

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Julien GROSSIN-DEBATTISTA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie analytique et environnement

**Fractionnements isotopiques ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) engendrés par la
méthanogenèse : apports pour la compréhension des processus de
biodégradation lors de la digestion anaérobie**

Application aux procédés anaérobies de traitements des déchets non dangereux

Directeur de thèse : Hélène BUDZINSKI

Soutenue le : 24 février 2011

Devant la commission d'examen formée de :

M. BERNET, N.	Directeur de Recherche, Inra de Narbonne	Rapporteur
M. BRAUMAN, A.	Directeur de Recherche, IRD de Montpellier	Rapporteur
M. CONRAD, R.	Professeur, Max Planck Institute de Marburg	Examineur
Mme. LEMUNIER, M.	Chargée de projet, Cirsee, Suez Environnement	Examineur
M. SCHMITTER, J.M.	Professeur, Université de Bordeaux I	Président
Mme. BUDZINSKI, H.	Directeur de Recherche, CNRS, Université Bordeaux I	Directeur de thèse
M. MAZÉAS, L.	Chargé de recherche, Cemagref d'Antony	Encadrant
M. BOUCHEZ, T.	ICPEF, Cemagref d'Antony	Co-encadrant

A mon père...

Avant propos

Les remerciements sont une partie anodine à l'échelle du manuscrit de thèse ... mais également très importante car ils symbolisent l'achèvement de cette expérience scientifique et humaine et offre la possibilité de remercier l'ensemble des personnes ayant contribué, de manière directe ou indirecte, à l'aboutissement de ces travaux.

Tout d'abord, même si de simples remerciements sont bien insuffisants pour témoigner ma gratitude à Laurent MAZÉAS, je tiens tout de même à le remercier pour m'avoir permis de réaliser cette thèse ainsi que pour son investissement au quotidien pendant son déroulement. Laurent, ta gentillesse, ta disponibilité, ta motivation, ton humour et ton soutien, font de toi un encadrant exceptionnel auprès de qui j'ai énormément appris. Ce fut un honneur et un plaisir de travailler sous « ta direction ».

Je remercie également Théodore BOUCHEZ, pour sa disponibilité et sa participation active à chacune des étapes de cette thèse. Théodore, ce fut un plaisir et grâce à toi, j'ai beaucoup appris, notamment en microbiologie.

Mes remerciement vont ensuite à Hélène BUDZINSKI pour avoir accepté de prendre la direction de cette thèse ainsi que pour l'intérêt qu'elle a porté, malgré la distance, à mes travaux et à mes nombreuses démarches administratives. Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du comité de pilotage : Françoise BÉHAR, Fabrice BÉLINE, & Mélanie LEMUNIER.

Je tiens également à remercier Messieurs Nicolas BERNET et Alain BRAUMAN pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Que soit également remerciés l'ensemble des membres du jury et tout particulièrement Messieurs Ralph CONRAD et Jean-Marie SCHMITTER.

Je remercie également la société Suez Environnement pour sa participation financière et Jean-Marc AUDIC, Elena SENANTE, Jean-Luc MARTEL, Maxime ROUEZ, et tout particulièrement Mélanie LEMUNIER pour l'accompagnement scientifique et technique de ce projet de thèse.

Enfin merci aux relecteurs attentifs de ce manuscrit : Théodore BOUCHEZ, Hélène BUDZINSKI, Laëtitia CARDONA, Christian DUQUENNOI, Aurélie GUETTIER, Mélanie LEMUNIER, Patricia MAUGAN & Laurent MAZÉAS.

Avec ce paragraphe, je remercie les quatre anciens stagiaires placés sous ma responsabilité pour le travail réalisé pendant leur stage : Mohamed SASSI, Arnaud BEAUGRAND, Faustine LAURENT & Laëtitia CARDONA. Un grand merci à toi Laëtitia pour avoir prolongé ton implication après la fin de ton stage et ainsi permis de compléter, vérifier et valider des points spécifiques à certaines questions "microbiologiques".

Merci à "Tony" ou Antoine CUCINELLA, Michel ANIS, Bernard LOISEAU, et Sylvain MOREAU pour le travail réalisé ensemble sur la conception du système expérimental des colonnes de percolations. Également un grand merci à Tony pour son aide au quotidien.

Je remercie également Ting-Di WU et Jean-Luc GUERQUIN-KERN pour les analyses NanoSIMS réalisées. My thanks also go to Lu FAN for the realisation of the metaproteomic work. Thank for the time you awarded to my project. Merci également à Jean-Noël ROCHE et Sandrine CHABOUD-CROUSAZ pour m'avoir permis de venir à de nombreuses reprises prélever des lixivats et merci à Eric ROCO pour l'aide fournie sur le terrain.

Enfin je remercie Philippe DUCHÈNE, Cécile LOUMAGNE & Pascal MALLARD.

Merci aux membres de l'équipe TED-SOWASTE d'Antony : Ariane BIZE, Jean-Michel BOUYÉ, Chrystelle BUREAU, Rémi CLÉMENT, Didier CROISSANT, Christian DUQUENNOI, Rolland GALLO, Cécile ROUILLON, Céline MADIGOU, Jacques MERY, Sylvain MOREAU, Alain THOMAS et Nathalie TOUZE-FOLTZ.

Merci également aux membres des autres équipes croisés quotidiennement. La liste est bien trop longue, cependant je remercie particulièrement Cédric CHAUMONT, Yves NEDELEC, Gaëlle TALLEC, Julien TOURNEBIZE, Charles PERRIN et Roger MARTINS.

Un gros merci également à l'équipe de chimie : Angéline GUENNE, Jonathan EPISSARD, Nadine DERLET, Daniel STADTMULLER et Nina POURETTE pour le nombre impressionnant d'analyses réalisées.

Je remercie Sophie MORIN, Valérie DANSIN, Michèle LEBEL, Laurence TANTON & Catherine GEOFFROY pour leur aide au quotidien dans les nombreuses démarches administratives.

Pour avoir partagé une partie de ces presque quatre années passées au Cemagref, je remercie l'ensemble des stagiaires, thésards et post-doc : Charlotte RICHARD, Thomas TOUTAIN, Jérôme BUESSARD, Rim DRISS, Intissar LIMAN, Elodie PASSEPORT, Thibaut SERAIN, Xian QU, Lu FAN, Sandrine PAUMIER, Elie DESMOND et tous les autres ...

Je me rappelle encore de deux stagiaires rencontrés près d'une centrifugeuse lors de ma première visite au Cemagref. Ces stagiaires qui ont réalisé un stage puis leur thèse parallèlement à la mienne : Olivier CHAPLEUR (sans qui je n'aurais pas découvert une partie de ce pays magnifique qu'est le Mexique) et Anthony BOULANGER (qui a partagé avec moi le stress du premier colloque international et bien plus grâce à sa présence quotidienne discrète mais importante).

Enfin j'adresse un grand merci à Hugues CARLEI, pour m'avoir apporté sa bonne humeur et son humour au quotidien, que ce soit au sein du Cemagref ou à l'extérieur. Tu m'as fait redécouvrir l'escalade et partagé avec moi de nombreuses séances à Antrebloc, à Bleau, ou ailleurs, mais également des soirées, WE et vacances. Ton soutien moral a été très important et pour tout cela je te remercie.

Merci à tous les motards d'HBAN : Daniel, Sylvain, Vivien, Yves ... GAAZZZZZ !!!!

Je tiens aussi à faire un clin d'œil aux volleyeurs (Valérie, Marc, Simon, Cédric, Jean-Mi, Béné, Florent, Laure, Aurélien, Vivien, Anthony et tous les autres ...), frisbeeuteurs (Charles, les Julien"s", Yves, Vazken, Vivien, Yannick, Anthony, Simon et tous les autres ...), joggeurs (Yves, Sylvain, Charles, ...), basketteurs, et plus généralement à l'ensemble des sportifs avec qui j'ai pu partager des moments agréables au cours de ces années. Merci à l'ASCCR et à l'implication des membres actifs qui rendent possible la pratique de ces activités à tous. Sylvain et Yves, je vous remercie pour avoir partagé chacun 21 km de course officielle avec moi, même si la distance parcourue ensemble est bien plus importante. Enfin merci Valérie pour ta motivation, ton entrain et ton humour, tu es la meilleure coach«e» de volley !!!

Merci également à mes proches et à ma famille pour leur aide et leur soutien. Merci à ma mère Patricia, de m'avoir accompagné pendant toutes mes études et cela, sans connaissances scientifiques particulières, ce socle s'est révélé indispensable à ma poursuite d'étude et à l'aboutissement de cette thèse. Merci à ma sœur (Laetitia) et à mes frères (Adrien et Damien) pour les moments partagés, je vous souhaite bonheur et réussite. Merci également aux membres de ma famille habitant dans le sud de m'avoir toujours apporté le soleil nécessaire pour éclairer la grisaille de la vie « parisienne », particulièrement à Lucie pour tous les étés passés ensemble et à mes grands parents (Graziela et Sauveur) pour tout leur amour et la fierté que j'ai toujours pu lire dans leurs yeux ...

Enfin je remercie tout particulièrement ma compagne (Aurélié) pour les nombreuses heures de relecture, l'écoute attentive lors de mes répétitions et surtout pour m'avoir accompagné et supporté pendant toute cette période de fin de thèse. Merci pour ton soutien moral, merci pour avoir tout simplement été là, ce qui a joué un rôle indispensable dans les moments les plus durs. L'aventure ne fait que commencer, il nous reste tout à écrire ...

Enfin, je tiens à remercier tous ceux dont le nom n'apparaît pas ici faute de place ou d'inattention de ma part.

Merci à tous pour votre participation à ces travaux de thèse, votre soutien moral ou tout simplement pour les sourires, les discussions et les bons moments partagés ensemble.

Sommaire

Avant propos.....	- 3 -
Sommaire	- 5 -
Glossaire.....	- 15 -
Nomenclature.....	- 17 -
Introduction générale.....	- 23 -
<u>CHAPITRE 1 : Problématique des déchets non dangereux en France</u>	- 29 -
1. Gestion des déchets en France	- 29 -
1.1. Définitions	- 29 -
1.1.1. Déchets dangereux	- 29 -
1.1.2. Déchets inertes	- 30 -
1.1.3. Déchets non dangereux (DND)	- 30 -
1.1.3.1. Ordures ménagères	- 31 -
1.1.3.2. Biodéchets	- 31 -
1.2. La production des déchets en France et son évolution.....	- 31 -
1.2.1. La production de déchets en France	- 31 -
1.2.2. L'évolution de la production des OM.....	- 32 -
1.3. Les différentes filières de gestion des OM.....	- 32 -
1.4. La composition des OM et son évolution.....	- 34 -
1.4.1. Composition des OM	- 34 -
1.4.2. Évolution de la composition des OM.....	- 35 -
1.5. Caractérisation des OM et des biodéchets.....	- 36 -
1.6. Contexte réglementaire	- 37 -
2. Description technique d'une ISDND	- 38 -
2.1. ISDND classique	- 38 -
2.1.1. Définition	- 38 -
2.1.2. Localisation et aménagement	- 39 -
2.1.3. Structure technique d'une ISDND	- 39 -
2.1.3.1. Barrière de fond.....	- 39 -

2.1.3.2.	Couverture	- 40 -
2.1.4.	Exploitation du site.....	- 41 -
2.1.5.	Effluents	- 41 -
2.1.5.1.	Lixiviat	- 41 -
2.1.5.2.	Biogaz.....	- 41 -
2.1.6.	Post exploitation et réhabilitation du site	- 42 -
2.2.	ISDND bioactive	- 42 -
2.2.1.	Définition	- 42 -
2.2.2.	ISDND bioactive par recirculation de lixiviat.....	- 43 -
2.2.2.1.	Concept.....	- 43 -
2.2.2.2.	Système de recirculation	- 43 -
2.2.2.3.	Recirculation de lixiviat	- 43 -
2.2.2.4.	Avantages	- 44 -
2.2.2.5.	Limites.....	- 45 -
3.	Description technique d'une installation de méthanisation	- 45 -
3.1.	Définition	- 45 -
3.2.	Stratégies technologiques de méthanisation.....	- 45 -
3.2.1.	Alimentation.....	- 45 -
3.2.2.	Type de réacteur	- 46 -
3.2.3.	Nombre d'étapes	- 46 -
3.2.4.	Taux d'humidité.....	- 46 -
3.2.5.	Température	- 47 -
3.2.6.	Charge appliquée.....	- 47 -
3.2.7.	Temps de séjour	- 47 -
3.3.	Méthanisation de DND.....	- 48 -
3.3.1.	Intégration dans la filière de traitement des déchets	- 48 -
3.3.2.	Prétraitements.....	- 49 -
3.3.3.	Technologies de fermentation humides.....	- 49 -
3.3.3.1.	Agitation mécanique	- 49 -
3.3.3.2.	Agitation par recirculation du biogaz.....	- 49 -
3.3.4.	Technologies de fermentation sèche	- 50 -
3.3.4.1.	Agitation mécanique	- 50 -
3.3.4.2.	Agitation par recirculation du biogaz.....	- 50 -
3.3.4.3.	Agitation par recirculation du digestat	- 50 -
3.3.4.4.	Systèmes statiques.....	- 51 -
3.3.5.	Performances	- 52 -
3.3.6.	Effluents	- 52 -
3.3.6.1.	Le biogaz.....	- 52 -
3.3.6.2.	Le digestat	- 53 -
<u>CHAPITRE 2 : Synthèse bibliographique</u>		- 57 -
1.	La digestion anaérobie ou méthanisation	- 57 -

1.1.	Les étapes de la digestion anaérobie	- 58 -
1.1.1.	Le schéma général de dégradation	- 58 -
1.1.2.	Description des différentes étapes de la digestion anaérobie	- 60 -
1.1.2.1.	Hydrolyse	- 60 -
1.1.2.2.	Acidogenèse	- 61 -
1.1.2.3.	Acétogenèse	- 62 -
1.1.2.4.	Méthanogenèse	- 63 -
1.1.2.5.	Autres réactions	- 63 -
1.1.2.5.1.	Sulfato réduction	- 63 -
1.1.2.5.2.	Oxydation anaérobie du méthane	- 63 -
1.1.3.	Description détaillée de l'étape de méthanogenèse	- 64 -
1.1.3.1.	Les archées	- 64 -
1.1.3.2.	Les différents métabolismes méthanogènes	- 67 -
1.1.3.2.1.	Etapas métaboliques communes	- 68 -
1.1.3.2.2.	Méthanogenèse acétoclaste	- 69 -
1.1.3.2.3.	Méthanogenèse hydrogénotrophe	- 70 -
1.1.3.2.4.	Autres voies de la méthanogenèse	- 71 -
1.1.3.3.	Oxydation syntrophique de l'acétate	- 71 -
1.1.3.3.1.	Mécanismes mis en jeu	- 71 -
1.1.3.3.2.	Micro-organismes impliqués	- 73 -
1.1.3.3.3.	Paramètres influant la mise en place de l'OSA	- 75 -
1.1.3.4.	Homoacétogenèse	- 76 -
1.2.	Paramètres clés ayant une influence sur la méthanogenèse	- 76 -
1.2.1.	La teneur en eau	- 76 -
1.2.2.	L'oxygène et le potentiel redox	- 76 -
1.2.3.	La température	- 77 -
1.2.4.	Le rapport C/N	- 78 -
1.2.5.	Le pH	- 78 -
1.2.6.	Inhibiteurs potentiels	- 78 -
1.2.6.1.	Les acides gras volatils	- 78 -
1.2.6.2.	Les ions	- 78 -
1.2.6.3.	L'azote ammoniacal	- 79 -
1.2.6.4.	Les métaux	- 81 -
1.2.6.5.	Autres inhibiteurs	- 82 -
2.	Etude de la méthanogenèse par approche isotopique	- 82 -
2.1.	Isotopes stables	- 82 -
2.1.1.	Définitions	- 82 -
2.1.2.	Effet isotopique	- 83 -
2.1.3.	Fractionnement isotopique	- 84 -
2.2.	Rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	- 85 -
2.2.1.	Isotopes du carbone	- 85 -
2.2.2.	Composition isotopique	- 86 -
2.2.3.	Variation de la composition isotopique du carbone dans la nature	- 87 -
2.3.	Applications des isotopes stables	- 89 -
2.3.1.	Contexte	- 89 -

2.3.2.	Quelques exemples d'applications.....	- 89 -
2.4.	Applications pour l'étude de la méthanogène	- 91 -
2.4.1.	Principe de l'approche isotopique permettant l'étude des environnements méthanogènes	- 91 -
2.4.2.	Facteurs de fractionnements isotopiques des voies métaboliques de la méthanogène	- 93 -
2.4.2.1.	Détermination à partir d'incubations en cultures pures	- 93 -
2.4.2.2.	Inoculum complexe	- 95 -
2.4.3.	Etude des environnements naturels "méthanogènes"	- 97 -
2.4.4.	Etude de la méthanogène dans les procédés de traitement des déchets	- 99 -
2.4.4.1.	Mesure de la composition isotopique des effluents d'ISD	- 99 -
2.4.4.1.1.	Méthane	- 99 -
2.4.4.1.2.	Dioxyde de carbone	- 99 -
2.4.4.1.3.	Carbone inorganique	- 100 -
2.4.4.1.4.	Carbone organique	- 100 -
2.4.4.2.	Identification des voies métaboliques lors de la digestion anaérobie	- 100 -
2.4.4.2.1.	Métabolisme de la méthanogène	- 100 -
2.4.4.2.2.	Oxydation du méthane	- 101 -
2.4.5.	Points spécifiques : utilisation de substrats marqués	- 101 -
3.	Problématique.....	- 102 -
<u>CHAPITRE 3 : Matériel et méthodes</u>		- 107 -
1.	Les substrats de dégradations.....	- 107 -
1.1.	Substrats purs	- 107 -
1.1.1.	Acétate.....	- 107 -
1.1.1.1.	Acétate naturel.....	- 107 -
1.1.1.2.	Acétate enrichi.....	- 107 -
1.1.2.	Hydrogène	- 108 -
1.2.	Déchets reconstitués.....	- 108 -
1.2.1.	Déchet reconstitué (type OM)	- 108 -
1.2.1.1.	Description	- 108 -
1.2.1.2.	Protocole de préparation.....	- 110 -
1.2.2.	Biodéchet reconstitué	- 111 -
2.	Les consortia microbiens dit inocula.....	- 112 -
2.1.	Lixiviats d'ISDND.....	- 112 -
2.2.	Boues digérées de station d'épuration	- 113 -
2.3.	Boues de méthaniseur d'OM thermophiles.....	- 113 -

3.	Les milieux d'incubations.....	- 114 -
3.1.	Solution carbonate.....	- 114 -
3.2.	Milieu d'incubation.....	- 114 -
4.	Les flacons à plasma ou microcosmes	- 115 -
4.1.	Le dispositif expérimental.....	- 115 -
4.2.	Mode opératoire	- 116 -
4.2.1.	Remplissage des microcosmes	- 116 -
4.2.1.1.	Introduction du substrat.....	- 116 -
4.2.1.1.1.	Introduction du déchet.....	- 116 -
4.2.1.1.2.	Introduction d'autres substrats.....	- 116 -
4.2.1.2.	Introduction de l'inoculum	- 116 -
4.2.1.3.	Introduction du milieu d'incubation	- 117 -
4.2.2.	Incubation des microcosmes	- 117 -
4.2.2.1.	Fermeture des microcosmes	- 117 -
4.2.2.2.	Mise en conditions anaérobies	- 117 -
4.2.2.3.	Incubation des microcosmes	- 118 -
4.2.3.	Protocole de suivi des microcosmes.....	- 118 -
4.3.	Récapitulatif de l'ensemble des microcosmes	- 119 -
5.	Les colonnes de percolation ou mésocosmes	- 124 -
5.1.	Le dispositif expérimental.....	- 125 -
5.1.1.	Les colonnes de percolation	- 125 -
5.1.2.	Instrumentation et système d'acquisition.....	- 128 -
5.1.3.	Les substrats	- 129 -
5.1.3.1.	Le déchet reconstitué.....	- 129 -
5.1.3.2.	Les effluents	- 129 -
5.2.	Paramètres	- 130 -
5.2.1.	Taux de compactage.....	- 130 -
5.2.2.	Débit de recirculation	- 130 -
5.3.	Modes opératoires	- 130 -
5.3.1.	Remplissage des colonnes.....	- 130 -
5.3.2.	Suivi des pilotes	- 131 -
6.	Méthodes analytiques.....	- 133 -
6.1.	Analyse du biogaz	- 133 -
6.1.1.	Analyse de la composition du biogaz.....	- 133 -
6.1.2.	Mesure de la composition isotopique du biogaz	- 134 -
6.2.	Analyse du lixiviat	- 135 -
6.2.1.	Mesure du pH.....	- 135 -

6.2.2.	Mesure du Carbone dissous (COD/CID)	- 135 -
6.2.3.	Mesure des AGV	- 136 -
6.2.4.	Mesure des cations	- 136 -
6.2.5.	Mesure de la composition isotopique du carbone de l'acétate	- 136 -
6.2.5.1.	Mesure de la composition isotopique globale du carbone de l'acétate (moyenne des deux atomes de carbone).....	- 136 -
6.2.5.2.	Mesure de la composition isotopique du carbone du groupement méthyle de l'acétate	- 136 -
6.3.	Analyses microbiologiques	- 137 -
6.3.1.	Extraction d'ADN	- 137 -
6.3.2.	PCR-ARISA	- 137 -
6.3.3.	FISH	- 139 -
6.3.3.1.	Fixation.....	- 140 -
6.3.3.2.	Hybridation.....	- 140 -
6.3.3.3.	Observation au microscope confocale à balayage laser	- 140 -
6.3.4.	NanoSIMS	- 141 -
6.3.4.1.	Principe.....	- 141 -
6.3.4.2.	Préparation de l'échantillon	- 143 -
6.3.4.3.	Analyse de l'échantillon	- 143 -
6.3.5.	Clonage / Séquençage	- 144 -
6.3.5.1.	Clonage.....	- 144 -
6.3.5.2.	Séquençage.....	- 145 -
6.3.5.3.	Traitements des résultats	- 145 -
6.4.	Analyse des solides	- 146 -
6.4.1.	Analyse élémentaire	- 146 -
6.4.2.	Teneur en eau, matières sèches et pertes au feu.....	- 146 -
6.5.	Calculs.....	- 146 -
6.5.1.	Calcul de production	- 146 -
6.5.2.	Caractérisation des courbes de production cumulée de méthane.....	- 147 -
6.5.3.	Recalcul de la composition isotopique.....	- 148 -
6.5.4.	Calcul du facteur de fractionnement apparent.....	- 148 -
6.5.5.	Calcul des facteurs de fractionnement	- 149 -
6.5.5.1.	Facteur de fractionnement de la méthanogenèse acétoclaste.....	- 149 -
6.5.5.2.	Facteur de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe ...	- 150 -
6.5.6.	Calcul de la concentration en NH ₃	- 150 -
6.5.7.	Expressions des résultats	- 150 -

CHAPITRE 4 : Résultats et discussion - 155 -

1.	Validation de l'utilisation de l'approche isotopique pour l'étude de la digestion anaérobie des déchets	- 155 -
1.1.	Introduction	- 155 -
1.2.	Résultats expérimentaux obtenus	- 156 -
1.2.1.	Facteurs de fractionnement induits par la méthanogenèse acétoclaste ..	- 156 -

1.2.1.1.	Inoculum de lixiviat d'ISDND (35°C).....	- 156 -
1.2.1.2.	Inocula de boue de méthaniseur (35°C et 55°C).....	- 158 -
1.2.2.	Facteur de fractionnement induit par la méthanogenèse hydrogénotrophe.....	- 160 -
1.2.2.1.	Haute concentration d'hydrogène.....	- 160 -
1.2.2.2.	Faible concentration d'hydrogène.....	- 160 -
1.3.	Discussion	- 161 -
1.3.1.	Facteurs de fractionnement acétoclaste.....	- 161 -
1.3.2.	Facteurs de fractionnement hydrogénotrophe	- 162 -
1.4.	Conclusion.....	- 163 -
2.	Effet de la température sur les voies métaboliques méthanogènes	- 163 -
2.1.	Effet de la température lors de la digestion anaérobie de déchets	- 163 -
2.1.1.	Digestion anaérobie des déchets en conditions mésophiles	- 164 -
2.1.1.1.	Introduction	- 164 -
2.1.1.2.	Résultats expérimentaux obtenus	- 164 -
2.1.1.2.1.	Production de gaz et évolution des paramètres physico- chimiques du lixiviat	- 165 -
2.1.1.2.2.	Composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone..	- 165 -
2.1.1.2.3.	Observations FISH	- 167 -
2.1.1.3.	Discussion	- 168 -
2.1.1.3.1.	Phase 1 (jour 0 à 20).....	- 168 -
2.1.1.3.2.	Phase 2 (jour 20 à 50).....	- 168 -
2.1.1.3.3.	Phase 3 (jour 50 à 120).....	- 168 -
2.1.1.4.	Conclusion.....	- 169 -
2.1.2.	Digestion anaérobie des déchets : conditions mésophiles vs thermophiles	- 170 -
2.1.2.1.	Introduction	- 170 -
2.1.2.2.	Résultats expérimentaux obtenus	- 170 -
2.1.2.2.1.	Production de gaz et évolution des paramètres physico- chimiques du lixiviat	- 171 -
2.1.2.2.2.	Composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone..	- 173 -
2.1.2.2.3.	Évolution des communautés de micro-organismes (par ARISA)	- 173 -
2.1.2.2.4.	Identifications des micro-organismes par clonage/séquençage ..	- 174 -
2.1.2.3.	Discussion	- 178 -
2.1.2.3.1.	Effet de la température sur la production de méthane et la composition du lixiviat.....	- 178 -
2.1.2.3.2.	Effet de la température sur les métabolismes de la méthanogenèse	- 178 -
2.1.2.3.3.	Effet de la température sur les communautés de micro- organismes	- 179 -
2.1.3.	Conclusion.....	- 180 -
2.2.	Effet de la température sur la méthanisation de l'acétate	- 180 -
2.2.1.	Introduction	- 180 -
2.2.2.	Résultats expérimentaux obtenus	- 181 -

2.2.2.1.	Inoculum d'ISDND.....	- 181 -
2.2.2.2.	Inoculum de digesteur d'ordures ménagères	- 183 -
2.2.2.2.1.	Incubations mésophiles (35°C)	- 183 -
2.2.2.2.2.	Incubations thermophiles (55°C)	- 185 -
2.2.3.	Interprétations et discussions	- 186 -
2.2.3.1.	Effet de la nature de l'inoculum.....	- 186 -
2.2.3.2.	Effet des changements métaboliques sur la production finale de méthane	- 186 -
2.2.3.3.	Effet direct ou indirect de la température sur les changements métaboliques.....	- 187 -
2.2.4.	Conclusion.....	- 190 -
3.	Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la méthanogenèse	- 190 -
3.1.	Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la dégradation de l'acétate en conditions mésophiles.....	- 191 -
3.1.1.	Introduction	- 191 -
3.1.2.	Résultats expérimentaux obtenus	- 192 -
3.1.2.1.	Acclimatation de l'inoculum à la consommation d'acétate	- 192 -
3.1.2.2.	Incubations d'acétate à différentes concentrations d'azote ammoniacal	- 193 -
3.1.2.2.1.	Production de méthane	- 193 -
3.1.2.2.2.	Résultats des approches isotopiques	- 194 -
3.1.2.2.3.	Étude de la dynamique des communautés de bactéries et d'archées	- 197 -
3.1.2.2.4.	Réinjections d'acétate	- 201 -
3.1.3.	Interprétations des résultats.....	- 202 -
3.1.3.1.	Acclimatation de l'inoculum à la consommation d'acétate (Série A).- 202 -	- 202 -
3.1.3.2.	Dégradation de l'acétate aux basses concentrations d'azote ammoniacal (Séries C1 et C2).....	- 202 -
3.1.3.3.	Dégradation de l'acétate à moyenne concentration d'azote ammoniacal (Série C3).....	- 203 -
3.1.3.4.	Dégradation de l'acétate à haute concentration d'azote ammoniacal (Série C4).....	- 204 -
3.1.3.5.	Réinjection d'acétate à haute concentration d'azote ammoniacal (Séries C3-b, C4-b et C4-c).....	- 206 -
3.1.4.	Discussion	- 206 -
3.1.5.	Conclusion.....	- 209 -
3.2.	Effet de la quantité d'inoculum sur la dégradation de l'acétate à haute concentration en azote ammoniacal en conditions mésophiles.....	- 209 -
3.2.1.	Introduction	- 209 -
3.2.2.	Résultats expérimentaux obtenus	- 210 -
3.2.2.1.	Production de méthane	- 210 -
3.2.2.2.	Approche isotopique	- 211 -
3.2.2.2.1.	Approche isotopique naturelle	- 211 -
3.2.2.2.2.	Approche isotopique marquée.....	- 212 -
3.2.2.3.	PCR-ARISA	- 213 -
3.2.2.4.	Clonage –Séquençage	- 215 -
3.2.2.5.	Hybridation in situ (FISH)	- 216 -

3.2.3.	Interprétation et discussion des résultats.....	- 217 -
3.2.3.1.	Métabolisme et population microbienne à l'origine de la production de méthane	- 217 -
3.2.3.1.1.	Séries I2 et I3.....	- 218 -
3.2.3.1.2.	Série I1	- 220 -
3.2.3.2.	Arrangement spatial des micro-organismes	- 224 -
3.2.3.3.	Analyses NanoSIMS	- 226 -
3.2.3.4.	Analyses métagénomiques.....	- 237 -
3.2.3.5.	Effet de la quantité initiale d'inoculum sur la production de méthane	- 238 -
3.2.4.	Conclusion.....	- 239 -
4.	Application aux procédés anaérobies de traitements des déchets non dangereux .-	240 -
4.1.	Influence de la recirculation en ISDND bioactives de différentes qualités d'effluents sur la dégradation des déchets non dangereux.....	- 240 -
4.1.1.	Introduction	- 240 -
4.1.2.	Résultats expérimentaux obtenus.....	- 241 -
4.1.2.1.	Caractérisation et évolution des effluents utilisés lors de leur stockage avant injection dans les pilotes.....	- 241 -
4.1.2.1.1.	pH.....	- 241 -
4.1.2.1.2.	COD/CID	- 242 -
4.1.2.1.3.	Acides organiques	- 242 -
4.1.2.1.4.	Cations.....	- 242 -
4.1.2.1.5.	Potentiel méthanogène	- 244 -
4.1.2.2.	Dégradation des déchets lors des essais en colonnes de percolation .-	244 -
4.1.2.2.1.	Suivi de la production et de la composition du biogaz	- 244 -
4.1.2.2.2.	Suivi des paramètres physico-chimiques des lixiviats des colonnes	- 247 -
4.1.2.2.3.	Suivi des compositions isotopiques du CH ₄ et du CO ₂	- 253 -
4.1.3.	Interprétations de l'ensemble des résultats.....	- 255 -
4.1.3.1.	Couplage hydrolyse/méthanogenèse et zonation des processus	- 255 -
4.1.3.2.	Effet de la qualité des effluents sur la mise en place des voies métaboliques.....	- 257 -
4.1.4.	Discussion relative aux paramètres opérationnels	- 259 -
4.1.4.1.	Démarrage de la méthanogenèse.....	- 259 -
4.1.4.2.	Cinétiques de dégradation	- 260 -
4.1.4.3.	Rendements de dégradation	- 260 -
4.1.4.4.	Effet d'une forte concentration en azote ammoniacal.....	- 262 -
4.1.5.	Conclusion.....	- 263 -
4.2.	Codigestion d'un mélange biodéchets/déchets verts.....	- 263 -
4.2.1.	Introduction	- 263 -
4.2.2.	Incubation de différents mélanges biodéchets / déchets verts.....	- 264 -
4.2.2.1.	Résultats expérimentaux obtenus	- 264 -
4.2.2.1.1.	Analyse de la phase gazeuse	- 265 -
4.2.2.1.2.	Analyse de la phase liquide.....	- 265 -
4.2.2.2.	Discussion	- 268 -
4.2.3.	Effet d'une introduction de déchets verts / ammonium sur un processus de méthanisation thermophile de biodéchets stabilisé.....	- 270 -

4.2.3.1.	Résultats expérimentaux obtenus	- 271 -
4.2.3.1.1.	Analyses de la phase gazeuse.....	- 271 -
4.2.3.1.2.	Analyses de la phase liquide	- 272 -
4.2.3.1.3.	Analyses isotopiques	- 273 -
4.2.3.2.	Discussion	- 274 -
4.2.4.	Conclusion.....	- 275 -
5.	Expérience sur site : ISDND	- 276 -
5.1.	Introduction	- 276 -
5.1.1.	Objectifs de l'étude	- 276 -
5.1.2.	Mise en œuvre	- 276 -
5.2.	Résultats expérimentaux obtenus	- 278 -
5.3.	Discussion	- 279 -
5.4.	Conclusion.....	- 281 -
	Conclusion générale	- 285 -
	Références bibliographiques	- 291 -
	Liste des figures, tableaux et équations.....	- 313 -
	Annexes	- 321 -

Glossaire

Alvéole : « subdivision d'un casier » (arrêté du 9 septembre 1997).

Anaérobie : désigne un être vivant ou un phénomène qui n'a pas besoin d'oxygène pour exister. A pour contraire l'aérobie.

Barrière de sécurité active : « normalement constituée, du bas vers le haut, par une géomembrane ou tout autre dispositif équivalent, surmontée d'une couche de drainage » (arrêté du 9 septembre 1997).

Barrière de sécurité passive : « normalement constituée par le substratum du site (base sur laquelle il repose) qui doit présenter, de haut en bas, une perméabilité inférieure à 10^{-9} m.s^{-1} sur au moins 1 m et inférieure à 10^{-6} m.s^{-1} sur au moins 5 m » (arrêté du 9 septembre 1997).

Biogaz : « tous les gaz produits par les déchets mis en décharge » (Directive européenne 99/31/CE).

Carbone Inorganique Dissous (CID) : la totalité du carbone présent dans les matières inorganiques dissoutes.

Carbone Organique Dissous (COD) : la totalité du carbone présent dans les matières organiques dissoutes.

Casier : « subdivision de la zone à exploiter, délimitée par une digue périmétrique stable et étanche, hydrauliquement indépendante » (arrêté du 9 septembre 1997).

Capacité au champ : capacité de rétention en eau (d'un déchet).

Coenzyme : petite molécule organique non protéique liée à l'apoenzyme, indispensable à l'activité enzymatique et qui dérive généralement d'une vitamine.

Couche de drainage : constituée de bas en haut par « un réseau de drains permettant l'évacuation des lixiviats vers un collecteur principal et par une couche drainante, d'épaisseur supérieure ou égale à 0,5 m, ou tout autre dispositif équivalent » (arrêté du 9 septembre 1997).

Déchet : « tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit, ou plus généralement tout bien nuisible abandonné, ou que son détenteur destine à l'abandon » (loi du 15 juillet 1975).

Déchets Non Dangereux (DND) : « déchets constitués des ordures ménagères et des déchets provenant des entreprises industrielles, des artisans, commerçants, écoles, services publics, hôpitaux, services tertiaires, qui sont collectés dans les mêmes conditions que les ordures ménagères ». Cette définition inclut les encombrants en provenance des collectes spécifiques, les déchets verts, les déchets du nettoyage, les boues de station d'épuration et divers matériaux recyclables (Ademe).

Ecosystème : « unité écologique de base englobant tous les éléments d'un milieu donné ainsi que les relations des organismes animaux et végétaux entre eux et avec les autres éléments du milieu considéré (par exemple, écosystème aquatique, écosystème montagnard,...) » (Ademe).

Effluent : terme générique désignant une eau usée urbaine ou industrielle, et plus généralement « tout rejet liquide véhiculant une certaine charge polluante (dissoute, colloïdale ou particulaire) ». Le terme désigne également les déjections animales (effluents d'élevage). On parle aussi d'effluents gazeux (Ademe).

Géomembranes : appartiennent à la famille des géosynthétiques*, « produits adaptés au génie civil, minces, souples, continus, étanches aux liquides, même sous les sollicitations en service » (ISO 13 428). Les géomembranes sont manufacturées sous forme de nappes d'au moins 1 mm d'épaisseur et de largeur variable.

Géosynthétiques : « matériaux, à base de polymères naturels ou synthétiques, utilisés au contact de sol/roche ou tout autre matériau géotechnique dans des applications de génie civil » (International Geosynthetic Society).

Géotextiles : « matériaux tissés, non tissés ou tricotés, perméables, à base de polymères, utilisés dans le domaine de la géotechnique et du génie civil » (ISO 10318).

Lixiviat : « tout liquide filtrant par percolation des déchets mis en décharge et s'écoulant d'une décharge ou contenu dans celle-ci » (arrêté du 9 septembre 1997).

Microcosme : système artificiel clos, de laboratoire, constitué des composantes abiotiques de l'écosystème simulé et de plusieurs espèces représentatives de différents niveaux trophiques, le plus souvent sous conditions environnementales contrôlées.

Syntrophie : relation mutualiste établie lors d'une co-culture de deux espèces bactériennes et au cours de laquelle chaque espèce produit un élément nutritif essentiel au développement de l'autre.

Valorisation : elle consiste dans « *le réemploi, le recyclage ou toutes autres actions visant à obtenir, à partir des déchets, des matériaux réutilisables ou de l'énergie* » (loi du 13/07/1992).

