieso, L., Sánchez, E., Díaz, F. 2006. Use of natural zeolite at different doses and dosage procedures in batch and continuous anaerobic digestion of synthetic and swine wastes. *Resources, Conservation and Recycling*, **47**(1), 26-41.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Robles, M., Mery, C., Huiliñir, C., Borja, R. 2014. Start-up and performance of UASB reactors using zeolite for improvement of nitrate removal process. *Ecological Engineering*, **70**, 437-445.
- Moset, V., Poulsen, M., Wahid, R., Højberg, O., Møller, H.B. 2015. Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: methane productivity and microbial ecology. *Microbial Biotechnology*, **8**(5), 787-800.
- Moteleb, M.A., Suidan, M.T., Kim, J., Davel, J.L., Adrian, N.R. 2001. Anaerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene in granular activated carbon fluidized bed and batch reactors. *Water Science and Technology*, **43**(1), 67-75.
- Na, J.-G., Lee, M.-K., Yun, Y.-M., Moon, C., Kim, M.-S., Kim, D.-H. 2016. Microbial community analysis of anaerobic granules in phenol-degrading UASB by next generation sequencing. *Biochemical Engineering Journal*, **112**, 241-248.
- Nelson, M.C., Morrison, M., Yu, Z. 2011. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, **102**(4), 3730-9.
- Neumann, L., Scherer, P. 2011. Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops. *Bioresource Technology*, **102**(3), 2931-2935.
- Ng, A., Torpy, M., Rose, C. 1988. Control of anaerobic digestion toxicity with powdered activated carbon. *Journal of Environmental Engineering*, **114**(3), 593-605.
- Nie, Y., Liu, H., Du, G., Chen, J. 2008. Acetate yield increased by gas circulation and fed-batch fermentation in a novel syntrophic acetogenesis and homoacetogenesis coupling system. *Bioresource Technology*, **99**(8), 2989-95.
- Nielsen, A.M., Spanjers, H., Volcke, E.I. 2008. Calculating pH in pig manure taking into account ionic strength. *Water Science and Technology*, **57**(11), 1785-90.
- Nielsen, H.B., Mladenovska, Z., Ahring, B.K. 2007. Bioaugmentation of a two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion concept for improvement of the methane yield from cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**(6), 1638-43.
- Nordell, E., Hansson, A.B., Karlsson, M. 2013. Zeolites relieves inhibitory stress from high concentrations of long chain fatty acids. *Waste Management*, **33**(12), 2659-63.
- Nsereko, V.L., Morgavi, D.P., Rode, L.L.M., Beauchemin, K.A., McAllister, T.A. 2000. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, **88**(3-4), 153-170.

- Oleszkiewicz, J.A., Sharma, V.K. 1990. Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals - A review. *Biological Wastes*, **31**(1), 45-67.
- Olguín-Lora, P., Puig-Grajales, L., Razo-Flores, E. 2003. Inhibition of the acetoclastic methanogenic activity by phenol and alkyl phenols. *Environmental Technology*, **24**(8), 999-1006.
- Olguín-Lora, P., Razo-Flores, E. 2004. Anaerobic biodegradation of phenol in sulfide-rich media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**(6), 554-561.
- Omil, F., Bakker, C.D., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. 1997. Effect of pH and low temperature shocks on the competition between sulphate reducing bacteria and methane producing bacteria in UASB reactors. *Environmental Technology*, **18**(3), 255-264.
- Parthasarathy, S., Gomes, R.L., Manickam, S. 2016. Process intensification of anaerobically digested palm oil mill effluent (AAD-POME) treatment using combined chitosan coagulation, hydrogen peroxide (H₂O₂) and Fenton's oxidation. *Clean Technologies and Environmental Policy*, **18**(1), 219-230.
- Patel, G.B., Khan, A.W., Agnew, B.J., Colvin, J.R. 1980. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov., sp. nov.†. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **30**(1), 179-185.
- Paul, K., Nonoh, J.O., Mikulski, L., Brune, A. 2012. "Methanoplasmatales," Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(23), 8245-53.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E. 1991. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Control*, **21**(5-6), 411-490.
- Pender, S., Toomey, M., Carton, M., Eardly, D., Patching, J.W., Colleran, E., O'Flaherty, V. 2004. Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Water Research*, **38**(3), 619-30.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**(6), 927-55.
- Pereira, M.A., Pires, O.C., Mota, M., Alves, M.M. 2005. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, **92**(1), 15-23.
- Philippidis, G.P., Smith, T.K. 1995. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **51-2**(1), 117-124.
- Poggi-Varaldo, H.M., Barcenas-Torres, J.D., Moreno-Medina, C.U., Garcia-Mena, J., Garibay-Orijel, C., Rios-Leal, E., Rinderknecht-Seijas, N. 2012. Influence of discontinuing feeding degradable cosubstrate on the performance of a fluidized bed bioreactor treating a mixture of trichlorophenol and phenol. *Journal of Environmental Management*, **113**, 527-37.
- Poirier, S., Desmond-Le Quémener, E., Madigou, C., Bouchez, T., Chapleur, O. 2016. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: Identification of key microbial phylotypes. *Bioresource Technology*, **207**, 92-101.
- Qu, X., Mazéas, L., Vavilin, V.A., Epissard, J., Lemunier, M., Mouchel, J.M., He, P.J., Bouchez, T. 2009. Combined monitoring of changes in $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ and archaeal

