



HAL
open science

Influence de différents facteurs opérationnels sur la structure des communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie

Xavier Goux

► **To cite this version:**

Xavier Goux. Influence de différents facteurs opérationnels sur la structure des communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie. Sciences agricoles. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0292 . tel-01754584

HAL Id: tel-01754584

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754584>

Submitted on 30 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Luxembourg Institute of Science and Technology

UMR 1120 Sols & Environnement-INRA

Ecole doctorale RP2E

« Ressources Procédés Produits Environnement »

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur en Sciences Agronomiques
de l'Université de Lorraine**

Par

Xavier Goux

Influence de différents facteurs opérationnels sur la structure des
communautés microbiennes impliquées dans le processus de
digestion anaérobie

Soutenue publiquement le 18 Décembre 2015 devant le jury composé de :

M. Georges Barbier	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
M. Patrick Gerin	Professeur, Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Mme Magdalena Calusinska	Docteur, LIST	Examinatrice
M. Pascal Simonet	Directeur de Recherche, CNRS	Examineur
M. Emile Benizri	Professeur, Université de Lorraine - LSE/INRA	Directeur de thèse
M. Philippe Delfosse	Chef de Projet, LIST	Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier, à travers ces quelques lignes, l'ensemble des personnes, qui de près ou de loin, ont contribué à cette thèse.

Je souhaite en premier lieu remercier chaleureusement **Emile Benizri** et **Philippe Delfosse** qui ont accepté d'encadrer mon travail. Voilà maintenant plusieurs années que nous nous sommes rencontrés, à chaque fois par l'intermédiaire de stages, durant lesquels vous étiez déjà à l'époque mes encadrants. Je tiens à vous remercier sincèrement pour m'avoir transmis, au fil du temps, votre passion pour la recherche et pour avoir grandement contribué à mon épanouissement personnel.

Cette thèse aurait eu une toute autre saveur sans l'implication, les conseils et les encouragements de **Magdalena Calusinska**. Un grand merci pour ces trois années passées à mes côtés, tant au bureau que derrière la paillasse. Merci pour l'aide que tu m'as apportée, les moments de réflexions et les discussions toujours enrichissantes que nous avons partagés. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. J'ai énormément appris à tes côtés et je te dois énormément.

Je souhaite également vivement remercier les chercheurs qui ont accepté d'évaluer cette thèse : Monsieur **Pascal Simonet**, Directeur de Recherche au CNRS, Monsieur **Patrick Gerin**, Professeur à l'Université Catholique de Louvain et Monsieur **Georges Barbier**, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale.

Lors de ma première année de thèse, j'ai eu la chance de partir quelques mois me former à différentes techniques de biologie moléculaire au sein du groupe de **Michael Klocke** à l'ATB de Potsdam. Je le remercie, ainsi que toute son équipe, pour l'accueil et le temps qu'ils m'ont accordés. Je tiens également à remercier tout particulièrement **Ingo Bergmann** et **Beate-Kristin Kröck** pour les journées agréables passées à leurs côtés au laboratoire ou en dehors, ainsi que leur soutien indéniab. **Ingo**, merci également pour les bons moments passés à Potsdam, Berlin, Rostock, Metz et Rome !

La recherche est un travail d'équipe. J'adresse un sincère et profond remerciement aux membres de notre petit groupe « biogaz » au sein du LIST qui m'ont accompagné durant ces années: **Sébastien Lemaigre, Bénédicte de Vos, Anaïs Noo, Marie Fossépré, Martyna Marynowska**. Je souhaite également remercier **Laurent Solinhac, Thomas Udelhoven, Bertjan Broeksema, Fintan Mc Gee, Mohammad Ghoniem, Sébastien Cambier, Emile Muller, Laura Lebrun** et **Paul Wilmes** pour l'aide qu'ils ont su m'apporter à un moment ou un autre au cours de ces quatre années.

Merci à **Marine** et **Bruno** du bureau C1.08 pour les discussions et l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée. Merci également à **Kahina** pour son soutien et les discussions notamment lors des longs trajets en train.

Je remercie vivement **Sylvain** et **Aurélie** pour leurs encouragements, leurs conseils, et les moments toujours agréables passés en leur compagnie.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes amis les plus proches. Merci à **Amandine, Aurélie, Florent, Florian** et **Claire-Marie, Frédéric, Maud, Nicolas** et **Mélanie, Olivier** et **Christelle, Sandra** et **Jeff, Sandrine** et **Guillaume**, pour les excellents moments passés à vos côtés depuis plus de 12 ans maintenant. Merci à vous tous pour votre soutien, pour m'avoir permis de me changer les idées et de décompresser lors de soirées ou weekends en Lorraine, dans la Drôme, ou ailleurs.

Arrive le tour de celle qui partage ma vie, qui m'a montré l'exemple en accomplissant avant moi ce long et difficile travail de thèse. **Mathilde**, un immense merci pour ta présence, ton soutien à toute épreuve et tes conseils. Tu as contribué, plus qu'aucune autre personne, à ce que je mène à bien ce travail.

Pour terminer, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma famille et belle famille. Merci à **Papa** et **Maman** de m'avoir permis de réaliser mes souhaits professionnels et de n'avoir jamais cessé de m'encourager. Merci à mon frère **Nicolas**, à ma future belle sœur **Caroline**, à mes sœurs **Nathalie** et **Sonia**, à mon beau frère **Fabrice**, ainsi qu'à mes neveux **Thomas, Sacha, Noa, Lucas** et **Timaé** pour les week-end familiaux passés tous ensemble et pour votre soutien. Merci à **Dominique** et **Christian** ainsi qu'à **Mémé** pour vos sourires et vos encouragements. Merci à **Laura** et **Simon** pour votre soutien, votre vision de la vie, et

pour m'avoir rappelé que vivre ses rêves ne tient qu'à une seule chose : se lancer, partir à l'aventure.

Enfin, pour avoir toujours été un exemple pour moi, je souhaite remercier mes **grands-parents**, dont la simple pensée m'a permis, et me permet toujours, de me donner la force d'aller de l'avant.

Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Contexte général.....	7
Chapitre 1. Synthèse bibliographique	11
I. La digestion anaérobie.....	13
I.1. Le processus.....	13
I.1.1. L'hydrolyse.....	13
I.1.2. L'acidogenèse	14
I.1.3. L'acétogenèse	14
I.1.4. La méthanogenèse.....	14
I.2. Les principaux facteurs opérationnels influençant la digestion anaérobie	16
I.2.1. La température	17
I.2.2. L'alimentation.....	18
I.2.2.1. La nature des substrats.....	19
I.2.2.2. Le taux de charge organique.....	22
I.2.2.3. Le temps de rétention hydraulique	23
I.2.3. Le type de digesteur	23
I.2.3.1. Les réacteurs continus perpétuellement mélangés.....	24
I.2.3.2. Les réacteurs anaérobies à chicane	25
I.2.4. L'agitation.....	25
I.3. Bilan.....	26
II. Les techniques d'analyse en écologie microbienne	26
II.1. Les approches phénotypiques	27
II.1.1. Les milieux de culture	27
II.1.2. Les marqueurs cellulaires	29
II.2. Les approches génétiques	31
II.2.1. Les approches génétiques partielles	31

II.2.1.1. Les principaux gènes marqueurs utilisés.....	31
II.2.1.2. La technique de banque de clones.....	34
II.2.1.3. Q-PCR, RT-Q-PCR et microscopie FISH.....	35
II.2.1.4. Les techniques d’empreintes moléculaires.....	36
II.2.1.5. Utilisation de puces à ADN.....	40
II.2.1.6. Le séquençage haut débit	40
II.2.2. Les approches génétiques globales.....	41
II.2.2.1. Etude de la cinétique d’hybridation de l’ADN.....	41
II.2.2.2. Etude de la teneur en GC de l’ADN.....	42
II.2.2.3. Analyse de type « méta »	43
II.3. Bilan.....	43
Chapitre 2. Dynamique des communautés microbiennes de différents digesteurs anaérobies de laboratoire traités en réplikat, successivement exposés à une augmentation du taux de charge organique, une acidose et un rétablissement du processus de digestion	49
Abstract.....	51
Keywords	51
I. Background.....	53
II. Methods.....	56
II.1. Reactors operation, monitoring and sampling.....	56
II.2. Microbial monitoring by 16S rRNA gene-based T-RFLP analysis	57
II.3. Microbial monitoring by high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing.....	59
II.4. Data analysis and statistics	60
III. Results and discussion	61
III.1. Operational parameters and anaerobic process performance	61
III.2. Comparison of the 16S rRNA gene-based T-RFLP and high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing results.....	65
III.3. Microbial communities in replicate reactors in steady-state.....	68

III.4. Comparison of bacterial composition in replicate reactors exposed to increasing OLR and acidosis	70
III.5. Bacterial richness, diversity and evenness	71
III.6. Adaptation of archaeal population to acidosis and correlation with reactor's parameters	73
III.7. Restoration of biogas production with NaOH and NaHCO ₃ addition	76
Conclusions.....	77
References.....	78
Points marquants de l'étude :	84
Chapitre 3. Comparaison entre CSTRs et ABRs : performances et dynamique des communautés microbiennes sous augmentation du taux de charges organiques	85
Abstract.....	87
Keywords	87
I. Introduction	89
II. Methods.....	90
II.1. Reactor designs and operation.....	90
II.2. Analytical chemistry methods	91
II.3. Microbial community monitoring	92
II.4. Microbial structure and dynamics analysis	93
III. Results and discussion	93
III.1. Performance of CSTRs and ABRs during the period of moderate feeding with sugar beet pulp (day 1 to day 90).....	93
III.2. Performances of CSTRs and ABRs when exposed to increasing or stable OLR with sugar beet pulp (day 91 to day 162)	97
III.3. Performances of CSTRs and ABRs when exposed to new carbon sources (day 163 to day 188).....	98
III.4. Microbial community monitoring	98
III.4.1. Microbial communities in the inoculum	98

III.4.2. Microbial dynamics at the onset of the experiment (stable feeding with sugar beet pulp - day 1 to day 90)	99
III.4.3. Microbial dynamics under increasing OLR and substrate change (day 91 to day 188)	103
Conclusion	106
References.....	106
Points marquants de l'étude :	110
Chapitre 4. Phase de démarrage d'un digesteur anaérobie agricole : comment les communautés microbiennes méthanogènes évoluent en fonction de l'apparition des conditions anaérobies mésophiles ?	111
Abstract.....	113
Keywords	113
I. Introduction	115
II. Methods.....	116
II.1. Full-scale farm reactor design and operation	116
II.2. Samples collection and metabolic parameters analysed.....	117
II.3. DNA extraction, 16S/18S rRNA amplicon libraries preparation and high-throughput sequencing.....	118
II.4. Data analysis.....	119
III. Results and discussion	119
III.1. Reactor performance during the start-up phase.....	119
III.2. Microbial community characterisation and monitoring	121
III.2.1. Microbial community structure in the psychrophilic seeding materials	122
III.2.2. Microbial community dynamics towards the establishment of mesophilic anaerobic conditions	124
III.2.3. Microbial community dynamics towards a steady state anaerobic digestion process	126
III.2.4. Microbial communities established at a steady state anaerobic digestion process.....	127

III.3. Correlation analysis within and between environmental parameters and microbial community structure.....	129
Conclusions.....	133
References.....	133
Points marquants de l'étude :.....	136
Discussion générale, conclusions et perspectives	139
Liste des figures	152
Liste des tableaux.....	154
Références bibliographiques	157
Annexes.....	179
Résumé	191

Liste des abréviations

- AD (DA)** : anaerobic digestion (digestion anaérobie)
- ABR** : anaerobic baffled reactor (réacteur anaérobie à chicane)
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AGV** : acides gras volatils
- Alk** : total alkalinity (alcalinité totale)
- ARDRA** : amplified rDNA restriction analysis (analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié)
- ARISA** : automated ribosomal intergenic spacer analysis (analyse automatique de l'espace intergénique ribosomique)
- ARN** : acide ribonucléique
- bp (pb)** : base pair (paire de bases)
- CCA** : canonical correspondence analysis
- CH₄** : méthane
- CHP** : combined heat and power unit (co-génératrice)
- CLPP** : community level physiological profiles
- CO₂** : dioxyde de carbone
- CR** : control (cautiously fed) reactor
- CSTR** : continuously/completely stirred tank reactors (réacteurs continus perpétuellement mélangés)
- D** : indice de Simpson, mesure la diversité¹ des espèces présentes dans un milieu
- DGGE** : denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)
- DCO** : demande chimique en oxygène
- DNA (ADN)** : deoxyribonucleic acid (acide désoxyribonucléique)
- ERIN** : environmental research and innovation (recherche et innovation environnementales)
- FAME** : fatty acid methyl ester
- FISH** : fluorescence in situ hybridization (hybridation *in situ* en fluorescence)
- H'** : indice de Shannon-Weaver, mesure la diversité des espèces présentes dans un milieu
- H₂** : dihydrogène
- H₂S** : hydrogène sulfuré

¹ En écologie microbienne, la diversité désigne la variabilité des différents organismes présents dans un milieu.

HRT : hydraulic retention time (temps de rétention hydraulique)
HTS : high-throughput amplicon sequencing
IGS : intergenic spacer (espace intergénique)
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
J : indice de Pielou, mesure la répartition du nombre d'individus par espèce dans un milieu
K : potassium
LIST : Luxembourg Institute of Science and Technology
LMM : linear mixed-effect models
LSE : Laboratoire Sols et Environnement
MO : matière organique
N : azote
NL : Normalised liter (litre à atmosphère et température normales)
NH₃ : ammoniac
NH₄⁺ : ion ammonium
Nano SIMS : nanometer-scale secondary ion mass spectrometry
NMDS : non-metric multidimensional scaling
O₂ : dioxygène
OLR : organic loading rate (taux de charge organique)
OTU : operational taxonomic unit
P : phosphore
PCR : polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)
PLFA : phospholipid-derived fatty acids
Q-PCR : PCR quantitative
R : indice de richesse, mesure le nombre d'espèces présentes dans un milieu
R1-R3 : test (overfed) reactors R1, R2 and R3
RFLP : restriction fragment polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
RISA : ribosomal intergenic spacer analysis (analyse de l'espace intergénique ribosomiques)
RNA : ribonucleic acid (acide ribonucléique)
RT-PCR : reverse transcriptase-PCR
SAO : syntrophic acetate oxidation (oxydation syntrophique de l'acétate)
SIVEC : Syndicat Intercommunal à Vocation Ecologique
SSCP : single strand conformation polymorphism (analyse du polymorphisme de conformation des simples brins d'ADN)

TGGE : temperature gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel à gradient de température)

T_m : melting temperature (température de fusion)

T-RF : terminal restriction fragment

T-RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (terminal restriction fragment length polymorphism)

TS (MS) : total solids (matière sèche)

UFC : unité formant colonie

UL : Université de Lorraine

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : ultraviolet

VFAs (AGV) : volatile fatty acids (acides gras volatils)

VS (MOS) : volatile solids (matière organique sèche)

WWTP : wastewater treatment plant

Contexte général

Contexte général

Depuis plusieurs décennies, le réchauffement climatique est considéré comme l'un des problèmes environnementaux les plus préoccupants que l'humanité ait à affronter (Appels *et al.*, 2011 ; Lau *et al.*, 2012). En effet, l'augmentation globale des températures accentue la fonte des glaces conduisant à une élévation du niveau des océans et des mers, pouvant à terme, submerger certaines régions littorales densément peuplées. Par ailleurs, les variations climatiques provoquent de fortes variations de production agricole qui pourraient causer des famines locales (Fuchs, 2012). Par conséquent et dans le but de limiter cette hausse globale de température à 2 °C, le protocole de Kyoto de 1997, suivi des accords de Copenhague de 2009, imposent aux pays signataires une réduction et une limitation des émissions de gaz pouvant augmenter le phénomène d'effet de serre (Crowley, 2000 ; United Nations framework convention on climate change, 1998 ; United Nations framework convention on climate change, 2009).

Afin de tenir leurs engagements, de nombreux Etats ont donc mis en place une politique de soutien et de développement des énergies renouvelables avec pour but une réduction de l'utilisation des énergies fossiles, principale source d'émissions de gaz à effet de serre. Ainsi, la Commission Européenne s'est fixé l'objectif que d'ici 2050, 55 % de l'énergie totale consommée proviendront des énergies renouvelables (European Commission, 2011). A plus court terme, le Luxembourg s'est quant à lui engagé à réduire de 8 % par rapport à 1990 ses émissions de gaz à effet de serre tout en élevant sa part d'énergie renouvelable dans la consommation globale d'énergie du pays à 11 % d'ici 2020 (European Parliament and Council, 2009). Afin d'atteindre ces objectifs, l'Europe et le gouvernement luxembourgeois encouragent donc la recherche ainsi que les secteurs agricole et industriel à développer et produire des énergies renouvelables. La digestion anaérobie apparaît comme un des leviers pouvant répondre à cette finalité.

La digestion anaérobie, également appelée biométhanisation, est un processus biologique permettant la transformation de la matière organique en biogaz, composé principalement de méthane (CH₄) et de dioxyde de carbone (CO₂). Ce processus naturel se produit en l'absence de dioxygène (O₂) et sous l'action de différents microorganismes (Ahring, 2003 ; Gerardi, 2003). Ainsi, le processus de digestion anaérobie se retrouve dans de nombreux milieux

naturels comme les marais, les intestins des animaux et des insectes, les rizières, et les sédiments des rivières et des lacs (Moletta et Verstraete, 2011).

Dès la découverte par Alessandro Volta, en novembre 1776 que « l'air des marais est inflammable et brûle très lentement avec une belle flamme bleue » (Moletta, 2011), la digestion anaérobie a suscité de l'intérêt, ceci dans un but de production d'énergie renouvelable et de valorisation des déchets organiques. Le biogaz permet en effet la formation d'électricité et de chaleur après combustion dans des cogénérateurs ou peut être directement injecté dans le réseau de gaz naturel après épuration. Parmi de nombreux avantages, la biométhanisation ne contribue pas à l'augmentation du taux de dioxyde de carbone atmosphérique du fait d'un bilan carbone neutre (Wilkie, 2005). De même, le processus de digestion anaérobie permet, par l'utilisation de déchets organiques produits par les activités humaines, d'éviter toute compétition avec les chaînes de production alimentaire, contrairement à la production de bioéthanol nécessitant majoritairement la culture de céréales, betterave ou canne à sucre. De plus, toutes les matières non digérées (appelées communément digestat) et récupérées à la fin du processus de digestion anaérobie sont riches en éléments nutritifs pour les plantes (N-P-K et microéléments) et peuvent donc être valorisées comme fertilisant sur les parcelles agricoles. Par ailleurs, parmi les processus disponibles aujourd'hui pour transformer la matière organique humide en énergie (la biomasse peut être également transformée en hydrogène, éthanol, butanol ou acétone, par exemple), la biométhanisation est la plus rentable en terme de quantité d'énergie produite par quantité de biomasse investie (Schink, 2008). En effet, la conversion d'hexose en méthane consomme seulement 14 % de l'énergie produite lors de l'oxydation aérobie de ce même sucre, les 86 % restant étant stockés dans la molécule de CH₄ et pouvant donc être libérés lors de la combustion de ce gaz. Ainsi, la production du biogaz par la digestion anaérobie et ses diverses utilisations apportent de nombreux bénéfices environnementaux et socio-économiques aussi bien pour la société que pour les agriculteurs (Yiridoe *et al.*, 2009).

Aujourd'hui, la demande accrue en énergie renouvelable nécessite des avancées scientifiques et techniques, en particulier concernant l'amélioration du rendement du processus de digestion anaérobie. Ces avancées sous-tendent deux principaux axes de recherches. D'une

part, une meilleure connaissance de la structure² génétique et de la dynamique des communautés microbiennes impliquées dans le processus de biométhanisation serait nécessaire (Appels *et al.*, 2011). D'autre part, le développement d'outils de suivi en ligne du processus de digestion anaérobie permettant de mieux prédire d'éventuels dysfonctionnements de ce processus serait un réel atout pour optimiser la production de biogaz et limiter les pertes économiques.

Sur la base de ces observations, l'objectif principal de ce travail a donc été de caractériser les communautés microbiennes impliquées dans la production de biogaz lors de changements de facteurs opérationnels du processus de digestion anaérobie.

Plan de Thèse

Mon travail de thèse a été effectué au sein du groupe « Plants » du département « Environmental Research and Innovation » (ERIN, recherche et innovation environnementales) du « Luxembourg Institute of Science and Technology » (LIST, Institut Luxembourgeois de la Science et de la Technologie), en collaboration avec l'unité mixte de recherche (UMR) 1120 « Sols et Environnement » (LSE, France) dépendant de l'Université de Lorraine (UL) et de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Celui-ci s'articule en plusieurs étapes :

Dans un premier temps, l'état des connaissances actuelles du processus de digestion anaérobie et des communautés microbiennes impliquées dans celui-ci est présenté, tout comme les facteurs majeurs influençant la biométhanisation ainsi que les principales techniques d'analyse disponibles en écologie microbienne (Chapitre 1).

Dans un deuxième temps, la dynamique des communautés microbiennes de différents digesteurs anaérobies de laboratoire traités en réplikat, et successivement exposés à une augmentation du taux de charge organique, une acidose et enfin un rétablissement du processus de digestion, est étudiée (Chapitre 2).

Par la suite, la réponse, tant au niveau des performances, que de l'évolution des communautés microbiennes de deux types de digesteurs de laboratoire anaérobies, soumis à une

² En écologie microbienne, la structure désigne la répartition des différents organismes, connus ou non, au sein d'un milieu.

augmentation du taux de charge organique et à un changement de substrat d'alimentation est analysée (Chapitre 3).

Enfin, l'influence de l'établissement des conditions anaérobies mésophiles sur les communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie, lors de la phase de démarrage d'un digesteur anaérobie de ferme, est présentée (Chapitre 4).

L'ensemble de ces travaux s'inscrit dans une stratégie de recherche menée au cours de ma thèse et qui vise à répondre à deux questions scientifiques principales mais aussi aux besoins exprimés par le secteur de la biométhanisation en termes de suivi et d'optimisation de processus :

Est-il possible de prédire l'état du processus de digestion anaérobie grâce à la dynamique des populations microbiennes impliquées ?

Existe-t-il une communauté microbienne « universelle » qui serait la mieux adaptée à la digestion de différents substrats ?

Les différents éléments de connaissance générés au cours de ce travail sont rassemblés et discutés dans un chapitre intitulé « Discussion générale, conclusions et perspectives » apportant des éléments de réponse aux deux questions scientifiques posées par la thèse. Les nouvelles connaissances produites au cours de ce travail sont aussi replacées dans un contexte plus large visant leurs applications dans la pratique.

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre débute par une description des différentes étapes du processus de digestion anaérobie et des microorganismes intervenant dans chacune d'entre elles. Les principaux facteurs opérationnels influençant le processus de digestion anaérobie et par conséquent les microbes impliqués dans celui-ci sont par la suite décrits, avant une présentation des méthodes d'analyse utilisées en écologie microbienne.

I. La digestion anaérobie

I.1. Le processus

Lors du processus de digestion anaérobie, la matière organique est progressivement dégradée sous l'action d'un consortium microbien complexe fonctionnant en anaérobiose. Ces microbes, dont certains sont syntrophiques³ (Gerardi, 2003) et/ou symbiotiques⁴ (Wilkie, 2005), sont plus ou moins sensibles à leur environnement (Pohland et Ghosh, 1971). Quatre principales phases de dégradation de la matière organique, faisant pour chacune intervenir un groupe spécifique de bactéries ou d'archées, peuvent être différenciées.

I.1.1. L'hydrolyse

La phase d'hydrolyse est la première phase du processus de digestion anaérobie. Lors de celle-ci, les polymères complexes (polysaccharides, protéines et lipides) formant la matière organique sont dégradés en monomères et dimères (sucres simples, acides aminés, acides gras, alcools) principalement sous l'action des bactéries hydrolytiques. Ces réactions de dégradations sont réalisées par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaires de type cellulase, lipase et protéase, par exemple (Boone et Mah, 1987). Ces enzymes clivent les grosses molécules de la matière organique en molécules solubles plus petites, pouvant être absorbées par les microorganismes et ainsi être utilisées comme source trophique et d'énergie. Les bactéries hydrolytiques, anaérobies facultatives ou strictes (Godon, 2011), présentent un temps de génération très rapide de l'ordre de quelques heures. Elles sont également très peu sensibles aux changements de leur environnement (Gerardi, 2003) et sont présentes en très grande majorité dans les digesteurs à la concentration d'environ 10^8 à 10^9 bactéries par mL (Anderson *et al.*, 2003). En plus des bactéries hydrolytiques, des protozoaires et des champignons ont été observés dans certains digesteurs anaérobies, bien que ceux-ci ne semblent pas avoir un rôle important dans le processus de digestion anaérobie du fait de leurs faibles dénombrements (Anderson *et al.*, 2003). Excepté lors de l'utilisation de substrats difficilement digestibles du fait de leur forte teneur en lignine, la phase d'hydrolyse n'est pas considérée comme une phase limitante du processus de biométhanisation (Noike *et al.*, 1985).

³ Relation de nécessité entre deux organismes qui ne peuvent se développer séparément.

⁴ Association constante, obligatoire et spécifique entre deux organismes ne pouvant vivre l'un sans l'autre, chacun d'eux tirant un bénéfice de cette association.

I.1.2. L'acidogénèse

Les produits résultant de la phase d'hydrolyse sont digérés lors de la phase d'acidogénèse en acides gras volatils (AGV), alcool, acides organiques, dihydrogènes (H_2) et dioxyde de carbone. La taille de la communauté acidogène varie de 10^6 et 10^8 bactéries par mL dans un digesteur anaérobie (Archer et Kirsop, 1990) et certains représentants peuvent être également anaérobies facultatifs (Anderson *et al.*, 2003). Cette phase est généralement très rapide et peut donc conduire à la formation d'une grande quantité d'AGV en cas de suralimentation du digesteur ou de l'utilisation de substrats rapidement fermentescibles. Cette production rapide d'AGV dans le digesteur peut donc entraîner une chute de pH et donc conduire à une inhibition du processus de digestion anaérobie du fait de la sensibilité des microorganismes producteurs de méthane à ce paramètre (voir paragraphe 1.1.4).

I.1.3. L'acétogénèse

Lors de la phase d'acétogénèse, les précurseurs du méthane sont constitués. En effet, les produits de la phase précédente sont transformés en acétate (CH_3COOH), dihydrogène et dioxyde de carbone sous l'action des bactéries dites acétogènes. Thermodynamiquement, l'acétogénèse est dépendante de la pression partielle en dihydrogène du digesteur. Cette étape essentielle du processus de digestion anaérobie nécessite donc une coopération étroite entre les organismes acétogènes et les méthanogènes entrant en action lors de l'étape suivante. En effet, lors de la formation de l'acétate, du dihydrogène est également produit et en cas d'accumulation de celui-ci dans le digesteur, l'activité des bactéries acétogènes est inhibée (Dolfing et Tiedje, 1988). De ce fait, les bactéries acétogènes sont actives seulement avec une pression partielle en dihydrogène inférieure à 10^{-4} atmosphère (McCarty et Smith, 1986 ; Gerardi, 2003). Cette condition est réalisée dans le processus de biométhanisation lorsque le dihydrogène produit par les bactéries acétogènes est rapidement consommé. Il existe donc une relation de syntrophie entre les archées méthanogènes hydrogénotrophes et les microorganismes acétogènes qui vivent en étroite collaboration, permettant ainsi de maintenir la basse pression partielle de ce gaz (Schink, 1997).

I.1.4. La méthanogénèse

C'est lors de l'ultime phase de la biométhanisation, la méthanogénèse, que le méthane est formé. Les archées méthanogènes sont anaérobies strictes et permettent, par la consommation principalement de l'acétate, du dioxyde de carbone et du dihydrogène produits lors des phases précédentes, le bon déroulement du processus de digestion anaérobie (Gerardi, 2003).

Le temps de génération des archées est généralement long, de l'ordre de 1 à 12 jours (Gerardi, 2003) et par conséquent, la méthanogénèse est considérée comme la phase la plus lente du processus de digestion anaérobie (Anderson *et al.*, 2003 ; Liu et Whitman, 2008). C'est également la phase la plus sensible aux conditions environnementales comme le pH, la température ou encore la présence d'inhibiteurs chimiques (Pohland et Ghosh, 1971 ; Chen *et al.*, 2008 ; Liu et Whitman, 2008).

Environ 10^6 à 10^8 archées méthanogènes par mL sont généralement recensées (Toerien et Hattingh, 1969), dont différentes communautés peuvent être distinguées suivant les substrats qu'elles utilisent (Anderson *et al.*, 2003). Une première communauté rassemble les archées méthanogènes dites acétotrophes (ou acétoclastiques), c'est-à-dire utilisant l'acétate comme précurseur du méthane. Cette communauté réunit les genres *Methanosaeta* (acétotrophe stricte) et *Methanosarcina* (acétotrophe facultatif) ; les deux seuls genres de méthanogènes actuellement connus capables d'utiliser l'acétate comme seul précurseur du méthane. Ces méthanogènes acétotrophes seraient responsables d'environ 70 % de la production de méthane du digesteur (Jeris et McCarty, 1965 ; Smith et Mah, 1966 ; Anderson *et al.*, 2003).

Cependant, d'autres études ont également montré que la seconde communauté de méthanogènes, les archées méthanogènes hydrogénotrophes, était également très active (Nettmann *et al.*, 2008). Ces archées utilisent le dihydrogène et le dioxyde de carbone, produits lors de l'acétogénèse, afin de former le méthane. Les genres les plus représentés sont, par exemple, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* ou encore *Methanoculleus* (Garcia *et al.*, 2000 ; Liu et Whitman, 2008).

Alors que d'autres métabolites comme les méthylamines, certains alcools et le formate peuvent également être utilisés comme précurseurs du méthane (Liu et Whitman, 2008), des études récentes décrivent une synthèse alternative de méthane par voie hydrogénotrophe à partir de l'acétate (Schnürer *et al.*, 1999 ; Hattori, 2008). Cette voie alternative, encore très peu connue, permet la conversion de l'acétate en dihydrogène et en dioxyde de carbone par des organismes non producteurs de méthane. Par la suite, les deux produits de cette réaction de dégradation de l'acétate seront utilisés par les méthanogènes hydrogénotrophes afin de produire du méthane. La coopération entre les différentes populations microbiennes entrant en jeu lors de cette voie alternative de formation du biogaz est appelée oxydation syntrophique de l'acétate (SAO) (Zinder et Koch, 1984 ; Schnürer *et al.*, 1994). Cette syntrophie est plus lente que la voie acétotrophique classique du fait que le temps de génération des bactéries oxydatives syntrophiques est beaucoup plus long que celui des méthanogènes acétotrophes (Schnürer *et al.*, 1994).

La Figure 1.1 résume les différentes étapes ainsi que les principales réactions lors du processus de digestion anaérobie.

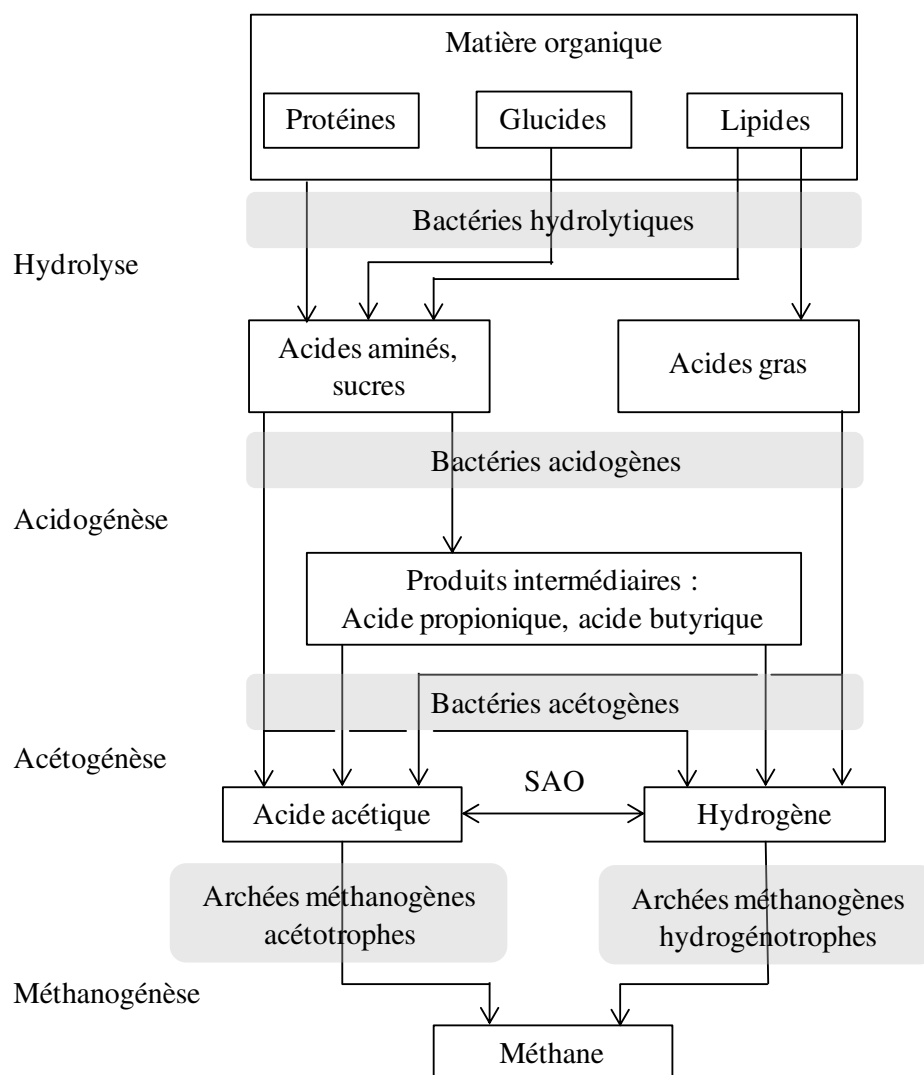


Figure 1.1 - Les différentes étapes du processus de digestion anaérobie
D'après Görisch et Helm (2006). SAO : oxydation syntrophique de l'acétate.

I.2. Les principaux facteurs opérationnels influençant la digestion anaérobie

Cette partie présente les principaux facteurs liés au mode de gestion du processus de digestion anaérobie qui influencent la quantité et la qualité (pourcentage de méthane dans le biogaz) du biogaz produit par les microorganismes impliqués. Ces facteurs regroupent principalement la température, l'alimentation (la nature et la quantité des différents substrats), ou encore le type de digesteur utilisé.

I.2.1. La température

Comme toute activité résultant de l'action d'un ou de plusieurs groupes de microbes, le processus de digestion anaérobie est fortement dépendant de la température (Kotzé *et al.*, 1969 ; Anderson *et al.*, 2003 ; Görisch et Helm, 2006 ; Leven *et al.*, 2007). En effet, une élévation de température active les réactions biochimiques et enzymatiques au sein des cellules, conduisant à un taux de croissance cellulaire plus rapide. C'est pourquoi une augmentation de la température lors du processus de digestion anaérobie permet une accélération de la vitesse de dégradation de la matière organique ainsi qu'une meilleure dégradation de celle-ci, se traduisant donc au final par une production de biogaz plus importante (Figure 1.2).

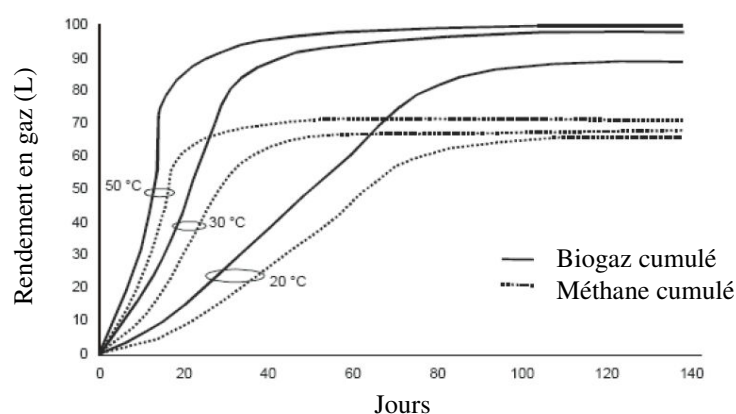


Figure 1.2 - Rendements en biogaz et méthane en fonction de la température et du temps de digestion

D'après LfU (2007).

Une dégradation de la matière organique par biométhanisation de l'ordre de 40 à 50 % est atteinte à des températures comprises entre 30 et 35 °C. Dans le cas où la température est contrôlée autour de 37 ± 2 °C, la valeur optimale de réduction de la matière organique passe à 57 % (Camacho et Prévot, 2011). Cependant, au-delà d'une certaine température propre à chaque organisme, des inhibitions ou la dénaturation de protéines pouvant aller jusqu'à la mort de l'organisme peuvent se produire (Anderson *et al.*, 2003). De même, de faibles variations de température rapides (1 à 2 °C en moins de 2 h, par exemple) peuvent avoir de fortes répercussions sur le processus de digestion anaérobie, du fait que chaque groupe microbien impliqué possède des optimums de température différents (Anderson *et al.*, 2003). En effet, certains groupes microbiens peuvent être favorisés ou défavorisés par ces faibles variations, perturbant ainsi l'équilibre établi au sein de la communauté microbienne et

diminuant ainsi les performances du processus de digestion anaérobie (Camacho et Prévot, 2011).

La digestion anaérobie est nommée de différentes manières suivant la gamme de température dans laquelle elle se réalise. Ainsi, elle est dite psychrophile lorsqu'elle se réalise à une température inférieure à 20 °C, mésophile si elle se déroule à une température comprise entre 20 et 45 °C et thermophile pour une température supérieure à 45 °C. Ces deux dernières gammes sont les plus utilisées en vue de produire de l'énergie *via* le biogaz. Cependant, elles possèdent chacune des avantages et des inconvénients relatifs à la vitesse de dégradation et à sa stabilité. Ainsi, pour une digestion anaérobie thermophile, la vitesse de réaction de la phase d'hydrolyse est accélérée par rapport à une digestion anaérobie mésophile. Ceci s'explique par le fait qu'à des températures thermophiles, l'activité des microorganismes est augmentée par la chaleur de 25 à 50 % par rapport à la mésophilie (Gerardi, 2003). De ce fait, pour un même rendement, le volume des digesteurs peut être diminué (Buhr et Andrews, 1977 ; Camacho et Prévot, 2011). Il a été également démontré que les digesteurs thermophiles possèdent une plus grande capacité à éliminer les organismes pathogènes, par rapport aux digesteurs mésophiles (Buhr et Andrews, 1977). Néanmoins, les digesteurs anaérobies thermophiles possèdent une diversité microbienne moindre (Leven *et al.*, 2007 ; Guo *et al.*, 2014) et seraient moins stables (Wilson *et al.*, 2008 ; Labatut *et al.*, 2014) du fait qu'ils sont sujets plus facilement à une accumulation d'AGV ou d'ammoniac lors du processus de digestion anaérobie pouvant conduire à son inhibition (Kim *et al.* (2002) et voir paragraphe I.2.2.1 de ce chapitre). Ils nécessitent également plus d'énergie de chauffage qu'un digesteur mésophile.

I.2.2. L'alimentation

Les facteurs liés à l'alimentation d'un digesteur anaérobie influencent à plusieurs niveaux son fonctionnement. En effet, selon le taux de charge organique (OLR) ainsi que le temps de rétention hydraulique (HRT) appliqué au digesteur, ou encore la nature des différents substrats utilisés, la production de biogaz se fera plus ou moins rapidement. De même, ces différents facteurs liés à l'alimentation du digesteur influencent la quantité de méthane produite, la composition mais également le risque d'inhibition de la flore microbienne impliquée dans le processus de digestion anaérobie. En effet, les nutriments nécessaires aux communautés microbiennes impliquées dans le processus sont primordiaux à leur développement car ils permettent à la cellule la synthèse des enzymes et cofacteurs nécessaires aux réactions biochimiques et métaboliques (Anderson *et al.*, 2003). Afin d'éviter

tout phénomène d'inhibition, il est donc primordial que les macro- et micronutriments (en fonction de leurs importances dans le métabolisme des microorganismes) soient en quantités suffisantes et disponibles dans le milieu environnant les microorganismes. Toutefois, un excès de certains nutriments peut être toxique pour la communauté microbienne et conduire également à des inhibitions (Gunnerson et Stuckey, 1986).

I.2.2.1. La nature des substrats

Les substrats utilisés en biométhanisation ont majoritairement pour origine : (1) l'agriculture, de par la valorisation de déchets d'élevage comme les lisiers, les fumiers, les refus d'alimentation ; des déchets ou produits de cultures comme les plantes énergétiques (ensilage de seigle immature, de maïs, d'herbe, de sorgho), les déchets de céréales ou les pailles et menues pailles ; (2) les industries agroalimentaires, de par la valorisation de nombreux déchets et coproduits comme les déchets d'abattoirs, les drêches de brasserie, les légumes et fruits non conformes ou encore les eaux de rinçage des machines et outils ; (3) les municipalités par la valorisation principalement des eaux usées et de tous types de déchets organiques comme les tontes de pelouse, les tailles de haies, les feuilles mortes ou encore les restes de cantines.

La composition des substrats utilisés détermine la composition du biogaz. En effet, dans le cas théorique où la totalité des substrats serait convertie en biogaz, les hydrates de carbone (sucre) conduisent à la production d'un biogaz composé de 50 % de méthane et de 50 % de dioxyde de carbone (Buswell et Mueller, 1952). Pour les protéines, un biogaz composé en pratique d'environ 60 % de méthane et de 40 % de dioxyde de carbone est généralement attendu. Un biogaz avec 72 % de méthane, pour 28 % de dioxyde de carbone est produit lors de la digestion anaérobie de lipides (Boyle, 1976). Toutefois et en pratique, une production non négligeable d'hydrogène sulfuré (H_2S) et d'ammoniac (NH_3) est également observée. L'hydrogène sulfuré est nocif pour les moteurs thermiques des cogénératrices brûlant le biogaz et permettant de produire de l'électricité et de la chaleur (Hulshoff Pol *et al.*, 1998). Ainsi, l'utilisation de certains substrats comme des plumes provenant d'abattoirs, riches en protéines soufrées telles la méthionine et la cystéine, conduira à une production importante d' H_2S .

L'hydrolyse de l'urée et des protéines provenant de la matière organique conduit, quant à elle, à la formation d'ammoniac lors du processus de digestion anaérobie (Angelidaki et Ahring, 1993 ; Kayhanian, 1999). Cet élément est nécessaire au développement des microbes et permet de tamponner une partie de l'acidité générée par la formation d'AGV, en passant de

sa forme libre NH_3 à sa forme ionisée NH_4^+ . Cependant, une trop forte concentration d'ammoniac peut conduire à l'inhibition du processus de biométhanisation et donc à une diminution ou même un arrêt de la production de biogaz (Hashimoto, 1986). En effet, en fonction du pH et de la température, l'ammoniac se retrouve principalement sous deux formes en digestion anaérobie : sous une forme gazeuse en solution (NH_3) et sous une forme ionisée (NH_4^+) (Chen *et al.*, 2008). A un pH neutre, plus de 99 % de l'ammoniac sera sous sa forme ionisée (Anderson *et al.*, 2003 ; Schnürer et Jarvis, 2010). Cependant, une élévation du pH du digesteur à 8, ou encore de sa température de quelques degrés par exemple, conduira à augmenter la part d'ammoniac se retrouvant sous forme NH_3 dans le milieu (Figure 1.3), cette seconde forme étant beaucoup plus toxique pour les microbes que la forme ionisée NH_4^+ (Kroeker *et al.*, 1979).

L'ammoniac sous sa forme libre diffuse passivement à travers les membranes cellulaires. Dès lors, une augmentation en NH_3 dans l'environnement des microbes conduit également à une augmentation en NH_3 au sein de ceux-ci. Cette augmentation provoque une perturbation du pH intracellulaire, une demande en énergie de maintenance plus importante à la cellule, tout comme l'inhibition de certaines enzymes (Wittmann *et al.*, 1995). Parmi les différents groupes microbiens impliqués dans le processus de digestion anaérobie, les archées méthanogènes et principalement les acétotrophes, sont les plus affectées par de fortes concentrations en ammoniac (NH_3) (Kayhanian, 1994 ; Schnürer et Nordberg, 2008 ; Schnürer et Jarvis, 2010).

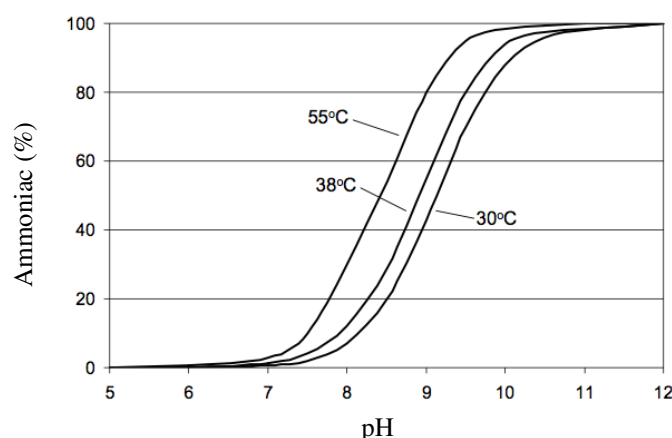


Figure 1.3 - Balance entre ammoniac et ammonium en fonction du pH et de la température
D'après Schnürer et Jarvis (2010).

Cette inhibition éventuelle des méthanogènes se traduit par une augmentation du taux d'AGV dans le digesteur, du fait que l'acétate n'est plus consommé directement afin de former le méthane.

Une concentration en ammonium supérieure à 2-3 g N-NH₄⁺ par litre est généralement considérée comme inhibitrice du processus de digestion anaérobie (Hashimoto, 1986 ; Schnürer et Jarvis, 2010). Cependant, de nombreuses études définissent différentes concentrations au-delà desquelles l'ammoniac inhibe le processus de digestion anaérobie. Ces variations s'expliquent par le fait que suivant les caractéristiques des digesteurs en termes de pH et de température, le ratio entre l'ammonium, non toxique, et l'ammoniac, toxique, sera différent (Figure 1.3).

D'autres facteurs, comme les genres de microbes impliqués dans le processus, qui peuvent montrer ou non une acclimatation à ces hautes concentrations en ammoniac libre (Chen *et al.*, 2008 ; Schnürer et Jarvis, 2010), influencent également la valeur seuil à partir de laquelle une toxicité à l'ammoniac apparaît. Différentes études ont montré que les communautés microbiennes d'un digesteur anaérobie soumises à de fortes concentrations en ammoniac sont capables de s'adapter après une période plus ou moins longue. La production de biogaz n'est donc que partiellement affectée (Webb et Hawkes, 1985 ; Angelidaki et Ahring, 1993). Ce phénomène d'adaptation s'explique par des changements dans la communauté microbienne du digesteur et donc dans le processus de formation du méthane par l'acétate (Schnürer et Nordberg, 2008). En effet, lors de cette période d'adaptation et comme décrit dans la partie I.1.4 de ce chapitre, l'action des bactéries oxydatives syntrophiques d'acétate permet de favoriser la voie hydrogénotrophe de formation du méthane et donc de pallier à l'inhibition des méthanogènes acétotrophes (Schnürer et Jarvis, 2010).

D'autres composants liés à la nature des différents substrats utilisés en biométhanisation peuvent également influencer le processus de digestion anaérobie.

En effet, certains métaux comme le cobalt, le molybdène ou encore le nickel sont essentiels pour l'activité enzymatique des archées méthanogènes (Schnürer et Jarvis, 2010). Ainsi, une inhibition de la production de méthane, par exemple, peut apparaître en cas de déficience de certains de ces métaux lourds. De même, une accumulation d'une grande quantité de métaux lourds dans le digesteur peut également conduire à une inhibition de la production de biogaz par intoxication de la communauté microbienne. En effet, les métaux lourds interfèrent au niveau de certaines enzymes en se fixant sur leur site actif, conduisant ainsi à un phénomène de blocage de leurs activités (Schnürer et Jarvis, 2010). Les principaux éléments concernés sont le chrome, le manganèse, le fer, le cobalt, le zinc, le molybdène, l'argent, le mercure, le cadmium et le nickel (Jin *et al.*, 1998). Ceux-ci peuvent être retrouvés en grande quantité dans les déchets organiques industriels ou les boues de stations d'épuration (Chen *et al.*, 2008). L'impact de chaque métal et son seuil d'inhibition est difficile à prédire du fait de

résultats très variables suivant les études (Chen *et al.*, 2008). Il semblerait, en effet, qu'en plus de leurs concentrations et de leurs formes chimiques, le pouvoir inhibiteur des différents métaux lourds dépend également de facteurs environnementaux comme la présence de certains composants organiques tels la bentonite et l'acide citrique sur lesquels ils pourraient se fixer, le pH et le potentiel d'oxydo-réduction du milieu, par exemple (Oleszkiewicz et Sharma, 1990 ; Chen *et al.*, 2008).

D'autres substances inhibitrices, comme les antibiotiques présents dans les substrats, par exemple, peuvent également conduire à des perturbations du processus de digestion anaérobie. En effet, il a été démontré depuis de nombreuses années que les antibiotiques, utilisés comme stimulateur de croissance en alimentation animale, peuvent se retrouver dans les fumiers et lisiers et ainsi perturber le processus de biométhanisation (Hilpert *et al.*, 1984). Par exemple, des antibiotiques tels le chloramphénicol et la chlortétracycline, qui ont tous deux pour mode d'action l'inhibition de la synthèse des protéines, conduisent à une réduction de la production de méthane par inhibition des archées méthanogènes (Sanz *et al.*, 1996). Toutefois, d'autres études ont montré que certains autres antibiotiques, se retrouvant dans les eaux usées, sont dégradés par les microorganismes et ne conduisent donc pas à des phénomènes d'inhibition du processus (Loftin *et al.*, 2005 ; Gartiser *et al.*, 2007).

I.2.2.2. Le taux de charge organique

Sous l'action du complexe microbien, la dégradation de la matière organique (MO) se déroule de façon continue dans un digesteur, et ce jusqu'à ce que la totalité de la MO soit consommée. Le taux de charge organique (OLR) définit la quantité de substrat qui peut être incorporée, de façon journalière, par exemple, dans le digesteur. Ce taux est un paramètre important et doit être adapté aux microorganismes impliqués dans le processus de digestion anaérobie. En effet, l'incorporation d'une grande quantité de substrats dans un digesteur où les communautés microbiennes sont non adaptées conduirait à une croissance rapide des communautés bactériennes impliquées dans les premières étapes du processus de digestion anaérobie, du fait de leur temps de génération rapide. En conséquence, une grande quantité d'AGV, issus de la dégradation de la MO, serait produite dans le digesteur. Ceci conduirait à une inhibition du développement des archées méthanogènes, qui ne peuvent s'adapter à de fortes concentrations en AGV et des valeurs de pH basses.

Afin d'éviter ce problème, il est important de déterminer l'OLR maximum à appliquer pour les différents substrats utilisés. Pour cela, il convient de caractériser la matière sèche (MS ou TS pour total solids) et la matière organique sèche (MOS ou VS pour volatile solids) du

substrat. Lors de l'introduction d'un nouveau substrat dans la ration d'un digesteur, il est ainsi conseillé d'appliquer un OLR de 0,5 kg de MOS par mètre cube de digesteur et par jour, puis d'augmenter ce taux de 0,5 kg toutes les deux semaines, afin de laisser le temps aux communautés microbiennes de se développer en conséquence (Angelidaki *et al.*, 2006 ; Anonymous, 2006). De plus, afin de faciliter le maintien de ces communautés microbiennes spécifiques à la dégradation des différents substrats utilisés pour alimenter un digesteur anaérobie, il est préférable de maintenir un OLR aussi stable que possible au cours du temps ; une variation de 10 à 15 % maximum étant cependant généralement acceptée.

I.2.2.3. Le temps de rétention hydraulique

Le temps de rétention hydraulique (ou hydraulic retention time - HRT) correspond à la durée nécessaire pour remplacer la totalité du contenu du digesteur. Il se calcule en divisant le volume total du digesteur par le volume de substrat introduit dans celui-ci, chaque jour. L'HRT optimal d'un digesteur dépend de la nature et de la composition des substrats utilisés pour l'alimenter, de la température de digestion, ainsi que de la communauté microbienne impliquée dans le processus (type de microorganismes et densité).

Si l'HRT est trop court, c'est-à-dire inférieur au temps de génération des bactéries et des archées impliquées dans le processus, la communauté microbienne sera éliminée du digesteur (phénomène de lessivage). La production de biogaz ne pourra donc plus être pleinement assurée. Afin d'éviter ou de limiter ce phénomène, il est conseillé de maintenir un temps de rétention hydraulique équivalent au minimum à deux fois le temps de génération du microorganisme le plus lent à se développer (Weiland, 2010 ; Angelidaki *et al.*, 2011) ou d'utiliser des matériaux permettant aux microorganismes de s'y fixer (comme des anneaux en plastique pour bioréacteur) et d'être ainsi retenus dans le digesteur.

Inversement, une perturbation du processus de biométhanisation peut également apparaître si l'HRT est trop long. En effet, une accumulation de certains éléments inhibiteurs pour les communautés microbiennes, comme l'ammonium et le potassium (K^+), par exemple, est favorisée par de longs temps de rétention hydraulique.