Nomenclature

Ademe:	Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie ;
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique ;
AGV :	Acide Gras Volatile ;
ANME :	ANAerobic MEthanotroph ;
ANR :	Agence Nationale de la Recherche ;
ARISA :	Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis ;
ARNr :	Acide RiboNucléique Ribosomique ;
Atm :	Atmosphère (Unité de pression) ;
BMP :	Biochemical Methane Potential ;
BTP :	Bâtiment et Travaux Publics ;
CEL :	Carrières de l'Essonne et du Loing, Filiale du groupe Semardel ;
Cemagref :	Anciennement CEntre national du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et Forêts ;
CGDD-MEEDDM :	Commissariat Général au Développement Durable du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer ;
CHO-MF :	Formyl-Méthanofurane ;
CID :	Carbone Inorganique Dissous ;
CoA :	Coenzyme A ;
CoB :	Coenzyme B ;
CoM :	Coenzyme M ;
COD :	Carbone Organique Dissous ;
CVA :	Charge Volumique Appliquée ;
Cy :	Cyanine ;
DA :	Digestion Anaérobie ;
DCO :	Demande Chimique en Oxygène ;
DMA :	Déchets Ménagers et Assimilés ;
DND :	Déchet Non Dangereux ;
dNTP :	DésoxyriboNucléotide Tri-Phosphate ;
E :	Energie ;
EDTA :	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid ;
ELA :	Emballage de Liquide Alimentaire ;
Fd_{ox} / Fd_{red} :	Ferrédoxine oxydée / réduite ;
FISH :	Fluorescent In Situ Hybridization ;
FITC :	Fuorescein isothiocyanate ;
Ga :	Giga Annum (milliard d'années) ;
GAS :	Société GAS Environnement ;
GBn :	Test de fermentation sur n jours ;
GC-C-IRMS :	Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometer ;

GES :	Gaz à Effet de Serre ;
GSn :	Test d'incubation sur n jours ;
h :	Constante de Planck ;
HBAN :	Hydrosystèmes et Bioprocédés d'Antony ;
ICPE :	Installations Classées pour la Protection de l'Environnement ;
IRD :	Institut de Recherche et Développement ;
IRMS :	Isotope ratio mass spectrometry ;
ISD :	Installation de Stockage de Déchet ;
ISDND :	Installation de Stockage de Déchets Non Dangereux ;
ISO :	International Standard Organisation ;
ITS :	Intergenic Transcribed Spacer ;
K :	Conductivité hydrolrique ;
KIE :	Kinetic Isotope Effect ;
GC :	Micro Gas Chromatography ;
MM :	Matière Minérale ;
MO :	Matière Organique ;
MODECOM :	MéthOde DE Caractérisation des Ordures Ménagères ;
MPI :	Max Planck Institute ;
MS :	Matière Sèche ;
Mtr :	MethylTRansferase ;
MV :	Matières Volatiles ;
NADH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide ;
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate ;
NF :	Norme Française ;
OAM :	Oxydation Anaérobie du Méthane ;
OHPA :	Obligat Hydrogen Producing Acetogenic ;
OM :	Ordures Ménagères ;
OSA :	Oxydation Syntrophique de l'Acétate ;
P :	Pression ;
pb :	Paire de bases ;
PBS :	Phosphate buffered saline ;
PCDV :	Plateforme de Compostage de Déchets Verts ;
PCI :	Pouvoir Calorifique Inférieur ;
PCR :	Polymerase Chain Reaction ;
PE :	PolyEthylène ;
PEHD :	PolyEthylène Haute Densité ;
PET :	PolyEthylène Téréphtalate ;
PFA :	ParaFormAldéhyde ;
pH :	Potentiel Hydrogène ;
pKa :	Constante d'acidité ;

PP :	PolyPropylène ;
PRECODD :	Programme ECOTEchnologies et Developpement Durable ;
PRG :	Potentiel de Réchauffement Global ;
PVC :	PolyChlorure de Vinyle ;
PVF :	Fluorure de PolyVinyle ;
R :	Rapport d'abondance isotopique ;
RDP :	Ribosomal Database Project ;
Rm :	Vitesse maximale de production ;
rpm :	Rotations Par Minute ;
SDS :	Sodium Dodecyl Sulphate ;
SEE :	Société des Eaux de l'Essonne ;
SGE :	Scientific Glass Engineering ;
SIMSISH :	Secondary Ion Mass Spectrometry In Situ Hybridization ;
SIP :	Stable Isotope Probing ;
SMOW :	Standard Mean Ocean Water ;
STEP :	Station de Traitements des Eaux Polluées / Station d'Épuration ;
STP :	Standard Temperature and Pression ;
T :	Température ;
TAN :	Total Ammonia Nitrogen ;
TBAOH :	TetraButylAmmonium Hydroxide ;
TCD :	Thermique Conductivity Detector ;
TEOM :	Taxe d'Enlèvement des Ordures Ménagères ;
Tg :	Téragrammes ;
THF :	Tétrahydrofolate ;
TSS :	Temps de Séjour des Solides ;
V-PDB :	Vienne-Pee Dee Belemnite ;
α :	Facteur de fractionnement isotopique ;
α app :	Facteur de fractionnement isotopique apparent ;
ΔG^0 :	Energie libre ;
δ :	Composition isotopique en pour mille ;
\emptyset :	Diamètre ;
ε :	Facteur d'enrichissement isotopique ;
f :	Fraction du produit à l'instant t ;
λ :	Temps de latence ;
Pcm(∞) :	Production Cumulée de Méthane à la fin de l'expérience (mL.g ⁻¹ STP) ;
v :	Fréquence de vibration des atomes les uns par rapport aux autres ;

Introduction générale

Introduction générale

« La gestion de nos déchets présente toujours des enjeux majeurs ». C'est ainsi que commence le rapport établi par l'Atelier intergroupe Déchets fixant les objectifs du Grenelle Environnement en septembre 2007. En effet, alors que la quantité de déchets ménagers à traiter reste importante (31 millions de tonnes de déchets issues des ménages produites en 2008), la nécessaire prise en compte des principes du développement durable que sont, la limitation des émissions polluantes, la nécessité de préserver les ressources naturelles et l'augmentation de la part des énergies renouvelables dans le bouquet énergétique, impose de développer de nouvelles filières de traitement respectueuses de l'environnement. Ainsi, parmi les enjeux forts du Grenelle Environnement, figure très clairement la nécessité de développer la valorisation de la fraction organique contenue dans les déchets ménagers, qui représente un potentiel énergétique actuellement largement sous exploité. En effet, alors que 53 % de la masse humide des déchets ménagers collectés est constituée de déchets organiques, seuls 6 % d'entre eux sont valorisés par traitement biologique.

Dans ce contexte, les procédés anaérobies de traitement de déchets apparaissent clairement pouvoir répondre à cet objectif. En effet, la dégradation de la matière organique en conditions anaérobies conduit à la production de gaz riches du méthane. Cette réaction intervient dans de nombreux environnements naturels (rizières, sédiments, tourbières, ...). Le méthane ainsi produit est un puissant gaz à effet de serre qui contribue à l'augmentation des problèmes actuels de réchauffement climatique. Lorsque cette même réaction se produit dans des environnements méthanogènes industriels au sein desquels le biogaz peut être capté, elle permet la production d'énergie renouvelable. En effet, le biogaz ainsi généré contient une importante quantité de méthane valorisable notamment sous forme d'électricité ou de chaleur.

Les installations industrielles reposant sur le processus de la digestion anaérobie de la matière organique contenue dans les déchets sont de deux types : les méthaniseurs (installations hors-sol) et les installations de stockage de déchets bioactives. Alors que dans les décharges classiques, la dégradation anaérobie des déchets était subie, il est possible de l'accélérer et de l'optimiser dans les installations bioactives afin de réduire les impacts environnementaux à long terme. Même si le stockage ne peut être considéré comme un procédé de traitement *stricto-sensu*, la dégradation anaérobie dans les installations de stockage bioactives suit un processus tout à fait similaire à celui se produisant dans les méthaniseurs. Ce processus fait intervenir en cascade différentes réactions et populations de micro-organismes permettant de transformer la matière organique macromoléculaire en biogaz. En raison de la complexité de cette chaîne réactionnelle engendrée par la multitude et l'imbrication des voies métaboliques, une bonne connaissance des effets des paramètres opérationnels sur l'orientation des métabolismes s'avère nécessaire afin d'optimiser ces procédés. Ceci est notamment le cas pour la dernière étape, appelée méthanogenèse, au cours de laquelle le méthane est produit grâce à l'action de micro-organismes selon différentes voies métaboliques en fonction du substrat utilisé (CO_2/H_2 , acétate, ...).

Introduction générale

Les différentes voies métaboliques responsables de la méthanogenèse conduisent à des fractionnements isotopiques différents. Ainsi, la mesure de la composition isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) du méthane et du dioxyde de carbone a permis d'identifier les voies métaboliques responsables de la production du méthane dans les environnements naturels. Encore peu utilisée dans les études sur la dégradation des déchets, cette approche devrait permettre d'arriver à une compréhension plus fine des métabolismes méthanogènes mis en jeu et d'éclaircir les incertitudes liées à leur succession au cours de la digestion anaérobie des déchets.

Ce travail de recherche a ainsi pour premier objectif de valider l'utilisation de l'approche isotopique déjà utilisée pour l'étude des environnements méthanogènes naturels, à des systèmes industriels de traitement de déchets. Les potentialités de l'approche isotopique seront ensuite exploitées pour étudier l'effet de différents paramètres d'ordre opérationnel sur les processus de méthanisation. L'objectif général est ainsi d'obtenir une compréhension plus fine de l'influence de ces différents paramètres, notamment sur les voies métaboliques mises en jeu.

Ce mémoire de thèse est organisé en quatre chapitres distincts.

Le premier chapitre présente la problématique de la gestion des déchets en France. Les déchets, leurs évolutions ainsi que les filières de traitement y sont présentés afin de permettre d'appréhender de manière globale le contexte socio-économique dans lequel s'insère ce travail. Les procédés de stockage bioactif et de méthanisation des déchets y sont présentés de manière plus particulièrement détaillée car ils sont directement liés aux travaux de thèse.

Le second chapitre propose une synthèse bibliographique articulée en deux parties. Dans la première, le processus de méthanisation (ou de "digestion anaérobie") de la matière organique est présenté. Cette partie permet une compréhension de l'ensemble des réactions et acteurs intervenant dans le processus de méthanisation. L'étape finale conduisant à la formation du méthane, la méthanogenèse, y est plus particulièrement détaillée car c'est cette dernière qui sera principalement étudiée dans le cadre de ce travail. La seconde partie de ce chapitre présente l'ensemble des éléments nécessaires à la compréhension de l'approche isotopique utilisée. Après avoir rappelé le principe de cette approche, les travaux l'ayant mis en œuvre pour étudier la méthanogenèse dans différents environnements naturels, sont détaillés. Enfin, une synthèse des rares études menées à l'aide de cette approche sur la dégradation des DND est présentée.

Le troisième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail. L'ensemble des systèmes expérimentaux utilisés (microcosmes, mésocosmes, ...) ainsi que les méthodes analytiques et de calculs ayant été utilisés au cours des différentes expérimentations réalisées y sont décrits.

Dans le quatrième chapitre, les principaux résultats obtenus sont présentés et discutés. Les résultats ayant permis de valider l'utilisation de l'approche isotopique proposée pour l'étude de la méthanogenèse lors de la digestion anaérobie des déchets, sont tout d'abord détaillés. Dans une deuxième partie, les données obtenues sur les effets de différents paramètres opérationnels tels que, la température et la concentration en azote ammoniacal, sur la mise en place des métabolismes méthanogènes, sont présentées et discutées. Les résultats de deux expérimentations concernant des applications industrielles spécifiques aux procédés anaérobies de traitement des déchets non dangereux, au cours desquelles les potentialités de l'outil isotopique ont été exploitées, sont ensuite présentés. Dans une dernière partie, les données obtenues lors d'une campagne de mesures réalisée sur une installation de stockage de déchets, sont discutées.

Enfin, une conclusion générale propose une synthèse des principaux résultats obtenus et envisage les perspectives qu'ouvrent les travaux réalisés.

Chapitre 1

Problématique des déchets en France

Chapitre

1

Problématique des déchets non dangereux en France

Ce premier chapitre introductif, présente l'ensemble des aspects socio-technico-économiques relatifs à la gestion des Déchets Non Dangereux (DND) en France. Les travaux présentés dans ce mémoire se situent au cœur de cette problématique en ayant recourt à des techniques relevant de la biogéochimie isotopique pour étudier les phénomènes intervenants lors de la biodégradation de la matière organique des déchets en absence d'oxygène (phénomène ayant lieu dans les Installations de Stockage de Déchets Non Dangereux (ISDND) et dans les unités de méthanisation). La première partie de ce chapitre précise les définitions et présente le contexte socio-économique de la gestion des déchets en France. Ensuite, la composition, l'évolution et la caractérisation des ordures ménagères sont détaillées. Le contexte législatif réglementant la gestion des déchets non dangereux est également présenté. Enfin, la seconde et la troisième partie de ce chapitre présentent respectivement la description technique des Installations de Stockage de Déchets Non Dangereux et celle des installations de méthanisation.

1. Gestion des déchets en France

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont au cœur de l'enjeu sociétal, environnemental et économique que représente aujourd'hui la gestion des déchets en France. Les paragraphes qui suivent présentent une vue globale de la problématique des déchets en France. La production des déchets non dangereux, les filières actuelles de gestion de ces déchets et le contexte réglementaire y sont présentés. Ensuite, la composition des déchets non dangereux, son évolution ainsi que leurs caractéristiques intrinsèques sont détaillées.

1.1. Définitions

Etymologiquement, déchet vient de déchoir, du latin *cadere* (tomber). Un déchet est défini par l'article L. 541-1 du code de l'environnement : "Est un déchet tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement tout bien nuisible abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon". Cette définition relativement générale s'entend quelle que soit la valeur marchande du déchet, qui peut varier selon l'époque, l'endroit et l'individu. Au sein même des déchets, de nombreuses catégories et sous catégories sont distinguées. Parmi elles, trois catégories sont définies plus en détails dans ce paragraphe : les déchets dangereux, inertes et non-dangereux.

1.1.1. Déchets dangereux

La définition d'un déchet dangereux est donnée par le décret n°2002-540 du 18-04-2002, relatif à la classification des déchets (transposition de la Décision 2001-573-CE qui

établit la liste des déchets et de la Directive 91-689-CE qui définit un déchet dangereux). Les déchets dangereux sont les déchets issus de l'activité industrielle qui représentent un risque pour la santé ou l'environnement et qui nécessitent un traitement adapté. Ils peuvent générer des nuisances pour l'homme et l'environnement, et présenter une ou plusieurs propriétés de danger énumérées à l'Annexe I du décret du 18 avril 2002 (14 propriétés de danger sont énumérées : explosif, comburant, inflammable, irritant, infectieux, mutagène, écotoxique...) ce qui implique de prendre certaines précautions particulières. Ils font l'objet d'un contrôle administratif renforcé (production, stockage, transport, élimination).

1.1.2. Déchets inertes

Les déchets inertes sont des déchets qui ne subissent aucune modification physique, chimique ou biologique importante (gravas, terres...).

1.1.3. Déchets non dangereux (DND)

Les catégories de classifications des déchets sont relativement complexes et de nombreuses appellations ont été modifiées ce qui peut parfois créer quelques confusions. C'est par exemple le cas de l'ancienne catégorie des Déchets Ménagers et Assimilés (DMA) qui correspond aujourd'hui à la catégorie des DND.

Les DND sont les déchets constitués des ordures ménagères et des déchets provenant des entreprises industrielles, des artisans, commerçants, écoles, services publics, hôpitaux, services tertiaires, qui sont collectés dans les mêmes conditions que les ordures ménagères. Cette définition inclut les encombrants en provenance des collectes spécifiques, les déchets verts, les déchets du nettoyage, les boues de station d'épuration et divers matériaux recyclables. La Figure 1 illustre la répartition des différents déchets qui composent les DND (Ademe 2007).

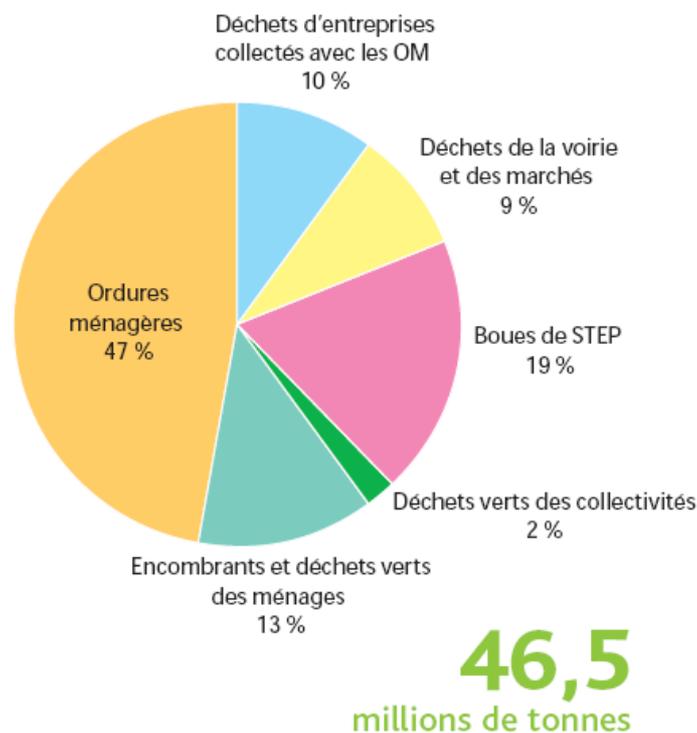


Figure 1 : Répartition en masse des DND selon leur origine, (Ademe 2007).

Les travaux réalisés pendant cette thèse portent sur les déchets non dangereux. Plus précisément, ce sont les sous-catégories des ordures ménagères (OM) et des biodéchets (appartenant aux DND) qui seront placées au centre de l'étude présentée dans ce manuscrit. En effet, la matière organique présente dans ce type de déchet peut être biodégradable dans les installations de stockage de déchets non dangereux et dans les méthaniseurs.

1.1.3.1. Ordures ménagères

La part la plus importante des DND correspond à la fraction des Ordures Ménagères (OM). Les OM sont les déchets issus de l'activité domestique des ménages pris en compte par les collectes usuelles ou séparatives.

1.1.3.2. Biodéchets

Les biodéchets sont composés de la fraction fermentescible des ordures ménagères (déchets de cuisine, certains déchets verts des ménages présents dans la poubelle) ainsi que des papiers (dont essuie-tout) et cartons.

1.2. La production des déchets en France et son évolution

1.2.1. La production de déchets en France

En 2004, la production totale de déchets en France était de 849 millions de tonnes. La répartition des déchets en fonction de leur secteur de provenance est détaillée dans le Tableau 1. Deux secteurs produisent à eux seuls la grande majorité des déchets en masse (BTP et agriculture/sylviculture). Les déchets de l'agriculture représentent une quantité importante dont la majeure partie (déjections animales) est valorisée au sein des exploitations productrices par retour au sol.

Tableau 1 : Contribution des différents secteurs à la production de déchets.

Catégories	Sous catégories	Tonnage en millions de tonnes	
Déchets des collectivités	Voirie, marché, boue et déchets verts	14	} D N D
Déchets des ménages	Encombrants et déchets verts	6	
	Ordures ménagères	22	
	DND collectés avec les OM	4,5	
Déchets des entreprises	DND collectés privés	79,2	
	Déchets dangereux	6	
Déchets de l'agriculture et de la sylviculture	Elevage, cultures et forêt	374	
Déchets d'activités de soin		0,2	
Déchets du BTP	Bâtiment, travaux publics, ...	340	
	Déchets dangereux	3	
Total		848,9	

Source ADEME-IFEN

(Ademe 2007)

Données issues d'enquêtes, d'études ou d'estimations produites entre 1995 et 2006

Parmi tous les types de déchets, les DND représentent un flux de 46,5 millions de tonnes. La répartition par type de déchets au sein de cette catégorie est donnée en Figure 1. Les OM représentant 47 % de ces 46,5 millions de tonnes, cela correspond à environ 22 millions de tonnes à traiter annuellement. Le reste du tonnage correspond aux déchets des

collectivités, aux encombrants et déchets verts ainsi qu'aux déchets des entreprises collectés avec les OM.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux OM et aux biodéchets. En effet, ce sont ces catégories des DND qui, du fait de leurs caractéristiques, présentent un potentiel valorisable par digestion anaérobie.

1.2.2. L'évolution de la production des OM

Un suivi de la production des déchets en France a été initié par différents ministères et agences depuis les années 70. En raison de la croissance démographique et de l'évolution des modes de vie, la production de déchets en provenance stricte des ménages a doublée sur les 40 dernières années. Même si, depuis 2002, la production de déchets connaît une stabilisation, depuis 1998 chaque habitant produit tout de même en moyenne un peu plus de 350 kg de déchets par an (Figure 2).

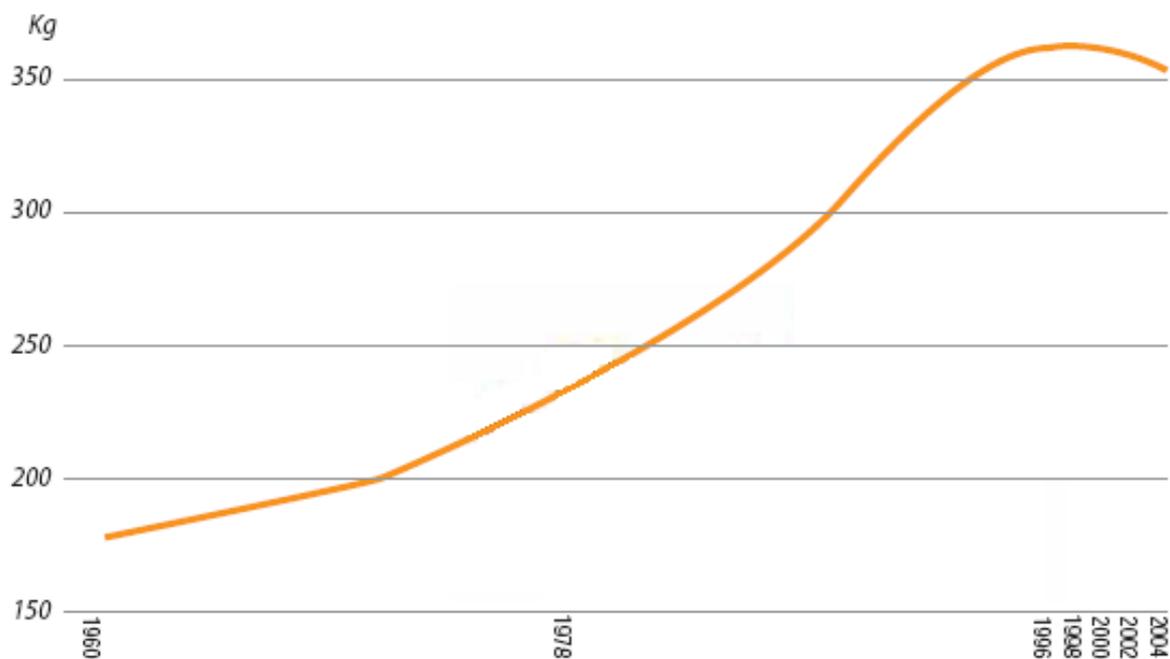


Figure 2 : Progression de la production d'OM par habitant en provenance stricte des ménages, (Ademe 2007).

1.3. Les différentes filières de gestion des OM

La prise de conscience des enjeux économiques et environnementaux relatifs à la gestion des DND n'est apparue que récemment (dans les années 1980). En effet, avant cette date, les déchets étaient majoritairement enfouis dans des décharges non contrôlées et dont les dispositifs de protection du milieu naturel étaient moins efficaces qu'actuellement. Depuis, avec la prise de conscience des notions de protection de l'environnement, ce sont principalement quatre filières qui se sont développées en France. Le traitement thermique et l'enfouissement en Installation de Stockage de Déchets (ISD) représentent plus de 80 % du devenir des OM. Le tri et le recyclage absorbent 13 % des OM et le compostage et la méthanisation 6 % (Figure 3). Le stockage en ISD reste une des méthodes majoritairement utilisée pour l'élimination des déchets puisque 39 % des OM y sont enfouis (Ademe 2007). De

plus, cette filière est à ce jour indispensable pour l'élimination des résidus produits par les autres filières. Grace aux évolutions techniques et à celles du contexte réglementaire, les filières de l'incinération et de l'enfouissement sont devenues plus respectueuses de l'environnement de part le développement d'équipements permettant de minimiser leurs impacts sur le milieu naturel. D'autre part, l'augmentation des prix de rachat de l'électricité produite par valorisation du biogaz, a entraîné une généralisation de la valorisation de ce dernier en ISDND et semble avoir permis à la méthanisation de devenir économiquement attrayante d'où une rapide augmentation du nombre de projets en instruction.

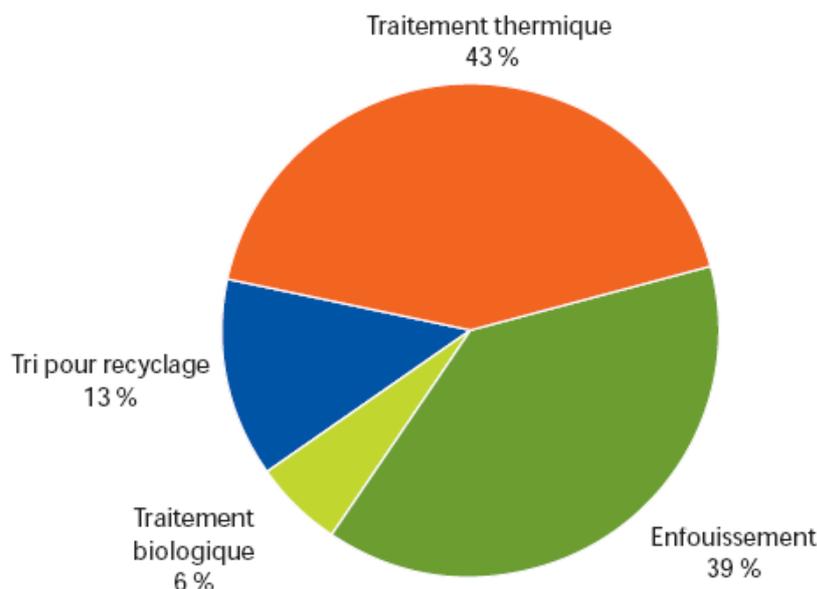


Figure 3 : Mode de traitement des OM, (Ademe 2007).

L'état actuel du nombre d'unités de traitement des déchets français a été donné par le Commissariat Général au Développement Durable du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer (CGDD-MEEDDM) et est listé ci-dessous :

- Incinération : 130 usines d'incinération sur le territoire en 2006 (300 en 1995). 7 usines d'incinération en projet ou en construction.
- Méthanisation : 6 installations industrielles en fonctionnement en France pour le traitement de déchets ménagers en mélange ou après collecte sélective de la fraction organique en 2006. 139 projets de traitement de déchets agricoles recensés fin 2008.
- Compostage : 800 installations de compostage en fonctionnement en France en 2006, avec une capacité de traitement comprise entre 1000 tonnes/an et 100 000 tonnes/an. Entre 5,5 et 6 millions de tonnes de déchets traités chaque année par compostage sont transformées en environ 1,8 million de tonnes de compost.
- Stockage de déchets non dangereux : 303 installations en exploitation en 2006 (contre plus de 500 en 1993).
- Tri des déchets : Plus de 300 centres de tri de déchets ménagers et assimilés absorbant 6,4 millions de tonnes de déchets en 2006.
- Recyclage : 18 millions de tonnes de matériaux recyclés ont été intégrés dans la production de matériaux (acier, papiers cartons, plastiques, verre, métaux non ferreux)

En 1993, le parc des ISD atteignait les 500 installations. Depuis, avec la prise en compte des impacts environnementaux, la montée de l'intercommunalité et les contraintes technico-économiques de plus en plus fortes, le nombre d'ISD en exploitation a diminué pour atteindre 303 installations en 2006. Aujourd'hui, même si l'impact environnemental du stockage des déchets s'est amélioré grâce à un meilleur confinement des déchets stockés, l'ouverture de nouveaux sites est très difficile du fait de l'opposition que peuvent rencontrer ces projets. A cela s'ajoutent, une législation contraignante (durée post exploitation de 30 ans minimum) et des garanties financières nécessaires très importantes. Une situation relativement similaire est constatée pour la filière incinération (diminution depuis 1995 de 300 à 130 usines 2010). Devant ce constat et pour faire face à l'épuisement des exutoires actuels alors que la production de déchets est toujours aussi importante, on assiste actuellement à l'essor des traitements par méthanisation, compostage et du tri/recyclage. Cette mutation est encouragée par les politiques publiques puisque, suite à la loi Grenelle II (publiée au Journal Officiel du 13 juillet 2010), les objectifs suivants en matière de gestion des déchets ont notamment été fixés à court ou moyen termes (liste non exhaustive) :

- Mise en place de filières de récupération et de traitement spécifique pour les seringues, les déchets dangereux des ménages, les pneumatiques, les déchets d'équipements électriques et électroniques et les produits d'ameublement ;
- Modulation de la contribution financière de chaque produit à sa filière de traitement en fonction de son impact environnemental et de ses valorisations, notamment de sa recyclabilité ;
- Création dans tout magasin d'alimentation de plus de 2 500 m² d'un point de déballage des suremballages des produits en sortie de caisse ;
- Harmonisation des consignes de tri d'ici 2015 et mise en place d'une signalétique appropriée sur les consignes de tri sur tous les produits concernés d'ici 2012 ;
- Limitation des capacités d'élimination ou d'enfouissement des déchets ménagers afin de favoriser la prévention, le recyclage et la valorisation ;
- Création d'une collecte sélective obligatoire des déchets organiques par leurs gros producteurs ;
- Limitation du traitement des installations de stockage et d'incinération à 60 % des déchets produits sur le territoire ;
- Possibilité donnée aux collectivités locales d'expérimenter pendant trois ans la mise en place d'une part variable incitative, calculée en fonction du poids et du volume des déchets, dans la TEOM (Taxe d'Enlèvement des Ordures Ménagères) ;
- Développement des filières de valorisation de la fraction organique des déchets.

1.4. La composition des OM et son évolution

Afin d'évaluer et d'étudier la biodégradabilité des Ordures Ménagères (OM), il est essentiel de bien connaître leur composition et notamment celle de la fraction organique présentant un potentiel valorisable lors de la digestion anaérobie. Ainsi, la composition de l'OM française et son évolution sont présentées plus en détails dans ce paragraphe.

1.4.1. Composition des OM

Etablir la composition d'une OM n'est pas chose aisée du fait des hétérogénéités spatiales et temporelles des flux générés. L'échantillonnage se doit donc d'être représentatif de l'ensemble des déchets à caractériser. Une des procédures reconnue et couramment utilisée en

France pour l'échantillonnage des déchets est la procédure MODECOM™ (MéthODE de Caractérisation des Ordures Ménagères) (Ademe 1993). Cette méthode, développée par l'Ademe en 1993, propose une procédure d'échantillonnage aléatoire des déchets et recommande une prise d'échantillon d'au moins 500 kg. Les campagnes de caractérisation des OM de l'Ademe, réalisées en 1993 et 2007, différencient des catégories (douze au total plus les "fines") et des sous-catégories de déchets.

La composition des OM en 1993 est détaillée en Figure 4. Les déchets putrescibles représentent environ un quart du pourcentage de la masse humide (28,6 %). Si on y ajoute les papiers et les cartons, plus de 54 % de la masse humide des OM correspond donc à une fraction "biodégradable".

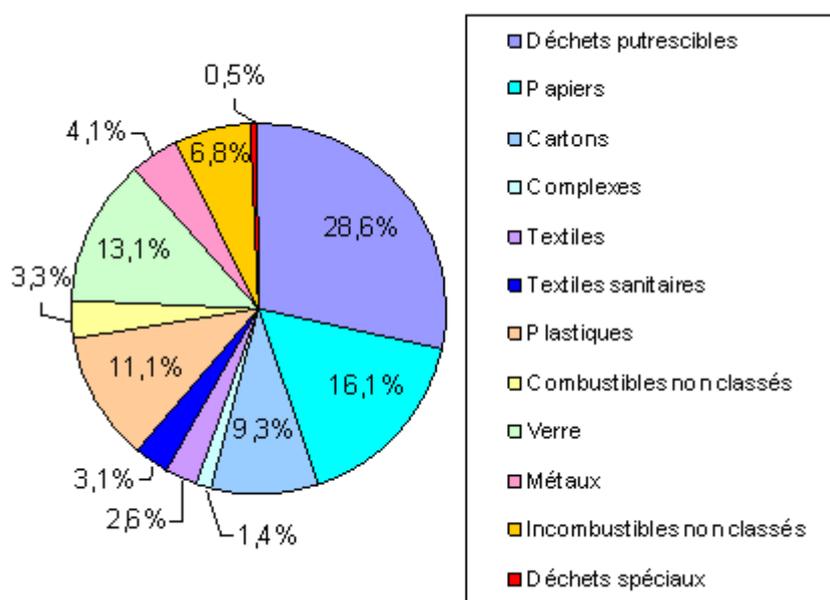


Figure 4 : Composition moyenne nationale des ordures ménagères. (Ademe 1999) (En % de la masse humide)

La campagne de caractérisation réalisée en 1993 différencie trois zones de collecte : zone urbaine, semi-urbaine ou rurale. Cette différenciation permet de mettre en évidence des différences spatiales. Par exemple, en zone urbaine, plus de papier arrive dans les poubelles. En plus de la variabilité géographique, une variabilité saisonnière peut également exister.

Ce sont les résultats obtenus lors de la campagne d'échantillonnage de 1993 (Ademe 1999), qui ont été utilisés pour reconstituer le déchet utilisé lors des expériences décrites dans la suite de ce manuscrit.

1.4.2. Évolution de la composition des OM

Suite à la publication (Ademe 2010) des résultats de l'enquête nationale de caractérisation des OM réalisée par l'Ademe en 2007 par la méthode MODECOM™, il apparaît que la composition des OM a peu évolué. En effet, entre 1993 et 2007, la composition globale des ordures ménagères est restée sensiblement identique. En 2007, les grandes catégories restent les déchets putrescibles (32,2 %), les papiers-cartons (21,5 %), le verre (12,7 %), les plastiques (11,2 %), les textiles (10,6 %, dont les textiles sanitaires), les métaux (3 %) et divers matériaux composites ou non classés (8,9 %). Toutefois, une légère

baisse de la part des emballages (carton, plastique et verre) qui est passée de 39 à 32 % est remarquée. Au contraire, les textiles sanitaires (couches, lingettes, mouchoirs papier ...), ont atteint la proportion de près de 9 % soit 34 kilos par habitant par an, ce qui représente une augmentation significative par rapport à 1993 expliquée en grande partie par l'utilisation de plus en plus courante des lingettes jetables. Certains composés toxiques affichent également une baisse significative par rapport aux données de 1993. Cette amélioration est probablement liée à la progression des collectes sélectives des déchets dangereux diffus, notamment en déchèterie, ainsi qu'à une meilleure conception de nombreux produits.

1.5. Caractérisation des OM et des biodéchets

Dans le cadre de la campagne de caractérisation des OM de l'Ademe réalisée en 1993, tout un ensemble de paramètres des OM a été déterminé. Parmi ces paramètres, la teneur en eau du déchet global est de 35 % de la masse humide, alors que la teneur en MV (Matières Volatiles) du déchet global est de 59,2 % de la masse sèche. Les teneurs en carbone et en azote organique sont respectivement : 33,4 % et 0,73 % de la masse sèche (cf. Tableau 2). Cette caractérisation est essentielle pour la compréhension des processus de dégradation (Ademe 1999).

Tableau 2 : Teneur en eau, MV, C et N org des OM françaises en 1993 - (Ademe 1999).

Catégories	Teneur en eau	Teneur en MV	Teneur en C	Teneur en N organique
	(% masse humide)	(% masse sèche)		
Déchets putrescibles (déchets de cuisine, DV...)	63,3	82,2	41,3	1,79
Papiers (emballages, journaux, magazines...)	26,7	82,1	43,8	0,32
Cartons (cartons plats, ondulés, autres...)	34,1	86,9	42,1	0,33
Complexes (emballages complexes)	24,8	85,8	49	0,33
Textiles (emballages textiles, autres...)	23,5	92,9	51,4	3,34
Textiles sanitaires (couches, coton hygiénique)	59,9	90,7	50,4	0,67
Plastiques (PE, PVC, PET, polystyrène)	23,7	91,8	65,7	0,43
Combustibles non classés (bois, caoutchouc...)	20,1	83,7	46,7	1,66
Verres	0,6	0,9	0,4	0,02
Métaux (aluminium, métaux ferreux, cuivre...)	8,7	0,9	---	0,38
Incombustibles non classés (pierres, gravats...)	9,9	8,3	1,9	0,18
Déchets spéciaux (chiffons souillés, piles...)	---	15,6	---	0,49
Déchet global	35	59,2	33,4	0,73

Toutefois, la connaissance de nos ordures ménagères est encore insuffisante. En effet, la connaissance des teneurs en eau, en MV, carbone et azote ne permet pas de connaître la biodégradabilité des déchets et leurs productions réelles de méthane. Si l'on s'intéresse plus particulièrement au potentiel de production de méthane des différents types de déchets solides, il est, contrairement aux effluents liquides, difficile de mesurer la DCO qui permet généralement d'en évaluer le potentiel méthanogène. En effet, dans le cas de déchets solides, le potentiel méthanogène est généralement exprimé par rapport à un flux massique de matière organique (mesuré en MV). Cependant, il n'y a pas forcément de correspondance entre la matière organique d'un déchet et son potentiel de production de méthane car la totalité de la matière organique n'est pas toujours dégradée lors des processus de méthanisation et cela particulièrement dans le cas des déchets solides.

En ce qui concerne les biodéchets, peu de données fiables sont disponibles, aussi bien en ce qui concerne leurs compositions que leurs caractérisations (probablement du fait d'une

variabilité très importante aussi bien spatiale que temporelle). Cependant, quelques valeurs de ratio C/N pour des biodéchets et pour des déchets verts ont permis de donner une gamme :

- C/N des déchets verts : compris entre 7 et 14,9 (Francou, Linères et *al.* 2008) (Annexe 1) ;
- C/N des biodéchets : compris entre 14,8 et 36,4 (Zhang, El-Mashad et *al.* 2007; Francou, Linères et *al.* 2008)(Annexe 1).

Afin de mesurer le potentiel de production de méthane d'un type de déchet donné en condition anaérobie, il existe des tests normalisés (BMP, GB_n, GS_n, ...). Le test dit BMP (Biochemical Methane Potential), décrit dans la norme NF EN ISO 11734 concernant l'évaluation de la biodégradabilité anaérobie "ultime" des composés organiques dans les boues de digesteurs, en fait partie. Il permet de déterminer la quantité maximum de méthane pouvant être produit à partir de la matière organique introduite dans un milieu "favorable et idéal" aux processus de dégradation anaérobie. Pour ce faire, un consortium microbien ainsi que l'ensemble des éléments indispensables au développement des micro-organismes (minéraux, métaux, ...) sont utilisés. Le Tableau 3 regroupe quelques exemples de potentiels méthanogènes déterminés par test BMP sur des déchets ménagers de différents types. Une approche purement théorique fondée sur une approche stœchiométrique considérant la composition élémentaire des différents constituants des déchets, donne 200 à 270 m³ de biogaz par tonne de déchets secs. Une approche reposant sur des tests de biodégradabilité donne des potentiels de production de méthane compris entre 60 et 170 m³ de méthane par tonne de déchets secs (El-Fadel, Findikakis et *al.* 1996).

Tableau 3 : Biodégradabilité anaérobie de déchets ménagers ou fractions de déchets - (Gachet 2005).

Nature du déchet	Test	Taux de biodégradation (potentiel méthane)	Références
Déchets ménagers	BMP	186 à 222 L/kg MO Totale	(Owens et Chynoweth 1993)
Déchets de jardin	BMP	123 à 209 L/kg MO Totale	
Déchets de papier	BMP	84 à 278 L/kg MO Totale	
Déchets d'ELA	BMP	318 à 349 L/kg MO Totale	
Déchets ménagers	BMP	environ 400 L/kg MO Totale	(Chen, Ecke et <i>al.</i> 1995)
Déchets ménagers frais	BMP	177 Nm ³ /t MS	(Heiss-Ziegler et Lechner 1999)
Déchets ménagers compostés	BMP	4,8 Nm ³ /t MS	
Déchets ménagers	BMP	85 à 125 m ³ t MS	(Harries, Cross et <i>al.</i> 2001a)
Déchets ménagers papier	BMP	127 à 167 m ³ t MS	(Harries, Cross et <i>al.</i> 2001b)
Déchets ménagers carton d'emballage	BMP	209 m ³ t MS	
Déchets ménagers textile	BMP	94 à 142 m ³ t MS	
Déchets ménagers bois	BMP	28 m ³ t MS	
Déchets ménagers putrescibles	BMP	16 à 94 m ³ t MS	

D'autres types de caractérisations plus détaillées, qui ne seront pas présentées dans ce manuscrit, permettent d'obtenir une meilleure connaissance de la composition et des caractéristiques des OM et des biodéchets. Certaines caractérisations physique, chimique (analyse élémentaire, fraction soluble), biologique, biochimique (lipidique, protéique, humique) ou thermique (Achour 2008) peuvent ainsi permettre de mieux évaluer la biodégradabilité de la matière organique présente dans les déchets.