- community structure during mesophilic methanization of municipal solid waste. *FEMS Microbiology Ecology*, **68**(2), 236-45.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, **41**(Database issue), D590-6.
- Rajagopal, R., Masse, D.I., Singh, G. 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology*, **143**, 632-41.
- Ramos, I., Perez, R., Reinoso, M., Torio, R., Fdz-Polanco, M. 2014. Microaerobic digestion of sewage sludge on an industrial-pilot scale: the efficiency of biogas desulphurisation under different configurations and the impact of O₂ on the microbial communities. *Bioresource Technology*, **164**, 338-46.
- Regueiro, L., Carballa, M., Lema, J.M. 2014a. Outlining microbial community dynamics during temperature drop and subsequent recovery period in anaerobic co-digestion systems. *Journal of Biotechnology*, **192 Pt A**, 179-86.
- Regueiro, L., Carballa, M., Lema, J.M. 2014b. Outlining microbial community dynamics during temperature drop and subsequent recovery period in anaerobic co-digestion systems. *Journal of Biotechnology*, **192, Part A**, 179-186.
- Regueiro, L., Lema, J.M., Carballa, M. 2015. Key microbial communities steering the functioning of anaerobic digesters during hydraulic and organic overloading shocks. *Bioresource Technology*, **197**, 208-216.
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Lema, J.M., Carballa, M. 2014c. Influence of transitional states on the microbial ecology of anaerobic digesters treating solid wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**(5), 2015-27.
- Rhodes, C.J. 2010. Properties and applications of zeolites. *Science Progress*, **93**(Pt 3), 223-84.
- Rinzema, A., Boone, M., van Knippenberg, K., Lettinga, G. 1994. Bactericidal effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion. *Water Environment and Research*, **66**(1), 40-49.
- Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A. 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME journal*, **3**(6), 700-14.
- Rodriguez-Freire, L., Moore, S.E., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A. 2015. Adaptation of a methanogenic consortium to arsenite inhibition. *Water, Air, and Soil Pollution*, **226**(12), 414.
- Romano, R.T., Zhang, R., Teter, S., McGarvey, J.A. 2009. The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of Jose Tall Wheat Grass. *Bioresource Technology*, **100**(20), 4564-4571.
- Romero-Güiza, M.S., Vila, J., Mata-Alvarez, J., Chimenos, J.M., Astals, S. 2016. The role of additives on anaerobic digestion: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **58**, 1486-1499.
- Rosenkranz, F., Cabrol, L., Carballa, M., Donoso-Bravo, A., Cruz, L., Ruiz-Filippi, G., Chamy, R., Lema, J.M. 2013. Relationship between phenol degradation efficiency and microbial community structure in an anaerobic SBR. *Water Research*, **47**(17), 6739-49.
- Rui, J., Li, J., Zhang, S., Yan, X., Wang, Y., Li, X. 2015. The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters. *Biotechnology for Biofuels*, **8**(1), 1-15.
- Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord.

- nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**(Pt 4), 929-36.
- Sanders, W.T., Geerink, M., Zeeman, G., Lettinga, G. 2000. Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates. *Water Science and Technology*, **41**(3), 17-24.
- Schauer-Gimenez, A.E., Zitomer, D.H., Maki, J.S., Struble, C.A. 2010. Bioaugmentation for improved recovery of anaerobic digesters after toxicant exposure. *Water Research*, **44**(12), 3555-64.
- Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**(2), 262-80.
- Schink, B., Philipp, B., Muller, J. 2000. Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften*, **87**(1), 12-23.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K. 1993. Effects of magnesium on thermophilic acetate-degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, **15**(4), 304-310.
- Schnürer, A., Nordberg, A. 2008. Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Science and Technology*, **57**(5), 735-40.
- Schnürer, A., Zellner, G., Svensson, B.H. 1999. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology Ecology*, **29**(3), 249-261.
- Shao, L.M., He, P.J., Li, G.J. 2008. In situ nitrogen removal from leachate by bioreactor landfill with limited aeration. *Waste Management*, **28**(6), 1000-7.
- Show, K.-Y., Wang, Y., Foong, S.-F., Tay, J.-H. 2004. Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Research*, **38**(9), 2293-2304.
- Siegert, I., Banks, C. 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry*, **40**(11), 3412-3418.
- Siriwongrungson, V., Zeng, R.J., Angelidaki, I. 2007. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water Research*, **41**(18), 4204-10.
- Soto, M., Méndez, R., Lema, J.M. 1991. Biodegradability and toxicity in the anaerobic treatment of fish canning wastewaters. *Environmental Technology*, **12**(8), 669-677.
- Strik, D.P., Domnanovich, A.M., Holubar, P. 2006. A pH-based control of ammonia in biogas during anaerobic digestion of artificial pig manure and maize silage. *Process Biochemistry*, **41**(6), 1235-1238.
- Su, H., Liu, L., Wang, S., Wang, Q., Jiang, Y., Hou, X., Tan, T. 2015. Semi-continuous anaerobic digestion for biogas production: influence of ammonium acetate supplement and structure of the microbial community. *Biotechnology for Biofuels*, **8**, 13.
- Subramanyam, R. 2013. Physicochemical and Morphological Characteristics of Granular Sludge in Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors. *Environmental Engineering Science*, **30**(5), 201-212.
- Sun, Z.-Y., Yamaji, S., Cheng, Q.-S., Yang, L., Tang, Y.-Q., Kida, K. 2014. Simultaneous decrease in ammonia and hydrogen sulfide inhibition during the thermophilic anaerobic digestion of protein-rich stillage by biogas recirculation and air supply at 60°C. *Process Biochemistry*, **49**(12), 2214-2219.
- Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H., Sorensen, S.J., Karlsson, A. 2013. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiology Ecology*, **85**(3), 612-26.