I.2.3. Le type de digesteur

En Europe, les digesteurs anaérobies à l'échelle réelle sont des cuves, généralement construites en acier ou en béton, isolées de l'atmosphère afin d'en préserver le contenu de l'oxygène de l'air. Ils sont pour la plupart équipés d'un système de chauffage et d'isolation permettant de maintenir une température mésophile ou thermophile, ainsi que d'un système

de mélange par hélice, pompe, ou réinjection du biogaz produit. Le biogaz formé est évacué par le dessus de la cuve. Les substrats, suivant leurs aspects et leurs contenus en eau, sont quant à eux incorporés dans le digesteur grâce à des pompes ou une vis sans fin. Le digestat est par la suite pompé en vue d'être injecté dans un second digesteur (appelé post-digesteur) destiné à terminer la digestion ou à stocker le digestat final avant utilisation comme fertilisant.

En fonction du volume et du type de substrat à valoriser, il existe différents types de digesteur. Dans tous les cas, les microbes impliqués dans le processus de digestion anaérobie peuvent être libres dans la boue ou alors fixés à des supports microbiens placés à l'intérieur du digesteur. Ces supports peuvent être les fibres végétales non dégradées dans le cas des digesteurs agricoles.

I.2.3.1. Les réacteurs continus perpétuellement mélangés

Les réacteurs continus perpétuellement mélangés (CSTR ou continuously stirred tank reactors) (Figure 1.4) sont les plus utilisés à l'échelle réelle afin de produire du biogaz. Dans ce type de digesteur, le substrat à digérer est directement en contact avec les communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie et il n'y a pas de séparation entre les différentes phases de celui-ci. Ainsi, des hydrolytiques aux méthanogènes, l'ensemble des microorganismes impliqués en biométhanisation se retrouvent dans le même compartiment. Du fait que les microorganismes sont libres dans le réacteur, le temps de rétention hydraulique ne doit pas être trop court afin d'éviter un phénomène de lessivage.

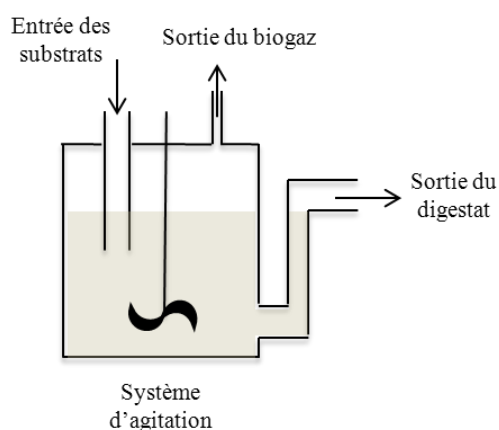


Figure 1.4 - Schéma de base d'un digesteur anaérobie de type CSTR

I.2.3.2. Les réacteurs anaérobies à chicane

Les réacteurs anaérobies à chicane (ABR ou anaerobic baffled reactors) sont des digesteurs anaérobies horizontaux et compartimentés en plusieurs éléments (Figure 1.5). Le nombre de compartiments est variable suivant les différents concepteurs.

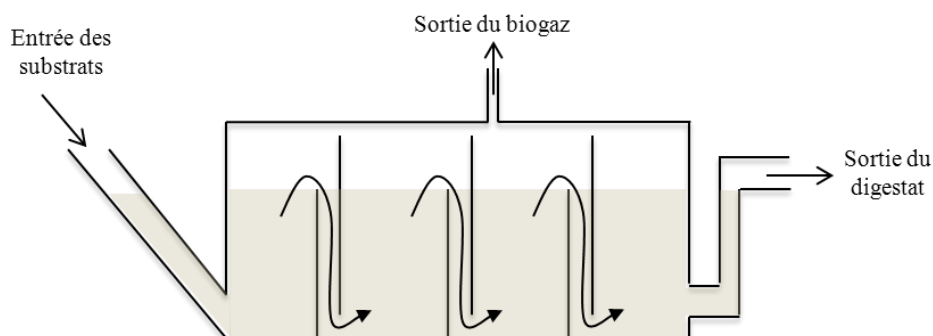


Figure 1.5 - Schéma de base d'un digesteur anaérobie à chicane

L'introduction des substrats à digérer se fait par une extrémité du digesteur alors que le digestat est évacué par l'autre. Le mélange substrat en cours de digestion/digestat passe dans les éléments de bas en haut, au fur et à mesure des entrées de substrat et des sorties de digestat dans le digesteur (Grobicki et Stuckey, 1992). L'avantage de ce type de digesteur est de pouvoir réaliser une digestion anaérobie en deux phases, tout en limitant les coûts et les problèmes de contrôle du processus (Weiland et Rozzi, 1991). En effet, le design de ce type de digesteur permet un développement spécifique des différents groupes microbiens dans les différents compartiments du digesteur (Uyanik *et al.*, 2002). Cette observation est due au fait que pour les différents compartiments du digesteur, il s'établit des conditions plus favorables à certaines populations microbiennes, en termes de quantité de substrat présent et de pH, par exemple (Barber et Stuckey, 1999). Ainsi, la plupart des bactéries hydrolytiques seront concentrées dans le premier compartiment recevant le substrat, du fait de leur temps de génération rapide, de leur tolérance à des milieux riches en substrats et leurs affinités pour des pH acides. Les autres microorganismes impliqués dans le processus de digestion anaérobie, adaptés à un pH plus élevé et possédant un temps de génération plus lent, se développeront dans les compartiments suivants de l'ABR.

I.2.4. L'agitation

Le brassage du contenu des digesteurs anaérobies peut se faire de différentes façons, à l'aide d'agitateurs à hélice, par une recirculation du digestat par l'intermédiaire de pompe, ou

encore par la réintroduction du biogaz produit. L'agitation du digesteur a pour rôle d'assurer de nombreuses fonctions au sein du processus de digestion anaérobie. Elle permet une répartition uniforme de la température et du pH dans le milieu, d'éviter la sédimentation au fond du digesteur ou la formation d'une croûte en surface, d'aider à la réduction de la taille des particules et finalement de faciliter la libération du biogaz (Stafford *et al.*, 1980). Le mélange permet également de faciliter les interactions entre les substrats et les microorganismes les dégradant, en réduisant la distance entre les enzymes et les substrats par exemple, et permet ainsi une hausse de production de biogaz de l'ordre de 10 à 30 % par rapport à un digesteur non agité (Karim *et al.*, 2005). Par contre, différentes études montrent que l'agitation d'un réacteur lors de sa phase de démarrage aurait un effet néfaste sur le processus de digestion anaérobie (Karim *et al.*, 2005 ; Hoffmann *et al.*, 2008) : le processus serait moins stable, le pH plus faible du fait d'une quantité plus importante d'acides gras volatiles.

I.3. Bilan

La digestion anaérobie est un processus biologique complexe faisant intervenir un grand nombre de populations microbiennes différentes, interagissant entre elles et permettant la génération, entre autres, de méthane. Différents facteurs opérationnels comme la température, l'alimentation, le type de digesteur ou encore l'agitation ont un impact avéré sur la production de biogaz. C'est pourquoi, afin de mieux comprendre l'impact de la variation de certains de ces facteurs sur le processus de digestion anaérobie, il apparaît essentiel de mieux connaître l'écosystème microbien impliqué. Pour ce faire, différents outils d'analyse en écologie microbienne existent.

II. Les techniques d'analyse en écologie microbienne

Il existe de nombreuses techniques d'analyse des communautés microbiennes impliquées dans différents processus naturels et plus particulièrement dans le processus de digestion anaérobie. Une des techniques les plus simples est l'utilisation d'un microscope, de résolution suffisante, équipé d'une lampe ultraviolet (UV), qui permettra d'identifier les communautés archées méthanogènes présentes dans un digesteur anaérobie (Figure 1.6). En effet, les archées méthanogènes sont facilement identifiables au microscope du fait de la structure typique de leur membrane cellulaire, comprenant le cofacteur F₄₂₀, composant qui émet une lumière bleu-vert lorsqu'il est exposé à des UV de longueur d'onde de 420 nm (Cheeseman *et al.*, 1972). Cependant, afin de caractériser ces communautés archées plus en détail, mais aussi

afin de s'intéresser aux autres communautés microbiennes, comme la communauté bactérienne, d'autres techniques d'analyse en écologie microbienne ont été développées.

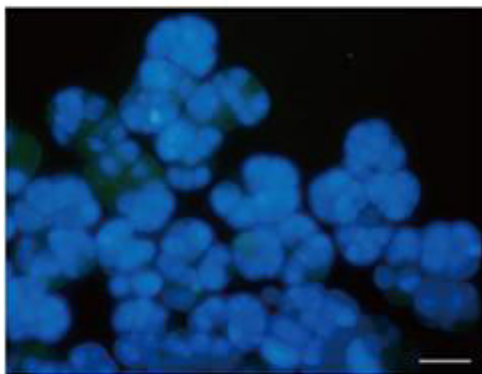


Figure 1.6 - Fluorescence émise par *Methanosarcina* sous ultraviolet

D'après le site internet : http://www.jamstec.go.jp/e/about/press_release/20110609/. Sous lampe ultraviolet, le cofacteur F₄₂₀ des archées méthanogènes émet une fluorescence bleue. Le segment en bas à droite de l'image représente 10 micromètres.

II.1. Les approches phénotypiques

Les techniques phénotypiques utilisées peuvent être classées en deux groupes. Le premier se base sur la culture et la viabilité *in vitro* des microorganismes (milieux de culture gélosés, Biolog Ecoplate™). Le deuxième groupe quant à lui ne se base pas sur une réponse physiologique, mais sur une analyse précise de certains marqueurs cellulaires permettant, outre la comparaison de structures de communautés microbiennes, une approche taxonomique.

II.1.1. Les milieux de culture

Par le passé, les techniques d'isolement et de culture de souches de microorganismes sur milieu sélectif étaient traditionnellement utilisées comme moyen d'investigation et d'études des microbes et permettaient d'obtenir une vision relative de la diversité microbienne au sein d'une communauté. En effet, ces techniques permettent, après étalement sur milieu de culture d'un extrait environnemental, de quantifier le nombre de microorganismes cultivables (sous la forme d'unités formant colonies (UFC)), voire leur isolement et multiplication dans le but de créer une collection de souches microbiennes. Cependant, ces techniques d'isolement et de culture des microorganismes se sont très vite révélées insuffisantes dans le but d'isoler et de caractériser la totalité des microbes impliqués dans différents processus biologiques. En effet, ces techniques sont aujourd'hui connues pour leur sélectivité envers un nombre restreint de microorganismes et ne sont pas considérées comme représentative de l'étendue de la

communauté microbienne (Ranjard *et al.*, 2000b) car seulement une infime partie des microbes sont cultivables sur milieu gélosé (Amann *et al.*, 1995). Effectivement, elles ne rendent compte, au maximum, que de 15% de la population totale, étant donné que la fraction actuellement cultivable des microorganismes est estimée à 0,1-15 % du microbiote d'échantillons environnementaux (Torsvik *et al.*, 1990a ; Wagner *et al.*, 1993). Ce chiffre varie cependant suivant les études. Staley et Konopka (1985) estiment à seulement 15% au maximum, le pourcentage de bactéries cultivables provenant de différents milieux aquatiques et terrestres. Wagner *et al.* (1993) ont, quant à eux, montré qu'une infime partie de la communauté microbienne issue d'une boue activée peut être isolée en utilisant les techniques de microbiologie pasteurienne, alors que Hugenholtz (2002) et Riesenfeld *et al.* (2004) reportent que moins de 1 % des microorganismes issus de n'importe quel échantillon environnemental seraient cultivables. Ces différences entre observations s'expliquent par le fait que le développement de microorganismes sur gélose dépend de la composition du milieu et des conditions de culture utilisées. De plus, l'étude par ces techniques, des communautés microbiennes impliquées en biométhanisation est rendue particulièrement compliquée (Hofman-Bang *et al.*, 2003), du fait de la nécessité de travailler en conditions anaérobies et de leur vitesse de croissance lente, tout comme de la présence de phénomènes syntrophiques et symbiotiques entre les bactéries acidogènes et les archées méthanogènes hydrogénotrophes, par exemple.

Ainsi, sur la base de ces connaissances, l'extrapolation des résultats obtenus à l'ensemble des microorganismes de l'échantillon est donc *a priori* sans fondement. En revanche, cette fraction cultivable peut être envisagée comme un indicateur et peut donc s'avérer utile lors d'études comparatives.

Une autre mesure physiologique, à l'échelle des communautés, est souvent utilisée en écologie microbienne : il s'agit du système Biolog EcoplateTM (Garland et Mills, 1991 ; Zak *et al.*, 1994 ; Garland, 1997). Cet outil permet de comparer l'oxydation de substrats différents (31) par des communautés bactériennes. En effet, les différents substrats sont contenus dans des plaques de microtitration en présence d'un indicateur coloré (sel de tétrazolium) sensible au potentiel rédox du milieu dans lequel les communautés microbiennes sont inoculées. Lorsque le substrat est oxydé, l'indicateur coloré est réduit et s'accumule dans les cellules bactériennes sous forme de formazan violet et insoluble (Figure 1.7).

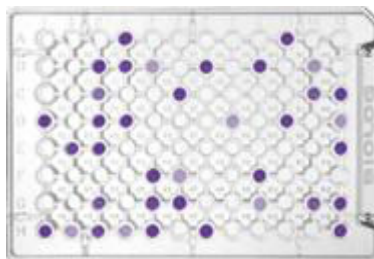


Figure 1.7 - Aspect d'une plaque Biolog™ après inoculation et incubation

D'après le site internet : <http://www.biolog.com>.

Les mycètes, incapables de réduire le sel de tétrazolium utilisé dans les plaques, ne peuvent pas prendre part au développement de la couleur (Dobranic et Zak (1999) cités par Buyer *et al.* (2001)). L'intensité de la coloration du puit, mesurée par spectrophotométrie à 590 nm, est corrélée à celle de l'oxydation du substrat. Des analyses statistiques multivariées permettent alors de comparer les empreintes métaboliques et donc d'opposer ou de relier des communautés bactériennes extraites de différents environnements. Cependant, la réponse Biolog™ est due à la fraction cultivable et viable des communautés. Ainsi cette technique reste sélective et ne permet de caractériser les aptitudes cataboliques que d'une partie des communautés microbiennes. Les profils physiologiques à l'échelle des communautés (CLPP, community level physiological profiles) qui en résultent, ont été utilisés avec succès pour discriminer des communautés microbiennes issues d'espèces ligneuses différentes (Grayston et Campbell, 1996), de diverses espèces herbacées (Westover *et al.*, 1997 ; Grayston *et al.*, 1998a ; Grayston *et al.*, 1998b ; Lahav and Steinberger, 2001), de blés inoculés avec des microorganismes génétiquement modifiés (Gagliardi *et al.*, 2001), de sols contaminés par des hydrocarbures (Wünsche *et al.*, 1995) ou des herbicides (el Fantroussi *et al.*, 1999) et de sols aux pratiques culturales distinctes (Lupwayi *et al.*, 2001).

II.1.2. Les marqueurs cellulaires

Contrairement aux outils basés sur la physiologie et le métabolisme microbiens précédemment décrits, d'autres approches phénotypiques sont basées, cette fois-ci, sur les caractéristiques cellulaires propres aux communautés microbiennes étudiées.

C'est le cas, par exemple, des techniques basées sur l'étude des PLFA (pour phospholipid fatty acid analysis) et FAME (pour fatty acid methyl esters) qui permettent, par la caractérisation de lipides membranaires extraits des microbes présents dans le milieu étudié (principalement le sol, mais aussi les boues activées *etc.*), d'obtenir en plus d'une information taxonomique, la comparaison de structures de communautés microbiennes (Pennanen *et al.*,

1998 ; Dickens et Anderson, 1999 ; Broughton et Gross, 1999 ; Kozdrój et van Elsas, 2000 ; Kozdrój et van Elsas, 2001a). L'approche FAME porte sur tous les lipides de l'environnement étudié tandis que l'approche PLFA concerne uniquement les phospholipides, liés strictement à la fraction vivante, étant donnée leur grande fragilité (Lawlor *et al.*, 2000). Ces lipides sont donc extraits du sol, purifiés avant d'être soumis à une méthylation alcaline dans le cas PLFA et acide dans le cas FAME, puis sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse. En dépit de l'attrait lié à la caractérisation *in situ* de communautés microbiennes, ces techniques présentent, au niveau de la phylogénie, des limitations liées justement à l'extraction directe. En effet, le milieu étudié, comme le sol par exemple, peut facilement contenir des centaines d'acides gras différents dont beaucoup ne sont pas associés à des microorganismes connus (Kozdrój et van Elsas, 2001b). Une partie importante de ces acides gras est aussi partagée par beaucoup de microorganismes. Par conséquent, l'interprétation quantitative de certains acides, indiquant l'abondance de taxa spécifiques, peut être difficile.

L'étude des communautés microbiennes peut également être approchée grâce à la technique d'immunofluorescence. Celle-ci consiste en l'utilisation de fluorochromes⁵ conjugués à des protéines anticorps spécifiques permettant de localiser et visualiser, à l'aide d'un microscope en épifluorescence⁶ par exemple, les organismes recherchés après réaction antigène-anticorps (Bohloul et Schmidt, 1980). Cette technique a été mise en pratique en écologie microbienne pour la première fois avec les travaux de Hobson et Mann (1957), qui ont démontré que des bactéries isolées du rumen pouvaient être détectées *in situ* par l'utilisation d'anticorps fluorescents appropriés. Par la suite, la technique d'immunofluorescence a été utilisée à de nombreuses reprises pour l'étude, entre autres, des communautés bactériennes rhizosphériques, microbiennes méthanogènes présentes dans les sédiments, ou encore la recherche de différents agents, pathogènes ou non, bactériens ou fongiques (Schmidt (1973) et Bohloul et Schmidt (1980)). Les principaux inconvénients de cette technique sont par exemple la création d'anticorps spécifiques à/aux organisme(s) recherché(s), tout comme des interférences lors de la mise en pratique liées à la complexité de certains milieux étudiés (sols, sédiments), l'auto-fluorescence, ou encore l'adsorption non-spécifique⁷ (Bohloul et Schmidt, 1980). De ce fait, la quantification de la population ou communauté microbienne

⁵ Substance chimique capable d'émettre une fluorescence après excitation par une lumière de longueur d'onde spécifique.

⁶ Microscope optique ayant la propriété d'émettre de la lumière à des longueurs d'onde choisies par l'utilisation de filtres spécifiques, afin d'exciter les fluorochromes.

⁷ Phénomène de surface par lequel des molécules se fixent, sans pénétration.

ciblée par immunofluorescence peut également être problématique. Il est alors conseillé de réaliser des dilutions en série du milieu étudié afin de déterminer quelle dilution permettra d'obtenir les meilleurs résultats d'identification et de quantification par immunofluorescence.

II.2. Les approches génétiques

Afin de pallier aux limites liées à la microbiologie pasteurienne précédemment abordées, d'autres techniques ayant pour objectif l'étude de la structure, de la diversité mais également de l'activité des communautés microbiennes, basées sur l'extraction et l'analyse des supports de l'information génétique (acide désoxyribonucléique (ADN)⁸ et acide ribonucléique (ARN)⁹), ont été développées grâce à l'émergence de la biologie moléculaire. Ces techniques génétiques permettent d'avoir accès soit à une partie (approche partielle), soit à l'ensemble (approche globale) des communautés microbiennes d'un milieu.

II.2.1. Les approches génétiques partielles

Les approches génétiques partielles ont été développées grâce à la technique d'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR)¹⁰ de gènes marqueurs spécifiques. En effet, cette technique offre un accès direct aux génomes des différentes communautés microbiennes peuplant un milieu donné, ou encore aux informations relatives à leurs activités à condition que l'étape d'extraction d'ADN/ARN n'ait pas été limitante.

II.2.1.1. Les principaux gènes marqueurs utilisés

Différents gènes marqueurs peuvent être employés afin d'étudier les communautés microbiennes d'un milieu. Cependant, bien que n'importe quel gène puisse théoriquement être employé, le choix de celui-ci obéit à quelques règles. Par exemple, une partie de la séquence de ce gène doit être connue afin de disposer des amorces¹¹ nécessaires à son amplification par PCR. Les séquences d'ADN connues doivent être également stables afin de

⁸ Macromolécule biologique (acide nucléique) présente dans toutes les cellules ainsi que dans certains virus, constituée généralement de deux brins enroulés en double hélice. Les brins sont formés chacun d'une succession de nucléotides et code l'information génétique permettant le développement et le fonctionnement de la cellule.

⁹ Acide nucléique très proche chimiquement de l'ADN. Les ARNs sont issus de la transcription de l'ADN. Il existe de nombreuses familles d'ARN comme par exemple : (1) les ARNs messagers (ARNm) qui sont utilisés par les organismes vivants comme support intermédiaire des gènes pour synthétiser les protéines, (2) les ARNs ribosomiques (ARNr) entrant dans la composition des ribosomes et (3) les ARNs de transfert (ARNt) qui portent des acides aminés et permettent leur incorporation dans les protéines.

¹⁰ De l'anglais polymerase chain reaction. Technique de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de multiplier une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité de cette séquence.

¹¹ Courte séquence d'ADN ou d'ARN, complémentaire d'un fragment d'acide nucléique simple brin, servant de point de départ à la reproduction de celui-ci par un enzyme synthétisant l'acide nucléique (appelé ADN (respectivement ARN) polymérase).

permettre l'hybridation de ces amorces. Suffisamment de données doivent être présentes concernant ce gène au sein de la communauté scientifique afin de s'assurer, par exemple, qu'il soit bien présent chez la population microbienne visée, ou bien qu'il soit le plus adapté à la technique d'analyse que l'on souhaite utiliser.

Le gène codant pour la petite sous-unité ribosomique est un des gènes marqueurs les plus utilisés pour révéler la structure des communautés microbiennes peuplant un milieu donné. Les ribosomes, constitués d'une petite et d'une grande sous-unité, sont des organites essentiels au bon fonctionnement de la cellule, car responsables de la synthèse des protéines. Ils sont présents dans tout organisme vivant.

Chez les procaryotes, le gène codant pour la petite sous-unité des ribosomes est appelé gène ribosomique de la fraction 16S du génome (16S rRNA gene) et est utilisé depuis de nombreuses années comme marqueur phylogénétique. En effet, ce gène est composé de neuf régions variables permettant de discriminer les différents microorganismes (Gutell *et al.*, 1994). Ces régions variables sont espacées de régions hautement conservées (Figure 1.8), c'est-à-dire qui sont restées très stables au cours de l'évolution (Van de Peer *et al.*, 1996). De plus, la taille de ce gène (entre 1500 et 1600 paires de bases¹² (pb)) est assez longue pour permettre l'identification des individus, mais également assez courte pour en faciliter l'amplification, le séquençage et l'analyse.

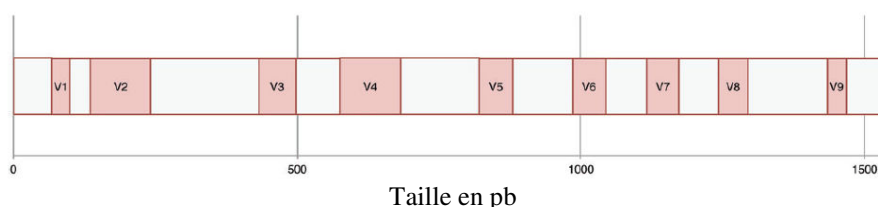


Figure 1.8 - Structure du gène ribosomique 16S

D'après Cox *et al.* (2013). Les régions variables sont numérotées de V1 à V9 et apparaissent en rouge, alors que les régions conservées apparaissent en blanc. pb : paires de bases.

Du fait de son utilisation par la communauté scientifique comme marqueur phylogénétique, de nombreuses séquences du gène ribosomique 16S ont été déposées dans différentes bases de données génétiques disponibles en ligne comme RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) ou encore

¹² Une paire de bases (pb) est l'appariement de deux bases nucléiques situées sur deux brins complémentaires d'ADN ou d'ARN.

Silva (<http://www.arb-silva.de>), permettant ainsi l'affiliation d'une grande partie des séquences nucléiques obtenues par séquençage¹³.

En plus de l'identification des différentes espèces présentes dans un milieu, ce gène permet d'obtenir une estimation semi-quantitative de leur abondance (voir ci-après certaines techniques d'empreintes génétiques et de séquençage haut débit par exemple). Cependant, cette estimation est limitée par le fait que le gène ribosomique 16S peut être présent un nombre de fois variable au sein du génome microbien. En effet, le nombre de copie du gène ribosomique 16S pour un génome peut varier de 1 à 15, voire plus (Klappenbach *et al.*, 2001). Il a été également montré que, même si le nombre de copie du gène ribosomique 16S semble être spécifique à chaque taxon, certaines variations peuvent être enregistrées (Acinas *et al.*, 2004), ou encore que les séquences du gène ribosomique 16S d'une même espèce ou d'un même génome peuvent différer (Clayton *et al.*, 1995 ; Vetrovsky et Baldrian, 2013).

Toutefois, l'objectif de nombreuses études d'écologie microbienne est de suivre la dynamique au cours du temps des populations microbiennes, c'est-à-dire de s'intéresser aux changements éventuels au niveau de l'abondance relative pour un même organisme entre deux temps de prélèvement. Ainsi, l'impact sur les résultats finaux peut être qualifié de négligeable, car les approximations relatives à la quantification des différents microorganismes par l'utilisation du gène ribosomique 16S restent les mêmes pour tous les échantillons analysés. Par conséquent, une diminution ou une augmentation de l'abondance relative au cours du temps d'un organisme pourront tout de même être mises en avant par l'analyse de ce gène ribosomique 16S.

Malgré les limites évoquées précédemment due à l'utilisation du gène codant pour la petite sous-unité des ribosomes, l'utilisation de ce gène d'analyse permettant le suivi et l'étude de populations microbiennes, par différentes techniques, a permis de révéler que la diversité microbienne était bien plus importante que supposée précédemment par les approches de microbiologie pasteurienne (Hofman-Bang *et al.*, 2003).

Chez les microorganismes eucaryotes, le gène codant pour la petite sous-unité des ribosomes est appelé gène ribosomique 18S (18S rRNA gene). Ce gène est l'outil adapté dans le but de présenter une analyse phylogénétique des taxons eucaryotes présents dans un échantillon (Hadziavdic *et al.*, 2014). Cependant, ce gène est insuffisant pour identifier l'ensemble des espèces présentes.

¹³ Technique de biologie moléculaire permettant de déterminer la séquence (suite) des nucléotides constituant un fragment d'ADN.

Un autre gène, en lien avec les ribosomes, est également beaucoup utilisé comme gène marqueur. En effet, alors que le gène 16S (respectivement 18S) décrit précédemment code pour la petite sous-unité ribosomique chez les procaryotes (respectivement les eucaryotes), le gène 23S (respectivement 28S) code quant à lui pour la grande sous-unité. L'espace intergénique (ou IGS pour InterGenic Spacer, Figure 1.9) entre ces deux gènes ribosomiques peut également être utilisée afin de caractériser la structure des communautés microbiennes au sein d'un ou plusieurs échantillons. En effet, la longueur et la séquence de l'IGS ribosomique est variable suivant les espèces (entre 60 et 1 500 paire de bases environ) et les allèles des différentes espèces (Gürtler et Stanisich, 1996). De ce fait, de par l'utilisation d'amorces spécifiques aux séquences conservées des gènes ribosomiques 16S et 23S (respectivement 18S et 28S), l'IGS peut être amplifié par PCR et donc servir à l'analyse de la structure des communautés microbiennes présentes dans un échantillon. Ce gène est couramment utilisé pour l'analyse des populations de champignons présentes dans un échantillon et ce, souvent en complément avec d'autres gènes (cas de *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*, par exemple).

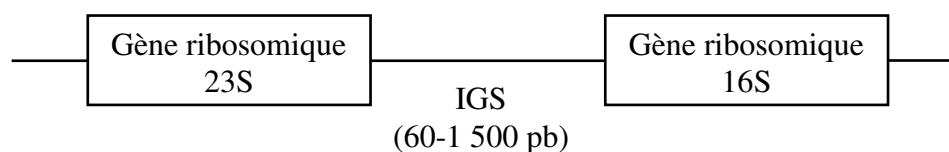


Figure 1.9 - Position de l'espace intergénique ribosomique dans le génome des procaryotes
IGS : espace intergénique (InterGenic Spacer), pb : paires de bases.

Enfin, certains gènes fonctionnels, c'est-à-dire associés à une fonction biologique spécifique comme le gène *mcrA* (pour méthyl coenzyme-M reductase) (Luton *et al.*, 2002), codant pour une enzyme essentielle dans la formation microbienne du CH₄, peuvent être également utilisés en tant que gène marqueur.

Une fois choisi, le gène marqueur peut être analysé de différentes façons afin de révéler la structure et la diversité des différents microorganismes peuplant le milieu étudié.

II.2.1.2. La technique de banque de clones

Cette technique consiste, après amplification d'un gène marqueur présent dans l'ADN extrait d'un milieu, en son clonage¹⁴ et son séquençage afin de révéler la diversité génétique des

¹⁴ Technique consistant à insérer un fragment d'ADN dans un chromosome circulaire, qui sera à son tour inséré dans des bactéries afin que l'ensemble soit multiplié lors des divisions cellulaires.

communautés microbiennes d'un échantillon. Les séquences du gène marqueur obtenues (le gène codant pour la petite sous-unité des ribosomes est majoritairement utilisé ici) permettent l'identification des microorganismes par comparaison avec les séquences d'ADN disponibles dans les bases de données en ligne. Bien que très largement répandue, cette technique nécessite toutefois de très gros investissements humain et financier afin de s'assurer de révéler un maximum de diversité. En effet, la principale limitation de cette technique est qu'elle ne permet de mettre en évidence qu'une faible partie de la diversité microbienne présente dans un échantillon (Rastogi et Sani, 2011). Dunbar *et al.* (2002) ont, quant à eux, rapporté qu'entre 16 000 et 44 000 clones seraient nécessaires pour documenter la moitié des espèces bactériennes présentes dans différents sols d'Arizona. Par conséquent, dans la grande majorité des études utilisant la technique de banque de clones, avec seulement 100 à 200 clones analysés par échantillon, une infime partie de la diversité microbienne est révélée.

II.2.1.3. Q-PCR, RT-Q-PCR et microscopie FISH

Le suivi de gène marqueur spécifique par PCR quantitative (Q-PCR, également appelée PCR en temps réel) ou par microscopie d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) permet de quantifier l'abondance de certaines populations microbiennes. Suivant leur mode d'application, ces techniques permettent également d'avoir un aperçu de la structure génétique d'une communauté microbienne par la quantification de plusieurs populations spécifiques présentes dans un même échantillon. La PCR quantitative consiste au suivi en temps réel de marqueur fluorescent comme le SYBR Green ou de sonde fluorescente de type TaqMan s'hybridant aux fragments d'ADN synthétisés à chaque cycle PCR, permettant ainsi leur quantification (Higuchi *et al.*, 1993 ; Smith et Osborn, 2009). La technologie de PCR quantitative peut également être utilisée pour la quantification de l'expression de gènes, par la quantification de fragment d'ARN messager, suite à leurs synthèses en ADN complémentaire. Elle est alors appelée reverse transcriptase quantitative PCR (RT-Q-PCR) (Bustin *et al.*, 2005). La technologie de microscopie FISH, quant à elle, consiste en l'utilisation de sondes de nucléotides marquées afin de permettre l'identification phylogénétique et le comptage de cellules microbiennes grâce à l'utilisation d'un microscope en épifluorescence (Amann *et al.*, 1995).

Ainsi, ces différentes techniques de biologie moléculaire permettent de mesurer l'abondance et/ou l'expression de gènes marqueurs sélectionnés par l'utilisateur suivant leurs caractéristiques taxonomiques ou fonctionnelles. Bien que ces techniques soient rapides et assurent une grande sensibilité pour la quantification de séquences d'ADN (et donc

d'organismes), leur utilisation peut être facilement et rapidement perturbée par la présence d'impuretés, comme par exemple des acides humiques, conduisant à des inhibitions d'amplification ou d'hybridation (Rincon-Florez *et al.*, 2013). De même, l'auto fluorescence de certains microorganismes (du fait du cofacteur F₄₂₀ chez les archées par exemple) peut conduire à une perturbation de l'analyse de certains échantillons par microscopie FISH.

II.2.1.4. Les techniques d'empreintes moléculaires

Les techniques d'empreintes moléculaires sont des techniques de biologie moléculaire utilisées pour caractériser la structure de la communauté microbienne présente dans un environnement donné. Elles sont basées sur l'analyse directe des produits de l'amplification d'un gène marqueur, après séparation suivant leurs tailles ou leur polymorphisme de séquence par migration sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide, par exemple. Le gène marqueur le plus couramment utilisé dans ce cas, est le gène codant pour la petite sous-unité ribosomique. Les techniques d'empreintes moléculaire regroupent par exemple les techniques d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant ou électrophorèse sur gel en gradient de température (DGGE/TGGE, denaturing gradient gel electrophoresis/temperature gradient gel electrophoresis), de polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux ou non (T-RFLP, terminal restriction fragment length polymorphism ; RFLP, restriction fragment length polymorphism), d'analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique (ARDRA, amplified ribosomal DNA restriction analysis), ou encore d'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins d'ADN (SSCP, single strand conformation polymorphism). D'autres techniques, comme l'analyse de l'espace intergénique ribosomique (RISA, ribosomal intergenic spacer analysis) et l'analyse automatique de l'espace intergénique ribosomique (ARISA, automated ribosomal intergenic spacer analysis) ciblent quant à elles l'intergène ribosomique. Ces différentes techniques ont l'avantage d'être rapide et de permettre l'analyse d'un grand nombre d'échantillons de façon simultanée (Ranjard *et al.*, 2000b ; Rastogi et Sani, 2011). Cependant, la taxonomie des microorganismes d'un milieu ne peut pas être précisée par ces techniques : elles ne permettent que de comparer la structure génétique de différentes communautés microbiennes, au cours du temps ou en fonction d'autres facteurs. Par conséquent et dans le but d'avoir également accès aux informations taxonomiques, les techniques d'empreintes moléculaires peuvent être complémentées par la création d'une banque de clones, par exemple.

Une des techniques d'analyse des communautés microbiennes par empreintes moléculaires utilisée dans de nombreuses études et pour de nombreux types d'environnements différents est la T-RFLP (Lukow *et al.*, 2000 ; Braker *et al.*, 2001 ; Collins *et al.*, 2003 ; Egert *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2004b ; Smalla *et al.*, 2007 ; Tipayno *et al.*, 2012 ; Pervin *et al.*, 2013). Cette technique est basée sur l'amplification du gène marqueur par PCR en utilisant des amorces spécifiques, dont une est marquée à son extrémité 5' par un fluorochrome. Une fois la partie du gène d'intérêt amplifiée et donc marquée par le fluorochrome, les produits PCR sont digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction, avant que la taille des produits de digestion marqués ainsi que leur relative abondance (basé sur l'intensité de la fluorescence) ne soient déterminées par l'intermédiaire d'un séquenceur capillaire de type Sanger (Sanger *et al.*, 1977). La Figure 1.10 résume les différentes étapes de la T-RFLP.

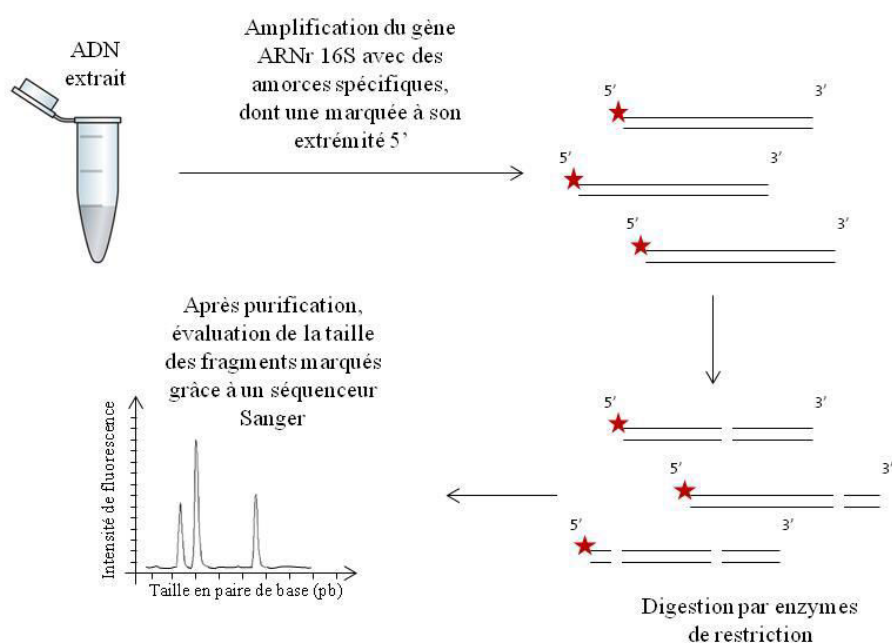


Figure 1.10 - Principe de la T-RFLP

Bien que cette technique permette d'avoir un aperçu rapide de la structure génétique des communautés microbiennes d'un grand nombre d'échantillons, ou encore qu'elle soit hautement reproductible (Osborn *et al.*, 2000), une de ses principales limites est le seuil de détection : seules les populations microbiennes dominantes d'une communauté peuvent être facilement détectées. D'autres populations générant des signaux de fluorescence faibles ne pourront être distinguées du bruit de fond et ne pourront donc pas être prises en compte dans l'estimation de la diversité (Bent et Forney, 2008). De même, il a été démontré que plusieurs séquences partageant un même site de restriction peuvent partager le même signal final et ne pourront pas, en conséquence, être différenciées (Nocker *et al.*, 2007). Enfin, cette technique

ne permet pas une identification rapide des populations microbiennes. En effet, il est possible de déduire la composition de la communauté étudiée par la taille des fragments de restriction générés en comparant les résultats de T-RFLP obtenus à des bases de données regroupant les différentes tailles de fragments qu'il est possible d'obtenir, suivant les enzymes de restriction utilisées et ceci pour différentes espèces de bactéries et d'archées. Cependant, pour un même produit de digestion, cette technique d'identification donne souvent plusieurs origines possibles, ce qui rend difficile, voire impossible, une bonne identification. La réalisation de banque de clones est alors la seconde méthode permettant d'identifier l'origine des produits de digestion marqués. Or, comme décrit précédemment (II.2.1.2), cette technique est fastidieuse (Rittmann *et al.*, 2008) et nécessite de maîtriser un grand nombre de techniques de microbiologie et biologie moléculaire.

La DGGE et la TGGE permettent de pallier à la limitation de la T-RFLP concernant l'identification rapide des populations microbiennes, par l'accès direct, après excision du gel, aux bandes d'ADN analysées, permettant ainsi leurs séquençages et leurs identifications (Ranjard *et al.*, 2000b ; Kirk *et al.*, 2004). En effet, la DGGE et la TGGE sont toutes deux basées sur la séparation des produits d'amplification du gène marqueur par électrophorèse sur gel d'acrylamide, sous conditions de gradient dénaturant (par l'utilisation de formamide ou d'urée dans le cas de la DGGE) ou de température (cas de la TGGE). Afin d'éviter l'élution des produits d'amplification du gel lors de la migration, une structure d'environ 40 pb riche en nucléotides guanine et cytosine (GC) portée à l'extrémité 5' d'une des deux amorces est ajoutée aux fragments d'ADN amplifiés lors de la PCR (Myers *et al.*, 1985). Du fait que les produits PCR résultant de l'amplification ont tous plus ou moins la même taille, ce sont les propriétés de ces fragments et notamment leur contenu en base G et C qui vont déterminer leur comportement migratoire et donc permettre leur séparation en fonction du gradient dénaturant. La Figure 1.11 présente les étapes clés de la DGGE.

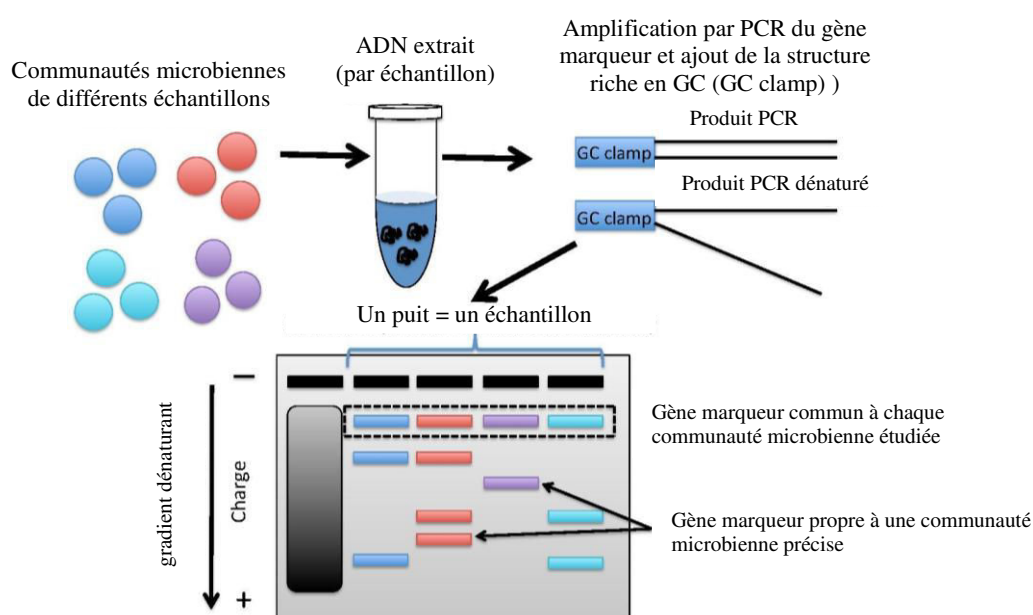


Figure 1.11 - Les étapes clés de la DGGE

En plus de permettre une identification assez rapide des fragments d'ADN, ces techniques ont également l'avantage de permettre une discrimination théorique entre deux fragments d'ADN ayant une différence minimum d'un nucléotide (Nocker *et al.*, 2007). Cependant, elles sont difficiles à reproduire et une même espèce peut générer plusieurs bandes d'ADN sur le gel du fait de micro variation dans la séquence d'ADN (Kirk *et al.*, 2004 ; Nocker *et al.*, 2007).

La technique RISA permet quant à elle l'analyse de la région intergénique ribosomique après amplification par PCR puis migration sur gel d'acrylamide. Sa version automatisée (ARISA), consiste, quant à elle, en l'utilisation d'amorces PCR forward marquées (fluorescence) qui seront par la suite détectées, après migration, de façon automatique grâce à un laser. Ces deux méthodes d'analyse de l'IGS ribosomique sont jugées hautement reproductibles, cependant elles nécessitent une grande quantité d'ADN microbien au départ et sont longues à mettre en place (Fisher et Triplett, 1999 ; Kirk *et al.*, 2004). Elles permettent également d'obtenir une estimation seulement grossière de la richesse microbienne de l'échantillon étudié (Kovacs *et al.*, 2010). Pour exemple, les techniques RISA et ARISA ont été utilisées pour étudier la structure microbienne du sol (Ranjard *et al.*, 2000a ; Sigler et Zeyer, 2002 ; Khodadad *et al.*, 2011), ainsi qu'en milieu marin (Brown *et al.*, 2005).

Les études notamment de Ranjard *et al.* (2000b), Kirk *et al.* (2004), Nocker *et al.* (2007) et Rincon-Florez *et al.* (2013) permettent de souligner le fait que chaque technique d'empreinte

moléculaire a ses propres avantages et inconvénients pour révéler la structure d'une communauté microbienne donnée. Ainsi, le choix de la méthode d'analyse à utiliser dépend entre autre de nombreux facteurs comme la complexité de la communauté microbienne à analyser ainsi que du nombre d'échantillons à analyser.

II.2.1.5. Utilisation de puces à ADN

La structure et la diversité génétiques d'une communauté microbienne d'un environnement peuvent être analysées également grâce à l'utilisation de puces à ADN. En effet, celles-ci ont un potentiel sans précédent pour atteindre l'objectif de développement d'un outil haut débit spécifique, sensible et quantitatif servant à la détection, l'identification et la caractérisation microbienne d'un milieu naturel (Gentry *et al.*, 2006). Ces puces à ADN contiennent des sondes moléculaires, c'est-à-dire des fragments d'ADN simple brin connus et spécifiques aux différents types de microorganismes recherchés dans l'échantillon à analyser (fragment d'ADN du gène ribosomique 16S par exemple). L'ADN total de l'échantillon ayant été extrait, le gène marqueur est par la suite amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques marquées par fluorescence avant que les amplicons soient par la suite dénaturés puis hybridés sur la sonde. L'utilisation d'un microscope en épifluorescence permet de lire la puce à ADN et ainsi de détecter quels sont les organismes recherchés présents dans l'échantillon, mais également d'évaluer leurs abondances relatives respectives à partir de l'intensité de fluorescence. Cette méthode d'analyse a l'avantage d'être hautement reproductible mais ne permet pas cependant de s'intéresser à la structure et à la diversité microbiennes totales d'un échantillon, du fait que les sondes moléculaires doivent être créées et fixées sur la puce au préalable (Rastogi et Sani, 2011). Ces puces peuvent également servir à quantifier l'activité de certaines fonctions biologiques. Pour ce faire, la puce contient des sondes moléculaires correspondant à certains gènes codant des enzymes spécifiques à une ou différentes activités biologiques. Par extraction de l'ARN de l'échantillon, conversion de celui-ci en ADN complémentaire, amplification puis hybridation sur la puce, il est donc possible de suivre l'activité de certaines fonctions biologiques au cours du temps ou sous différentes conditions environnementales.

II.2.1.6. Le séquençage haut débit

Les derniers progrès en matière de biologie moléculaire ont permis, depuis le début des années 2000, la mise sur le marché de séquenceurs de nouvelle génération. Contrairement au séquenceur de type Sanger (Sanger *et al.*, 1977), les séquenceurs de nouvelle génération

permettent l'accès à la structure et à la diversité des communautés microbiennes issues d'environnements divers par le séquençage haut débit et simultané de plusieurs millions de séquences provenant de nombreux échantillons (Mardis, 2008 ; Rastogi et Sani, 2011). Ces différentes technologies de séquençage haut débit ont été développées par différentes compagnies (Roche Diagnostics Corp., Illumina Inc., Life Technologies Corp., principalement) et permettent ainsi d'avoir accès rapidement, par l'analyse d'un gène marqueur spécifique par exemple, à la structure et la diversité génétique des communautés microbiennes de n'importe quel environnement. Ces nouvelles technologies de séquençage haut débit permettent donc de pallier aux principales limites des séquenceurs de type Sanger que sont le coût et le temps de séquençage. Elles permettent également un séquençage « en profondeur » des échantillons limitant ainsi l'absence de détection des microorganismes peu abondant au sein d'une communauté (Rastogi et Sani, 2011). Toutefois, ces techniques nécessitent d'importants efforts et moyens en termes d'algorithme, de logiciel et de compétence en bio-informatique afin de permettre l'analyse des données générées (Rincon-Florez *et al.*, 2013).

II.2.2. Les approches génétiques globales

Comme nous l'avons vu précédemment ; les approches génétiques partielles ont pour principal inconvénient de ne permettre qu'une analyse limitée des communautés microbiennes (Rastogi et Sani, 2011) car se focalisant sur l'étude de gène marqueur. Il a été également démontré que suivant le choix des amorces ainsi que de la température d'hybridation utilisée lors des différents cycles d'amplification, par l'inhibition possible de l'ADN polymérase par des acides humiques, ou encore par la formation de chimère, l'amplification par PCR de gène marqueur peut conduire à certain biais et ainsi créer une diversité artificielle au sein de l'échantillon analysé (Ranjard *et al.*, 2000b). Par conséquent, pour pallier à ces limitations et permettre ainsi une compréhension plus globale de la structure et/ou de la diversité génétique au sein d'un échantillon, des approches génétiques globales ont été développées.

II.2.2.1. Etude de la cinétique d'hybridation de l'ADN

La diversité génétique d'un échantillon peut être effectivement approchée par l'étude de la dénaturation thermique de l'ADN et la mesure spectrophotométrique des cinétiques d'hybridation entre brins homologues. Cette technique est basée sur la propriété de dénaturation de l'ADN double brins sous haute température. En effet, l'ADN est composé de

deux brins complémentaires comprenant une suite de bases azotées (adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et thymine (T)). La liaison entre les deux brins d'ADN formant la molécule double brins est réalisée grâce aux liaisons hydrogènes pouvant s'établir entre les bases complémentaires présentes sur chacun d'entre eux : deux liaisons hydrogènes se forment entre les bases complémentaires adénine et thymine et trois liaisons hydrogènes se forment entre les bases cytosine et guanine. En chauffant les molécules d'ADN double brins au-delà de la température de fusion appelée T_m (pour melting temperature) propre à chaque molécule d'ADN double brins du fait de sa composition en A, C, G et T, les liaisons hydrogènes entre les bases azotées complémentaires vont se rompre, permettant la dénaturation de la molécule d'ADN double brins en deux molécules simple brin. L'étude, grâce à un spectrophotomètre, de l'hybridation après dénaturation des molécules simple brin d'ADN au cours du temps peut être ainsi utilisée afin d'estimer la diversité spécifique globale d'un échantillon (Torsvik *et al.*, 1998). En effet, le taux d'hybridation est ici corrélé avec la diversité génétique de l'échantillon analysé. Sous conditions particulières, le temps nécessaire pour que la moitié de l'ADN dénaturé s'hybride est donc proportionnel à la diversité génétique et peut être ainsi utilisé comme indice de diversité (Torsvik *et al.*, 1990b ; Rastogi et Sani, 2011). Ces techniques de dénaturation et d'étude de la cinétique d'hybridation de l'ADN ont été utilisées afin d'évaluer la diversité microbienne de différents sols (Torsvik *et al.*, 1990a).

II.2.2.2. Etude de la teneur en GC de l'ADN

La guanine et la cytosine sont deux bases azotées complémentaires de la molécule d'ADN. D'après Tiedje *et al.* (1999), la teneur en guanine et cytosine de l'ADN des procaryotes varie entre 24 et 76 %, et les microorganismes appartenant à un même groupe phylogénétique ont une teneur en GC variant seulement de 3 à 5 %. De ce fait, l'analyse de la teneur en GC de la totalité de l'ADN extrait d'un échantillon permet de caractériser la diversité microbienne ainsi que l'abondance relative de chaque groupe à teneur en GC proche (Tiedje *et al.*, 1999). Cette méthode quantitative a l'avantage d'être applicable à l'ADN de tous les organismes vivants et de ne pas être sujette au biais potentiel lié à une amplification par PCR (Tiedje *et al.*, 1999). Outre la nécessité d'une grande quantité d'ADN (environ 50 µg) et d'environ 4 jours d'analyse, l'étude de la diversité microbienne par l'étude de la teneur en GC ne permet d'obtenir qu'une résolution plutôt grossière, du fait que différents groupes phylogénétiques peuvent avoir la même teneur en GC (Holben et Harris, 1995 ; Tiedje *et al.*, 1999 ; Rastogi et Sani, 2011).

II.2.2.3. Analyse de type « méta »

Le terme « métagénome », proposé par Handelsman *et al.* (1998), définit l'ensemble des molécules d'ADN provenant de la communauté d'organismes présents dans un environnement donné. Une analyse métagénomique consiste donc en l'analyse, tant au niveau structure et diversité taxonomique que fonctionnelle potentielle, de la totalité de l'ADN présent dans un échantillon sans nécessité de se restreindre aux seuls microorganismes cultivables sur milieu de culture (Riesenfeld *et al.*, 2004 ; Hugenholtz et Tyson, 2008). Pour ce faire et d'après Rastogi et Sani (2011), l'ADN total de la communauté microbienne de l'échantillon environnemental doit être extrait, fragmenté et cloné aléatoirement dans un vecteur qui servira par la suite à la transformation de cellules bactériennes compétentes. Les cellules ayant intégré un vecteur seront par la suite sélectionnées et ce dernier sera séquencé. Riesenfeld *et al.* (2004) rapportent qu'au minimum 10^{11} clones seraient nécessaire afin d'avoir accès également aux génomes des microorganismes faiblement représentés au sein de la communauté microbienne de l'échantillon analysé. Cette technique demande donc un temps et des moyens considérables.

Cependant, grâce au développement des nouvelles technologies de séquençage haut débit, les analyses de type métagénomique ont pu se démocratiser, tout en assurant un gain de temps et une réduction des coûts (Shendure et Ji, 2008). De même, l'émergence de ces outils a également permis de s'intéresser à l'ensemble des ARNs messagers produits par la communauté microbienne d'un milieu. Ainsi, par l'analyse de ces ARNs messagers (appelé métatranscriptomique), les informations relatives à la structure et la diversité fonctionnelle des différentes populations présentes dans l'échantillon sont obtenues. Enfin, la métaprotéomique, axée sur l'étude de l'ensemble des protéines produites par la communauté microbienne, permet également d'avoir accès à la diversité fonctionnelle.

II.3. Bilan

Il existe de nombreuses techniques d'analyse en écologie microbienne. Le choix de la technique la plus appropriée à une étude donnée dépend principalement du type et du nombre d'échantillons à analyser, des moyens financiers, temporel et matériel à disposition, mais également de l'objectif de l'étude (accès à la structure de la communauté, à sa diversité génétique, ou sa diversité fonctionnelle, par exemple). La Tableau 1.1 résume les principales techniques d'analyse en écologie microbienne abordées précédemment et rassemble leurs avantages et inconvénients. Ceux-ci ont été déterminés sur la base des travaux cités tout au long de cette synthèse bibliographique. Il est intéressant de noter que des différences de

jugement quant à la rapidité ou la résolution d'une technique par exemple, peuvent apparaître entre les études.