1.6. Contexte réglementaire

Plusieurs textes, européens et nationaux, encadrent le traitement des déchets en France. Le code de l'environnement regroupe l'ensemble des grands principes du cadre réglementaire

français en ce qui concerne les déchets. Un bref aperçu de quelques notions importantes de la législation en vigueur est présenté dans la suite de ce paragraphe.

Les décisions concernant l'élimination des déchets passent par la mise en œuvre de plans d'élimination des déchets :

- Plans départementaux d'élimination des déchets non dangereux.

Chaque département est couvert par un plan départemental ou interdépartemental d'élimination des déchets non dangereux. Ce plan est établi en concertation avec des représentants des communes et de l'ensemble des acteurs concernés. Le plan dresse l'inventaire des types, des quantités et des origines des déchets à éliminer et des installations existantes appropriées. Il énonce les priorités à retenir afin de garantir un niveau élevé de protection de l'environnement tout en tenant compte des moyens économiques et financiers nécessaires à leur mise en œuvre.

- Plans régionaux pour les déchets industriels et ménagers dangereux.

La majorité des installations de gestion des déchets est régie par la réglementation qui définit les contraintes juridiques et techniques d'exploitation d'une installation listée dans le Décret du 20 mai 1953 relatif aux Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE). Ces installations sont soumises à une réglementation spécifique qui complète la réglementation sur les déchets. Elles sont soumises à une procédure soit de déclaration, soit d'autorisation.

Les unités de méthanisation traitant des déchets ménagers (ordures ménagères et boues de station d'épuration) sont des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement, soumises à autorisation. Les ISD, sont elles aussi des ICPE soumises à autorisation. Enfin, les conditions de stockage des déchets ont été cadrées par l'adoption de la Directive 1999/31/CE du 26 avril 1999 concernant la mise en décharge. Cette directive prévoit l'orientation des déchets vers les différents types de décharge :

- Décharge de déchets dangereux (Classe 1).

Destinée aux déchets industriels spéciaux.

- Décharge de déchets non dangereux (Classe 2).

Destinée aux ordures ménagères et aux déchets industriels banals.

- Décharge de déchets inertes (Classe 3).

Destinée aux déchets inertes.

L'influence de la réglementation communautaire relative aux déchets sur le droit des déchets français est à la base de la construction d'un dispositif réglementaire relativement large, exigeant et de plus en plus tourné vers la protection de l'environnement. A partir de 1975, le législateur français suit « le train communautaire ». Le droit des déchets français se construit depuis par réajustements successifs.

2. Description technique d'une ISDND

2.1. ISDND classique

2.1.1. Définition

Aujourd'hui, les installations de stockage de déchets non dangereux (classe 2) sont devenues de véritables sites industriels soumis à une réglementation stricte et faisant l'objet de règles rigoureuses de conception, d'exploitation et de surveillance. Dans l'arrêté du 9

septembre 1997 (modifié les 31 décembre 2001, 3 avril 2002 et 19 janvier 2006) l'ISDND est définie comme étant une installation "d'élimination de déchets ménagers et assimilés (aujourd'hui DND) par dépôt ou enfouissement sur ou dans la terre". La Figure 5 présente un schéma de principe d'une ISDND.

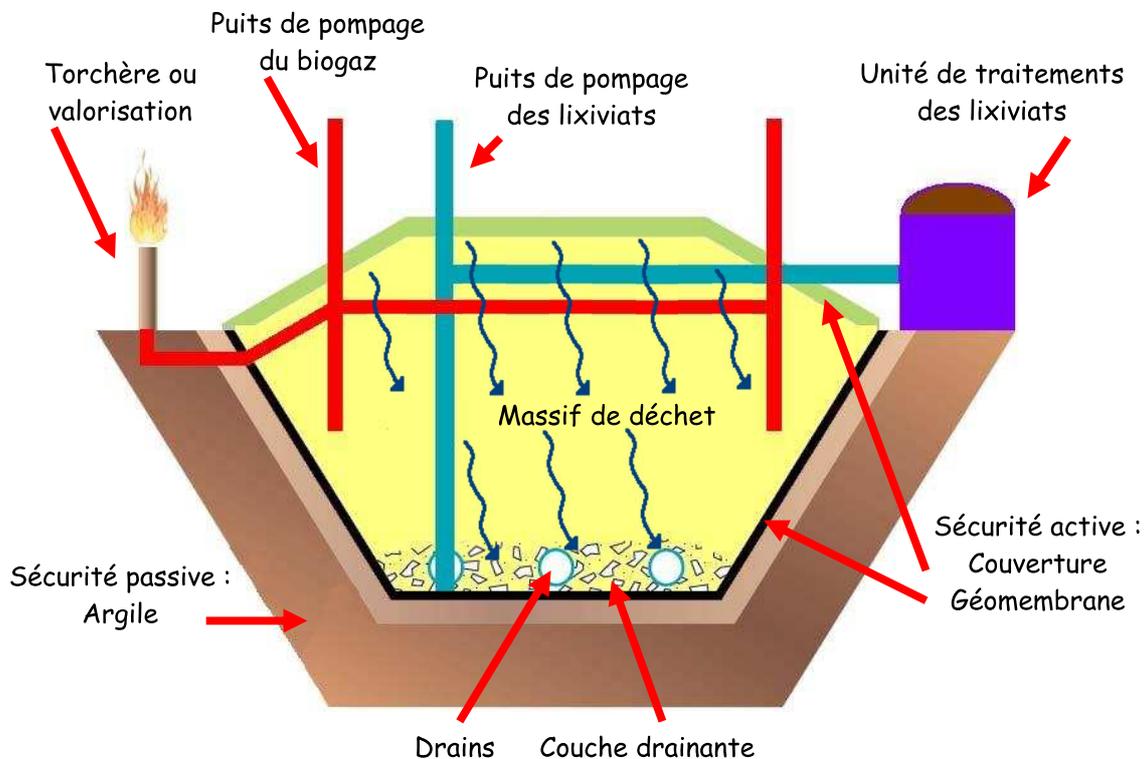


Figure 5 : Schéma d'une ISDND.

2.1.2. Localisation et aménagement

Le site doit répondre à une liste de critères définis dans les articles 9 à 11 de l'arrêté du 9 septembre 1997. Parmi ces derniers, le contexte géologique et hydrologique du site doit être favorable. En particulier, le sous-sol doit constituer une barrière de sécurité passive qui ne doit pas être sollicitée pendant l'exploitation et le site doit garantir la protection des sols, des eaux souterraines et de surfaces. Les risques d'inondation, d'affaissement, de glissement de terrain ou d'avalanche sont également pris en compte et une distance minimum de 200 mètres à toute zone habitée est un critère pour le choix du site.

2.1.3. Structure technique d'une ISDND

2.1.3.1. Barrière de fond

La barrière de fond d'une ISDND (préconisée par l'arrêté du 9 septembre 1997) est constituée d'une structure composée d'une barrière de sécurité passive et d'une barrière de sécurité active comme représenté sur la figure 6.

La barrière de sécurité active est constituée d'une géomembrane, généralement en PEHD (polyéthylène haute densité), qui assure l'étanchéité des casiers. Cette géomembrane est recouverte d'une couche drainante (massif granulaire parcouru de drains nécessaires au drainage et à la collecte des lixiviats).

La barrière de sécurité passive est nécessaire pour assurer la prévention d'une pollution des sols et des nappes d'eau sur le long terme. En cas de défaillance de la barrière de sécurité active, elle assurera le rôle d'étanchéité des casiers.

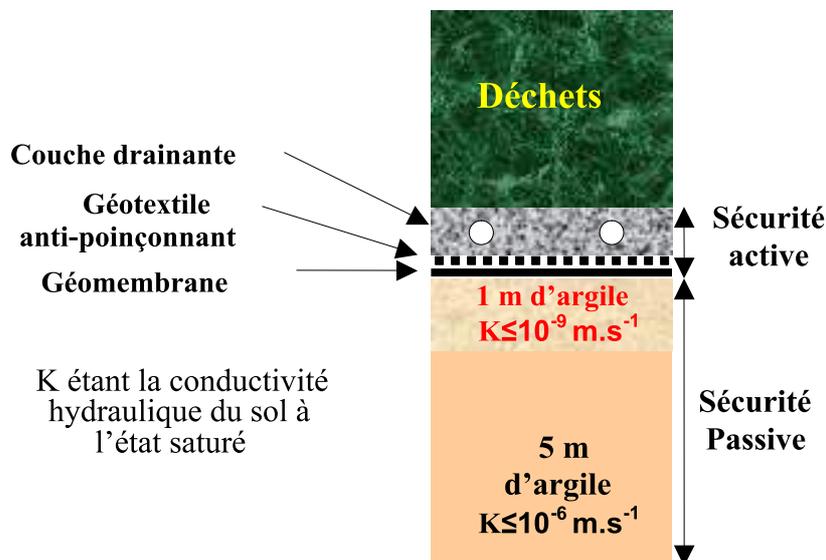


Figure 6 : Schéma du système d'étanchéité composite du fond et des flancs de casiers d'une ISDND, (Vigneron 2005).

2.1.3.2. Couverture

Lorsque l'exploitation des casiers est terminée, la couverture définitive est mise en place sur le massif de déchets. C'est une barrière de sécurité active dont le but est d'isoler le massif de déchets de l'extérieur (limitation des entrées d'eau et des sorties de biogaz). Elle doit résister à de nombreuses agressions (ruissellements, intrusions de racines, tassements, agressions chimiques, ...), conserver son intégrité et rétablir l'esthétique du site (Ademe 1999b). Il existe deux types de couvertures : les semi-imperméables et les imperméables. La structure d'une couverture imperméable est détaillée en Figure 7.

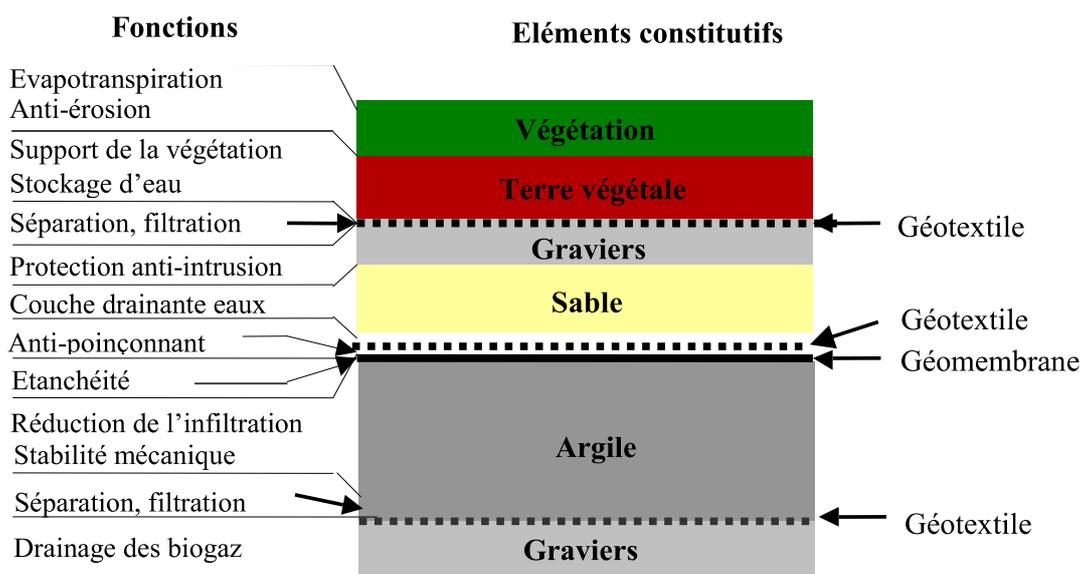


Figure 7 : Couverture imperméable et exemple d'éléments constitutifs, (Vigneron 2005).

2.1.4. Exploitation du site

La phase d'exploitation est régie par de nombreuses règles (directive européenne 1999/31/CE du 16 avril 1999 et arrêté du 9 septembre 1997) concernant la maîtrise et le contrôle quantitatif et qualitatif des flux entrants (déchets, eaux de pluies, ...), des flux sortants (biogaz, lixiviats, ...) et du milieu naturel (eaux souterraines, ...). La surveillance du site s'applique aux zones de stockage de déchets et aux zones associées (bassin de stockage et/ou traitements des lixiviats, unité de destruction ou de valorisation du biogaz, ...).

Le principe schématique de l'exploitation consiste à déposer les déchets dans l'alvéole ou le casier en exploitation par couches successives compactées. Généralement, les déchets sont déchargés des camions au niveau d'un quai de déchargement, ensuite ils sont déplacés jusqu'à la zone d'exploitation par un tractopelle et enfin, le compactage est réalisé à l'aide de compacteurs. Afin de réduire les nuisances, les déchets doivent être périodiquement recouverts de matériaux inertes.

2.1.5. Effluents

2.1.5.1. Lixiviat

Le terme lixiviat désigne "tout liquide filtrant par percolation des déchets mis en décharge et s'écoulant d'une décharge ou contenu dans celle-ci". Au contact des déchets, le lixiviat va se charger en polluants par voie mécanique, chimique et biologique. La qualité des lixiviats est donc très variable d'un site à l'autre et évolue au cours du temps. La réglementation impose des valeurs seuils à atteindre après traitements, pour certains polluants, avant rejet dans le milieu naturel.

Le suivi de certains paramètres des lixiviats peut renseigner sur l'état de dégradation du massif de déchets. L'évolution du pH, de la charge organique et de sa biodégradabilité ainsi que les teneurs en métaux en sont les principaux indicateurs.

2.1.5.2. Biogaz

Le biogaz de décharge est défini comme "tous les gaz produits par les déchets mis en décharge" (Directive européenne (99/31/CE) du 26 avril 1999).

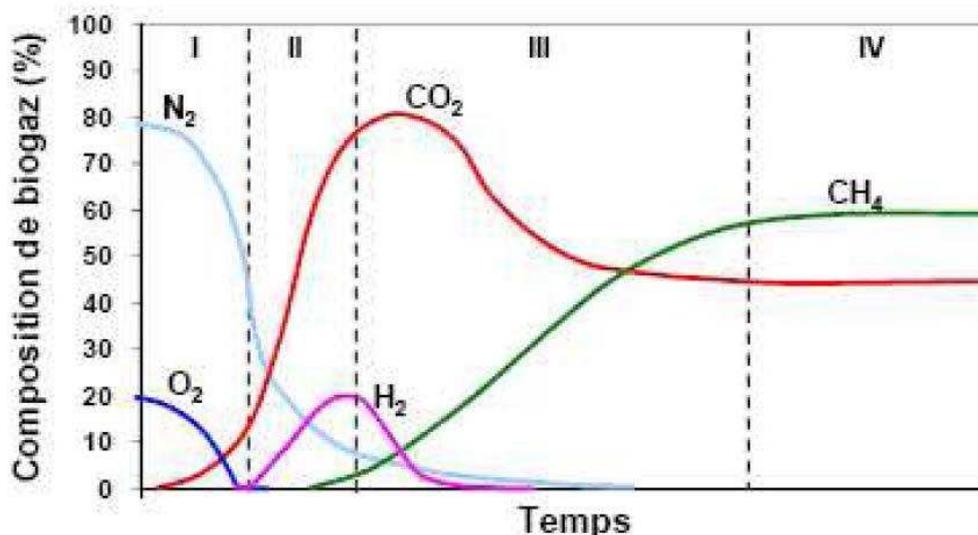


Figure 8 : Évolution de la composition du biogaz au cours des différentes phases de dégradation - (Farquhar et Rovers 1973).

Dans la phase anaérobie méthanogène, le biogaz est principalement composé de méthane et de dioxyde de carbone : entre 50 et 70 % de méthane pour 30 à 50 % de dioxyde de carbone (Farquhar et Rovers 1973). La composition du biogaz au cours des quatre phases de dégradation (Barlaz, Schaefer et *al.* 1989), est présentée sur la Figure 8 où la phase I est la phase aérobie, la phase II est la phase acide anaérobie, la phase III est la phase méthanogène accélérée et la phase IV est la phase méthanogène ralentie.

La collecte et le traitement du biogaz sont imposés par la réglementation afin de protéger l'environnement des gaz à effet de serre et d'assurer la sécurité du site en évitant l'accumulation de biogaz pouvant provoquer des explosions ou des incendies. Chaque ISDND doit donc au minimum assurer le captage et la destruction du biogaz (principalement *via* des torchères). Une alternative économiquement et environnementalement intéressante est la valorisation de l'énergie renouvelable qu'est le biogaz. Collecté à partir des puits installés au sein du massif de déchets, le biogaz est capté grâce à la création, *via* des sur-presseurs, d'une légère dépression à l'intérieur du massif. Le biogaz est ensuite envoyé dans des moteurs à combustion pour y être valorisé en produisant de l'électricité pouvant être exportée sur le réseau électrique public.

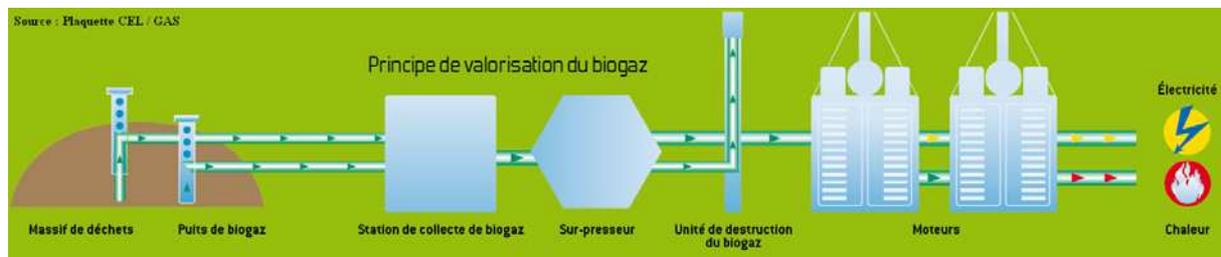


Figure 9 : Schéma de principe de la valorisation du biogaz (CEL /GAS).

2.1.6. Post exploitation et réhabilitation du site

Le programme de suivi post exploitation dure au minimum trente ans et comprend la surveillance et l'entretien du site et des installations. Il comprend également le suivi des rejets. Les analyses sont relativement identiques à celles qui sont réalisées durant la phase d'exploitation (lixiviats, biogaz, eaux de ruissellement, eaux souterraines & air ambiant). Seule la fréquence d'analyse diminue (généralement tous les six mois).

La revégétalisation du site a une double fonction : elle doit permettre sa réintégration paysagère dans l'environnement et protéger le sol contre l'érosion *via* le développement du système racinaire.

2.2. ISDND bioactive

2.2.1. Définition

Depuis les années 1970, principalement aux Etats-Unis, une nouvelle stratégie de gestion des ISDND a émergée : l'ISDND bioactive ou "bioréacteur" (Barber et Maris 1984; Yuen, Styles et *al.* 1995; Reinhart et Townsend 1998; Pacey 1999). Cette nouvelle approche peut se définir comme "une tentative de maîtrise des processus d'évolution (microbiologiques) des déchets biodégradables dans une installation confinée en vue de transformer et de stabiliser la fraction facilement et modérément fermentescible des déchets, dans un temps compatible avec la période de suivi post-exploitation d'une ISDND conformément au principe de développement durable" (Vigneron 2005). Dans cette approche nouvelle de

l'enfouissement des déchets, l'ISDND devient un procédé industriel dont le but est d'obtenir une stabilisation des déchets plus rapide qu'en ISDND classique, accompagnée d'une production de biogaz accrue avant la période de post exploitation.

Le concept d'ISDND bioactive regroupe différentes techniques : (i) l'injection d'air dans le massif de déchets, (ii) l'injection de lixiviat, et (iii) l'injection conjointe d'air et de lixiviat. La seconde technique reposant sur l'injection de lixiviat est présentée plus en détails dans le paragraphe suivant.

2.2.2. ISDND bioactive par recirculation de lixiviat

2.2.2.1. Concept

La mise en œuvre d'un système entraînant une étanchéité complète (couverture, fond et flancs) dans les ISDND "classiques", a pour but de limiter au maximum l'infiltration d'eau dans le massif de déchets. De ce fait, un dessèchement rapide du massif de déchets peut avoir lieu. La conséquence est alors une augmentation du temps nécessaire à la stabilisation des déchets (temps pouvant alors atteindre plusieurs siècles) du fait du déficit d'humidité (Pohland et Al-Yousfi 1994; Reinhart et Townsend 1998; Pacey 1999). Ce concept de système fermé, génère ainsi la "tombe sèche". L'ISDND devient alors une "bombe" à retardement (Delineau et Budka 2000). En effet, cet état "sec" n'est que latent car une intrusion d'eau dans le massif de déchets peut relancer les processus de biodégradation de manière incontrôlée (Ademe 1999b).

Dans le but de répondre à cette problématique, le concept d'ISDND bioactive (ou de bioréacteur anaérobie) par recirculation de lixiviat a été développé. Le but est de favoriser les réactions de biodégradation en augmentant l'humidité du massif de déchets. Le principe repose sur l'utilisation de l'ISDND et de ses infrastructures d'étanchéités, ainsi que sur la recirculation d'un liquide (généralement le lixiviat), qui va permettre le maintien, au sein du massif de déchets, d'une humidité optimale pour la dégradation des déchets. De plus, cette technique conduit à long terme à la réduction de la charge organique polluante des lixiviats (Barber et Maris 1984).

2.2.2.2. Système de recirculation

Le choix et la conception du système de recirculation est une étape clé pour l'efficacité d'une ISDND bioactive car c'est elle qui va permettre d'obtenir une teneur en eau la plus homogène possible au sein du massif de déchets (Mehta, Barlaz et *al.* 2002). Liés aux contraintes d'exploitation et aux contraintes économiques, deux types de système de recirculation sont généralement utilisés : la recirculation par tranchées horizontales et/ou par puits verticaux (Reinhart 1996). Ces systèmes doivent résister dans le temps au colmatage et au tassement des déchets et assurer une répartition homogène de l'humidité.

Une capacité de stockage des lixiviats à recirculer et éventuellement une unité de prétraitements des lixiviats avant recirculation font également parties des équipements nécessaires à une ISDND bioactive.

2.2.2.3. Recirculation de lixiviat

Les quantités de lixiviats recirculées sont très différentes en fonction de chacun des sites. En effet, chaque exploitant ajuste le volume réinjecté en fonction des volumes collectés

en fond de casier et de la capacité de stockage. Le Tableau 4 regroupe les volumes réinjectés sur quelques sites.

Tableau 4 : Débits de recirculation de lixiviats sur sites - (Vignerot 2005).

Auteurs	Sites	Volume de lixiviat recirculé
(Barina, Budka et <i>al.</i> 2001)	The Busta Landfill (Italie)	3 à 4 m ³ lixiviat/ha/j
(François 2004)	Site de Lapouyade (France)	48 m ³ lixiviat/ha/j
(Burton et Watson-Craik 1999)	Auchencarroch (Strathclyde, Ecosse)	0,123 m ³ lixiviat/an/m ³
(Delineau et Budka 2000)	Nanticoke (Bringhamton, Etats-Unis)	0,135 m ³ lixiviat/an/m ³
(Yuen, Styles et <i>al.</i> 1995)	Lyndhurst (Melbourne, Australie)	2,65 m ³ lixiviat/an/m ³
(Delineau et Budka 2000)	Vert-le-Grand (France)	0,138 m ³ lixiviat/an/m ³
(Gachet 2005)	SYDOM du Jura (France)	0,18 m ³ lixiviat/an/tonne
(Delineau et Budka 2000)	Yolo County Central Landfill (Davis, Californie)	0,54 m ³ lixiviat/an/tonne

2.2.2.4. Avantages

La durée nécessaire à la stabilisation des déchets en ISDND bioactive serait comprise entre 10 et 15 ans contre 30 à 150 ans pour une ISDND classique (Pacey 1999). Donner des chiffres est compliqué mais le phénomène d'accélération est, quant à lui, admis par de nombreux auteurs. Les principaux avantages de l'ISDND bioactive sont :

- Réduction de la charge polluante biodégradable des lixiviats. L'accélération de la vitesse de dégradation de la matière organique (Chian et De Walle 1976; Suflita, Gerba et *al.* 1992; Reinhart et Al-Yousfi 1996), entraîne la diminution de la DCO (Pohland 1975; Tittlebaum 1982; Pohland et Al-Yousfi 1994; Ozkaya, Demir et *al.* 2004) et facilite donc le traitement des lixiviats (Pohland et Al-Yousfi 1994; Warith, Zekry et *al.* 1999; Kim et Pohland 2003).
- Augmentation de la production de biogaz pendant la phase d'exploitation. Un démarrage précoce de la méthanogenèse peut être obtenu grâce au pouvoir tampon du lixiviat qui stabilise le pH à des valeurs idéales pour les micro-organismes méthanogènes (San et Onay 2001; Ozkaya, Demir et *al.* 2004). La vitesse de production du biogaz (Reinhart et Al-Yousfi 1996; El-Fadel 1999) et notamment du méthane (Attal, Akunna et *al.* 1992; Gurijala et Suflita 1993; Jokela, Kettunen et *al.* 1999; Barina, Budka et *al.* 2001; Chan, Chu et *al.* 2002; Mehta, Barlaz et *al.* 2002; Demir, Ozkaya et *al.* 2004a; Demir, Bilgili et *al.* 2004b) est plus rapide que dans une ISDND classique.
- Augmentation de la vitesse de tassement des déchets (Leckie, Pacey et *al.* 1979; Buivid, Wise et *al.* 1981; El-Fadel 1999; Chan, Chu et *al.* 2002; Mehta, Barlaz et *al.* 2002; Ozkaya, Demir et *al.* 2004) permettant d'obtenir un vide de fouille plus important qu'en mode de gestion classique (Warith, Zekry et *al.* 1999).

La sollicitation des systèmes d'étanchéité et de drainage est maximisée pendant la période où leur efficacité est optimale. La production de biogaz est augmentée pendant la période d'exploitation ce qui permet de rentabiliser la valorisation de ce dernier. Les risques environnementaux pour les générations futures sont ainsi minimisés.

2.2.2.5. Limites

Les risques des ISDND bioréacteur sont ceux des ISDND classiques mais sont amplifiés durant la phase d'exploitation et réduits durant celle de post exploitation (Vignerou 2005). En effet, la recirculation des lixiviats peut entraîner une instabilité du massif de déchets si la gestion du site n'est pas adéquate. Des phénomènes de fracturation hydraulique par augmentation de la pression interstitielle, des fuites sur les pentes ou les talus et des nappes perchées sont quelques-uns des problèmes pouvant survenir. Le suivi des volumes injectés, l'éloignement des points de réinjections des pentes, la diminution des pentes des sites en remblai et la non pratique d'injection sous pression, permettent de limiter les risques de voir survenir de tels problèmes. Par ailleurs, du fait de la sollicitation accrue du système d'étanchéité, une surveillance plus régulière de la qualité des eaux souterraines est souhaitable.

Un des risques spécifiques aux ISDND bioactives est l'accumulation des polluants non biodégradables en condition anaérobie. A terme, certains de ces composés (éléments organiques et inorganiques récalcitrants comme la DCO dure, l'azote ammoniacal, les chlorures, le fer et le manganèse) pourraient donc s'accumuler dans les lixiviats et inhiber le processus même de digestion anaérobie. Le principal composé polluant non biodégradable en conditions anaérobies est l'azote ammoniacal (Burton et Watson-Craik 1997) et son accumulation pourrait avoir des effets inhibiteurs sur la dégradation des déchets (dès 3421 mg $\text{NH}_3+\text{NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ en ISDND classique (Wens, Vercauteren et *al.* 2001)). Afin d'éviter l'accumulation de l'azote ammoniacal, la possibilité de nitrifier les lixiviats avant leur recirculation représente une solution intéressante (Vignerou 2005).

3. Description technique d'une installation de méthanisation

3.1. Définition

Il est difficile de donner une définition précise d'une installation de méthanisation. En effet, la conception de ces installations est totalement différente en fonction de la nature des déchets ou des effluents à traiter. Toutefois, il est possible de définir une installation de méthanisation comme étant : un procédé hors sol édifié et exploité dans le but de fournir l'ensemble des conditions nécessaires (température, humidité, ...) à la croissance et au maintien, en condition anaérobie, de populations microbiennes dégradant la matière organique provenant des déchets ou d'effluents. La mise en œuvre de ce processus de digestion anaérobie conduit à la formation de biogaz contenant du méthane (source d'énergie renouvelable) pouvant être facilement recueilli et valorisé.

Il est possible de distinguer les procédés de méthanisation selon différents critères opérationnels (type de réacteur, d'alimentation, taux d'humidité, température, ...) permettant de les classer. Les différentes stratégies technologiques applicables aux procédés de méthanisation sont détaillées dans les paragraphes suivants.

3.2. Stratégies technologiques de méthanisation

3.2.1. Alimentation

Les méthaniseurs peuvent fonctionner en régime continu d'alimentation en matière organique (souvent le régime est semi-continu avec une ou plusieurs alimentations séquentielles dans la journée). Une autre méthode consiste à alimenter le digesteur de façon

discontinu, c'est-à-dire introduire la matière organique à digérer initialement, puis ne plus en introduire pendant toute la durée du processus de méthanisation (Moletta 2008).

3.2.2. Type de réacteur

Deux modèles types de réacteurs reposant sur un principe différent sont généralement distingués dans les installations de méthanisation, (la réalité se situe généralement entre les deux) : les réacteurs "pistons" et les réacteurs "mélangés". Le principe de ces réacteurs est représenté en Figure 10. Dans les réacteurs "mélangés", la matière organique entrante est immédiatement mélangée avec celle en cours de dégradation. Dans les réacteurs "pistons", la matière entrante se déplace au cours du temps dans le réacteur jusqu'à atteindre la sortie de celui-ci sans avoir été mélangée avec celle déjà en cours de dégradation (Moletta 2008).

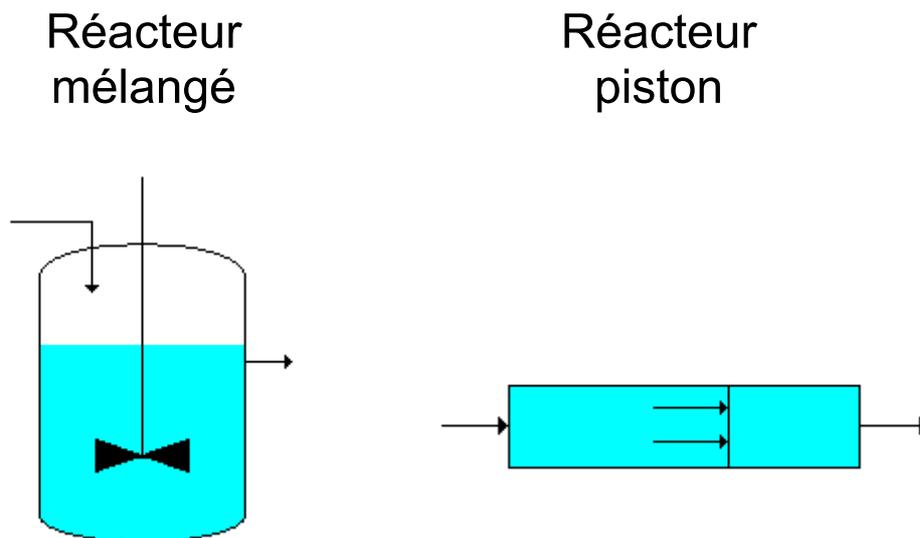


Figure 10 : Schéma de principe des réacteurs mélangé et piston.

3.2.3. Nombre d'étapes

Il est possible de réaliser l'ensemble des étapes de la digestion anaérobie dans un seul réacteur (une seule étape) ou bien de procéder en deux étapes par passages successifs de la matière organique dans deux réacteurs distincts. L'intérêt de procéder en deux étapes est de réaliser dans un premier réacteur les premières étapes de la digestion anaérobie (hydrolyse et acidogénèse généralement). Pendant cette étape, la matière organique est transformée en molécules beaucoup plus simples : monomère, AGV, Ensuite, les déchets sortant de ce premier réacteur sont dirigés vers un second réacteur dans lequel se réaliseront les étapes suivantes (acétogénèse et méthanogénèse généralement) conduisant à la formation du méthane. En imposant des conditions opératoires spécifiques dans chacun des deux réacteurs, le but est d'optimiser le processus de digestion anaérobie en proposant des conditions physico-chimiques adaptées à chacun des différents consortiums de micro-organismes catalysant les différentes étapes de dégradation, afin d'obtenir une accélération de la cinétique de dégradation et une augmentation du rendement de production du méthane (Moletta 2008).

3.2.4. Taux d'humidité

Un des paramètres capitaux, si ce n'est le plus important, est la teneur en eau. Un classement arbitraire est généralement réalisé comme suit : en dessous de 5 % de matière

sèche, c'est le domaine de la méthanisation des effluents, dans la gamme 5 à 20 % de matière sèche, la fermentation est appelée "humide" et dans la gamme 20 à 50 % de matière sèche, la fermentation est dite "sèche". Au dessus de 55 % le milieu est considéré comme difficilement traitable par méthanisation (Moletta 2008).

- **Digestion humide :**

Un ajout d'eau est souvent nécessaire afin d'ajuster le taux d'humidité dans le milieu. L'avantage principal réside dans l'obtention d'un mélange solide-liquide relativement homogène. Les désavantages sont la production d'une quantité plus importante d'effluents liquides à traiter et une décantation des matières "lourdes" du fait d'une densité faible du milieu.

- **Digestion sèche :**

En comparaison avec la digestion dite humide, le milieu est généralement moins homogène et l'introduction de matières "lourdes" ne pose pas réellement de problèmes du fait de la densité plus élevée du milieu. La non homogénéité du milieu peut permettre d'éviter des problèmes de dissémination de polluants et donc de blocage total des réactions de digestion anaérobie dans le méthaniseur.

3.2.5. Température

Un des paramètres caractérisant un méthaniseur est sa température. La température influence principalement les vitesses de réaction, qu'elles soient chimiques ou biochimiques (El-Fadel, Findikakis et *al.* 1996). Dans les méthaniseurs, les procédés sont quasiment exclusivement mésophiles (35°C à 40°C) et thermophiles (55°C à 60°C). Les temps de séjour sont généralement plus longs en conditions mésophiles par rapport à ceux nécessaires en conditions thermophiles (Buffière, Carrere et *al.* 2007). Un réacteur thermophile nécessite plus d'énergie pour le maintien de la température mais permet une meilleure hygiénisation vis-à-vis de certains germes pathogènes (Buffière, Carrere et *al.* 2007). Cependant, les méthaniseurs fonctionnant en conditions thermophiles sont également réputés comme étant plus sensibles à la présence d'inhibiteurs, notamment l'azote ammoniacal, les AGV et l'H₂ (Buffière, Carrere et *al.* 2007; Moletta 2008).

3.2.6. Charge appliquée

La charge appliquée à un méthaniseur correspond au flux de matière entrant dans le réacteur. La Charge Volumique Appliquée (CVA) est le flux de matière traitée ramené à l'unité de volume du méthaniseur. Pour les produits solides, c'est généralement la quantité de matières volatiles qui est utilisée pour quantifier la matière organique. L'unité de la CVA est $\text{kg}_{MV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$.

3.2.7. Temps de séjour

Le temps de séjour (ou Temps de Séjour des Solides (TSS) pour les déchets solides) correspond à la durée moyenne passée par la matière organique dans le méthaniseur. Pour le traitement des déchets solides et du fait de la réduction de masse s'opérant pendant la méthanisation, le flux massique d'entrée peut être supérieur à celui de sortie, d'où, un calcul plus complexe que pour celui des réacteurs traitant des effluents liquides.

3.3. Méthanisation de DND

Fin 2008, il existait en France six usines de méthanisation des déchets ménagers avec une prévision de plus 15 à 20 usines d'ici 2015 (intervention de O. Théobald, ADEME, journée technique nationale 07/10/08).

Une installation de méthanisation peut se découper en cinq unités (tri/prétraitement ; digestion ; traitements effluents/odeurs ; valorisation ; débouché du digestat) et la cohésion de l'ensemble est essentielle. Les techniques de méthanisation en milieu solide (déchets ménagers) sont les plus complexes et les moins abouties. A l'heure actuelle, il n'y a pas de système complètement efficace. Cependant, il existe des solutions pour mieux préparer les déchets (tri, collectes sélectives, ...) afin d'optimiser la digestion et améliorer la qualité du produit de sortie, mais la contrepartie est le coût élevé de ces techniques. Au sein d'un méthaniseur, les processus de biodégradation sont les mêmes que ceux rencontrés dans une ISD. Il est cependant plus aisé de contrôler certains paramètres opérationnels (température, intrants, taux d'humidité ...) ayant une influence sur le bon déroulement du processus de digestion anaérobie dans ces installations que dans les ISDND.

3.3.1. Intégration dans la filière de traitement des déchets

L'étape de méthanisation, à elle seule, ne permet pas de proposer une solution pour les traitements des déchets. Des étapes de prétraitements ainsi que des étapes post-traitements restent nécessaires. Le recours à d'autres méthodes de traitement de déchets (enfouissement, incinération) est également un maillon indispensable des procédés de digestion anaérobie des ordures ménagères.