- Sung, S., Liu, T. 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere*, **53**(1), 43-52.
- Tada, C., Yang, Y., Hanaoka, T., Sonoda, A., Ooi, K., Sawayama, S. 2005. Effect of natural zeolite on methane production for anaerobic digestion of ammonium rich organic sludge. *Bioresource Technology*, **96**(4), 459-64.
- Tale, V.P., Maki, J.S., Zitomer, D.H. 2015. Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community. *Water Research*, **70**, 138-147.
- Tang, Y., Shigematsu, T., Ikbal, Morimura, S., Kida, K. 2004. The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. *Water Research*, **38**(10), 2537-2550.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, **41**(1), 100-80.
- Tong, X., Smith, L.H., McCarty, P.L. 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, **21**(4), 239-255.
- Town, J.R., Dumonceaux, T.J. 2016. Laboratory-scale bioaugmentation relieves acetate accumulation and stimulates methane production in stalled anaerobic digesters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**(2), 1009-17.
- Trably, E., Patureau, D., Delgenes, J.P. 2005. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Removal during Anaerobic and Aerobic Sludge Treatments. in: *Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems*, (Eds.) E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, D. Robert, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 431-440.
- Uludag-Demirer, S., Demirer, G.N., Chen, S. 2005. Ammonia removal from anaerobically digested dairy manure by struvite precipitation. *Process Biochemistry*, **40**(12), 3667-3674.
- Vallero, M.V., Hulshoff Pol, L.W., Lens, P.N., Lettinga, G. 2002. Effect of high salinity on the fate of methanol during the start-up of thermophilic (55°C) sulfate reducing reactors. *Water Science and Technology*, **45**(10), 121-6.
- Van Lier, J.B., Grolle, K.C., Frijters, C.T., Stams, A.J., Lettinga, G. 1993. Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(4), 1003-1011.
- Van Velsen, A.F.M. 1979. Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations. *Water Research*, **13**(10), 995-999.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Ho, D.P., Batstone, D.J., Tyson, G.W. 2014. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, **27**, 55-64.
- Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H., Hamelers, B. 2000. Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. *Journal of Environmental Engineering*, **126**(12), 1076-1081.
- Veeresh, G.S., Kumar, P., Mehrotra, I. 2005. Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research*, **39**(1), 154-170.
- Vigneron, V., Ponthieu, M., Barina, G., Audic, J.M., Duquennoi, C., Mazeas, L., Bernet, N., Bouchez, T. 2007. Nitrate and nitrite injection during municipal solid waste anaerobic biodegradation. *Waste Management*, **27**(6), 778-91.
- Visser, A., Gao, Y., Lettinga, G. 1993. Effects of short-term temperature increases on the mesophilic anaerobic breakdown of sulfate containing synthetic wastewater. *Water Research*, **27**(4), 541-550.

- Walker, M., Iyer, K., Heaven, S., Banks, C.J. 2011. Ammonia removal in anaerobic digestion by biogas stripping: An evaluation of process alternatives using a first order rate model based on experimental findings. *Chemical Engineering Journal*, **178**, 138-145.
- Wang, H., Fotidis, I.A., Angelidaki, I. 2015. Ammonia effect on hydrogenotrophic methanogens and syntrophic acetate oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(16), 5261-5267.
- Wang, W., Han, H., Yuan, M., Li, H. 2010. Enhanced anaerobic biodegradability of real coal gasification wastewater with methanol addition. *Journal of Environmental Sciences*, **22**(12), 1868-1874.
- Wang, X., Lu, X., Li, F., Yang, G. 2014. Effects of temperature and carbon-nitrogen (C/N) ratio on the performance of anaerobic co-digestion of dairy manure, chicken manure and rice straw: focusing on ammonia inhibition. *PLoS One*, **9**(5), e97265.
- Wang, Y., David Gabbard, H., Pai, P. 1991. Inhibition of Acetate Methanogenesis by Phenols. *Journal of Environmental Engineering*, **117**(4), 487-500.
- Wang, Y., Qian, P.Y. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, **4**(10), e7401.
- Watanabe, R., Tada, C., Baba, Y., Fukuda, Y., Nakai, Y. 2013. Enhancing methane production during the anaerobic digestion of crude glycerol using Japanese cedar charcoal. *Bioresource Technology*, **150**, 387-92.
- Weiss, S., Lebuhn, M., Andrade, D., Zankel, A., Cardinale, M., Birner-Gruenberger, R., Somitsch, W., Ueberbacher, B.J., Guebitz, G.M. 2013. Activated zeolite - suitable carriers for microorganisms in anaerobic digestion processes? *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(7), 3225-38.
- Werner, J.J., Garcia, M.L., Perkins, S.D., Yarasheski, K.E., Smith, S.R., Muegge, B.D. 2014. Microbial community dynamics and stability during an ammonia-induced shift to syntrophic acetate oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**.
- Westerholm, M., Levén, L., Schnürer, A. 2012. Bioaugmentation of syntrophic acetate-oxidizing culture in biogas reactors exposed to increasing levels of ammonia. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(21), 7619-25.
- Wilson, C.A., Murthy, S.M., Fang, Y., Novak, J.T. 2008. The effect of temperature on the performance and stability of thermophilic anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **57**(2), 297-304.
- Wirth, B., Krebs, M., Andert, J. 2015. Anaerobic degradation of increased phenol concentrations in batch assays. *Environmental Science and Pollution Research International*, **22**(23), 19048-59.
- Wittmann, C., Zeng, A.P., Deckwer, W.D. 1995. Growth inhibition by ammonia and use of a pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenolicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44**(3-4), 519-25.
- Xu, S., He, C., Luo, L., Lü, F., He, P., Cui, L. 2015. Comparing activated carbon of different particle sizes on enhancing methane generation in upflow anaerobic digester. *Bioresource Technology*, **196**, 606-12.
- Yamaguchi, T., Harada, H., Hisano, T., Yamazaki, S., Tseng, I.C. 1999. Process behavior of UASB reactor treating a wastewater containing high strength sulfate. *Water Research*, **33**(14), 3182-3190.
- Yang, Q., Luo, K., Li, X.-m., Wang, D.-b., Zheng, W., Zeng, G.-m., Liu, J.-j. 2010. Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. *Bioresource Technology*, **101**(9), 2924-2930.