Tableau 1.1 Tableau récapitulatif des principes, objectifs, avantages et inconvénients des principales techniques d'analyse en écologie microbienne (sur la base de la littérature)

	Techniques	Principes	Objectifs	Avantages	Inconvénients
Approches phénotypiques	Milieux de culture	Isolement et culture de microorganismes	Diversité	- Offre un accès direct aux communautés microbiennes cultivables (Kirk <i>et al.</i> , 2004)	- Non représentative de l'étendue de la communauté microbienne (Ranjard <i>et al.</i> , 2000b ; Kirk <i>et al.</i> , 2004 ; Rastogi et Sani, 2011)
	Biolog Ecoplate™	Comparaison de l'oxydation de différents substrats par les communautés bactériennes	Diversité des profils physiologiques bactériens	- Permet de déterminer la part viable des communautés bactériennes étudiées (Kirk <i>et al.</i> , 2004)	- Liée à la fraction cultivable (<i>i.e.</i> très faible) et viable de la communauté étudiée (Kirk <i>et al.</i> , 2004)
	FAME et PLFA	Etude des lipides membranaires extraits des communautés microbiennes	Structure et diversité	- Permet la caractérisation <i>in situ</i> des communautés microbiennes (Kirk <i>et al.</i> , 2004 ; Rastogi et Sani, 2011)	- Interprétation en termes d'abondance difficile - Limitation au niveau de l'identification phylogénique (Kozdrój et van Elsas, 2001b)
	Immunofluorescence	Basée sur l'utilisation de fluorochromes et la réaction antigène-anticorps	Identification d'organismes spécifiques	- Une fois la technique mise en place, elle permet de traiter un grand nombre d'échantillons rapidement (Bohlool et Schmidt, 1980)	D'après Bohlool et Schmidt (1980) : - Besoin de créer des anticorps spécifiques pour chaque organisme recherché - Auto-fluorescence et adsorption non-spécifique de certains milieux - Quantification problématique
Approches génétiques partielles	Banque de clones	Amplification d'un gène marqueur puis clonage et séquençage	Diversité	- Haute résolution phylogénétique (Nocker <i>et al.</i> , 2007)	D'après Nocker <i>et al.</i> (2007) et Rastogi et Sani (2011) : - Long et fastidieux - Un nombre d'échantillons très faible peut être traité en même temps - Recours à de nombreuses techniques de microbiologie

	Techniques	Principes	Objectifs	Avantages	Inconvénients
	Q-PCR	Quantification d'un gène marqueur	Structure	- Rapide, précise, très sensible et reproductible (Rastogi et Sani, 2011 ; Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013)	D'après Rincon-Florez <i>et al.</i> , (2013) : - Ne cible qu'une séquence connue - Précision et fiabilité dépendent de la spécificité des amorces - Inhibition possible de la réaction
	RT-Q-PCR	Quantification de l'expression d'un gène marqueur	Structure fonctionnelle	- Rapide, précise, très sensible et reproductible (Rastogi et Sani, 2011 ; Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013)	D'après Rincon-Florez <i>et al.</i> , (2013) : - Ne cible qu'une séquence connue - Précision et fiabilité dépendent de la spécificité des amorces - Inhibition possible de la réaction
	Microscopie FISH	Identification et quantification phylogénétique par l'utilisation de sondes marquées	Structure	- Différentes sondes peuvent être combinées en même temps pour un même échantillon (Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013)	D'après Rincon-Florez <i>et al.</i> (2013) : - Auto-fluorescence de certains milieux et des microorganismes - Précision et fiabilité dépendent de la spécificité des sondes
	DGGE/TGGE	Amplification d'un gène marqueur et séparation des amplicons par électrophorèse sous conditions dénaturantes ou selon gradient de température	Structure	D'après Rincon-Florez <i>et al.</i> (2013) : - La diversité microbienne peut facilement être évaluée par excision et séquençage des bandes - Discrimination théorique possible entre deux séquences ayant une différence de seulement un nucléotide	- Comparaison entre deux gels difficiles, ce qui rend cette technique faiblement reproductible (Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013) - De multiples bandes pour une même espèce peuvent être générées du fait d'une micro hétérogénéité au sein du génome (Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013) - Biais possibles liés à l'amplification PCR (Ranjard <i>et al.</i> , 2000b ; Rastogi et Sani, 2011)

	Techniques	Principes	Objectifs	Avantages	Inconvénients
	T-RFLP	Amplification d'un gène marqueur grâce à des amorces marquées, digestion enzymatique et quantification des produits de digestion	Structure	D'après Osborn <i>et al.</i> (2000) : - Hautement reproductible - Permet d'étudier un grand nombre d'échantillons simultanément	- Accès à la diversité microbienne difficile (Rastogi et Sani, 2011) - Ne permet de détecter que les populations microbiennes dominantes (Bent et Forney, 2008) - Les séquences du gène marqueur provenant de deux organismes différents peuvent partager un même site de restriction (Nocker <i>et al.</i> , 2007) - Biais possibles liés à l'amplification PCR (Ranjard <i>et al.</i> , 2000b ; Rastogi et Sani, 2011)
	RISA/ARISA	Amplification d'un gène marqueur (IGS) puis migration sur gel d'électrophorèse	Structure	- Hautement reproductible (Kirk <i>et al.</i> , 2004)	- Plus d'une séquence peut être générée pour un même organisme (Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013) - Une taille d'IGS similaire entre différents organismes peut conduire à une sous-estimation de la richesse microbienne (Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013) - Biais possibles liés à l'amplification PCR (Ranjard <i>et al.</i> , 2000b ; Rastogi et Sani, 2011)
	Puces à ADN	Hybridation de gènes marqueurs recherchés sur des sondes moléculaires spécifiques	Structure (fonctionnelle)	D'après Kirk <i>et al.</i> (2004) et Rincon-Florez <i>et al.</i> (2013) : - Haut débit - Hautement reproductible	- Nécessite la construction de la puce et donc la connaissance de la séquence de tous les gènes marqueurs recherchés (Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013) - Limitée par le nombre de sondes sur la puce (Rincon-Florez <i>et al.</i> , 2013) : - Biais possibles liés à l'amplification PCR (Ranjard <i>et al.</i> , 2000b ; Rastogi et Sani, 2011)

	Techniques	Principes	Objectifs	Avantages	Inconvénients
	Séquençage haut débit	Séquençage haut débit d'un gène marqueur	Structure et diversité	<ul style="list-style-type: none"> - Très haute résolution (Rastogi et Sani, 2011) - Coût faible en préparation des échantillons par rapport à la quantité de données générées - Très rapide (Rincon-Florez <i>et al.</i>, 2013) 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite des connaissances en bio-informatique et des ordinateurs puissants (Rincon-Florez <i>et al.</i>, 2013) - Biais possibles liés à l'amplification PCR (Ranjard <i>et al.</i>, 2000b ; Rastogi et Sani, 2011)
Approches génétiques globales	Cinétique d'hybridation de l'ADN	Dénaturation thermique de l'ADN et mesure spectrophotométrique des cinétiques d'hybridation	Diversité	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'amplification par PCR (Kirk <i>et al.</i>, 2004) 	D'après Kirk <i>et al.</i> (2004) : <ul style="list-style-type: none"> - Peu sensible - Nécessite un grand nombre de séquences d'ADN
	Etude de la teneur en GC de l'ADN	Mesure du taux de guanine et de cytosine de l'ADN	Diversité	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'amplification par PCR (Kirk <i>et al.</i>, 2004) 	D'après Kirk <i>et al.</i> (2004) : <ul style="list-style-type: none"> - Résolution grossière - Nécessite une grande quantité d'ADN
	Métagénomique	Analyse de l'ensemble de l'ADN d'un échantillon	Structure et diversité	<ul style="list-style-type: none"> - Haute résolution - Très rapide 	D'après Rincon-Florez <i>et al.</i> (2013) : <ul style="list-style-type: none"> - Nécessite des connaissances en bio-informatique et des ordinateurs puissants - Equipement et consommables onéreux
	Métatranscriptomique	Analyse de l'ensemble de l'ARN d'un échantillon	Structure et diversité fonctionnelle	<ul style="list-style-type: none"> - Haute résolution - Très rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite des connaissances en bio-informatique et des ordinateurs puissants (Rincon-Florez <i>et al.</i>, 2013) - Equipement et consommables onéreux - La préservation et l'extraction de l'ARN peuvent être compliqués suivant l'environnement étudié

Cette très grande diversité de techniques d'analyse des communautés microbiennes a été utilisée en digestion anaérobie dans de nombreuses études. Ainsi, et parmi tant d'autres, les techniques d'isolement et de culture des microorganismes ont été utilisées afin de mieux comprendre et de caractériser la diversité des populations microbiennes cultivables impliquées dans le processus de digestion anaérobie par Toerien *et al.* (1968), Qiu *et al.* (2004) et Liu *et al.* (2011), par exemple. Ces techniques permettent en effet de générer, après

l'isolement des souches microbiennes, des informations importantes quant à leurs aptitudes fonctionnelles et ainsi de définir plus en détail leurs rôles potentiels au sein de l'écosystème.

La technique de banque de clones, permettant également un accès à la diversité microbienne, est très souvent utilisée en complément d'autres techniques moléculaires caractérisant la structure génétique des échantillons. Ainsi, dans de nombreuses études portant sur les communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie, cette technique de banque de clones a pu être couplée aux techniques ARDRA (McHugh *et al.*, 2003 ; Klocke *et al.*, 2007), RFLP (Nettmann *et al.*, 2008) ou encore de microscopie FISH et de Q-PCR (Nettmann *et al.*, 2008 ; Nettmann *et al.*, 2010 ; Bergmann *et al.*, 2010a ; Bergmann *et al.*, 2010b ; Jang *et al.*, 2014 ; Gagliano *et al.*, 2015).

La structure génétique des communautés microbiennes présentes dans de nombreux digesteurs anaérobies a également été étudiée à l'aide d'autres techniques d'empreintes moléculaires comme la DGGE et la TGGE (Malin et Illmer, 2008 ; Kundu *et al.*, 2012 ; Merlino *et al.*, 2013 ; Kundu *et al.*, 2013), la RISA et l'ARISA (Cheng *et al.*, 2009 ; Ciesielski *et al.*, 2013), ou encore la T-RFLP, (Heeg *et al.*, 2014 ; Klang *et al.*, 2015). D'autres travaux ont utilisé les techniques de séquençage haut débit et/ou de métagénomique (Schlüter *et al.*, 2008 ; Rademacher *et al.*, 2012 ; Solli *et al.*, 2014).

Dans la suite de cet exposé, l'influence de différents facteurs opérationnels sur la structure des communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie sera étudiée principalement par T-RFLP et séquençage haut débit du gène codant pour la petite sous-unité ribosomique. Ce choix résulte du fait de la simplicité de ces techniques pour analyser un grand nombre d'échantillons, du matériel disponible au laboratoire ainsi que de la gestion des coûts tant matériel, qu'humain.

Chapitre 2. Dynamique des communautés microbiennes de différents digesteurs anaérobies de laboratoire traités en réplikat, successivement exposés à une augmentation du taux de charge organique, une acidose et un rétablissement du processus de digestion

Dans ce chapitre, trois digesteurs anaérobies de type CSTR ont subi une augmentation de leur taux de charge organique en vue de créer une perturbation du processus par acidose. Une fois celle-ci atteinte, le processus de digestion anaérobie a été réinitié par l'utilisation d'une solution alcaline afin de ramener le pH à neutralité. Tout au long de l'expérimentation, les résultats, tant au niveau performances que dynamique des communautés bactériennes et archées, ont été comparés entre les triplicats. Ces résultats ont également été comparés à ceux obtenu par un quatrième digesteur alimenté de façon prudente.

Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery.

Xavier Goux, Magdalena Calusinska, Sébastien Lemaigre, Martyna Marynowska, Michael Klocke, Thomas Udelhoven, Emile Benizri and Philippe Delfosse

Ces travaux ont été publiés sous une forme légèrement différente dans la revue « *Biotechnology for biofuels* » (2015) 8:122 – DOI 10.1186/s13068-015-0309-9.

Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery

Abstract

Background: Volatile fatty acid intoxication (acidosis), a common process failure recorded in anaerobic reactors, leads to drastic losses in methane production. Unfortunately, little is known about the microbial mechanisms underlying acidosis and the potential to recover the process. In this study, triplicate mesophilic anaerobic reactors of 100 L were exposed to acidosis resulting from an excessive feeding with sugar beet pulp and were compared to a steady-state reactor.

Results: Stable operational conditions at the beginning of the experiment initially led to similar microbial populations in the four reactors, as revealed by 16S rRNA gene T-RFLP and high-throughput amplicon sequencing. *Bacteroidetes* and *Firmicutes* were the two dominant phyla, and although they were represented by a high number of operational taxonomic units, only a few were dominant. Once the environment became deterministic (selective pressure from an increased substrate feeding), microbial populations started to diverge between the overfed reactors. Interestingly, most of bacteria and archaea showed redundant functional adaptation to the changing environmental conditions. However, the dominant *Bacteroidales* were resistant to high volatile fatty acids content and low pH. The severe acidosis did not eradicate archaea and a clear shift in archaeal populations from acetotrophic to hydrogenotrophic methanogenesis occurred in the overfed reactors. After 11 days of severe acidosis (pH 5.2 ± 0.4), the process was quickly recovered (restoration of the biogas production with methane content above 50 %) in the overfed reactors, by adjusting the pH to around 7 using NaOH and NaHCO₃.

Conclusions: In this study we show that once the replicate reactors are confronted with sub-optimal conditions, their microbial populations start to evolve differentially. Furthermore the alterations of commonly used microbial parameters to monitor the process, such as richness, evenness and diversity indices were unsuccessful to predict the process failure. At the same time, we tentatively propose the replacement of the dominant *Methanosaeta* sp. in this case by *Methanoculleus* sp., to be a potential warning indicator of acidosis.

Keywords

Anaerobic digestion, Volatile fatty acids intoxication, Process recovery, 16S rRNA gene-based T-RFLP, High-throughput 16S rRNA amplicon sequencing, Microbial ecology

I. Background

Anaerobic digestion (AD and syn. biomethanation) of biomass, including wastewater, agro-food residues, municipal solid waste, and energy crops, is not only regarded as a promising source of renewable energy, but also generates environmental benefits, *e.g.* reduction of greenhouse gas emissions, manure odour and pathogens (Möller and Stinner, 2009; Yiridoe *et al.*, 2009) and contributes to the recovery of essential nutrients (N, P, and K). The main products of the AD process are the biogas and the digestion residue. Biogas is composed of methane (CH₄), carbon dioxide (CO₂) and trace gases such as H₂S, NH₃ and H₂, and it can be combusted in combined heat and power units (CHP) to provide electricity and heat. Alternatively, by eliminating CO₂ and trace gases, methane can be upgraded to reach the natural gas quality and be injected into the gas grid or used as transport fuel. Digestion residue being rich in nutrients is gaining reputation as a fertilizer in agriculture (Wilkie, 2008).

The AD process is conducted by various microbial groups interacting to decompose the organic matter into minerals and simple molecules. During the first stage called hydrolysis, facultative or obligatory anaerobic fermenting microorganisms decompose proteins, fats and polysaccharides into soluble compounds (*i.e.* amino acids, long-chain fatty acids and sugars). In continuation, during the acidogenic stage, acidogenic bacteria convert these by-products into volatile fatty acids (VFAs), CO₂, H₂, and alcohols. Furthermore, VFAs, CO₂ and H₂ are transformed by acetogenic microorganisms to produce acetate (acetogenesis stage). Finally during the methanogenesis stage, acetate and H₂, CO₂, are used, respectively, by the acetotrophic (syn. acetoclastic) and hydrogenotrophic methanogenic archaea to produce methane (Ahring, 2003). Even though the major paths of the AD process are well described, the complexity of the microbial activities, competition, and syntrophism are not well understood (Appels *et al.*, 2011; Carballa *et al.*, 2015). Importantly, the performance of an AD reactor is closely linked to the structure and dynamics of its microbial community (microbiome) (Demirel and Scherer, 2008). Consequently, the importance of understanding the AD microbiome and the need of establishing microbial indicators of process performance are currently considered as key research subjects towards the improvement of the biomethanation process and the understanding of the process imbalance (Carballa *et al.*, 2015).

Acidification of anaerobic reactors (acidosis) results from an accumulation of VFAs due to an overload of the feeding substrate or the use of a rapidly degradable substrate and sometimes

due to the temperature drop (Akuzawa *et al.*, 2011; Vanwonterghem *et al.*, 2015). VFAs accumulation directly reflects the kinetic imbalance between their production by fermentative and acidogenic bacteria and their consumption by a combined effort of acetogenic bacteria and methanogenic archaea (Ahring *et al.*, 1995). Acidosis is the most common process failure taking place in many AD reactors (Speece, 1996; Akuzawa *et al.*, 2011) and for which the biogas unit owners seek advice and recommendation on how to quickly and efficiently recover the process (personal interactions with the biogas plants owners in the Greater Region including Luxembourg, and partially Belgium, France and Germany). In general, acidosis is not easy to prevent (Adam *et al.*, 2015), and high VFAs concentration in the reactors do not necessarily result in pH decrease (Franke-Whittle *et al.*, 2014). However, due to their high sensibility to the increased VFAs concentrations and pH changes, archaeal communities in AD reactors facing acidification are quickly inhibited, leading to a decreased methane production (Weiland, 2010). As a consequence, acidosis represents an important loss for the biogas plants both in terms of reduced methane production and an acidic digestion residue, which do not meet the requirements for optimal fertilisation anymore (Möller and Müller, 2012; Makádi *et al.*, 2012). For these reasons, it is important on the one hand to efficiently predict and prevent acidosis and on the other hand, to quickly restart the process once the acidosis takes place (Lerm *et al.*, 2012). Indeed, a poor biogas quality (low CH₄ content) usually results in stopping the CHP unit with heat no longer being provided to the AD reactor, thus further worsening the process status of the plant. While recent studies have brought more evidence about the changes in microbial communities during the process perturbation related to VFAs accumulation (Delbès *et al.*, 2001; Blume *et al.*, 2010; Akuzawa *et al.*, 2011; Franke-Whittle *et al.*, 2014), little is known about the individual sensitivity of the reactors and the capability of the process to recover when the pH is brought back to neutrality.

Therefore, this study had two objectives. First, to investigate the assumption that an increasing content of VFAs in some reactors leading to pH drop, directly influences the microbial communities (what is reflected by a decreased methane production), we gradually increased the organic loading rate (OLR) in three test reactors (R1, R2 and R3), while a control reactor (CR) was constantly cautiously fed (Figure 2.1). Second, to establish potential (microbial) warning indicators of a process failure, we characterized the dynamics of the microbial (bacterial and archaeal) communities for six sampling periods P0-P5 in relation to physicochemical parameters in the continuously (completely) stirred tank reactors (CSTRs) sequentially exposed to (1) an increasing OLR of sugar beet pulp, (2) acidosis, and (3)

process recovery. Microbial communities in the CSTRs were studied by means of molecular techniques including, 16S rRNA gene-based terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and 16S rRNA high-throughput amplicon sequencing (HTS). In addition, common process parameters such as pH, total solids (TS), volatile solids (VS), alkalinity, ammonium-nitrogen ($\text{NH}_4\text{-N}$) and biogas production and quality were monitored and correlated with the dominant microbes and the state of the AD process.

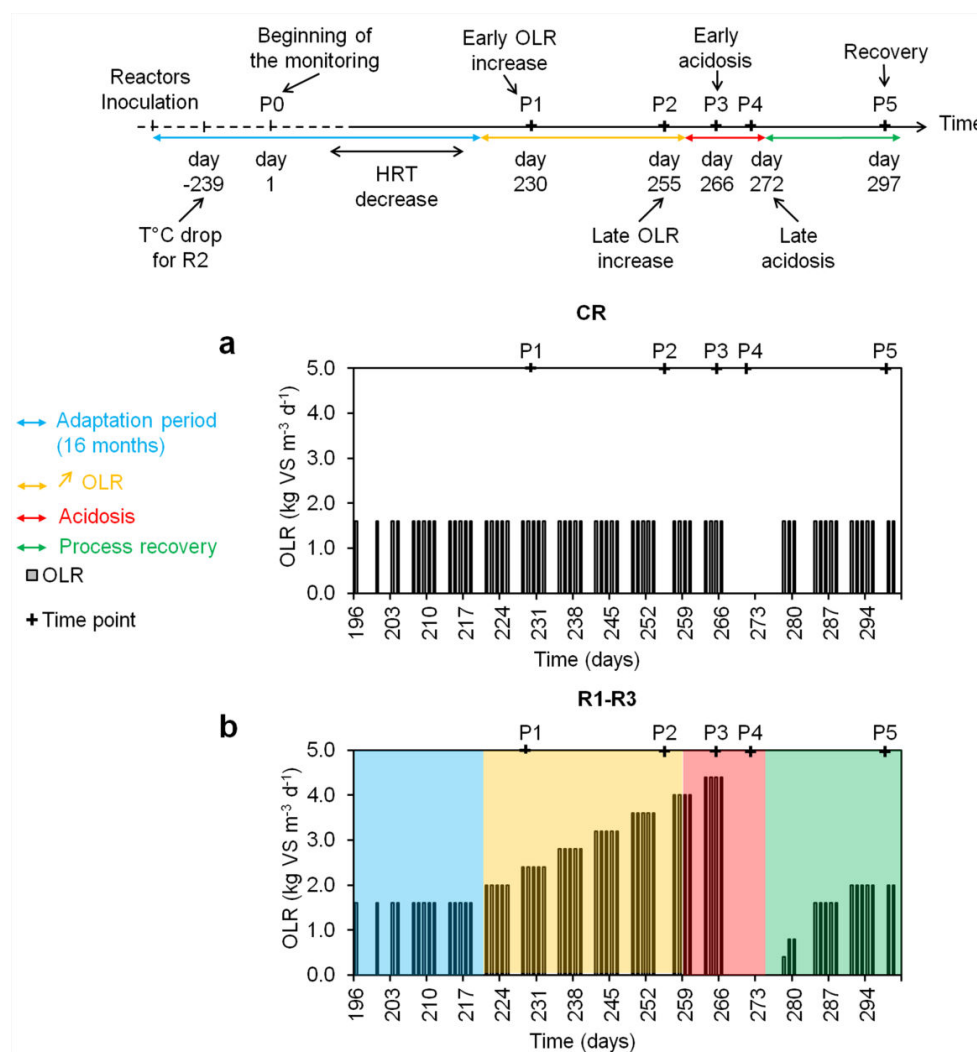


Figure 2.1 - Schematic diagram of the experimental feeding campaign

Progress of the organic loading rate (OLR) over time for the cautiously fed reactor (CR, **a**) and the test reactors (R1-R3, **b**); OLR: organic loading rate (*bars*) in $\text{kg VS m}^{-3} \text{d}^{-1}$; P_0 (beginning of the monitoring), P_1 (early OLR increase), P_2 (late OLR increase), P_3 (early acidosis), P_4 (late acidosis), and P_5 (recovery) are the sampling periods chosen for microbial community analyses.

II. Methods

II.1. Reactors operation, monitoring and sampling

Four anaerobic pilot-scale CSTR reactors were inoculated with seeding sludge originating from a mesophilic AD reactor of a wastewater treatment plant (WWTP) located in Schiffflange, Luxembourg (SIVÉC-Schiffflange). To be the closest as possible to a full-scale anaerobic reactor conditions, the working volume of our lab CSTR was 100 L. Each reactor was equipped with an individual temperature regulation system to assure a constant temperature of 37 ± 0.2 °C and pH was measured daily with a pH 196 Microprocessor pH meter connected to a SenTix[®] 21 pH electrode (WTW, Weilheim, Germany). The sludge total solids (24 h at 105 °C) and volatile solids (6 h at 550 °C) were determined on a weekly basis, according to the 4630 VDI norm (Anonymous, 2006). Alkalinity (mg CaCO₃ L⁻¹ of sludge) and ammonium-nitrogen concentration (kg NH₄-N m⁻³ of sludge) were measured weekly, in conformity with the manufacturers' protocol, using the BiogasPro system (RIMU, Königsbrunn, Germany). The concentration of VFAs was measured following an ether extraction and using a gas chromatograph (Agilent technologies, Santa Clara, USA) equipped with a Varian CP-FFAP column and a flame ionization detector (FID). The migration was done with helium (He) as a carrier gas. The total VFAs concentrations (mg kg⁻¹) were expressed as the sum of the individual volatile fatty acids concentrations, measured for acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovalerate, valerate and caproate. Four individual gas counters of the wet-drum type of 1 mL resolution (Ritter, Bochum, Germany) were used to continuously monitor the gas production for each reactor. The gas production measurement was cumulated to produce hourly data and expressed in litres, at normal atmospheric pressure and temperature conditions (NL). Gas quality (CH₄ and CO₂ content) was measured online every 2 h with dedicated nondispersive infrared sensors in the 0-100 % volume measurement range (Dynamant, South Normanton, UK). The concentration of H₂S and H₂ was measured with an electrochemical sensor (in the 0-10,000 ppm range, ITG, Wismar, Germany) and a specific 65-2440RK sensor (0-2,000 ppm range; RKI Instruments Inc., Union City, USA), respectively, on the same time basis as CH₄ and CO₂.

Following the reactors inoculation and during a 16-month-long adaptation phase (data not shown) the four reactors were fed every working day with a mono-substrate, using sugar beet pulp pellets (86.8 % total solids [TS], 92.0 % volatile solids [VS], C/N: 39.63) at the OLR of 1.60 kg VS m⁻³ day⁻¹, in order to increase the TS content of the original sludge from about

2 % to 7-8 % (TS content commonly observed in farm biogas reactors). To best mimic traditional full-scale anaerobic reactors, the added substrate was not sterilised. In continuation, the feeding was adapted to maintain a constant hydraulic retention time (HRT) of 28.5 days by mixing the sugar beet pulp with tap water. Once a stable TS content was obtained, the sludge was sampled (sampling period zero: P0, day 1) and the experimental campaign was initiated (Figure 2.1). Three reactors (overfed reactors: R1, R2, R3) were further fed with an increasing OLR, while one reactor was used as a control (cautiously fed reactor; CR), and was constantly fed at an OLR of $1.60 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ (Figure 2.1a). The choice of the experimental design present in this study (three replicated overfed reactors versus only one control reactor), was dictated by the fact than only four reactors of 100 L capacity were available, therefore, we decided to give priority for data generation to the overfed reactors. The OLR for R1-R3 was gradually increased by increments of $0.40 \text{ kg VS m}^{-3}$ every week until reaching acidosis (Figure 2.1b). To promote the process recovery, the feeding was stopped at day 267. After 6 days of starving under very acidic pH (5.2 ± 0.4), the pH was artificially increased to reach a value of 7 by adding 7, 2 and 5 L of 1 M NaOH to R1, R2 and R3, respectively (each reactor requiring specific amount of alkali). In continuation, NaHCO_3 dry salt was slowly added to increase the alkalinity (around 900, 600 and 800 g for R1, R2 and R3 respectively) until a pH of 7.5 was reached. The three test reactors were then starved for 5 more days. The total starving of 11 days was also applied to the CR. Finally, after the 11 days of starving, as the methane content in the biogas reached again at least 50 % for R1-R3, the feeding was re-initiated for all the reactors at an OLR of $1.60 \text{ kg m}^{-3} \text{ day}^{-1}$. Sludge aliquots for R1-R3 and CR were sampled for six periods P0-P5 (Figure 2.1) and stored frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ prior the microbial community analyses.

II.2. Microbial monitoring by 16S rRNA gene-based T-RFLP analysis

Genomic DNA was extracted as previously described by Klocke *et al.* (2007). Bacteria-specific 16S rRNA gene forward primer 27f, labelled with 6-carboxyfluorescein (6-FAM), and the reverse primer 926MRr (Table 2.1; Eurogentec, Seraing, Belgium), were used for amplification with the following PCR conditions; initial denaturation at $98 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 min, followed by 25 cycles of denaturation at $98 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 s, annealing at $54 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 s, elongation at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min and a final elongation at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for 7 min. To amplify the archaeal 16S rRNA gene, forward primer Ar109f labelled with 6-FAM and the reverse primer Ar912r (Table 2.1; Eurogentec, Seraing, Belgium) were used with the following PCR

conditions: initial denaturation at 98 °C for 3 min, followed by 29 cycles of denaturation at 98 °C for 20 s, annealing at 55 °C for 15 s, elongation at 72 °C for 1 min, and a final elongation at 72 °C for 7 min. Amplifications were done using a TProfessional Thermocycler (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) and the Phusion[®] Taq polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) in a final volume of 25 µL with 0.4 µM of each primer and 0.5 µL of a 1:10 and 1:50 dilution of the DNA extracts, respectively for bacteria and archaea. PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. In continuation, 100-200 ng of purified bacterial 16S rRNA amplicons were digested at 37 °C for 4 h with the *MspI* and *Hin6I* restriction enzymes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). For Archaea, between 200 and 500 ng of PCR products were digested at 37 °C for 4 h with the *AluI* restriction enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Digested products were precipitated with 0.1 v/v of sodium acetate (3 M) and 10 v/v of ethanol (75 %). Samples were incubated for 30 min in the dark and at room temperature, and centrifuged at 14,000 rpm at 4 °C for 30 min. Following the centrifugation, the supernatant was discarded, 10 v/v of ethanol (75 %) was added and samples were incubated for a second time during 10 min in the dark and at room temperature; and centrifuged at 14,000 rpm and 4 °C for 30 min. Finally, following the centrifugation, the supernatant was discarded, samples were dried at 37 °C, re-suspended in 40 µL of sterile ultrapure water and incubated at 55 °C for 15 min at 300 rpm. In continuation, samples were mixed with 10 µL of Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Stafford, USA) containing 1:250 (v/v) carboxy-X-rhodamine (ROX)-labeled MegaBace[™] ET900-R size standard (GE Healthcare, Piscataway, USA). Ultrapure water was added to reach the final volume of 16 µL. Samples were denatured at 95 °C for 3 min and directly placed on ice. The sizes of generated DNA fragments were determined using an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Stafford, USA) (POP 7 matrix, capillary size: 50 cm) with the following parameters: injection voltage, 3.0 kV; injection duration, 12 s; run voltage, 8.5 kV; run time at 60 °C, 5500 s. The GeneMapper software (version 4.0; Applied Biosystems, Stafford, USA) was used to analyse the T-RFLP chromatograms. Fragments with fluorescence intensity below 200 relative fluorescence units were discarded from further analysis and following Dunbar *et al.* (2001), the total fluorescence of each sample was standardized three times to the smallest quantity. Online T-Rex software was used to align the T-RFs with a clustering threshold of 0.8 (Culman *et al.*, 2009). The length of each T-RF was expressed in base pair (bp). An average of three technical replicates performed for each sample is presented as results.

Table 2.1 PCR primers targeting the 16S rRNA genes of the bacterial and archaeal community

Primer	Direction	Sequence [5' -> 3']	Targeted domain	Reference
27f	forward	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Bacteria	(Lane, 1991)
926MRr	reverse	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	Bacteria	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
S-D-Bact-0341-a-S-17	forward	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Bacteria	(Klindworth <i>et al.</i> , 2013)
S-D-Bact-0787-b-A-20	reverse	GGA CTA CHV GGG TAT CTA AT	Bacteria	(Klindworth <i>et al.</i> , 2013)
Ar109f	forward	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Archaea	(Grosskopf <i>et al.</i> , 1998)
Ar 912r	reverse	CTC CCC CGC CAA TTC CTT TA	Archaea	(Lueders and Friedrich, 2000)
S-D-Arch-0519-a-S-15	forward	CAG CMG CCG CGG TAA	Archaea	(Klindworth <i>et al.</i> , 2013)
S-D-Arch-1041-a-A-18	reverse	GGC CAT GCA CCW CCT CTC	Archaea	(Klindworth <i>et al.</i> , 2013)

II.3. Microbial monitoring by high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing

Genomic DNA extractions from samples of the six sampling periods P0-P5 were performed this time using the PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturers' protocol. The 16S rRNA gene libraries were constructed with a modified primer pair S-D-Bact-0341-a-S-17 and S-D-Bact-0787-b-A-20 targeting a fragment of 466 bp of the bacterial V3-4 region and primer pair S-D-Arch-0519-a-S-15 and S-D-Arch-1041-a-A-18 targeting a fragment of 526 bp of the archaeal V4-6 region (Table 2.1). The modification included the incorporation in the 5' end of the Nextera XT® transposase sequence (Illumina Inc., San Diego, USA) in the forward and the reverse primer, and additional four N (i.e. four random nucleotides) in the forward primer to increase the nucleotide diversity. Amplicons were generated using the Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), purified with the AMPure magnetic beads (Agencourt, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) and quantified with the Qubit® dsDNA HS assay kit (Life technologies, Carlsbad, USA). The concentration of the amplicons was adjusted to 1 ng μL^{-1} and 1 μL of each library was used as a template in a second PCR reaction where the Nextera XT® barcodes and the Illumina adapters necessary for hybridization to the flow cell were added with the Nextera XT Index kit. The resulting amplicons were purified with the AMPure magnetic beads (Agencourt) and pooled in equimolar concentrations. The final concentration of the library pool was determined with a KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA). Libraries were mixed with Illumina-generated PhiX control libraries (5 %) and sequenced with the MiSeq Reagent Kit V3-600 cycles. The obtained sequence reads were de-multiplexed, quality trimmed and assigned to OTUs at 97 % similarity with Usearch (v7.0.1090_win64) pipeline

(Edgar, 2010). Taxonomy affiliation was done with the Greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/>) and the final nucleotide sequences obtained were deposited in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) under accession numbers KR013301 to KR013741 for bacteria and KR013288 to KR013300 for archaea.

II.4. Data analysis and statistics

Richness (numbers of distinct T-RFs and OTUs) and diversity indices, including Shannon-Weaver index¹⁵ (H') (Shannon, 1948) which measures the entropy, Pielou index¹⁶ (J) (Pielou, 1966) which measures the evenness, *i.e.* the equitability between the different species present in a community, were calculated based on the microbial community analyses results. To assess the richness and diversity indices over time, linear mixed-effect models (LMM) were calibrated for each reactor, considering time (the different sampling points) as fixed factor and the replicates as random factor. Post hoc tests (Tukey's honest significant difference test) were applied to further compare pairwise sampling points for significant LMM. To compare, respectively, the bacterial and archaeal community results from the two molecular techniques (T-RFLP and HTS) used in this study, pairwise Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957) distance matrices were calculated using Mothur (Schloss *et al.*, 2009) and represented using non-metric multidimensional scaling (NMDS) diagrams. The average pairwise Bray-Curtis distance for each microbial community between results from T-RFLP and HTS were then compared statistically using Wilcoxon signed-rank test. Differences were considered statistically significant at a p -value < 0.05 . The influence of process parameters on the microbial community diversity, assessed by HTS, was analysed using canonical correspondance analysis (CCA) with the CANOCO software (version 4.5) (Ter Braak, 1987) and a correlation analysis (Spearman). The significance test for CCAs was carried out by Monte Carlo permutation (499 times) and correlations were considered significant at a p -value < 0.05 . All statistical and correlation analyses were performed using the freeware R version 3.1.0 (Core Team, 2008).

¹⁵ $H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$, où p_i est la proportion d'individus de la i -ème espèce (ou OTU), S est le nombre d'espèces.

¹⁶ $J = \frac{H'}{\log_2 R}$, où R est la richesse. L'indice de Pielou est compris entre 0 (une seule espèce (ou OTU) domine la communauté) et 1 (les espèces (ou OTUs) de la communauté ont une abondance identique).

III. Results and discussion

III.1. Operational parameters and anaerobic process performance

The reactors were previously acclimated for 16 months to adapt to a mono-substrate, sugar beet pulp, and to reach a steady-state with a final HRT of 28.5 days (Figure 2.1). CR was constantly and cautiously fed with an OLR of $1.60 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ of sugar beet pulp, assuring a steady-state process with sludge parameters in the range of pH: 7.1 to 7.6, alkalinity of $8,824.9 \pm 2.5 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ of sludge (average \pm standard deviation (n-1)), $\text{NH}_4\text{-N}$ under $1.5 \text{ kg NH}_4\text{-N m}^{-3}$ (Figure 2.2a-c) and the TS and VS contents fluctuating between 1.9 - 2.4 % and 60 - 67 %, respectively.

For the three test reactors R1-R3 and from the beginning of the OLR increase (sampling period P1), a substantially low sludge content in TS, between 2.5 and 4.1 %, resulted in their high sensitivity to VFA accumulation (on average $10,589 \pm 2,678 \text{ mg L}^{-1}$) and pH decrease (on average 5.2 ± 0.4) (Figure 2.2). This took place at an OLR of $4.5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Alkalinity also decreased from around $10,132 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ of sludge at P1 to approximately 1,471; 5,393 and 2,942 for R1, R2 and R3, respectively, during the late OLR increase (P2). At P1, acetate was the dominant VFA in overfed reactors and its concentration in the sludge was $409 \pm 26 \text{ mg kg}^{-1}$. During the late acidosis (P4), the concentration in total VFAs reached approximately $12,000 \text{ mg kg}^{-1}$ for R1 and R3, and $8,000 \text{ mg kg}^{-1}$ for R2. At this stage, acetate, propionate, and isobutyrate were the dominant VFAs and accounted for $70 \% \pm 6$, $11 \% \pm 1$ and $3 \% \pm 1$ of total VFAs, respectively. Even though a propionate/acetate ratio above 1.4 is considered as one of the most appropriate indicators of process imbalance (Hill *et al.*, 1987), for the three overfed reactors it did not exceed 0.17 ± 0.0 , what could prevent the right diagnosis of the reactor state if only relying on VFAs measurement. Indeed, different authors previously reported that different reactors have their specific VFAs levels to serve as process indicator, and the conditions that are considered stable for one reactor may not be optimal for another (Angelidaki *et al.*, 1993; Murto *et al.*, 2004; Franke-Whittle *et al.*, 2014).

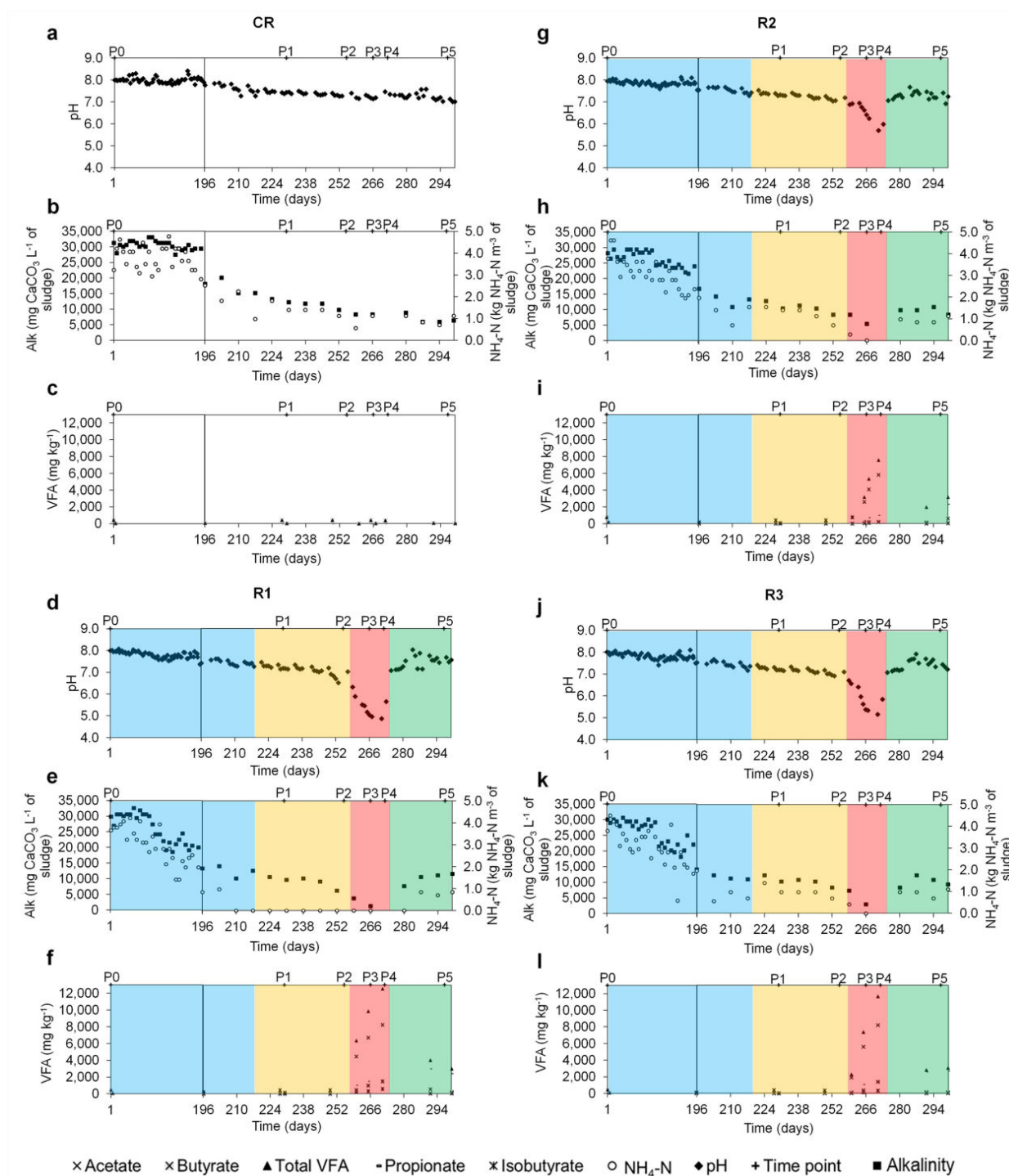


Figure 2.2 - Dynamics of pH, alkalinity, ammonium-nitrogen and volatile fatty acids contents in the sludge for each reactor over time

Progress over time for CR, R1, R2, and R3, respectively, of pH - **a, d, g, j**; total alkalinity (Alk., mg CaCO₃ L⁻¹ of sludge) and ammonium-nitrogen content (NH₄-H, kg NH₄-N m⁻³ of sludge) - **b, e, h, k**; volatile fatty acid content (VFA, mg kg⁻¹) - **c, f, i, l**; CR is the cautiously fed reactor; R1, R2 and R3 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; P0-P5 are the sampling periods chosen for microbial community analyses.

Significant differences in biogas production and composition were also observed during the late acidosis phase (Figure 2.3), with methane constituting roughly 9, 25, and 32 % of the biogas for R1, R2 and R3, respectively, while it equalled a minimum of 55 % for CR. Moreover, peaks of increased H₂ production (> 2,000 ppm) were detected for R1-R3 indicating a decoupling between the H₂-producing and H₂-consuming bacteria (Figure 2.3d-f).

Following the acidosis, a process recovery (restoration of biogas production with average methane content above 50 %; P5) was promoted by an artificial pH increase, what led to a decrease of total VFAs to a level of 4,000 mg kg⁻¹ for R1, 2,000 mg kg⁻¹ for R2 and 2,800 mg kg⁻¹ for R3 at the sampling period P5 (Figure 2.2f, i, l). A significant increase in methane content in the biogas was correlated with acetate consumption, what could indicate the re-activation of acetoclastic methanogenesis. However, at the same time propionate was the most dominant VFA (75 and 90 % of total VFAs for R1 and R2-R3, respectively) and the propionate/acetate ratio was above 12.5 ± 6.4 during the recovery stage. Incapacity to quickly re-consume propionate might point to the fact that acetogenic bacteria were the one the most affected by the experimental conditions examined in this study. Moreover, syntrophic propionate degradation is a thermodynamically very unfavourable reaction ($\Delta G^{0'}$ equals +72 kJ mol⁻¹), that occurs only when an optimized balance (pH₂ below 10⁻⁵ atm) between H₂-producing (acetogens) and H₂-consuming (mostly hydrogenotrophic methanogens and homoacetogens) microbes exists (Gallert and Winter, 2004).

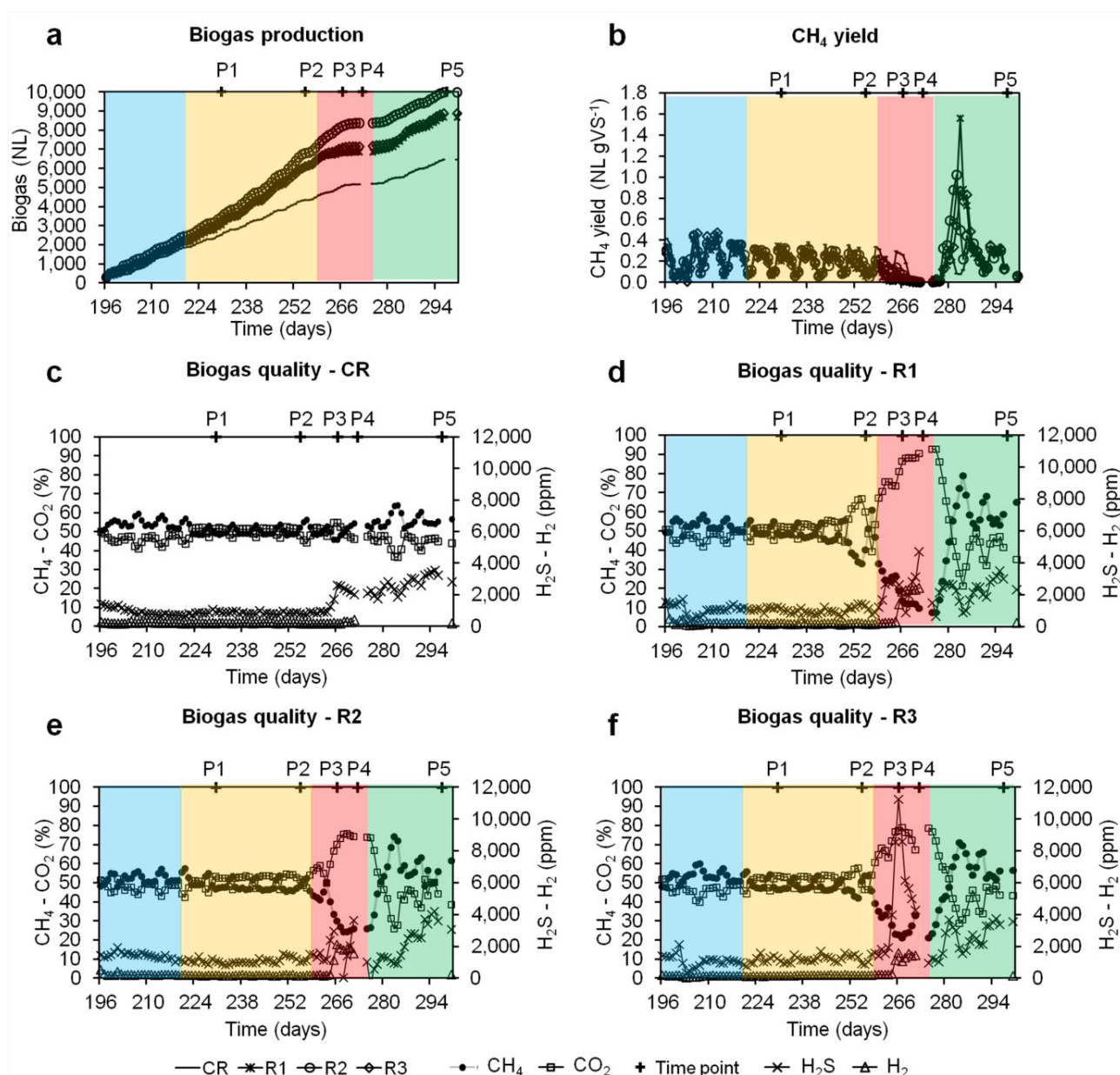


Figure 2.3 - Progress of the biogas production and composition over time for the four reactors

Biogas production for the four reactors (in NL) (a); CH₄ yield for the four reactors (in NL g VS⁻¹) (b); Biogas quality (CH₄ and CO₂ in %, H₂S and H₂ in ppm) for CR, R1; R2 and R3 (c, d, e and f, respectively); CR is the cautiously fed reactor; R1, R2 and R3 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; P1-P5 are the sampling periods chosen for microbial community analyses; gaps in the curves indicate missing data due to measurement failure.

III.2. Comparison of the 16S rRNA gene-based T-RFLP and high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing results

Microbial communities were evaluated in the four studied reactors by means of 16S rRNA gene-based T-RFLP and high-throughput amplicon sequencing (Figure 2.4, 2.5). It is well known that while the T-RFLP allows for the detection and semi-quantification of only the most abundant species in a sample (Liu *et al.*, 1997; Osborn *et al.*, 2000; Bent and Forney, 2008), taxon-specific resolution of the HTS is much higher (Pilloni *et al.*, 2012). Therefore, knowing this limitation, we were not surprised that the calculated species richness based on the T-RFLP results was relatively lower compared to the amplicon sequencing (Annex 1 - Table S1). Also the total terminal restriction fragments (T-RF) diversity was only around 50% of that resulting from the HTS. Similar discrepancies between the two molecular approaches were previously observed for AD reactors (Pilloni *et al.*, 2012) as well as other studied environments, *e.g.* human anterior nares (Camarinha-Silva *et al.*, 2012). Additionally these differences can result from the use of different primers pairs for T-RFLP and HTS (Berry *et al.*, 2011). Due to the length limitation of the HTS technology, longer amplicons required for T-RFLP were too large for HTS. However, the calculated average pairwise Bray-Curtis distances reflecting the dissimilarities in community structures between the four reactors at the different sampling points were not significantly different between T-RFLP and HTS results (Figure 2.6c, f). This observation suggests that both techniques accurately characterised the species dynamics over time in the four reactors, even though HTS was superior to T-RFLP regarding its sensitivity to detect minority species and the direct taxonomic affiliation of resulting sequencing reads. Interestingly, based on the HTS results, the ten most abundant bacterial operational taxonomic units (OTUs) at the sampling period P0 accounted for an average of $52.0\% \pm 7.9$ of the population in the studied reactors. At the same time the average bacterial richness calculated based on the T-RFLP was 8.7 ± 1.3 , suggesting that indeed the T-RFLP approach could be sufficient to characterise at least the dominant part of the bacterial community in the reactor. Nevertheless, the attempts to *in silico* taxonomically assign the obtained T-RFs failed to provide unequivocal results due to a difference of a few base pairs. This discrepancy is often found between T-RFs predicted *in silico* and T-RFs measured *in vivo* (Winderl *et al.*, 2008; Pilloni *et al.*, 2012). It usually results from the presence of unknown species in analysed environmental samples, thus the adequate 16S rRNA gene sequences lack in required databases used to assign *in silico* the generated T-RFLP results.

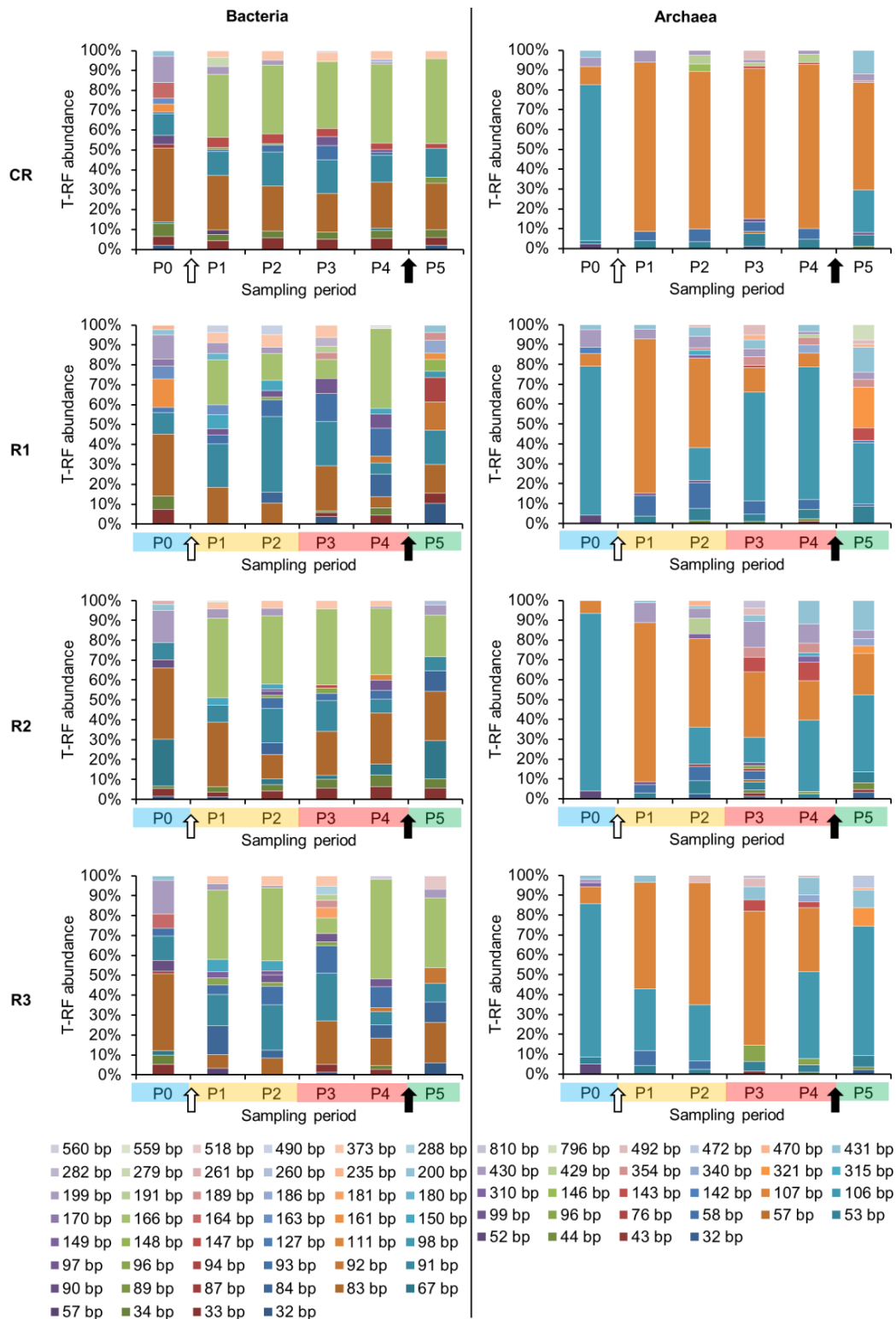


Figure 2.4 - Bacterial and archaeal community structure dynamics over time as assessed by 16S rRNA gene-based T-RFLP analysis

P0-P5 are the six sampling periods chosen for microbial community monitoring; CR is the cautiously fed reactor; R1, R2 and R3 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; T-RFs are characterized by their length in base pairs (bp); the *white arrow* represents the initiation of the hydraulic retention time decrease; the *black arrow* represents the onset of the starving period.