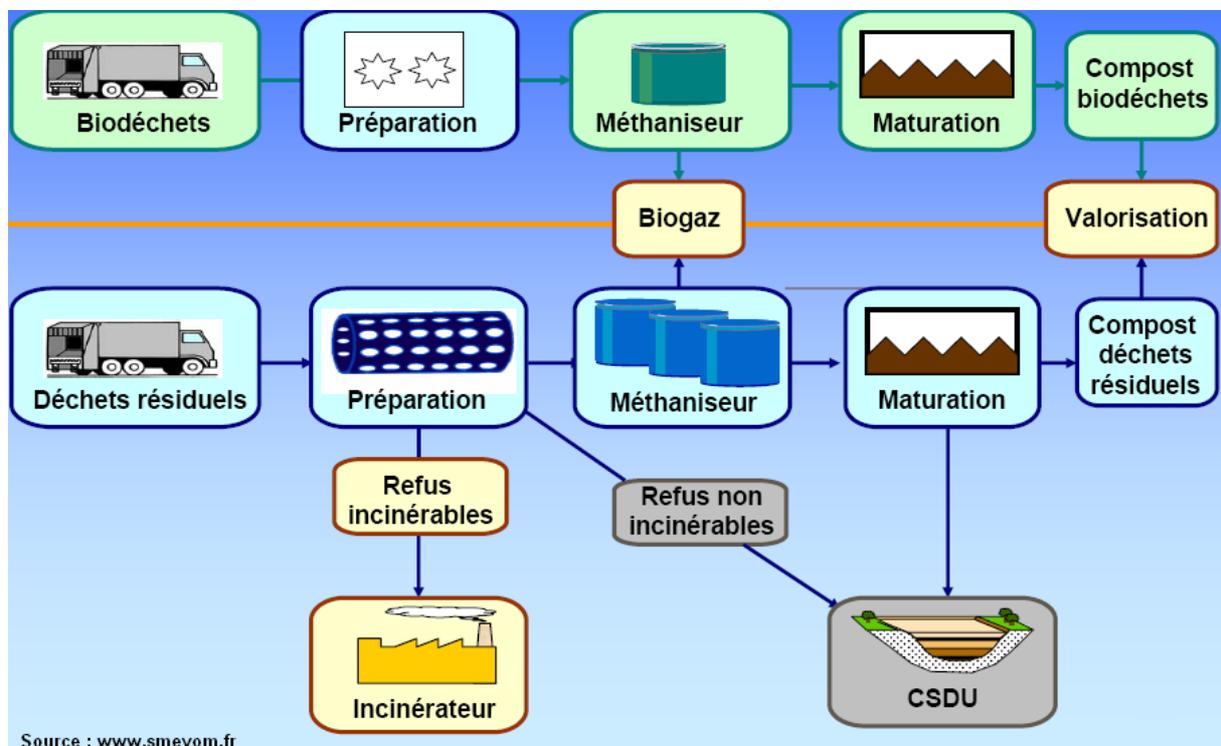


Figure 11 : Schéma de principe de la filière méthanisation.

Comme l'illustre bien la Figure 11, la méthanisation n'est qu'un maillon dans une chaîne de traitements plus complexes, comprenant aussi le tri, le compostage, l'incinération et la mise en ISD. La méthanisation est une des solutions permettant de répondre à la pénurie

d'exutoires, aux difficultés de montage de projets d'incinérateurs et d'ISD et à la demande d'une augmentation de la production d'énergie renouvelable.

3.3.2. Prétraitements

Afin d'optimiser le processus de digestion anaérobie, qui peut être limité par la nature des déchets solides à traiter, certains prétraitements peuvent être mis en œuvre. L'objectif de ces prétraitements est d'obtenir un produit qui sera traité par méthanisation avec une meilleure efficacité. Dans le cas de déchets solides comme les déchets ménagers, une étape de tri préalable est indispensable afin d'en extraire un maximum d'éléments non biodégradables.

Il existe différents types de prétraitements qui s'ajoutent généralement au tri afin d'obtenir un déchet entrant optimisé pour l'étape de méthanisation. Le principe de quelques-uns de ces traitements est rapidement détaillé dans la suite de ce paragraphe :

- Prétraitements mécaniques et macération : le but est de diminuer au maximum la taille des matières solides et d'accélérer leur hydrolyse.
- Procédés en deux étapes à biolixiviation : le principe est de réaliser l'hydrolyse et la solubilisation des matières organiques composites dans un premier réacteur afin de récupérer le résidu liquide (ou lixiviat) et de l'amener vers un réacteur de méthanisation classique. Ce procédé correspond en réalité plutôt à une stratégie technologique de méthanisation qu'à un type de prétraitement.
- Prétraitements physico-chimiques : l'objectif est ici de réaliser une transformation de la nature chimique des composés afin qu'ils deviennent soit accessibles (biodisponibles) pour la digestion, soit qu'ils deviennent des produits biodégradables.

3.3.3. Technologies de fermentation humides

La méthanisation par voie dite "humide" (5 à 20 % de matière sèche) (procédés WAASA, BTA LINDE-KCA et Biostab) pour le traitement des déchets solides, est généralement mise en œuvre dans des digesteurs de type mélangé et selon deux types d'agitation.

3.3.3.1. Agitation mécanique

Le principe de l'agitation mécanique consiste à exploiter un mouvement créé de façon mécanique (généralement à l'aide d'un moteur) pour agiter le milieu de fermentation grâce à un dispositif adapté au digesteur (généralement des pales). Ce type d'agitation peut être utilisé sur des digesteurs "pistons" ou "mélangés". Dans le premier type de réacteur, les pales vont à la fois permettre d'agiter et de faire avancer la matière organique. Dans le second type de réacteur, les pales sont généralement situées sur un axe vertical au centre du digesteur. Cet axe est entraîné par un moteur qui fait tourner les pales qui assurent ainsi l'agitation du milieu (Figure 12, A). Dans le cas de la fermentation humide, les digesteurs sont majoritairement de type mélangé.

3.3.3.2. Agitation par recirculation du biogaz

Le principe de l'agitation par recirculation du biogaz consiste à utiliser le biogaz produit pendant la méthanisation pour créer un mouvement dans le milieu de dégradation. Cette agitation a pour but de permettre l'homogénéisation de la matière organique afin d'obtenir une digestion anaérobie stable et homogène. Pour ce faire, un surpresseur est généralement utilisé pour réintroduire du biogaz en surpression dans le digesteur. La Figure 12, B illustre cette méthode d'agitation appliquée par la société Linde. Le biogaz est injecté dans une

tubulure centrale et entraîne la matière avec lui créant ainsi un mouvement de circulation de cette dernière.

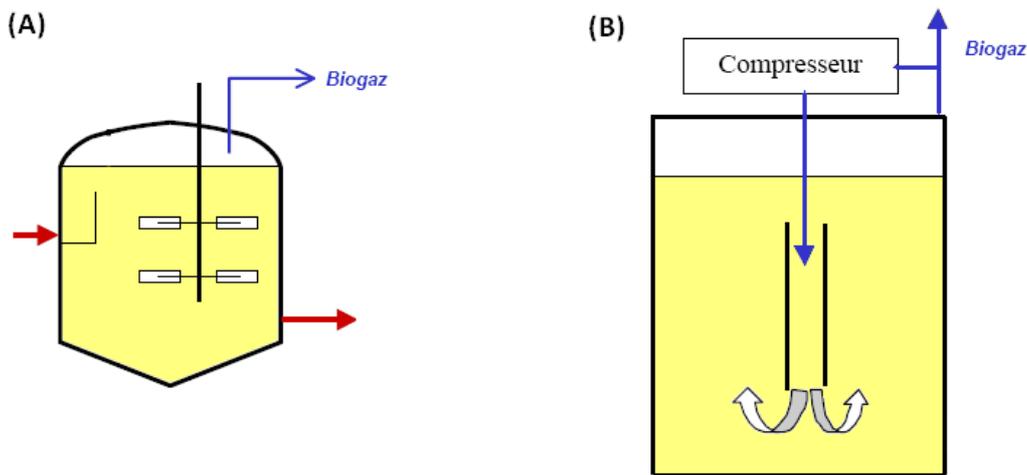


Figure 12 : Schéma de principe d'un système, (A) d'agitation mécanique, (B) d'agitation par recirculation du biogaz.

3.3.4. Technologies de fermentation sèche

La méthanisation par voie dite "sèche" (20 à 50 % de matière sèche) (procédés Valorga, Kompogas, BRV, Dranco et Biocel) pour le traitement des déchets solides est généralement mise en œuvre selon trois types d'agitation ou selon un procédé dit "statique".

3.3.4.1. Agitation mécanique

Le principe de l'agitation mécanique est utilisé dans les réacteurs de type "pistons". Les procédés Kompogas et BRV font partie de cette famille. Dans le procédé Kompogas, les pales vont permettre d'agiter la matière organique mais pas de la faire avancer. Dans ce procédé, c'est l'entrée de la matière organique qui va pousser celle déjà présente dans le digesteur vers la sortie (Figure 13, A). Le principe utilisé dans le procédé BRV est légèrement différent. Les pales vont à la fois permettre d'agiter et de faire avancer la matière organique. Ce dispositif est complété par un système de va et vient en fond de digesteur afin d'éviter l'accumulation des matériaux lourds.

3.3.4.2. Agitation par recirculation du biogaz

Le procédé de fermentation "sèche" avec agitation par recirculation du biogaz correspond à la technologie Valorga. Dans ce procédé, des buses placées dans le fond du digesteur permettent l'injection de biogaz sous pression qui agite et homogénéise le mélange. De plus, une séparation interne en béton à l'intérieur du digesteur va obliger la matière à cheminer dans un sens particulier (de l'entrée vers la sortie) (Figure 13, B).

3.3.4.3. Agitation par recirculation du digestat

Le procédé de fermentation "sèche" avec agitation par recirculation de digestat correspond à la technologie Dranco. Dans ce procédé, une pompe externe re-mélange le digestat avec le déchet à digérer avant son introduction par le haut du digesteur (Figure 13, C).

3.3.4.4. Systèmes statiques

Le principe de la digestion statique est exploité dans le procédé Biocel. Son principe utilise des cellules en béton dans lesquelles un mélange inoculum/déchets est initialement déposé. La matière ainsi déposée est laissée à fermenter avec une recirculation du lixiviat afin de maintenir une bonne activité microbienne. En fin de digestion, les cellules sont vidées puis le processus est répété.

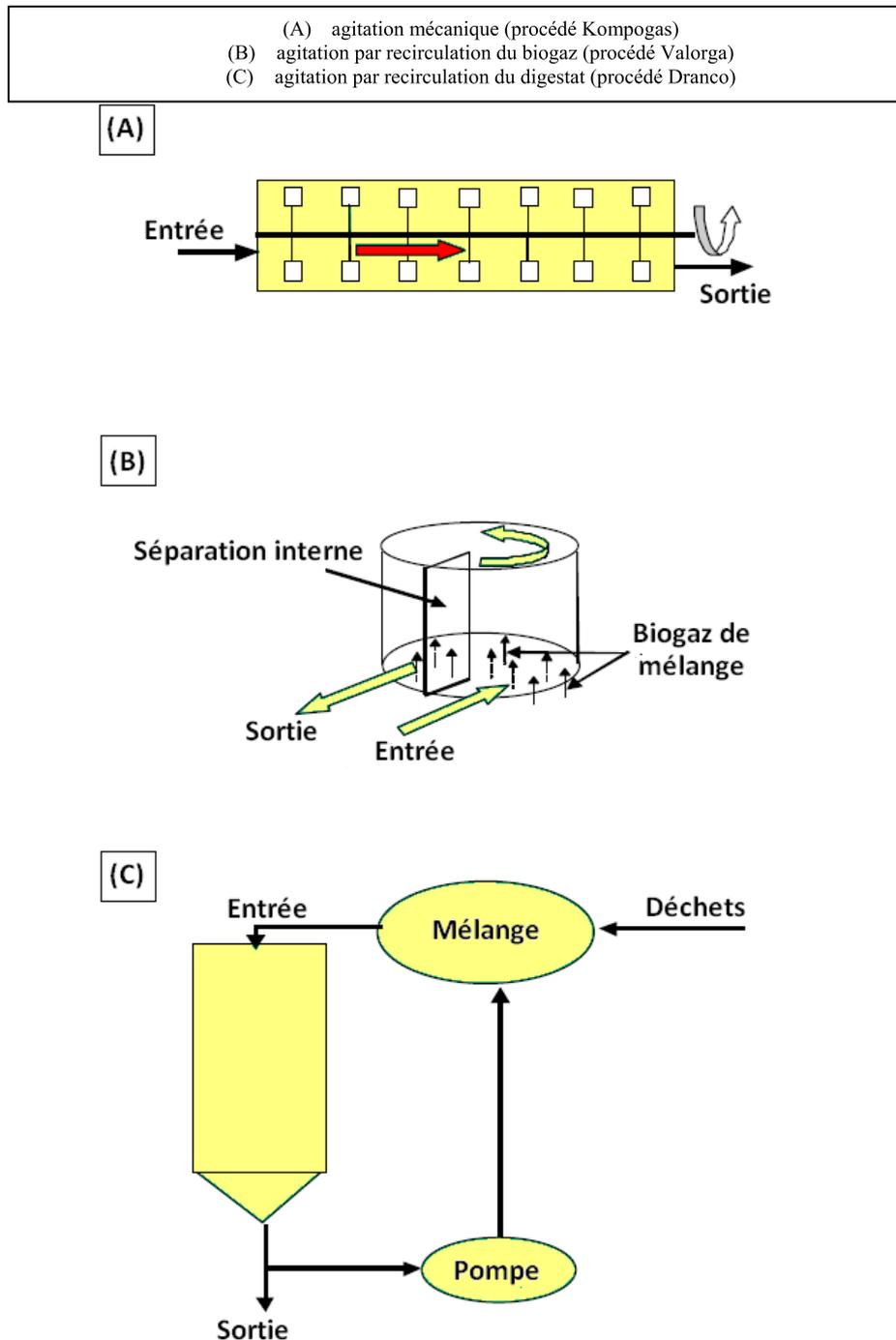


Figure 13 : Schéma de principe des technologies de fermentation sèches - (Moletta 2002).

3.3.5. Performances

Les performances d'un digesteur sont théoriquement, quelle que soit sa technologie, liées à la composition des déchets y entrant. Le Tableau 5 compare les performances de différents procédés de digestion anaérobie. Par exemple, il n'y a pas de différence très importante entre les procédés de fermentation humides et secs, en terme de rendement de production de biogaz exprimé par rapport à la matière volatile entrante (Moletta 2008). Les temps de séjour sont compris entre 15 et 55 jours, les CVA entre 3 et 7 kg de MV par m³ et par jour, et les rendements de méthane varient entre 169 et 354 Nm³.t⁻¹ de MV (Moletta 2008). Toutefois, les procédés de méthanisation des DND ne sont généralement que peu optimisés. La multiplication du nombre d'installations et les retours d'expériences devraient permettre d'améliorer les performances des méthaniseurs.

Tableau 5 : Comparaison des performances de différents procédés de digestion anaérobie - (Moletta 2008).

Site / Constructeur	Substrats	Température (°C)	Taux de MS (%)	TSS (jours)	CVA (kg de MV/m ³ /j)	Rendement en méthane (m ³ /t de MV)
Amiens / Valorga	OM brutes ^a , 60 % MS, 63 % MV	37	25-35	18-22	7 ^b	220-250
Engelskirchen / Valorga	Biodéchets, MS 32-42, MV 50-75 %	37	36	> 25	3,7 ^b	240-260
Tiburg / Valorga	Biodéchets, MS 37-55, MV 32-57 %	40	30	22-55	2,96 ^b 4,4 ^c	210-290
Bretsch / OWS Dranco 2	Biodéchets, MS 40 %, MV 55 %	55	31	10-15	4 à 6	272
Bassum / OWS Dranco	Déchets gris, MS 57 %, MV 51 %	55	41	-	-	304
Lelystad / Arcadis Biocel	Biodéchets	35-40	35-40	21	4,5 ^b	169
Kompogas / Kogas Bülher	Biodéchets	55	30	20	6	354

(a) Refus 15 % avant entrée dans le digesteur

(b) recalculé

(c) en régime permanent

3.3.6. Effluents

Le biogaz et le digestat sont les deux effluents principaux des méthaniseurs de déchets. Ces effluents sont présentés plus en détails avec leurs exutoires dans la suite de ce paragraphe et la Figure 14 illustre leur gestion.

3.3.6.1. Le biogaz

Le biogaz est principalement constitué de méthane et de gaz carbonique. D'autres gaz minoritaires peuvent être présents dans le biogaz : hydrogène, sulfure d'hydrogène (H₂S) et ammoniac (NH₃). Le pouvoir calorifique (PCI) du méthane à 0°C à pression atmosphérique est de 9,94 kWh/m³. Pour le biogaz, le PCI sera proportionnel à sa teneur en méthane (par exemple, pour un biogaz contenant 70 % de méthane, le PCI sera de 9,94 x 0,7 = 6,96 kWh/m³) (Buffière, Carrere et al. 2007). Le biogaz produit lors du processus de digestion anaérobie est généralement valorisé soit, après purification, en tant que biocarburant (exemple du méthaniseur de Lille en France). Depuis peu, des possibilités de réinjection dans le réseau de gaz public sont également en discussion. A cela s'ajoutent les possibilités de valorisation par des moteurs à combustion permettant la production d'électricité et la récupération de chaleur. La chaleur peut ainsi être utilisée pour maintenir le méthaniseur à sa température optimale et l'électricité peut être exportée sur le réseau électrique public.

3.3.6.2. Le digestat

Le digestat correspond au résidu solide non digéré et est constitué de la fraction peu ou difficilement biodégradable du déchet après son passage dans le digesteur. Le digestat peut être épandu (selon un plan d'épandage) ou également post-composté. Dans ce cas, il aura, après maturation, des propriétés agronomiques relativement proches de celles d'un compost (Buffière, Carrere et *al.* 2007). La qualité des déchets entrants est parfois à l'origine de problèmes (teneur importante en plastiques et en métaux). En effet, afin que les digestats puissent être utilisés en tant qu'amendement organique (considéré comme un produit et non comme un déchet), il est nécessaire que le digestat brut ou composté puisse satisfaire aux critères des normes en vigueur. Ce sont les normes " amendement organique" NFU 44051 ou "composts à base de boues" NFU 44095 qui s'appliquent. Si la qualité du compost est satisfaisante, le digestat devient un produit organique épandable sans contrainte. Dans certains types de procédés de méthanisation, les digestats peuvent également être (en partie) réintroduits pour préparer le déchet afin de procéder à son inoculation et ajuster son taux d'humidité.

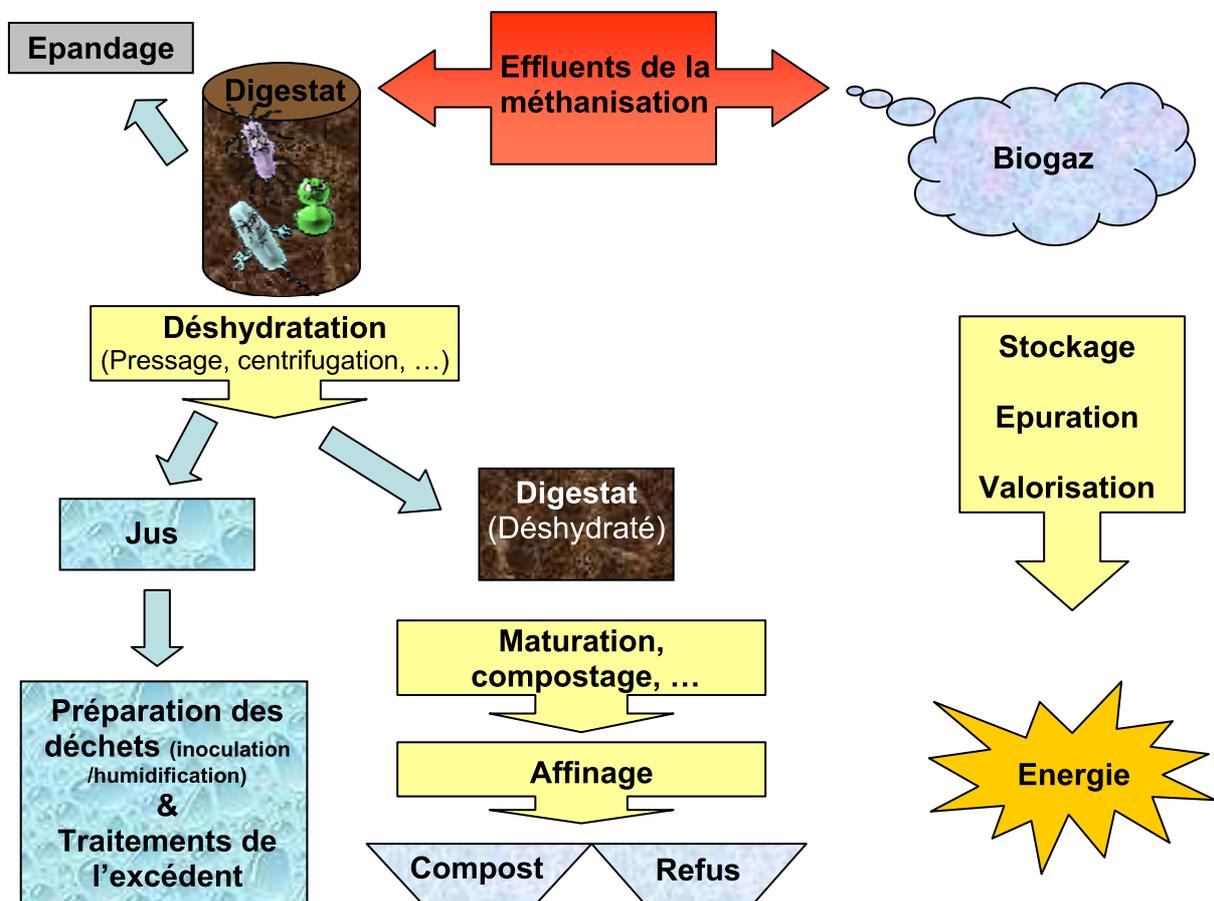


Figure 14 : Schéma de principe de l'utilisation des effluents de la méthanisation.

Chapitre 2

Synthèse bibliographique

Chapitre

2

Synthèse bibliographique

Ce second chapitre présente une synthèse bibliographique faisant l'état de l'art des différents aspects scientifiques couverts par le sujet traité. Dans une première partie, le processus de digestion anaérobie est explicité. L'étape de méthanogenèse, étape qui conduit notamment à la formation du méthane et qui nous intéresse plus spécifiquement, y est plus particulièrement détaillée. Dans la seconde partie, le principe de l'approche relevant de la biogéochimie isotopique mise en œuvre dans le cadre de ce travail, est présenté. Une synthèse des applications déjà réalisées grâce à cette approche pour l'étude d'environnements méthanogènes naturels et également des applications relatives à la dégradation anaérobie des déchets est ensuite présentée.

1. La digestion anaérobie ou méthanisation

La digestion anaérobie ou méthanisation est le processus de dégradation de la matière organique en gaz carbonique et méthane par des micro-organismes en absence d'oxygène. Les réactions impliquées au cours de ce processus font probablement partie des plus anciennes réactions réalisées par des organismes vivants. En effet, cette réaction devait avoir lieu dans la biosphère lorsque la terre présentait encore des conditions anaérobies et réductrices, c'est-à-dire avant l'apparition massive d'oxygène (il y a 1,8 Ga (Giga-années)). Ce processus qui a lieu dans les environnements dit "méthanogènes" fait intervenir successivement de nombreuses populations de micro-organismes (hydrolytique, acidogène, acétogène, méthanogène, ...). Les études phylogénétiques estiment l'apparition des micro-organismes méthanogènes (réalisant l'étape de méthanogenèse) au cours de la période comprise entre -4,11 et -3,78 milliards d'années (Battistuzzi, Feijao et *al.* 2004).

De nos jours, de nombreux types d'environnements méthanogènes différents existent toujours. Certains sont "naturels" et d'autres plus "artificiels" car directement liés aux activités humaines. Les micro-organismes anaérobies stricts méthanogènes sont présents dans des habitats tels que les sédiments, les eaux douces et marines, les rizières, les marais, les tourbières, dans les sources d'eaux chaudes d'origine volcanique (exemple de l'écosystème du Yellowstone National Park), dans le tube digestif de l'homme et des animaux (notamment celui des ruminants), le tractus intestinal des termites, mais aussi dans les digesteurs de boues de stations d'épuration, les décharges et les méthaniseurs de déchets.

Ainsi, le processus de méthanisation est non seulement étudié afin d'optimiser sa mise en œuvre industrielle dans les procédés de digestion anaérobie comme dans le cadre de ce travail, mais aussi au sein des écosystèmes naturels méthanogènes cités précédemment, et qui jouent un rôle majeur dans la production atmosphérique de méthane. L'importance de cette production est illustrée par les estimations des émissions annuelles planétaires de méthane présentées dans le Tableau 6. Les études visant à mieux appréhender le déterminisme des

réactions conduisant à la production de méthane sont d'autant plus importantes que le méthane est un Gaz à Effet de Serre (GES) 21 fois plus puissant que le dioxyde de carbone (Potentiel de Réchauffement Global (PRG) = 21) et qui de ce fait joue un rôle majeur dans le réchauffement climatique.

Tableau 6 : Estimations des émissions annuelles planétaires de méthane - (Janssen, Olivier et al. 1999).

Emissions annuelles planétaires	Emissions [Tg CH ₄ / an] (Hein, Crutzen et al. 1997)	Emissions [Tg CH ₄ / an] (Lelieveld, Crutzen et al. 1998)
Zones humides et rizières	325	225
Secteur de l'énergie	97	110
Ruminants	90	115
Enfouissement des déchets	35	40
Combustion de biomasse	40	40
Autres	-	70
Total	587	600

En Tg/an (Tg = Tégragrammes, soit des millions de tonnes/an).

Alors que dans les milieux naturels, le méthane est produit dans des conditions non contrôlées conduisant à des émissions atmosphériques importantes, produit au sein des procédés industriels (avec captage et valorisation), il devient une source d'énergie renouvelable.

1.1. Les étapes de la digestion anaérobie

1.1.1. Le schéma général de dégradation

La digestion anaérobie conduit, par l'action de micro-organismes, à la transformation du carbone organique en dioxyde de carbone et en méthane. Cette transformation fait intervenir successivement quatre populations microbiennes. Les processus de dégradation mis en jeu sont complexes et les différentes populations de micro-organismes travaillent en série (Farquhar et Rovers 1973; Barlaz, Ham et al. 1990).

Tout d'abord, des acteurs procaryotiques hydrolytiques pouvant être aérobies, anaérobie strictes ou facultatifs vont transformer, par réaction d'hydrolyse, les biopolymères (polysaccharides, lipides, protéines) en monomères et oligomères (glucides, acides gras, acides aminés). Ensuite, les monomères produits par les réactions d'hydrolyse vont être à leur tour utilisés et transformés en acides gras volatils, en alcools ainsi qu'en dihydrogène et dioxyde de carbone. Cette seconde étape est réalisée par des acteurs procaryotiques fermentaires acidogènes. La troisième étape de la dégradation de la matière organique correspond à l'acétogénèse. Durant cette réaction, de l'acétate est formé à partir des produits de la réaction d'acidogénèse. Enfin, des acteurs procaryotiques méthanogènes vont utiliser un petit nombre de substrats simples (acétate, formate, méthanol, H₂/CO₂, ...) pour produire du méthane. L'ensemble des étapes de la méthanisation est synthétisé dans la Figure 15.

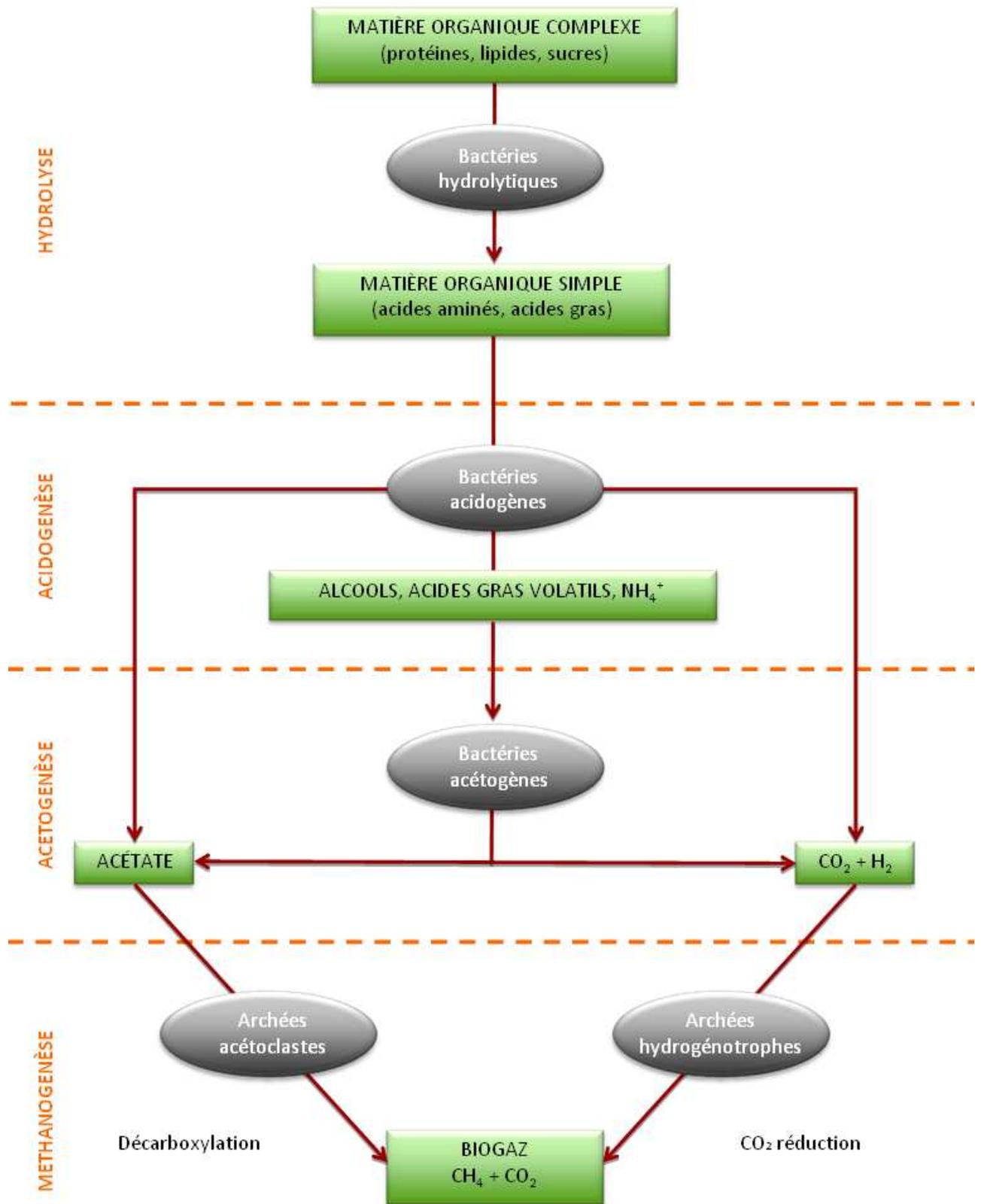


Figure 15 : Les étapes de la digestion anaérobie.

1.1.2. Description des différentes étapes de la digestion anaérobie

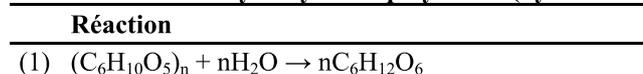
Dans les parties suivantes, les différentes étapes de la digestion anaérobie sont présentées plus en détails.

1.1.2.1. Hydrolyse

L'hydrolyse est la première étape de la dégradation de la matière organique. La matière organique complexe solide ne peut pas être utilisée sans transformation préalable par les micro-organismes, et doit être hydrolysée en composés solubles aptes à franchir les membranes cellulaires bactériennes (Pavlostathis et Giraldo-Gomez 1991). Pouvant également débuter en conditions aérobies, cette première étape consiste en la solubilisation des polymères organiques en dimères ou monomères. L'hydrolyse a lieu grâce à des enzymes extracellulaires (Palmisano et Barlaz 1996) dont la nature dépend des réactions qu'elles catalysent (cellulases, protéases et lipases) (Palmisano et Barlaz 1996). Les polysaccharides (cellulose, hémicellulose) sont convertis en sucres simples (glucose, galactose), les protéines en acides aminés et les lipides en acides gras et glycérol. De l'ammonium est également formé pendant cette étape. La lignine, difficilement hydrolysable, est considérée comme récalcitrante en conditions anaérobies. L'hydrolyse est réalisée par des bactéries hydrolytiques et constitue une phase de préparation du substrat avant l'acidogénèse.

Cette phase est considérée comme étant l'étape cinétiquement limitante du processus de méthanisation (Pavlostathis et Giraldo-Gomez 1991; Vavilin, Rytov et *al.* 1996; Mata-Alvarez, Mace et *al.* 2000). En effet, l'acidogénèse serait 30 à 40 fois plus rapide (Moletta 2008). La réaction d'hydrolyse des polymères (cas des composés hydrocarbonés) est donnée à titre d'exemple dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Réaction d'hydrolyse des polymères (hydrocarbonés).



Les bactéries participant à l'hydrolyse (bactéries acidogènes hydrolytiques) ont un métabolisme anaérobie strict ou facultatif (Archer et Kirsop 1990). Elles sont très nombreuses et variées et regroupent de nombreux groupes bactériens (McInerney, Wilkinson et *al.* 1995). Le Tableau 8 présente quelques-unes des plus importantes bactéries hydrolytiques de la digestion anaérobie.

Tableau 8 : Bactéries hydrolytiques de la digestion anaérobie - (Moletta 2008).

Substrat	Espèces	
Condition mésophile	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	<i>Acetivibrio cellulosolvens</i>
	<i>Bacteroides succinogenes</i>	<i>Bacteroides cellulosolvens</i>
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Cillobacterium cellulosolvens</i>
	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Ruminococcus flavifaciens</i>
	<i>Clostridium aldrichii</i>	<i>Clostridium celerecerscens</i>
	<i>Clostridium cellulobioaparum</i>	<i>Clostridium cellulofermentens</i>
	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>Clostridium cellulovorans</i>
	<i>Clostridium chartatabidum</i>	<i>Clostridium josui</i>
	<i>Clostridium lochheadii</i>	<i>Clostridium lerntocellum</i>
	<i>Clostridium longisporum</i>	<i>Clostridium papyrosolvens</i>
	<i>Clostridium paradoxum</i>	<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>
	<i>Clostridium populeti</i>	<i>Clostridium termitidis</i>

Tableau 8 : Suite.

Substrat	Espèces		
Condition mésophile (suite)	Hémicelluloses	<i>Bacteroides ruminicola</i>	
	Pectines	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium felsineum</i>
		<i>Clostridium multif fermentans</i>	<i>Lachnospira multiparus</i>
	Amidon	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
		<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium</i> spp.
		<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.
<i>Pseudomonas</i> spp.		<i>Succinomonas amylolytica</i>	
Lipides	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	<i>Bacillus</i> spp.	
	<i>Syntrophomonas</i> spp.		
Protéines	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	
	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Peptococcus anaerobius</i>	
	<i>Staphylococcus</i> spp.		
Composés azotés	<i>Clostridium acidurici</i>	<i>Clostridium cylindrospermum</i>	
	<i>Micrococcus aerogenes</i>	<i>Micrococcus lactilyticus</i>	
Condition thermophile	Cellulose	<i>Anaerocellum thermophilum</i>	<i>Clostridium cellulosi</i>
		<i>Clostridium stercorarium</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
		<i>Clostridium thermocopriae</i>	<i>Clostridium thermopapyrolyticum</i>
	Hémicelluloses	<i>Clostridium thermobutyricum</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
		<i>Clostridium thermocopriae</i>	
	Pectines	<i>Acetomicrobium faecalis</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
		<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	<i>Clostridium thermolacticum</i>
		<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>
	Amidon	<i>Acetomicrobium flavidum</i>	<i>Clostridium fervidus</i>
		<i>Clostridium stercorarium</i>	<i>Clostridium thermobutyricum</i>
<i>Clostridium thermocopriae</i>		<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	
<i>Clostridium thermolacticum</i>		<i>Clostridium thermopalmarium</i>	
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>		<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	
<i>Thermoanaerobacter finnii</i>		<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	
Protéines	<i>Thermoanaerobacter acetoethylis</i>		
	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>		

1.1.2.2. Acidogenèse

Les monomères issus de l'hydrolyse sont maintenant disponibles pour les bactéries acidogènes. Pendant cette nouvelle étape (l'acidogenèse), les bactéries convertissent les produits de l'hydrolyse en composés organiques simples par la fermentation et d'autres processus métaboliques. Les sucres, les acides aminés et les acides gras obtenus suite aux réactions hydrolytiques vont être transformés en alcools, azote ammoniacal et acides gras volatils (AGV) tels que l'acide acétique, propionique, butyrique et valérique. Cette forte augmentation de la teneur en AGV entraîne une baisse significative du pH de la phase liquide. Les réactions de dégradation du glucose sont données dans le Tableau 9 à titre d'exemple (les ΔG^0 représentent les énergies libres des réactions (Thauer, Jungermann et al. 1977)).

Tableau 9 : Quelques réactions de dégradation du glucose (acidogenèse).

Réactions	ΔG^0 (kJ.mol ⁻¹ de glucose)
(1) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2 + 2CO_2$	-264
(2) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	-359
(3) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$	-215
(4) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$	-197

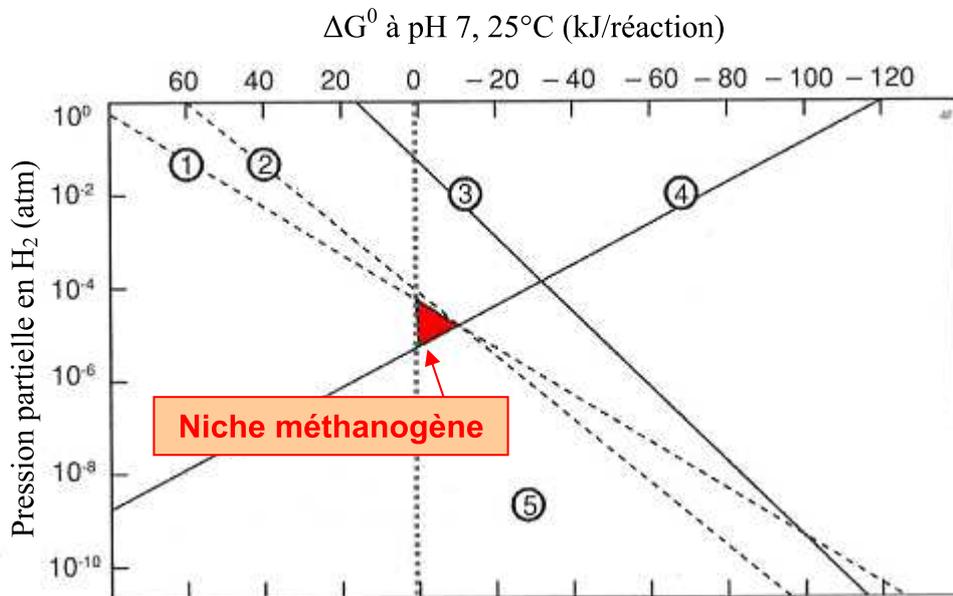
1.1.2.3. Acétogénèse

L'acétogénèse correspond à l'étape pendant laquelle les longues chaînes d'AGV sont scindées afin d'être transformées en molécules d'acétate, de dioxyde de carbone et de dihydrogène. Cette réaction est notamment due à trois groupes de bactéries (Pelmont 1993) que sont les acétogènes productrices obligées d'hydrogène, les bactéries homoacétogènes et les bactéries sulfato-réductrices. Quelques-unes de ces réactions sont données dans le Tableau 10 à titre d'exemple (Thauer, Jungermann *et al.* 1977).

Tableau 10 : Quelques réactions de formation d'acétate (acétogénèse).