- Ye, C., Yang, X., Zhao, F.-J., Ren, L. 2016. The shift of the microbial community in activated sludge with calcium treatment and its implication to sludge settleability. *Bioresource Technology*, **207**, 11-18.
- Yenigün, O., Demirel, B. 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry*, **48**(5–6), 901-911.
- Yilmazel, Y.D., Demirel, G.N. 2013. Nitrogen and phosphorus recovery from anaerobic co-digestion residues of poultry manure and maize silage via struvite precipitation. *Waste Management and Research*, **31**(8), 792-804.
- Yilmazel, Y.D., Demirel, G.N. 2011. Removal and recovery of nutrients as struvite from anaerobic digestion residues of poultry manure. *Environmental Technology*, **32**(7-8), 783-94.
- Yu, C., Li, D., Wang, Q., Zhang, Z., Yang, Y. 2015. Improving anaerobic methane production from ammonium-rich piggery waste in a zeolite-fixed bioreactor and evaluation of ammonium adsorbed on zeolite A-3 as fertilizer. *International Journal of Waste Resources*, **2014**.
- Yu, H.Q., Tay, J.H., Fang, H.H.P. 2001. The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research*, **35**(4), 1052-1060.
- Yu, Z., Smith, G.B. 2000. Inhibition of methanogenesis by C1- and C2-polychlorinated aliphatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**(9), 2212-2217.
- Yuan, S.Y., Chang, B.V. 2007. Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan. *Journal of Environmental Science and Health*, **42**(1), 63-9.
- Zayed, G., Winter, J. 2000. Inhibition of methane production from whey by heavy metals--protective effect of sulfide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**(6), 726-31.
- Zhang, B., He, P.-j., Lü, F., Shao, L.-m., Wang, P. 2007. Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Research*, **41**(19), 4468-4478.
- Zhang, L., Lee, Y.W., Jahng, D. 2012a. Ammonia stripping for enhanced biomethanization of piggery wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, **199-200**, 36-42.
- Zhang, L., Ouyang, W., Lia, A. 2012b. Essential Role of Trace Elements in Continuous Anaerobic Digestion of Food Waste. *Procedia Environmental Sciences*, **16**, 102-111.
- Zhang, T., Ke, S.Z., Liu, Y., Fang, H.H.P. 2005. Microbial characteristics of a methanogenic phenol-degrading sludge. *Water Science and Technology*, **52**(1-2), 73-8.
- Zhang, Y., Angelidaki, I. 2015. Submersible microbial desalination cell for simultaneous ammonia recovery and electricity production from anaerobic reactors containing high levels of ammonia. *Bioresource Technology*, **177**, 233-9.
- Zhang, Y., Feng, Y., Quan, X. 2015. Zero-valent iron enhanced methanogenic activity in anaerobic digestion of waste activated sludge after heat and alkali pretreatment. *Waste Management*, **38**, 297-302.
- Zhao, J., Zheng, Y., Li, Y. 2014. Fungal pretreatment of yard trimmings for enhancement of methane yield from solid-state anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **156**, 176-181.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Wang, L., Quan, X. 2015. Potential for direct interspecies electron transfer in an electric-anaerobic system to increase methane production from sludge digestion. *Scientific Reports*, **5**, 11094.
- Zhu, M., Lu, F., Hao, L., He, P., Shao, L.M. 2009. Regulating the hydrolysis of organic wastes by micro-aeration and effluent recirculation. *Waste Management*, **29**(7), 2042-50.