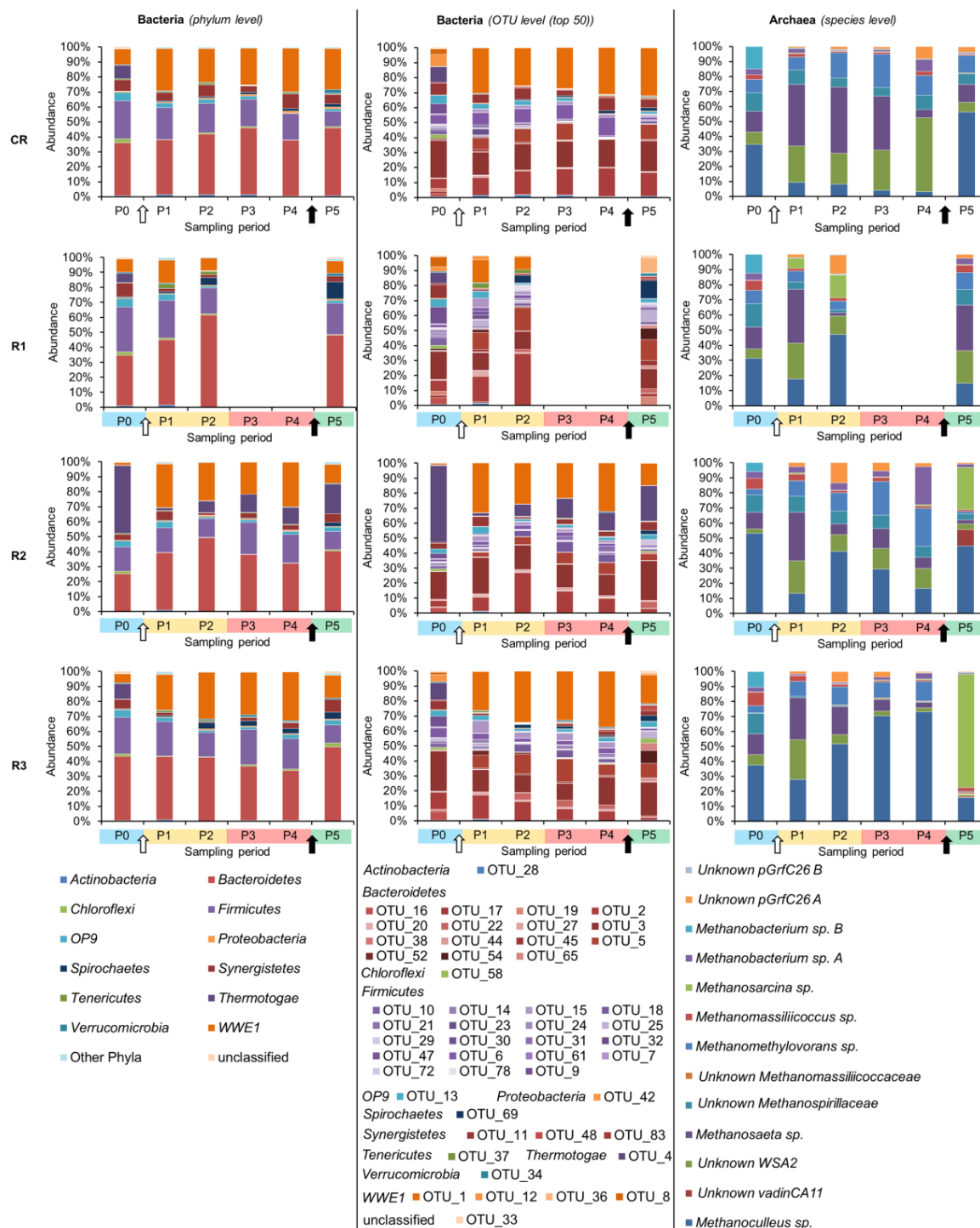


Figure 2.5 - Bacterial and archaeal diversity dynamics over time as assessed by high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing

P0-P5 are the sampling periods chosen for microbial community monitoring; CR is the cautiously fed reactor; R1, R2 and R3 are the reactors exposed to increasing organic loading; results are presented at the phylum level and the OTU level (top 50) for bacteria and at the species level for archaea; gaps for R1 at sampling periods P3 and P4 were due to the poor quality of extracted DNA during severe acidosis; the *white arrow* represents the initiation of the hydraulic retention time decrease; the *black arrow* represents the onset of the starving period.

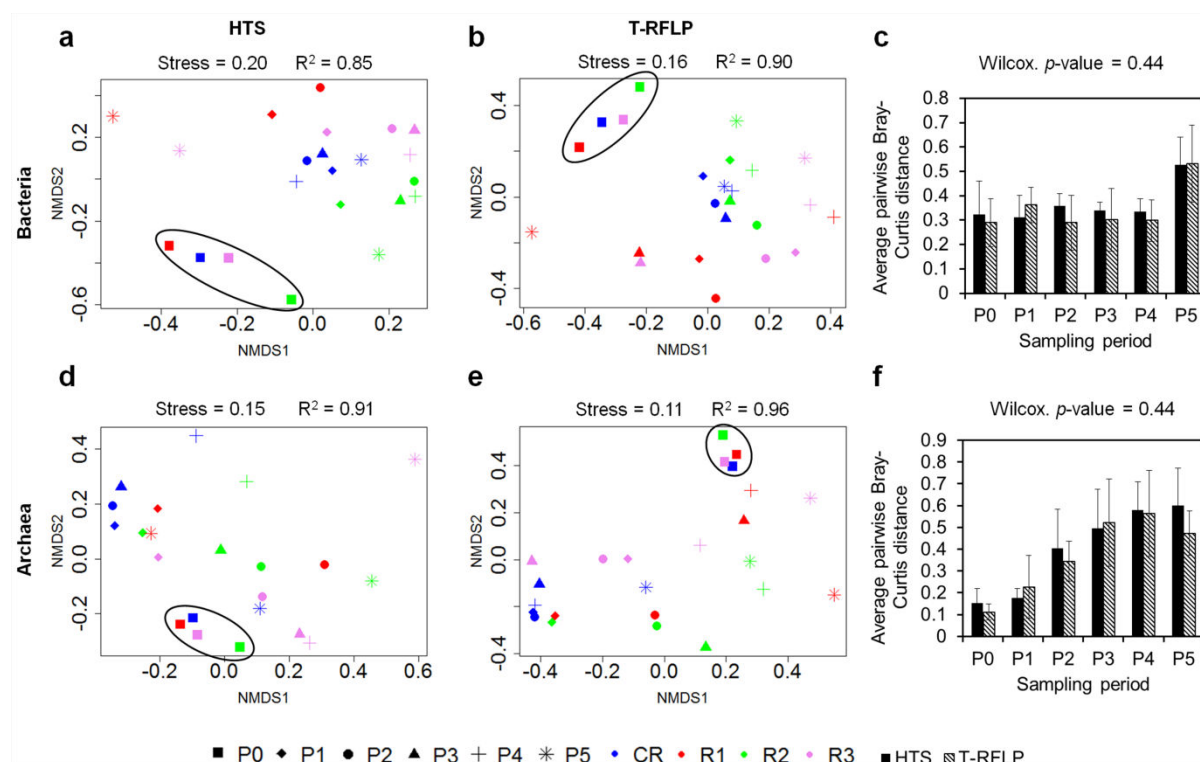


Figure 2.6 - Non-metric multidimensional scaling ordination diagrams of temporal variations in bacterial and archaeal community structures

The ordination is based on Bray-Curtis similarity matrices of the relative abundance data obtained from high-throughput amplicon sequencing (a and d) and T-RFLP (b and e) for the bacterial and archaeal community, respectively; c and f show the average pairwise Bray-Curtis distance for the four reactors at the different sampling periods based on the high-throughput amplicon sequencing and T-RFLP results for, respectively, the bacterial and archaeal community; the *black ellipses* group sampling period P0 (steady-state process) for each reactor.

III.3. Microbial communities in replicate reactors in steady-state

At P0, on average, 22.8 % ± 5.7 and 63.3 % ± 13.8 of bacterial and below 1.0 % ± 0.0 and 19.6 % ± 3.3 of archaeal 16S rRNA amplicon reads could not be classified at the family and genus levels, respectively, confirming that largely bacterial and to a lesser extent archaeal communities in AD reactors remain uncharacterized. Both at the OTUs and T-RFs levels, bacterial and archaeal communities from replicate reactors (except for R2) clustered together at P0 based on NMDS analyses (Figure 2.6). This indicates that stable operational conditions during the acclimation period led to similar microbial population in replicate AD reactors. In general, archaeal communities were much less diverse than bacterial ones (Annex 1 - Table S1), with *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae* and *Methanosaetaceae* being the dominant families at P0. Bacterial communities were dominated by representatives of the

phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and candidate phylum *WWE1* (Figure 2.5), with respectively *Porphyromonadaceae*, *Lachnospiraceae* and *Cloacamonaceae* being the dominant families. The prevalence of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* is not surprising and has been frequently reported for different AD reactors treating agricultural and agro-food residues (*e.g.* Sundberg *et al.* (2013)). The other phyla including *Chloroflexi* and *Synergistetes* were only detected with low abundance. Concerning R2, the unexpected failure of the heating system during the acclimation period (exactly 239 days before P0; Figure 2.1) leading to a reactor temperature drop to 30°C for less than 24h most probably resulted in a more dissimilar microflora, with *Thermotogae* and *Bacteroidetes* being the dominant bacterial phyla at P0. The archaeal community in R2 at P0 was dominated by *Methanoculleus* sp. (over 50 % of all 16S rRNA reads) and to a lesser extent by *Methanosaeta* sp. and unknown *Methanospirillaceae* (Figure 2.5).

Towards the end of the acclimation period, the HRT was gradually decreased in the four CSTRs, from more than 300 days at P0 to 28.5 days at P1 (data not shown), what influenced the shift of microbial diversity between the two sampling periods studied (Figures 2.4, 2.5). While, at day 221 the OLR started to be gradually increased for the test reactors, it remained unchanged for CR, what resulted in a relatively stable bacterial community between P1 and P5 for this control reactor (Figures 2.4, 2.5). The six prevalent bacterial T-RFs (T-RFs 33, 83, 91, 147, 166 and 373 bp), with high relative abundance at P1, were also detected for the other sampling points (Figure 2.4). Similarly, the archaeal community remained stable in CR between the sampling periods P1 and P4, with the T-RF 107 bp representing more than 80 % of the total T-RF abundance (Figure 2.4). At P5, its abundance decreased and another T-RF 106 bp started to emerge. By correlating 16S rRNA gene-based T-RFLP and 16S rRNA amplicon sequencing results, we could relate T-RF 107 bp to *Methanosaeta* sp., and T-RF 106 bp to *Methanoculleus* sp. The apparent redirection from acetoclastic towards hydrogenotrophic methanogenesis, as could be concluded based on the increased abundance of *Methanoculleus* sp. at P5, is most probably attributable to the depleting source of acetate (Figure 2.2c), what is a direct consequence of the 11-day-long starving regime applied to CR (corresponds to the late acidosis and partially to the recovery period applied to R1-R3).

III.4. Comparison of bacterial composition in replicate reactors exposed to increasing OLR and acidosis

As the strength of selection increased, due to the increased OLR applied to test reactors, the environment turned from a steady-state to a selective one and distinct microbes began to dominate in the different R1-R3 reactors (Figure 2.4, 2.5). Replicate test reactors developed thus their own bacterial populations that had their community structures more similar between the different sampling points for the same reactor, than between the different reactors for the same sampling point (Figure 2.6a, b). At the same time, these communities were functionally redundant, since all reactors operated stably and showed similar global characteristics (Figures 2.2, 2.3). Similarly to CR, the three dominant phyla, namely *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and candidate phylum *WWE1* also dominated in R2-R3 (Figure 2.5). No data for R1 could be recorded during the acidosis phase due to poor quality of extracted DNA for these sampling periods (harsh acidic environment). While in total 441 OTUs were characterized for bacteria, roughly 50 top OTUs represented on average $88.1\% \pm 4.4$ of the whole bacterial populations in the studied reactors, and they were assigned to 12 different phyla (Figure 2.5). Top 10 OTUs accounted for $70.8\% \pm 14.9$ of all sequenced 16S rRNA reads for the sampling periods P1-P5 for the four reactors, with the dominant representing the candidate phylum *WWE1* (OTU_1), *Bacteroidetes* (OTU_2, 3 and 5), *Firmicutes* (OTU_6, 7 and 18), the candidate phylum *OP9* (OTU_13) and *Synergistetes* (OTU_11). *Thermotogae* (OTU_4) was also dominant in case of R2.

In general, the diversity of *Firmicutes* with a total of 231 different OTUs (223 assigned to *Clostridia*) was much higher than *Bacteroidetes* with only 59 OTUs. While the dominant *Bacteroidetes* OTUs (they accounted for an average of $31.6\% \pm 8.8$ of the total bacterial 16S rRNA reads for R1-R3) appeared resistant to the increasing OLR and acidosis, *Firmicutes* (on average they accounted for $6.1\% \pm 3.6$ of total 16S rRNA reads for R1-R3) were much more sensitive (Annex 1 - Table S2). Several dominant *Firmicutes* OTUs disappeared (e.g. OTU_7, 15 and 32 unclassified bacteria of the order *MBA08*, OTU_14, an unclassified bacterium of the order *SHA-98*), and other completely new OTUs appeared during the acidosis. These new OTUs, e.g. OTU_18, 31, 78, 101 and 103, were classified as *Clostridiales*, including families of *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* (Annex 1 - Table S2). Whether this functional redundancy of *Firmicutes* explains their much higher diversity than *Bacteroidetes* is not clear at this stage and needs further investigation. Interestingly, it is well recognised that more diverse microbial communities provide a wider range of parallel

pathways, what in principle should ensure their overall functional stability when confronted with an environmental stress (Carballa *et al.*, 2015). That is why, diversity index is often proposed as a warning indicator of a process performance (see below). However, the fact that our reactors were dominated by a few resistant *Bacteroidetes* OTUs, suggests that each of these microbes must have a suite of parallel pathways encoded on its genome to allow to quickly adapt to the changing environment. Therefore, further metagenomic studies should show whether these yet uncharacterised *Bacteroidetes* are indeed broad-specificity bacteria.

The remaining phyla detected in our test reactors were much less diverse, with a candidate phylum *WWE1* being represented by five OTUs and *Thermotogae* by two OTUs only. The most abundant OTU_1, in terms of total 16S rRNA reads, was assigned to the candidate phylum *WWE1* and constituted a fourth part of the whole bacterial community in R2 and R3 between P1 and P4 (on average $27.6 \% \pm 3.9$), and it only decreased during the recovery stage ($13.6 \% \pm 1.5$). For the test reactor R1 its abundance varied depending on the experimental stage. Interestingly, this OTU was below the detection limit for all reactors at the beginning of the experiment (P0). Candidatus *Cloacimonas* belonging to candidate division *WWE1* was previously shown to be the most dominant genus in an AD reactor co-digesting fish-waste and cow manure (Solli *et al.*, 2014). The reconstructed genome of a representative bacterium from the same division suggested that it could be a hydrogen-producing syntroph (Pelletier *et al.*, 2008). Additionally, the involvement of the *WWE1* candidate bacteria to the fermentation of sugars was further confirmed by a high-resolution nanometer-scale secondary ion mass spectrometry (nano SIMS) (Limam *et al.*, 2014). With regards to *Thermotogae*, members of this phylum have been previously detected in mesophilic anaerobic reactors (Nesbo *et al.*, 2006) and their presence could not be clearly linked to process parameters such as HRT or OLR (Kratat *et al.*, 2011). Surprisingly, the high abundance of OTU_4 (*Thermotogae*) in R2 coincided with the higher pH reached by this reactor compared to the other test reactors during the late acidosis (P4, pH 5.7, Figure 2.2g). Moreover, members of *Thermotogae* have been characterised for complex polysaccharide fermentation and hydrogen production (Conners *et al.*, 2006), what might promote beneficial associations with hydrogenotrophic methanogens (Muralidharan *et al.*, 1997).

III.5. Bacterial richness, diversity and evenness

Although the richness, evenness and diversity indices are often used to interpret the functioning of the reactor in terms of its microbial communities (Talbot *et al.*, 2008; Carballa

et al., 2011; De Vrieze *et al.*, 2013; Heeg *et al.*, 2014), their use as warning indicators remains questionable (Carballa *et al.*, 2015). In principle, functionally diverse microbial communities provide a better suite of resistant, redundant and resilient pathways, and a higher microbial diversity is usually correlated with well-performing AD reactors (Carballa *et al.*, 2015). However, when a stable (stochastic) environment faces a disturbance, it changes to a deterministic one, and the better adapted competitors begin to dominate, what is usually reflected by a decreased richness and diversity. Indeed, between the early and the late acidosis periods (P3 and P4), bacterial richness and diversity indices decreased for R1 and R3 (based on T-RFLP and HTS; Annex 1 - Table S1). In contrast, for the test reactor R2 these indices either increased (T-RFLP) or remained unchanged (HTS). Interestingly, while in general R2 was characterised by a lower species richness and diversity during the acidosis period than R3 (no HTS data for R1; Annex 1 - Table S1), it maintained the highest pH at P4 (5.7 versus 4.9 and 5.2 for R1 and R3), and produced significantly more biogas than R1 and R3, with the most favourable CH₄/CO₂ ratio (Figures 2.2 and 2.3).

While the use of richness and diversity parameters has still to be carefully considered, a decrease of evenness in structure of microbial diversity has been shown to be a good candidate warning indicator of process perturbation (Werner *et al.*, 2011; Werner *et al.*, 2014). Nevertheless, in our study the differences in the calculated evenness, based on the Pielou index (Annex 1 - Table S1), for R1-R3 and measured at the different sampling periods, did not show any uniform patterns, based on both T-RFLP and HTS results, suggesting that this index should also be carefully interpreted when used as a warning indicator. The overall functional redundancy of microbial communities demonstrated for our replicate overfed reactors, and the absence of uniform patterns in terms of the microbial ecology parameters raise the question whether the conclusions of the studies where only a single reactor was investigated (no replicates) are meaningful. Indeed, similarly to our observations, recent studies of parallel reactors treating beet silage (Krakat *et al.*, 2011) and co-digesting fish waste and cow manure (Solli *et al.*, 2014), showed as well that distinct reactors can establish different microbial communities.

III.6. Adaptation of archaeal population to acidosis and correlation with reactor's parameters

Following the accumulation of VFAs and the resulting decrease of pH, and in contrast to another report (Kundu *et al.*, 2013), the richness and the diversity of the archaeal community were in general higher during the acidosis (P3 and P4) than at the beginning of the overfeeding campaign (P1) for the test reactors. The calculated evenness (Pielou index) for the archaeal population showed a trend similar to the bacterial community (Annex 1 - Table S1), providing no evidence that a lower evenness could be associated with a process imbalance. In continuation a CCA was used to highlight the influence of the changing process parameters on the archaeal community (CCA performed for bacteria was not statistically significant most probably due to the differential answer of the different communities that established in replicate reactors; p -value of the Monte Carlo test was > 0.05 , therefore, these results are not discussed here). As shown in Figure 2.7, 65 % of the total species variance could be explained by the first two axes of the CCA ordination diplot. While pH showed a strong positive correlation with the alkalinity ($r = 0.94$, p -value < 0.001) and a negative correlation with the VS content ($r = -0.89$, p -value < 0.001), it was uncorrelated with the total biogas production (p -value = 0.34). This may be explained by the fact that total biogas production was not strongly reduced during acidosis, due to the increased production of CO₂ and most probably H₂ (its correct concentration could not properly be measured due sensor saturation; Figure 2.3) by hydrolytic and acidogenic bacteria. This is well reflected by a strong negative correlation between pH and CO₂ content in the biogas ($r = -0.80$, p -value < 0.001). At the same time, pH also showed a strong positive correlation with the methane content in the biogas ($r = 0.80$, p -value > 0.001), which was significantly reduced during the acidosis (Figure 2.3d-f). Interestingly, higher biogas production was also correlated with the abundance of *Methanosaeta* sp. ($r = 0.48$, p -value = 0.025). Moreover, the presence of *Methanosaeta* sp. was negatively correlated with the total VFAs content in the reactors ($r = -0.72$, p -value < 0.001) and with the level of abundance of *Methanoculleus* sp. ($r = -0.49$, p -value = 0.022).

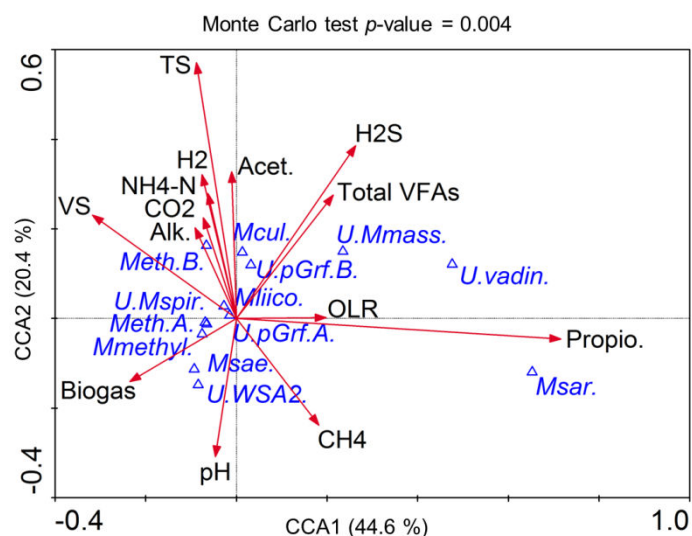


Figure 2.7 - Canonical correspondence analysis (CCA) ordination diplot for the archaeal community

Red vectors represent the influence of the process parameters such as pH (pH), organic loading rate (OLR), biogas production (Biogas), total solids (TS), volatile solids (VS), methane (CH₄), carbone dioxyde (CO₂) and hydrogen sulfide (H₂S) contents in the biogas, alkalinity (Alk.), ammonium-nitrogen (NH₄-N), total volatile fatty acids (Total VFAs), acetate (Acet.) and propionate (Propio.), contents in the sludge; blue triangles represent archaeal taxa derived from the high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing at the species level: unknown *Methanomassiliicoccaceae* (*U.Mmass.*), unknown *Methanospirillaceae* (*U.Mspir.*), unknown WSA2 (*U.WSA2.*), unknown *vadinCA11* (*U.vadin.*), *Methanobacterium* sp. A (*Meth.A.*), *Methanobacterium* sp. B (*Meth.B.*), *Methanoculleus* sp. (*Mcul.*), *Methanomassiliicoccus* sp. (*Mliico.*), *Methanomethylovorans* sp. (*Mmethyl.*), *Methanosaeta* sp. (*Msae.*), *Methanosarcina* sp. (*Msar.*), unknown *pGrfC26* A (*U.pGrf.A.*), unknown *pGrfC26* sp. B (*U.pGrf.B.*). A detailed correlation matrix including all process parameters and the archaeal community diversity is provided as Annex 1 - Table S4.

Indeed, in the overfed reactors R1-R3, the relative abundance of T-RFs 107 bp, assigned to *Methanosaeta* sp., was dominant at the beginning of the OLR increase (P1), then decreased toward acidosis and was replaced by T-RFs 106 pb, related to *Methanoculleus* sp. (Figures 2.4, 2.5). This suggests an overall redundancy of the archaeal population in sub-optimal conditions. Similarly, a low pH and high VFAs-determined transition from an acetoclastic (*Methanosaeta* sp.-dominated) toward a hydrogenotrophic (*Methanoculleus* sp.-dominated) methanogenesis has been previously reported for an anaerobic membrane bioreactor treating swine manure and exposed to high shear condition (Padmasiri *et al.*, 2007), and for a hybrid anaerobic reactor exposed to the changing OLR (Kundu *et al.*, 2013). Even though, in the absence of *Methanosaetaceae*, syntrophic acetate oxidation (SAO) and hydrogenotrophic methanogenesis were proposed to be the dominant methane producing pathways from acetate

(Karakashev *et al.*, 2006), we did not detect any of a few known SAO bacteria in our test reactors (Werner *et al.*, 2014) (Annex 1 - Table S2). This might indicate either the presence of previously unknown SAO bacteria, which could be expected regarding a relatively high number of taxonomically unassigned 16S rRNA sequences generated in this study, or the existence of new metabolic pathways leading to VFAs conversion and a subsequent methane production.

Methanosaeta sp. is regarded as a redundant archaeon and a decrease in its population, or more generally a disturbance of a stable archaeal population has been proposed as an early warning indicator of process failure (Carballa *et al.*, 2015). Here, by correlating the 16S rRNA amplicon sequencing with the changes observed at macroscopic level, we could observe that indeed a decrease of *Methanosaeta* sp. population and its substitution by *Methanoculleus* sp. started in the test reactors at the sampling period P2. For the same, the pH was still above 7, no accumulation of VFAs was observed, and the methane yield was not yet affected (Figures 2.2, 2.3).

Even though, the dominance of *Methanoculleus* was documented for many well-performing farm reactors (Nettmann *et al.*, 2010), it is not the presence of this species (*e.g.* P0 in our studied reactors) which could point to the approaching process disturbance, but the sudden shift of the dominant population in steady-state reactors. Therefore, and in accordance to other authors (Carballa *et al.*, 2015), we tentatively propose that substitution of a dominant archaeal population (*Methanosaeta* sp. is often dominant in reactors inoculated with sludge from a wastewater treatment plant [WWTP] and operated at low acetate and free-ammonia concentrations ((Zheng and Raskin, 2000; Karakashev *et al.*, 2005; Nettmann *et al.*, 2010; De Vrieze *et al.*, 2012), Figure 2.7) with another population of archaea (*Methanoculleus* sp. emerged at the onset of VFAs accumulation) could indeed be regarded as an early warning indicator of acidosis. Nevertheless, other authors propose other *e.g.* *Methanosarcina thermophila*-related species, characterized as heavy duty methanogens (De Vrieze *et al.*, 2012), to be the earliest indicators of acidification in overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage (Kampmann *et al.*, 2014). In our study *Methanosarcina* sp. was not detected neither before nor during the acidosis (Figure 2.5). Therefore, we suggest to conduct further large-scale monitoring of different well-performing as well as failed AD reactors fed with diverse substrates before a microbial species can unequivocally be proposed as a good and universal indicators of any process imbalance.

III.7. Restoration of biogas production with NaOH and NaHCO₃ addition

A starving period and a gradual addition of NaOH and NaHCO₃ to R1-R3 following the acidosis, resulted in a pH increase to a neutral level after 3 days only. The complete process recovery and restoration of biogas production with the methane content exceeding 50 %, occurred already after 9 days following the beginning of the alkali addition. In comparison, bioaugmentation of overfed acidic reactors (pH decreased from around 7.0 to 6.8 only), has been shown to decrease the recovery time by a maximum of 37 days, compared to about 180 days for non-bioaugmented ones (Tale *et al.*, 2015)!

Interestingly, the archaeal population in the test R1-R3 reactors, although affected in terms of community structure dynamics, was not eradicated by a relatively low pH (5.2 ± 0.4) during the acidosis. Following the pH increase, and probably as a consequence of starvation and NaOH influence on archaeal population, *Methanosarcina* sp. which was also described as a fast growing archaeon resistant to high acetate concentration (De Vrieze *et al.*, 2012), started to outcompete *Methanoculleus* sp. in R2 and R3 (Figure 2.5). Remarkably, a new archaeal OTU_15 classified as a candidate genus *vadinCA11* that was below the detection limit in previous periods, emerged in R1 and R2 during the recovery phase (P5) (Figures 2.5, Annex 1 – Table S3). This genus has been reported as potentially halophilic (Durbin and Teske, 2012) and it is probable that the increase of sodium ion concentration due to the addition of the alkali favoured its outbreak during the recovery phase.

A drastic pH increase influenced the structure of the dominant bacterial phyla as well. While the three dominant *Bacteroidetes* OTUs (OTU_2, 3 and 5) at P1-P4 were still detected at P5, however with lower abundance, new OTUs (OTU_19, 45, 65 and 74, Annex 1 – Table S2) also representing families of *Porphyromonadaceae* and *Bacteroidaceae* started to be detected at high level inside the *Bacteroidetes* population during the recovery phase P5. *Firmicutes* also answered with a functional redundancy to the pH change. Three OTUs (OTU_25, 68 and 72, Annex 1 – Table S2) emerged and became dominant (OTU_25 assigned as unclassified *Sedimentibacter*, OTU_68 potentially assigned as *Clostridium bolteae* and OTU_72 assigned as unclassified *Epulopiscium*). At P5, OTU_68 constituted 10.6, 0.5 and 7.6 % of the whole bacterial population, based on the HTS results, respectively for R1, R2 and R3. *C. bolteae*, which is a spore-forming propionate producer, was only detected for R3 at P0 and at a very low abundance level (around 0.01 % of the whole bacterial community). As one could expect, an increased propionate concentration at P5 was linked to an increased abundance of a propionate-producing *C. bolteae* and a decrease in abundance of potentially propionate-

consuming *WWEI* candidate bacteria (Pelletier *et al.*, 2008). Although the bacterial and archaeal community structures completely changed for the three reactors R1-R3, following the alkali addition (Figures 2.4, 2.5), the microbial population successfully self-optimized to the new environmental conditions, as the biogas production restarted quickly (Figure 2.3a). On the one hand we showed that the addition of NaOH to raise the pH and NaHCO₃ to raise the alkalinity, quickly restored the activity of overfed reactors; therefore it represents an efficient treatment of AD reactors that faced acidosis. On the other hand, the drastically changing environmental conditions influenced the structure of the prevailing microbial communities in a way that a favourable niche was created for other species to emerge.

Conclusions

The impact of increasing OLR of sugar beet pulp, acidosis and finally process recovery on microbial community richness and diversity in three mesophilic CSTR reactors (R1-R3) were compared with a cautiously fed reactor (CR). As major outputs of this study we could point out that even though the overfed reactors responded rather similarly in terms of process performance to the OLR increase, each reactor established its own microbial community structure over time, dominated only by a few OTUs. The retrospective management (Carballa *et al.*, 2015) of our reactors showed that traditional microbial parameters such as richness, diversity and evenness which could be potentially used to predict process imbalances were not effective, due to the differential behaviours of microbial consortia in the replicated reactors. Moreover, the reactor that was characterised with the least diverse microbial community (R2) was the most resistant to acidosis and the best performing one in terms of methane production. The shift from *Methanosaeta* sp. to *Methanoculleus* sp. in *Methanosaeta* sp.-dominated reactor could be an interesting and promising warning indicator of an approaching acidosis since this shift occurred before pH started to decrease. The combination of the reactor starvation and the pH adjustment with NaOH and NaHCO₃ demonstrated a good potential for process recovery after acidosis, as reflected by a quick restart of the methane production, even if a new microbial community has established. Nevertheless, longer monitoring periods of microbial communities after man-induced process recovery are necessary to evaluate if the newly established microbial populations are stable over time and if they are better adapted to high VFAs concentrations. Relying on the results of this study, alkali-mediated AD process recovery from acidosis was successfully applied to two full-scale anaerobic reactors in Germany and Luxembourg (data not shown).

References

- Adam, G., Lemaigre, S., Goux, X., Delfosse, P., and Romain, A.C. (2015) Upscaling of an electronic nose for completely stirred tank reactor stability monitoring from pilot-scale to real-scale agricultural co-digestion biogas plant. *Bioresource Technology* **178**: 285-296.
- Ahring, B.K., Sandberg, M., and Angelidaki, I. (1995) Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**: 559-565.
- Ahring, B. (2003) Perspectives for Anaerobic Digestion. In *Biomethanation I*. Ahring, B., Angelidaki, I., Macario, E.C., Gavala, H.N., Hofman-Bang, J., Macario, A.J.L. et al. (eds). 81st edn. Springer Berlin Heidelberg, 1-30.
- Akuzawa, M., Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2011) Distinctive responses of metabolically active microbiota to acidification in a thermophilic anaerobic digester. *Microbial Ecology* **61**: 595-605.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., and Ahring, B.K. (1993) A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*. **42**: 159-166.
- Anonymous (2006) *VDI 4630 - Vergarung organischer stoffe (german guideline: fermentation of organic materials - characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests)*. Beuth Verlag GmbH edn, Berlin.
- Appels, L., Lauwers, J., Degrève, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K. et al. (2011) Anaerobic digestion in global bio-energy production: potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**: 4295-4301.
- Bent, S.J. and Forney, L.J. (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME Journal* **2**: 689-695.
- Berry, D., Ben Mahfoudh, K., Wagner, M., and Loy, A. (2011) Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7846-7849.
- Blume, F., Bergmann, I., Nettmann, E., Schelle, H., Rehde, G., Mundt, K., and Klocke, M. (2010) Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *Journal of Applied Microbiology* **109**: 441-450.
- Bray, J.R. and Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**: 325-349.
- Camarinha-Silva, A., Wos-Oxley, M.L., Jáuregui, R., Becker, K., and Pieper, D.H. (2012) Validating T-RFLP as a sensitive and high-throughput approach to assess bacterial diversity patterns in human anterior nares. *FEMS Microbiology Ecology* **79**: 98-108.
- Carballa, M., Regueiro, L., and Lema, J.M. (2015) Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology* **33**: 103-111.

- Carballa, M., Smits, M., Etchebehere, C., Boon, N., and Verstraete, W. (2011) Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**: 303-314.
- Connors, S.B., Mongodin, E.F., Johnson, M.R., Montero, C.I., Nelson, K.E., and Kelly, R.M. (2006) Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic Thermotoga species. *FEMS Microbiology Reviews* **30**: 872-905.
- Core Team, R.D. (2008) *R: a language and environment for statistical computing*. The R foundation for statistical computing edn. Vienna, Austria.
- Culman, S., Bukowski, R., Gauch, H., Cadillo-Quiroz, H., and Buckley, D. (2009) T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* **10**: 171.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., and Verstraete, W. (2012) Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* **112**: 1-9.
- De Vrieze, J., Verstraete, W., and Boon, N. (2013) Repeated pulse feeding induces functional stability in anaerobic digestion. *Microbial Biotechnology* **6**: 414-424.
- Delbès, C., Moletta, R., and Godon, J.J. (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 19-26.
- Demirel, B. and Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **7**: 173-190.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 190-197.
- Durbin, A.M. and Teske, A. (2012) Archaea in organic-lean and organic-rich marine subsurface sediments: an environmental gradient reflected in distinct phylogenetic lineages. *Frontiers in Microbiology* **3**:168, doi:10.3389/fmicb.2012.00168.
- Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.
- Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C., and Insam, H. (2014) Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management* **34**: 2080-2089.
- Gallert, C. and Winter, J. (2004) Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. In *Environmental Biotechnology. Concepts and Applications*. Jördening, H.J. and Winter, J. (eds). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1-48.
- Grosskopf, R., Janssen, P.H., and Liesack, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 960-969.

Heeg, K., Pohl, M., Sontag, M., Mumme, J., Klocke, M., and Nettmann, E. (2014) Microbial communities involved in biogas production from wheat straw as the sole substrate within a two-phase solid-state anaerobic digestion. *Systematic and Applied Microbiology* **37**: 590-600.

Hill, D.T., Cobb, S.A., and Bolte, J.P. (1987) Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digester failure. *Transactions of the ASABE* **30**: 496-501.

Kampmann, K., Ratering, S., Geißler-Plaum, R., Schmidt, M., Zerr, W., and Schnell, S. (2014) Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage. *Bioresource Technology* **174**: 108-117.

Karakashev, D., Batstone, D.J., and Angelidaki, I. (2005) Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 331-338.

Karakashev, D., Batstone, D.J., Trably, E., and Angelidaki, I. (2006) Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5138-5141.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41**: e1. doi: 10.1093/nar/gks808.

Klocke, M., Mähnert, P., Mundt, K., Souidi, K., and Linke, B. (2007) Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology* **30**: 139-151.

Krakat, N., Schmidt, S., and Scherer, P. (2011) Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. *Bioresource Technology* **102**: 5692-5701.

Kundu, K., Sharma, S., and Sreekrishnan, T.R. (2013) Changes in microbial communities in a hybrid anaerobic reactor with organic loading rate and temperature. *Bioresource Technology* **129**: 538-547.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds). New York: John Wiley and Sons, 115-175.

Lerm, S., Kleyböcker, A., Miethling-Graff, R., Alawi, M., Kasina, M., Liebrich, M., and Würdemann, H. (2012) Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. *Waste Management* **32**: 389-399.

Limam, R.D., Chouari, R., Mazéas, L., Wu, T.D., Li, T., Grossin-Debattista, J. *et al.* (2014) Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. *MicrobiologyOpen* **3**: 157-167.

Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522.

- Lueders, T. and Friedrich, M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2732-2742.
- Makádi, M., Tomócsik, A., and Orosz, V. (2012) Digestate: a new nutrient source - review. In *Biogas*. Sunil Kumar (ed). InTech Rijeka, doi:10.5772/31355
- Möller, K. and Müller, T. (2012) Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: a review. *Engineering in Life Sciences* **12**: 242-257.
- Möller, K. and Stinner, W. (2009) Effects of different manuring systems with and without biogas digestion on soil mineral nitrogen content and on gaseous nitrogen losses (ammonia, nitrous oxides). *European Journal of Agronomy* **30**: 1-16.
- Muralidharan, V., Rinker, K.D., Hirsh, I.S., Bouwer, E.J., and Kelly, R.M. (1997) Hydrogen transfer between methanogens and fermentative heterotrophs in hyperthermophilic cocultures. *Biotechnology and Bioengineering* **56**: 268-278.
- Murto, M., Björnsson, L., and Mattiasson, B. (2004) Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management* **70**: 101-107.
- Nesbo, C.L., Dlutek, M., Zhaxybayeva, O., and Doolittle, W.F. (2006) Evidence for existence of Mesotogas, members of the order Thermotogales adapted to low-temperature environments. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5061-5068.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., and Klocke, M. (2010) Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2540-2548.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., and Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **2**: 39-50.
- Padmasiri, S.I., Zhang, J., Fitch, M., Norddahl, B., Morgenroth, E., and Raskin, L. (2007) Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water Research* **41**: 134-144.
- Pelletier, E., Kreymeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R. *et al.* (2008) "Candidatus Cloacamonas acidaminovorans": genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *Journal of Bacteriology* **190**: 2572-2579.
- Pielou, E.C. (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* **13**: 131-144.
- Pilloni, G., Granitsiotis, M.S., Engel, M., and Lueders, T. (2012) Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility. Quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. *PLoS ONE* **7**: e40467.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported

software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537-7541.

Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.

Solli, L., Havelsrud, O., Horn, S., and Rike, A. (2014) A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnology for Biofuels* **7**: 146, doi: 10.1186/s13068-014-0146-2.

Speece, R.E. (1996) *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae press, Nashville.

Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H. *et al.* (2013) 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiology Ecology* **85**: 612-626.

Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., and Massé, D.I. (2008) Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* **42**: 513-537.

Tale, V.P., Maki, J.S., and Zitomer, D.H. (2015) Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community. *Water Research* **70**: 138-147.

Ter Braak, C.J. (1987) The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**: 69-77.

Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Rabaey, K., and Tyson, G.W. (2015) Temperature and solids retention time control microbial population dynamics and volatile fatty acid production in replicated anaerobic digesters. *Scientific Reports* **5**: doi: 10.1038/srep08496.

Weiland, P. (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 849-860.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.

Werner, J.J., Garcia, M.L., Perkins, S.D., Yarasheski, K.E., Smith, S.R., Muegge, B.D. *et al.* (2014) Microbial community dynamics and stability during an ammonia-induced shift to syntrophic acetate oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 3375-3383.

Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K. *et al.* (2011) Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4158-4163.

Wilkie, A.C. (2008) Biomethane from biomass, biowaste, and biofuels. In *Bioenergy*. Wall, J.D., Harwood, C.S., and Demain, A. (eds). ASM Press edition, Washington: 195-205.

Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R.U., and Lueders, T. (2008) Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community

patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 792-801.

Yiridoe, E.K., Gordon, R., and Brown, B.B. (2009) Nonmarket cobenefits and economic feasibility of on-farm biogas energy production. *Energy Policy* **37**: 1170-1179.

Zheng, D. and Raskin, L. (2000) Quantification of Methanosaeta species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. *Microbial Ecology* **39**: 246-262.

Points marquants de l'étude :

- Les performances et la dynamique des communautés microbiennes de digesteurs sous augmentation du taux de charge organique, perturbation du processus (acidose) et restauration de la production de biogaz, ont été comparés.
- Bien que les digesteurs aient été traités en tant que réplicats, la pression de sélection due à l'augmentation du taux de charge organique a conduit à l'installation de communautés microbiennes spécifiques à chacun d'entre eux.
- Les paramètres écologiques microbiens tels que les indices de diversité, de richesse et d'équitabilité se sont révélés inefficaces en vue de la prédiction de l'acidose.
- Le changement au sein de la communauté archée, par la disparition et l'apparition d'espèces, intervenu bien avant les premiers symptômes de perturbation, laisse imaginer le développement d'un indicateur d'avertissement prometteur de l'acidose.
- L'action combinée d'un arrêt de l'alimentation des digesteurs perturbées, associé à l'utilisation d'une solution alcaline afin de ramener le pH vers la neutralité, a permis une restauration de la production de biogaz rapidement, bien que les communautés microbiennes aient été une nouvelle fois perturbées.

Chapitre 3. Comparaison entre CSTRs et ABRs : performances et dynamique des communautés microbiennes sous augmentation du taux de charges organiques

Après s'être intéressé à l'impact d'une augmentation de l'OLR conduisant à une acidose sur la dynamique des communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobies, nous allons maintenant nous intéresser à l'influence du type de digesteur sur ces mêmes communautés. Pour ce faire, deux digesteurs de type CSTR et deux digesteurs de type ABR ont été inoculés à partir d'une même boue. Alors qu'un digesteur de chaque type a subi une augmentation d'OLR au cours du temps, l'autre a reçu une alimentation constante.

Methane performance and microbial community dynamics in continuously stirred tank *versus* anaerobic baffled reactors.

Xavier Goux, Magdalena Calusinska, Sébastien Lemaigre, Marie Fossépré, Emilie E.L. Muller, Paul Wilmes, Emile Benizri and Philippe Delfosse

En préparation en vue d'une soumission pour publication à la revue « Bioresource Technology ».

Methane performance and microbial community dynamics in continuously stirred tank *versus* anaerobic baffled reactors.

Abstract

Anaerobic digestion performance and microbial community dynamics were compared for two types of reactor: completely/continuously stirred tank reactors (CSTRs) and anaerobic baffled reactors (ABRs). While one reactor of each type was moderately fed to target a steady state, another one received an increasing amount of substrate over time. Under a reasonable organic load, the biogas productions were similar for the two types of reactors. Following this period, combined feeding regime with sugar beet pulps complemented with soluble sugar was initiated, and each type of reactors started to produce different quantities of biogas and methane. Microbial communities specific to each reactor type were studied using 16S rRNA high-throughput amplicon sequencing. Whereas there was no statistical difference between bacterial communities of the two CSTRs, the high selective pressure imposed by the amounts of substrate fed to the first compartment of ABRs has resulted in significant discrepancies between the two ABRs microbial communities.

Keywords

ABR, anaerobic digestion, CSTR, high-throughput 16S rRNA gene sequencing, microbial ecology

I. Introduction

Providing clean, efficient, affordable and reliable energy is a key challenge for the 21st century (Advisory group on energy and climate change, 2010). Indeed, while the energy demand is continuously increasing, a transition into renewable and low greenhouse gas emitting energy source is required to mitigate to the global warming. In this context, the anaerobic treatment of organic wastes is highly attractive because of the different advantages offered by this technology, including the production of heat, electricity and fuel from biogas, effective pathogen removal and reduction of odourous emissions, as well as providing a nutrient-rich plants fertilizer (Ward *et al.*, 2008; Yiridoe *et al.*, 2009).

Anaerobic digestion (AD, syn. biomethanation) is an oxygen-free bioprocess that converts organic matter into biogas through a series of interlinked microbial processes defined as hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis (Pain and Hephherd, 1985; Vanwonterghem *et al.*, 2015). However, while microbial communities are the main driver of the anaerobic process, the key players of anaerobiosis and their associations and functioning are not completely understood yet (Carballa *et al.*, 2015). Thus, knowledge on the dynamics of microbial communities is required to better understand performance and stability of a reactor, as the microbial populations involved in AD are intimately linked due to syntrophic and symbiotic interactions, and are sensitive to different environmental conditions (Pohland and Ghosh, 1971; Gerardi, 2003).

Indeed, while the optimal pH for methane production is between 6.8 and 7.2 (Ward *et al.*, 2008), hydrolysis and acidogenesis are more efficient at lower pH, between 5.5 and 6.5 (Yu and Fang, 2002; Kim *et al.*, 2003). As the AD process is commonly operated at neutral pH, hydrolysis is often considered as a rate-limiting step regarding its distinct pH optimum (Maspolim *et al.*, 2015). In contrast to the commonly used completely/continuously stirred tank reactors (CSTRs), where all the biochemical processes take place simultaneously in the same reactor tank, the development of multi-stage systems, *e.g.* anaerobic baffled reactors (ABRs), creates a physical separation between the two first steps of the AD process and the methanogenesis (Barber and Stuckey, 1999). A series of vertical baffles forces the reactor sludge to flow under and over them, as the substrate is introduced inside the reactor. Moreover, it allows for the installation of microbial communities inside each compartment, according to the type and amount of substrate and pH (Barber and Stuckey, 1999; Wang *et al.*, 2004a). While a few studies have characterised ABRs treating mostly wastewater (Barber and Stuckey, 1999; Wang *et al.*, 2004a; Pirsahab *et al.*, 2015), to our best knowledge, no

study has compared the operation and microbial communities of CSTRs *versus* ABRs fed with solid substrate.

Therefore, the first goal of this study was to evaluate the performance of CSTR and ABR reactors, seeded with the same inoculum and operated under stable or increasing organic loading rate (OLR) of sugar beet pulp complemented with soluble sugar (saccharose). The second goal was to assess if the reactor performance could be linked to the reactor type and to the establishment and dynamics of specific microbial communities thriving in CSTRs and in the compartments of ABRs while using next generation sequencing technology.

II. Methods

II.1. Reactor designs and operation

Two CSTRs and two ABRs were used in this study. Schematic diagrams of the two reactor types are shown in Figure 3.1a and 3.1b. Each reactor had a 100 L working volume, a pilot scale chosen to better reflect the conditions of a full-scale anaerobic reactor while enabling the feeding with a solid substrate of agricultural origin. In CSTRs a continuous stirring was operated by a vertical mixing paddle whereas in ABRs a degassing was obtained by the re-introduction of the biogas at the bottom of the reactor in a sparging mode. The reactors were operated at a mesophilic temperature of 37 ± 1 °C. ABRs were divided in 3 compartments of equal volume (named c1, c2 and c3: c1 being the fed compartment while c3 was equipped with an outlet fitting to collect the overflow of digestate, Figure 3.1b). The four reactors were inoculated with seeding sludge originating from a mesophilic anaerobic reactor of a wastewater treatment plant (WWTP) located in Schiffflange, Luxembourg (SIVÉC-Schiffflange).

In an initial phase, the first 90 days of the experimental period, the four reactors were fed identically every working day with sugar beet pulp pellets [86.8 % total solids (TS), 92.0 % volatile solids (VS)]. The added substrate was not sterilized to best mimic full-scale energy units and the feeding was adapted to maintain a constant hydraulic retention time (HRT) of 40 days during the whole experiment, by mixing the substrate with tap water. In order to avoid microbial washout and too low pH in the 1st compartments of ABRs, which received the feeding substrate, 7 L of sludge from the last compartment (c3) were recycled into the first compartment (c1) each time the reactors were fed.

After day 90, one reactor of each type (CSTR2 and ABR2) received increasing amounts of sugar beet pulp (Figure 3.1d), while the two other reactors (CSTR1 and ABR1) remained

constantly fed at a moderate OLR of $2 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Figure 3.1c) to maintain a steady process. For CSTR2 and ABR2, OLR increments of $0.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ every two weeks were applied. From day 163, rapeseed oil was added daily to the reactors to control foam production, and from day 174, soluble sugar (saccharose) was used in complementation of sugar beet pulps and rapeseed oil to feed the reactors (Figure 3.1c, d).

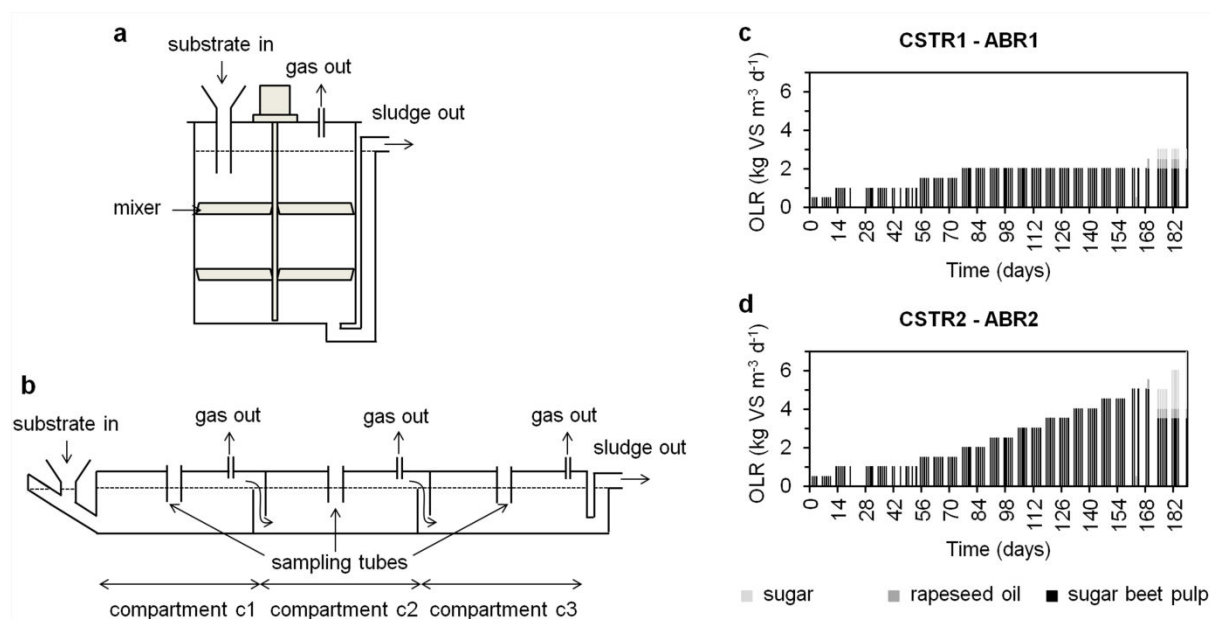


Figure 3.1 - Schematic diagrams of the experimental reactor types and details on the feeding campaign

Completely/continuously stirred tank (CSTR) and anaerobic baffled (ABR) reactor designs (**a** and **b**), the dotted lines represent the theoretical level of digestate; organic loading rate (OLR in $\text{kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, bars) applied to moderately fed reactors (CSTR1 - ABR1, **c**) and the reactors exposed to an increasing amount of feeding substrate (CSTR2 - ABR2, **d**).

II.2. Analytical chemistry methods

Sludge samples were collected once per week from CSTRs as well as from each of the three compartments of ABRs. The pH, TS (%) and VS (%) content, total alkalinity (Alk, $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), ammonium-nitrogen concentration ($\text{kg NH}_4\text{-N m}^{-3}$) and the concentration of volatile fatty acids (VFAs, mg kg^{-1}) were measured as described previously (Goux *et al.*, 2015) and expressed with their standard deviation when appropriate. The total VFAs concentration was expressed as the sum of the individual volatile fatty acids concentrations, measured for acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovalerate, valerate and caproate. Free ammonia concentration (free- NH_3 , kg m^{-3}) was estimated according to Emerson *et al.*

(1975) and Körner *et al.* (2001) taking into account the operating temperature, the pH and the measured ammonium-nitrogen content.

The produced biogas of each CSTR and each compartment of ABRs was stored in individual gas-bags (Tecobag, Tesseraux Spezialverpackungen GnbH) modified as described in Mayer *et al.* (2014). The volume of produced biogas was measured each hour with a wet-drum type gasmeter of 1 mL resolution (Ritter, Bochum, Germany), and expressed in litres, at normal atmospheric pressure and temperature conditions (NL). The biogas composition (CH₄ and CO₂ content in %) was measured every 2 h using dedicated nondispersive infrared sensors in the 0-100 % volume measurement range (Dynament, South Normanton, UK). Based on the volume of biogas produced daily, its pourcentage in methane and the OLR applied to the different reactors all along the experimental campaign, the CH₄ yield (in NL gVS⁻¹) of each reactor was calculated.