Réactions	ΔG^0 (kJ.mol ⁻¹ d'acétate)
(1) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$	+72
(2) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$	+24
(3) $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	-92

Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène également appelées OHPA (Obligat Hydrogen Producing Acetogenic bacteria) catalysent des réactions thermodynamiquement défavorables ($\Delta G_0 > 0$). Leur croissance nécessite de ce fait des conditions particulières : une pression partielle en hydrogène très basse ($< 10^{-4}$ atm) (Barlaz, Ham *et al.* 1990). La mise en place d'une syntrophie entre des micro-organismes capables de consommer immédiatement l'hydrogène produit est donc indispensable (principalement avec des méthanogènes hydrogénotrophes, des bactéries sulfato-réductrices ou des bactéries homoacétogènes). La Figure 16 illustre les conditions très particulières nécessaires pour la croissance de ces micro-organismes. La mise en place de cette syntrophie est une des étapes clés pour l'obtention d'un bon fonctionnement du processus de digestion anaérobie.



Evolution de l'énergie libre de Gibbs (ΔG^{**}) des réactions de conversion de l'éthanol, du propionate, du butyrate en acétate et de la production de CH_4 à partir de H_2/CO_2 en fonction de la $P_{\text{partielle}}$ en H_2 .

[propionate] = [butyrate] = [éthanol] = [acétate] = 1 mM ; $[\text{HCO}_3^-] = 100$ mM ; $P_{\text{CH}_4} = 0,5$ atm ;

(1), (2) & (3) : acétogénèse du propionate, butyrate et de l'éthanol.

(4) : méthanogénèse hydrogénotrophe et acétoclaste.

Figure 16 : Illustration de la niche méthanogène - (Cresson 2006).

Les bactéries homoacétogènes (cf. Chapitre 2, § 1.1.3.4 Homoacétogénèse) et hétéroacétogènes produisent de l'acétate à partir de l'hydrogène et du dioxyde de carbone par un mécanisme de réduction ou bien à partir de substrats organiques respectivement.

1.1.2.4. Méthanogénèse

La dernière étape de la digestion anaérobie est la méthanogénèse. Cette étape, catalysée par des micro-organismes de type archées méthanogènes conduit à la formation de méthane par deux voies métaboliques principales (acétoclaste et hydrogénotrophe). Cette étape plus particulièrement au cœur de ce travail, sera présentée plus en détails dans une partie spécifique (Chapitre 2, § 1.1.3 Description détaillée de l'étape de méthanogénèse).

1.1.2.5. Autres réactions

Les réactions principales intervenant au cours de la digestion anaérobie ont déjà été présentées. Toutefois, il est important de considérer que dans un processus aussi complexe que celui de la digestion anaérobie, des réactions complémentaires et/ou concurrentes à celles déjà présentées, peuvent également avoir lieu. Les deux réactions décrites dans les paragraphes suivants font partie de celles-ci. D'autres réactions minoritaires peuvent également concerner des molécules xénobiotiques ou des micropolluants qui peuvent être dégradés en condition anaérobie.

1.1.2.5.1. Sulfato réduction

En parallèle aux réactions de méthanogénèse, des réactions de sulfato-réductions peuvent avoir lieu. Les micro-organismes sulfato-réducteurs (Zhou et Fang 1998) peuvent, en milieu très réducteur et en présence de sulfate, transformer l'hydrogène, l'acide acétique et les AGV en dioxyde de carbone et hydrogène sulfureux (H₂S). Une compétition entre sulfato-réducteurs et méthanogènes peut donc avoir lieu pour la transformation de l'hydrogène et de l'acétate (Percheron 1997).

D'un point de vue métabolique, deux groupes ont été identifiés :

- Dans le premier groupe, des substrats tels que l'éthanol, le fumarate, le malate, le pyruvate mais surtout le lactate sont utilisés en tant que source de carbone et d'énergie. Leur oxydation est incomplète et donne de l'acétate et du dioxyde de carbone. (Bactéries des genres : *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfohalobium*, *Desulfobotulus*, *Desulfomonile*, *Thermodesulfobacterium* et *Desulfobulbus*).
- Dans le deuxième groupe, les bactéries oxydent de manière complète (jusqu'au dioxyde de carbone) l'acétate, d'autres acides gras à longue chaîne, certains composés aromatiques et des substrats communs avec le premier groupe. (Micro-organismes des genres : *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfoarculus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina* et *Archaeoglobus*).

1.1.2.5.2. Oxydation anaérobie du méthane

La plus grande partie du méthane produit au fond des océans est consommée par des microbes notamment par la réaction d'Oxydation Anaérobie du Méthane (OAM). Cette réaction intervient dans la régulation des flux de méthane en soutenant (avec les sulfures) d'importants écosystèmes benthiques et en favorisant la formation des carbonates authigènes (roches ayant précipitées à l'intérieur du sédiment) (Valentine 2002). L'oxydation anaérobie

du méthane consiste à oxyder ce dernier en utilisant le sulfate comme accepteur d'électrons
Tableau 11.

Tableau 11 : Réaction d'oxydation anaérobie du méthane.

Réaction
(1) $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{HS}^-$

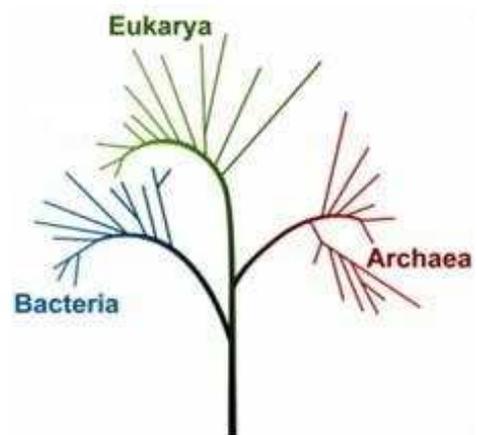
De nombreuses études ont mis en évidence que l'OAM (couplée à la sulfato-réduction) est catalysée par des consortia microbiens (archées méthanogènes + bactéries sulfato-réductrices) (Orphan, House et *al.* 2001; Michaelis, Seifert et *al.* 2002; Nauhaus, Boetius et *al.* 2002; Girguis, Orphan et *al.* 2003; Knittel, Lösekann et *al.* 2005; Knittel, Lösekann et *al.* 2005). Toutefois, une récente étude a démontré que certains consortia de bactéries et d'archées ont également la capacité d'oxyder le méthane en utilisant les nitrates au lieu des sulfates (Raghoebarsing, Pol et *al.* 2006). Les consortia forment souvent des agrégats et le partenaire archées est nommé ANME, pour "ANAerobic MEthanotroph". Phylogénétiquement très proches des archées méthanogènes, les ANME pourraient réaliser la réaction inverse de la méthanogenèse au niveau enzymatique (Hallam, Girguis et *al.* 2003). L'identification des micro-organismes anaérobies et les mécanismes de l'OAM sont actuellement des sujets de recherches et de débats importants.

1.1.3. Description détaillée de l'étape de méthanogenèse

L'étape de méthanogenèse conduit à la minéralisation des produits formés lors des réactions qui la précèdent dans le schéma globale de la digestion anaérobie. Cette réaction est réalisée par des micro-organismes anaérobies stricts appartenant au domaine des *Archaea*. Le domaine des *Archaea* a été défini en 1978 par Carl Woese. Toutefois, certains de ces micro-organismes peuvent résister quelques temps en présence d'oxygène (Peters et Conrad 1995; Kato, Field et *al.* 1997). Différents métabolismes méthanogènes existent en fonction du substrat utilisé.

1.1.3.1. Les archées

Les archées ou *Archaea* (anciennement archéobactéries ou bien encore archéobactéries, du grec *archaios*, « ancien » et *backterion*, « bâton ») forment un groupe de micro-organismes unicellulaires et représentent un groupe majeur des procaryotes. Comme les bactéries, elles ne présentent ni noyau, ni organites intracellulaires. Elles se différencient des bactéries du fait notamment de caractéristiques métaboliques et de structures membranaires particulières (Palmisano et Barlaz 1996). Les analyses phylogénétiques détaillées ont montré que les archées étaient aussi différentes des bactéries que celles-ci le sont des eucaryotes (Woese, Kandler et *al.* 1990). Ainsi, les archées constituent un domaine à part entière dans la classification du vivant qui en comporte trois (bactérie, archées et eucaryote) (cf. Figure 17). Ultérieurement, le domaine *Archaea* a été divisé en quatre phyla : *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Nanoarchaeota* et *Korarchaeota*.



**Figure 17 : Arbre phylogénétique de la vie basé sur l'analyse comparative des gènes ARNr.
(D'après Carl Woese).**

Le Tableau 12 présente la taxonomie des *Euryarchaeota* (classe, ordre, famille, genre et nombre d'espèces). (Source : site internet, Jean-Louis GARCIA, Jean-Luc CAYOL et Pierre ROGER du laboratoire de microbiologie IRD à la date du 20/07/2010) (<http://garciajeanlouis9051.perso.neuf.fr/index.html>). Ce phylum nous intéresse plus particulièrement car c'est dans ce dernier que se situe la majorité des archées méthanogènes.

Tableau 12 : Taxonomie des Euryarchaea.

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genres	Espèces
Phylum <i>Euryarchaeota</i>					
Classe <i>Methanobacteria</i>					
Ordre <i>Methanobacteriales</i>					
Famille <i>Methanobacteriaceae</i>					
				<i>Methanobacterium</i>	18
				<i>Methanobrevibacter</i>	14
				<i>Methanosphaera</i>	2
				<i>Methanothermobacter</i>	6
Famille <i>Methanothermaceae</i>					
				<i>Methanothermus</i>	2
Classe <i>Methanomicrobia</i>					
Ordre <i>Methanomicrobiales</i>					
Famille <i>Methanomicrobiaceae</i>					
				<i>Methanomicrobium</i>	1
				<i>Methanoculleus</i>	8
				<i>Methanofollis</i>	5
				<i>Methanogenium</i>	5
				<i>Methanolacinia</i>	1
				<i>Methanoplanus</i>	3
				<i>Methanosphaerula</i>	1
Famille <i>Methanocorpusculaceae</i>					
				<i>Methanocorpusculum</i>	4
Famille <i>Methanospirillaceae</i>					
				<i>Methanospirillum</i>	2
Genres non classés					
				<i>Methanocalculus</i>	4
				<i>Methanolinea</i>	1
				<i>Methanoregula</i>	2
Ordre <i>Methanosarcinales</i>					
Famille <i>Methanosarcinaceae</i>					
				<i>Methanosarcina</i>	9
				<i>Methanimicrococcus</i>	1
				<i>Methanococcoides</i>	3
				<i>Methanohalobium</i>	1
				<i>Methanohalophilus</i>	4
				<i>Methanolobus</i>	8
				<i>Methanomethylovorans</i>	2
				<i>Methanosalsum</i>	1
Famille <i>Methanosaetaceae</i>					
				<i>Methanosaeta</i>	3
Famille <i>Methermicoccaceae</i>					
				<i>Methermicoccus</i>	1
Ordre <i>Methanocellales</i>					
Famille <i>Methanocellaceae</i>					
				<i>Methanocella</i>	2

Tableau 12 : Suite.

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genres	Espèces
	Classe <i>Methanopyri</i>				
		Ordre <i>Methanopyrales</i>			
			Famille <i>Methanopyraceae</i>		
				<i>Methanopyrus</i>	1
	Classe <i>Methanococci</i>				
		Ordre <i>Methanococcales</i>			
			Famille <i>Methanococcaceae</i>		
				<i>Methanococcus</i>	4
				<i>Methanothermococcus</i>	2
			Famille <i>Methanocaldococcaceae</i>		
				<i>Methanocaldococcus</i>	5
				<i>Methanotorris</i>	2

Les archées sont extrêmement diversifiées (reproduction, morphologie, nutrition, physiologie et écologie) :

- **Reproduction.**

La reproduction des archées a lieu de manière asexuée (par scissiparité, par bourgeonnement, par fragmentation ou bien par d'autres mécanismes). La méiose n'a pas lieu ce qui conduit à ce que l'ensemble des descendants aient le même matériel génétique. Après la réplication de l'ADN, les chromosomes sont scindés et la cellule se divise (Bernander 1998; Prescott, Harley et al. 2003).

- **Morphologie**

Les archées peuvent avoir des morphologies relativement variées mais généralement proches de celles des bactéries (taille et forme). Elles peuvent être sphériques, en bâtonnets, spiralées, lobées ou aplaties, de formes irrégulières ou plénomorphes. Certaines sont des cellules isolées tandis que d'autres forment des filaments ou des agrégats. Leur diamètre est généralement compris entre 0,1 et plus de 15 µm et certains filaments atteignent 200 µm de long (Prescott, Harley et al. 2003).

- **Nutrition**

Sur le plan nutritionnel, elles se répartissent en de nombreux groupes, depuis les chimiolithoautotrophes (tirant leur énergie de gradients chimiques d'origine non biologique) aux organotrophes (Prescott, Harley et al. 2003).

- **Physiologie**

Sur le plan physiologique, elles peuvent être aérobies, anaérobies facultatives ou strictement anaérobies. Les archées méthanogènes se développent uniquement en conditions anaérobies (Prescott, Harley et al. 2003).

- **Ecologie**

Elles sont souvent connues pour leur capacité à vivre dans des conditions extrêmes ou dans des niches écologiques qu'elles sont seules à occuper (pH proche de 0, température supérieure à 100°C, salinité élevée, ...). Toutefois, il existe énormément d'archées vivant dans des biotopes plus courants et particulièrement variés comme les sols, les lacs, les sédiments, les océans ou l'intestin des animaux (Prescott, Harley et al. 2003).

Cinq ordres dans le domaine *Archaea* appartenant au phylum *Euryarchaeota*, englobent la plupart des méthanogènes. Ce sont les ordres *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* et *Methanopyrales*. Parmi ces ordres, du point de

vue trophique, trois types de méthanogenèse (en fonction du substrat précurseur utilisé), présentés dans la partie suivante, peuvent être distingués.

1.1.3.2. Les différents métabolismes méthanogènes

Plusieurs grands types de métabolisme (en fonction du substrat utilisé) peuvent être distingués :

- Méthanogenèse hydrogénotrophe (correspond à la transformation des molécules de dioxyde de carbone et d'hydrogène ou de formate) ;
- Méthanogenèse acétoclaste (correspond à la transformation des molécules d'acétate) ;
- Méthanogenèse méthylotrophe (correspond à la transformation des molécules de méthanol et méthylamine).

L'ensemble de ces réactions est détaillé dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Réactions de méthanogenèse - (Moletta 2008).

Réactions	ΔG^0 à pH 7 (kJ.mol ⁻¹ de CH ₄)
(1) $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-139,2
(2) $4HCOO^- + 2H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2 + 2HCO_3^-$	-126,8
(3) $HCOO^- + 3H_2 + H^+ \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-134,3
(4) $4CO + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 3CO_2$	-185,1
(5) $4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-102,5
(6) $CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	-121,1
(7) $4CH_3NH_2 + 2H_2O + 4H^+ \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4^+$	-101,6
(8) $2(CH_3)_2NH + 2H_2O + 2H^+ \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_4^+$	-86,3
(9) $4(CH_3)_3N + 6H_2O + 4H^+ \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_4^+$	-80,2
(10) $2CH_3CH_2-N(CH_3)_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2CH_3CH_2NH_2$	-70,0
(11) $CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-28,2

La Figure 18 représente un schéma simplifié de l'étape de méthanogenèse avec ses principales voies métaboliques (méthanogenèse hydrogénotrophe et acétoclaste) et les réactions pouvant avoir lieu entre les substrats précurseurs de la méthanogenèse (homoacétogenèse et oxydation syntrophique de l'acétate).

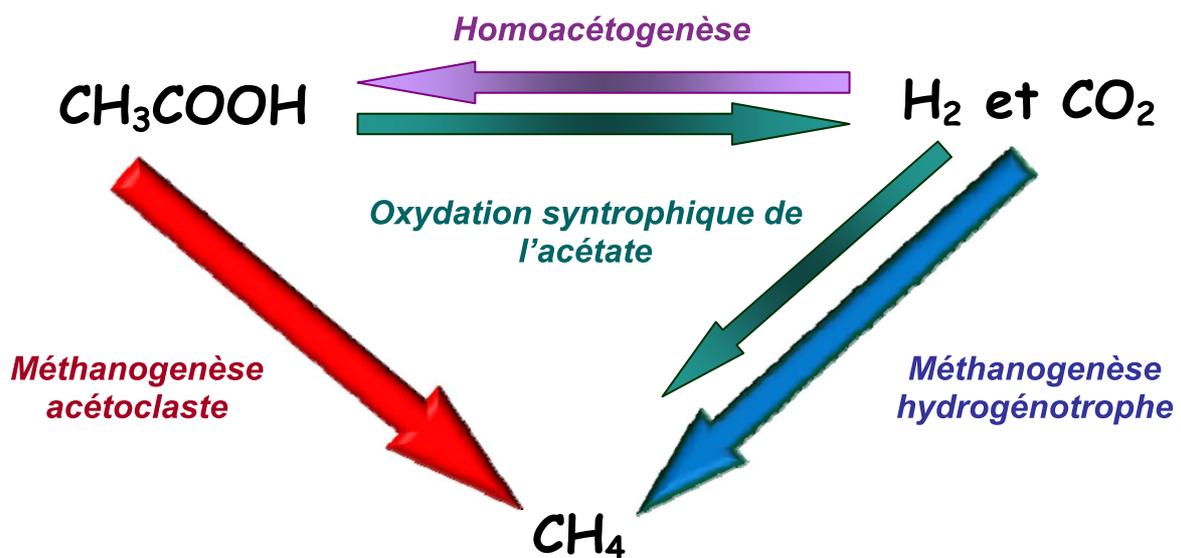


Figure 18 : Principales réactions impliquées dans l'étape de méthanogenèse. (Triangle réactionnel entre acétate, CO₂ et H₂ et méthane).

Il est généralement admis que 65 à 70 % du méthane provient de la dégradation de l'acétate et que les 30 à 35 % restant proviennent de la transformation de l'hydrogène et du dioxyde de carbone (Thauer, Jungermann et *al.* 1977; Tholozan 1988; Pavlostathis et Giraldo-Gomez 1991; El-Fadel, Findikakis et *al.* 1996; Conrad 1999). Toutefois, ces valeurs correspondent à un calcul théorique effectué pour les glucides (ou des formes similaires de matière organique) et dans de nombreux environnements méthanogènes, des proportions relativement différentes peuvent être observées (Conrad 1999).

Pour les cinq ordres du domaine *Archaea* qui englobent la plupart des méthanogènes (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* et *Methanopyrales*), le type de méthanogenèse généralement réalisé peut être précisé (Tableau 14).

Tableau 14 : Types de méthanogenèse réalisables selon l'ordre des micro-organismes.

Taxon (ordres et genres)	Type de méthanogenèse
<i>Methanobacteriales</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanosphaera</i> <i>Methanothermobacter</i>	Hydrogénotrophe
<i>Methanococcales</i> <i>Methanocaldococcus</i> <i>Methanotorris</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanothermococcus</i>	Hydrogénotrophe
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanocorpusculum</i> <i>Methanoculleus</i> <i>Methanofollis</i> <i>Methanogenium</i> <i>Methanolacinia</i> <i>Methanomicrobium</i> <i>Methanoplanus</i> <i>Methanospirillum</i> <i>Methanocalculus</i>	Hydrogénotrophe
<i>Methanopyrales</i>	Hydrogénotrophe
<i>Methanosarcinales</i>	
<i>Methanosaeta</i>	Acétoclaste
<i>Methanosarcina</i>	Hydrogénotrophe, Acétoclaste, Méthylotrophe
<i>Methanobolus</i> <i>Methanohalobium</i> <i>Methanohalophilus</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanimicrococcus</i> <i>Methanomethylovorans</i> <i>Methanosalsum</i>	Méthylotrophe

Il apparaît ainsi que la méthanogenèse acétoclaste peut uniquement être réalisée par les membres des familles *Methanosaetaceae* et *Methanosarcinaceae* (Ferry 1993). Alors que, les membres de la famille *Methanosaetaceae* peuvent n'utiliser que l'acétate, les membres de la famille *Methanosarcinaceae* présentent une grande versatilité métabolique puisqu'ils peuvent également utiliser l'hydrogène et le dioxyde de carbone (Ferry 1993), ainsi que les substrats méthylés. La plupart des autres espèces d'archées méthanogènes sont uniquement capables de réaliser la méthanogenèse hydrogénotrophe.

Les parties suivantes de ce paragraphe décrivent plus en détails chacune des différentes voies métaboliques de la méthanogenèse.

1.1.3.2.1. Etapes métaboliques communes

Les trois types de méthanogenèse suivent différentes voies métaboliques. Différents substrats intermédiaires, enzymes et coenzymes interviennent. Une des étapes clés de la méthanogenèse est le transfert de méthyle du $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{SPT}$ à la CoM. Le méthyle-coenzyme M constitue un substrat clé car il est commun aux trois processus de méthanogenèse (acétoclaste, hydrogénotrophe et méthylotrophe). La production du méthane est catalysée par la méthyle-coenzyme M réductase, qui réduit le groupe méthyle du méthyle-coenzyme M ($\text{CH}_3\text{-CoM}$) en

utilisant les électrons apportés par le coenzyme B (CoB), donneur d'électron commun pour la réduction du méthyle-coenzyme M chez tous les méthanogènes (Ferry 1999) (cette étape se retrouve dans les Figure 19, Figure 20 & Figure 21).

Dans le métabolisme hydrogénotrophe et acétoclaste, ce transfert arrive simultanément avec l'extrusion d'ions de sodium produisant un potentiel de membrane lors d'une réaction catalysée par l'enzyme N⁵-méthyle-H₄SPT:CoM méthyltransférase (Mtr) (Becher, Muller et al. 1992). Cette enzyme à huit sous-unités, encodée par l'opéron *mtrECDBAFGH* et attachée à la membrane, catalyse aussi la réaction inverse (endergonique) de transfert du méthyle du CH₃-CoM à l'H₄SPT dans le métabolisme méthylotrophe (Gottschalk et Thauer 2001). Mtr peut conduire ce transfert de méthyle thermodynamiquement défavorable par la consommation du gradient d'ions de sodium (Gartner, Weiss et al. 1994; Harms, Weiss et al. 1995). Il a été proposé qu'un transfert direct du méthyle du méthanol à l'H₄SPT puisse arriver afin de contourner cette étape consommatrice d'énergie, mais cela n'a pas encore été démontré expérimentalement (Keltjens et Vogels 1993).

1.1.3.2.2. Méthanogenèse acétoclaste

L'acétate kinase active d'abord l'acétate et rend possible la formation d'acétyl-CoA (Weimer et Zeikus 1979). Le groupe carbonyle est ensuite oxydé en dioxyde de carbone (donneur d'électrons) tandis que la tetrahydrosarcinapterine (H₄SPT) rompt la liaison C-C de l'acétate et accepte le groupe méthyle (le méthyle est transféré à la tetrahydrosarcinapterine, H₄SPT qui devient CH₃-H₄SPT). Le méthyle du méthyle-tetrahydrosarcinapterine est réduit par la suite en méthane (Weimer et Zeikus 1979)). Les électrons sont produits par l'oxydation du groupe carbonyle en dioxyde de carbone. Les étapes finales de la production du méthane sont identiques à celles des autres types de méthanogenèse (cf. Chapitre 2, § 1.1.3.2.1 Etapes métaboliques communes).

L'étude détaillée de cette voie métabolique apporte ainsi une information très importante : lors de la transformation du méthane par réaction de méthanogenèse acétoclaste, c'est le groupement méthyle qui est transformé en méthane et le groupement carbonyle qui est oxydé en dioxyde de carbone.

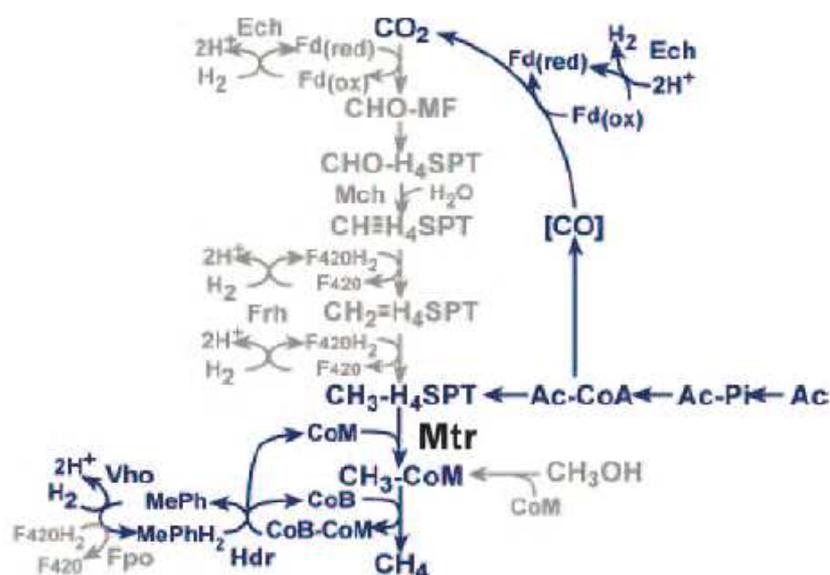


Figure 19 : Métabolisme de la méthanogenèse acétoclaste (en bleu) - (Welander et Metcalf 2005).

Légende de la Figure 19, de la Figure 20 et de la Figure 21

CHO-MF : formyl-méthanofurane	Mph/MphH ₂ : formes oxydé et réduite de la méthanophénazine
CHO-H ₄ SPT : formyl-tetrahydrosarcinapterine	F ₄₂₀ /F ₄₂₀ H ₂ : formes oxydé et réduite Factor 420
CH=H ₄ SPT : méthényl-tetrahydrosarcinapterine	Fd(ox)/Fd(red) : formes oxydé et réduite de la ferredoxine
CH ₂ =H ₄ SPT : méthylène-tetrahydrosarcinapterine	Ac : acétate
CH ₃ -H ₄ SPT : méthyle-tetrahydrosarcinapterine	Ac-Pi : acétyl-phosphate
CH ₃ -CoM : méthyle-coenzyme M	Ac-CoA : acétyl-Coenzyme A
CH ₃ COSCoA : acetyl-coenzyme A	Ech : ferredoxin-dépendante hydrogénase
H ₄ SPT : tétrahydrosarcinapterine	Frh : F ₄₂₀ -dépendante hydrogénase
CoM : Coenzyme M	Vho : méthanophénazine-dépendante hydrogénase
CoB : Coenzyme B	Fpo : F ₄₂₀ déshydrogénase
CoA : Coenzyme A	CoM-CoB: disulfure Coenzyme M et Coenzyme B

1.1.3.2.3. Méthanogenèse hydrogénéotrophe

Cette réaction est réalisée par des micro-organismes capables d'oxyder l'H₂ et de réduire le CO₂. Parmi eux, certains utilisent également le formate. Ils sont capables de dissocier le formate en H₂ et CO₂ puis de réaliser la méthanogenèse hydrogénéotrophe.

Le processus de méthanogenèse hydrogénéotrophe implique la réduction de dioxyde de carbone en méthane avec le dihydrogène comme donneur d'électrons (c'est-à-dire en utilisant les électrons provenant de l'oxydation du dihydrogène) (Weimer et Zeikus 1979). Le CO₂ entre dans la voie métabolique par la formation du formylméthanofurane (CHO-MF). Ensuite, la H₄SPT intervient pour transmettre le groupe méthyle. Le coenzyme M est l'accepteur final du groupement méthyle. Le méthane est produit en réduisant le méthyle-coenzyme M à l'aide des électrons apportés par le coenzyme B et provenant initialement de la réduction de l'hydrogène. Les étapes finales de la production du méthane sont identiques à celles des autres types de méthanogenèse (cf. Chapitre 2, § 1.1.3.2.1 Etapes métaboliques communes).

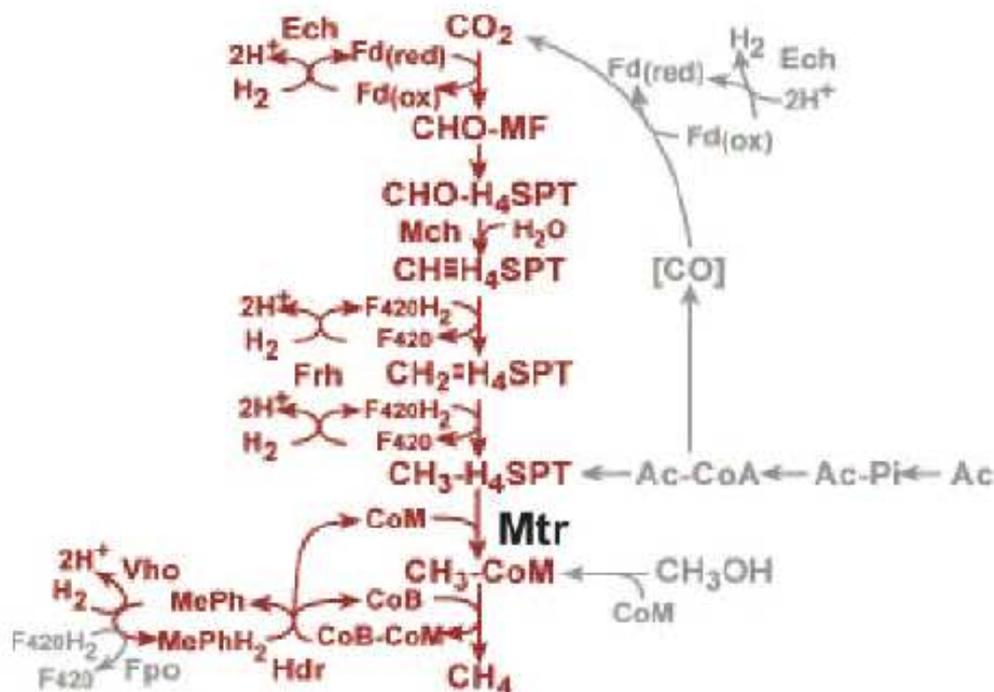


Figure 20 : Métabolisme de la méthanogenèse hydrogénéotrophe (en rouge). (Welander et Metcalf 2005) ; Légende : cf. légende Figure 19.

1.1.3.2.4. Autres voies de la méthanogenèse

Enfin, le processus de méthanogenèse méthylotrophe (Figure 21, A) implique la conversion de composés à un atome de carbone comme le méthanol et les méthylamines, en dioxyde de carbone et méthane (Deppenmeier, Lienard et *al.* 1999). Une molécule de substrat doit être oxydée en dioxyde de carbone pour produire les équivalents nécessaires (6 électrons) à la réduction de trois molécules de substrat en méthane (Deppenmeier, Lienard et *al.* 1999). La formation du CH₄ s'achève par la transformation du groupe méthyle du H₄SPT. Les étapes ultérieures de la production du méthane sont identiques à celles des autres types de méthanogenèse (cf. Chapitre 2, § 1.1.3.2.1 Etapes métaboliques communes).

Le processus de méthanogenèse de réduction de méthyle (Figure 21, B) utilise aussi le dihydrogène comme donneur d'électrons, mais réduit le méthanol en méthane après le transfert du groupement méthyle au coenzyme M (CoM) (Weimer et Zeikus 1978).

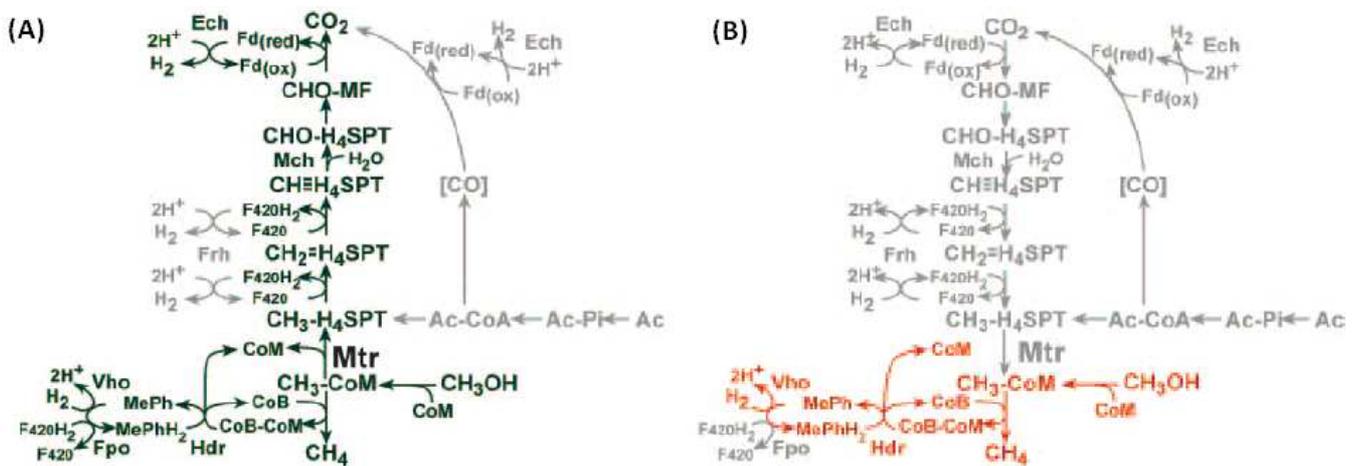


Figure 21 : Métabolisme de la méthanogenèse méthylotrophe (en vert) et de réduction du méthyle (en orange). (Welander et Metcalf 2005) ; Légende : cf. légende Figure 19.

1.1.3.3. Oxydation syntrophique de l'acétate

Une autre voie métabolique, nommée oxydation syntrophique de l'acétate (OSA), a également été décrite. Ce mécanisme permet de produire du méthane à partir de l'acétate en réalisant une réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe après que l'acétate ait été oxydé en CO₂ et H₂.

1.1.3.3.1. Mécanismes mis en jeu

L'OSA est une voie de transformation de l'acétate en méthane réalisée en deux étapes. Premièrement, les groupements méthyle et carboxyle de l'acétate sont oxydés en CO₂ avec production de H₂ (cf. Tableau 15, réaction 1), par des bactéries. C'est la réaction d'oxydation de l'acétate. Cette réaction est défavorable au niveau énergétique puisqu'elle est endergonique (+104,6 kJ.mol⁻¹). La deuxième étape consiste en la réduction du CO₂ en CH₄ par le H₂. Cette réaction est exergonique et produit 135,6 kJ.mol⁻¹ (cf. Tableau 15, réaction 2). Elle est réalisée grâce à des archées méthanogènes. Ainsi, l'association de ces deux étapes permet la production de 31,0 kJ.mol⁻¹ (cf. Tableau 15, réaction 3), ce qui équivaut à la quantité d'énergie libérée par la méthanogenèse acétoclaste (Zinder et Koch 1984; Hattori 2008).

Tableau 15 : Réaction de l'oxydation syntrophique de l'acétate.

Réactions	ΔG^0 (kJ.mol ⁻¹)
(1) $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}_2 + \text{H}^+ + 2\text{HCO}_3^-$	+104,6
(2) $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135,6
(3) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{CH}_4$	-31,6

Deux types de métabolismes qui permettraient l'oxydation de l'acétate par les bactéries ont été décrits (Galushko et Schink 2000; Hattori 2008)

- L'un des deux métabolismes repose sur l'utilisation du cycle de Krebs (cf. Figure 22). Le cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques ou encore cycle du citrate) est une voie métabolique de la mitochondrie. Il consomme de l'acétate et produit du CO_2 sous forme de bicarbonates. L'acétate y rentre sous forme activée, donc sous forme d'acétyl-CoA.

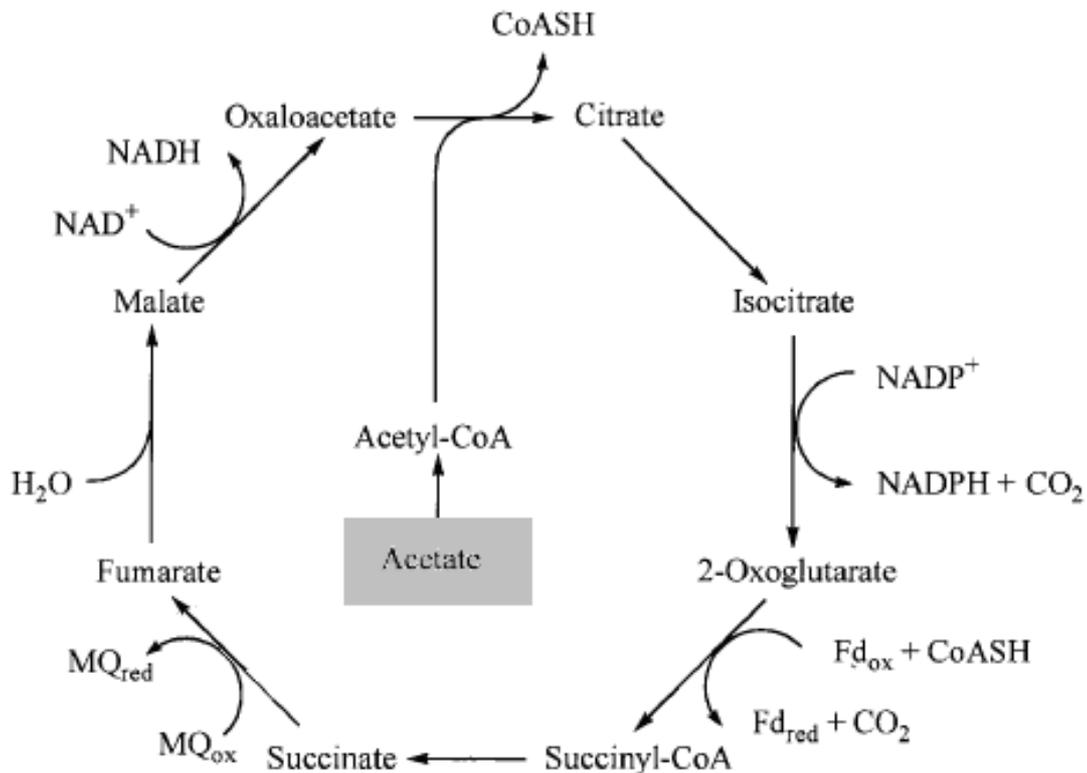


Figure 22 : cycle de Krebs – d'après (Galushko et Schink 2000).

- Le second correspond à l'utilisation de la voie de Wood/Ljungdahl (voie réductrice de l'acétyl-CoA). Cette voie, utilisée par les micro-organismes homoacétogènes, permet la réduction de deux moles de CO_2 en une mole d'acétate (cf. Figure 23). Utilisée dans le sens de l'oxydation par les bactéries syntrophiques, elle permettrait de former du CO_2 à partir de l'acétate.

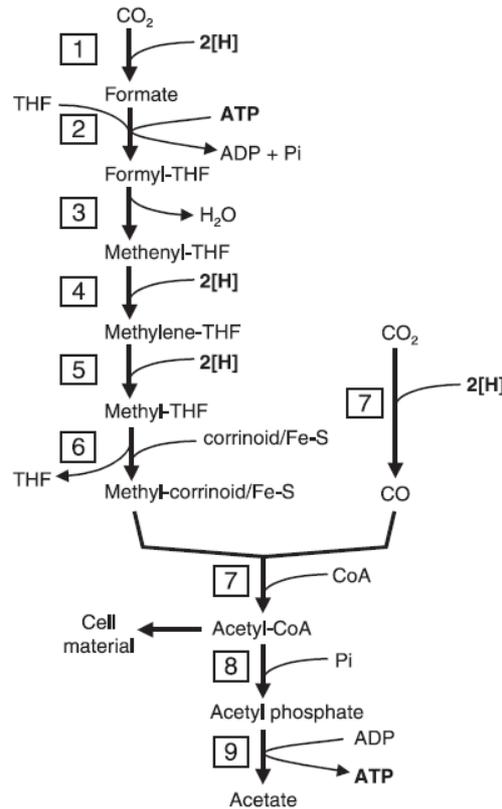


Figure 23 : Métabolisme de Wood/Ljungdahl (homoacétogénèse).