- Ziganshin, A.M., Liebetrau, J., Proter, J., Kleinsteuber, S. 2013. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(11), 5161-74.
- Ziganshina, E.E., Belostotskiy, D.E., Ilinskaya, O.N., Boulygina, E.A., Grigoryeva, T.V., Ziganshin, A.M. 2015. Effect of the Organic Loading Rate Increase and the Presence of Zeolite on Microbial Community Composition and Process Stability During Anaerobic Digestion of Chicken Wastes. *Microbial Ecology*, **70**(4), 948-60.
- Zinder, S.H., Anguish, T., Cardwell, S.C. 1984. Effects of Temperature on Methanogenesis in a Thermophilic (58°C) Anaerobic Digester. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**(4), 808-813.
- 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.

Title : Anaerobic digestion inhibitions: ecological dynamics, microbial indicators and resistance strategies. Examples of phenol and ammonia nitrogen

Keywords : Methanization, biowaste, perturbation, 16S sequencing, multivariate analysis, support media.

Abstract :

Anaerobic digestion (AD) is based on a complex biological network forming a real ecosystem. Nevertheless, the balance of this ecosystem is subjected to various perturbations induced by inhibitory molecules. In order to increase the robustness of this bioprocess, a better understanding of the inhibition effects on the microbial ecosystem is now needed. New solutions are also expected to enhance the resistance of digesters facing perturbations. During this work, we characterized in detail the effect of total ammonia nitrogen (TAN) and phenol, two inhibitors regularly involved in industrial units' disruptions, on the mesophilic AD of biowaste collected on a deconditioning platform.

A first set of experiment, conducted in batch digesters aimed at studying the response of a microbial ecosystem collected on an industrial digester treating aerobic sludge, to different inhibition levels. Ten concentrations were assessed for each of the inhibitors (ranging from 0 up to 5 g/L of phenol and from 0 up to 50 g/L of TAN). Half-inhibiting concentrations (IC_{50}) characterizing the resistance capacity of the inoculum, were determined: 1.5 g/L of phenol and 19.0 g/L of TAN. The impact of different inhibiting concentrations towards the microbial diversity was investigated with high throughput rRNA 16S sequencing. Results showed that the functional resistance of the ecosystem to highest inhibitors concentrations was associated with important rearrangements of the microbial diversity. Within methanogenic populations, increasing inhibiting concentrations of phenol and TAN led to the implantation of genus *Methanoculleus* at the expense of *Methanosarcina*. The composition of bacterial syntrophic populations was also altered by the presence of both inhibitors. While family Syntrophomonadaceae was predominant under non-inhibiting conditions, families Synergistaceae and Spirochaetaceae became more abundant in presence of phenol and TAN, respectively.

During the second set of experiment, five support media (2 zeolites, 2 activated carbons and chitosan) were introduced in parallel within batch digesters, so as to assess their capacity to limit the inhibition exerted by a concentration corresponding to each of the IC_{50} previously determined. Under non-inhibiting conditions, support materials neither influenced the performance nor the composition of the microbial ecosystem. With phenol, each of the support enhanced biogas production while accelerating this inhibitor degradation. Some of the populations, such as genus *Methanosarcina*, which were also present under non-inhibiting conditions, were preserved. Moreover, even though support media did not influence TAN concentration, both zeolites and one of the activated carbons alleviated its inhibition by favoring the implantation of new populations such as family Marinilabiaceae. Both zeolites also maintained genus *Methanosarcina* within the ecosystem. In order to assess how these results could be transposed to other reactor configurations; one zeolite and one activated carbon were introduced in parallel within semi-continuous digesters after a step-wise inhibition by phenol was applied. Results obtained in batch digesters were confirmed with digesters whose functioning is closer to industrial units. This work revealed correlations between anaerobic digestion performance and structural modifications within archaeal and bacterial community composition. Microbial indicators, specific to the level and to the type of inhibition were evidenced. These results provide new insights with a view to conduct an ecological management of the anaerobic digesters. Furthermore, support material addition showed promising results to counteract inhibitions associated with phenol and TAN.