II.3. Microbial community monitoring

During this experiment, a total of 93 sludge aliquots of around 200 µL were sampled weekly and stored at - 80 °C prior the DNA extraction. The first sample (d1) corresponded to the seeding sludge. Samples for CSTR1 and ABR1, maintained under moderate OLR, were collected on days 7, 14, 21, 56, 77, 90, 104, 118, 132, 174, 176, 181 and 188 whereas CSTR2 and ABR2, exposed to increasing OLR, were sampled starting from day 56. Thus the sample collection for CSTR2 and ABR2 included sampling at day 56, 77, 90, 104, 118, 132, 174, 176, 181 and 188. Samples were collected each time before the feeding of the reactors and for ABRs each of the three compartments was sampled individually.

To unravel the microbial community (bacteria and archaea) structure and dynamics, genomic DNA was extracted as described by Roume *et al.* (2012) using a robotic platform (Muller *et al.*, 2014). In order to survey the bacterial community structure, a fragment of around 484 bp of the bacterial V6-V8 region of the 16S rRNA gene was amplified from all the samples with modified primer pair S-D-Bact-0909-a-S-18 (5'-ACT CAA AKG AAT WGA CGG-3') and S-*-Univ-1392-a-A-15 (5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3') (Klindworth *et al.*, 2013). Concerning archaea, modified archaeal 16S rRNA gene-specific primer pair S-D-Arch-0519a-S-15 (5'-CAG CMG CCG CGG TAA-3') and S-D-Arch-1041-a-A-18 (5'-GGC CAT GCA CCW CCT CTC-3') targeting a fragment of V4-V6 region of around 526 bp was used (Klindworth *et al.*, 2013). As modification, the Nextera XT[®] transposase sequence (Illumina Inc., San Diego, USA) was included in the 5' end of the forward and reverse primer.

Additional four N (*i.e.* four random nucleotides) were also added in the forward primer to increase the nucleotide diversity. The amplicons and libraries were generated and sequenced as described before (Goux *et al.*, 2015).

II.4. Microbial structure and dynamics analysis

The obtained sequence reads were de-multiplexed using CLC Genomics Workbench 7, then quality trimmed (with the fastq_mergepairs comment and the fastq_truncqual of 2) and assigned to operational taxonomic units (OTUs) at 97 % similarity using Usearch (v7.0.1090_win64) (Edgar, 2010). The resulting nucleotide sequences were deposited in GenBank database under accession numbers KT796612 to KT799062 for bacteria and KT796569 to KT796611 for archaea. Taxonomic affiliation was done using the Greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/>) with a confidence threshold of 80 %.

The richness (numbers of OTUs) and the Shannon-Weaver (H') (Shannon, 1948), Simpson (D)¹⁷ (Simpson, 1949), and Pielou (J) (Pielou, 1966) indices were calculated for the bacterial and archaeal domain separately. While H' and D evaluate the microbial diversity, J evaluates the microbial evenness. The dissimilarity in terms of community structure was assessed by calculating pairwise Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957) distance matrices using Mothur (Schloss *et al.*, 2009) and visualized using non-metric multidimensional scaling (NMDS). The spatial separation between all samples originating from each CSTR or ABR compartment observed in NMDS plots was tested using analysis of molecular variance (AMOVA). Differences were considered statistically significant at a p -value < 0.05.

III. Results and discussion

III.1. Performance of CSTRs and ABRs during the period of moderate feeding with sugar beet pulp (day 1 to day 90)

Until day 90, the four reactors were subjected to a moderate feeding regime (OLR below 2 kg VS m⁻³ day⁻¹) and showed similar biogas and methane performances with a stable methane yield of about 21.5 ± 1.9 NL kgVS⁻¹ of sugar beet pulp (Figure 3.2a, b). CH₄ represented

¹⁷ $D = \sum_{i=1}^S \frac{N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}$ où N_i est le nombre d'individus de la i -ème espèce (ou OTU), S est le nombre d'espèces

(ou OTUs), N est le nombre total d'individus. L'indice de Simpson est compris entre 0 et 1. Plus il se rapproche de 0, plus la probabilité d'obtenir des individus d'espèces (ou OTUs) différentes est élevée.

around 52 ± 4.0 % of the biogas content for the two CSTRs as well as for the average biogas composition calculated from the three compartments of ABRs (Figure 3.2c, d).

In terms of sludge characteristics, during this period, the two CSTRs behaved like duplicated reactors and average values are presented in the text. The pH remained stable over time (6.8 ± 0.2), while total alkalinity increased from around $6,005 \pm 173$ to $7,722 \pm 173$ mg CaCO₃ L⁻¹. Free-NH₃ and TS remained under 0.01 ± 0.0 kg m⁻³ and 1.8 ± 0.2 %, respectively, the VS content in the sludge increased from around 54.8 ± 0.8 to 62.1 ± 0.7 %, due to the feeding with a solid substrate rich in VS (Figure 3.3a, d, g). Acetate was the dominant VFAs at that time, however its concentration was quite low (less than 400 mg kg⁻¹) (Figure 3.3j).

With regards to the two ABRs, physical separation of the different compartments strongly influenced the biogas production and composition as well as the pH specifically for each compartment (Figure 3.2a, e-j and Figure 3.3b, c). A clear pH decrease was noticed in the 1st compartment from an average value of 7.4 ± 0.0 at day 1 to around 4.5 ± 0.1 for both ABR1-c1 and ABR2-c1 at day 35 (Figure 3.3b, c). A smaller feeding-reception volume of the 1st ABR compartment (around 33.3 L of sludge) in comparison to the CSTRs (100 L), resulted in a high OLR in this fed compartment leading to an unbalanced process and VFAs accumulation (Figure 3.3k, l). To our surprise, while the pH remained below 4.9 in ABR1-c1 after day 35, in ABR2-c1 it receded to neutrality at day 76 and remained stable (7.2 ± 0.1) until the end of this moderate feeding period. At the same time, VFAs were consumed in ABR2-c1, indicating a well-functioning AD process in this compartment. The compartments c2 and c3 of ABR1 and ABR2 showed similar pH values that remained stable in a neutral range over time (Figure 3.3b, c). The 2nd and 3rd compartments of both ABRs showed total alkalinity and free-NH₃ values in ranges similar to that observed for the CSTRs (Figure 3.3d-f). By contrast, in the case of the 1st compartments of both ABRs, total alkalinity and free-NH₃ decreased to respectively 735.4 and 980.5 mg CaCO₃ L⁻¹ and 0.0 kg m⁻³ between day 1 and day 35 due to the low pH. Beyond day 35, due to a drastic increase in pH in ABR2-c1, the total alkalinity increased to around 5,888 mg CaCO₃ L⁻¹ towards day 90 whereas it remained low in ABR1-c1. The TS and VS contents were higher in the 1st compartment of ABR1 than in its 2nd and 3rd compartments and both CSTRs, pointing to a slower substrate degradation and conversion to methane (Figure 3.3g, h). In the case of ABR2, the 1st compartment was exposed to an initial low pH that conducted to a VS accumulation (until 78.8 % at day 35) (Figure 3.3i). However, as the pH receded close to neutrality after day 76, the VS content decreased and reached values similar to that of the last two ABRs compartments and both CSTRs.

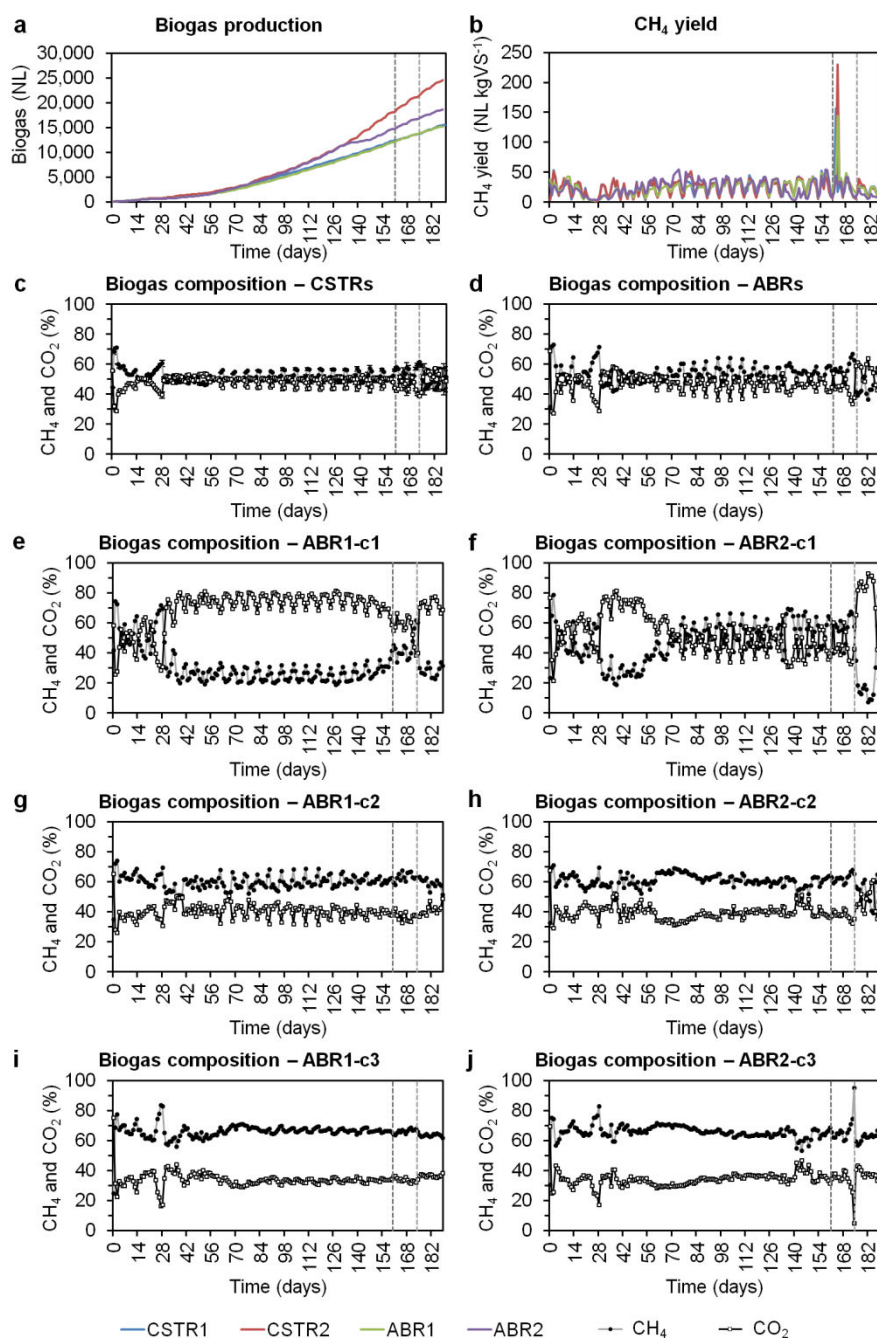


Figure 3.2 - Cumulated biogas production and progress over time of the biogas composition for the studied reactors

Cumulated biogas production for the four reactors (in NL) - **a**; CH₄ yield for the four reactors (in NL kgVS⁻¹) - **b**; biogas composition (CH₄ and CO₂ in %) for CSTRs and ABRs (**c** and **d**), and for each compartment of ABR1 and ABR2 (**e**, **g**, **i**, **f**, **h** and **j**, respectively); CSTR1 and ABR1 are the moderately fed reactors; CSTR2 and ABR2 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *dark grey vertical dotted line* indicates the first day with rapeseed oil added as substrate; the *light grey vertical dotted line* indicates the first day with sugar added as substrate.

Whereas cumulated biogas and CH₄ yield of ABRs (cumulated biogas production of the three ABR compartments) between day 1 to day 90 were similar to the performance of CSTRs (Figure 3.2a, b), interestingly, as long as the pH of the 1st ABR compartments was low, the majority of the biogas, and especially methane, was produced in the 2nd compartments.

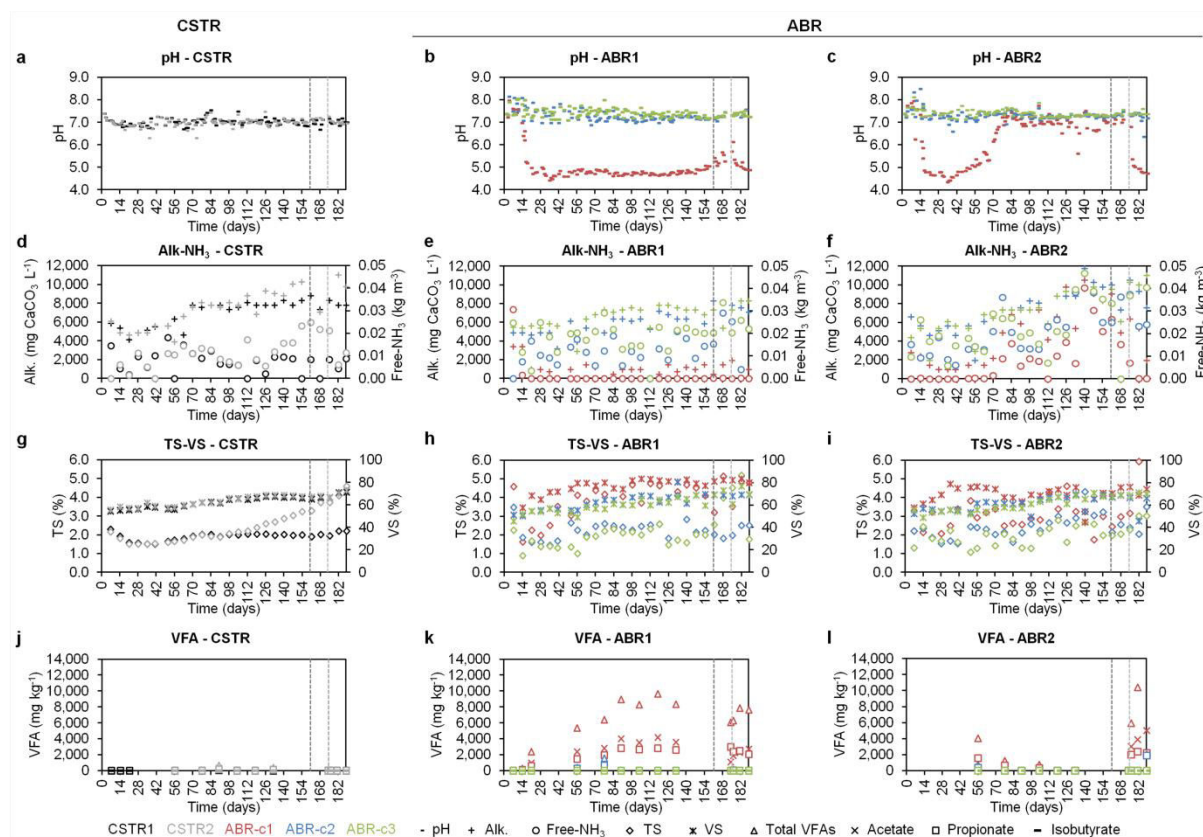


Figure 3.3 - Progress over time of physicochemical parameters of the anaerobic sludge studied for each reactor and compartments

pH - **a, b, c**; total alkalinity (Alk., mg CaCO₃ L⁻¹), and free-ammonia content (Free-NH₃, kg m⁻³) - **d, e, f**; total solids (TS, %) and volatile solids (VS,%) - **g, h, i**; volatile fatty acid content (VFA, mg kg⁻¹, only total VFAs, acetate, propionate and isobutyrate are represented) - **j, k, l**; CSTR1 and ABR1 are the moderately fed reactors; CSTR2 and ABR2 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *dark grey vertical dotted line* indicates the first day with rapeseed oil added as substrate; the *light grey vertical dotted line* indicates the first day with sugar added as substrate.

Indeed, at day 35 for example, 13.2 and 9.5 NL of biogas were produced by the 2nd compartment of ABR1 and ABR2, respectively, while at the same time only 3.2 and 1.6 NL and 3.4 and 1.6 NL were produced by the 1st and 3rd compartments of ABR1 and ABR2, respectively. In the case of ABR2 as soon as the pH in the 1st compartment increased and reached back a neutral value from day 76, this compartment overtook most of the biogas

production with 34.3 NL produced (day 76). At the same time, the two other compartments (c2 and c3) of ABR2 produced 13.9 and 4.2 NL of biogas, respectively. To summarize, in case of the establishment of a clear hydrolysis phase, as it is the case for the 1st compartment of ABR1, characterized by a high content of CO₂ in the produced biogas (63 ± 12 %, Figure 3.2e), high VFAs content, and low pH (Figure 3.3b,k), the majority of the biogas and methane is produced in the following compartments, with better conditions for methanogenesis (neutral pH) as shown in Figure 3.2g and 3.2i. This characteristic is one of the benefits of ABR, as this type of reactor allows a high stability to organic loading shocks (Barber and Stuckey, 1999). However this was not the case for ABR2 for which the first compartment succeeded to recede to neutral pH and efficient biogas production.

III.2. Performances of CSTRs and ABRs when exposed to increasing or stable OLR with sugar beet pulp (day 91 to day 162)

Between days 91 and 162, CSTR2 and ABR2 were exposed to increasing sugar beet pulp loading rate while this parameter was maintained stable for CSTR1 and ABR1. This increasing feeding applied to CSTR2 resulted in an increase of its TS content compared to CSTR1, from 1.9 % at day 91 to 3.3 % at day 163 (Figure 3.3g). Interestingly, pH, alkalinity, VS and VFAs contents remained similar for the two CSTRs (Figure 3.3a, d, g, j). Moreover, the increasing biogas production (Figure 3.2a), the favourable CH₄ content (52 %, Figure 3.2c), and a stable CH₄ yield for the days when the reactors were fed (26.2 ± 7.3 NL kgVS⁻¹, Figure 3.2b) showed that the performance of CSTR2 was not affected by this increasing load in sugar beet pulp. Interestingly, both moderately fed CSTR1 and ABR1 were characterised by similar cumulated biogas production and CH₄ yields (Figure 3.2a,b). Thus the reactor design played little role on the process efficiency when exposing the reactors to a moderate OLR with a solid substrate. For the two reactors exposed to an increasing load, at OLR of 4 kg VS m⁻³ d⁻¹ (day 135) ABR2 produced less biogas than CSTR2 (Figure 3.2a), suggesting that the ABR design used here with 3 compartments of equal size, is less efficient to convert the solid substrate. Surprisingly, at the same time most of the monitored process parameters, including pH, alkalinity, TS, VS, and VFAs contents were not different between each compartment of ABR2 and the CSTR2 (Figure 3.3a, c, d, f, g, i, j, l). The only dissimilar parameter was a higher free-NH₃ content in the first compartment of ABR2 (around 0.04 kg m⁻³) than in CSTR2 (around 0.02 kg m⁻³; Figure 3.3d, f). However, it is unlikely that such a low free-NH₃ content would explain a putative AD process retardation in case of ABR2

(Yenigün and Demirel, 2013). Even though ABRs have been reported to achieve a high reaction rate per unit reactor volume by better retaining the biomass in the reactor in contrast to CSTR (Barber and Stuckey, 1999), in our study, we have shown that for the same reaction volume, CSTRs were better adapted to digest sugar beet pulp than ABRs when exposed to OLR above $4 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

III.3. Performances of CSTRs and ABRs when exposed to new carbon sources (day 163 to day 188)

Towards the end of the experiment, the addition of rapeseed oil on day 163 resulted in a peak of CH_4 yield at day 163 for CSTR1, CSTR2 and ABR1, with 157.0, 230.2 and 144.5 NL of CH_4 produced kg VS^{-1} , respectively, against an initial $26.2 \pm 7.3 \text{ NL kg VS}^{-1}$ when fed exclusively with sugarbeet pulps (Figure 3.2b). For ABR2, no increase in CH_4 yield was detected, suggesting that the microbial community established in this reactor was in principle not adapted to fat digestion. When saccharose started to be added to the different reactors in complement of sugar beet pulp and rapeseed oil at day 174, no differences in terms of CH_4 yield (and in general the biogas production) were pointed out for all the studied reactors (Figure 3.2a, b). However, associated with the already high OLR applied to ABR2, it resulted in a VFAs accumulation and pH drop in ABR2-c1 (Figure 3.3c, l), while these parameters remained unchanged for the two other compartments of the reactor. With regards to CSTR2, the CO_2 content in biogas was higher than CH_4 (data not shown) following the addition of saccharose, pointing towards accelerated hydrolysis and indicating a probable process perturbation (Goux *et al.*, 2015). These observations are not surprising as sugar beet pulp, used to feed the reactor since the beginning of the experimental campaign are composed of complex sugar such as pectin, cellulose and hemicellulose. Thus, saccharose, another carbohydrate, is expected to yield similar biogas quality and production in terms of VS added (Anonymous, 2006).

III.4. Microbial community monitoring

III.4.1. Microbial communities in the inoculum

Results from the high-throughput 16S rRNA gene sequencing are presented at the phylum level for bacteria (Figure 3.4) and at the genus level for archaea (Figure 3.5). The seeding sludge (sample d1) used to inoculate our reactors was characterized by a co-dominance of *Chloroflexi* and *Proteobacteria*, representing together around 20 % of the whole bacterial

community. The *Chloroflexi* phylum was represented mainly by one OTU (OTU_1), belonging to the family *Anaerolinaceae* while *Proteobacteria* was represented by OTU_29 and OTU_78 identified as members of the family *Syntrophaceae* (Annex 2 - Figure S1). Others phyla such as *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, candidate division *WWE1* and *Actinobacteria* constituted between 5 and 15 % of the community. The prevalence of these different bacterial microbes was also underlined in three anaerobic digesters treating municipal sewage sludge in Germany (Abendroth *et al.*, 2015).

Regarding the archaeal community, the genera *Methanosaeta*, *Methanolinea* and *Methanobacterium* accounted for around 70 % of the total community. While a high dominance of *Methanosaeta* and respectively the presence of *Methanolinea* were also representative of the three anaerobic reactors treating sewage sludge studied in Germany (Abendroth *et al.*, 2015), and a mesophilic methanogenic sludge digesting municipal sewage in Japan (Yamamoto *et al.*, 2014), the high presence of *Methanobacterium* in our inoculum was more surprising.

III.4.2. Microbial dynamics at the onset of the experiment (stable feeding with sugar beet pulp - day 1 to day 90)

Already at the beginning of the monitoring, a global decrease of the diversity, evenness and richness of bacterial community was observed in the studied reactors (Annex 2 - Figure S2). Indeed, while for example 948 bacterial non-redundant OTUs were detected at day 1 in the seeding sludge, they were only 568, 521, 804 and 809 detected at day 90 for CSTR1, CSTR2, ABR1 and ABR2, respectively. Similarly, in the case of reactors fed with protein-rich substrate, a greater functional complexity was also described in the inoculum compared to the sludge taken from the reactors at the later stages of its operation (Solli *et al.*, 2014). In our study the shift from a complex substrate such as waste activated sludge to sugar beet pulp used as mono-substrate, resulted also in the selection of a few bacterial organisms, putatively best adapted to the degradation of this mono substrate.

In the CSTRs, the bacterial community structure and composition at the phylum level remained relatively stable during the time that they were fed with a moderate amount of sugar beet pulp (from day 1 until day 90, Figure 3.4a, b). On the contrary, changes were pointed out inside the archaeal community at the genus level (Figure 3.5a, b).

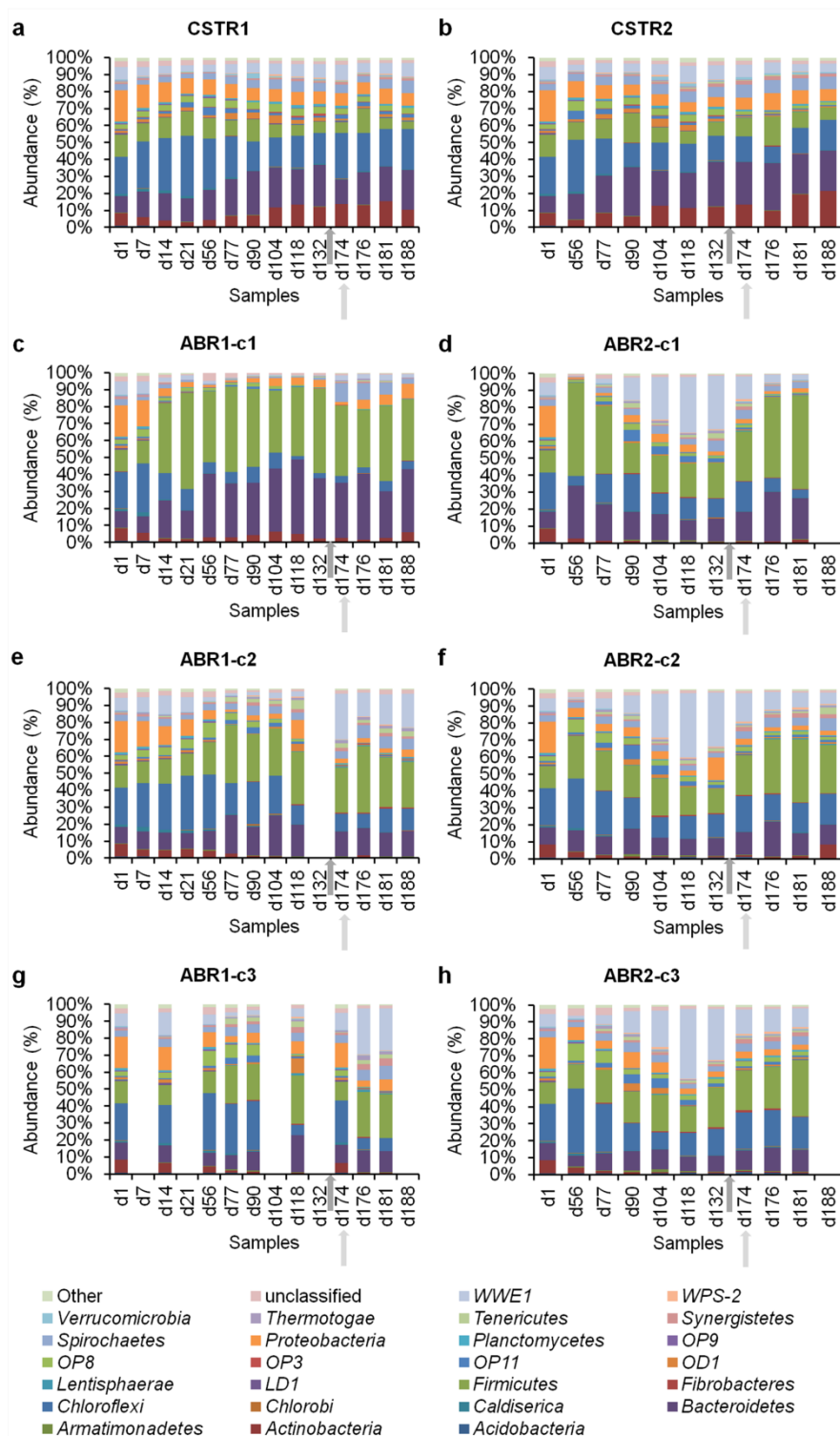


Figure 3.4 - Bacterial community dynamics in the studied reactors during the experimental campaign

Results are presented at the phylum level; CSTR1 (a) and ABR1 (c, e, g) are the moderately fed reactors; CSTR2 (b) and ABR2 (d, f, h) are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *dark grey arrow* indicates the first day with rapeseed oil added as substrate; the *light grey arrow* indicates the first day with sugar added as substrate; gaps were due to amplicon sequencing problems.

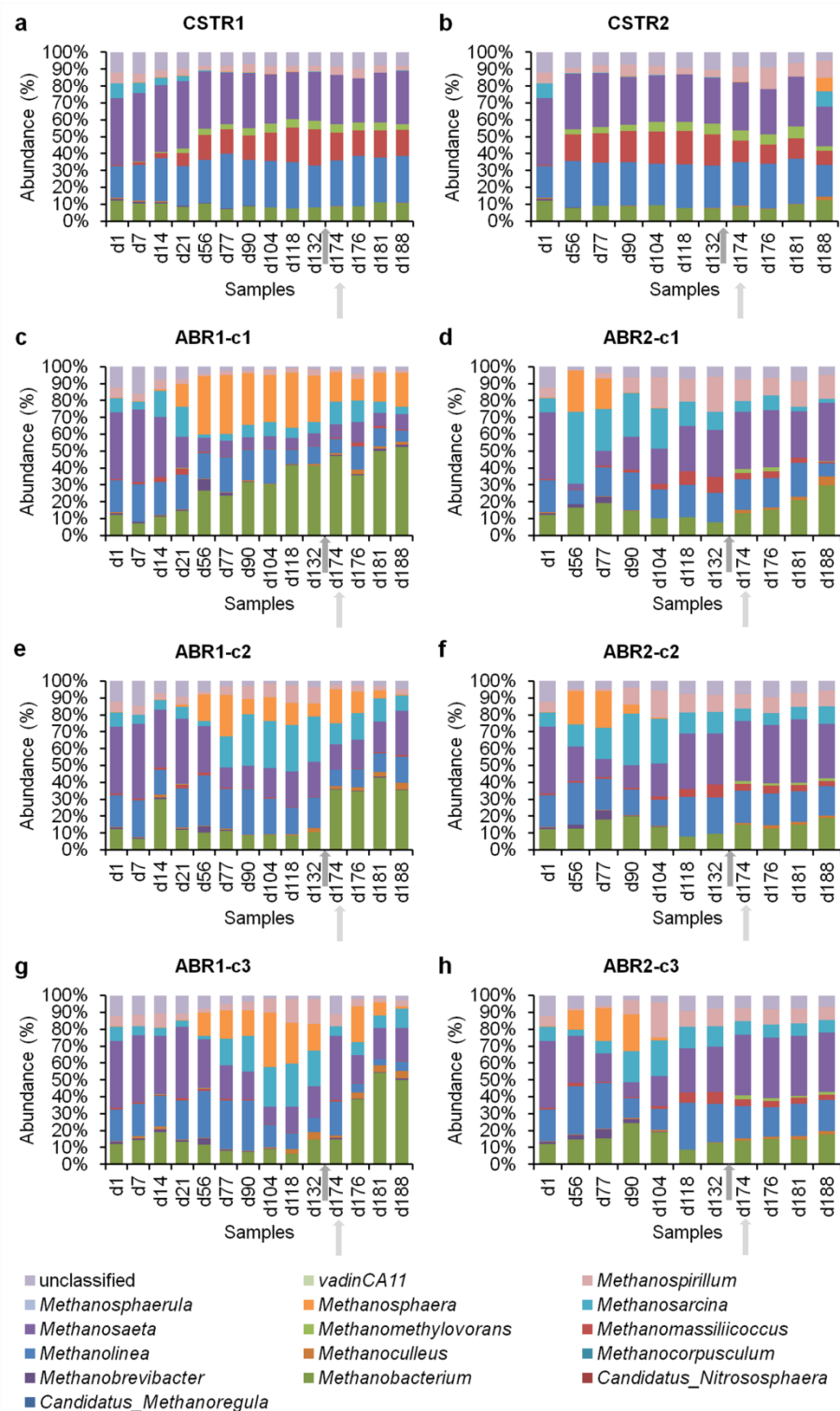


Figure 3.5 - Archaeal community dynamics in the studied reactors during the experimental campaign

Results are presented at the genus level: CSTR1 (a) and ABR1 (c, e, g) are the moderately fed reactors; CSTR2 (b) and ABR2 (d, f, h) are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *dark grey arrow* indicates the first day with rapeseed oil added as substrate; the *light grey arrow* indicates the first day with sugar added as substrate; gaps were due to amplicon sequencing problems.

Methanosarcina, an acetotrophic and hydrogenotrophic archaea (De Vrieze *et al.*, 2012), often found in AD environments with high acetate concentration (Li *et al.*, 2014), gradually disappeared in both CSTR between day 1 and day 77 while at the same time acetate remained low in these reactors (Figure 3.3j). Between day 1 and day 56, the genera *Methanomassiliicoccus* and *Methanomethylovorans* started to emerge (Figure 3.5a, b). However, regarding the dominant genera, *Methanosaeta* and *Methanolinea*, no changes over time in terms of abundance were detected. According to the presence of these different archaeal genera, we assumed that methane was produced in CSTRs by both acetotrophic (*Methanosaeta*, (van Haandel *et al.*, 2014)) and hydrogenotrophic (*Methanolinea* and *Methanomassiliicoccus* (Dridi *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2014) pathways.

A much more complex picture was observed for the ABRs. Microbial communities of the two ABRs differed from that of the CSTRs and differences in the microbial community structure and composition were noticed between compartments of the ABRs both for bacteria and archaea (Figure 3.4, 3.5, and Annex 2 - Figure S1). At the phylum level, the major difference between bacterial communities of both ABRs was a higher abundance of organisms belonging to the candidate division *WWE1* in ABR2 than in ABR1. *WWE1* members have recently been reported to be implicated in the anaerobic digestion of cellulose (Limam *et al.*, 2014), one of the major compounds of sugar beet pulp (Adam *et al.*, 2013). With regards to archaeal community, while the abundance levels of *Methanosphaera* and *Methanosaeta* respectively increased and decrease in the 1st compartment of ABR2 with the decreasing pH and the increasing acetate concentration in the sludge, as soon as the pH was back to neutrality, their abundance levels decreased and increased respectively (Figure 3.5d). In ABR1-c1, characterized by a low pH mostly due to high acetate concentration, *Methanosphaera* represented around 30 % of the archaeal community at day 90, while *Methanosaeta* unfavoured by high acetate concentration (Li *et al.*, 2014), accounted for only around 5 %. Therefore its dynamics over time according to the fluctuating acetate concentration is not surprising in our reactors. However, the difference in terms of process efficiency and microbial community structure between both ABRs (especially marked for the 1st compartments) is surprising, as the conditions applied to both ABRs were similar and no variations could be underlined at the same time for the studied CSTRs. We assumed that the highly selective conditions applied in the 1st compartment receiving the full quantity of substrate for both ABRs was the reason of community variance appearance. Indeed, in case of similar conditions, but under increasing strength of selection, our previous results showed that distinct microbes could establish in replicated anaerobic reactors (Goux *et al.*, 2015).

Interestingly, each ABR compartment was also characterized by different richness at day 90. In general, the 2nd compartments (ABR1-c2 and ABR2-c2) had communities characterized by a higher bacterial richness, 578 and 627 OTUs for ABR1 and ABR2, respectively, than the 1st (328 and 529 OTUs, respectively) and 3rd compartments (515 and 584 OTUs, respectively). Similar results were observed in terms of bacterial community diversity and evenness (Annex 2 - Figure S2d, e). This observation was most probably related to the diversity of functions performed by the different microbial communities located in the different compartments of ABRs. While, in the 2nd compartment all AD stages were active (from hydrolysis to methanogenesis), as both CH₄ and CO₂ were produced in a 60:40 % ratio, the two other compartments were more focused on only one stage of the process. The 1st compartments contribute mainly to hydrolysis-acidogenesis and had the highest CO₂ content (75 %) in the produced biogas under low pH. The transition from acido- and acetogenesis to methanogenesis was the main contribution of the 3rd compartments that had the highest CH₄ content (70 %) in its gas production (Figure 3.2e-j). Logically, to cope with the higher assortment of functions, the diversity of bacteria would also be expected to be higher in the 2nd compartments than in the first and last ones.

III.4.3. Microbial dynamics under increasing OLR and substrate change (day 91 to day 188)

Over the rest of the experiment, differences in terms of bacterial community structure at the phylum level remained insignificant between both CSTRs, independently of the OLR and the feeding substrate applied (Figure 3.4a, b; Annex 2 - Figure S2a-c). Bacterial community remained indeed dominated by the same phyla already prevalent at day 1. Nevertheless, at the OTU level (Annex 2 - Figure S1a, b), differences could be underlined between CSTR1 and CSTR2 inside the *Bacteroidetes* phylum, with a higher dominance from day 174 to the end of the monitoring of OTU_23 in CSTR2 assigned to an unclassified organism of the *Bacteroidales* order. This organism represented more than 10 % of the community when rapeseed oil and sugar were used as substrates and we assume that these two substrates associated with the high OLR applied to this reactor promote its establishment. However, as this bacterium was not characterized yet, we can not speculate on its putative function and role in the AD process. The absence of significant spatial separation (p -value > 0.05) between samples from CSTR1 and CSTR2 on the NMDS plot (Figure 3.6a) showed that the increasing OLR had no major influence on the bacterial community structure during our

study. By contrast, a significant difference (p -value < 0.05) could be seen between the archaeal populations thriving in CSTRs (Figure 3.6b). This result could be expected as archaea are less diverse, metabolically slower and less resilient to stress than bacteria (Ali Shah *et al.*, 2014) and are thus more susceptible to environmental instability (Carballa *et al.*, 2015).

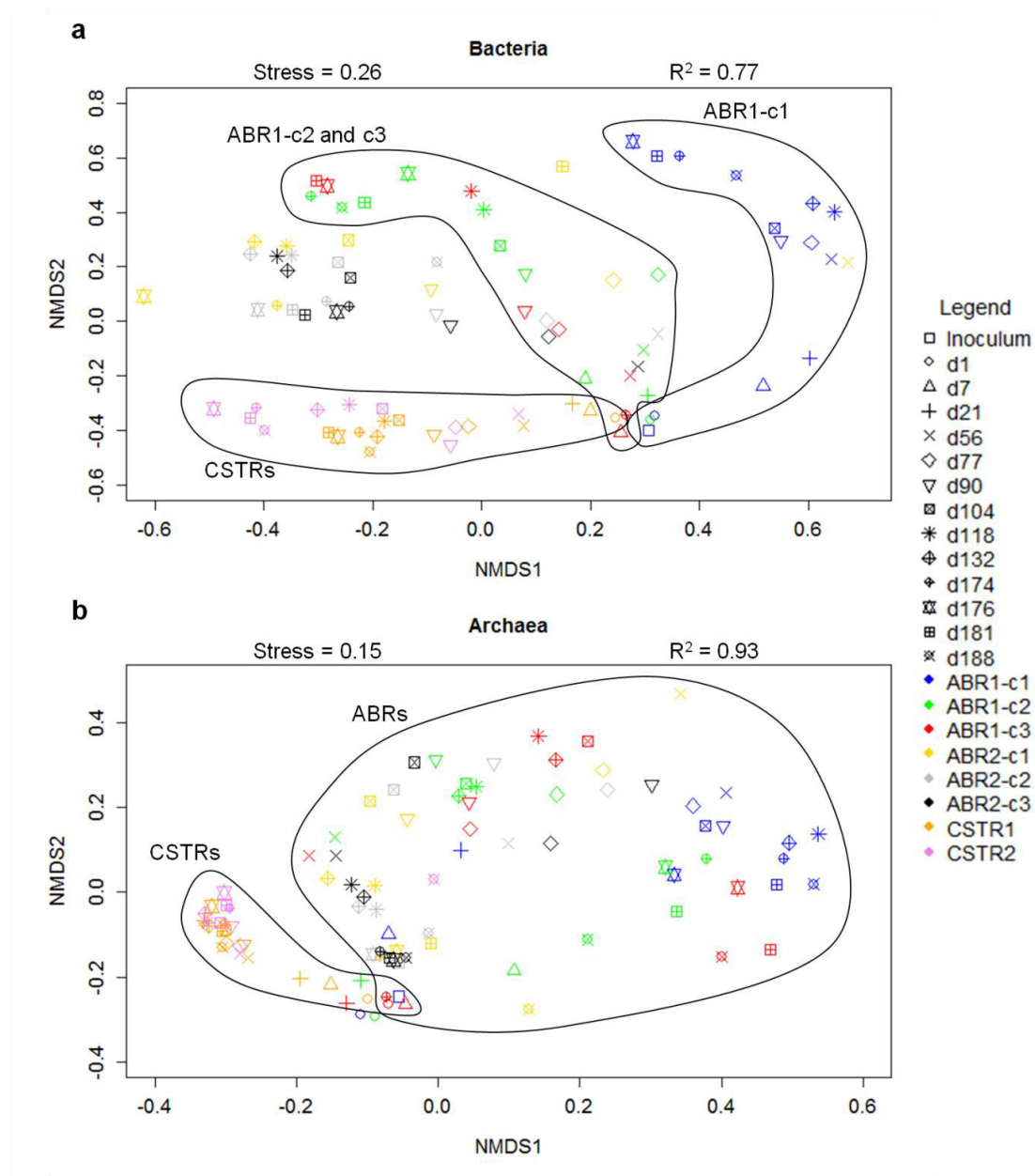


Figure 3.6 - Non-metric multidimensional scaling ordination diagrams of temporal variations in bacterial and archaeal community structures

The ordination is based on Bray-Curtis dissimilarity matrices of the relative abundance of the bacterial (a) and archaeal (b) communities; CSTR1 and ABR1 are the moderately fed reactors; CSTR2 and ABR2 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *black circles* indicate the major sample groups defined on statistical differences (p -value < 0.05).

The major difference between both CSTRs resides in a higher archaeal diversity and evenness in CSTR2 than CSTR1 at day 188 (Annex 2 - Figure S3a, b). At the same time, the genus *Methanosphaera* started to be detected in CSTR2 (Figure 3.5b). These changes in the CSTR exposed to increasing OLR were probably the consequences of the increasing quantity of sugar beet pulp and saccharose used as substrate (Figure 3.1d).

Again for this period, ABRs are distinguished clearly from CSTR in their response to an increased and modified OLR. Indeed, the trend of a higher presence of the bacterial candidate division *WWE1* organisms in ABR2 than ABR1 at the beginning of the monitoring was enhanced during this final period (Figure 3.4c-h). Similarly, while *Methanosphaera* was not anymore detected in ABR2 from day 104, this archaeal genus was still highly present in ABR1, and represented from day 104 to day 188 between 20 and 30 % of the whole archaeal community in the 1st compartment, and around 10-20 % in the 2nd and 3rd compartments (Figure 3.5c-h). Statistically, each ABR developed distinct bacterial and archaeal communities, as the Bray-Curtis distances between the communities from each compartment were different (p -values < 0.01) for ABR1 and ABR2 (Figure 3.6). Furthermore, the harsh acidic conditions in ABR1-c1 resulted in significant bacterial and archaeal community differences between this compartment and the two others, as shown by the AMOVA analysis based on the NMDS results (p -value < 0.001 for the bacterial community and p -value < 0.05 for the archaeal one). By contrast, no significant spatial separation on the NMDS plot could be shown between the different ABR2 compartments, suggesting similar archaeal communities inside the different compartments of the studied reactor (Figure 3.6b). However, for the bacterial community of ABR2, only a significant spatial difference between the 1st and the 3rd compartments could be pointed out on the NMDS plot (p -value < 0.05), but not with samples from the second one. These observations seem to indicate that an acidic pH maintained in the first compartment influenced the establishment of distinct microbial communities in the last two other compartments (c2 and c3), characterized by a neutral pH.

Finally, CSTRs were globally characterized by a higher presence of organisms belonging to the bacterial *Actinobacteria* phylum and the archaeal *Methanomasiliicoccus* genus, and a lower presence of the bacterial *Firmicutes* phylum and archaeal *Methanosarcina* genus members, than ABRs (Figure 3.4 and 3.5). Thus, these results indicate that the reactor design influenced the establishment of the microbes involved in the AD process as ABRs and CSTRs differed over time in terms of microbial community structure in spite the same inoculum was used to seed all reactors. This observation was indeed supported by the AMOVA analyses, which evidenced that the Bray-Curtis distances of both bacterial and

archaeal communities from each ABR compartment were different (p -value < 0.001) from the communities that established in both CSTRs, as it could be assumed with the NMDS plots (Figure 3.6). However, as little is known about the key players of anaerobiosis, further metagenomic and metatranscriptomic analyses of the microbial communities established in each type of reactor and each ABR compartment are needed to generate valuable information about the putative functions performed by these different microbes.

Conclusion

Segmenting the AD process in different stages did not necessarily result in an improved biogas process. Our results suggested little influence of the reactor design, CSTR *versus* ABR, on the process efficiency and its driving microbiome when reactors are exposed to OLR up to 2 kg VS m⁻³. However, for OLR above 4 kg VS m⁻³, the reactor design had a marked impact on (1) the process efficiency at converting solid substrates into biogas and methane, and (2) the anaerobic microbial consortia realizing this conversion. High selective pressure on the microbiome was evidence in the ABR type.

References

Abendroth, C., Vilanova, C., Günther, T., Luschnig, O., and Porcar, M. (2015) Eubacteria and Archaea communities in seven mesophilic anaerobic digester plants in Germany. *Biotechnology for Biofuels* **8:87**: doi: 10.1186/s13068-015-0271-6.

Adam, G., Lemaigre, S., Romain, A.C., Nicolas, J., and Delfosse, P. (2013) Evaluation of an electronic nose for the early detection of organic overload of anaerobic digesters. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **36**: 23-33.

Advisory group on energy and climate change (2010). Energy for a Sustainable Future - Summary Report and Recommendations. <http://www.un.org/chinese/millenniumgoals/pdf/AGECCsummaryreport%5B1%5D.pdf>.

Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., and Ahmad Asad, S. (2014) Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal* **2014**: 21 pages-<http://dx.doi.org/10.1155/2014/183752>.

Anonymous (2006) *VDI 4630 - Vergärung organischer stoffe (german guideline: fermentation of organic materials - characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests)*. Beuth Verlag GmbH edn, Berlin.

Barber, W.P. and Stuckey, D.C. (1999) The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: a review. *Water Research* **33**: 1559-1578.

Bray, J.R. and Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**: 325-349.

- Carballa, M., Regueiro, L., and Lema, J.M. (2015) Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology* **33**: 103-111.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., and Verstraete, W. (2012) Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* **112**: 1-9.
- Dridi, B., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Raoult, D., and Drancourt, M. (2012) Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human feces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**: 1902-1907.
- Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.
- Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., and Thurston, R.V. (1975) Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **32**: 2379-2383.
- Gerardi, M.H. (2003) *The microbiology of anaerobic digesters*. 1st ed. Somerset NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T. *et al.* (2015) Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for Biofuels* **8**:122: doi: 10.1186/s13068-015-0309-9.
- Kim, M., Gomec, C.Y., Ahn, Y., and Speece, R.E. (2003) Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Environmental Technology* **24**: 1183-1190.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41**: e1. doi: 10.1093/nar/gks808.
- Körner, S., Das, S.K., Veenstra, S., and Vermaat, J.E. (2001) The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to Lemna gibba. *Aquatic Botany* **71**: 71-78.
- Li, Y.F., Chen, P.H., and Yu, Z. (2014) Spatial and temporal variations of microbial community in a mixed plug-flow loop reactor fed with dairy manure. *Microbial Biotechnology* **7**: 332-346.
- Limam, R.D., Chouari, R., Mazéas, L., Wu, T.D., Li, T., Grossin-Debattista, J. *et al.* (2014) Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. *MicrobiologyOpen* **3**: 157-167.
- Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., and Ng, W.J. (2015) Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems – Performance and microbial community dynamics. *Chemosphere* **140**: 54-62.

Mayer, F., Gerin, P.A., Noo, A., Foucart, G., Flammang, J., Lemaigre, S. *et al.* (2014) Assessment of factors influencing the biomethane yield of maize silages. *Bioresource Technology* **153**: 260-268.

Muller, E.L.E., Heintz-Buschart, A., Roume, H., Lebrun, L., and Wilmes, P. (2014) The sequential isolation of metabolites, RNA, DNA, and proteins from a single, undivided mixed microbial community sample. *Protocol exchange* doi:10.1038/protex.2014.051.

Pain, B.F. and Hephherd, R.Q. (1985) Anaerobic digestion of livestock wastes. In *Anaerobic digestion of farm wastes. NIRD Technical Bulletins*. Pain, B. F. and Hephherd, R. Q. (eds), 9-14.

Pielou, E.C. (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* **13**: 131-144.

Pirsaheb, M., Rostamifar, M., Mansouri, A.M., Zinatizadeh, A.A.L., and Sharafi, K. (2015) Performance of an anaerobic baffled reactor (ABR) treating high strength baker's yeast manufacturing wastewater. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **47**: 137-148.

Pohland, F.G. and Ghosh, S. (1971) Developments in Anaerobic Stabilization of Organic Wastes - The Two-Phase Concept. *Environmental Letters* **1**: 255-266.

Roume, H., Muller, E.L.E., Cordes, T., Renaut, J., Hiller, K., and Wilmes, P. (2012) A biomolecular isolation framework for eco-systems biology. *The ISME Journal* **7**: 121.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. *et al.* (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537-7541.

Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.

Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.

Solli, L., Havelsrud, O., Horn, S., and Rike, A. (2014) A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnology for Biofuels* **7**: 146-doi: 10.1186/s13068-014-0146-2.

van Haandel, A., De Vrieze, J., Verstraete, W., and dos Santos, V.S. (2014) Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **89**: 1751-1759.

Vanwonderghem, I., Jensen, P.D., Rabaey, K., and Tyson, G.W. (2015) Temperature and solids retention time control microbial population dynamics and volatile fatty acid production in replicated anaerobic digesters. *Scientific Reports* **5**: doi: 10.1038/srep08496.

Wang, J., Huang, Y., and Zhao, X. (2004a) Performance and characteristics of an anaerobic baffled reactor. *Bioresource Technology* **93**: 205-208.

Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., and Jones, D.L. (2008) Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* **99**: 7928-7940.

Yamamoto, K., Tamaki, H., Cadillo-Quiroz, H., Imachi, H., Kyrpides, N., Woyke, T. *et al.* (2014) Complete genome sequence of *Methanolinea tarda* NOBI-1(T), a hydrogenotrophic methanogen isolated from methanogenic digester sludge. *Genome Announcements* **2**: e00876-14.

Yenigün, O. and Demirel, B. (2013) Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry* **48**: 901-911.

Yiridoe, E.K., Gordon, R., and Brown, B.B. (2009) Nonmarket cobenefits and economic feasibility of on-farm biogas energy production. *Energy Policy* **37**: 1170-1179.

Yu, H.Q. and Fang, H.H.P. (2002) Acidogenesis of dairy wastewater at various pH levels. *Water Science & Technology* **45**: 201-206.

Points marquants de l'étude :

- Les performances et la dynamique des communautés microbiennes de deux digesteurs de type CSTR et ABR ont été comparés.
- Le type de digesteur n'influence que très peu l'efficacité du processus de digestion anaérobie lorsque celui est exposé à un taux de charge organique modéré de substrat solide.
- Les digesteurs de type CSTR semblent être mieux adaptés que les digesteurs de type ABR à la digestion d'un taux de charge organique élevé de substrat solide.
- Chaque type de digesteur a développé sa propre communauté microbienne au cours du temps alors que l'inoculum était similaire.
- Des communautés microbiennes distinctes se sont développées dans chaque digesteur de type ABR ainsi que dans chacun de leur compartiment.
- Une dominance de la division candidate *WWE1* ainsi qu'une réduction de l'abondance du genre *Methanosphaera* ont pu être reliées à l'augmentation de pH dans le premier compartiment des ABRs.

Chapitre 4. Phase de démarrage d'un digesteur anaérobie agricole : comment les communautés microbiennes méthanogènes évoluent en fonction de l'apparition des conditions anaérobies mésophiles ?

Après avoir suivi la dynamique des communautés microbiennes de digesteurs anaérobies de laboratoire, nous nous sommes intéressés aux communautés bactériennes, archées et eucaryotes d'un digesteur de ferme de taille industrielle. Ainsi, nous avons suivi au cours du temps, l'installation des communautés microbiennes anaérobies au cours de la phase de démarrage de ce digesteur de ferme, *i.e.* lors de l'apparition des conditions anaérobies mésophiles au sein du digesteur.

Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor - How does the methanogenic microbial community cope with the appearance of mesophilic anaerobic conditions?

Xavier Goux, Magdalena Calusinska, Marie Fossépré, Emile Benizri and Philippe Delfosse

En préparation en vue d'une soumission pour publication à la revue « Bioresource Technology ».

Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor - How does the methanogenic microbial community cope with the appearance of mesophilic anaerobic conditions?

Abstract

The goal of this study was to investigate how the microbial community structure establishes during the start-up phase of a full-scale farm anaerobic reactor inoculated with stale and cold cattle slurry. The 16S/18S high-throughput amplicon sequencing results showed an increase of the bacterial, archaeal and eukaryotic diversity, evenness and richness during the setting up of the mesophilic anaerobic conditions. When a steady performing digestion process was reached, the microbial diversity, evenness and richness decreased, indicating the installation of a few dominant microbial populations, best adapted to biogas production. Interestingly, among the environmental parameters, the temperature, alkalinity, free-NH₃, total solids and O₂ content were found to be the main drivers of microbial dynamics. Interactions between eukaryotes, characterized by a high number of unknown organisms, and the bacterial and archaeal communities were also evidenced, suggesting that eukaryotes might play important roles in the anaerobic digestion process.

Keywords

Anaerobic digestion, full-scale farm reactor, microbial ecology, start-up phase, 16S/18S high-throughput amplicon sequencing

I. Introduction

In view of a holistic approach towards organic waste management, renewable energy production, environment conservation and nutrients recovery, an increasing number of farmers invest in anaerobic treatment of organic leftovers available on their farms such as wastewater, manure, animal slurries, and crop residues.

Anaerobic digestion (AD, syn. biomethanation) of biomass is regarded as a promising source of green energy because it also generates additional environmental benefits to the society, *e.g.* reduction of greenhouse gas emissions, nutrients recovery, and organic soil conditioners. Indeed, the digestion residue, called digestate, is used in agriculture as nutrient-rich fertilizer and/or organic amendment. Furthermore, the AD process generates other non-profit benefits such as odour reduction (Pain *et al.*, 1990), inactivation of microbial pathogens, and weed seeds inactivation (Engeli *et al.*, 1993; Yiridoe *et al.*, 2009).