L'oxydation syntrophique de l'acétate a lieu en sens inverse des flèches - (Hattori 2008).

Les nombres dans les carrés correspondent aux enzymes suivantes (noms en anglais):		
1 – formate dehydrogenase	4 – methylene-THF dehydrogenase	7 – carbon monoxyde deshydrogenase/acétyl-CoA synthetase
2 – formyl-THF synthetase	5 – methylene-THF reductase	8 - phosphotransacetylase
3 – methenyl-THF	6 – methyltransferase	9 – acetate kinase

1.1.3.3.2. Micro-organismes impliqués

Dans la littérature, quatre associations bactéries / archées réalisant l'oxydation syntrophique de l'acétate ont été décrites.

- ***AOR / Methanobacterium***

Une relation syntrophique a été mise en évidence dans une coculture, obtenue à partir d'un digesteur thermophile (60°C) permettant la production de méthane grâce à la dégradation de déchets lignocellulosiques (Zinder et Koch 1984; Lee et Zinder 1988). La bactérie syntrophique est un bâtonnet d'environ 2-3 sur 0,4-0,6 µm. Le séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr classe cette bactérie dans le *phylum* des *Firmicutes*. Cette bactérie, nommée *AOR* ou *Reversibacter*, utilise la voie de Wood / Ljungdahl pour oxyder l'acétate (Hattori 2008). L'archée méthanogène hydrogénotrophe associée à cette bactérie dans ce digesteur, est *Methanobacterium* (*phylum Euryarchaeota*, famille *Methanobacteriaceae*) qui présente une forme de bâtonnet de 0,3-1 sur 1,5-15 µm.

- ***Clostridium ultunense / Methanoculleus sp.***

La relation syntrophique entre *Clostridium ultunense* (*phylum Firmicutes*, famille *Clostridiaceae*) et des *Methanoculleus* (*phylum Euryarchaeota*, famille *Methanomicrobiaceae*) a été mise en évidence dans un digesteur traitant du fumier de porc en

condition mésophile et présentant une concentration élevée en ammoniac (0,5 M) (Schnurer, Schink et *al.* 1996; Schnurer, Zellner et *al.* 1999). *Clostridium ultunense* est une bactérie en forme de bâtonnet de 0,5-7 sur 0,5-0,7 µm. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Cette bactérie utilise le mécanisme de Wood / Ljungdahl pour oxyder l'acétate en CO₂ et H₂. Les membres du groupe *Methanoculleus* sont généralement en forme de coque irrégulière de 0,7-2 µm de diamètre. Leur température optimale peut varier de 37 à 60°C en fonction des espèces.

- ***Thermacetogenium phaeum* / *Methanothermobacter thermautotrophicus***

Cette relation syntrophique a été mise en évidence dans un réacteur thermophile traitant les effluents liquides d'une usine de production de pâte à papier au Japon (Hattori, Kamagata et *al.* 2000). L'oxydation de l'acétate est réalisée par la voie de Wood / Ljungdahl par la bactérie *Thermacetogenium phaeum* (phylum *Firmicutes*, famille *Thermoanaerobacteriaceae*). Cette bactérie se présente sous la forme d'un bâtonnet de 0,4-0,7 sur 2-12,6 µm seul, regroupé par deux ou en chaîne. Sa température optimale de croissance est de 58°C et cette bactérie peut dégrader environ 40 mM d'acétate, en coculture, en 20 jours. *Methanothermobacter thermautotrophicus* (phylum *Euryarchaeota*, famille *Methanobacteriaceae*) est l'archée hydrogénotrophe retrouvée en syntrophie avec *T. phaeum*. Elle présente une forme de long bâtonnet d'une taille de 0,3-0,6 sur 2-7 µm (Demirel et Scherer 2008).

- ***Thermotoga lettingae* / *M. thermautotrophicus***

Thermotoga lettingae est une bactérie en forme de bâtonnet d'une taille de 0,5-1 sur 2-3 µm. Sa température optimale de croissance est de 65°C. *T. lettingae* peut dégrader 20 mM d'acétate en 28 jours, en présence d'une archée méthanogène (*M. thermautotrophicus*), par la voie d'oxydation de l'acide citrique (aussi appelée cycle de Krebs). Elle peut aussi dégrader l'acétate en présence de thiosulfate pour former de l'alanine et du sulfure d'hydrogène. Cette relation syntrophique a été mise en évidence à partir de prélèvements d'un bioréacteur en condition sulfato-réductrice en présence de méthanol (Hattori 2008).

- **Bactérie capable d'oxyder l'acétate : *Syntrophaceticus schinkii***

Syntrophaceticus schinkii est une bactérie très récemment isolée à partir d'un échantillon de boue provenant d'un digesteur de traitement d'eaux usées d'une usine de préparation de poisson (Westerholm, Roos et *al.* 2010). Ce digesteur fonctionnait alors en conditions mésophiles, sous forte concentration d'ammoniac et produisait le méthane par OSA. *Syntrophaceticus schinkii* est une bactérie appartenant au phylum des *Firmicutes*, qui sous de faibles concentrations d'ammoniac se présente sous la forme de coques, alors que sous de hautes concentrations; elle est en forme de bâtonnets droits ou légèrement courbés de 2-5 µm sur 0,5-0,7 µm se présentant seuls ou regroupés. Sa température de croissance est comprise entre 25 et 40°C et son pH entre 6 et 8. Cette bactérie est capable d'oxyder l'acétate et participe ainsi à la production de méthane en coculture avec des méthanogènes hydrogénotrophes.

- **Cas particulier des membres de la famille *Methanosarcinaceae***

Comme cela a été présenté précédemment (Chapitre 2, § 1.1.3.1 Les archées), les membres de la famille *Methanosarcinaceae* sont capables de produire du méthane par différentes voies (acétoclaste, hydrogénotrophe, méthylotrophe). De plus, il a été montré que certains membres de cette famille seraient capables de produire et consommer de l'hydrogène à partir de l'acétate pour maintenir une certaine pression partielle en H₂ (Lovley et Ferry 1985). Cela indiquerait que certains membres de la famille *Methanosarcinaceae* soient

capables de réaliser, les deux étapes de l'oxydation syntrophique de l'acétate qui, dans ce cas, ne serait plus syntrophique puisqu'un même micro-organisme réaliserait les deux étapes du processus. Des publications récentes (Rother et Metcalf 2004; Lessner, Li et al. 2006) mettent en évidence que ces archées présentent les capacités métaboliques leur permettant de réaliser l'oxydation de l'acétate sans l'avoir mis en évidence expérimentalement. Au niveau morphologique, les membres de la famille *Methanosarcinaceae* peut se présenter sous forme unicellulaire ou regroupée en "cluster" en fonction des conditions dans lesquelles elle évolue (Raskin, Stromley et al. 1994; Gomec, Letsiou et al. 2008).

1.1.3.3.3. Paramètres influant la mise en place de l'OSA

La prédominance de la voie d'oxydation syntrophique de l'acétate sur la voie acétoclaste, peut être due à l'impact de certains facteurs dont la concentration en ammonium. La concentration en ammonium semble en effet avoir un rôle déterminant. La dégradation anaérobie de la matière organique entraîne la libération d'ammonium. Les deux formes majoritaires en solution aqueuse sont le NH_4^+ et le NH_3 . Le NH_3 est soupçonné d'être la forme inhibitrice car elle passe à travers la membrane cellulaire (cf. Chapitre 2, § 1.2.6.3 L'azote ammoniacal). La concentration en ammonium joue un rôle dans l'orientation de la voie de transformation de l'acétate (Schnurer, Zellner et al. 1999; Schnurer et Nordberg 2008). En effet, l'augmentation de la concentration en ammonium entraîne le passage de la voie acétoclaste à la voie d'OSA. Il semblerait donc que les méthanogènes acétoclastes (particulièrement les membres de la famille *Methanosaetaceae*) soient, même si des résultats contradictoires existent, plus sensibles à l'azote ammoniacal que les méthanogènes hydrogénotrophes (Karakashev, Batstone et al. 2006; Chen, Cheng et al. 2008; Song, Shin et al. 2010). L'augmentation de différents paramètres (la température et le pH) entraîne un accroissement de la concentration en azote ammoniacale sous sa forme libre (NH_3) et peut donc influencer les mécanismes d'inhibition par l'azote ammoniacal (Chen, Cheng et al. 2008) (cf. Chapitre 2, § 1.2.6.3 L'azote ammoniacal).

Certains paramètres peuvent influencer les populations d'archées présentes et/ou le métabolisme employé pour la production du méthane. Par exemple, la concentration d'acétate semble avoir un effet sur les populations de micro-organismes et affecter le processus biogéochimique. En effet, la concentration d'acétate joue un rôle important. L'étude d'Ahring (Ahring 1995) a montré que dans un réacteur anaérobie thermophile, à une concentration supérieure à $0,06 \text{ g.L}^{-1}$, l'acétate est métabolisé par méthanogenèse acétoclaste alors que quand la concentration d'acétate est inférieure à $0,06 \text{ g.L}^{-1}$, la majeure partie de l'acétate est oxydée par l'oxydation syntrophique de l'acétate réalisée par une bactérie syntrophique et une méthanogène hydrogénotrophe. Des expériences ont montrées qu'à basse température ($<20^\circ\text{C}$), la production de méthane n'était pas, comme c'est le cas à 25°C , augmentée suite à l'introduction d' H_2 (Conrad, Bak et al. 1989). A l'opposé, alors qu'un mélange de méthane produit par les métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe est possible en conditions mésophiles, une augmentation de la température au dessus de $37-40^\circ\text{C}$ conduit à l'établissement d'un métabolisme hydrogénotrophe uniquement (Fey, Claus et al. 2004; Conrad, Klose et al. 2009). Le métabolisme hydrogénotrophe ne semble donc pas être actif à basse température et favorisé à haute température.

Tableau 16 : Méthanogènes prédominants en fonction de la température et de la concentration en acétate. (Li 2008).

[acétate]	Température mésophile	Température thermophile
Faible ($< 1 \text{ mM}$)	<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanoculleus</i>
Elevée ($> 1 \text{ mM}$)	<i>Methanosarcina</i> , <i>Methanosaeta</i>	<i>Methanosarcina</i> , <i>Methanoculleus</i>

1.1.3.4. Homoacétogénèse

L'homoacétogénèse correspond aux processus de formation d'acétate à partir de substrat contenant un atome de carbone, comme le CO₂, le méthanol, la méthylamine ou le formate. Strictement anaérobies, les micro-organismes réalisant cette réaction sont, au niveau taxonomique, les homoacétogènes. Ils forment un groupe extrêmement hétérogène, comportant des micro-organismes Gram-positifs et Gram-négatifs, des morphologies de types bacilles et cocci, mobiles et non-mobiles, psychrophiles, mésophiles ou thermophiles. Ce processus a également été mis en évidence pour sa consommation significative d'hydrogène dans les installations de stockage de déchets (Chen, Ohashi et *al.* 2003).

Il existe deux intérêts pour les micro-organismes à réaliser l'homoacétogénèse : l'apport de carbone et d'énergie. L'apport de carbone car les molécules d'acétate peuvent être converties ensuite en acétyl-CoA pour la synthèse cellulaire. L'apport d'énergie car la synthèse d'acétate à partir de méthanol est un processus exo-énergétique, et l'homoacétogénèse hydrogénotrophe libère également de l'énergie mais en moindre quantité (Tableau 17).

Tableau 17 : Quelques réactions d'homoacétogénèse.

Réactions	$\Delta G^0_{35^\circ\text{C}}$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta G^0_{55^\circ\text{C}}$ (kJ.mol ⁻¹)
(1) $4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 4\text{H}_2\text{O}$	-215,8	-212,5
(2) $4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-141,0	-133,9

1.2. Paramètres clés ayant une influence sur la méthanogénèse

De nombreux paramètres ont une influence sur le déroulement de la méthanogénèse de façon positive ou négative. Un paramètre peut être favorable à la méthanogénèse dans certaines conditions et défavorable dans d'autres. Cette liste, non exhaustive, identifie et présente uniquement les paramètres les plus importants.

1.2.1. La teneur en eau

Un des paramètres essentiels au bon déroulement de la méthanogénèse est la teneur en eau. En effet, c'est le milieu de vie des micro-organismes et elle représente environ 80 % de leur masse cellulaire (Aguilar-Juarez 2000). Par ailleurs, l'eau intervient comme réactif dans les processus de dégradation de la MO (Tchobanoglous, Theisen et *al.* 1993) et de certaines réactions de méthanogénèse. Elle est indispensable à la réalisation de ces réactions. De plus, la circulation de l'eau va permettre d'une part la dilution des composés inhibiteurs dans les zones fortement concentrées, et d'autre part la circulation tant des nutriments et substrats solubles que des micro-organismes (El-Fadel, Findikakis et *al.* 1996). Une teneur en eau inférieure à 60 % serait insuffisante pour les processus de dégradation des déchets et cela, quelle que soit la phase de dégradation (Rees 1980).

1.2.2. L'oxygène et le potentiel redox

De part sa toxicité envers les micro-organismes anaérobies stricts, dont font partie les archées méthanogènes, l'oxygène et donc le potentiel d'oxydo-réduction sont des paramètres ayant une influence sur la méthanogénèse. Le potentiel d'oxydo-réduction, généralement exprimé par rapport à l'électrode normale à hydrogène, doit en théorie être inférieur à -300 mV pour permettre la croissance des méthanogènes (Demeyer, Jacob et *al.* 1981; Jee, Mano et *al.* 1988; Oremland 1988; Christensen et Kjeldsen 1989). Des cas de méthanogénèse à des

potentiels supérieurs ont toutefois été observés de -350 à -250 mV (Bouchez et Bourdon 2001), de -300 à -200 mV (François 2004), à -200 mV (Farquhar et Rovers 1973) et jusqu'à -100 mV (Pohland et Al-Yousfi 1994).

1.2.3. La température

La température affecte l'activité enzymatique et la croissance des micro-organismes méthanogènes. Toutefois, ils sont capables de se développer dans une gamme de température très large allant de 2°C (dans les sédiments marins) à plus de 100°C (dans les zones géothermiques) (Palmisano et Barlaz 1996). Il est considéré que les micro-organismes méthanogènes sont particulièrement adaptés à trois domaines de températures : températures psychrophiles (4-15°C), températures mésophiles (20-40°C) et températures thermophiles (45-70°C) (Batstone, Keller et *al.* 2002).

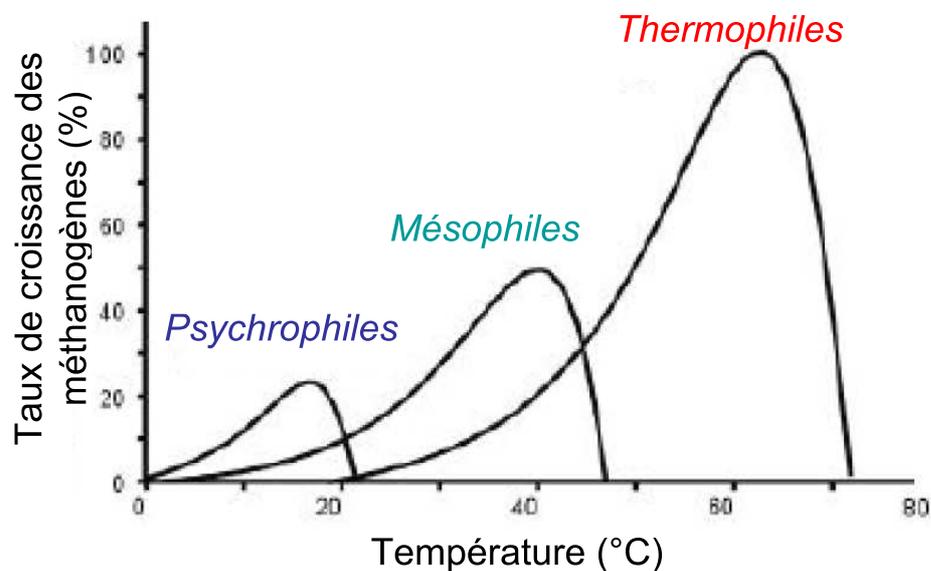


Figure 24 : Variations du taux de croissance relatif des méthanogènes en fonction de la température. (Batstone, Keller et *al.* 2002).

Certaines études ont montré qu'une augmentation de la température permet d'accélérer la production du méthane sans pour autant accroître le potentiel final de production (Palmisano et Barlaz 1996). La vitesse de production de biogaz peut doubler à chaque augmentation de 10°C jusqu'au palier critique de 60°C (Palmisano et Barlaz 1996). La variation de la température doit néanmoins être relativement lente afin que la flore microbienne ait le temps de s'adapter aux nouvelles conditions du milieu.

La température affecte les réactions biochimiques et les réactions physico-chimiques. Comme le prédit la loi d'Arrhenius, une augmentation de la température conduit à une augmentation des vitesses réactionnelles. Au delà des seuils de tolérance de chaque micro-organisme, une augmentation conduit à une diminution de la vitesse de réaction. Enfin une température trop élevée peut également conduire à la modification des chemins réactionnels (modification thermodynamique et modification des populations), augmenter le taux de mortalité des méthanogènes et/ou diminuer les rendements (augmentation de la dépense énergétique liée au maintien de l'intégrité cellulaire) (Batstone, Keller et *al.* 2002).

1.2.4. Le rapport C/N

Chaque micro-organisme constituant la flore méthanogène demande un apport suffisant en éléments nécessaires à la synthèse de sa biomasse (C, N, P, S) et en oligo-éléments pour sa croissance. Les besoins en carbone et azote peuvent être évalués grossièrement à partir de la formule brute décrivant la composition d'une cellule. Pour les méthanogènes, le milieu de culture doit avoir des teneurs en carbone (exprimée en DCO), en azote et en phosphore au minimum dans les proportions (DCO/N/P) suivantes : 100/0,44/0,08 (Mc Carty 1964), 600/7/1 (Mata-Alvarez 2003), 400/5/1 (Wens, Vercauteren et *al.* 2001). L'ammonium est leur principale source d'azote. Certaines espèces fixent l'azote moléculaire alors que d'autres ont besoin d'acides aminés.

1.2.5. Le pH

Le pH optimum pour la méthanogénèse se situe entre 6 et 8 d'après (Ehrig 1983) ou 6,8 et 7,4 d'après (Barlaz, Ham et *al.* 1990). En dessous d'un pH de 6 les archées sont fortement inhibées. Une chute de pH traduit généralement l'accumulation d'AGV et influe directement les équilibres acido-basiques de nombreuses espèces chimiques (par exemple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$). Il est donc difficile d'établir si une inhibition résulte d'un effet direct ou indirect du pH.

1.2.6. Inhibiteurs potentiels

La méthanogénèse est sensible à la présence de nombreux composés chimiques tels que certains accepteurs d'électrons (oxygène, nitrates & sulfates), les métaux lourds, les sulfures, les acides organiques volatils, l'ammoniac, les hydrocarbures halogénés et les cations. Le pouvoir inhibiteur de chacun de ces composés dépend généralement de leurs concentrations dans le milieu, mais également des conditions environnementales (pH, température, concentration d'autres espèces) (Mata-Alvarez 2003). Les AGV, l'azote ammoniacal et le sulfure d'hydrogène sont les inhibiteurs les plus couramment mis en cause lors de défaillances des digesteurs industriels.

1.2.6.1. Les acides gras volatils

L'accumulation des AGV conduit à une chute du pH pouvant s'avérer être défavorable à la méthanogénèse. Ces composés peuvent également être directement inhibiteurs pour les étapes de méthanogénèse et d'hydrolyse lors de la digestion anaérobie (Palmisano et Barlaz 1996), et cela, même si le pouvoir tampon permet de garder un pH proche de la neutralité. La détermination des concentrations inhibitrices est difficile. Toutefois, des effets inhibiteurs pour des concentrations de 2 g.L⁻¹ (Siegert et Banks 2005) et de 3 g.L⁻¹ (Yuen, Styles et *al.* 1995) ont été mis en évidence.

1.2.6.2. Les ions

Nombreux sont les ions pouvant potentiellement inhiber la méthanogénèse. Les principaux sont :

- **L'ammonium**

L'inhibition de la méthanogénèse par les ions NH_4^+ est un élément clé dans le cadre de ce travail. Un paragraphe spécifique est dédié à l'effet de l'azote ammoniacal sur la méthanogénèse (Chapitre 2, § 1.2.6.3 L'azote ammoniacal).

- **Le phosphate**

Une inhibition de la méthanogenèse par le phosphate serait possible à partir de 20 mmol.L⁻¹ (Conrad, Klose et *al.* 2000). Les populations acétoclastes y seraient plus spécifiquement sensibles.

- **Le sodium**

Le sodium est essentiel aux méthanogènes à faibles concentrations, probablement pour son rôle lors de la formation de l'adénosine triphosphate ou de l'oxydation du NADH (Dimroth et Thomer 1989). De fortes concentrations de sodium peuvent par contre inhiber la méthanogenèse. En effet, des phénomènes d'inhibition modérée peuvent survenir à partir de concentrations comprises entre 3,5 et 5,5 g Na⁺.L⁻¹ (Yuen, Styles et *al.* 1995) et des inhibitions fortes pour 8 g Na⁺.L⁻¹ (Mc Carty 1964) en conditions mésophiles. Ces résultats sont confirmés à pH neutre pour des concentrations en sodium de 5, 10 et 14 g Na⁺.L⁻¹ qui inhibent la méthanogenèse acétoclaste de 10, 50 et 100 % respectivement (Rinzema, van Lier et *al.* 1988). Une acclimatation préalable semble pouvoir permettre d'augmenter le seuil de tolérance des populations microbiennes au sodium (Debaere, Devocht et *al.* 1984; Feijoo, Soto et *al.* 1995; Chen, Han et *al.* 2003).

- **Le potassium**

Des études ont montré que des hauts niveaux de potassium extracellulaire (1,0 M) seraient néfastes car ils conduiraient à un flux passif d'ions qui neutraliserait le potentiel de membrane (Chen, Cheng et *al.* 2008). Une inhibition de la méthanogenèse par le potassium serait possible à partir de concentrations comprises entre 2500 à 4500 mg.L⁻¹ (Yuen, Styles et *al.* 1995).

- **Le calcium**

Des teneurs excessives en calcium conduisent à la précipitation des carbonates et des phosphates, ce qui entraîne une perte du pouvoir tampon et des nutriments nécessaires à l'activité méthanogène (Chen, Cheng et *al.* 2008). Une inhibition de la méthanogenèse par le calcium serait possible à partir de concentrations comprises entre 2500 à 4500 mg.L⁻¹ (Yuen, Styles et *al.* 1995).

- **Le magnésium**

Une inhibition de la méthanogenèse par le magnésium serait possible pour certains auteurs à partir de 400 mg.L⁻¹ (Schmidt et Ahring 1993) et pour d'autres à partir de 1000 à 1500 mg.L⁻¹ (Yuen, Styles et *al.* 1995).

1.2.6.3. L'azote ammoniacal

La dégradation anaérobie des composés azotés tels que les protéines conduit à la production d'azote ammoniacal. L'azote ammoniacal ainsi produit se retrouve en solution sous deux formes principales : la forme libre (NH₃) et la forme d'ion ammonium (NH₄⁺). Plusieurs mécanismes d'inhibition ont été proposés comme par exemple un changement du pH intracellulaire, une augmentation de l'énergie requise au maintien de l'intégrité cellulaire (maintenance) ou une inhibition spécifique d'une réaction enzymatique (Whittmann, Zeng et *al.* 1995). Toutefois, rien n'est clairement établi. En effet, la forme libre (NH₃) a été proposée comme étant la forme inhibitrice du fait de sa capacité à traverser librement les membranes (Kroeker, Schulte et *al.* 1979; Debaere, Devocht et *al.* 1984). Les molécules d'ammoniac hydrophobes peuvent diffuser passivement dans les cellules en entraînant un gradient de protons trop important et/ou des déficiences en potassium (Spratt, Shaw et *al.* 1984; Gallert,

Bauer *et al.* 1998). Parmi tous les micro-organismes participant à la digestion anaérobie, les méthanogènes semblent être les moins tolérants et les plus sujets à l'inhibition par l'azote ammoniacal (Kayhanian 1994). Les principaux facteurs ayant une influence sur l'inhibition de la méthanogenèse par l'azote ammoniacal sont les suivants :

- **Concentration**

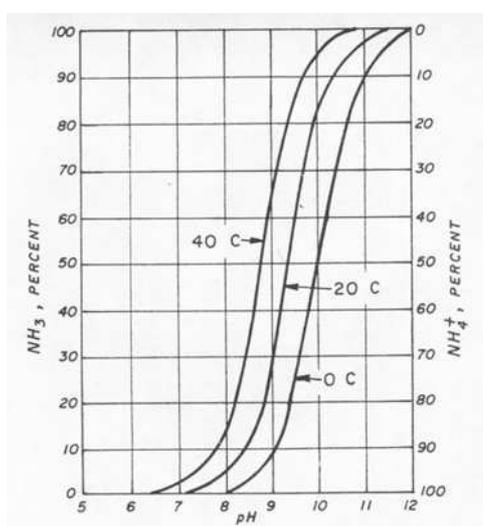
Il est généralement considéré que des concentrations en dessous de 200 mg.L⁻¹ d'azote ammoniacal total sont bénéfiques aux processus de digestion anaérobie car l'azote est un des éléments essentiels à la croissance des micro-organismes anaérobies (Liu et Sung 2002). De nombreuses valeurs de concentrations inhibitrices (entraînant un abaissement de plus de 50 % de la production de méthane) sont données pour l'azote ammoniacal dans la littérature allant de 1,7 à 14 g.L⁻¹ d'azote ammoniacal total (Chen, Cheng *et al.* 2008). La disparité importante de ces valeurs peut être attribuée à la variété des substrats étudiés, des conditions environnementales, des inocula et des périodes d'acclimatation considérées.

- **pH**

La teneur en forme libre (NH₃) est affectée par le pH. En effet, il existe un équilibre entre la concentration en ions ammonium et l'ammoniac en fonction notamment du pH et de la température (cf. Figure 25 & Équation 21). Comme il a été suggéré que la forme libre (NH₃) est la forme toxique, une augmentation du pH conduirait donc à une augmentation du NH₃ et donc à une augmentation de la toxicité.

- **Température**

La teneur en forme libre (NH₃) est affectée par la température. Une augmentation de la température conduit, comme le pH, à un déplacement de l'équilibre NH₃/NH₄⁺ vers la forme NH₃ (cf. Figure 25 & Équation 21). Une augmentation de la température conduirait donc à une augmentation du NH₃ et donc à une augmentation de la toxicité. Plusieurs auteurs ont montré que la digestion anaérobie à haute concentration en azote ammoniacal, est plus facilement inhibée et moins stable à haute température (Braun, Huber *et al.* 1981; Parkin et Miller 1983).



$$NH_3 - N = \frac{NH_4^+ - N \times 10^{pH}}{e^{\frac{6344}{273+T(^{\circ}C)} + 10^{pH}}}$$

Figure 25 : Illustration de l'effet de la température et du pH sur l'équilibre NH₄⁺/NH₃.

- **Micro-organismes**

A ce jour, il n'est pas clairement établi qui des méthanogènes acétoclastes ou des hydrogénotrophes sont les plus fortement affectés par l'azote ammoniacal. Toutefois, même s'il existe des informations contradictoires dans la littérature, les acétoclastes sembleraient être généralement plus sensibles (Chen, Cheng et *al.* 2008). Des recherches basées sur la comparaison de la production de méthane et du taux de croissance, indiquent que l'effet inhibiteur est en général plus fort pour les méthanogènes acétoclastes que pour les hydrogénotrophes (Zeeman, Wiegant et *al.* 1985; Sprott et Patel 1986; Koster et Lettinga 1988; Bhattacharya et Parkin 1989; Robbins, Gerhardt et *al.* 1989; Angelidaki et Ahring 1994; Borja, Sanchez et *al.* 1996). Cependant, d'autres études mettent en évidence la résistance relativement élevée des acétoclastes aux hautes concentrations de TAN (total ammonia nitrogen) en comparaison des hydrogénotrophes (Zeeman, Wiegant et *al.* 1985; Wiegant et Zeeman 1986).

- **Autres ions**

La présence d'autres ions tels que Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} semble limiter l'effet inhibiteur de l'azote ammoniacal. Leur présence permettrait ainsi d'abaisser la toxicité de l'azote ammoniacal (Braun, Huber et *al.* 1981; Hendriksen et Ahring 1991).

- **Acclimatation**

Une acclimatation des populations de méthanogènes à l'azote ammoniacal, grâce à une augmentation progressive de la concentration, est reportée depuis 1971 (Melbinger et Donnellon 1971). Cette adaptation peut être le résultat d'une modification des espèces dominantes de méthanogènes (Zeeman, Wiegant et *al.* 1985). Il est donc important de noter que même si les populations de méthanogènes semblent capables de s'adapter à de hauts niveaux d'azote ammoniacal (Chen, Cheng et *al.* 2008), cela conduit généralement à une chute de la production de méthane (Koster et Lettinga 1988; Borja, Sanchez et *al.* 1996) et de sa cinétique (Lay, Li et *al.* 1998; Schnurer, Zellner et *al.* 1999; Karakashev, Batstone et *al.* 2006).

Remarque : dans le cas spécifique du domaine d'étude qui concerne la dégradation des déchets solides, l'accumulation d'azote ammoniacal à partir des composés azotés (majoritairement sous la forme d'urée et de protéines (Kayhanian 1999), est un phénomène pouvant survenir dans les ISD ou les méthaniseurs, car il n'y a pas de réaction d'élimination de l'azote ammoniacal efficace en condition anaérobie. Les concentrations en azote ammoniacal retrouvées peuvent, de ce fait, entraîner des inhibitions de la méthanogenèse (Kayhanian 1994; Wens, Vercauteren et *al.* 2001). En effet, les concentrations en ions ammonium peuvent atteindre des valeurs élevées dans le lixiviat d'ISDND ($3421 \text{ mg NH}_3+\text{NH}_4^+.\text{L}^{-1}$) (Wens, Vercauteren et *al.* 2001) et dans les méthaniseurs ($4,3 \text{ g.kg}^{-1}$ de matière prélevée en sortie de digesteur) (Illmer et Gstraunthaler 2009) par exemple.

1.2.6.4. Les métaux

La plupart des métaux sont essentiels au développement des micro-organismes. Toutefois, à de fortes concentrations ils peuvent devenir inhibiteurs. Une inhibition totale de la méthanogenèse est possible si les concentrations de :

- Cobalt libre sont supérieures à 70 mg.L⁻¹ (Bhattacharya, Uberoi et *al.* 1995b) ;
- Cuivre sont supérieures à 60 mg.L⁻¹ (Speece et Parkin 1983) ;
- Zinc sont supérieures à 100 mg.L⁻¹ (Harries, Scrivens et *al.* 1990) ;
- Cadmium sont supérieures à 0,1 mg.L⁻¹ (Bhattacharya, Madura et *al.* 1995a).

De plus, un grand nombre d'auteurs ont tenté d'établir un classement des métaux en fonction de leurs toxicités sur les processus de conversion des AGV en méthane (Lin 1992; Mueller et Steiner 1992; Lin 1993; Codina, Munoz et *al.* 1998; Lin et Chen 1999). L'ordre est variable en fonction des études et des micro-organismes présents. Cependant, une tendance générale permet de les classer en trois catégories en fonction de leur pouvoir d'inhibition :

- Plus inhibiteurs : cuivre et cadmium ;
- Moyennement inhibiteurs : zinc et chrome ;
- Moins inhibiteurs : plomb et nickel.

1.2.6.5. Autres inhibiteurs

Evidemment, d'autres inhibiteurs peuvent s'ajouter à ceux listés précédemment. Les nitrates, nitrites, l'oxygène, certains xénobiotiques tels que les solvants, des médicaments, des pesticides, des surfactants ou des phénols (Barclaz 1996; Malta-Alvarez 2003) et de nombreux autres composés (Chen, Cheng et *al.* 2008).

2. Etude de la méthanogenèse par approche isotopique

2.1. Isotopes stables

2.1.1. Définitions

Avant de définir la notion d'isotope, il est essentiel de bien connaître les éléments constitutifs d'un atome. Un atome est constitué d'un noyau (10⁻¹⁵ m de diamètre environ) composé de nucléons (protons et neutrons) autour duquel gravite un nuage d'électrons comme illustré sur la Figure 26.

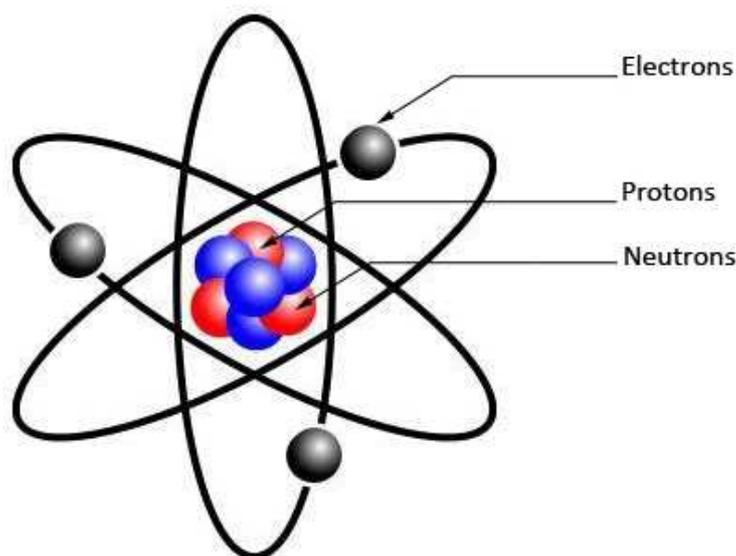


Figure 26 : Représentation structurelle d'un atome.

Les électrons ont une charge électrique négative. Les protons ont une charge électrique positive, de même valeur absolue que celle de l'électron. Les neutrons n'ont pas de charge électrique, ils sont neutres comme leur nom l'indique. Au sein d'un atome, il y a exactement le même nombre d'électrons et de protons. Un atome est ainsi électriquement neutre. Le nombre d'électrons (ou de protons) dans un atome détermine ses propriétés physiques et chimiques, c'est le numéro atomique. Le nombre de neutrons au sein des atomes d'un même élément (même numéro atomique) peut varier mais, en général, il est proche du nombre de protons afin d'assurer une certaine stabilité du noyau. Les atomes d'un même élément chimique n'ont donc pas tous le même nombre de masse (nombre de protons + nombre de neutrons). Pour représenter un atome on utilise donc la représentation présentée en Figure 27.

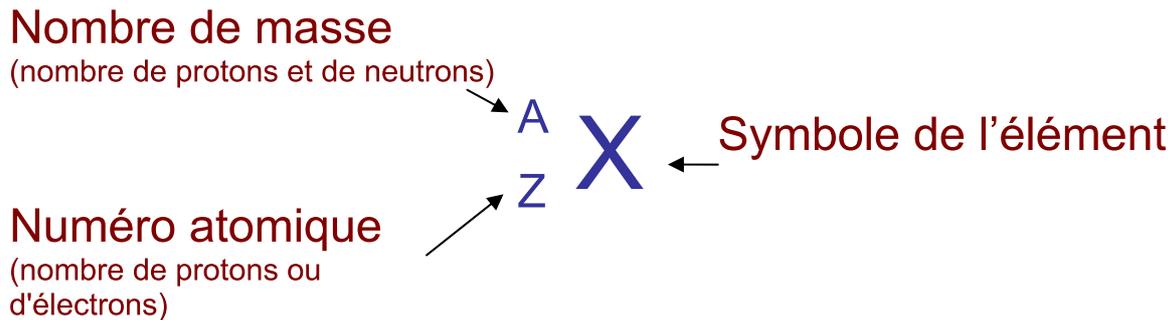


Figure 27 : Notation atomique des éléments.

Les isotopes sont des atomes dont le noyau contient le même nombre de protons mais un nombre différent de neutrons. Deux isotopes d'un même élément ont donc le même numéro atomique, mais un nombre de masse différent. Etymologiquement, le terme isotope vient du grec et est composé du préfixe iso-, « même » et du suffixe -tope, « place » ce qui signifie "à la même place" (sous entendu dans la classification périodique des éléments).

Deux grands groupes d'isotopes sont distingués : les isotopes stables et les isotopes instables, également couramment appelés éléments radioactifs.

2.1.2. Effet isotopique

Si les différents isotopes d'un même élément peuvent sembler présenter les mêmes propriétés physico-chimiques, cela n'est vrai qu'en première approximation. En effet, les différences de masse entre deux isotopes d'un même élément chimique engendrent de faibles différences de propriétés physico-chimiques : énergie de liaison, température de fusion et de vaporisation, viscosité, vitesse de réaction, constante d'équilibre, Ces différences sont appelées effets isotopiques.

C'est un effet quantique qui est à la base de ces différences de propriétés physico-chimiques. Cet effet est schématiquement représenté sur la Figure 28 qui représente l'évolution de l'énergie potentielle (pour une molécule diatomique) en fonction de la distance entre deux atomes. Cette courbe présente un minimum auquel une distance interatomique est associée. Dans la théorie quantique, l'énergie d'une molécule est limitée à des valeurs discrètes de niveaux d'énergie. Le premier niveau d'énergie se situe à $\frac{1}{2} h\nu$ (ou h est la constante de Planck et ν la fréquence de vibration des atomes les uns par rapport aux autres) au-dessus de la valeur d'énergie observée au niveau du puit de potentiel. La présence d'un isotope plus ou moins lourd va alors créer une différence. En effet, la fréquence de vibration des atomes entre eux dépend de la masse de ces derniers et elle varie donc avec l'isotope

considéré. Plus la masse des atomes est importante, plus la fréquence de vibration sera faible. Ainsi, le niveau d'énergie minimum sera plus faible pour une molécule contenant un isotope lourd. La liaison formée sera ainsi plus énergétique et donc moins fragile que celle contenant uniquement des isotopes légers.

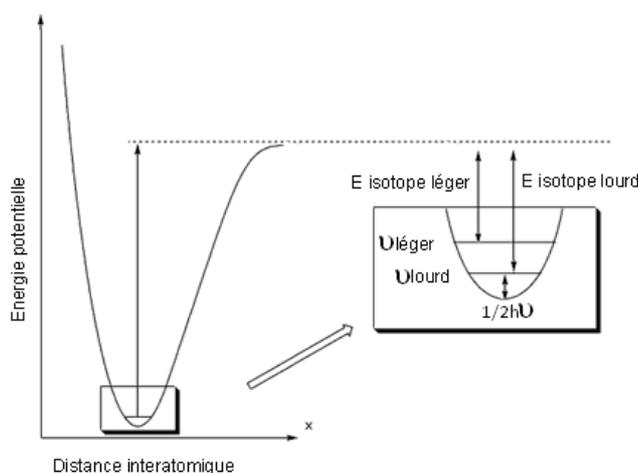


Figure 28 : Courbe de potentiel d'interaction entre deux atomes en fonction de la distance-interatomique.