Titre : Inhibitions de la digestion anaérobie : dynamiques écologiques, indicateurs microbiens et stratégies de résistance. Cas du phénol et de l'azote ammoniacal

Mots-clés : Méthanisation, biodéchet, perturbation, séquençage 16S, analyse multivariée, supports

Résumé :

La digestion anaérobie (DA) repose sur un processus biologique complexe impliquant un véritable écosystème microbien dont l'équilibre est parfois menacé par diverses perturbations induites par des substances inhibitrices. Afin d'augmenter la robustesse de ce bioprocédé, une meilleure compréhension des phénomènes d'inhibition et de leurs effets sur l'écosystème microbien est aujourd'hui nécessaire. Il est également souhaitable de développer de nouvelles solutions pour améliorer la résistance des digesteurs face à l'arrivée de ces perturbateurs. Au cours de ce travail, nous avons caractérisé en détail l'effet de l'azote ammoniacal (NH_4) et du phénol, deux inhibiteurs régulièrement impliqués dans le dysfonctionnement d'unités industrielles, sur la DA mésophile de biodéchets issus d'une plate-forme de déconditionnement.

Une première expérimentation en digesteurs batchs a consisté en l'étude de la réponse d'un écosystème microbien issu d'un digesteur industriel de boues à différents niveaux d'inhibition. Dix concentrations ont été testées pour chacun des inhibiteurs (échelonnées de 0 à 5 g/L de phénol et de 0 à 50 g/L de NH_4). Des concentrations inhibitrices médianes (CI_{50}), caractéristiques du niveau de résistance de l'inoculum, ont été déterminées : 1.5 g/L de phénol et 19.0 g/L de NH_4 . L'impact des différentes concentrations d'inhibiteur sur la diversité microbienne a été caractérisé par le biais d'un séquençage haut-débit du gène codant l'ARNr 16S. Ces observations ont montré que la résistance fonctionnelle de l'écosystème s'accompagnait d'importantes réorganisations de la diversité microbienne. Au sein des archées, les concentrations inhibitrices croissantes de ces deux composés ont favorisé l'implantation du genre *Methanoculleus* au détriment de *Methanosarcina*. La composition des populations bactériennes syntrophiques a également été altérée. Alors que la famille Syntrophomonadaceae était majoritaire en l'absence d'inhibition ; les familles Synergistaceae et Spirochaetaceae sont respectivement devenues prédominantes en présence de phénol et de NH_4 .

Lors d'une seconde expérimentation, cinq supports (2 zéolithes, 2 charbons actifs et du chitosane) ont été introduits en parallèle au sein de digesteurs batchs, afin d'évaluer leur capacité à limiter l'inhibition causée par une concentration équivalente à chacune des CI_{50} . En l'absence d'inhibition, il a été constaté que ces supports n'ont pas modifié les performances et la composition de l'écosystème. En présence de phénol, chacun des supports a amélioré la production de biogaz tout en accélérant la dégradation de cet inhibiteur. Certaines populations, telles que le genre *Methanosarcina*, présent en l'absence d'inhibition, ont pu être préservées. Bien que les supports n'aient pas influé sur la concentration en NH_4 , les zéolithes et l'un des charbons actifs ont limité son inhibition en favorisant la présence de nouvelles populations telles que la famille Marinilabiaceae. Les zéolithes ont également permis de maintenir le genre *Methanosarcina* au sein de l'écosystème. Afin d'évaluer dans quelle mesure ces résultats pouvaient être transposés à d'autres configurations de réacteurs, une zéolithe et un charbon actif ont été parallèlement introduits dans des digesteurs semi-continus sur lesquels une inhibition graduelle par le phénol avait été appliquée. Les résultats acquis en digesteurs batchs ont été confirmés sur des systèmes se rapprochant du fonctionnement d'unités industrielles. Ce travail a permis d'établir qu'il existait des corrélations entre les performances de la DA et la composition des communautés microbiennes, permettant ainsi de proposer, dans les configurations étudiées, des indicateurs microbiens spécifiques au niveau et au type d'inhibition. Ces résultats fournissent de nouvelles pistes dans l'optique d'une gestion écologique des bioprocédés. Par ailleurs, l'utilisation de supports en vue de la réduction des inhibitions liées au phénol et au NH_4 semble prometteuse.