The AD process involves different microbial groups that interact together in the absence of oxygen to decompose organic matter into biogas, which is a mixture of methane (CH₄), carbon dioxide (CO₂) and trace gases such as hydrogen sulphide (H₂S), ammoniac (NH₃) and hydrogen (H₂). Biogas can be valorised in a combined heat and power (CHP) unit to produce electricity and heat. Alternatively, biogas can be upgraded to biomethane that reach the purity of natural gas and be injected into the municipal gas grid or be used as transport fuel. The AD process is divided into four main stages (hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis), each involving different microbial communities (Weiland, 2010). These microbial groups are in perpetual interactions and the complexity of their associations and functioning is far from being well understood (Carballa *et al.*, 2015). Moreover, according to some authors, the performance of an AD reactor is closely linked to the structure and dynamics of its microbial community (Demirel and Scherer, 2008). For this purpose, the start-up phase of an anaerobic reactor, aiming at developing an active microbial biomass that reaches a satisfactory treatment performance (Escudié *et al.*, 2011), is considered as a critical point (Ike *et al.*, 2010). Especially methanogenic archaea are considered a rate-limiting key-players of the AD process due to their slow growth rates and high sensitivity to different environmental conditions (Weiland, 2010). Moreover, process inhibition can be quickly encountered due to an imbalance between VFAs and CH₄ precursors-producing bacteria and methanogenic archaea producing CH₄ (Ahring *et al.*, 1995). Knowledge on the dynamics of microbial communities is required to prevent process imbalance, to better understand

performance and stability of a reactor, but also to shorten the start-up phase of a new reactor and thus to improve the economic competitiveness of the AD process.

Even though the start-up phase of anaerobic reactors has been studied for lab-scale reactors (Ziganshina *et al.*, 2014; Goberna *et al.*, 2015), only a few studies have dealt with the microbial community dynamics at this stage in full-scale biogas units. Furthermore, none of these studies used the high-throughput sequencing approach to characterize the microbial populations, and to our best knowledge, the studied reactors were all inoculated with warm and acclimated sludge coming from another running reactor, such as a secondary anaerobic digester (Angenent *et al.*, 2002), or thermophilic and mesophilic reactors from cow and pig manure-treating plants (Ike *et al.*, 2010).

In the present study, we monitored the performance and dynamics of microbial consortia, including small anaerobic eukaryotes, during the start-up phase of a full-scale farm AD reactor inoculated with psychrophilic non-anaerobic materials, and the progressive warming and establishment of anaerobic conditions till full operational status was reached.

II. Methods

II.1. Full-scale farm reactor design and operation

The construction of a farm anaerobic reactor of around 500 m³ working volume, located in the Northeast France, was completed at the end of 2013. The reactor is a completely stirred tank reactor type and consists of a concrete tank of 12 m in diameter and 5 m high. It is equipped with a heating system to maintain the mesophilic temperature range (defined as 37-42 °C in this study, temperature commonly used in AD) and a mixer (Figure 4.1).

Even though the seeding microorganisms and the inoculum size are considered important factors for the start-up of an AD process (Ike *et al.*, 2010), due to the lack of an adequate inoculum, the reactor was initially partly filled with 250 m³ of a mixture of run-off water collected on the farm premises and courtyard and cattle slurry available on the farm, and previously stored for a few months in an outdoor open storage tank. Following the reactor filling, the heating system was initiated with the heat provided by the combined heat and power unit (CHP) operating with propane. During 30 days, the reactor was regularly filled with a mix of run-off water, cattle slurry and manure to initiate the digestion process (Annex 3 - Figure S1). Following this period, feeding was carefully initiated with plant biomass, including grass, immature rye and maize silages, hay, straw, grass and animal effluents, such as solid meat- and dairy-cattle manure and slurry available on the farm. Additional details on

the input materials and loading rate (LR) are specified in Annex 3 - Figure S1. Over a period lasting 152 days, the sludge temperature increased progressively inside the anaerobic reactor from 5.6 °C to around 42 °C, which was the final temperature desired by the plant owner.

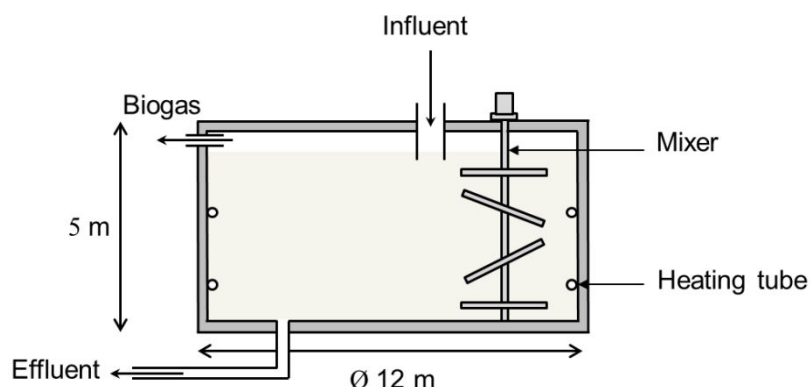


Figure 4.1 - Schematic of the full-scale anaerobic reactor

II.2. Samples collection and metabolic parameters analysed

Establishment of anaerobic conditions inside the reactor during the start-up phase was monitored during 175 days. For this purpose, a sludge volume of around 1 L was collected following a thorough reactor mixing. The first sampling was done on the day the heating was initiated (day 1). During the study time, a total of 12 sludge samples were collected at day 1, 6, 14, 21, 30, 35, 42, 57, 70, 96, 152 and 175 and named hereinafter from d1 to d175 in the figures. For each sludge sample, different aliquots were frozen on-site in liquid nitrogen. Back to the lab, aliquots of 200 μL were preserved at -80 °C prior the DNA extraction while aliquots of around 15 mL were stored at -20 °C prior the VFAs concentration measurements. The remaining unfrozen sludge was used to measure the pH, total solids (TS, %) and volatile solids (VS, %) contents, total alkalinity ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), and ammonium-nitrogen concentration ($\text{kg NH}_4\text{-N m}^{-3}$), as described in Goux *et al.* (2015). In accordance to Emerson *et al.* (1975) and Körner *et al.* (2001) the free ammonia content (free- NH_3 , kg m^{-3} of sludge) was calculated, taking into account the temperature, pH, and the measured $\text{NH}_4\text{-N}$ content of the sludge in the reactor at the moment of sampling. The detailed protocol for the VFAs concentration (mg kg^{-1}) measurement is as described in Goux *et al.* (2015). Total VFAs concentration was expressed in terms of the sum of measured acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovalerate, valerate and caproate concentrations. The estimated methane production ($\text{m}^3 \text{ CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ reactor day}^{-1}$) was calculated starting from day 54 (*i.e.* when the produced biogas started to be used in the CHP unit to generate heat and electricity), based on an energy content of methane of 35 MJ m^{-3} and the monthly amount of electricity produced by the

plant, and the CHP unit electrical efficiency as stated by the manufacturer (38.75 %). The biogas composition inside the reactor (CH₄, CO₂, O₂ (%), H₂S (ppm)) was monitored using a Multitec[®] 540 apparatus (Hermann Sewerin GmbH, Gütersloh, DE).

II.3. DNA extraction, 16S/18S rRNA amplicon libraries preparation and high-throughput sequencing

Altogether, bacteria, archaea and eukaryotes were targeted. The DNA extraction of the 12 collected samples was performed with the PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the extracted DNA were assessed using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and an electrophoresis migration on a 1 % agarose gel. Modified primer pair S-D-Bact-0909-a-S-18 (5'-ACT CAA AKG AAT WGA CGG-3') and S-*-Univ-1392-a-A-15 (5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3'), targeting around 484 bp of bacterial V6-V8 region of the 16S rRNA gene, and an archaeal 16S rRNA gene-specific primer pair S-D-Arch-0519a-S-15 (5'-CAG CMG CCG CGG TAA-3') and S-D-Arch-1041-a-A-18 (5'-GGC CAT GCA CCW CCT CTC-3') targeting a fragment of V4-V6 region of around 526 bp, were selected after the study of Klindworth *et al.* (2013). Eukaryotic primer pair Ek7F (5'-ACC TGG TTG ATC CTG CCA G-3') and EK516R (5'-ACC AGA CTT GCC CTC C-3'), targeting an 18S rRNA V1-V5 fragment of around 509 bp was selected according to Santos *et al.* (2010). As modification, the Nextera XT[®] transposase sequence (Illumina Inc., San Diego, USA) was included in the 5' end of the forward and reverse primer and additional four N (*i.e.* four random nucleotides) were added in the forward primer to increase the nucleotide diversity (Bartram *et al.*, 2011). Amplicons were generated using the Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), were purified with the AMPure magnetic beads (Agencourt, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) and quantified with the Qubit[®] dsDNA HS assay kit (Life technologies, Carlsbad, USA). Purified amplicons were diluted to the concentration of 1 ng μl^{-1} , and the Nextera XT[®] barcodes and the Illumina adapters necessary for hybridization to the flow cell, were added to each amplicon during the cycle-limited PCR using the Nextera XT Index kit. Purification of the resulting PCR products was carried out with the AMPure magnetic beads (Agencourt). Obtained and purified libraries were then pooled in equimolar concentrations, and the final concentration of the library pool was determined with the KAPA SYBR[®] FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA). Libraries were mixed with Illumina-

generated PhiX gDNA control libraries (5 %) and sequenced on the Illumina MiSeq system with the MiSeq Reagent Kit V3-600 cycles.

II.4. Data analysis

The CLC Genomics Workbench 7 and Usearch (v7.0.1090_win64) (Edgar, 2010) software were used to de-multiplex, quality trim and assign the obtained sequence reads to operational taxonomic units (OTUs) at 97 % of similarity. For Eukaryotes, only the forward read was used for further analysis as the final amplicon length exceeded the calculated *in silico* 509 bp, what prevented an efficient forward and reverse read assembly, due to either too small or not existing sequence overlap. Taxonomic classification was done using the Greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/>) and the resulting nucleotides sequences were deposited in GenBank database under accession numbers KT251256 to KT252397 for bacteria, KT252398 to KT252430 for archaea and KT386389 to KT386961 for eukaryotes. Based on the high-throughput sequencing results, richness (numbers of OTUs), Shannon-Weaver (H') (Shannon, 1948), Simpson (D) (Simpson, 1949), Pielou (J) (Pielou, 1966), Sørensen (Sørensen, 1948) and Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957) indices were calculated to evaluate respectively the diversity (H' and D), evenness (J) and the dissimilarity in terms of membership (Sørensen) and community structure (Bray-Curtis) between the microbial communities at different time-points.

The influence of the environmental parameters on bacterial, archaeal and eukaryotic community dynamics (H' , D , J and R , as well as the ten most abundant OTUs of each domain) was analysed using Spearman's rank correlations. Spearman's rank correlation coefficient and their corresponding p -values (considered statistically significant if below 0.05) were calculated using R (Version 3.1.2) (Core Team, 2008).

III. Results and discussion

III.1. Reactor performance during the start-up phase

The temperature inside the reactor reached 37 °C at day 42 (Figure 4.2c). Following the temperature increase and due to the feeding regime rich in manure and immature rye silage (Annex 3 - Figure S1), the concentration of CH₄ and CO₂ in the reactor headspace increased and stabilised after day 42 (Figure 4.2b). In relation to the increasing production of biogas, the O₂ concentration decreased from around 18 % at day 1 to less than 3 % at day 42. Thus,

mesophilic anaerobic conditions were considered to be reached inside the studied reactor at day 42.

All along the monitoring of the farm reactor, the pH fluctuated between 7.3 and 8.0, and the total VFAs content in the sludge remained low, with less than 450 mg kg^{-1} of sludge (Figure 4.2c, f). Acetate was the dominant VFA and represented on average more than $90 \% \pm 12$ of the total VFAs. Propionate, which is commonly used as an indicator of process perturbation (Marchaim and Krause, 1993), never exceeded a concentration of 68 mg kg^{-1} of sludge. In the studied reactor during the start-up phase, propionate and other longer VFAs were gradually and effectively consumed by the establishing microbial community.

During the monitoring phase, increasing alkalinity from around 4,400 at day 1 to more than $16,000 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ at day 175 (Figure 4.2e), was related to the incorporation of manure as input material starting from day 21 (Annex 3 - Figure S1). Even though manure is rich in recalcitrant lignocellulose, it is considered as an excellent co-substrate for co-digestion as it is characterized by a high buffering capacity (Goberna *et al.*, 2015). Further increase in sludge alkalinity could be partially explained by the new feeding regime rich in various plant biomasses (Annex 3 - Figure S1) initiated at day 31. Feeding the reactor with solid substrates resulted in an increase of the TS and VS content from respectively around 1.0 and 42.0 % at day 1 to around 13.0 and 64.0 % at day 175 (Figure 4.2d).

Based on the monthly amounts of electricity produced from day 54 when propane was replaced by the produced biogas to feed the CHP unit, the estimated methane production showed a steady increase (Figure 4.2a). Around $0.13 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ reactor day}^{-1}$ was produced by the biogas unit between days 54 and 62, $0.30 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ reactor day}^{-1}$ between days 63 and 92, and finally 0.53 and $0.57 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ reactor day}^{-1}$ between days 93 and 123, and days 124 and 153, respectively. These values showed that in around 120 days the reactor reached a good CH_4 productivity level which is similar to values quoted in the literature for a CSTR fed with cattle manure (Sakar *et al.*, 2009). As a conclusion, our results showed that a mesophilic AD process can be efficiently initiated from psychrophilic stale seeding material.

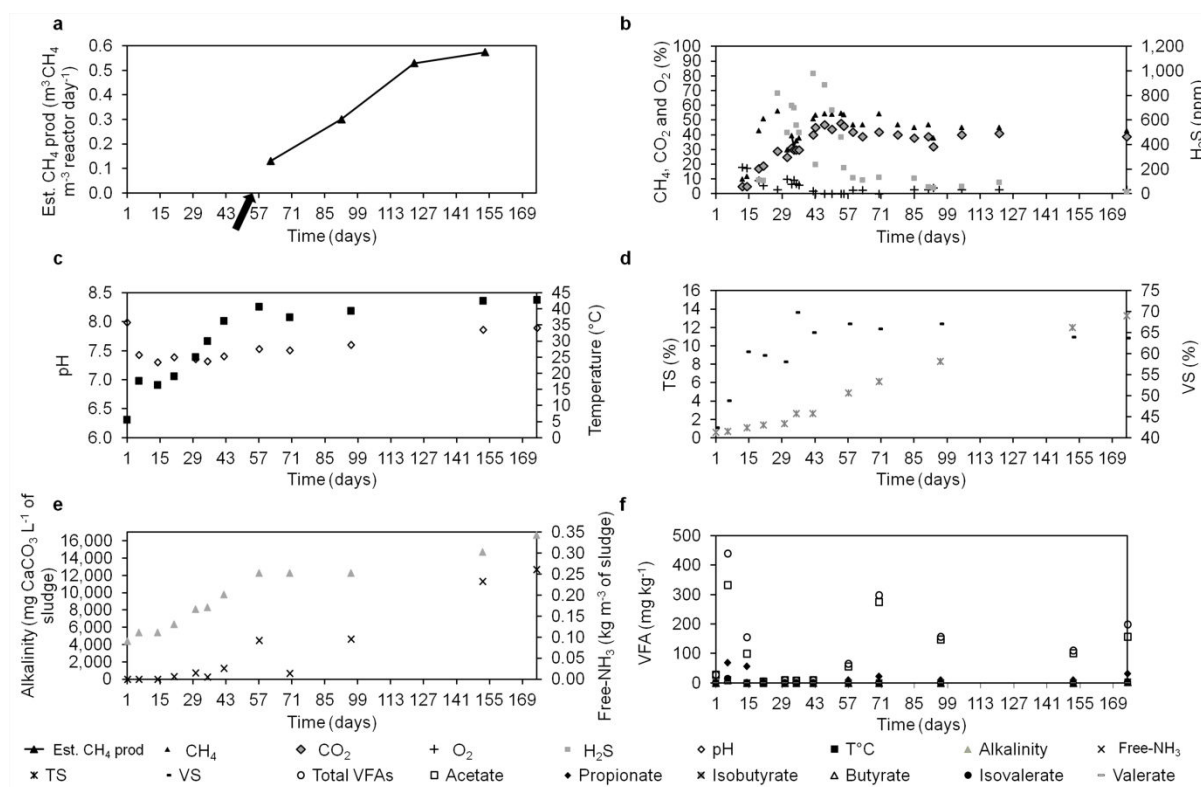


Figure 4.2 - Dynamics of the reactor performances and metabolic parameters during the start-up phase

Estimated methane production (a), reactor headspace composition (b), pH and temperature (c), total and volatile solids (d), alkalinity and free-NH₃ (e), and volatile fatty acids concentrations (f); the *black arrow* indicates day 54, when propane was replaced by the produced biogas to feed the CHP unit.

III.2. Microbial community characterisation and monitoring

The high-throughput 16S/18S rRNA amplicon sequencing approach applied in this study gave us the opportunity to monitor the establishment over time of a mesophilic anaerobic microbial community initiated from a seeding with psychrophilic farm effluents. For the 12 samples analysed, a total of 2,284,500 raw reads were obtained and assigned after processing to 1,142; 33 and 573 OTUs for the bacterial, archaeal and eukaryotic communities, respectively. The dynamics of microbial community structure over time was presented at the phylum level for bacteria, at the genus level for archaea, and for the three first classification levels for eukaryotes (Figure 4.3). While the Chao1 estimator rarefaction curves started to level off for the majority of the samples analysed for the bacterial community (Annex 3 - Figure S2a), clear asymptotes were reached for the archaeal and eukaryotic communities (Annex 3 - Figure S2b, c). We can point out from these observations that most of the

diversity for the two latter communities was indeed characterised by high-throughput sequencing, whereas an additional sequencing effort would have allowed to describe on average 110 ± 19 bacterial OTUs more, *i.e.* around 10 % of the observed OTUs.

III.2.1. Microbial community structure in the psychrophilic seeding materials

At the beginning of monitoring (day 1), the microbial community was dominated by a few organisms (Figure 4.3 and Annex 3 - Figure S3). The phylum *Proteobacteria*, accounted for around 40 % of the whole bacterial population (Figure 4.3a). This phylum was represented mainly by the two families *Campylobacteraceae* and *Comamonadaceae* (OTU_18, 41 and 1637, Annex 3 - Table S1 and Figure S3a). Other bacterial phyla such as *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Tenericutes*, with respectively *Porphyromonadaceae* (OTU_146), an unclassified family from the class OPB54 (OTU_17), and *Acholeplasmataceae* (OTU_11) being the dominant families, were also well represented, with abundance levels of around 20, 18 and 10 %, respectively (Annex 3 - Figure S3a). Two genera constituted most of the archaeal community, with the genus *Methanocorpusculum* and the archaeon candidate division *vadinCA11* representing respectively around 70 and 25 % of the whole archaeal community (Figure 4.3b and Annex 3 - Table S2). These archaea most probably originated from the cattle manure and slurry. Indeed, the presence of bacterial phyla similar to those cited above, and the dominance of *Methanocorpusculum*-like archaea has been shown in cattle manure used for composting and in influent of a mixed plug-flow loop reactor converting cattle manure to biogas (Yamamoto *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014). However, other archaeal genera including *Methanosarcina* and *Methanobrevibacter*, not detected in the studied reactor, have also been found as co-dominant organisms in manure used as inoculum for another CSTR of 75 dm³ working volume (Goberna *et al.*, 2015). Regarding eukaryotes, organisms belonging to the division *Chlorophyta* represented more than 95 % of the community at day 1 with OTU_2 and OTU_457 identified as members of the class *Chlorophyceae* (Figure 4.3c, Annex 3 - Figure S3b and Table S3). The high abundance of these green microalgae at the beginning of the monitoring was most probably a consequence of filling the reactor with run-off water that was stored in an outdoor open tank.

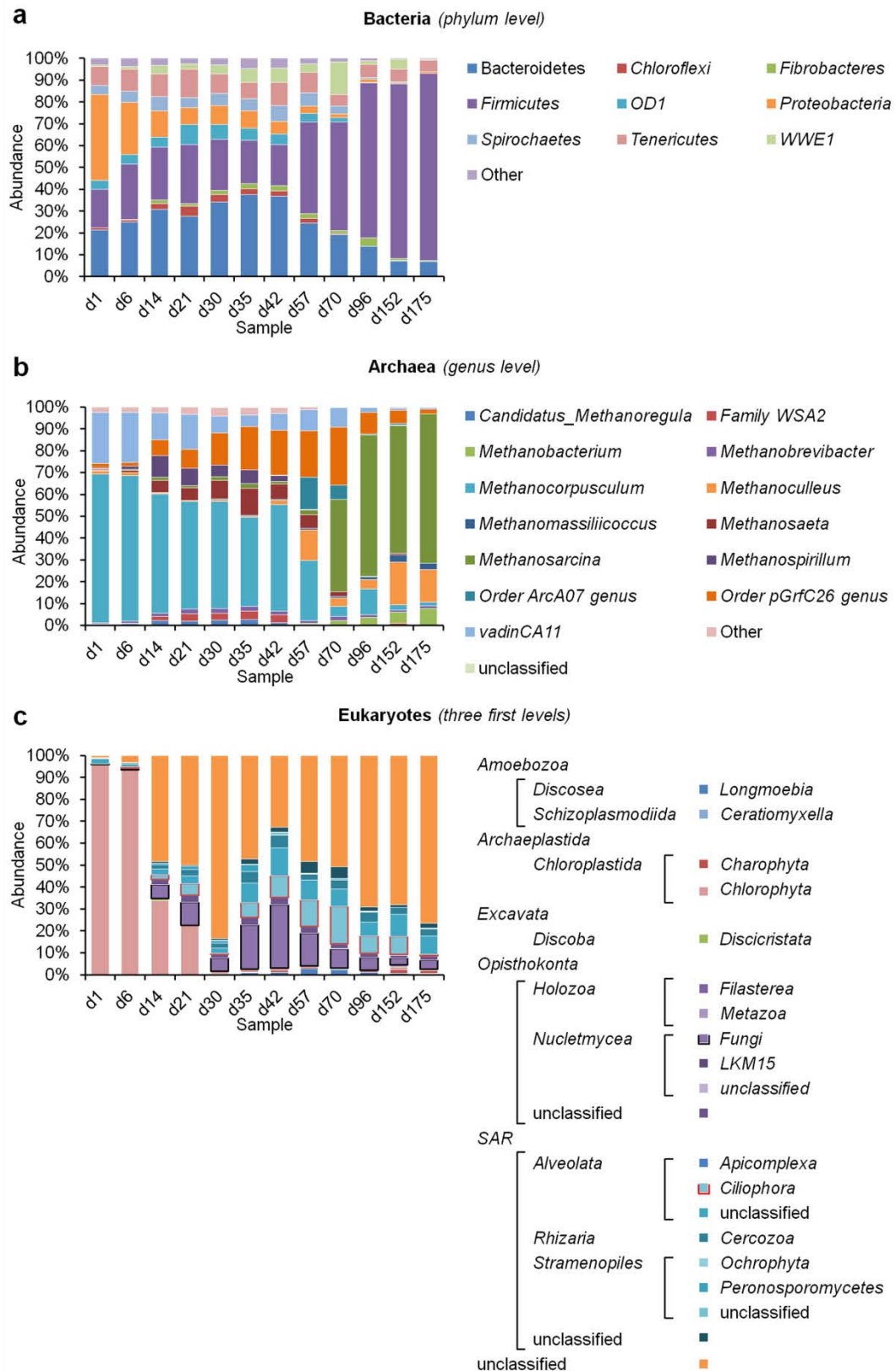


Figure 4.3 - Bacterial, archaeal and eukaryotic structure dynamics over time

Results are presented at the phylum level for bacteria (a), at the genus level for archaea (b), and at the three first classification levels (c) for eukaryotes.

III.2.2. Microbial community dynamics towards the establishment of mesophilic anaerobic conditions

Interesting changes over time inside the microbial community could be underlined during the temperature increase and the appearance of anaerobic conditions inside the reactor (Figure 4. 2, 4.3 and 4.4).

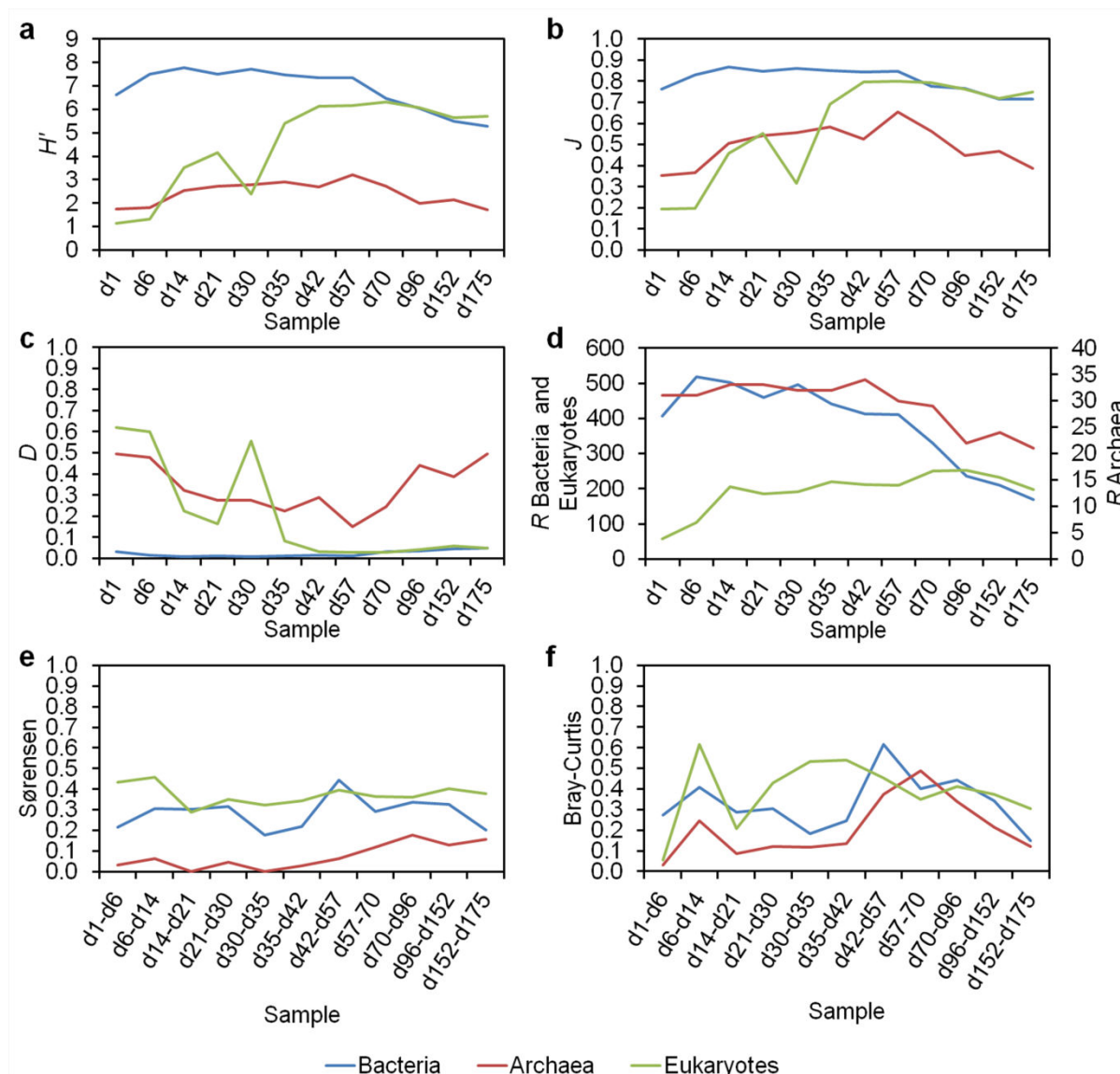


Figure 4.4 - Microbial ecology parameters dynamics for the bacterial, archaeal and eukaryotic communities

Shannon-Wiener index (H' , **a**), Pielou index (J , **b**), Simpson index (D , **c**), richness (R , **d**), Sørensen index (**e**) and Bray-Curtis index (**f**).

Indeed, between day 1 and 42 the previously dominant *Proteobacteria* phylum decreased in abundance from around 40 to 5 % of the total bacterial community (Figure 4.3a). At the same

time, the abundance of the *Bacteroidetes* phylum increased from around 20 to almost 40 % with a dominance of the *SB-1* family (e.g. OTU_19 and 355). Concerning the other dominant bacterial phyla detected at the beginning of the start-up phase, their abundance levels remained relatively stable during the initiation of the mesophilic anaerobic conditions inside the farm reactor. Interestingly, whereas the bacterial community was only dominated by a few OTUs at day 1 (Annex 3 - Figure S3a), and in spite of the changes at the phylum level and the appearance of new, yet rare OTUs, the diversity (H' and D) and evenness (J) indices remained quite stable as evidenced by H' , D and J close to 7.5, 0.0 and 0.9, respectively, during the initiation of the mesophilic anaerobic conditions (samples from day 6 to day 42) (Figure 4.4a-c). Bacterial richness R also remained unchanged between day 1 and day 42, with an average value close to 462 ± 45 identified OTUs (Figure 4.4d).

Inside the archaeal community, the abundance of the two previously dominant organisms, the genus *Methanocorpusculum* and the archaeon candidate division *vadinCA11*, decreased from around 70 to 50 % and from 25 to 6 % of the whole archaeal community, respectively (Figure 4.3b). Simultaneously, the abundance of the *Methanosaeta* genus, detected at a very low level at day 1, increased to approximately 20 % of the total archaeal community towards the end of the initiation of the mesophilic anaerobic conditions (day 42). This genus was reported as highly competitive in anaerobic environment with low acetate concentration (Angenent *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2014). Therefore, we assume that the overall low acetate concentration ($70 \pm 120 \text{ mg kg}^{-1}$) in the studied reactor during the monitoring period (Figure 4.2f), favoured the increase in abundance of *Methanosaeta*. At day 42, other archaea representing the family WSA2 and the genera *Methanosarcina* and *Methanospirillum* were detected with abundance levels of less than 10 % each, whereas *Crenarchaeal* order *pGrfC26*-related archaea represented around 20 % of archaeal community. In contrast to bacteria, the diversity and evenness of the archaeal community increased from day 1 to day 42, as assessed by the values of the H' , D and J indices changing over time from 1.7 to 2.7, 0.5 to 0.1 and 0.4 to 0.7, respectively (Figure 4.4a-c).

The ecological microbial parameters (*i.e.* diversity, evenness and richness indices) were fluctuating much more for the eukaryotic community than for the bacterial and archaeal ones. Based on the two calculated diversity indices (H' and D), eukaryotic diversity globally increased during the establishment of the mesophilic anaerobic conditions in the studied farm reactor (Figure 4.4a, c). At the same time, eukaryotic evenness and richness also increased (Figure 4.4b, d). Community membership and structure changed as well during that time (Figure 4.4e, f). The change of these ecological microbial parameters reflects the

disappearance of the division *Chlorophyta* following day 6, and the appearance of specific anaerobic eukaryotes, such as *Fungi* and *Ciliophora* (Kittelmann *et al.*, 2013) (Figure 4.3c). However, concerning the taxonomic classification of eukaryotes, incompleteness of publicly available databases resulted in a high proportion of unclassified OTUs. Indeed, following the disappearance of *Chlorophyta* division from the reactor (day 14), unclassified sequences represented an average of $57.5 \% \pm 15.8$ of the whole eukaryotic community. Surprisingly, the majority of these unclassified eukaryotes was represented by a single OTU_1 (Annex 3 - Figure S3b and Table S3), covering around 45 % of the eukaryotic community at day 14 and day 21, and up to more than 90 % at day 30. This over-dominance of OTU_1 (showing 95 % of 18S rRNA gene identity to a free free-living phagotrophic flagellate *Rictus lutensis* gen. et sp. nov., isolated from low oxygen environments (Yubuki *et al.*, 2010) resulted in a drop of diversity (Figure 4.4a, d) and evenness (Figure 4.4b) of the eukaryotic community present in the farm reactor. Towards the end of the establishment of mesophilic anaerobic conditions inside the reactor (temperature above 37 °C and O₂ content in the reactor headspace under 3 % reached at day 42), the relative abundance of OTU_1 decreased from around 35% to less than 1 %. At the same time the abundance levels of *Fungi*, *Ciliophora*, and other organisms belonging to the *Opisthokonta* and *SAR* super-groups, increased. These changes were linked to an increase of the community diversity, evenness and difference in terms of community structure (Fig. 4.4a-c, f), whereas the global richness and similarity in terms of community membership remained stable (Figure 4.4d, e).

III.2.3. Microbial community dynamics towards a steady state anaerobic digestion process

Although mesophilic anaerobic conditions established in the farm reactor after day 42, major shifts inside the microbial community were still evidenced afterwards indicating that the reactor did not reach yet a steady state in terms of microbial composition at this stage. Indeed, a gradual disappearance of *Bacteroidetes* was underlined, whereas at the same time the abundance of *Firmicutes* increased (Figure 4.3a). This observation was corroborated by the Sørensen and Bray-Curtis indices, revealing major changes inside the bacterial community membership and structure respectively, between sampling days 42 and 57 (Figure 4.4e, f). Indeed, the increase of the Sørensen index indicated the appearance of new OTUs (Annex 3 - Figure S3a and Table S1) and the Bray-Curtis index indicated that only 39 % of the community structure was shared between days 42 and 57, while it was 75 % between days 35

and 42. Similarly to the bacterial community, changes inside the archaeal community after the establishment of mesophilic anaerobic conditions inside the studied reactor were also detected. Indeed, the high d57-d70 Bray-Curtis index of 0.50 (Figure 4.4f) shows that 50 % of the archaeal community structure was different between these two time-points. This change was best illustrated at the genus level with the appearance of *Methanosarcina*. Indeed, whereas *Methanosarcina* was detected at a low abundance of 3 % at day 57, this genus characterized by a high growth rates and tolerance toward high total ammonium and acetate concentrations (De Vrieze *et al.*, 2012), increased in abundance to around 45 % of the whole archaeal community at day 70. Moreover, it seemed to compete with *Methanocorpusculum* and *Methanosaeta* which strongly decreased in terms of relative abundance at this time in the reactor (Figure 4.3b).

Regarding the eukaryotic community, no change inside the community membership and structure could be pointed out based on the Sørensen and Bray-Curtis indices after the establishment of the mesophilic anaerobic conditions in the reactor (Figure 4.4e, f). However, starting from this period, the abundance of *Fungi* and *Ciliophora* decreased while at the same time the abundance of other unclassified eukaryotes increased (Figure 4.3c).

III.2.4. Microbial communities established at a steady state anaerobic digestion process

Following the main changes in the microbial communities (especially for the bacterial and archaeal communities), the whole microbial (bacterial, archaeal and eukaryotic) community dynamics was then characterized by a global decrease in diversity, evenness and richness towards the end of the monitoring. Indeed, while around 411 bacterial OTUs were identified at day 57 (respectively 30 archaeal OTUs and 209 eukaryotic OTUs), only 169 bacterial OTUs were detected at the last time-point of the monitoring (respectively 21 archaeal and 198 eukaryotic OTUs) (Figure 4.4d). Similarly, the diversity index H' was reduced between days 57 and 175 for the bacterial, archaeal and eukaryotic communities (Figure 4.4a). The evenness also decreased at the end of the monitoring for the three microbial communities (Figure 4.4b). The diminution of these microbial ecological parameters reflects the installation of a specific microbial community, best adapted to biogas production from the used substrates, as following the day 96 these parameters remained rather unchanged over time. Moreover, typical microbes found in a mesophilic anaerobic reactor fed with cow manure and slurry (Li *et al.*, 2014) were detected in the studied reactor. Indeed, towards the end of the monitoring (days 96 to 175) *Firmicutes* became the dominant phylum, with an

abundance level fluctuating from around 70 to 90 % of the whole bacterial community (Figure 4.3a). This phylum was mainly represented by taxa belonging to unclassified families of the orders *MBA08* and *SHA-98* and the *Ruminococcaceae* family. *Bacteroidetes* and *Tenericutes* shared the large part of the remaining community.

With regards to the archaeal community, establishment of stable operational conditions in the reactor towards the end of the start-up phase, continued to promote the increase in abundance of *Methanosarcina*, which represented around 65 % of the population at the end of the monitoring period (day 175). The two other dominant taxa, *Methanoculleus* and *Methanobacterium* represented respectively 20 and 10 % of the archaeal population (Figure 4.3b). An over-dominance of *Methanosarcina* in other full-scale mesophilic anaerobic digesters has also been reported (St-Pierre and Wright, 2013). Finally, it is interesting to point out that the genus of the *Crenarchaeal* order *pGrfC26*, previously characterized by an increasing abundance during the initiation of the mesophilic anaerobic conditions (days 1 to 42), represented less than 3 % of the archaeal community at the end of the monitoring. While Carballa *et al.* (2015) proposed that a functionally diverse microbial community provides a suite of parallel pathways and in consequence that a higher microbial diversity is often correlated with good-performing anaerobic reactors, our results point out that the loss of microbial diversity did not necessarily correspond to a decreased functional diversity in stable AD process. Indeed, the dominance of *Methanosarcina* in AD reactors can be considered beneficial, since this quite robust archaeon is able to use different substrates and thus multiple pathways for methane production, being at the same time an acetoclastic and hydrogenotrophic methanogen (De Vrieze *et al.*, 2012). Further metagenomic and metatranscriptomic studies could confirm or infirm this speculation by studying the different potential and active metabolic pathways used by the microorganisms involved in the AD process. Interestingly, and in contrast to the bacterial and archaeal community, the diversity, evenness and richness of the eukaryotic community reached higher values by the end of the monitoring compared to the seeding stage (day 1) (Figure 4.4). Thus, the establishment of the mesophilic anaerobic conditions inside the reactor and/or the beginning of the feeding with plant materials resulted in an increase in the eukaryotic community richness and diversity. The role of this eukaryotic community in the AD process has yet to be determined as discussed below.

III.3. Correlation analysis within and between environmental parameters and microbial community structure

The influence of the reactor environmental parameters on the microbial community structure was evaluated by means of Spearman's Rank correlations (Figure 4.5 and Annex 3 - Table S4). With regards to the environmental parameters, temperature showed the strongest correlation with alkalinity ($r = 0.99$, p -value < 0.001), TS ($r = 0.97$, p -value < 0.001) and free-NH₃ content ($r = 0.94$, p -value < 0.001). While free-NH₃ content is pH dependent (Emerson *et al.*, 1975), we did not see any correlation between these two parameters in our dataset probably due to a very narrow pH range (7.3-8.0). The CH₄ content in the reactor headspace was positively correlated to temperature ($r = 0.58$, p -value < 0.05) and alkalinity ($r = 0.61$, p -value < 0.05); and negatively correlated with the O₂ content ($r = -0.90$, p -value < 0.001). Furthermore, a strong correlation between alkalinity and TS content ($r = 0.98$, p -value < 0.001) was also evidenced. The latter result corroborates our assumption concerning an increased sludge alkalinity being a consequence of solid manure and plant materials added to the feeding regime of the reactor, respectively after day 21 and day 31.

Even though pH remained quite stable in a neutral range during the monitoring period, its small fluctuations negatively correlated with the bacterial diversity ($r = -0.83$, p -value < 0.001 with HB and $r = 0.82$, p -value < 0.001 with DB), evenness (*i.e.* JB, $r = -0.89$, p -value < 0.001) and richness (RB, $r = -0.80$, p -value < 0.001). pH was also negatively correlated with the archaeal diversity (HA, $r = -0.61$, p -value < 0.05) and richness (RA, $r = -0.76$, p -value < 0.01). Other environmental parameters such as temperature, alkalinity, or the free-NH₃ and TS content also influenced bacterial diversity (HB) and richness (RB), and archaeal richness (RA) (Figure 4.5 and Annex 3 - Table S4). Various environmental parameters, including temperature, pH, alkalinity, free-NH₃, TS, VS, as well as the O₂ content, appeared to strongly influence the abundance of many bacterial, archaeal and eukaryotic OTUs studied here. As all these parameters are well known to be crucial for the AD process and the establishment of an active anaerobic microbiome (Escudié *et al.*, 2011; Goberna *et al.*, 2015), it is reassuring to find such correlations in our dataset as well.

Significant correlations between bacterial diversity and archaeal richness (*i.e.* HB and RA, $r = 0.78$, p -value < 0.01), bacterial evenness (JB) and archaeal microbial parameters (*i.e.* HA, JA and RA with respectively $r = 0.70$, p -value < 0.05 , $r = 0.58$, p -value < 0.05 and $r = 0.74$, p -value < 0.01) and bacterial richness (RB) with the archaeal one (RA, $r = 0.78$, p -value < 0.01), were evidenced and underlined the interrelations of these two communities involved in the AD process. Regarding eukaryotes, to our best knowledge, little is known about their involvements in the anaerobic digestion process and their influence on bacteria and archaea. In large herbivore intestine tract, eukaryotic microorganisms such as ciliates and anaerobic fungi play a significant role in the degradation of plant material by the degradation of large substrate particles, which are then more accessible to bacteria (Flint and Bayer, 2008; Kittelmann *et al.*, 2013). Ciliate are also known to host methanogenic archaea in their cytoplasm in a form of endosymbiosis or externally in an episymbiotic relationship (Hackstein, 2010). Furthermore, evidence of gene acquisition by horizontal transfer between prokaryotes and eukaryotes, suggested the role of eukaryotes as regulators of bacterial and archaeal communities by engulfment and predation (Devillard *et al.*, 1999; Flint and Bayer, 2008). Even though the involvement of protozoa in anaerobic wastewater treatment process has been revealed thanks to a correlation between ciliate count and enhanced methane production (Priya *et al.*, 2007), up to now no information concerning the eukaryotic dynamics during the start-up phase of a full-scale farm reactor and its potential interaction with prokaryotes is available.

Based on our results, the diversity, evenness and richness of the eukaryotic community (*i.e.* HE, JE and RE, Figure 4.5 and Annex 3 - Table S4) was positively correlated with temperature ($r = 0.76$, p -value < 0.01 ; $r = 0.77$, p -value < 0.01 and $r = 0.63$, p -value < 0.05 , respectively), alkalinity ($r = 0.78$, p -value < 0.01 ; $r = 0.78$, p -value < 0.01 and $r = 0.68$, p -value < 0.05 , respectively), TS ($r = 0.74$, p -value < 0.01 ; $r = 0.73$, p -value < 0.01 and $r = 0.73$, p -value < 0.05 , respectively), and VS content of the reactor ($r = 0.80$, p -value < 0.01 ; $r = 0.82$, p -value < 0.01 and $r = 0.84$, p -value < 0.01 , respectively). Furthermore, eukaryotic diversity and evenness were negatively correlated with the O₂ content in the reactor headspace ($r = -0.96$, p -value < 0.001 and $r = -0.95$, p -value < 0.001 , respectively). Interestingly, and similarly to results from Priya *et al.* (2007), the abundance level of the eukaryotic OTU_11 belonging to the *Ciliophora* division showed a positive correlation with the CH₄ content in the reactor headspace (OTU_11E, $r = 0.62$, p -value < 0.05 , Figure 4.5, Annex 3 - Table S3 and S4).

No correlation could be shown between bacterial and archaeal ecological parameters (diversity, evenness and richness) and the eukaryotic ones. Nevertheless, many eukaryotic OTUs had significant positive and negative correlations with the bacterial and archaeal diversity, evenness and richness (Figure 4.5 and Annex 3 - Table S4). For example, eukaryotic OTU_1 (Annex 3 - Table S3) potentially affiliated with *Rictus lutensis* gen. et sp. nov. which is characterized as a raptorial feeder that preys on bacteria (Yubuki *et al.*, 2010), showed strong positive correlations with bacterial community diversity (HB, $r = 0.91$, p -value < 0.001 and DB, $r = -0.75$, p -value < 0.01), evenness (JB, $r = 0.84$, p -value < 0.001) and richness (RB, $r = 0.83$, p -value < 0.001). Whereas another unclassified eukaryotic OTU_3 showed negative correlations with the bacterial diversity (HB, $r = -0.75$, p -value < 0.01) and bacterial and archaeal richness (RB, $r = -0.79$, p -value < 0.01 and RA, $r = -0.73$, p -value < 0.01). Furthermore, during the establishment of the mesophilic anaerobic conditions in our studied full-scale farm reactor, eukaryotic microbial community parameters such as the diversity, evenness and richness were strongly influenced by many bacterial and archaeal OTUs belonging *e.g.* to the order *Bacteroidales* (OTU_21B), archaeal order *ArcA07* (OTU_10A) or the *Crenarchaeal* order *pGrfC26* (OTU_13A) (Figure 4.5, Annex 3 - Table S1, S2 and S4).

Based on our results, it is clear that strong relationship between the eukaryotes and the remaining part of the microbial community in the AD reactor exists, as it was suggested in the rumen by Kittelmann *et al.* (2013). Nevertheless, eukaryotes are far from being well studied and known in AD reactors. Thus, their putative role inside the AD process and in our case, during the establishment of mesophilic anaerobic condition during the start-up phase of a full-scale anaerobic reactor remains unclear. Indeed, most of the studies neglect their existence as they are rarely mentioned in the context of anaerobic digestion. Therefore, future works on the microbial monitoring of the AD process should also include eukaryotes, as they could be important regulators of the bacterial and archaeal community dynamics. We also speculate that further metagenomic and metatranscriptomic studies of the eukaryotic fraction involved in anaerobic digestion could bring valuable information about their potential action and role in the AD process such as predator for bacteria and archaea or on the contrary as symbionts especially for archaea.

Conclusions

This study showed that biogas production can be initiated in a full-scale farm reactor using cold run-off water and stale cattle slurry as seeding material. The microbial transition from psychrophilic communities naturally present in stored cattle slurry and the one producing methane at mesophilic conditions, was evidenced by fluctuations in the microbial community structure in terms of diversity, evenness and richness. Significant correlations between the presence of eukaryotic organisms and, bacteria, archaea and ecological parameters indicated that this domain of life should be investigated to reveal their potential interactions with other microbes having crucial functions during the anaerobic biomass degradation.

References

- Ahring, B.K., Sandberg, M., and Angelidaki, I. (1995) Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**: 559-565.
- Angenent, L.T., Sung, S., and Raskin, L. (2002) Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Research* **36**: 4648-4654.
- Bartram, A.K., Lynch, M.D.J., Stearns, J.C., Moreno-Hagelsieb, G., and Neufeld, J.D. (2011) Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 3486-3852.
- Bray, J.R. and Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**: 325-349.
- Carballa, M., Regueiro, L., and Lema, J.M. (2015) Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology* **33**: 103-111.
- Core Team, R.D. (2008) *R: a language and environment for statistical computing*. The R foundation for statistical computing edn. Vienna, Austria.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., and Verstraete, W. (2012) Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* **112**: 1-9.
- Demirel, B. and Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **7**: 173-190.
- Devillard, E., Newbold, C.J., Scott, K.P., Forano, E., Wallace, R.J., Jouany, J.P., and Flint, H.J. (1999) A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* shows close sequence similarity to family 11 xylanases from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **181**: 145-152.

Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.

Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., and Thurston, R.V. (1975) Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **32**: 2379-2383.

Engeli, H., Edelmann, W., Fuchs, J., and Rottermann, K. (1993) Survival of plant pathogens and weed seeds during anaerobic digestion. *Water Science & Technology* **27**: 69-76.

Escudié, R., Cresson, R., Delgenès, J.P., and Bernet, N. (2011) Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. *Water Research* **45**: 1-10.

Flint, H.J. and Bayer, E.A. (2008) Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 280-288.

Goberna, M., Gadermaier, M., Franke-Whittle, I.H., García, C., Wett, B., and Insam, H. (2015) Start-up strategies in manure-fed biogas reactors: Process parameters and methanogenic communities. *Biomass and Bioenergy* **75**: 46-56.

Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T. *et al.* (2015) Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for Biofuels* **8**:122. doi: 10.1186/s13068-015-0309-9.

Hackstein, J.H.P. (2010) *(Endo)symbiotic methanogenic Archaea*. Springer Berlin Heidelberg.

Ike, M., Inoue, D., Miyano, T., Liu, T.T., Sei, K., Soda, S., and Kadoshin, S. (2010) Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Koyoto eco-energy project. *Bioresource Technology* **101**: 3952-3957.

Kittlmann, S., Seedorf, H., Walters, W.A., Clemente, J.C., Knight, R., Gordon, J.I., and Janssen, P.H. (2013) Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS ONE* **8**: e47879. doi:10.1371/journal.pone.0047879.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41**: e1. doi: 10.1093/nar/gks808.

Körner, S., Das, S.K., Veenstra, S., and Vermaat, J.E. (2001) The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany* **71**: 71-78.

Li, Y.F., Chen, P.H., and Yu, Z. (2014) Spatial and temporal variations of microbial community in a mixed plug-flow loop reactor fed with dairy manure. *Microbial Biotechnology* **7**: 332-346.

- Marchaim, U. and Krause, C. (1993) Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Bioresource Technology* **43**: 195-203.
- Pain, B.F., Misselbrook, T.H., Clarkson, C.R., and Rees, Y.J. (1990) Odour and ammonia emissions following the spreading of anaerobically-digested pig slurry on grassland. *Biological Wastes* **34**: 259-267.
- Pielou, E.C. (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* **13**: 131-144.
- Priya, M., Haridas, A., and Manilal, V.B. (2007) Involvement of protozoa in anaerobic wastewater treatment process. *Water Research* **41**: 4639-4645.
- Sakar, S., Yetilmezsoy, K., and Kocak, E. (2009) Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment - a literature review. *Waste Management & Research* **27**: 3-18.
- Santos, H.F., Cury, J.C., Carmo, F.L., Rosado, A.S., and Peixoto, R.S. (2010) 18S rDNA sequences from microeukaryotes reveal oil indicators in mangrove sediment. *PLoS ONE* **5**: e12437.
- Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.
- Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.
- Sørensen, T. (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Biologiske Skrifter* **5**: 1-34.
- St-Pierre, B. and Wright, A.D. (2013) Metagenomic analysis of methanogen populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters operated on dairy farms in Vermont, USA. *Bioresource Technology* **138**: 277-284.
- Weiland, P. (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 849-860.
- Yamamoto, N., Asano, R., Yoshii, H., Otawa, K., and Nakai, Y. (2011) Archaeal community dynamics and detection of ammonia-oxidizing archaea during composting of cattle manure using culture-independent DNA analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**: 1501-1510.
- Yiridoe, E.K., Gordon, R., and Brown, B.B. (2009) Nonmarket cobenefits and economic feasibility of on-farm biogas energy production. *Energy Policy* **37**: 1170-1179.
- Yubuki, N., Leander, B.S., and Silberman, J.D. (2010) Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a novel phagotrophic stramenopile from low oxygen environments: *Rictus lutensis* gen. et sp. nov. (Bicosoecida, incertae sedis). *Protist* **161**: 264-278.
- Ziganshina, E.E., Bagmanova, A.R., Khilyas, I.V., and Ziganshin, A.M. (2014) Assessment of a biogas-generating microbial community in a pilot-scale anaerobic reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **117**: 730-736.

Points marquants de l'étude :

- Un digesteur anaérobie de ferme mésophile peut être démarré avec un inoculum froid.

- Le pH, l'alcalinité totale, l'ammoniac libre, la matière sèche et l'oxygène sont les paramètres environnementaux influençant le plus la dynamique microbienne.

- *Firmicutes* et *Methanosarcina* sont les deux groupes microbiens dominants qui se sont établis au sein du digesteur étudié.

- La diversité de la communauté eucaryote a augmenté avec l'apparition des conditions anaérobies mésophiles au sein du digesteur.

- Des interactions importantes entre les communautés bactériennes, archées et eucaryotes sont suggérées au vu de nos résultats.

Discussion générale, conclusions et perspectives

Discussion générale, conclusions et perspectives

Le processus de digestion anaérobie est un processus complexe, faisant intervenir un grand nombre d'espèces microbiennes, dont les interactions intra- et interspécifiques, ainsi qu'avec leur environnement, ne sont encore que très peu connues (Toerien et Hattingh, 1969 ; Weiland, 2010 ; Werner *et al.*, 2011 ; Regueiro *et al.*, 2014 ; Carballa *et al.*, 2015). Représentant aujourd'hui un enjeu certain pour : (1) la lutte contre le réchauffement climatique et l'utilisation de ressources fossiles par la production d'énergies renouvelables (gaz, électricité et chaleur) ; (2) la récupération des ressources par la formation d'engrais (les résidus de digestion) ; (3) la lutte contre les déchets par la valorisation des co- et sous-produits organiques ; la biométhanisation nécessite d'importants efforts de recherche afin d'en caractériser les acteurs, d'en contrôler le processus, d'en déterminer les limites, et ainsi permettre l'amélioration de son rendement, tout en limitant ses coûts (Kotzé *et al.*, 1969 ; Ward *et al.*, 2008 ; Buffiere *et al.*, 2008 ; Holm-Nielsen *et al.*, 2009 ; Weiland, 2010 ; Appels *et al.*, 2011).

Le principal objectif de mon travail de thèse était de caractériser les communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie lors de changements de facteurs opérationnels. La finalité de cette caractérisation était de relier la présence (ou l'absence) ainsi que la dynamique de certaines populations microbiennes avec l'efficacité de la production de biogaz. Cette tâche est rendue difficile par le fait que de nombreux genres et espèces rencontrés au cours de ce travail ne sont que peu voire pas décrits et leurs rôles restent encore dans le domaine de la spéculation.