2.1.3. Fractionnement isotopique

La notion de fractionnement isotopique correspond à une modification de la répartition des différents isotopes d'un élément au sein d'une molécule. Ce fractionnement peut survenir lors de processus chimiques ou lors de processus physiques et est directement lié à la notion d'effet isotopique, détaillé précédemment (Chapitre 2, § 2.1.2 Effet isotopique). Deux phénomènes principaux sont à l'origine des fractionnements isotopiques : les effets cinétiques et les échanges isotopiques.

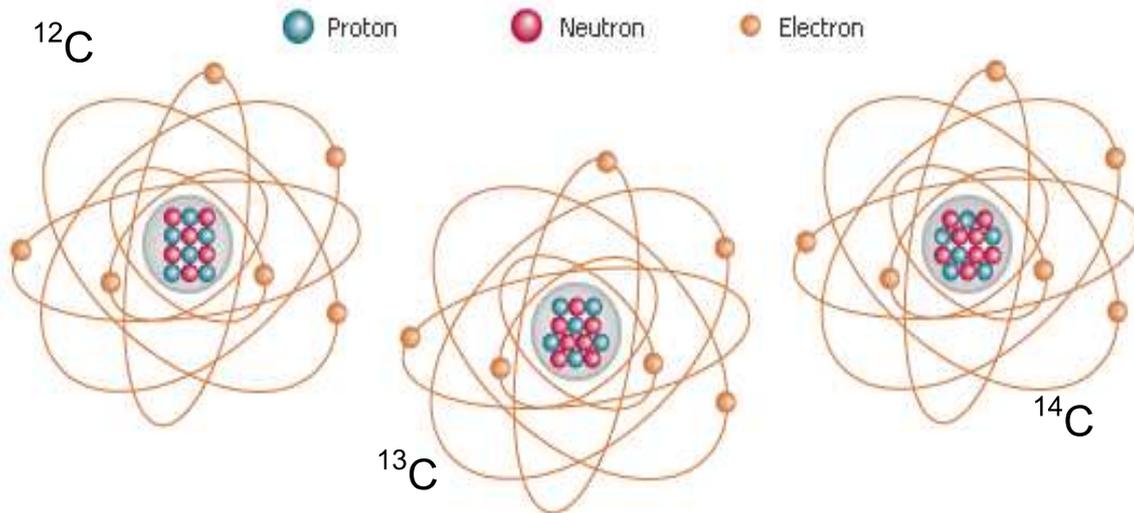
Les effets cinétiques sont associés à des processus tels que les phénomènes de diffusion, les réactions de dissociation et les réactions chimiques. Au cours d'une réaction chimique, l'énergie vibrationnelle du système en réaction varie lors du passage de l'état initial à l'état de transition, puisqu'une ou plusieurs liaisons sont cassées lors de la réaction chimique. Les liaisons mettant en jeu des isotopes légers étant plus fragiles, les réactions chimiques les concernant sont plus rapides et plus fréquentes. Un fractionnement isotopique peut en découler. La perturbation induite sur le système, quoique faible, est perceptible cinétiquement. Elle se traduit par une différence entre les constantes cinétiques de réaction associées aux différents isotopes. Lors des phénomènes de diffusion, c'est simplement la différence de mobilité des molécules qui cause le fractionnement car les atomes plus légers sont plus mobiles.

Les échanges isotopiques surviennent lors de la répartition des isotopes entre différentes phases ou substances chimiques. Ils sont associés aux processus physico-chimiques sans réaction chimique au sens propre du terme. Par exemple, les processus d'évaporation-condensation conduisent à un fractionnement isotopique entre la vapeur (appauvrie en ^{13}C) et la phase liquide (enrichie en ^{13}C) en raison de la différence de pression de vapeur des composés isotopiques.

2.2. Rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

2.2.1. Isotopes du carbone

Le carbone est un élément unique du fait de ses propriétés chimiques. En effet, le carbone permet de former un nombre de composés plus important que tous les autres éléments réunis. Il est également le composant caractéristique de la matière organique. Une présentation détaillée de ses isotopes est donnée en Figure 29.



Carbone 12 : stable : 6 protons / 6 neutrons

Carbone 13 : stable : 6 protons / 7 neutrons

Carbone 14 : instable : 6 protons / 8 neutrons

Figure 29 : Isotopes du carbone.

Il existe trois isotopes du carbone dont deux sont stables (^{13}C & ^{12}C) et un instable (^{14}C). Le carbone « ordinaire », de loin le plus abondant dans la nature, est le ^{12}C (98,89 %). Le ^{13}C est rare puisqu'il ne représente qu'environ 1,11 % du carbone en moyenne sur terre. Le ^{14}C , quant à lui, est encore plus rare puisqu'il représente seulement 0,0000000001 % du carbone total (Figure 30).

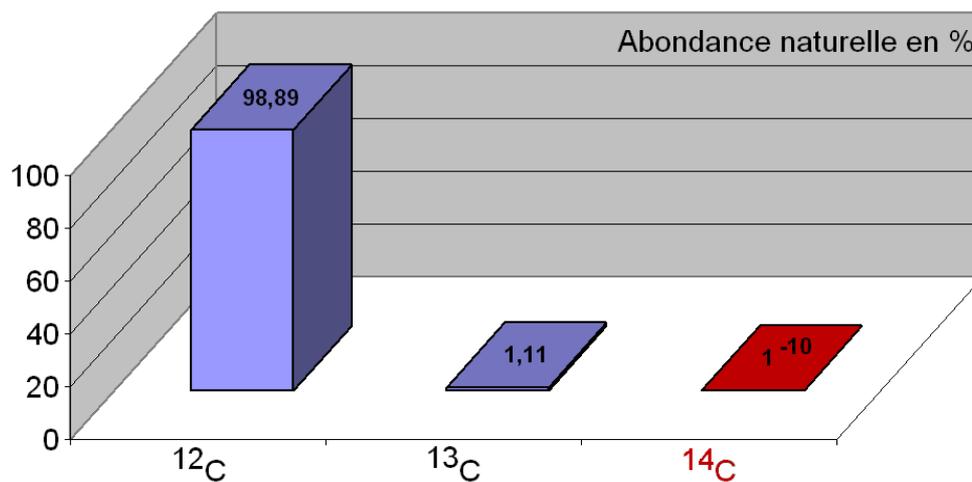


Figure 30 : Abondance naturelle des isotopes du carbone.

2.2.2. Composition isotopique

La géochimie des isotopes stables s'intéresse aux abondances des différents isotopes stables présents dans une substance. Le rapport d'abondance isotopique exprime, dans un composé donné, la proportion d'isotope lourd par rapport à l'isotope léger, le plus abondant. Il se note par un grand R.

$$R = \frac{\text{isotope lourd}}{\text{isotope léger}} \quad \text{Pour le carbone :} \quad R_C = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$$

Équation 1

Cette abondance relative des différents isotopes du carbone peut varier en fonction des composés, de leurs origines et des transformations qu'ils ont subies. Afin de pouvoir quantifier ces différences d'abondance généralement très faibles, une notation spécifique est utilisée : la composition isotopique (δ).

Du fait de la difficulté de mesurer les abondances isotopiques absolues, elles sont exprimées par rapport à des standards internationaux. Les variations isotopiques étant en générales faibles, les déviations relatives par rapport aux standards internationaux (valeur arbitraire fixée à 0 ‰) sont reportées suivant la notation delta et exprimées en pour mille (‰).

$$\text{Pour le Carbone :} \quad \delta^{13}\text{C}_{ech} = \left(\frac{R_{C_{ech}} - R_{C_{ref}}}{R_{C_{ref}}} \right) \times 10^3 \quad \left[\frac{\text{‰}}{\text{‰}} \right]$$

Équation 2

Les standards internationaux ont été choisis afin de représenter les réservoirs dominants de chacun des éléments spécifiques. Pour le carbone, le standard international utilisé comme référence est la Bélemnite Pee-Dee (le V-PDB, Vienne-Pee Dee Belemnite, CaCO_3) avec un rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ égal à 0,0112372. Ces carbonates proviennent d'un mollusque fossile datant du crétacé et provenant de la rivière Pee Dee en Caroline du Sud. Le rostre en calcite de ce mollusque est utilisé pour la mesure de son $\delta^{13}\text{C}$. Cette composition isotopique définit le zéro de l'échelle des $\delta^{13}\text{C}$.

Une valeur négative de $\delta^{13}\text{C}$ signifie que l'échantillon est appauvri en ^{13}C par rapport à l'étalon international. A l'opposé, une valeur positive indique un enrichissement en ^{13}C de l'échantillon par rapport à ce même étalon international, comme illustré sur la Figure 31

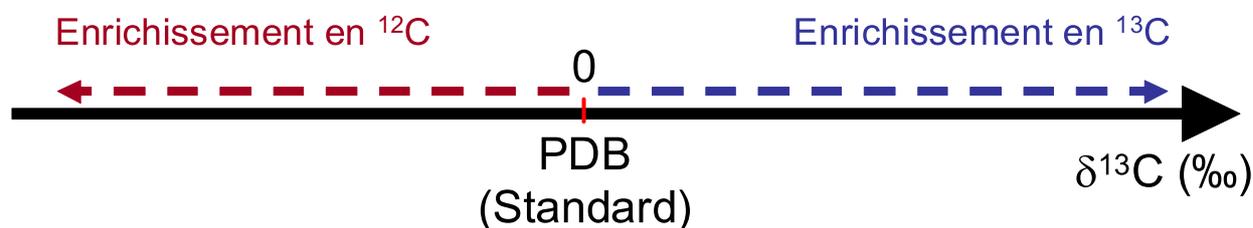


Figure 31 : Axe de représentation de la composition isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$).

Dans le cas de l'étude des fractionnements isotopiques engendrés par une réaction, d'autres notions telles que le facteur de fractionnement isotopique (ou isotopic fractionation factor, α) et le facteur d'enrichissement isotopique (ou isotopic enrichment factor, ϵ) sont généralement utilisées.

- **Facteur de fractionnement isotopique (α)**

Le fractionnement isotopique d'une réaction peut-être défini par le rapport des constantes de vitesse de cette réaction pour les deux espèces isotopiques. Il se note α et se calcule de la manière suivante :

$$\alpha = \frac{k_{\text{lourd}}}{k_{\text{léger}}} = KIE^{-1} \quad \text{pour le carbone} \quad \alpha = \frac{{}^{13}\text{C}k}{{}^{12}\text{C}k}$$

Équation 3

Le fractionnement isotopique d'une molécule (substrat) et de son produit de dégradation peut être exprimé par le rapport des rapports d'abondances isotopiques des deux composés.

$$\alpha_{\text{substrat} \rightarrow \text{produit}} = \frac{R_{\text{substrat}}}{R_{\text{produit}}} = \frac{10^{-3} \delta_{\text{substrat}} + 1}{10^{-3} \delta_{\text{produit}} + 1} = \frac{\delta_{\text{substrat}} + 10^3}{\delta_{\text{produit}} + 10^3}$$

Équation 4

- **Facteur d'enrichissement isotopique (ϵ)**

Pour exprimer la différence de composition isotopique entre deux composés, le facteur d'enrichissement isotopique noté ϵ est utilisé.

$$\epsilon = \alpha - 1 \quad \text{ou} \quad \epsilon = (\alpha - 1) \times 1000 \left[\frac{\text{‰}}{\text{‰}} \right]$$

Équation 5

Remarque : du fait de ses valeurs souvent faibles, dans la littérature, ϵ est souvent exprimé en ‰.

2.2.3. Variation de la composition isotopique du carbone dans la nature

Le carbone est présent dans nombre de composés chimiques sur terre, allant des composés organiques fortement réduits dans la biosphère jusqu'aux formes inorganiques fortement oxydées comme le CO₂ et les carbonates. Cette grande variété d'états d'oxydation, alliée à la diversité de formations géologiques, rend propice l'apparition de fractionnements isotopiques naturels. Ainsi, les variations de la composition isotopique du carbone dans la nature s'étendent sur une plage de 100 ‰, allant des carbonates lourds, présentant un $\delta^{13}\text{C}$ supérieur à +20 ‰, au méthane léger, ayant un $\delta^{13}\text{C}$ inférieur à -80 ‰ (Hoefs 1997).

Les deux principaux réservoirs de carbone terrestre, la matière organique et les carbonates sédimentaires, présentent des compositions isotopiques différentes dues à l'effet de deux processus de fractionnement isotopique distincts. Tout d'abord, des échanges isotopiques entre les différentes formes de carbone inorganique (CO₂ atmosphérique-bicarbonate dissous-carbonate solide) conduisent à un enrichissement en carbone 13 des carbonates (Mook, Bommerson et al. 1974). La composition isotopique de la matière organique, quant à elle, est influencée par les fractionnements isotopiques d'ordre cinétique, associés au transfert physique par diffusion du carbone inorganique au sein des cellules des plantes, ainsi qu'au mode de biosynthèse de l'organisme producteur de ces composés (Park et Epstein 1960). Ces fractionnements isotopiques conduisent à l'incorporation préférentielle du carbone 12 au sein des composés organiques. Le carbone organique est donc appauvri en carbone 13 par rapport au carbone inorganique source.

L'existence de ces deux mécanismes de fractionnement explique, en grande partie, les variations de composition isotopique observées au niveau de la matière organique. Ainsi, l'enrichissement en carbone 13 des molécules d'origine marine ($\delta^{13}\text{C}$ compris entre -13 ‰ et -27 ‰) par rapport à celles synthétisées par les plantes terrestres ($\delta^{13}\text{C}$ compris entre -22 ‰ et -33 ‰) s'explique par l'existence de l'équilibre chimique qui existe entre les carbonates et le CO_2 atmosphérique, favorisant la concentration en CO_2 enrichi en carbone 12 dans la phase gazeuse (Mook, Bommerson et *al.* 1974). En effet, le CO_2 atmosphérique actuel ($\delta^{13}\text{C} = -8$ ‰), source de carbone des plantes terrestres (photosynthèse), est alors appauvri en carbone 13 par rapport au carbone inorganique marin ($\delta^{13}\text{C} = 0$ ‰), présent sous forme de carbonate, utilisé par les algues. De nombreux paramètres biotiques et abiotiques (le pH, la température...), en modifiant les équilibres entre les différentes formes de carbone inorganique, compliquent les phénomènes. Par exemple, les eaux douces, généralement acides (pH compris entre 5 et 7), montrent une prédominance du CO_2 moléculaire et sont enrichies en carbone 12. Au contraire, les eaux marines, légèrement basiques (pH = 8,5), montrent une prédominance des carbonates.

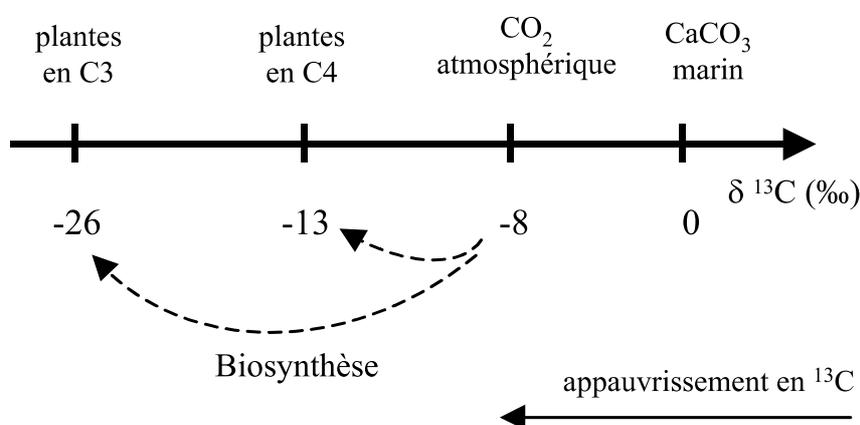


Figure 32 : Fractionnements isotopiques associés aux modes de biosynthèse de la matière organique - (Mazéas 2000).

Les fractionnements isotopiques associés aux différents modes de fixation du carbone et de biosynthèse de la matière organique, présentent des amplitudes variables permettant de remonter à l'origine biosynthétique de la matière organique. Les plantes dites en C4 (maïs), utilisant le cycle de Hatch-Slack ($\delta^{13}\text{C}$ compris entre -6 ‰ et -19 ‰), présentent un enrichissement en carbone 13 par rapport aux plantes en C3 (arbres et blé), utilisant le cycle de Calvin ($\delta^{13}\text{C}$ compris entre -24 ‰ et -34 ‰), car ces deux types de plantes utilisent des systèmes enzymatiques différents afin de fixer le carbone (Smith et Epstein 1971) (Figure 32).

De plus, au sein même d'une plante, le carbone 13 n'est pas uniformément réparti mais varie entre les hydrates de carbone, les protéines et les lipides (Park et Epstein 1960; Abelson et Hoering 1961). Les lipides sont par exemple appauvris en carbone 13 par rapport aux autres composés biochimiques.

La composition isotopique de la matière organique dépend, à la fois, de la composition isotopique de la source de carbone utilisée, des effets isotopiques associés au mode d'assimilation du carbone et des effets isotopiques dus au métabolisme ou au mode de biosynthèse. Le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ constitue ainsi un traceur d'origine et d'évolution de la matière organique (Wong et Sackett 1978). A titre d'exemple, Figure 33, sont représentées les compositions isotopiques de différents types de matières vivantes ainsi que celles rencontrées dans différents types de sédiments récents.

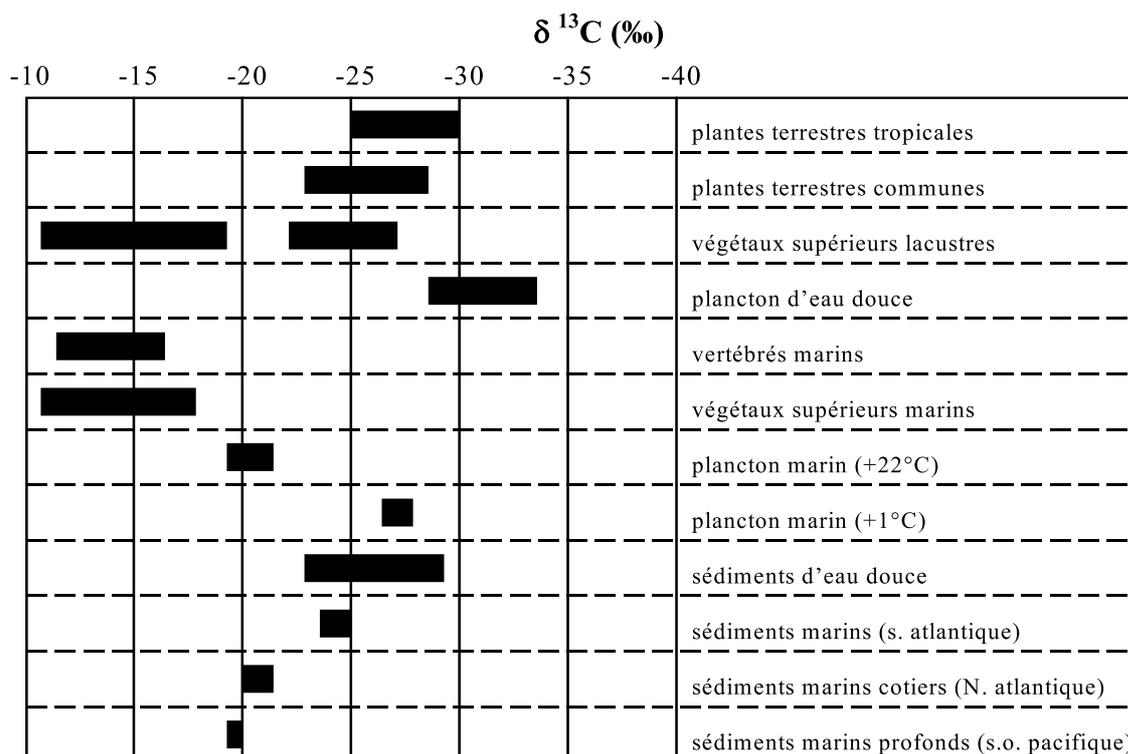


Figure 33 : Compositions isotopiques de différents types de matières vivantes et de différents types de sédiments récents - (Mazéas 2000).

2.3. Applications des isotopes stables

2.3.1. Contexte

Depuis le développement et la commercialisation de la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse isotopique vers la fin des années 1980 / début des années 1990, de multiples applications ont vu le jour dans des domaines très divers.

Ainsi, l'étude des variations isotopiques dues à des processus naturels a été particulièrement informative en sciences de la terre, en géochimie, en climatologie, en océanographie, en écologie, en archéologie, en recherche biomédicale De nombreuses applications utilisent aujourd'hui les mesures de composition isotopique comme outil en sciences de l'environnement. Ces applications incluent (i) la détermination des sources de contaminants de l'échelle locale à l'échelle globale ; (ii) l'identification et la quantification des réactions intervenant dans certains processus biologiques ou chimiques à des échelles allant de l'incubation de laboratoires à celle du site ; (iii) l'étude des mécanismes élémentaires (réactions intermédiaires) intervenant au cours de la formation d'un produit.

2.3.2. Quelques exemples d'applications

Afin d'illustrer les potentialités de l'utilisation des isotopes stables, deux exemples appartenant à des domaines distincts sont présentés plus en détails :

- **Contrôle anti-dopage :**

La mesure de la composition isotopique du carbone peut être utilisée pour déterminer si certaines molécules sont naturelles ou sont synthétisées artificiellement. Le développement de nouvelles méthodes de mesure en IRMS (Spectrométrie de masse isotopique) peut permettre de différencier la testostérone endogène, biosynthétisée par le sportif, de la testostérone exogène, utilisée comme agent dopant. La testostérone est une hormone sexuelle et sa structure chimique est donnée en Figure 34.

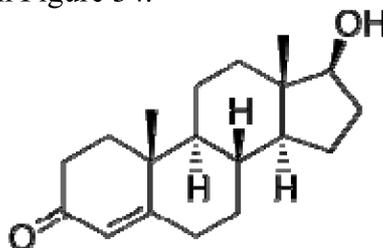


Figure 34 : Structure chimique de la testostérone.

La testostérone synthétique est préparée à base de stérols végétaux, ce qui conduit à un pourcentage de carbone ^{13}C différent de celui de la testostérone naturelle. La confirmation d'un dopage à la testostérone est généralement réalisée par la mesure de la composition isotopique en $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la testostérone ou de ses métabolites, qui apporte une preuve directe de l'origine exogène de la testostérone (Aguilera, Becchi et *al.* 1996).

- **"Thermomètre isotopique" :**

Les mesures de la composition isotopique de la glace piégée au niveau des pôles, permettent de déterminer la température qui régnait lors de la formation de cette dernière et donc d'étudier les changements climatiques s'étant produits dans le passé à la surface de la planète. Pour comprendre les fondements de cette approche nommée "thermomètre isotopique", il est nécessaire de débiter au niveau de l'eau océanique qui s'évapore pour former les masses nuageuses. Les molécules d'eau légères (contenant de l'hydrogène et de l'oxygène 16) s'évaporent plus facilement que les lourdes (contenant du deutérium de l'oxygène 17 ou 18). De ce fait, les molécules d'eau de la masse d'air humide sont enrichies en isotopes légers alors que les molécules d'eau de mer sont enrichies en isotopes lourds.

Après l'évaporation de l'eau, qui confère aux masses nuageuses ses caractéristiques isotopiques initiales, la masse d'air, transportée vers les pôles, va se refroidir au cours de son trajet et subir des phénomènes de condensation à l'origine des précipitations au fur et à mesure de sa migration. La vapeur d'eau s'enrichit donc en isotopes légers car les plus lourds sont préférentiellement emportés lors des précipitations. Plus la température est basse à la surface de la planète, plus les précipitations et donc les fractionnements isotopiques sont importants et plus la vapeur s'appauvrit en isotopes lourds. Ainsi, lors des périodes glaciaires, lorsque les températures étaient froides à la surface de la planète, les précipitations au niveau des pôles étaient particulièrement enrichies en isotopes légers, alors qu'en période de réchauffement climatique, cet enrichissement isotopique est moindre, comme l'illustre la figure 35. La composition isotopique de l'hydrogène et de l'oxygène de la glace dans la calotte polaire, dépend donc de la température qui régnait au moment de sa formation. En analysant la composition isotopique de la glace le long de carottes glacières prélevées au niveau des pôles, il est alors possible de retracer les évolutions climatiques à la surface du globe.

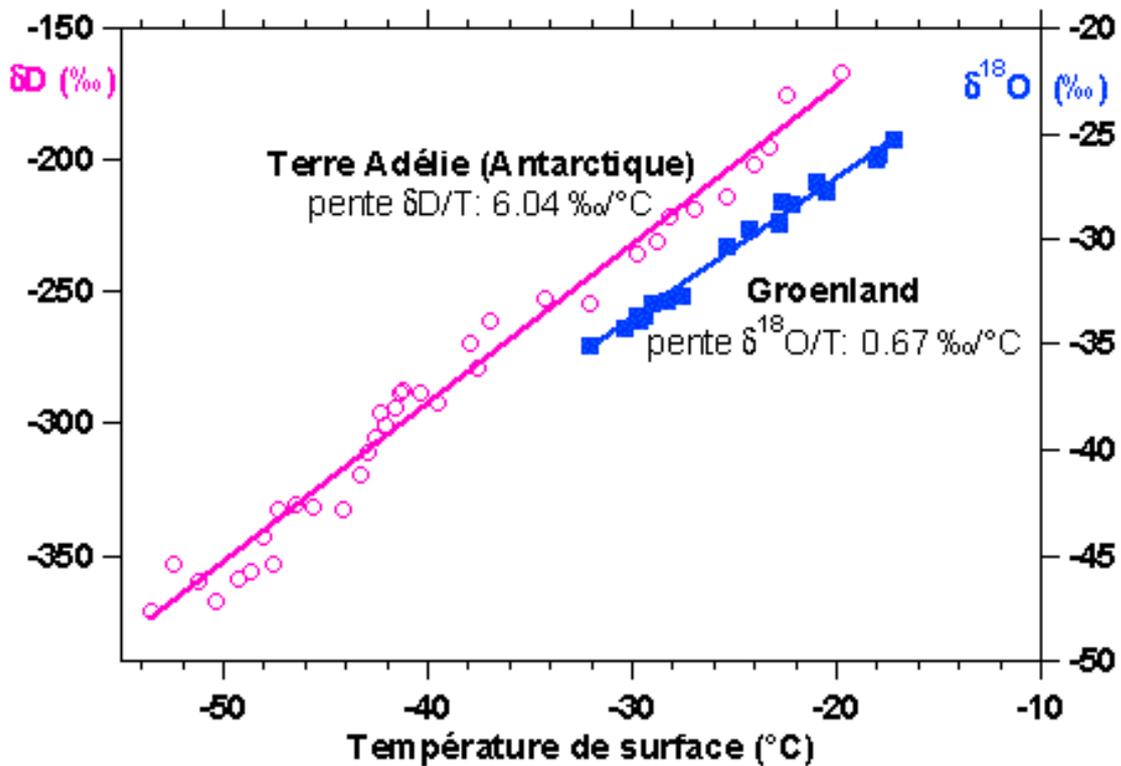


Figure 35 : "Thermomètre isotopique" - (Jouzel, Koster et al. 1994).

La comparaison de la composition de l'atmosphère (obtenue par l'analyse des bulles d'air piégées dans la glace) avec l'historique des températures ainsi obtenu a permis d'établir clairement le lien entre gaz à effet de serre et réchauffement climatique.

2.4. Applications pour l'étude de la méthanogénèse

2.4.1. Principe de l'approche isotopique permettant l'étude des environnements méthanogènes

Le méthane est produit lors de la biodégradation de la matière organique en condition anaérobie grâce à l'action de micro-organismes. La réaction de méthanogénèse peut être réalisée selon différentes voies métaboliques (hydrogénotrophe, acétoclaste, métylotrophe...) en fonction du substrat utilisé (CO_2/H_2 , acétate, méthanol...) et de certaines propriétés physico-chimiques.

Les réactions de méthanogénèse, comme la plupart des réactions biologiques, induisent des fractionnements isotopiques conduisant à l'enrichissement en isotope léger du produit de la réaction (méthane) et en isotope lourd du réactif (CO_2 , acétate, méthanol...). Ce fractionnement est dû au fait que les micro-organismes utilisent préférentiellement les molécules contenant l'isotope léger en raison du « coût » énergétique plus important associé à la cassure d'une liaison impliquant un isotope lourd. Ainsi, durant la méthanogénèse, le méthane s'enrichit en l'isotope léger (^{12}C) par rapport au substrat utilisé (CO_2 , acétate, méthanol...). Ces derniers se retrouvent donc enrichis en isotopes lourds (^{13}C). La Figure 36 illustre ce processus.



Figure 36 : Représentation du processus de fractionnement isotopique entre substrat et produit.

De plus, le méthane produit par méthanogénèse hydrogénotrophe présente une composition isotopique du carbone distincte de celle du méthane produit à partir d'acétate. Ces différences s'expliquent (i) par le fait que les substrats carbonés utilisés par les différentes voies métaboliques (CO_2 et acétate) présentent des compositions isotopiques différentes et (ii) par le fait que les voies métaboliques responsables de la méthanogénèse conduisent à des fractionnements isotopiques différents, comme l'illustre la Figure 37.

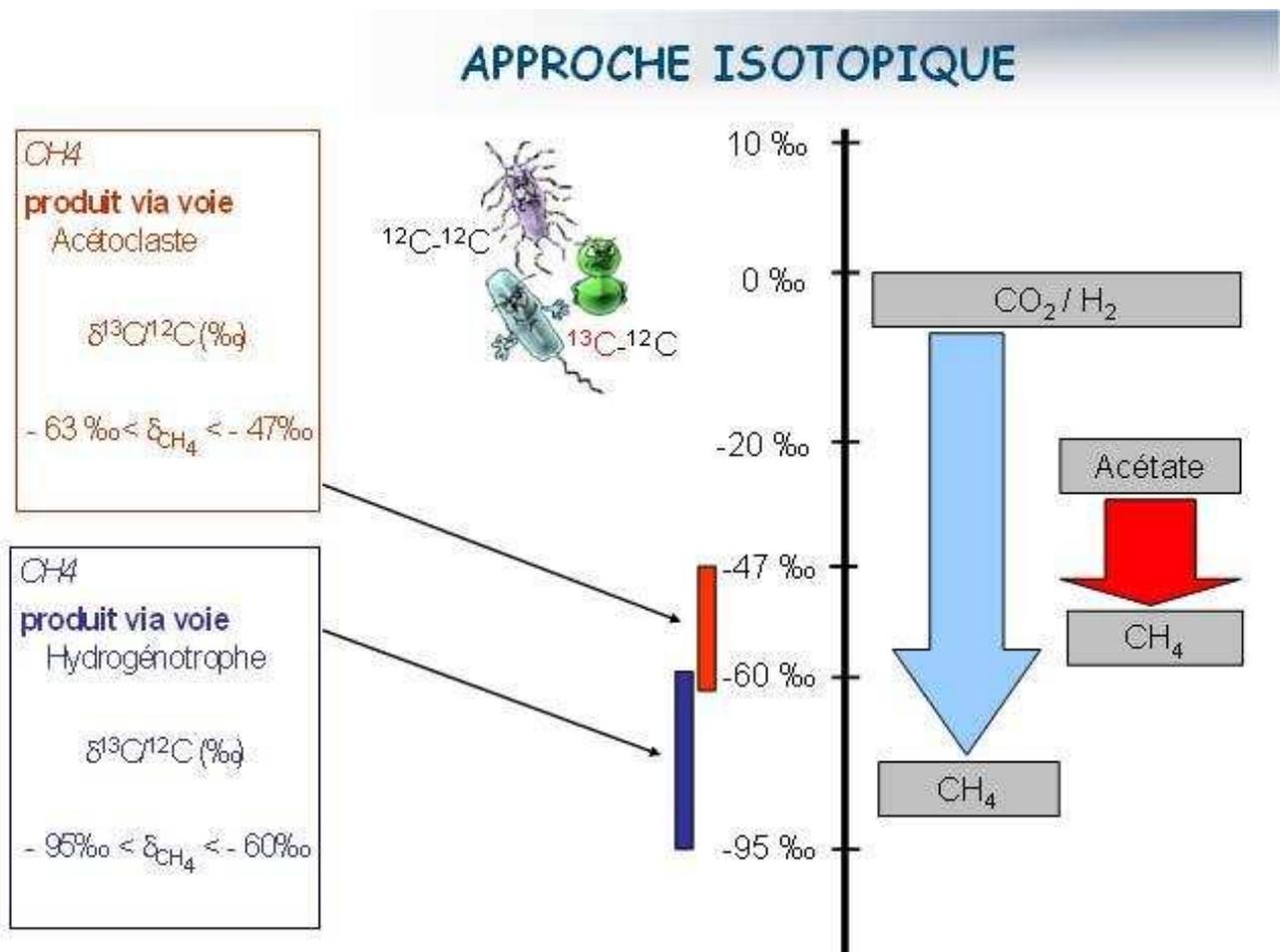


Figure 37 : Fractionnement isotopique des différentes voies métaboliques de la méthanogénèse. D'après (Whiticar, Faber et al. 1986)

Ainsi, le méthane produit par méthanogénèse hydrogénotrophe présente des compositions isotopiques pour le carbone comprises entre -60‰ et -95‰ , alors que dans le cas du méthane produit à partir d'acétate, la composition isotopique du carbone est comprise entre -47‰ et -63‰ (Whiticar, Faber et al. 1986).

2.4.2. Facteurs de fractionnements isotopiques des voies métaboliques de la méthanogénèse

2.4.2.1. Détermination à partir d'incubations en cultures pures

Le Tableau 18 regroupe les valeurs de facteurs de fractionnements isotopiques déterminées en cultures pures de méthanogènes pour les différentes voies métaboliques méthanogènes.

Tableau 18 : Facteurs de fractionnement en cultures pures – d'après (Conrad 2005).

Réaction	Micro-organismes	T (°C)	α	Référence
Méthanogénèse hydrogénotrophe	<i>Methanosarcina barkeri</i>	40	1,045	(Games, HayesRobert et al. 1978)
	<i>M. barkeri</i> strain MS	36	1,046	(Krzycki, Kenealy et al. 1987)
	<i>Methanobacterium</i> strain MoH	40	1,061	(Games, HayesRobert et al. 1978)
	<i>M. thermoautotrophicum</i>	65	1,025	(Games, HayesRobert et al. 1978)
	<i>M. thermoautotrophicum</i>	65	1,034	(Fuchs, Thauer et al. 1979)
	<i>M. fromicicum</i>	34	1,048	(Balabane, Galimov et al. 1987)
	<i>M. fromicicum</i> strain 41 (basse teneur en H ₂)	?	1,069	(Zyakun, Bondar et al. 1988)
	<i>M. fromicicum</i> strain 41 (haute teneur en H ₂)	?	1,021	(Zyakun, Bondar et al. 1988)
	<i>Methanobacterium</i> strain ivanov	37	1,034	(Belyaev, Wolkin et al. 1983)
	<i>Methanobacterium</i> strain ivanov	46	1,032	(Belyaev, Wolkin et al. 1983)
	<i>Methanococcus vanielii</i>	35	1,071	(Botz, Pokojski et al. 1996)
	<i>M. thermolithotrophicus</i>	45	1,064	(Botz, Pokojski et al. 1996)
	<i>M. thermolithotrophicus</i>	55	1,066	(Botz, Pokojski et al. 1996)
	<i>M. thermolithotrophicus</i>	65	1,059	(Botz, Pokojski et al. 1996)
	<i>M. igneus</i>	85	1,057	(Botz, Pokojski et al. 1996)
	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> (310 Pa H ₂)	65	1,064	(Valentine, Chidthaisong et al. 2004)
	<i>M. marburgensis</i> (80 kPa H ₂)	65	1,031	(Valentine, Chidthaisong et al. 2004)
	Isolement à partir de sol de rizière (<i>Methanobacterium</i> spp.)	30	1,050	(Chidthaisong, Chin et al. 2002)
	Isolement à partir de racine de riz (<i>Methanospirillum</i> spp.)	30	1,057	(Chidthaisong, Chin et al. 2002)
Méthanogénèse méthylotrophe (à partir du méthanol)	<i>M. barkeri</i> strain MS	37	1,074	(Krzycki, Kenealy et al. 1987)
	Isolement à partir de sédiment marin	30	1,081	(Rosenfeld et Silverman 1959)
	Isolement à partir de sédiment marin	23	1,094	(Rosenfeld et Silverman 1959)
	Isolement à partir de sédiment marin et de boues	30	1,077	(Heyer, Hübner et al. 1976)
	Isolement à partir du "Big Soda Lake", Nevada	20	1,074	(Oremland, Marsh et al. 1982)
Méthanogénèse méthylotrophe (à partir du tri- méthyle-amine)	<i>M. barkeri</i>	37	1,050	(Summons, Franzmann et al. 1998)
	<i>Methanococcoides burtonii</i>	20	1,071	(Summons, Franzmann et al. 1998)

Tableau 18 : Suite.

Réaction	Micro-organismes	T (°C)	α	Référence
Méthanogenèse acétoclaste	<i>M. barkeri</i> strain MS	37	1,021	(Krzycki, Kenealy et al. 1987)
	<i>Methanosarcina</i> strain 47	?	1,027	(Zyakun, Bondar et al. 1988)
	<i>M. barkeri</i> strain 227	37	1,021	(Gelwicks, Risatti et al. 1994)
	<i>Methanosaeta concilii</i>	?	1,018	(Chidthaisong et al., pers. comm.)
	<i>Methanosaeta concilii</i> (acétate)	37	1,013	(Penning, Claus et al. 2006c)
	<i>Methanosaeta concilii</i> (acétate méthyle)	37	1,010	(Penning, Claus et al. 2006c)
	<i>Methanosaeta thermophila</i> strain CALS-1	61	1,007	(Valentine, Chidthaisong et al. 2004)
	Isolement à partir de sédiment marin et de boues	30	1,019 1,030*	(Heyer, Hübner et al. 1976)
	<i>M. barkeri</i> (acétate)	30	1,017** 1,025*	(Goevert et Conrad 2009)
	<i>M. barkeri</i> (acétate méthyle)	30	1,011** 1,035*	(Goevert et Conrad 2009)
	<i>M. acetivorans</i> (acétate)	37	1,025** 1,024*	(Goevert et Conrad 2009)
	<i>M. acetivorans</i> (acétate méthyle)	37	1,014**	(Goevert et Conrad 2009)

* Pour la phase de consommation du substrat comprise entre 0 et 50 %;

** Pour la phase de consommation du substrat comprise entre 50 et 80 %.

Les facteurs de fractionnement associés à la méthanogenèse hydrogénotrophe sont compris entre 1,021 et 1,071 (Conrad 2005). Le facteur de fractionnement isotopique associé à un type de réaction n'est donc pas constant et peut varier en fonction de l'espèce de micro-organisme et de paramètres tels que, la température ou la concentration en hydrogène du milieu. Il a été montré récemment (Penning, Plugge et al. 2005) que ce dernier paramètre pouvait avoir un effet non négligeable sur le facteur de fractionnement isotopique associé à la voie hydrogénotrophe. A des teneurs en hydrogène importantes, les facteurs de fractionnement mesurés sont beaucoup plus faibles (pouvant être du même ordre que ceux associés à la voie acétoclaste) qu'à des teneurs en hydrogène plus faibles. En effet, il semblerait que de faibles concentrations en hydrogène entraînent un fractionnement isotopique plus important entre le méthane (produit) et le dioxyde de carbone (substrat). Ce phénomène serait lié aux propriétés de réversibilités des étapes de la méthanogenèse hydrogénotrophe. En effet, dans un environnement contenant une importante quantité d'H₂, la réversibilité des réactions serait plus importante et diminuerait le fractionnement isotopique associé (Valentine, Chidthaisong et al. 2004). L'étendue de la plage des facteurs de fractionnement mesurés pour la voie hydrogénotrophe, pourrait ainsi s'expliquer par le fait que les différentes expériences au cours desquelles ils ont été déterminés aient été réalisées à des teneurs en hydrogène différentes. Ces variations masquent généralement l'effet de la température sur les facteurs de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe. De ce fait, seules des données issues de cultures réalisées à différentes températures et à même pression partielle en hydrogène, peuvent permettre de mettre en évidence l'effet de la température sur les facteurs de fractionnement. Une décroissance du facteur de fractionnement isotopique de la méthanogenèse hydrogénotrophe de 0,0025 unité tous les 10°C d'augmentation de la température, a été mise en évidence (Botz, Pokojski et al. 1996) lors d'expériences réalisées sur des méthanogènes de l'ordre *Methanococcales* entre 35 et 85°C.