Il ressort que les facteurs opérationnels influençant le processus de digestion anaérobie sont nombreux. En effet, Kotzé *et al.* indiquent dès 1969 que le caractère individuel de chaque digesteur anaérobie est déterminé par la composition des substrats utilisés, le nombre d'espèces microbiennes présentes dans l'inoculum, ainsi que d'autres facteurs comme notamment la température, le taux de charge organique, le temps de rétention hydraulique, le temps de rétention des boues, la méthode d'agitation ou encore le type du digesteur. Au cours de cette étude, j'ai choisi d'analyser l'augmentation du taux de charge organique (chapitre 2 et 3), le type de digesteur (chapitre 3), et l'établissement des conditions anaérobies mésophiles (chapitre 4) sur les performances et la dynamique des communautés microbiennes impliquées dans la formation du biogaz. Ce choix résulte, d'une part, du faible nombre de

travaux ayant traité ces sujets. En effet, très peu d'informations sont disponibles sur les méthodes de récupération du processus après acidose (chapitre 2) ; la comparaison entre des digesteurs de type CSTR et ABR (chapitre 3) ; ou encore l'étude de la communauté eucaryote impliquée en digestion anaérobie (chapitre 4). D'autre part, le choix des différents travaux présentés dans ce document était également dépendant de la demande des acteurs de la filière (chapitre 2 et 4), tout comme des objectifs de recherche définis précédemment (caractériser les acteurs microbiens de la digestion anaérobie afin d'en contrôler le processus, d'en déterminer les limites et d'en améliorer le rendement), ou encore de l'opportunité de suivre de façon pratique la phase de démarrage d'un digesteur de ferme (chapitre 4).

Les résultats de ces différents travaux ont permis de générer de nouvelles connaissances concernant directement les performances du processus de digestion anaérobie et destinées aux acteurs de la filière. En effet, nous avons pu démontrer que l'arrêt de l'alimentation associé à l'ajout d'une solution alcaline dans des digesteurs atteints d'acidose permettaient de relancer rapidement et efficacement la production de méthane (chapitre 2). Nous avons également pu souligner que le design de digesteurs (soit de type CSTR, soit de type ABR) alimentés avec un substrat solide et à un taux de charge organique modéré, n'influçait que très peu ses performances. En revanche, si le taux de charge organique du substrat solide devenait plus élevé, les digesteurs de type CSTR semblaient cette fois-ci mieux adaptés à la production de biogaz que les digesteurs de type ABR (chapitre 3). Enfin, nous avons pu démontrer que le processus de digestion anaérobie pouvait s'établir de façon rapide et efficace dans un nouveau digesteur en phase de démarrage, sans forcément avoir recours à un inoculum acclimaté provenant d'un digesteur déjà en fonctionnement (chapitre 4). De plus, cette étude de la phase de démarrage d'un digesteur, nous a permis de mettre en avant que de nombreux paramètres environnementaux, comme le pH, l'alcalinité totale, le taux d'ammoniac libre, le taux de matière sèche ou encore le taux d'oxygène, par exemple, ont un impact direct sur les populations microbiennes impliquées en digestion anaérobie.

Le suivi de la structure des communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobie au cours des différentes études présentées dans ce document a été réalisé grâce à des techniques de biologie moléculaire telles que la T-RFLP et le séquençage haut débit du gène codant pour la petite sous-unité ribosomique (chapitre 1). Bien que ces deux techniques aient l'inconvénient de présenter des biais possibles liés à l'extraction de l'ADN ou l'amplification par PCR (von Wintzingerode *et al.*, 1997 ; Berry *et al.*, 2011 ; Leite *et al.*, 2014), elles

permettent d'obtenir rapidement un grand nombre d'information à des coûts de plus en plus réduits. De plus, afin de limiter l'influence de ces biais, l'ensemble des procédures expérimentales a été réalisé de façon homogène pour tous les échantillons d'une même étude. Ces techniques moléculaires sont des outils permettant d'observer des tendances d'évolution au cours du temps (résultats qualitatifs), mais *a priori* ne permettent pas d'obtenir des résultats quantitatifs. Tout comme la T-RFLP, le séquençage haut débit permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons de façon simultanée, mais à l'avantage de permettre directement l'identification des séquences d'acides nucléiques obtenues par séquençage tout en permettant une meilleure résolution (Pilloni *et al.*, 2012). C'est pourquoi cette technique a été principalement utilisée au cours de ma thèse. Toutefois, le séquençage haut débit a l'inconvénient de générer un grand nombre de séquences (plusieurs milliers) rendant leurs analyses et interprétations difficiles. De plus, cette technique moléculaire telle qu'employée ici, donne accès à la fraction totale des communautés microbiennes présentes dans le milieu (active et non active). En perspective méthodologique, d'autres analyses de biologie moléculaire permettant l'étude des ARNs (métatranscriptomique, par exemple) apporteraient un niveau d'information supplémentaire en s'intéressant principalement à la fraction active des organismes présents en digestion anaérobie et aux enzymes qu'ils synthétisent dans leur environnement.

D'une façon générale, les études présentées dans ce document ont été guidées par deux questions scientifiques principales et les éléments de réponses à ces deux questions feront l'objet de ma discussion :

- Est-il possible de prédire l'état du processus de digestion anaérobie grâce à la dynamique des populations microbiennes impliquées ?

Une inhibition du processus de digestion anaérobie, conduisant à une réduction, voire à un arrêt complet de la production de méthane, peut avoir des répercussions graves sur toute l'unité et son économie, du fait d'une réduction de la production d'électricité et de chaleur par les co-générateurs brûlant le biogaz. La prédiction de l'état du processus de digestion anaérobie, ainsi que des phénomènes d'inhibition, dont les causes sont liées à l'accumulation de substances toxiques comme les acides gras volatiles, l'ammoniac, les métaux lourds ou d'autres substances organiques (chlorophénols, acides gras à longue chaîne carbonée par exemple) (Chen *et al.*, 2008), constitue donc un axe de recherche primordiale.

Dans le but d'évaluer la répétabilité des mesures, les expériences que j'ai menées en laboratoire, ont dans un premier temps été réalisées avec des réacteurs répliqués. Ainsi, lors de l'étude de digesteurs anaérobies de laboratoire successivement exposés à une augmentation du taux de charge organique, une acidose et un rétablissement du processus de digestion (chapitre 2), trois digesteurs ont été suralimentés et donc traités en tant que répliqués. Lors de l'étude sur la comparaison entre des digesteurs de type CSTR et ABR (chapitre 3), deux digesteurs de chaque type ont été traités dans un premier temps de façon similaire (*i.e.* jusqu'au jour 90).

L'utilisation de répliqués dans les études en digestion anaérobie n'est pas systématique. En effet, les études portant sur la dynamique des populations microbiennes impliquées en digestion anaérobie lors d'un changement de facteur opérationnel et réalisées sur un seul digesteur sont communes dans la littérature (*e.g.* Delbès *et al.*, 2001 ; Kundu *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2015 ; Kim et Lee, 2015).

De façon générale, mes résultats portant sur les trois digesteurs de type CSTRs présentés dans le chapitre 2, ou encore sur les deux CSTRs et les deux ABRs étudiés sous conditions similaires (*i.e.* jusqu'au jour 90) dans le chapitre 3, montrent qu'en cas de conditions de digestion stables et non contraignantes, les répliqués ont tendance à développer les mêmes communautés microbiennes à partir d'un même inoculum. Ces observations rejoignent les travaux de Falk *et al.* (2009) ayant démontré que des communautés microbiennes acclimatées évoluent de façon similaire en l'absence de changement de facteurs opérationnels. Toutefois, avec l'apparition de conditions déterministes (pression de sélection due à une suralimentation des digesteurs par exemple), des différences notables au sein des communautés microbiennes ont alors émergé entre les différents digesteurs étudiés (chapitre 2 et 3). Dans le but d'établir un ou plusieurs indicateurs de l'état du processus de digestion anaérobie, ces différences entre répliqués s'avèrent contraignantes.

Quelques travaux se sont intéressés à différents paramètres métaboliques comme indicateurs de l'état de performance du processus de digestion anaérobie tels que la concentration en acide propionique de la boue (Marchaim et Krause, 1993 ; Nielsen *et al.*, 2007), son ratio acide propionique/acide acétique (Hill *et al.*, 1987 ; Illmer et Gstraunthaler, 2009), ou encore l'étude de la phase gazeuse du digesteur (Adam *et al.*, 2013 ; Adam *et al.*, 2015). Cependant, la prise en compte de certains de ces paramètres s'est révélée inefficace pour prédire l'état du

processus dans nos études (cas du ratio acide propionique/acide acétique par exemple ne permettant pas de prédire l'imminence de l'acidose détaillé dans le chapitre 2).

D'autres équipes de recherche ont préféré considérer les communautés microbiennes et leurs paramètres écologiques (tel que la diversité, la richesse et l'équitabilité) comme indicateurs. Ainsi, les résultats de nombreuses études ont permis d'établir des relations entre ces paramètres écologiques et l'état du processus de digestion anaérobie, telles que l'efficacité de la production de méthane ou encore l'imminence d'une perturbation. En effet, Werner *et al.* (2014) ont observé que l'équitabilité des communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobie est à la fois un indicateur de perturbation et de stabilité de digesteurs alimentés avec des déchets de porc, du fait que ce paramètre microbien décroît avec l'apparition d'un stress sélectif lié à une augmentation du taux d'ammoniac dans les digesteurs étudiés. Carballa *et al.* (2011) ont quant à eux démontré qu'une communauté bactérienne avec une diversité importante et dont les membres sont équitablement répartis, est statistiquement représentative du bon état de fonctionnement d'un digesteur anaérobie. De même, Regueiro *et al.* (2014) ont observé une efficacité plus importante du processus de biométhanisation dans des digesteurs ayant une diversité microbienne plus importante. Ces auteurs expliquent cette relation par le fait que plus une communauté microbienne est riche et diversifiée, plus grande est la possibilité de trouver dans l'ensemble du réseau métabolique de la digestion anaérobie, une voie métabolique permettant de convertir le substrat en méthane. Lerm *et al.* (2012) ont pu quant à eux, établir une corrélation entre la diversité de la communauté méthanogène impliquée en digestion anaérobie et la concentration en AGV du digesteur avec le rendement en méthane du digesteur. Enfin, les résultats de Kundu *et al.* (2013) suggèrent également qu'une communauté archée avec une diversité importante est indicatrice du bon fonctionnement d'un digesteur, et ce malgré les variations en termes de quantité de substrat organique que celui-ci peut recevoir.

Cependant, lors de l'étude de la dynamique des communautés microbiennes de trois digesteurs anaérobies de laboratoire traités en répliat, successivement exposés à une augmentation du taux de charge organique, une acidose et un rétablissement du processus de digestion (chapitre 2), les indices de richesse et de diversité des communautés bactériennes de deux réplicats ont diminué avec l'apparition de l'acidose. Ces mêmes indices ont augmenté ou sont restés inchangés pour le dernier répliat. Ainsi, du fait de nombreuses variations entre nos différents réplicats, ces indicateurs se sont révélés être des outils de prédiction inefficaces dans nos études, quelle que soit la méthode d'analyse des communautés microbiennes utilisée (T-RFLP ou séquençage haut débit).

Malgré ces différences notables au niveau des paramètres écologiques microbiens entre les trois réplicats étudiés au cours du chapitre 2, des tendances similaires quant à l'apparition ou la disparition de certains organismes dans nos digesteurs ont pu être démontrées. Ainsi, toujours dans ce même chapitre, nous avons pu établir un lien entre imminence de la perturbation (acidose) et présence des espèces *Methanosaeta* sp. et *Methanoculleus* sp. dans les digesteurs étudiés. De façon intéressante, un même constat a pu être observé entre les genres *Methanosaeta* et *Methanosphaera*, cette fois-ci au sein des CSTRs et ABRs étudiés au cours du chapitre 3. En effet, nous avons noté d'une part, une plus faible présence de *Methanosaeta* et une apparition de *Methanosphaera* dans les premiers compartiments des ABRs lorsque ceux-ci présentaient une boue avec un faible pH. D'autre part, nous avons pu caractériser ce même changement au sein de la communauté archée du second CSTR étudié, lorsque la pression de sélection imposée par le haut taux de charge organique appliqué à ce digesteur a laissé supposer l'apparition d'une inhibition de la production de méthane (du fait d'une augmentation de la concentration en AGV dans le digesteur). Ce même lien entre diminution de l'abondance de *Methanosaeta* dans des digesteurs anaérobies où cet organisme est dominant, et instabilité du processus de digestion anaérobie conduisant à une diminution de la production de méthane est confirmée par d'autres travaux contemporains à cette thèse (De Vrieze *et al.*, 2012 ; Bergmann, 2012 ; Carballa *et al.*, 2015). Les résultats générés par mes travaux précisent toutefois l'apparition dans chaque cas, d'une nouvelle espèce archée semblant plus adaptée aux nouvelles conditions métaboliques du digesteur.

Cependant, et comme nous avons pu le démontrer par la suite avec l'étude de la phase de démarrage d'un digesteur anaérobie agricole, cet indicateur potentiel (*i.e.* le remplacement de *Methanosaeta* par une autre espèce archée avant une perturbation) est limité du fait que *Methanosaeta* ne s'installe pas forcément dans chaque digesteur anaérobie comme espèce dominante. En effet, la présence de *Methanosaeta* n'a pas été détectée dans le digesteur de ferme suivi, une fois les conditions mésophiles anaérobies établies (chapitre 4). Ainsi, ce résultat traduit l'impossibilité d'utiliser, pour ce digesteur spécifique, la dynamique de cette espèce d'archée, comme indicateur de l'état du processus de digestion anaérobie. Ce constat ne peut être considéré comme définitif car ce réacteur de ferme a été suivi sur une période relativement courte (environ 6 mois). Il est possible que pour des réacteurs établis depuis plusieurs années, la perte d'abondance de *Methanosaeta* ait malgré tout le potentiel d'un indicateur de perturbation du processus de digestion anaérobie.

Néanmoins, d'autres travaux ont permis d'établir des liens entre l'apparition d'une nouvelle espèce, au départ non dominante au sein du digesteur (*e.g.* une espèce proche de *Methanosarcina thermophila*), et l'état de performance de digesteurs alimentés avec un taux de charge organique croissant d'ensilage de maïs (Kampmann *et al.*, 2014).

Ainsi, au terme de l'analyse de tous ces éléments, des similitudes quant au changement de dominance (disparition et apparition de nouvelles espèces) au sein des communautés microbiennes (principalement archées) avant l'apparition d'une perturbation semblent évidentes. Ces changements de dominance semblent également être plus adaptés que la simple disparition de *Methanosaeata* comme indicateur de l'état du processus de digestion anaérobie. Toutefois, au vu des disparités pouvant s'établir au sein des communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobie sous conditions déterministes (différences entre réplicats et communautés microbiennes s'établissant de façon distinctes dans différents digesteurs anaérobies), un important effort de recherche est toujours nécessaire avant de pouvoir développer un ou plusieurs indicateurs microbiens universels de l'état du processus de digestion anaérobie avec pour but ultime une gestion proactive (Carballa *et al.*, 2015) des unités de biométhanisation. En effet, dans le cas où une population microbienne ou un changement de dominance au sein de la communauté microbienne seraient révélateurs de l'état du processus de digestion anaérobie, le développement de méthode de suivi rapide de ces indicateurs par PCR quantitative, puce à ADN ou test d'immunofluorescence (test Elisa par exemple) permettrait la mise en place d'une gestion raisonnée de la production de biogaz. Ainsi, le processus de DA pourrait être rectifié, évitant alors des pertes de production en méthane.

Une campagne de suivi au cours du temps, de la dynamique des communautés microbiennes de digesteurs anaérobies, différents tant par leurs types d'alimentation, que leurs design ou leurs populations microbiennes établies, sous état stable puis perturbé, pourrait permettre d'apporter d'autres éléments de réponse à cette problématique.

De même, nous avons démontré qu'à court terme, les populations microbiennes impliquées en digestion anaérobie étaient perturbées par un traitement alcalin, permettant de relancer le processus de production de méthane par la correction du pH du digesteur acidifié (chapitre 2). Des études à plus long terme permettraient d'établir si les communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobie sont résilientes ou redondantes à la perturbation et/ou au traitement alcalin permettant la reprise du processus. Ces études permettraient également de confirmer le suivi des changements microbiens comme indicateur de l'état du processus de la

production de méthane, ainsi que d'établir en cas de plusieurs perturbations consécutives, si cet indicateur peut être appliqué de façon successive pour un même digesteur.

- Existe-t-il une communauté microbienne « universelle » qui serait le mieux adapté à la digestion de différents substrats ?

Outre la prédiction de l'état du processus, l'utilisation de communautés microbiennes les plus adaptées à la production de méthane est un enjeu important pour une amélioration de la conversion de la matière organique en biogaz, permettant ainsi un meilleur rendement en méthane et la rentabilité des infrastructures.

Les différentes études réalisées au cours de mon doctorat ont permis de démontrer, lors de situations stables (*i.e.* en l'absence d'un environnement déterministe), que la richesse, la diversité et l'équitabilité spécifiques des communautés bactériennes et archées impliquées en digestion anaérobie étaient réduites au cours du temps. En effet, en l'absence de changement drastique des conditions de digestion, et comme conclu par Solli *et al.* (2014), les communautés microbiennes ont tendance à devenir moins complexes au fil du temps en fonction du substrat à dégrader. Cette sélection conduirait ainsi à l'installation des espèces les plus adaptées à la dégradation du ou des substrats utilisés. De façon intéressante, et comme démontré dans le chapitre 4 avec l'installation de la dominance de *Methanosarcina* lors de la phase de démarrage d'un digesteur anaérobie agricole, ce constat ne semble pas s'accompagner forcément d'une réduction de diversité fonctionnelle. Des études parallèles de métagénomique et métatranscriptomique permettraient d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse « en absence de modifications opérationnelles, un nombre plus restreint de microbes réalise toutes les tâches requises du processus alors que sous conditions changeantes, le microbiome anaérobie se complexifie ».

Alors que de nombreuses études ont établi des relations entre diversité importante des communautés microbiennes et performances de digesteurs anaérobies (Carballa *et al.*, 2011 ; Lerm *et al.*, 2012 ; Regueiro *et al.*, 2014), les résultats de nos différentes études apportent des conclusions contradictoires. En effet, comme spécifié dans le second chapitre de ce document, le digesteur R2, caractérisé par une diversité et une richesse bactérienne les plus faibles parmi les digesteurs tests, a résisté le mieux à la pression exercée par la suralimentation. Cela s'est traduit au niveau métabolique, par un pH plus élevé, conduisant à une meilleure production de biogaz, tant au niveau quantité que qualité, par rapport aux deux

autres réplicats (R1 et R3). A l'opposé, dans le cadre de la seconde étude présentée dans ce manuscrit (chapitre 3), nous avons pu noter une meilleure résistance à l'alimentation de l'ABR2, caractérisé par une richesse et diversité bactériennes plus élevées dans le premier compartiment (ABR2-c1) que l'autre digesteur de type ABR étudié. Au vu de ces différents résultats, il nous est donc impossible de confirmer ou d'infirmer une quelconque relation entre les paramètres écologiques microbiens (richesse, diversité et équitabilité) et les performances des digesteurs étudiés. Ainsi, nous ne pouvons pas définir les caractéristiques types (*i.e.* richesse, diversité et équitabilité importantes ou non, par exemple) des communautés microbiennes qui seraient les mieux adaptées à la production de méthane, ou les plus résistantes à un changement de facteur opérationnel en cours de digestion. Le suivi des communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobie, ainsi que de la production en méthane d'un grand nombre de digesteurs fonctionnant sous état stable (*i.e.* sans changement de facteurs opérationnels) pourraient permettre d'établir un lien entre caractéristiques des communautés et efficacité de la production de biogaz.

De façon intéressante, la communauté bactérienne du digesteur R2 (chapitre 2) était caractérisée par une abondance relative plus importante d'organismes affiliés au phylum *Thermotogae*, par rapport à R1 et R3. De façon similaire, le retour à un pH neutre dans le premier compartiment de l'ABR2 par rapport à l'ABR1 pourrait être relié à une présence beaucoup plus importante d'organismes appartenant à la division candidate *WWE1* (chapitre 3). Ainsi, au vu de ces résultats, il semblerait donc que ces deux phyla bactériens jouent un rôle déterminant dans les performances du processus de digestion anaérobie, leurs membres ayant été caractérisés comme dégradant des sucres et producteurs d'hydrogène (Conners *et al.*, 2006 ; Pelletier *et al.*, 2008 ; Limam *et al.*, 2014). Ainsi et du fait de nos observations, la présence d'organismes de ces deux phyla (*Thermotogae* et division candidate *WWE1*) au sein de la communauté microbienne impliquée en digestion anaérobie semble donc être un avantage pour la production de biogaz et la résistance à des perturbations de processus dues à l'exposition préalable du microbiome à des conditions déterministes. Toutefois, l'étude de communautés microbiennes comprenant ou non ces deux phyla bactériens, ainsi que leurs performances respectives, sont nécessaires et indispensables afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

De par ces résultats tout au long de mon travail de thèse, nous avons pu démontrer que seulement quelques OTUs représentaient la majorité, en termes d'abondance relative, de l'ensemble des organismes présents dans chacun des digesteurs étudiés. De surcroît, l'analyse

par Riviere *et al.* (2009) des communautés microbiennes de sept digesteurs anaérobies a permis de mettre en évidence qu'un tiers des communautés est commun à tous les digesteurs, un autre tiers est commun à seulement quelques digesteurs, et le dernier tiers est propre à chacun d'entre eux. Par conséquent, nous pouvons déduire de l'ensemble de ces observations, que quels que soient les digesteurs anaérobies, leurs design, leurs modes opératoires ou leur inoculum de départ, il semble qu'un tiers de mêmes organismes connus ou non, fera partie de la communauté microbienne présente, et doit donc assurer des fonctions essentielles au sein du processus de digestion anaérobie. La caractérisation de ces organismes, par l'analyse phylogénétique, métagénomique, voire métatranscriptomique par exemple, de la composition microbienne et de son activité pour un grand nombre de digesteurs anaérobies, apparaît donc primordiale en vue de définir les fonctions et le rôle de ces genres particulièrement récurrents quel que soit le digesteur étudié.

Par ailleurs, comme nous avons pu le démontrer dans le quatrième chapitre de cette étude, d'étroites relations entre les eucaryotes et les bactéries et archées impliquées en digestion anaérobie semblent exister. En effet, nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre l'abondance d'organismes eucaryotes (OTU_1 par exemple phylogénétiquement proche de *Rictus lutensis* gen. et sp. nov., un prédateur de bactérie (Yubuki *et al.*, 2010)) et la diversité, la richesse et l'équitabilité de la communauté bactérienne. De même, nous avons pu confirmer la relation entre l'abondance relative de ciliés et l'efficacité de la production de méthane, d'abord démontrée par Priya *et al.* (2007). Ces différents résultats indiquent que la communauté eucaryote semble jouer un rôle primordial dans la dégradation de la matière organique et la production de biogaz. Par conséquent, afin de mieux comprendre les phénomènes de symbiose, syntrophie, et autre prédation, qui peuvent intervenir entre les différentes communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobie, il semble important d'inclure de façon systématique le suivi des populations eucaryotes dans l'étude des communautés microbiennes impliquées en digestion anaérobie. De plus, l'utilisation de traceurs radioactifs (isotopes radioactifs d'éléments naturels tels que le carbone par exemple) permettrait de suivre les interactions entre les différentes populations microbiennes impliquées en digestion anaérobie et dégradant la matière organique en biogaz.

Dans une moindre mesure, au vu de la quantité de bactéries et d'archées concentrées dans les digesteurs anaérobies (chapitre 1), une régulation au cours du temps, ou la disparition de microorganismes clés par infection virale n'est pas à exclure (Thingstad et Lignell, 1997 ; Pernthaler, 2005 ; Calusinska *et al.*, 2014). Ainsi, des perturbations soudaines du processus

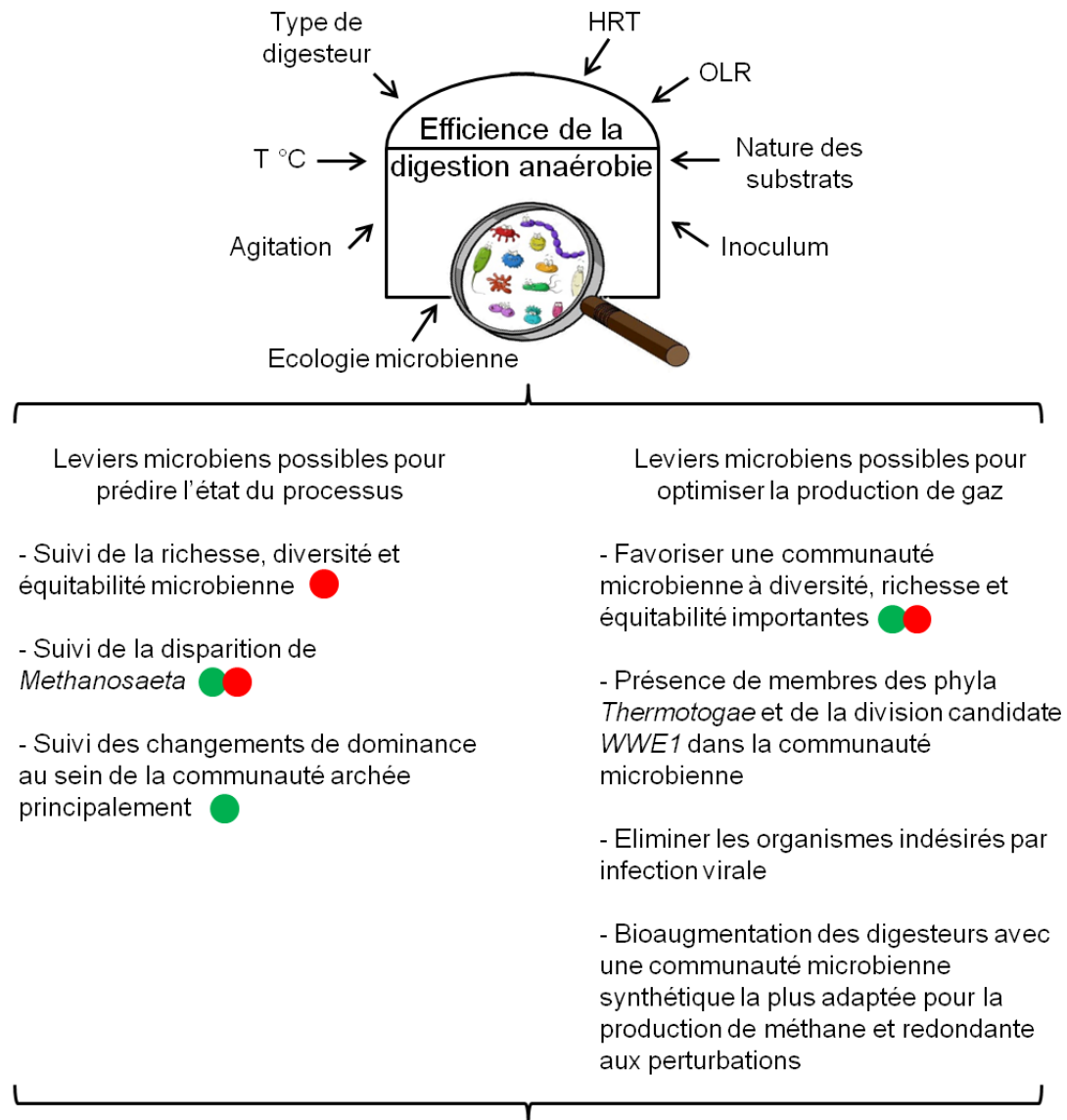
de digestion anaérobie pourraient être expliquées par ce type de régulation. En effet, une infection virale pourrait conduire au sein d'un digesteur anaérobie à des changements dans la dominance d'organismes microbiens ayant un rôle essentiel dans la dégradation de la matière organique et la production de méthane. La recherche et l'utilisation d'agents viraux spécifiques à certaines populations microbiennes permettraient aussi d'éliminer des organismes non désirés ou limitant le processus de DA, offrant ainsi une opportunité non négligeable pour la gestion microbiologique proactive de la production de méthane.

Enfin, la « résistance » de R2 à la suralimentation établie dans le second chapitre au cours de l'augmentation du taux de charge organique conduisant à une acidose par rapport aux deux autres réplicats (R1 et R3) est intrigante. En effet, le digesteur R2, a subi accidentellement une chute de température (descendue à 30 °C au lieu de 37 °C pendant moins de 24h) lors de sa phase d'acclimatation. Etant *a priori* sans conséquence car très bref et n'ayant eu aucune répercussion à court terme sur la production de biogaz de ce digesteur, ce changement opérationnel a peut-être permis la sélection au sein de ce digesteur d'une communauté microbienne mieux adaptée à des conditions sub-optimales ou de stress. Ainsi, l'abondance relative plus importante d'organismes affiliés au phylum *Thermotogae* pour ce digesteur, associée à une diversité microbienne moins importante par rapport à R1 et R3, pourraient être la cause du maintien d'un pH plus élevé, conduisant à une production de méthane plus importante lors de l'acidose. Par conséquent, infliger une suite de perturbations et de rétablissements de la production de méthane à différents digesteurs anaérobies permettraient d'établir si les communautés microbiennes deviennent plus résistantes aux perturbations au fil du temps par la sélection d'organismes les mieux adaptés aux conditions non-optimales.

Une fois encore, un important effort de recherche est toujours nécessaire afin de mieux caractériser les acteurs clés du processus de biométhanisation. Cependant, cet effort est nécessaire en vue de l'amélioration des rendements en production de méthane et ainsi répondre aux attentes de la filière. En effet, en augmentant notre niveau de connaissance sur les microorganismes clés impliqués en digestion anaérobie et leurs interactions, nous pourrions à terme mettre en place un contrôle microbiologique des digesteurs, ce contrôle assurant une production optimale de biogaz à la demande. Ainsi, nous pourrions envisager la création et l'utilisation de communautés microbiennes « synthétiques » regroupant l'ensemble des populations les mieux adaptés à la production de biogaz et résilientes aux perturbations. Ce consortium synthétique, pourrait servir à bioaugmenter des digesteurs

anaérobies ou être transplanté d'un digesteur à un autre afin d'en améliorer leurs performances.

La figure 5.1 reprend de façon synthétique les principaux éléments de réponses aux deux questions abordées dans cette discussion.



Vers une gestion microbiologique proactive du processus de digestion anaérobie

Légende :

→ influence

● Information présente dans la littérature et non confirmée par nos études

● Information présente dans la littérature et confirmée par nos études

Figure 5.1 - Les différents leviers microbiens mis en avant pour la prédiction de l'état du processus et l'optimisation de la digestion anaérobie

Liste des figures

Figure 1.1 - Les différentes étapes du processus de digestion anaérobie 16

Figure 1.2 - Rendements en biogaz et méthane en fonction de la température et du temps de digestion..... 17

Figure 1.3 - Balance entre ammoniac et ammonium en fonction du pH et de la température 20

Figure 1.4 - Schéma de base d'un digesteur anaérobie de type CSTR 24

Figure 1.5 - Schéma de base d'un digesteur anaérobie à chicane..... 25

Figure 1.6 - Fluorescence émise par *Methanosarcina* sous ultraviolet..... 27

Figure 1.7 - Aspect d'une plaque BiologTM après inoculation et incubation..... 29

Figure 1.8 - Structure du gène ribosomique 16S 32

Figure 1.9 - Position de l'espace intergénique ribosomique dans le génome des procaryotes 34

Figure 1.10 - Principe de la T-RFLP..... 37

Figure 1.11 - Les étapes clés de la DGGE 39

Figure 2.1 - Schematic diagram of the experimental feeding campaign 55

Figure 2.2 - Dynamics of pH, alkalinity, ammonium-nitrogen and volatile fatty acids contents in the sludge for each reactor over time 62

Figure 2.3 - Progress of the biogas production and composition over time for the four reactors..... 64

Figure 2.4 - Bacterial and archaeal community structure dynamics over time as assessed by 16S rRNA gene-based T-RFLP analysis 66

Figure 2.5 - Bacterial and archaeal diversity dynamics over time as assessed by high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing 67

Figure 2.6 - Non-metric multidimensional scaling ordination diagrams of temporal variations in bacterial and archaeal community structures 68

Figure 2.7 - Canonical correspondence analysis (CCA) ordination diplot for the archaeal community 74

Figure 3.1 - Schematic diagrams of the experimental reactor types and details on the feeding campaign..... 91

Figure 3.2 - Cumulated biogas production and progress over time of the biogas composition for the studied reactors..... 95

Figure 3.3 - Progress over time of physicochemical parameters of the anaerobic sludge studied for each reactor and compartments96

Figure 3.4 - Bacterial community dynamics in the studied reactors during the experimental campaign 100

Figure 3.5 - Archaeal community dynamics in the studied reactors during the experimental campaign 101

Figure 3.6 - Non-metric multidimensional scaling ordination diagrams of temporal variations in bacterial and archaeal community structures 104

Figure 4.1 - Schematic of the full-scale anaerobic reactor 117

Figure 4.2 - Dynamics of the reactor performances and metabolic parameters during the start-up phase 121

Figure 4.3 - Bacterial, archaeal and eukaryotic structure dynamic over time 123

Figure 4.4 - Microbial ecology parameters dynamics for the bacterial, archaeal and eukaryotic communities 124

Figure 4.5 - Spearman correlation matrix of the relationships between the process parameters and the microbial community during the appearance of mesophilic anaerobic conditions 130

Figure 5.1 - Les différents leviers microbiens mis en avant pour la prédiction de l'état du processus et l'optimisation de la digestion anaérobie 151

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Tableau récapitulatif des principes, objectifs, avantages et inconvénients des principales techniques d'analyse en écologie microbienne (sur la base de la littérature)44

Table 2.1 PCR primers targeting the 16S rRNA genes of the bacterial and archaeal community59

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abendroth, C., Vilanova, C., Günther, T., Luschig, O., and Porcar, M. (2015) Eubacteria and Archaea communities in seven mesophilic anaerobic digester plants in Germany. *Biotechnology for Biofuels* **8:87**: doi: 10.1186/s13068-015-0271-6.
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., and Polz, M.F. (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology* **186**: 2629-2635.
- Adam, G., Lemaigre, S., Goux, X., Delfosse, P., and Romain, A.C. (2015) Upscaling of an electronic nose for completely stirred tank reactor stability monitoring from pilot-scale to real-scale agricultural co-digestion biogas plant. *Bioresource Technology* **178**: 285-296.
- Adam, G., Lemaigre, S., Romain, A.C., Nicolas, J., and Delfosse, P. (2013) Evaluation of an electronic nose for the early detection of organic overload of anaerobic digesters. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **36**: 23-33.
- Advisory group on energy and climate change (2010). Energy for a Sustainable Future - Summary Report and Recommendations. <http://www.un.org/chinese/millenniumgoals/pdf/AGECCsummaryreport%5B1%5D.pdf>.
- Ahring, B.K., Sandberg, M., and Angelidaki, I. (1995) Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**: 559-565.
- Ahring, B. (2003) Perspectives for anaerobic digestion. In *Biomethanation I*. Ahring, B., Angelidaki, I., Macario, E.C., Gavala, H.N., Hofman-Bang, J., Macario, A.J.L. *et al.* (eds). Springer Berlin Heidelberg, 1-30.
- Akuzawa, M., Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2011) Distinctive responses of metabolically active microbiota to acidification in a thermophilic anaerobic digester. *Microbial Ecology* **61**: 595-605.
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., and Ahmad Asad, S. (2014) Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal* **2014**: 21 pages-<http://dx.doi.org/10.1155/2014/183752>.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Anderson, K., Sallis, P., and Uyanik, S. (2003) 24 - Anaerobic treatment processes. In *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Mara, D. and Horan, N. (eds). Academic Press, London, 391-426.
- Angelidaki, I. and Ahring, B.K. (1993) Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**: 560-564.

Angelidaki, I., Ellegaard, L., and Ahring, B.K. (1993) A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* **42**: 159-166.

Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., and Stams, A.J.M. (2011) Biomethane and its potential. *Methods in Enzymology* **494**: 327-351.

Angelidaki, I., Chen, X., Cui, J., Kaparaju, P., and Ellegaard, L. (2006) Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: start-up procedure for continuously stirred tank reactor. *Water Research* **40**: 2621-2628.

Angenent, L.T., Sung, S., and Raskin, L. (2002) Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Research* **36**: 4648-4654.

Anonymous (2006) *VDI 4630 - Vergärung organischer stoffe (german guideline: fermentation of organic materials - characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests)*. Beuth Verlag GmbH edn, Berlin.

Appels, L., Lauwers, J., Degrève, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K. *et al.* (2011) Anaerobic digestion in global bio-energy production: potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**: 4295-4301.

Archer, D.B. and Kirsop, B.H. (1990) The microbiology and control of anaerobic digestion. In *Anaerobic Digestion: a waste treatment technology*. Wheatley A. (ed). London (UK): 43-91.

Barber, W.P. and Stuckey, D.C. (1999) The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: a review. *Water Research* **33**: 1559-1578.

Bartram, A.K., Lynch, M.D.J., Stearns, J.C., Moreno-Hagelsieb, G., and Neufeld, J.D. (2011) Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 3486-3852.

Bent, S.J. and Forney, L.J. (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME Journal* **2**: 689-695.

Bergmann, I. (2012) *Characterization of methanogenic Archaea communities in biogas reactors by quantitative PCR*. Thesis/Dissertation, Fakultät III - Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin, 1-187.

Bergmann, I., Mundt, K., Sontag, M., Baumstark, I., Nettmann, E., and Klocke, M. (2010a) Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and Applied Microbiology* **33**: 78-84.

Bergmann, I., Nettmann, E., Mundt, K., and Klocke, M. (2010b) Determination of methanogenic Archaea abundance in a mesophilic biogas plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* **56**: 440-444.

- Berry, D., Ben Mahfoudh, K., Wagner, M., and Loy, A. (2011) Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7846-7849.
- Blume, F., Bergmann, I., Nettmann, E., Schelle, H., Rehde, G., Mundt, K., and Klocke, M. (2010) Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *Journal of Applied Microbiology* **109**: 441-450.
- Bohlool, B.B. and Schmidt, E. (1980) The immunofluorescence approach in microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* **4**: 203-241.
- Boone, D.R. and Mah, R. (1987) Transitional Bacteria. In *Anaerobic Digestion of Biomass*. Chynoweth, D.P. and Isaacson, R. (eds). Elsevier Applied Science, London: 35-48.
- Boyle, W.C. (1976) Energy recovery from sanitary landfills - a review. In *Microbial Energy Conversion*. Schlegel, H.G. and Barnea, S. (eds). Pergamon Press, Oxford: 119-138.
- Braker, G., Ayala-del-Río, H.L., Devol, A.H., Fesefeldt, A., and Tiedje, J.M. (2001) Community structure of denitrifiers, Bacteria, and Archaea along redox gradients in pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (nirS) and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1893-1901.
- Bray, J.R. and Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**: 325-349.
- Broughton, L.C. and Gross, K.L. (1999) Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia* **125**: 420-427.
- Brown, M.V., Schwabach, M.S., Hewson, I., and Fuhrman, J.A. (2005) Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environmental Microbiology* **7**: 1466-1479.
- Buffiere, P., Delgadillo Mirquez, L., Steyer, J.P., Bernet, N., and Delgenes, J.D. (2008) Anaerobic digestion of solid wastes needs research to face an increasing industrial success. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **6**: A94.
- Buhr, H.O. and Andrews, J.F. (1977) The thermophilic anaerobic digestion process. *Water Research* **11**: 129-143.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M.W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34**: 597-601.
- Buswell, A.M. and Mueller, H.F. (1952) Mechanism of Methane Fermentation. *Industrial & Engineering Chemistry* **44**: 550-552.
- Buyer, J.S., Roberts, D.P., Millner, P., and Russek-Cohen, E. (2001) Analysis of fungal communities by sole carbon source utilization profiles. *Journal of Microbiological Methods* **45**: 53-60.

- Calusinska, M., Marynowska, M., Goux, X., Lentzen, E., and Delfosse, P. (2014) DNA and RNA metagenomic analyses of viral communities occurring in different types of anaerobic reactors. Conference Proceeding, *2nd International Conference on Biogas Microbiology*. P5. Uppsala, Sweden. 10/12-6-2014.
- Camacho, P. and Prévot, C. (2011) Méthanisation des boues. In *La méthanisation, 2e édition*. René Moletta (coordonnateur) (ed). Lavoisier, Paris: 201-229.
- Camarinha-Silva, A., Wos-Oxley, M.L., Jáuregui, R., Becker, K., and Pieper, D.H. (2012) Validating T-RFLP as a sensitive and high-throughput approach to assess bacterial diversity patterns in human anterior nares. *FEMS Microbiology Ecology* **79**: 98-108.
- Carballa, M., Regueiro, L., and Lema, J.M. (2015) Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology* **33**: 103-111.
- Carballa, M., Smits, M., Etchebehere, C., Boon, N., and Verstraete, W. (2011) Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**: 303-314.
- Cheeseman, P., Toms-Wood, A., and Wolfe, R.S. (1972) Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from Methanobacterium Strain M.o.H. *Journal of Bacteriology* **112**: 527-531.
- Chen, Y., Cheng, J.J., and Creamer, K.S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology* **99**: 4044-4064.
- Cheng, Y.F., Edwards, J.E., Allison, G.G., Zhu, W.Y., and Theodorou, M.K. (2009) Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresource Technology* **100**: 4821-4828.
- Ciesielski, S., Bulkowska, K., Dabrowska, D., Kaczmarczyk, D., Kowal, P., and Mozejko, J. (2013) Ribosomal intergenic spacer analysis as a tool for monitoring methanogenic archaea changes in an anaerobic digester. *Current Microbiology* **67**: 240-248.
- Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S.Jr., Bult, C., and Fields, C. (1995) Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 595-599.
- Collins, G., Woods, A., McHugh, S., Carton, M.W., and O'Flaherty, V. (2003) Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology* **46**: 159-170.
- Connors, S.B., Mongodin, E.F., Johnson, M.R., Montero, C.I., Nelson, K.E., and Kelly, R.M. (2006) Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species. *FEMS Microbiology Reviews* **30**: 872-905.
- Core Team, R.D. (2008) *R: a language and environment for statistical computing*. The R foundation for statistical computing edn. Vienna, Austria.

- Cox, M.J., Cookson, W.O.C.M., and Moffatt, M.F. (2013) Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics* **22**: R88-R94.
- Crowley, T.J. (2000) Causes of climate change over the past 1000 years. *Science* **289**: 270-277.
- Culman, S., Bukowski, R., Gauch, H., Cadillo-Quiroz, H., and Buckley, D. (2009) T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* **10**: 171.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., and Verstraete, W. (2012) Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* **112**: 1-9.
- De Vrieze, J., Verstraete, W., and Boon, N. (2013) Repeated pulse feeding induces functional stability in anaerobic digestion. *Microbial Biotechnology* **6**: 414-424.
- Delbès, C., Moletta, R., and Godon, J.J. (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 19-26.
- Demirel, B. and Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **7**: 173-190.
- Devillard, E., Newbold, C.J., Scott, K.P., Forano, E., Wallace, R.J., Jouany, J.P., and Flint, H.J. (1999) A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* shows close sequence similarity to family 11 xylanases from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **181**: 145-152.
- Dickens, H.E. and Anderson, J.M. (1999) Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soils using chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 2049-2058.
- Dobranic, J.K. and Zak, J.C. (1999) A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Mycologia* **91**: 756-765.
- Dolfing, J. and Tiedje, J.M. (1988) Acetate inhibition of methanogenic, syntrophic benzoate degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1871-1873.
- Dridi, B., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Raoult, D., and Drancourt, M. (2012) *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human feces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**: 1902-1907.
- Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3035-3045.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 190-197.

Durbin, A.M. and Teske, A. (2012) Archaea in organic-lean and organic-rich marine subsurface sediments: an environmental gradient reflected in distinct phylogenetic lineages. *Frontiers in Microbiology* **3**:168: doi:10.3389/fmicb.2012.00168.

Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.

Egert, M., Wagner, B., Lemke, T., Brune, A., and Friedrich, M.W. (2003) Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6659-6668.

el Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., and Top, E.M. (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 982-988.

Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., and Thurston, R.V. (1975) Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **32**: 2379-2383.

Engeli, H., Edelman, W., Fuchs, J., and Rottermann, K. (1993) Survival of plant pathogens and weed seeds during anaerobic digestion. *Water Science & Technology* **27**: 69-76.

Escudié, R., Cresson, R., Delgenès, J.P., and Bernet, N. (2011) Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: an overview of 15 years of research. *Water Research* **45**: 1-10.

European Commission (2011) *Energy roadmap 2050*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

European Parliament and Council (2009) Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC. *Official Journal of the European Union* 16-62.

Falk, M.W., Song, K.G., Matiassek, M.G., and Wuertz, S. (2009) Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors - natural reproducible fluctuations. *Water Research* **43**: 842-852.

Fisher, M.M. and Triplett, E.W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4630-4636.

Flint, H.J. and Bayer, E.A. (2008) Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 280-288.

Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C., and Insam, H. (2014) Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management* **34**: 2080-2089.

- Fuchs, B (2012) *Climate change and famine*. Physicians for social responsibility. <http://www.psr.org/environment-and-health/climate-change/climate-change-and-famine.pdf>.
- Gagliano, M.C., Braguglia, C.M., Gianico, A., Mininni, G., Nakamura, K., and Rossetti, S. (2015) Thermophilic anaerobic digestion of thermal pretreated sludge: role of microbial community structure and correlation with process performances. *Water Research* **68**: 498-509.
- Gagliardi, J.V., Buyer, J.S., Angle, J.S., and Russek-Cohen, E. (2001) Structural and functional analysis of whole-soil microbial communities for risk and efficacy testing following microbial inoculation of wheat roots in diverse soils. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 25-40.
- Gallert, C. and Winter, J. (2004) Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. In *Environmental Biotechnology. Concepts and Applications*. Jördening, H.J. and Winter, J. (eds). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1-48.
- Garcia, J.L., Patel, B.K.C., and Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**: 105-226.
- Garland, J.L. (1997) Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 289-300.
- Garland, J.L. and Mills, A.L. (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2351-2359.
- Gartiser, S., Urich, E., Alexy, R., and Kümmerer, K. (2007) Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. *Chemosphere* **66**: 1839-1848.
- Gentry, T.J., Wickham, G.S., Schadt, C.W., He, Z., and Zhou, J. (2006) Microarray applications in microbial ecology research. *Microbial Ecology* **52**: 159-175.
- Gerardi, M.H. (2003) *The microbiology of anaerobic digesters*. 1st ed. Somerset NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Goberna, M., Gadermaier, M., Franke-Whittle, I.H., García, C., Wett, B., and Insam, H. (2015) Start-up strategies in manure-fed biogas reactors: Process parameters and methanogenic communities. *Biomass and Bioenergy* **75**: 46-56.
- Godon, J.J. (2011) Aspects biochimiques et microbiologiques de la méthanisation. In *La méthanisation, 2e édition*. René Moletta (coordonnateur) (ed). Lavoisier, Paris: 61-85.
- Görisch, U. and Helm, M. (2006) *Biogasanlagen*. Stuttgart, Germany.
- Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T. *et al.* (2015) Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for Biofuels* **8**:122: doi: 10.1186/s13068-015-0309-9.

- Grayston, S.J. and Campbell, C.D. (1996) Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology* **16**: 1031-1038.
- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Lutze, J.L., and Gifford, R.M. (1998a) Impact of elevated CO₂ on the metabolic diversity of microbial communities in N-limited grass swards. *Plant and Soil* **203**: 289-300.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., and Edwards, A.C. (1998b) Selective influence of plant species and microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 369-378.
- Grobicki, A. and Stuckey, D.C. (1992) Hydrodynamic characteristics of the anaerobic baffled reactor. *Water Research* **26**: 371-378.
- Grosskopf, R., Janssen, P.H., and Liesack, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 960-969.
- Gunnerson, C.G. and Stuckey, D.C. (1986) *Anaerobic digestion: principles and practices for biogas system*. Washington, DC, World Bank (World Bank Technical Paper Number 49)
- Guo, X., Wang, C., Sun, F., Zhu, W., and Wu, W. (2014) A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. *Bioresour Technol* **152**: 420-428.
- Gürtler, V. and Stanisich, V.A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**: 3-16.
- Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994) Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews* **58**: 10-26.
- Hackstein, J.H.P. (2010) *(Endo)symbiotic methanogenic Archaea*. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., and Troedsson, C. (2014) Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal Eukaryote specific primers. *PLoS ONE* **9**: e87624-DOI: 10.1371/journal.pone.0087624.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., and Goodman, R.M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* **5**: R245-R249.
- Hashimoto, A.G. (1986) Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes* **17**: 241-261.
- Hattori, S. (2008) Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments* **23**: 118-127.

- Heeg, K., Pohl, M., Sontag, M., Mumme, J., Klocke, M., and Nettmann, E. (2014) Microbial communities involved in biogas production from wheat straw as the sole substrate within a two-phase solid-state anaerobic digestion. *Systematic and Applied Microbiology* **37**: 590-600.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* **11**: 1026-1030.
- Hill, D.T., Cobb, S.A., and Bolte, J.P. (1987) Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digester failure. *Transactions of the ASABE* **30**: 496-501.
- Hilpert, R., Winter, J., and Kandler, O. (1984) Agricultural feed additives and disinfectants as inhibitory factors in anaerobic digestion. *Agricultural Wastes* **10**: 103-116.
- Hobson, P.N. and Mann, S.O. (1957) Some studies on the identification of rumen bacteria with fluorescent antibody. *Journal of General Microbiology* **16**: 463-471.
- Hoffmann, R.A., Garcia, M.L., Veskivar, M., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., and Angenent, L.T. (2008) Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure. *Biotechnology and Bioengineering* **100**: 38-48.
- Hofman-Bang, J., Zheng, D., Westermann, P., Ahring, B.K., and Raskin, L. (2003) Molecular ecology of anaerobic reactor systems. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **81**: 151-203.
- Holben, W.E. and Harris, D. (1995) DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Molecular Ecology* **4**: 627-631.
- Holm-Nielsen, J.B., Al Seadi, T., and Oleskowicz-Popiel, P. (2009) The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology* **100**: 5478-5484.
- Hugenholtz, P. (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* **3**: reviews0003-reviews0003.8.
- Hugenholtz, P. and Tyson, G.W. (2008) Microbiology: metagenomics. *Nature* **455**: 481-483.
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P.N.L., Stams, A.J.M., and Lettinga, G. (1998) Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* **9**: 213-224.
- Ike, M., Inoue, D., Miyano, T., Liu, T.T., Sei, K., Soda, S., and Kadoshin, S. (2010) Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Koyoto eco-energy project. *Bioresource Technology* **101**: 3952-3957.
- Illmer, P. and Gstraunthaler, G. (2009) Effect of seasonal changes in quantities of biowaste on full scale anaerobic digester performance. *Waste Management* **29**: 162-167.
- Jang, H.M., Kim, J.H., Ha, J.H., and Park, J.M. (2014) Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater. *Bioresource Technology* **165**: 174-182.
- Jeris, J.S. and McCarty, P.L. (1965) The biochemistry of the methane fermentation using ¹⁴C tracers. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **37**: 178-192.

- Jin, P., Bhattacharya, S.K., Williams, C.J., and Zhang, H. (1998) Effects of sulfide addition on copper inhibition in methanogenic systems. *Water Research* **32**: 977-988.
- Kampmann, K., Ratering, S., Geißler-Plaum, R., Schmidt, M., Zerr, W., and Schnell, S. (2014) Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage. *Bioresource Technology* **174**: 108-117.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., and Angelidaki, I. (2005) Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 331-338.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Trably, E., and Angelidaki, I. (2006) Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5138-5141.
- Karim, K., Hoffmann, R., Thomas Klasson, K., and Al-Dahhan, M.H. (2005) Anaerobic digestion of animal waste: effect of mode of mixing. *Water Research* **39**: 3597-3606.
- Kayhanian, M. (1999) Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environmental Technology* **20**: 355-365.
- Kayhanian, M. (1994) Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *Journal of Chemical Technology Biotechnology* **59**: 349-352.
- Khodadad, C.L.M., Zimmerman, A.R., Green, S.J., Uthandi, S., and Foster, J.S. (2011) Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biology and Biochemistry* **43**: 385-392.
- Kim, J. and Lee, C. (2015) Response of a continuous biomethanation process to transient organic shock loads under controlled and uncontrolled pH conditions. *Water Research* **73**: 68-77.
- Kim, M., Gomec, C.Y., Ahn, Y., and Speece, R.E. (2003) Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Environmental Technology* **24**: 1183-1190.
- Kim, M., Ahn, Y.H., and Speece, R.E. (2002) Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Research* **36**: 4369-4385.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., and Trevors, J.T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **58**: 169-188.
- Kittelman, S., Seedorf, H., Walters, W.A., Clemente, J.C., Knight, R., Gordon, J.I., and Janssen, P.H. (2013) Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS ONE* **8**: e47879. doi:10.1371/journal.pone.0047879.
- Klang, J., Theuerl, S., Szewzyk, U., Huth, M., Tölle, R., and Klocke, M. (2015) Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. *Microbial Biotechnology* **8**: 764-775.

- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., and Schmidt, T.M. (2001) rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research* **29**: 181-184.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41**: e1. doi: 10.1093/nar/gks808.
- Klocke, M., Mähnert, P., Mundt, K., Souidi, K., and Linke, B. (2007) Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology* **30**: 139-151.
- Körner, S., Das, S.K., Veenstra, S., and Vermaat, J.E. (2001) The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany* **71**: 71-78.
- Kotzé, J.P., Thiel, P.G., and Hattingh, W.H.J. (1969) Anaerobic digestion II. The characterization and control of anaerobic digestion. *Water Research* **3**: 459-494.
- Kovacs, A., Yacoby, K., and Gophna, U. (2010) A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. *Research in Microbiology* **161**: 192-197.
- Kozdrój, J. and van Elsas, J.D. (2000) Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1405-1417.
- Kozdrój, J. and van Elsas, J.D. (2001a) Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Applied Soil Ecology* **17**: 31-42.
- Kozdrój, J. and van Elsas, J.D. (2001b) Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods* **43**: 197-212.
- Krakat, N., Schmidt, S., and Scherer, P. (2011) Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. *Bioresource Technology* **102**: 5692-5701.
- Kroeker, E.J., Schulte, D.D., Sparling, A.B., and Lapp, H.M. (1979) Anaerobic treatment process stability. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **51**: 718-727.
- Kundu, K., Sharma, S., and Sreekrishnan, T.R. (2012) Effect of operating temperatures on the microbial community profiles in a high cell density hybrid anaerobic bioreactor. *Bioresource Technology* **118**: 502-511.
- Kundu, K., Sharma, S., and Sreekrishnan, T.R. (2013) Changes in microbial communities in a hybrid anaerobic reactor with organic loading rate and temperature. *Bioresource Technology* **129**: 538-547.

Labatut, R.A., Angenent, L.T., and Scott, N.R. (2014) Conventional mesophilic vs. thermophilic anaerobic digestion: a trade-off between performance and stability? *Water Research* **53**: 249-258.

Lahav, L. and Steinberger, Y. (2001) Soil bacterial functional diversity in a potato field. *European Journal of Soil Biology* **37**: 59-67.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds). New York: John Wiley & Sons, 115-175.

Lau, L.C., Lee, K.T., and Mohamed, A.R. (2012) Global warming mitigation and renewable energy policy development from the Kyoto Protocol to the Copenhagen Accord-a comment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**: 5280-5284.

Lawlor, K., Knight, B.P., Barbosa-Jefferson, V.L., Lane, P.W., Lilley, A.K., Paton, G.I. *et al.* (2000) Comparison of methods to investigate microbial populations in soils under different agricultural management. *FEMS Microbiology Ecology* **33**: 129-137.

Leite, D.C.A., Balieiro, F.C., Pires, C.A., Madari, B.E., Rosado, A.S., Coutinho, H.L.C., and Peixoto, R.S. (2014) Comparison of DNA extraction protocols for microbial communities from soil treated with biochar. *Brazilian Journal of Microbiology* **45**: 175-183.

Lerm, S., Kleyböcker, A., Miethling-Graff, R., Alawi, M., Kasina, M., Liebrich, M., and Würdemann, H. (2012) Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. *Waste Management* **32**: 389-399.

Leven, L., Eriksson, A.R.B., and Schnürer, A. (2007) Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 683-693.

LfU, (2007) *Biogashandbuch Bayern - Materialband*. Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg, Germany.

Li, L., He, Q., Ma, Y., Wang, X., and Peng, X. (2015) Dynamics of microbial community in a mesophilic anaerobic digester treating food waste: Relationship between community structure and process stability. *Bioresour Technol* **189**: 113-120.

Li, Y.F., Chen, P.H., and Yu, Z. (2014) Spatial and temporal variations of microbial community in a mixed plug-flow loop reactor fed with dairy manure. *Microbial Biotechnology* **7**: 332-346.

Limam, R.D., Chouari, R., Mazéas, L., Wu, T.D., Li, T., Grossin-Debattista, J. *et al.* (2014) Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. *MicrobiologyOpen* **3**: 157-167.

Liu, S., Zhu, N., Li, L.Y., and Yuan, H. (2011) Isolation, identification and utilization of thermophilic strains in aerobic digestion of sewage sludge. *Water Research* **45**: 5959-5968.

Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522.

- Liu, Y. and Whitman, W.B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 171-189.
- Loftin, K.A., Henny, C., Adams, C.D., Surampali, R., and Mormile, M.R. (2005) Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**: 782-788.
- Lueders, T. and Friedrich, M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2732-2742.
- Lukow, T., Dunfield, P.F., and Liesack, W. (2000) Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology* **32**: 241-247.
- Lupwayi, N.Z., Arshad, M.A., Rice, W.A., and Clayton, G.W. (2001) Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Applied Soil Ecology* **16**: 251-261.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W. (2002) The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**: 3521-3530.
- Makádi, M., Tomócsik, A., and Orosz, V. (2012) Digestate: a new nutrient source - review. In *BioGas*. Sunil Kumar (ed). InTech Rijeka, doi: 10.5772/31355
- Malin, C. and Illmer, P. (2008) Ability of DNA content and DGGE analysis to reflect the performance condition of an anaerobic biowaste fermenter. *Microbiological Research* **163**: 503-511.
- Marchaim, U. and Krause, C. (1993) Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Bioresource Technology* **43**: 195-203.
- Mardis, E.R. (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* **24**: 133-141.
- Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., and Ng, W.J. (2015) Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems - Performance and microbial community dynamics. *Chemosphere* **140**: 54-62.
- Mayer, F., Gerin, P.A., Noo, A., Foucart, G., Flammang, J., Lemaigre, S. *et al.* (2014) Assessment of factors influencing the biomethane yield of maize silages. *Bioresource Technology* **153**: 260-268.
- McCarty, P.L. and Smith, D.P. (1986) Anaerobic wastewater treatment. *Environmental Science & Technology* **20**: 1200-1206.
- McHugh, S., Carton, M., Mahony, T., and O'Flaherty, V. (2003) Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters* **219**: 297-304.

- Merlino, G., Rizzi, A., Schievano, A., Tenca, A., Scaglia, B., Oberti, R. *et al.* (2013) Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Research* **47**: 1983-1995.
- Moletta, R. (2011) *La méthanisation (2e édition)*. Lavoisier, Paris.
- Moletta, R. and Verstraete, W. (2011) La méthanisation dans la problématique énergétique et environnementale. In *La méthanisation, 2e édition*. René Moletta (coordonnateur) (ed). Lavoisier, Paris: 3-8.
- Möller, K. and Müller, T. (2012) Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: a review. *Engineering in Life Sciences* **12**: 242-257.
- Möller, K. and Stinner, W. (2009) Effects of different manuring systems with and without biogas digestion on soil mineral nitrogen content and on gaseous nitrogen losses (ammonia, nitrous oxides). *European Journal of Agronomy* **30**: 1-16.
- Muller, E.L.E., Heintz-Buschart, A., Roume, H., Lebrun, L., and Wilmes, P. (2014) The sequential isolation of metabolites, RNA, DNA, and proteins from a single, undivided mixed microbial community sample. *Protocol exchange* doi:10.1038/protex.2014.051.
- Muralidharan, V., Rinker, K.D., Hirsh, I.S., Bouwer, E.J., and Kelly, R.M. (1997) Hydrogen transfer between methanogens and fermentative heterotrophs in hyperthermophilic cocultures. *Biotechnology and Bioengineering* **56**: 268-278.
- Murto, M., Björnsson, L., and Mattiasson, B. (2004) Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management* **70**: 101-107.
- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S., and Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **13**: 3131-3145.
- Nesbo, C.L., Dlutek, M., Zhaxybayeva, O., and Doolittle, W.F. (2006) Evidence for existence of Mesotogas, members of the order Thermotogales adapted to low-temperature environments. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5061-5068.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., and Klocke, M. (2008) Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1835-1850.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., and Klocke, M. (2010) Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2540-2548.
- Nielsen, H.B., Uellendahl, H., and Ahring, B.K. (2007) Regulation and optimization of the biogas process: propionate as a key parameter. *Biomass Bioenergy* **31**: 820-830.
- Nocker, A., Burr, M., and Camper, A. (2007) Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology* **54**: 276-289.

- Noike, T., Endo, G., Chang, J.E., Yaguchi, J.I., and Matsumoto, J.I. (1985) Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering* **27**: 1482-1489.
- Oleszkiewicz, J.A. and Sharma, V.K. (1990) Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals: a review. *Biological Wastes* **31**: 45-67.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., and Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **2**: 39-50.
- Padmasiri, S.I., Zhang, J., Fitch, M., Norddahl, B., Morgenroth, E., and Raskin, L. (2007) Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water Research* **41**: 134-144.
- Pain, B.F. and Hephherd, R.Q. (1985) Anaerobic digestion of livestock wastes. In *Anaerobic digestion of farm wastes. NIRD Technical Bulletins*. Pain, B. F. and Hephherd, R. Q. (eds), 9-14.
- Pain, B.F., Misselbrook, T.H., Clarkson, C.R., and Rees, Y.J. (1990) Odour and ammonia emissions following the spreading of anaerobically-digested pig slurry on grassland. *Biological Wastes* **34**: 259-267.
- Pelletier, E., Kreymeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R. *et al.* (2008) "Candidatus Cloacamonas acidaminovorans": genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *Journal of Bacteriology* **190**: 2572-2579.
- Pennanen, T., Perkiömäki, J., Kiikkilä, O., Vanhala, P., Neuvonen, S., and Fritze, H. (1998) Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 291-300.
- Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 537-546.
- Pervin, H.M., Dennis, P.G., Lim, H.J., Tyson, G.W., Batstone, D.J., Bond, P.L. (2013) Drivers of microbial community composition in mesophilic and thermophilic temperature-phased anaerobic digestion pre-treatment reactors. *Water Research* **47**: 7098-7108.
- Pielou, E.C. (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* **13**: 131-144.
- Pilloni, G., Granitsiotis, M.S., Engel, M., and Lueders, T. (2012) Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility. Quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. *PLoS ONE* **7**: e40467.
- Pirsaheb, M., Rostamifar, M., Mansouri, A.M., Zinatizadeh, A.A.L., and Sharafi, K. (2015) Performance of an anaerobic baffled reactor (ABR) treating high strength baker's yeast manufacturing wastewater. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **47**: 137-148.
- Pohland, F.G. and Ghosh, S. (1971) Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two-phase concept. *Environmental Letters* **1**: 255-266.

- Priya, M., Haridas, A., and Manilal, V.B. (2007) Involvement of protozoa in anaerobic wastewater treatment process. *Water Research* **41**: 4639-4645.
- Qiu, Y.L., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Tseng, I.C., Cheng, S.S. *et al.* (2004) Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomer-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1617-1626.
- Rademacher, A., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Schönberg, M., Szczepanowski, R., Goesmann, A. *et al.* (2012) Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology* **79**: 785-799.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbière, F., Thioulouse, J., and Nazaret, S. (2000a) Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology* **39**: 263-272.
- Ranjard, L., Poly, F., and Nazaret, S. (2000b) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **151**: 167-177.
- Rastogi, G. and Sani, R. (2011) Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In *Microbes and Microbial Technology*. Ahmad, I., Ahmad, F., and Pichtel, J. (eds). Springer, New York, 29-57.
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Lema, J., and Carballa, M. (2014) Influence of transitional states on the microbial ecology of anaerobic digesters treating solid wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 2015-2027.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics* **38**: 525-552.
- Rincon-Florez, V.A., Carvalhais, L.C., and Schenk, P.M. (2013) Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. *Diversity* **5**: 581-612.
- Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., and Halden, R.U. (2008) Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 604-612.
- Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J. *et al.* (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME Journal* **3**: 700-714.
- Roume, H., Muller, E.L.E., Cordes, T., Renaut, J., Hiller, K., and Wilmes, P. (2012) A biomolecular isolation framework for eco-systems biology. *The ISME Journal* **7**: 121.
- Sakar, S., Yetilmezsoy, K., and Kocak, E. (2009) Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment - a literature review. *Waste Management & Research* **27**: 3-18.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467.

- Santos, H.F., Cury, J.C., Carmo, F.L., Rosado, A.S., and Peixoto, R.S. (2010) 18S rDNA sequences from microeukaryotes reveal oil indicators in mangrove sediment. *PLoS ONE* **5**: e12437.
- Sanz, J.L., Rodríguez, N., and Amils, R. (1996) The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**: 587-592.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 262-280.
- Schink, B. (2008) Energetic aspects of methanogenic feeding webs. In *Bioenergy*. Wall, J.D., Harwood, C.S., and Demain, A. (eds). Washington DC: ASM Press, 171-178.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. *et al.* (2009) Introducing mothur: open-Source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537-7541.
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N.N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H. *et al.* (2008) The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* **136**: 77-90.
- Schmidt, E.L. (1973) Fluorescent antibody techniques for the study of microbial ecology. *Bulletins from the Ecological Research Committee* **17**: 67-76.
- Schnürer, A., Houwen, F., and Svensson, B. (1994) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. *Archives of Microbiology* **162**: 70-74.
- Schnürer, A. and Jarvis, A. (2010) Microbiological handbook for biogas plants. Swedish Gas Centre report 207.
- Schnürer, A. and Nordberg, A. (2008) Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Science and Technology* **57**: 735-740.
- Schnürer, A., Zellner, G., and Svensson, B.H. (1999) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology Ecology* **29**: 249-261.
- Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.
- Shendure, J. and Ji, H. (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**: 1135-1145.
- Sigler, W.V. and Zeyer, J. (2002) Microbial diversity and activity along the forefields of two receding glaciers. *Microbial Ecology* **43**: 397-407.
- Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.

Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R. *et al.* (2007) Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* **69**: 470-479.

Smith, C.J. and Osborn, A.M. (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 6-20.

Smith, P.H. and Mah, R.A. (1966) Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Applied Microbiology* **14**: 371.

Solli, L., Havelsrud, O., Horn, S., and Rike, A. (2014) A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnology for Biofuels* **7**:146: doi: 10.1186/s13068-014-0146-2.

Sørensen, T. (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Biologiske Skrifter* **5**: 1-34.

Speece, R.E. (1996) *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae press, Nashville.

St-Pierre, B. and Wright, A.D. (2013) Metagenomic analysis of methanogen populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters operated on dairy farms in Vermont, USA. *Bioresource Technology* **138**: 277-284.

Stafford, D.A., Hawkes, D.I., and Horton, R. (1980) *Methane production from waste organic matter*. CRC Press, Boca Raton.

Staley, J.T. and Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* **39**: 321-346.

Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H. *et al.* (2013) 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiology Ecology* **85**: 612-626.

Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., and Massé, D.I. (2008) Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* **42**: 513-537.

Tale, V.P., Maki, J.S., and Zitomer, D.H. (2015) Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community. *Water Research* **70**: 138-147.

Ter Braak, C.J. (1987) The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**: 69-77.

Thingstad, T.F. and Lignell, R. (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology* **13**: 19-27.

Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L., and Flynn, S.J. (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* **13**: 109-122.

- Tipayno, S., Kim, C.G., and Sa, T. (2012) T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *Applied Soil Ecology* **61**: 137-146.
- Toerien, D.F. and Hattingh, W.H.J. (1969) Anaerobic digestion I. The microbiology of anaerobic digestion. *Water Research* **3**: 385-416.
- Toerien, D.F., Thiel, P.G., and Hattingh, M.M. (1968) Enumeration, isolation and identification of sulphate-reducing bacteria of anaerobic digestion. *Water Research* **2**: 505-513.
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., and Øvreås, L. (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64**: 53-62.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., and Daae, F.L. (1990a) High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 782-787.
- Torsvik, V., Salte, K., Sørheim, R., and Goksøyr, J. (1990b) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 776-781.
- United Nations framework convention on climate change (2009). Rapport de la quinzième session de la Conférence des parties tenue à Copenhague du 7 au 19 décembre 2009. <http://unfccc.int/resource/docs/2009/cop15/fre/11a01f.pdf>.
- United Nations framework convention on climate change (1998). Protocole de Kyoto à la convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques. <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpfrench.pdf>.
- Uyanik, S., Sallis, P.J., and Anderson, G.K. (2002) The effect of polymer addition on granulation in an anaerobic baffled reactor (ABR). Part I: process performance. *Water Research* **36**: 933-943.
- Van de Peer, Y., Van der Auwera, G., and De Wachter, R. (1996) The evolution of stramenopiles and alveolates as derived by "substitution rate calibration" of small ribosomal subunit RNA. *Journal of Molecular Evolution* **42**: 201-210.
- van Haandel, A., De Vrieze, J., Verstraete, W., and dos Santos, V.S. (2014) Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **89**: 1751-1759.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Rabaey, K., and Tyson, G.W. (2015) Temperature and solids retention time control microbial population dynamics and volatile fatty acid production in replicated anaerobic digesters. *Scientific Reports* **5**: doi: 10.1038/srep08496.
- Vetrovsky, T. and Baldrian, P. (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE* **8**: e57923.

- von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213-229.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., and Schleifer, K.H. (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1520-1525.
- Wang, J., Huang, Y., and Zhao, X. (2004a) Performance and characteristics of an anaerobic baffled reactor. *Bioresource Technology* **93**: 205-208.
- Wang, M., Ahrné, S., Antonsson, M., and Molin, G. (2004b) T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *Journal of Microbiological Methods* **59**: 53-69.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., and Jones, D.L. (2008) Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* **99**: 7928-7940.
- Webb, A.R. and Hawkes, F.R. (1985) The anaerobic digestion of poultry manure: variation of gas yield with influent concentration and ammonium-nitrogen levels. *Agricultural Wastes* **14**: 135-156.
- Weiland, P. and Rozzi, A. (1991) The start-up, operation and monitoring of high-rate anaerobic treatment systems: discussor's report. *Water Science and Technology* **24**: 257-277.
- Weiland, P. (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 849-860.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
- Werner, J.J., Garcia, M.L., Perkins, S.D., Yarasheski, K.E., Smith, S.R., Muegge, B.D. *et al.* (2014) Microbial community dynamics and stability during an ammonia-induced shift to syntrophic acetate oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 3375-3383.
- Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K. *et al.* (2011) Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4158-4163.
- Westover, K.M., Kennedy, A.C., and Kelley, S.E. (1997) Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *Journal of Ecology* **85**: 863-873.
- Wilkie, A.C. (2005) Anaerobic digestion: biology and benefits. In *Dairy Manure Management: Treatment, Handling, and Community Relations*. NRAES-176, Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service, Cornell University, Ithaca, 63-72.
- Wilkie, A.C. (2008) Biomethane from biomass, biowaste, and biofuels. In *Bioenergy*. Wall, J.D., Harwood, C.S., and Demain, A. (eds). ASM Press edition, Washington: 195-205.

- Wilson, C.A., Murthy, S.M., Fang, Y., and Novak, J.T. (2008) The effect of temperature on the performance and stability of thermophilic anaerobic digestion. *Water Science and Technology* **57**: 297-304.
- Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R.U., and Lueders, T. (2008) Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 792-801.
- Wittmann, C., Zeng, A.P., and Deckwer, W.D. (1995) Growth inhibition by ammonia and use of a pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**: 519-525.
- Wünsche, L., Brüggemann, L., and Babel, W. (1995) Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiology Ecology* **17**: 295-305.
- Yamamoto, K., Tamaki, H., Cadillo-Quiroz, H., Imachi, H., Kyrpides, N., Woyke, T. *et al.* (2014) Complete genome sequence of *Methanolinea tarda* NOBI-1(T), a hydrogenotrophic methanogen isolated from methanogenic digester sludge. *Genome Announcements* **2**: e00876-14.
- Yamamoto, N., Asano, R., Yoshii, H., Otawa, K., and Nakai, Y. (2011) Archaeal community dynamics and detection of ammonia-oxidizing archaea during composting of cattle manure using culture-independent DNA analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**: 1501-1510.
- Yenigün, O. and Demirel, B. (2013) Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. *Process Biochemistry* **48**: 901-911.
- Yiridoe, E.K., Gordon, R., and Brown, B.B. (2009) Nonmarket cobenefits and economic feasibility of on-farm biogas energy production. *Energy Policy* **37**: 1170-1179.
- Yu, H.Q. and Fang, H.H.P. (2002) Acidogenesis of dairy wastewater at various pH levels. *Water Science & Technology* **45**: 201-206.
- Yubuki, N., Leander, B.S., and Silberman, J.D. (2010) Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a novel phagotrophic stramenopile from low oxygen environments: *Rictus lutensis* gen. et sp. nov. (Bicosoecida, incertae sedis). *Protist* **161**: 264-278.
- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., and Wildman, H.G. (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1101-1108.
- Zheng, D. and Raskin, L. (2000) Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. *Microbial Ecology* **39**: 246-262.
- Ziganshina, E.E., Bagmanova, A.R., Khilyas, I.V., and Ziganshin, A.M. (2014) Assessment of a biogas-generating microbial community in a pilot-scale anaerobic reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **117**: 730-736.

Zinder, S. and Koch, M. (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology* **138**: 263-272.

Annexes

Annexe 1

Table S1 - Community diversity and evenness indices for the four reactors CR, R1-R3

	CR			R1			R2			R3			
	Sampling period	<i>H'</i>	<i>J</i>	<i>Richness</i>	<i>H'</i>	<i>J</i>	<i>Richness</i>	<i>H'</i>	<i>J</i>	<i>Richness</i>	<i>H'</i>	<i>J</i>	<i>Richness</i>
Bacteria T-RFLP	P0	2.71 ± 0.20 a	0.87 ± 0.04 c	8.7 ± 0.6 a	2.96 ± 0.13 b	0.89 ± 0.00 d	10.0 ± 1.0 ab	2.37 ± 0.10 ab	0.85 ± 0.03 b	7.0 ± 1.0 a	2.63 ± 0.07 c	0.83 ± 0.02 b	9.0 ± 0.0 b
	P1	2.74 ± 0.05 a	0.81 ± 0.00 ab	10.3 ± 0.6 a	3.04 ± 0.03 b	0.88 ± 0.01 c	11.0 ± 0.0 b	2.27 ± 0.06 a	0.74 ± 0.01 a	8.3 ± 0.6 b	2.62 ± 0.03 c	0.83 ± 0.01 b	9.0 ± 0.0 b
	P2	2.62 ± 0.08 a	0.81 ± 0.00 ab	9.3 ± 0.6 a	2.69 ± 0.01 a	0.85 ± 0.00 b	9.0 ± 0.0 a	2.83 ± 0.02 c	0.82 ± 0.01 b	11.0 ± 0.0 c	2.48 ± 0.07 bc	0.86 ± 0.01 cd	7.3 ± 0.6 a
	P3	2.73 ± 0.05 a	0.85 ± 0.01 bc	9.3 ± 0.6 a	3.01 ± 0.01 b	0.91 ± 0.00 e	10.0 ± 0.0 ab	2.47 ± 0.25 ab	0.83 ± 0.03 b	8.0 ± 1.0 ab	3.08 ± 0.00 d	0.89 ± 0.00 d	11.0 ± 0.0 c
	P4	2.45 ± 0.42 a	0.81 ± 0.03 ab	8.3 ± 2.3 a	2.65 ± 0.05 a	0.81 ± 0.01 a	9.7 ± 0.6 a	2.78 ± 0.08 c	0.82 ± 0.01 b	10.3 ± 0.6 c	2.16 ± 0.26 a	0.76 ± 0.02 a	7.3 ± 1.5 a
	P5	2.32 ± 0.01 a	0.77 ± 0.00 a	8.0 ± 0.0 a	3.21 ± 0.00 c	0.93 ± 0.00 f	11.0 ± 0.0 b	2.50 ± 0.05 b	0.85 ± 0.02 b	7.7 ± 0.6 ab	2.37 ± 0.02 ab	0.84 ± 0.00 bc	7.0 ± 0.0 a
Bacteria HTS	P0	4.74	0.60	242	4.97	0.62	263	3.54	0.46	216	4.52	0.57	247
	P1	4.09	0.52	246	4.96	0.57	239	4.08	0.51	268	4.35	0.55	248
	P2	4.22	0.53	245	4.06	0.53	203	3.54	0.47	193	3.90	0.50	216
	P3	4.04	0.51	239	-	-	-	4.04	0.53	194	4.37	0.57	212
	P4	3.42	0.44	209	-	-	-	3.90	0.51	194	4.19	0.55	205
	P5	4.06	0.51	239	5.16	0.65	249	4.24	0.55	199	4.97	0.63	229
Archaea T-RFLP	P0	1.09 ± 0.15 ac	0.52 ± 0.03 bc	4.3 ± 0.6 a	1.35 ± 0.00 ab	0.00 ± 0.00 a	6.0 ± 0.0 ab	0.58 ± 0.00 a	0.36 ± 0.00 a	3.0 ± 0.0 ab	1.21 ± 0.11 b	0.53 ± 0.05 bc	5.0 ± 1.4 ab
	P1	0.83 ± 0.07 a	0.41 ± 0.03 a	4.0 ± 0.0 a	1.17 ± 0.15 a	0.51 ± 0.00 b	5.0 ± 1.0 a	1.00 ± 0.07 a	0.50 ± 0.03 a	4.0 ± 0.0 b	0.84 ± 0.14 ab	0.42 ± 0.07 ab	4.0 ± 0.0 a
	P2	1.10 ± 0.18 ac	0.49 ± 0.04 ab	4.7 ± 0.6 a	1.87 ± 0.29 bc	0.68 ± 0.08 c	6.7 ± 0.6 ac	1.80 ± 0.08 b	0.66 ± 0.04 b	6.7 ± 0.6 bc	0.61 ± 0.19 a	0.32 ± 0.07 a	3.7 ± 0.6 a
	P3	1.31 ± 0.33 bc	0.53 ± 0.05 bc	5.7 ± 1.3 a	2.30 ± 0.33 cd	0.71 ± 0.05 c	9.3 ± 1.5 b	2.60 ± 0.64 c	0.80 ± 0.07 c	9.7 ± 3.2 c	1.72 ± 0.07 c	0.61 ± 0.02 cd	7.0 ± 0.0 cd
	P4	0.96 ± 0.11 ab	0.46 ± 0.03 ab	4.3 ± 0.6 a	1.80 ± 0.24 bc	0.61 ± 0.06 bc	7.7 ± 1.5 bc	2.31 ± 0.16 bc	0.79 ± 0.01 c	7.7 ± 1.2 ac	1.71 ± 0.22 c	0.59 ± 0.06 cd	7.3 ± 0.6 d
	P5	1.38 ± 0.21c	0.59 ± 0.09 c	5.0 ± 0.0 a	2.85 ± 0.08 d	0.87 ± 0.00 d	9.7 ± 0.6 b	1.94 ± 0.20 bc	0.68 ± 0.04 b	7.3 ± 0.6 bc	1.66 ± 0.15 c	0.67 ± 0.03 d	5.7 ± 0.6 bc
Archaea HTS	P0	2.66	0.80	10	2.77	0.77	12	2.25	0.65	11	2.66	0.77	11
	P1	2.38	0.72	10	2.48	0.69	12	2.66	0.84	9	2.30	0.69	10
	P2	2.22	0.67	11	2.35	0.66	12	2.53	0.76	10	2.14	0.60	12
	P3	2.28	0.66	11	-	-	-	2.69	0.75	12	1.64	0.46	12
	P4	2.37	0.68	11	-	-	-	2.67	0.80	10	1.49	0.40	13
	P5	2.11	0.59	12	2.67	0.84	9	2.24	0.65	11	1.29	0.35	13

H': Shannon-Weaver index; *J*: Pielou index; P0-P5 are the sampling periods chosen for microbial community analysis; CR is the cautiously fed reactor; R1-R3 are the reactors exposed to increasing organic loading rate, T-TRFLP: results from the 16S rRNA gene-based T-RFLP analysis, HTS: results from the high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. Statistical analyses were performed using linear mixed-effects models combined to a pairwise test (Tukey) for results of the 16S rRNA gene-based T-RFLP analysis, figures holding the same letter in a column and for one taxonomic domain (Bacteria or Archaea) do not differ significantly ($p \leq 0.05$); there were no replicate for the HTS analysis.

Annexe 1

Table S2, S3 and S4 (in an excel file) are available by following this link:

<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/supplementary/s13068-015-0309-9-s2.xlsx>

Annexe 2

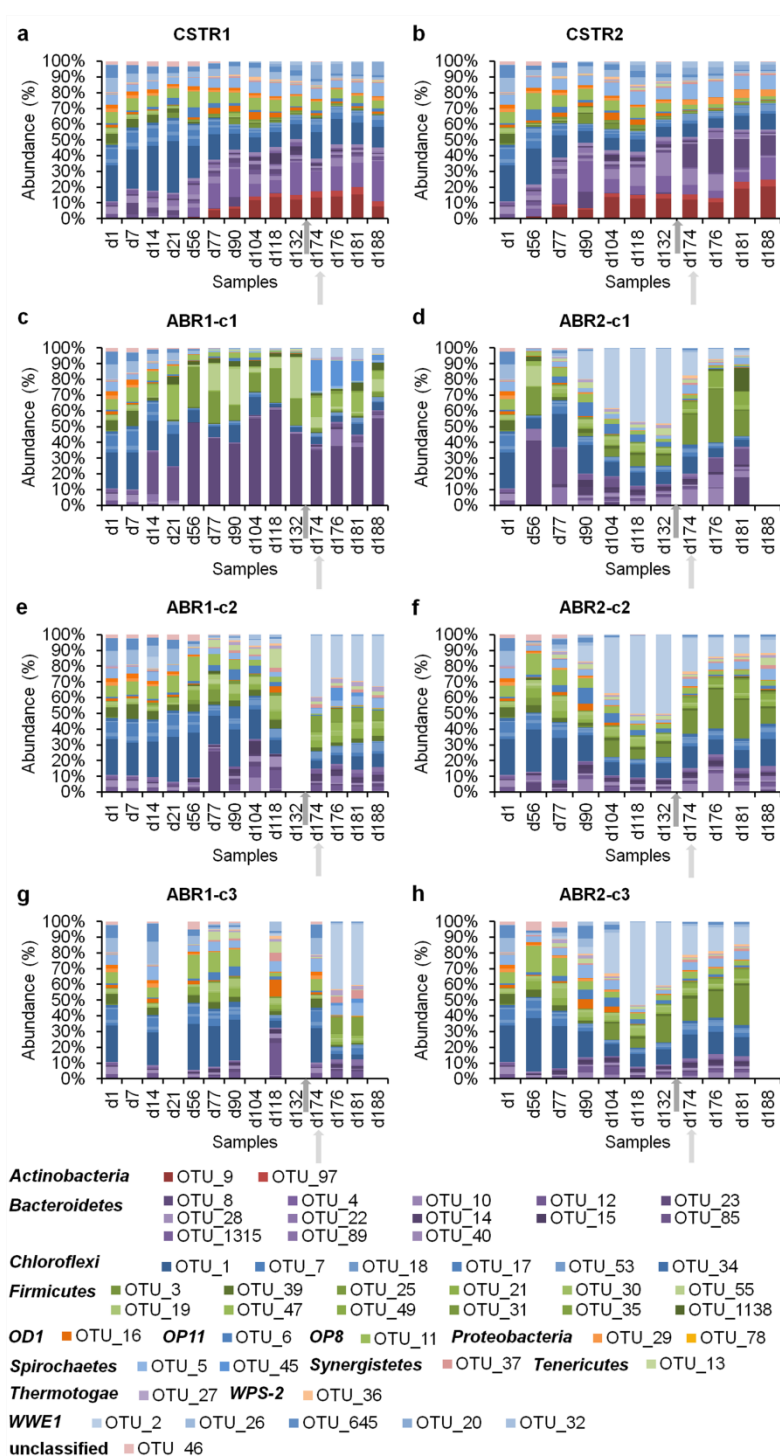


Figure S1 - Bacterial community dynamics at the OTU (top 50) level during the experimental campaign

CSTR1 (a) and ABR1 (c, e, g) are the moderately fed reactors; CSTR2 (b) and ABR2 (d, f, h) are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *dark grey arrow* indicates the first day with rapeseed oil added as substrate; the *light grey arrow* indicates the first day with sugar added as substrate; gaps were due to amplicon sequencing problems.

Annexe 2

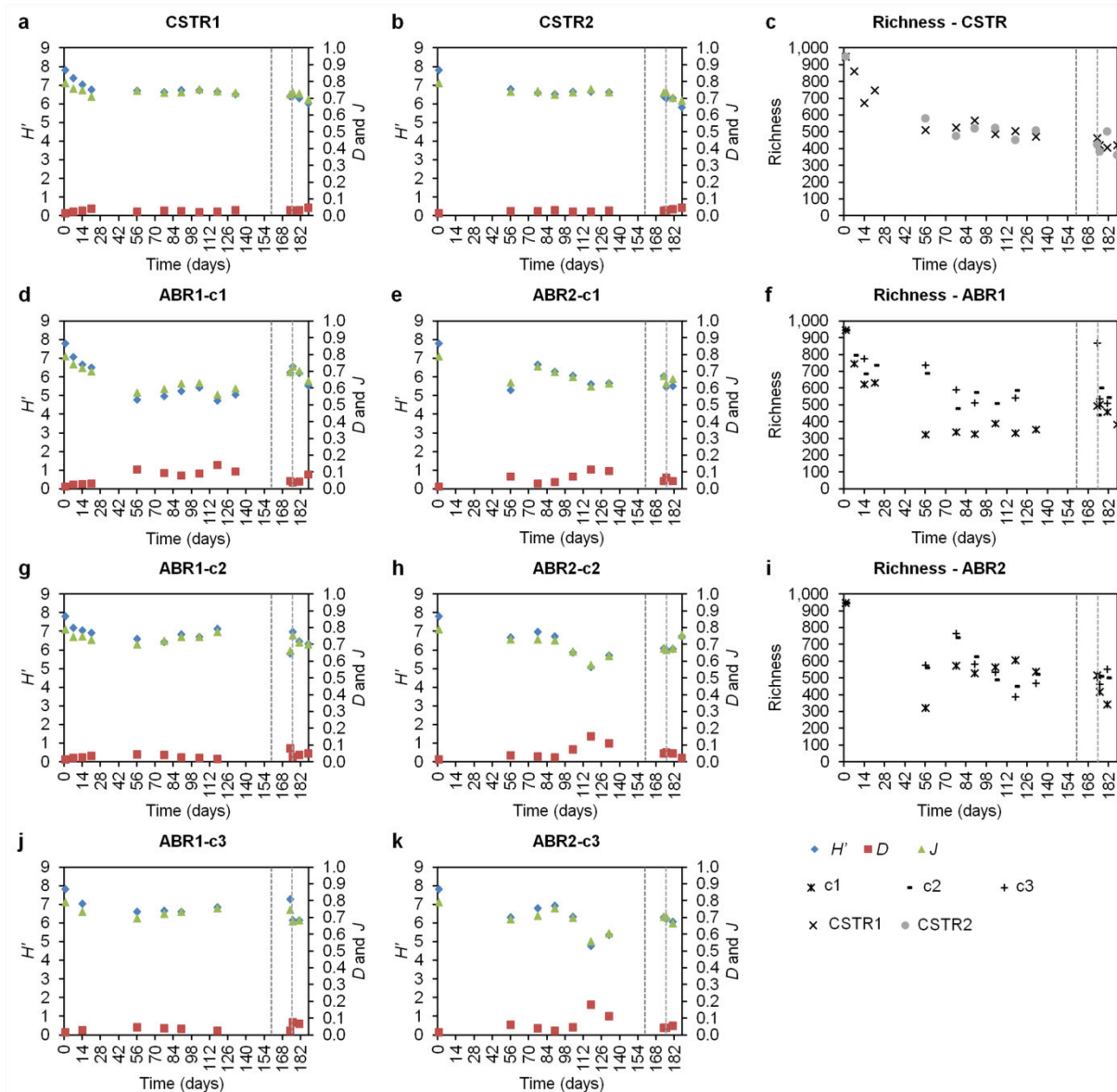


Figure S2 - Dynamics over time of bacterial ecology parameters for the four studied reactors Shannon-Wiener index (H'), Simpson index (D) and Pielou index (J) for CSTR1, CSTR2, ABR1 and ABR2 (a, b, d, e, g, h, j, k, respectively); richness for CSTRs, ABR1 and ABR2 (c, f, i, respectively); CSTR1 and ABR1 are the moderately fed reactors; CSTR2 and ABR2 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *dark grey vertical dotted line* indicates the first day with rapeseed oil added as substrate; the *light grey vertical dotted line* indicates the first day with sugar added as substrate.

Annexe 2

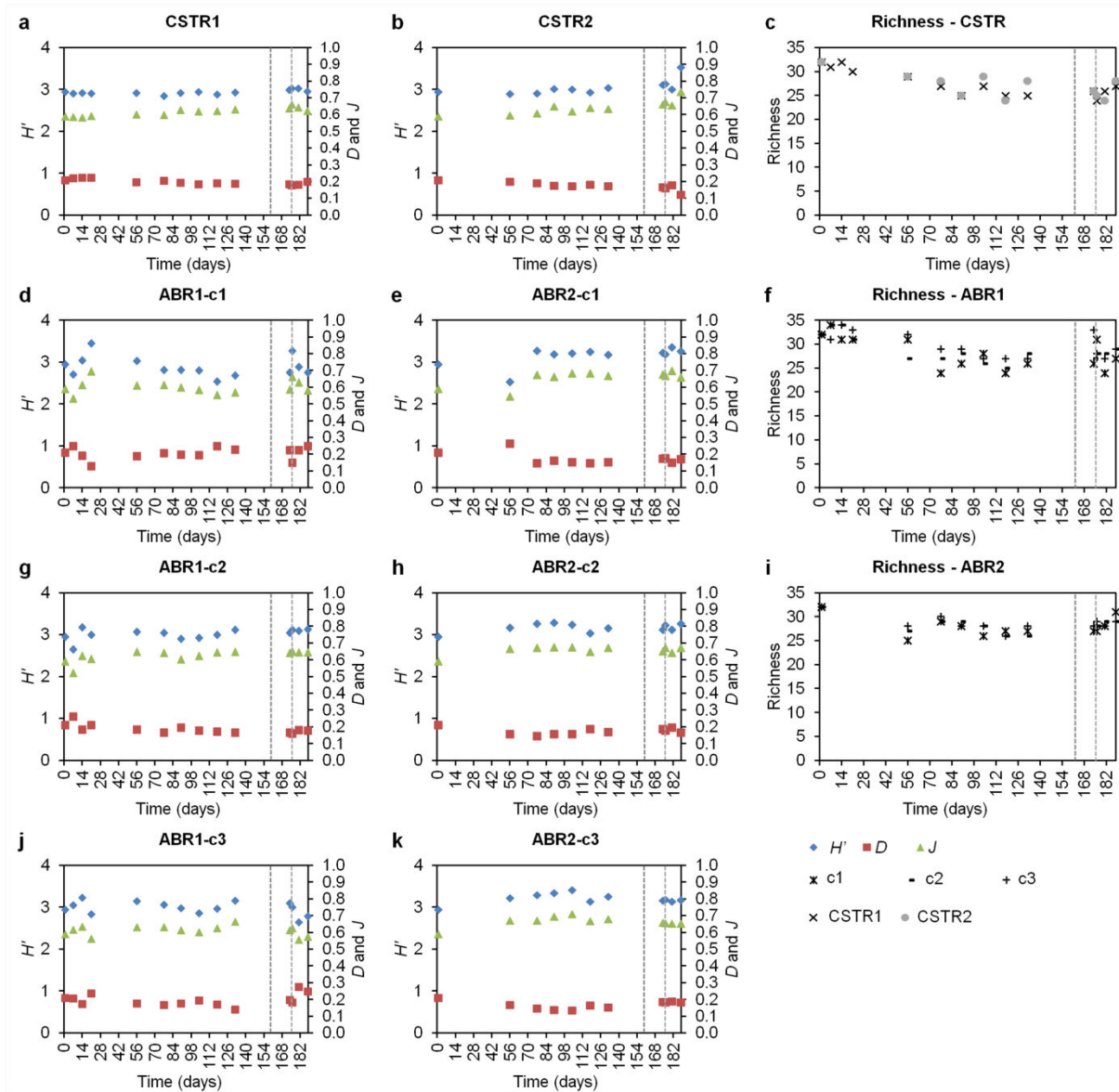


Figure S3 - Dynamics over time of archaeal ecology parameters for the four studied reactors Shannon-Wiener index (H'), Simpson index (D) and Pielou index (J) for CSTR1, CSTR2, ABR1 and ABR2 (a, b, d, e, g, h, j, k, respectively); richness for CSTRs, ABR1 and ABR2 (c, f, i, respectively); CSTR1 and ABR1 are the moderately fed reactors; CSTR2 and ABR2 are the reactors exposed to increasing organic loading rate; -c1, -c2, -c3 are the three ABR compartments; the *dark grey vertical dotted line* indicates the first day with rapeseed oil added as substrate; the *light grey vertical dotted line* indicates the first day with sugar added as substrate.

Annexe 3

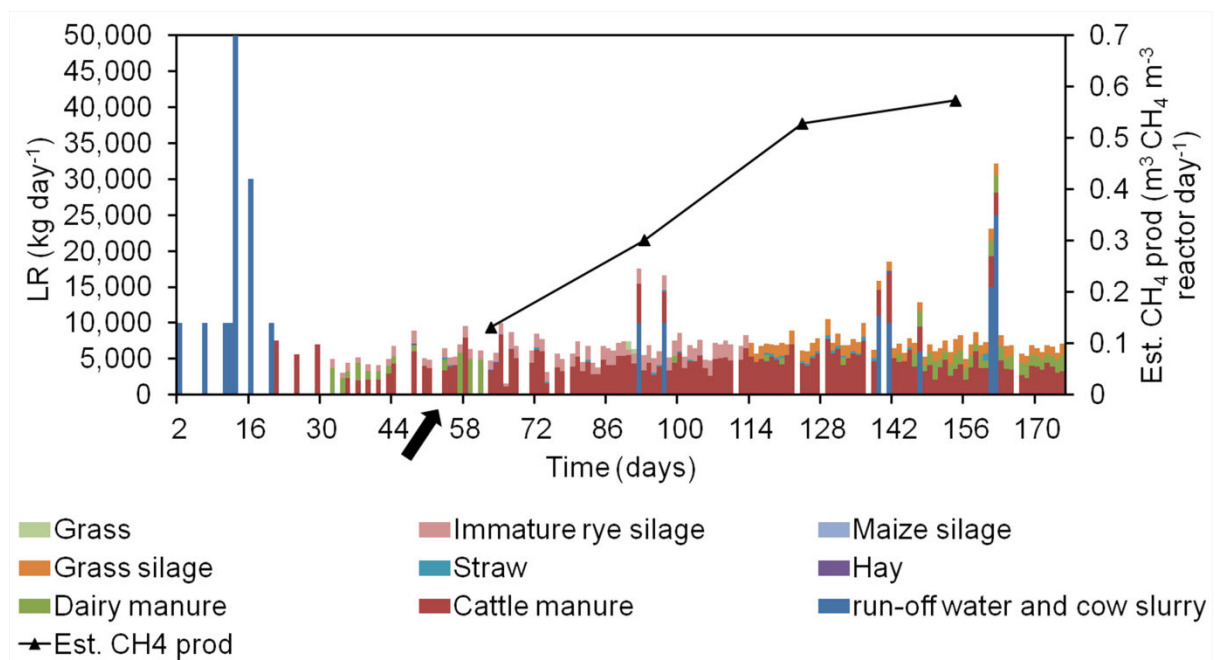


Figure S1 - Loading rate and estimated methane production over the strat-up phase of the studied full-scale farm reactor

The *black arrow* indicates day 54, when propane was replaced by the produced biogas to feed the CHP unit.

Annexe 3

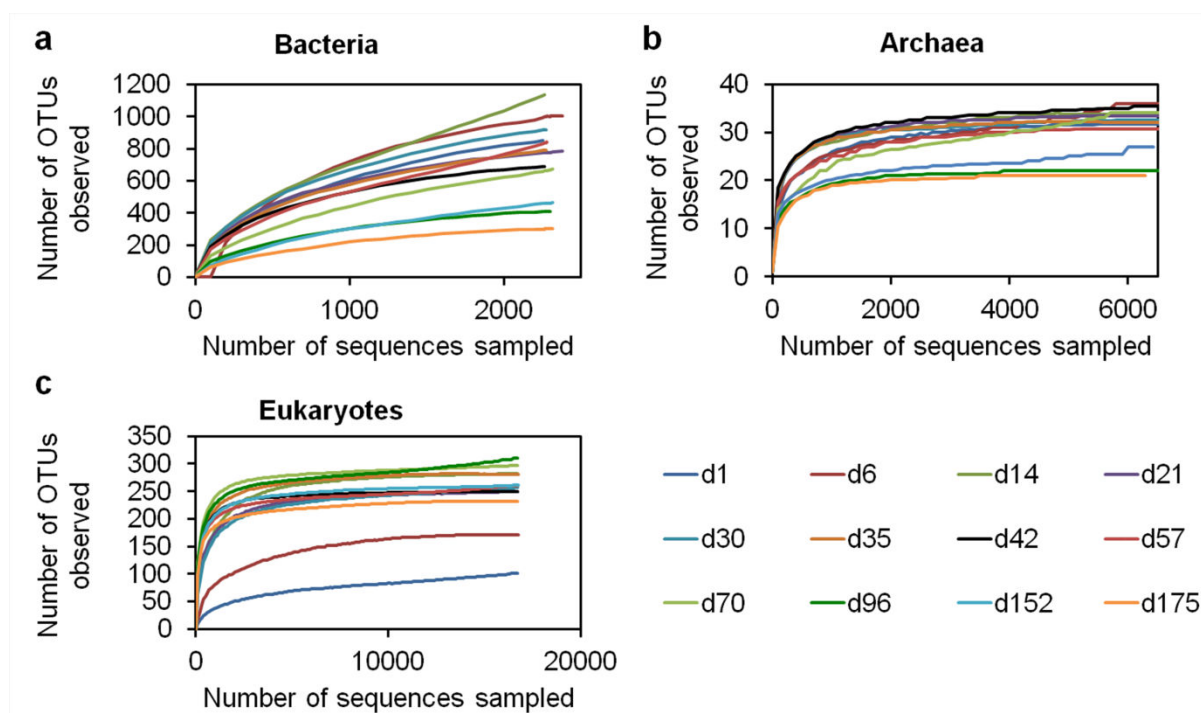


Figure S2 - Chao1 estimator rarefaction curves based on the high-throughput amplicon sequencing

Chao 1 estimator rarefaction curves for bacteria (**a**), for archaea (**b**) and for eukaryotes (**c**).

Annexe 3

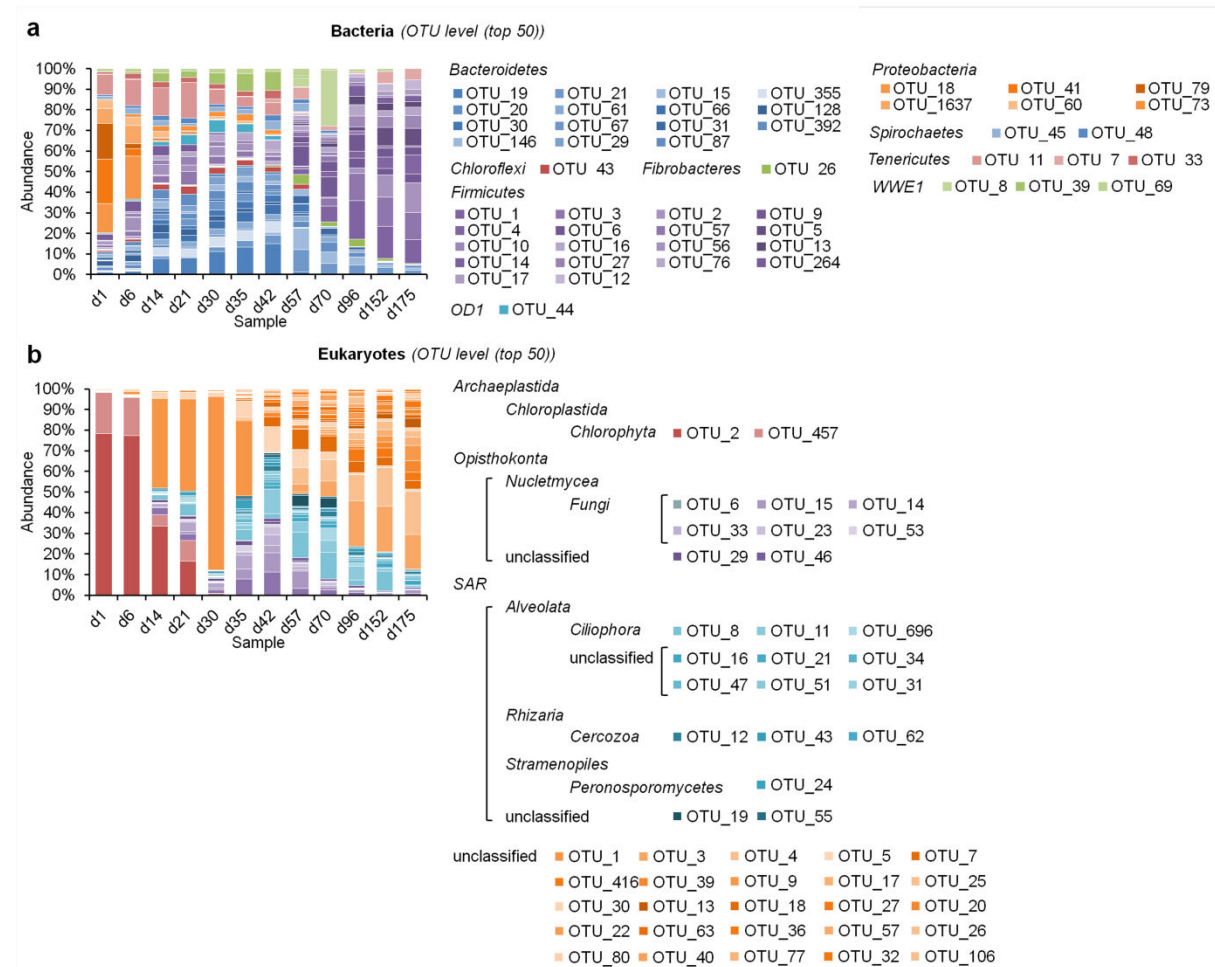


Figure S3 - Bacterial and eukaryotic structure dynamics over time at the OTU (*top 50*) level Structure dynamics for bacteria **(a)** and eukaryotes **(b)**.

Annexe 3

Table S1, S2, S3 and S4 (in an excel file) are available by following this link:

<https://www.dropbox.com/s/qu64o3w1a6vsdw2/Th%C3%A8se%20X.G.%20Annex%203%20-%20Tables%20S1%20to%20S4.xlsx?dl=0>

Influence de différents facteurs opérationnels sur la structure des communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie

Le processus de digestion anaérobie conduit à la production de biométhane, un vecteur flexible d'énergie renouvelable. L'amélioration du rendement de ce processus est souvent évoquée comme dépendante de la compréhension approfondie de la structure et de la dynamique des communautés microbiennes qui y sont impliquées.

L'objectif de la thèse a été de caractériser les communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie et de déterminer l'influence de facteurs opérationnels sur leurs dynamiques. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'augmentation du taux de charge organique, le type de digesteurs anaérobies (réacteur continu perpétuellement mélangé vs réacteur anaérobie à chicane), mais aussi à la phase de démarrage d'un digesteur de ferme avec une montée en température.

En absence de conditions contraignantes, nous avons observé l'installation de populations méthanogènes les mieux adaptées à la production de biogaz dans les réacteurs étudiés et la mise en place de communautés microbiennes similaires entre réacteurs répliqués. Cependant, des changements au niveau opérationnel ont conduit au développement de communautés divergentes en termes de structure. En effet, en présence d'un environnement déterministe, la plupart des bactéries et archées impliquées en digestion anaérobie ont montré une redondance fonctionnelle à la perturbation. Toutefois, certaines populations bactériennes dominantes ont également pu montrer des phénomènes de résistance, en termes de présence et d'abondance, à l'évolution des conditions environnementales.

Au cours de nos études, les différentes communautés s'installant dans les digesteurs étudiés ont également montré des aptitudes variables pour la production de biogaz. De plus, des corrélations entre les communautés bactériennes, archées et eucaryotes ont aussi été démontrées, soulignant le rôle non négligeable des eucaryotes dans le processus de digestion anaérobie et l'installation de communautés microbiennes dominantes et spécifiques à la production de biogaz.

Ainsi, les changements au sein de la communauté microbienne résultant de la modification progressive de facteurs opérationnels, et ce bien avant l'apparition des premiers symptômes d'inhibition de la production de biogaz, pourraient permettre le développement d'indicateurs microbiens de l'état du processus de digestion anaérobie et donc la mise en place d'une gestion microbiologique raisonnée des digesteurs anaérobies.

Mots clés : digestion anaérobie, bioénergie, écologie microbienne, perturbation du processus, digesteurs anaérobies de laboratoire et de taille réelle

Influence of shifts in various operational parameters on the structure of the microbial communities involved in the anaerobic digestion process

The anaerobic digestion process leads to the production of biomethane, a versatile renewable energy vector. The dynamics and interactions between specific microbial groups are currently considered as key research subjects towards the improvement of the anaerobic digestion (AD) process. Indeed, deeper knowledge of the ecology of AD, the dynamics of the microbial populations and their structure could provide valuable information regarding unexplained and unpredictable failures or malfunctioning of the anaerobic digestion process.

The aim of this work was to characterize the microbial communities involved in the AD process, and to study their responses due to the change of operational parameters such as an increase of the organic loading rate, the reactor type (completely stirred tank reactor vs anaerobic baffled reactor), or the start-up phase of a farm reactor with a shift from psychrophilic to mesophilic temperature range.

While we observed the installation of similar microbial populations between replicated reactors under stable conditions, best adapted to biogas production, the microbial communities started to diverge once the operational parameters changed. Indeed, due to deterministic environment, most of bacteria and archaea showed redundant functional adaptation to the changing environmental conditions. However, some dominant bacterial populations were also resistant in terms of presence and abundance to the environmental change.

The specific microbial communities established in our studied reactors showed also discrepancies in terms of biogas yields. Furthermore, correlations between the bacterial, archaeal and eukaryotic communities were pointed out, indicating the putative influence of eukaryotes on the anaerobic digestion process and the establishment of the other microbes having crucial functions during the anaerobic biomass digestion.

Interestingly, shifts inside the anaerobic microbial community due to the gradual change of operational parameters, were detected prior to any biogas production inhibition, giving the opportunity for the development of potential early microbial indicators for assessing the AD process status and improving the microbial management of anaerobic reactors.

Keywords: anaerobic digestion, bioenergy, microbial ecology, process perturbation, full-scale and lab-scale anaerobic reactors