Les facteurs de fractionnement associés à la méthanogenèse acétoclaste s'étendent, quant à eux, dans une gamme plus restreinte que ceux de la voie hydrogénotrophe puisqu'ils sont compris entre 1,007 et 1,035. Des différences de fractionnements isotopiques entre

Methanosarcina et *Methanosaeta* ont été mises en évidence. Les facteurs de fractionnement isotopique engendrés par la méthanogenèse acétoclaste réalisée par *Methanosarcina barkeri* sont compris entre 1,021 et 1,030 (Krzycki, Kenealy et al. 1987; Zyakun, Bondar et al. 1988; Gelwicks, Risatti et al. 1994), et ceux relatifs à *Methanosarcina acetivorans* sont compris entre 1,014 et 1,035 (Goevert et Conrad 2009). Ceux associés aux membres du genre *Methanosaeta* sont plus faibles puisqu'il est de 1,007 pour *Methanosaeta thermophila* (Valentine, Chidthaisong et al. 2004) et de 1,010 pour *Methanosaeta concilii* (Penning, Claus et al. 2006c). Il a été suggéré que cette différence pourrait être due à des différences au niveau de l'activation biochimique de l'acétate en acétyl-CoA (Valentine, Chidthaisong et al. 2004; Penning, Claus et al. 2006c). Cependant, les données isotopiques concernant les méthanogènes acétoclastes sont rares. Les données pour *Methanosarcina* sont issues de l'espèce *M. barkeri* et récemment d'une seconde espèce *M. acetivorans* (Goevert et Conrad 2009).

La comparaison des valeurs des fractionnements isotopiques associés à la méthanogenèse hydrogénotrophe (compris entre 1,021 et 1,071) avec ceux associés à la méthanogenèse acétoclaste (compris entre 1,007 et 1,035), fait apparaître une légère zone de chevauchement. Toutefois, les expériences présentant des facteurs de fractionnement hydrogénotropes faibles sont peu nombreuses et certaines sont réalisées sous fortes concentrations en dihydrogène. Il est donc envisageable que le minimum de 1,021 de la zone hydrogénotrophe puisse être un artefact et qu'en conditions classiques (faibles concentrations en hydrogène) cette limite ne se situe pas en réalité aussi bas. L'analyse des valeurs des fractionnements isotopiques associés à la méthanogenèse hydrogénotrophe et acétoclaste issues du Tableau 18, permet ainsi de mettre en évidence que la distinction entre ces deux métabolismes est généralement possible.

Cependant, lors de la production du méthane par méthanogenèse méthylotrophe à partir de méthanol ou de triméthylamine, des facteurs de fractionnement élevés (compris entre 1,050 et 1,094) sont observés. Il peut donc être difficile de différencier le méthane produit par la méthanogenèse hydrogénotrophe et méthylotrophe. Ce risque reste cependant relativement faible, car la production de méthane par méthanogenèse méthylotrophe n'est significative que dans certains environnements particuliers tels que les environnements salins par exemple (Oremland 1988). Dans les environnements d'eau douce, il n'a pas été mis en évidence que les méthylotropes puissent jouer un rôle majeur (Lovley et Klug 1983; Conrad et Claus 2005).

2.4.2.2. Inoculum complexe

Des études réalisées sur différents inocula complexes provenant d'environnements méthanogènes, permettent de déterminer les facteurs de fractionnements associés aux différentes voies métaboliques. Dans ces études, la détermination des facteurs de fractionnements se fait par :

- Inhibition de l'une des voies métaboliques
Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques comme le CH_3F , il est possible d'inhiber spécifiquement la méthanogenèse acétoclaste (Frenzel et Bosse 1996; Janssen et Frenzel 1997; Conrad et Klose 1999). Cependant l'utilisation d'un tel composé est relativement complexe car, au delà d'un certain seuil, la méthanogenèse hydrogénotrophe commence également à être inhibée (Conrad et Klose 1999).

- Stimulation de l'une des voies métaboliques

La stimulation de la voie métabolique étudiée est obtenue avec l'apport du substrat utilisé par la voie visée. Cependant, cette méthode ne garantit pas que seule la voie métabolique à étudier soit utilisée, ce qui pourrait biaiser la détermination du facteur de fractionnement (Conrad 2005).

- Identification des archées présentes (analyse microbiologique)

L'identification des micro-organismes présents et actifs pendant la production de méthane, peut permettre de déterminer la nature du métabolisme méthanogène se produisant. Toutefois, cette approche n'est pas applicable à certains micro-organismes comme les membres de la famille *Methanosarcinaceae* qui sont capables d'utiliser plusieurs voies métaboliques pour la production de méthane (Ferry 1993).

- Calcul

L'approche calculatoire procède par comparaison avec des résultats expérimentaux obtenus lors d'expériences réalisées précédemment, ou avec inhibiteurs ou éléments marqués pour connaître l'importance relative de chacune des voies.

Le Tableau 19 donne un aperçu des différentes valeurs déterminées pour chacune des voies par des inocula complexes.

Tableau 19 : Facteurs de fractionnement déterminés pour différents inocula.

Environnement	α acétoclaste	Référence	Méthode
Sédiments (lac Dagow, Allemagne)	1,013	(Penning, Claus et al. 2006c)	microbiologie
Sédiments (Baie, Caroline du nord)	1,032-1,036	(Blair et Carter Jr 1992)	calcul

Environnement	α hydrogénéotrophe	Référence	Méthode
Sol et racines (rizière, Californie)	1,050-1,057	(Chidthaisong, Chin et al. 2002)	stimulation
Sol (rizière, Italie)	1,073	(Fey, Claus et al. 2004)	stimulation
Sol (rizière, Italie)	1,070	(Conrad, Klose et al. 2002)	calcul
Sol (rizière, Texas)	1,060	(Tyler, Bilek et al. 1997)	calcul
Marais (tourbière, Buck Hollow, Michigan)	1,069	(Avery Jr, Shannon et al. 1999)	calcul
Marais (Kings lake)	1,073	(Lansdown, Quay et al. 1992)	calcul
Sol (rizière, Italie)	1,043-1,072	(Penning et Conrad 2007)	inhibition
Sol (rizière, Italie)	1,060-1,070	(Conrad 2005)	stimulation
Sol (rizière, Italie)	1,072	(Conrad 2005)	inhibition
Sédiments (lac Dagow, Allemagne)	1,060-1,070	(Conrad 2005)	stimulation
Sédiments (lac Dagow, Allemagne)	1,088-1,094	(Conrad 2005)	inhibition
Sédiments (lac Kinneret, Israël)	1,055-1,065	(Conrad 2005)	stimulation
Sédiments (lac Plußsee, Allemagne)	1,085-1,090	(Conrad 2005)	stimulation

Les valeurs obtenues (Tableau 19) permettent de valider l'intérêt de l'utilisation de l'approche isotopique pour l'étude des environnements méthanogènes puisque que les facteurs de fractionnement isotopique associés au métabolisme acétoclaste (1,013 à 1,036) et hydrogénéotrophe (1,043 à 1,094) sont différents.

2.4.3. Etude des environnements naturels "méthanogènes"

La détermination de la composition isotopique du méthane produit dans différents environnements méthanogènes au sein desquels a lieu la digestion anaérobie de la matière organique a permis d'identifier les voies métaboliques mises en jeu au sein de ces différents écosystèmes. La Figure 38 représente schématiquement les flux de carbone pendant ce processus. Lorsque des mesures de composition isotopique sont réalisées dans le biogaz produit dans un environnement méthanogène complexe, les valeurs obtenues correspondent à la moyenne pondérée des compositions isotopiques associées à chacune des voies métaboliques utilisées.

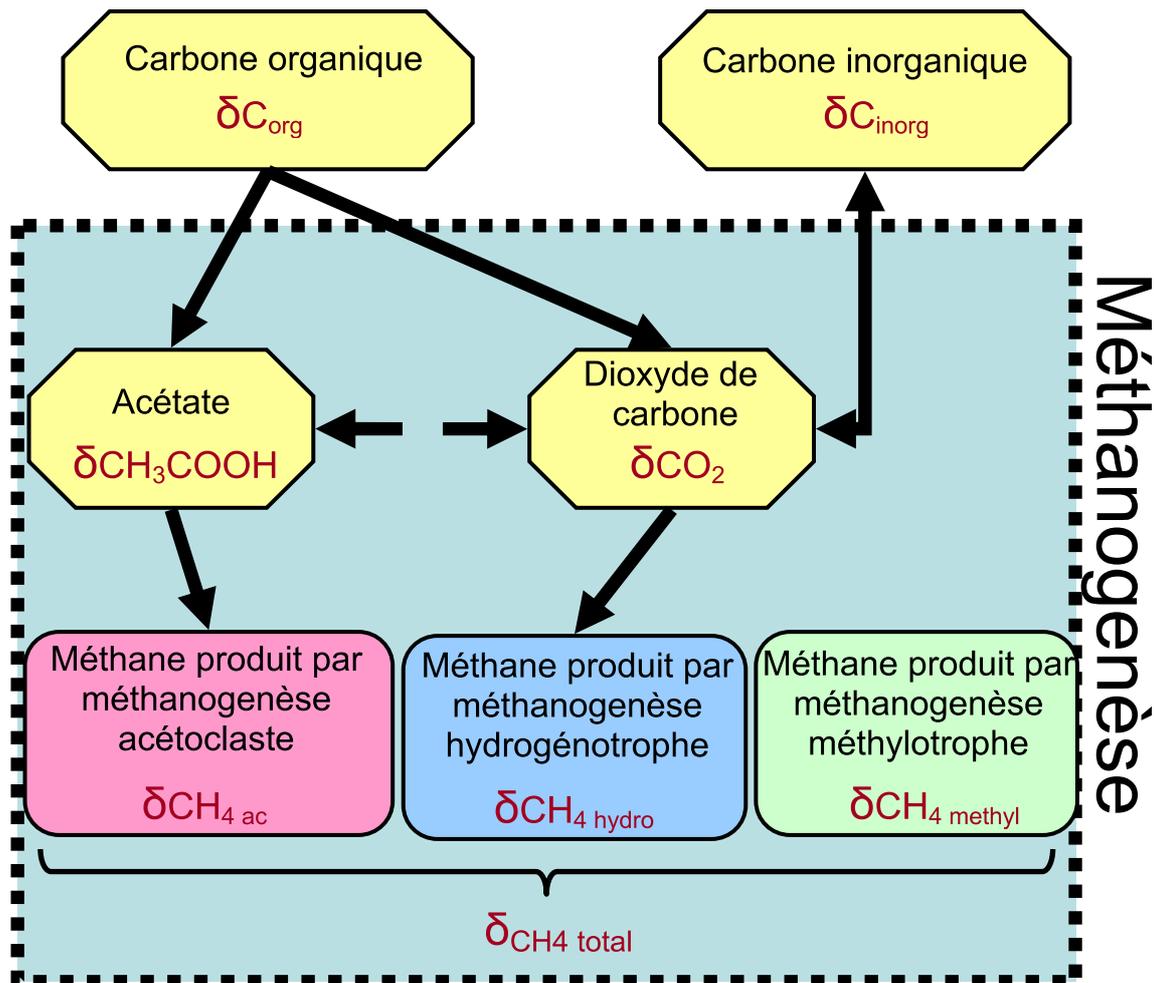


Figure 38 : Représentation schématique de l'approche isotopique permettant de déterminer la contribution des différentes voies métaboliques dans la production de méthane.

Il est possible de remonter aux contributions relatives du méthane produit par voie acétoclaste et hydrogénotrophe (si ce sont les seuls mécanismes intervenants) à partir des mesures des signatures isotopiques du méthane, du dioxyde de carbone et du groupement méthyle de l'acétate, ainsi que des facteurs de fractionnements acétoclaste et hydrogénotrophe associés à l'environnement étudié, dans les conditions étudiées. Cette approche, ainsi que ses limites, sont présentées de façon détaillée dans une publication récente (Conrad 2005).

La contribution du méthane produit par méthanogenèse hydrogénotrophe peut être déterminée en utilisant l'équation suivante :

$$f_{\text{hydrogénotrophe}} = (\delta_{\text{CH}_4} - \delta_{\text{CH}_4\text{-acétoclaste}}) / (\delta_{\text{CH}_4\text{-acétoclaste}} - \delta_{\text{CH}_4\text{-hydrogénotrophe}})$$

Équation 6

$f_{\text{hydrogénotrophe}}$ est la fraction de méthane produit par méthanogenèse hydrogénotrophe ;

δ_{CH_4} , la composition isotopique du méthane totale ;

$\delta_{\text{CH}_4\text{-acétoclaste}}$ et $\delta_{\text{CH}_4\text{-hydrogénotrophe}}$ sont les compositions isotopiques du méthane provenant respectivement de l'acétate et du H_2/CO_2 . Il est possible de déterminer ces valeurs en connaissant la composition isotopique du substrat et le facteur de fractionnement associé à la réaction à l'aide de l'Équation 4.

Cependant, les données nécessaires à la réalisation de ces calculs ne sont que parcellaires pour la majorité des environnements méthanogènes. Ainsi, par exemple, les données expérimentales, particulièrement celles concernant le groupement méthyle de l'acétate, sont rares. Pourtant, l'utilisation des mesures de composition isotopique de l'acétate total (moyenne des deux atomes de carbone) n'est pas aussi pertinente que celle du groupement méthyle, car c'est ce dernier qui est transformé en méthane et que le $\delta^{13}\text{C}$ du groupe carboxyle de l'acétate et celui de son groupement méthyle peuvent être différents de plus de 14 ‰ (Blair et Carter Jr 1992; Sugimoto et Wada 1993). En ce qui concerne les facteurs de fractionnement associés à un type de méthanogenèse particulier, les valeurs mesurées sur des échantillons de l'environnement restent dans la gamme de celles déterminées sur cultures pures mais sont peu nombreuses (particulièrement pour la voie acétoclaste) (cf. paragraphe précédent).

Toutefois, sans aller jusqu'à la quantification de la part relative de chacune des voies métaboliques de la méthanogenèse, il est possible d'utiliser les mesures de composition isotopiques pour identifier les voies métaboliques dominantes. Cette approche, déjà utilisée dans plusieurs études, permet de déterminer le métabolisme dominant ainsi que de suivre de façon semi quantitative l'évolution de sa contribution au cours du temps (Sugimoto et Wada 1993; Conrad, Klose et al. 2002; Nusslein, Eckert et al. 2003; Fey, Claus et al. 2004; Chan, Claus et al. 2005). Cependant, lors de la production de méthane non spécifique (mélange de métabolismes), les valeurs peuvent s'étendre sur une gamme relativement large et, en fonction des paramètres de l'expérience ou des zones de prélèvements, osciller entre les gammes acétoclaste et hydrogénotrophe. Par exemple, une étude sur des sols de marais donne des compositions isotopiques du méthane comprises entre -46 ‰ à -79 ‰ soit des facteurs de fractionnement apparent compris entre 1,028 et 1,075 (cf. Équation 16) ce qui signifie que le métabolisme de production du méthane passe d'acétoclaste à hydrogénotrophe (Hornibrook, Longstaffe et al. 2000). Aussi, lorsque les valeurs recouvrent les deux zones métaboliques de production du méthane (acétoclaste et hydrogénotrophe), l'interprétation des données devient alors cruciale pour identifier les évolutions métaboliques.

L'approche isotopique a également été utilisée pour étudier l'influence de certains paramètres sur la mise en place des voies métaboliques dans différentes études associées à des thématiques diverses. L'effet de la profondeur dans certains milieux anaérobies, a été étudié à l'aide des signatures isotopiques qui ont permis de révéler des modifications de métabolisme en fonction de la profondeur et/ou du pH (Kotsyurbenko, Chin et al. 2004; Koschorreck, Wendt-Potthoff et al. 2008). L'effet de la température sur les voies métaboliques méthanogènes, a également été étudié grâce aux mesures de composition isotopique dans des incubations de sol de rizière. Cette étude réalisée en 2003 a mis en évidence une modification des voies métaboliques entre 10-37°C (majoritairement acétoclaste) et 50°C (majoritairement hydrogénotrophe) grâce aux mesures de composition isotopique (Fey, Claus et al. 2004). Ce

résultat est confirmé dans une étude récente, ou pour des températures inférieures à 40°C, le méthane est produit par un mélange de métabolismes (acétoclaste et hydrogénotrophe) alors que lorsque la température est supérieure à 40°C, le métabolisme est exclusivement hydrogénotrophe (Conrad, Klose et *al.* 2009).

L'approche isotopique est un outil permettant d'étudier les modifications des voies métaboliques de la méthanogenèse utilisées lors de la production du méthane. Elle permet notamment de mettre en évidence des modifications de métabolisme induites par des changements de paramètres environnementaux dans les environnements anaérobies naturels, approche qui devrait être extrapolable à l'étude de la digestion anaérobie des déchets.

2.4.4. Etude de la méthanogenèse dans les procédés de traitement des déchets

A ce jour, l'utilisation de la biogéochimie des isotopes stables pour l'étude de la digestion anaérobie, reste une potentialité très faiblement exploitée. En effet, alors que les nombreuses études réalisées ces dernières années sur les environnements méthanogènes naturels ont montré tout l'intérêt de ces approches, elles n'ont pas encore été réellement utilisées pour l'étude des systèmes anaérobies artificiels que sont les ISD et les méthaniseurs de déchets industriels. Les rares applications à ces installations sont présentées ci-dessous.

2.4.4.1. Mesure de la composition isotopique des effluents d'ISD

Des mesures de la composition isotopique du carbone dans le biogaz produit lors de la dégradation des déchets en ISD, ont été réalisées relativement rapidement après l'émergence des techniques couplant spectrométrie de masse isotopique et chromatographie en phase gazeuse (Games et Hayes 1977). Par la suite, d'autres auteurs (Liu, Hackley et *al.* 1992; Coleman, Liu et *al.* 1993; Nozhevnikova, Lifshitz et *al.* 1993; Bergamaschi, Schupp et *al.* 1994; Bergamaschi et Harris 1995; Hackley, Liu et *al.* 1996; Bergamaschi, Lubina et *al.* 1998) ont également réalisé des mesures sur des échantillons comparables. Ces mesures ont permis de délimiter une gamme de valeurs de la composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone produit dans les installations de stockage de déchets.

2.4.4.1.1. Méthane

Les compositions isotopiques du méthane mesurées dans les biogaz prélevés sur plusieurs ISD, sont comprises entre -42 ‰ et -61 ‰ (Liu, Hackley et *al.* 1992; Coleman, Liu et *al.* 1993; Hackley, Liu et *al.* 1996). Ces valeurs isotopiques sont similaires à celles mesurées dans les environnements d'eaux douces peu profondes (Whiticar, Faber et *al.* 1986) mais sont bien distinctes de celles des autres sources de production comme le méthane d'origine thermogénique (Coleman, Liu et *al.* 1993).

2.4.4.1.2. Dioxyde de carbone

En ce qui concerne le dioxyde de carbone, celui provenant du biogaz des ISD présente également une signature distincte de celui provenant d'autres sources. En effet, une fois que la méthanogenèse s'est mise en place, la composition isotopique du dioxyde de carbone provenant de l'ISD va être fortement enrichie. Les compositions isotopiques du dioxyde de carbone mesurées dans les biogaz prélevés sur plusieurs ISD sont comprises entre -7 ‰ et + 20 ‰, avec une majorité comprises entre +1 ‰ et +20 ‰ (Games et Hayes 1977; Baedecker et Back 1979; Hackley, Liu et *al.* 1996). Les valeurs les plus faibles semblent pouvoir s'expliquer par la mise en place d'une réaction d'oxydation du méthane, ou sont liées à l'état de maturité du massif de déchets.

2.4.4.1.3. Carbone inorganique

Quelques mesures de la composition isotopique du carbone inorganique dans les lixiviats ont également été réalisées sur des lixiviats d'ISD. Ces valeurs sont comprises entre -5,1 ‰ pour les parties ou casiers les plus récents et +15 à +22 ‰ pour les parties plus anciennes (Hackley, Liu et *al.* 1996). Les autres mesures réalisées sont cohérentes avec ces résultats (van Breukelen, Roling et *al.* 2003; Mohammadzadeh, Clark et *al.* 2005; North, Frew et *al.* 2006).

Les principaux résultats découlant directement de ces analyses semblent indiquer qu'il devrait être possible de mettre en évidence, grâce aux approches isotopiques, des contaminations de l'environnement en provenance des ISD. En effet, les composants principaux du biogaz, générés lors de la digestion anaérobie des déchets (CH₄ et CO₂), ont des compositions isotopiques relativement distinctes de celles du méthane et du dioxyde de carbone produits dans les sols et les sédiments, par exemple (Hackley, Liu et *al.* 1996).

2.4.4.1.4. Carbone organique

Des mesures de la composition isotopique du carbone organique dissous, de l'acétate et du propionate dans les lixiviats ont été réalisées sur des lixiviats d'ISD. Ces valeurs sont comprises entre -16,9 ‰ et -10,7 ‰ pour le carbone organique, entre -28,8 ‰ et -17,5 ‰ pour l'acétate et entre -20,6 ‰ et -19,3 ‰ pour le propionate (Mohammadzadeh, Clark et *al.* 2005).

2.4.4.2. Identification des voies métaboliques lors de la digestion anaérobie

Rares sont les études qui ne font plus qu'évoquer simplement les possibilités d'identifier le métabolisme utilisé lors de la formation du méthane au sein des procédés anaérobies de traitement des déchets.

2.4.4.2.1. Métabolisme de la méthanogenèse

Waldron et *al.* ont utilisé un inoculum provenant de déchets âgés de 6 semaines d'ISD lors d'expériences centrées sur les mesures de composition isotopique du carbone du méthane, du dioxyde de carbone et de l'acétate, dans le but d'identifier le métabolisme responsable de la formation de méthane à partir de butyrate (Waldron, Watson-Craik et *al.* 1998). La composition isotopique du méthane produit est d'abord (jours 22 à 58) caractéristique d'une production par méthanogenèse hydrogénotrophe, puis le métabolisme semble se modifier (jours 78 à 85) car le $\delta^{13}\text{C}$ devient caractéristique de la méthanogenèse acétoclaste. L'utilisation des mesures de la composition isotopique du biogaz d'ISDND a également été testée comme paramètre, en vue de la modélisation des processus de formation du méthane dès 1996 (Bogner, Sweeney et *al.* 1996). Ces travaux ont mené à la conclusion que, l'utilisation des mesures de composition isotopique pouvait être utile pour déterminer les contributions relatives des différents processus (méthanogenèse acétoclaste, méthanogenèse hydrogénotrophe, oxydation directe de la matière organique en CO₂ et oxydation du méthane).

Plus récemment des travaux préliminaires à ceux présentés dans ce manuscrit, réalisés par Xian Qu au Cemagref d'Antony, ont permis d'investiguer les potentialités de la mesure de la composition isotopique du biogaz lors de la digestion anaérobie de différents types de déchets ménagers. Les premiers résultats obtenus sur la succession des métabolismes pendant la dégradation de déchets lors d'incubations en condition saturée à température mésophile, ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'approche isotopique.

En effet, en conditions mésophiles, il a été mis en évidence que pendant la dégradation de déchets ménagers reconstitués, la signature isotopique du méthane ($\delta^{13}\text{C CH}_4$) diminue initialement jusqu'à -69,5 ‰, suggérant que le méthane est alors produit à partir du dioxyde de carbone et de l'hydrogène. Quand la production active de méthane commence, le $\delta^{13}\text{C}$ du CH_4 augmente jusqu'à -23,8 ‰, ce qui indique que le méthane est alors produit par méthanogenèse acétoclaste. Enfin, le $\delta^{13}\text{C}$ du CH_4 décroît et reste autour de -55 ‰, indiquant que la part de méthanogenèse acétoclaste diminue finalement à un niveau similaire à celui de la voie hydrogénotrophe (pendant la phase finale de production lente de méthane) (Qu, Mazéas et al. 2008). Certains de ces résultats ont été utilisés pour la modélisation de la digestion anaérobie (Qu, Mazéas et al. 2008; Vavilin, Qu et al. 2008; Qu, Vavilin et al. 2009).

Enfin, très récemment, Keppler et al. ont comparé les performances d'une technique de mesure optique et de la technique de mesure par GC-IRMS de la composition isotopique du méthane, en vue d'application à l'acquisition de données en continue sur digesteur anaérobie (Keppler, Laukenmann et al. 2010).

2.4.4.2.2. Oxydation du méthane

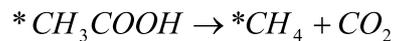
Si les travaux de recherches utilisant les isotopes stables pour l'étude des réactions de méthanogenèse lors de la dégradation de déchets restent très peu nombreux, ce n'est pas le cas de l'étude des phénomènes d'oxydation du méthane (généralement observés en couverture d'ISD). En effet, l'approche isotopique a, dans ce domaine, été très utilisée et l'est encore aujourd'hui (Bogner, Sweeney et al. 1996; Liptay, Chanton et al. 1998; Chanton, Rutkowski et al. 1999; Chanton et Liptay 2000; Nozhevnikova, Glagolev et al. 2003; Van Breukelen et Griffioen 2004; Börjesson, Samuelsson et al. 2007; Chanton, Powelson et al. 2008; Chanton, Powelson et al. 2008; Mahieu, De Visscher et al. 2008; Cabral, Capanema et al. 2010). L'enrichissement isotopique (ϵ_{CH_4}) généralement observé lors de l'oxydation (aérobie) du méthane est compris entre 5 et 31 pour mille (Whiticar 1999). La mesure de la composition isotopique des émissions diffuses de méthane à la surface de la couverture, peut permettre ainsi de quantifier l'importance du phénomène d'oxydation. Un des objectifs est l'estimation des flux de méthane émis dans l'atmosphère et donc des émissions de GES des ISDND.

2.4.5. Points spécifiques : utilisation de substrats marqués

Comme nous venons de le voir, l'étude de l'évolution de la composition isotopique du carbone pendant la digestion anaérobie, particulièrement pendant l'étape de méthanogenèse, permet d'aller plus loin dans l'identification et la compréhension des réactions qui conduisent à la production de méthane. Toutefois, dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire d'utiliser la technique du marquage isotopique pour vérifier certaines hypothèses et lever certaines incertitudes du fait d'interprétations complexes des données naturelles.

Cette technique consiste à utiliser des substrats marqués par enrichissement en carbone 13. Il est alors possible d'identifier la voie de dégradation du composé étudié en mettant en évidence la présence d'intermédiaires réactionnels, eux-mêmes marqués, spécifiques de telle ou telle voie. Il est également possible d'utiliser un substrat enrichi de manière distincte sur certains de ses atomes de carbones. Cette méthode permet d'identifier précisément la voie métabolique et les groupements fonctionnels utilisés lors des réactions étudiées. Le choix des fonctions enrichies de la molécule doit se faire en fonction des connaissances des réactions de dégradation et pour répondre à une ou plusieurs questions relativement spécifiques. Par exemple, l'utilisation d'acétate enrichi uniquement sur le groupement méthyle peut se révéler très utile dans le cadre de l'étude des voies réactionnelles de la méthanogenèse (Shigematsu, Tang et al. 2004). En effet, comme présenté précédemment, lors de la méthanogenèse

acétoclaste, l'atome de carbone du méthane correspond à celui du groupement méthyle de l'acétate.



Équation 7

En utilisant de l'acétate uniquement marqué sur le groupement méthyle, il est donc possible de vérifier que le méthane est bien produit par voie acétoclaste, car dans ce cas le méthane doit être enrichi à 100 %. Il est également possible de mettre en évidence l'occurrence de réaction telle que l'oxydation syntrophique de l'acétate.

Couplée à des méthodes de microbiologie, cette technique peut également permettre d'identifier les micro-organismes actifs lors de la dégradation du substrat enrichi, car ces derniers vont assimiler une partie du substrat et leurs constituants cellulaires vont, de ce fait, se retrouver eux même enrichis. Deux techniques peuvent être citées :

- La technique "stable isotope probing" (SIP) qui permet, en séparant les acides nucléiques de composition isotopique naturelle de ceux présentant un enrichissement isotopique en carbone 13 par ultracentrifugation, de pré-identifier les micro-organismes responsables (Radajewski, Ineson et *al.* 2000).
- La technique SIMSISH développée dans le cadre de la thèse de Tianlun Li au Cemagref d'Antony (Li, Wu et *al.* 2008), qui permet de visualiser simultanément l'identité et la fonction des micro-organismes au sein d'un écosystème complexe, grâce à une analyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires (NanoSIMS).

3. Problématique

Comme nous venons de le voir au cours de la présentation de cette synthèse bibliographique, la digestion anaérobie de la matière organique est un processus complexe faisant intervenir en cascade, différentes réactions et populations de micro-organismes. L'élucidation des voies métaboliques empruntées lors de la méthanogenèse qui est la dernière étape de ce processus s'avère être tout particulièrement délicate. En effet, alors que la production de méthane peut être réalisée essentiellement *via* deux voies métaboliques différentes (méthanogenèse acétoclaste et hydrogénotrophe) en fonction du substrat utilisé, le fait que des réactions (homoacétogenèse et oxydation de l'acétate) puissent se produire entre les substrats respectifs de ces métabolismes entraîne une complexification des voies métaboliques pouvant être réellement utilisées.

Il apparaît ainsi important d'étudier l'effet de certains paramètres environnementaux sur l'orientation des voies métaboliques méthanogènes utilisées lors de la production du méthane. En effet, certains phénomènes d'inhibition ou d'instabilité des processus de digestion anaérobie pourraient être dus à des changements métaboliques induits par des modifications de ces paramètres. La compréhension du déterminisme des effets de certains paramètres d'ordre opérationnel pourrait permettre d'expliquer voire de proposer des solutions techniques permettant d'apporter des solutions à ces problèmes récurrents rencontrés dans les installations de traitement de déchets.

L'utilisation de l'approche isotopique naturelle reposant sur la mesure des compositions isotopiques du méthane et du dioxyde de carbone dont les potentialités pour l'identification des voies métaboliques mises en jeu dans les environnements méthanogènes naturels (rizières, tourbières, sédiments ...) sont déjà bien établies semble tout à fait adaptée aux objectifs de ce travail. Ainsi, l'utilisation d'une telle approche encore peu appliquée à l'étude des procédés de traitements de déchets anaérobies devrait permettre d'obtenir des informations plus précises sur les réactions y intervenant en fonction des paramètres opérationnels utilisés. Toutefois, avant d'utiliser cette approche, il semble nécessaire de valider le fait qu'elle soit applicable à l'étude des métabolismes méthanogènes au sein des systèmes industriels de traitement de déchets car ses fondements reposent à l'heure actuelle sur la détermination des fractionnements isotopiques mesurés à partir de cultures pures de méthanogènes ou d'inocula issus d'environnements méthanogènes naturels.

Ainsi dans la première partie de ce travail il est apparu important de déterminer les facteurs de fractionnement associés à chacune des deux grandes voies métaboliques de la méthanogenèse (acétoclaste et hydrogénotrophe) pour plusieurs inocula provenant de systèmes industriels de traitements de déchets non dangereux car de telles données sont absentes de la littérature. Cette première étape de validation indispensable, permettra ensuite d'utiliser l'approche isotopique pour l'étude de l'effet de certains paramètres opérationnels tels que la température et la concentration en azote ammoniacal qui sont apparus au cours de l'étude bibliographique comme étant deux des principaux paramètres ayant une influence sur le bon déroulement du processus de méthanisation des déchets non dangereux. Cependant, les effets de ces paramètres sont encore assez mal connus. L'approche isotopique devrait se révéler un outil particulièrement intéressant dans le cadre de cette problématique puisqu'elle permettra d'étudier les effets de ces paramètres sur les voies métaboliques utilisées lors de la méthanogenèse.

Chapitre 3

Matériel & méthodes

Chapitre

3

Matériel et méthodes

Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, un grand nombre d'expériences ont été réalisées à différentes échelles. Les dispositifs expérimentaux utilisés (microcosme et mésocosme) permettent de réaliser une multitude de combinaisons en faisant varier certains paramètres expérimentaux comme le substrat ou la température par exemple. Afin de simplifier la présentation des matériels et méthodes utilisés, les trois premières parties de ce chapitre présentent les différents substrats, inocula et milieux d'incubation utilisés. Dans la quatrième et cinquième partie, les deux dispositifs expérimentaux (microcosme et mésocosme) sont présentés en détails avec les modes opératoires qui leur sont associés. Enfin, la sixième et dernière partie de ce chapitre présente l'ensemble des méthodes analytiques et calculatoires utilisées.

1. Les substrats de dégradations

En fonction des modalités à tester dans le cadre de telle ou telle expérimentation, deux grands types de substrats ont été utilisés : les substrats "purs" et les déchets reconstitués.

1.1. Substrats purs

Deux types de substrats "purs" ont été utilisés pour étudier les deux voies métaboliques principales de la réaction de méthanogenèse (acétoclaste et hydrogénotrophe). L'acétate, substrat de la méthanogenèse acétoclaste et l'hydrogène, substrat (avec le dioxyde de carbone) de la méthanogenèse hydrogénotrophe.

1.1.1. Acétate

1.1.1.1. Acétate naturel

L'acétate utilisé est de l'acide acétique glacial (Sigma-Aldrich $\geq 99\%$).

1.1.1.2. Acétate enrichi

Dans le cadre d'expérimentations spécifiques, de l'acétate enrichi en carbone 13 a quelquefois été employé. Différents types d'acétates enrichis ont été utilisés en fonction des besoins :

- Acide acétique glacial enrichi sur le groupement méthyle (Cambridge Isotope Laboratories, 2- ^{13}C , $\geq 99\%$)
- Acétate de sodium enrichi sur les deux atomes de carbone (Cambridge Isotope Laboratories, 1,2- ^{13}C , $\geq 99\%$).

1.1.2. Hydrogène

Deux mélanges gazeux contenant de l'hydrogène ont été utilisés comme substrats de réaction dans le ciel gazeux d'incubations :

- Le premier mélange est un mélange gazeux composé pour 80 % d'H₂ et pour 20 % de CO₂ mis à disposition par le Génoscope d'Evry.
- Le second mélange est un mélange gazeux composé pour 5 % d'H₂ et pour 95 % de N₂.

1.2. Déchets reconstitués

Il a été décidé de travailler avec des déchets reconstitués car l'utilisation de déchets réels, en raison de leur hétérogénéité n'aurait pas permis, à l'échelle des dispositifs expérimentaux, de fournir des résultats reproductibles et interprétables. En effet, l'objectif de ces travaux étant de réaliser des études comparatives sur l'effet de différents paramètres, il était indispensable d'utiliser une matrice homogène ayant les mêmes caractéristiques (teneur en C, teneur en N, granulométrie,...) et représentative des OM françaises ou bien des biodéchets.

1.2.1. Déchet reconstitué (type OM)

Le déchet reconstitué utilisé dans les expériences est un déchet reconstitué à partir des données moyennes nationales de l'Ademe (Ademe 1999) pour les OM, ces données étant déterminées selon la procédure MODECOMTM (Chapitre 1, § 1.4 La composition des OM et son évolution). Les résultats issus de cette caractérisation par la méthode MODECOMTM ont été adaptés afin d'être utilisables à l'échelle du laboratoire.

1.2.1.1. Description

Les 13 catégories de la méthode MODECOMTM restent inchangées. Par contre, les 33 sous-catégories ont été simplifiées afin d'en diminuer le nombre à 25 :

- Certaines des sous-catégories ont été regroupées en une seule.
(Exemple : *Autres papiers* et *Emballages papiers* sont réunis dans une sous-catégorie *Autres papiers*).
- Afin de mieux représenter certaines catégories qui n'étaient pas décrites en sous-catégories, des sous-catégories ont été ajoutées.
(cf. catégories *Putrescibles* et *Cartons*).
- Enfin, la catégorie *déchets spéciaux* reste à titre indicatif dans la composition mais n'a pas été introduite dans nos expériences.

Ces modifications sont visibles dans le Tableau 20.

Des éléments précis ont ensuite été choisis pour représenter chacune des sous-catégories. Ce choix a été réalisé à partir de la description des catégories dans la méthode MODECOMTM et en tenant compte de nos contraintes en termes d'homogénéité et de reproductibilité. La liste des éléments constitutifs ayant été sélectionnés pour représenter les sous-catégories, est décrite dans le Tableau 20 et les références exactes des produits sont données en Annexe 2.

Tableau 20 : Composition du déchet reconstitué.

Nomenclature MODECOM™ 1993		Nomenclature Cemagref/MODECOM™ 1993		% en masse humide	% en masse humide	P (g) théorique par bouteille
Catégorie	Sous-catégorie	Sous-catégorie	Éléments constitutifs			
1	Putrescibles	Déchets alimentaires	Biscottes Steaks hachés (boeuf 15% de MG) Miro de café Riz cuit Pommes de terre cuites Foin	28,60	3,16 4,34 2,39 2,66 12,89 3,16	1,26 1,74 0,96 1,06 5,16 1,26
2	Papiers	Journaux - brochures Magazines-Publicités Autres papiers Emballages papier	Journaux Magazines Papiers de bureau	16,10	3,60 4,80 7,70	1,44 1,92 3,08
3	Cartons	Cartons plats Cartons ondulés	Cartons plats divers Cartons ondulés	9,30	4,66 4,66	1,86 1,86
4	Complexes	Composites ELA	Emballages de liquide alimentaire	1,40	1,40	0,56
5	Textiles	Emballages en textiles Autres textiles	Textiles	2,80	2,80	1,04
6	Textiles sanitaires	Films polyoléfinés (PE et PP) Emballages PET Autres déchets plastiques Bouteilles / Flacons polyoléfinés Autres déchets polyoléfinés Bouteilles - emballages PVC Autres emballages PVC Autres déchets PVC Emballages polystyrène Autres déchets polystyrène Emballages combustibles Autres combustibles	Textiles sanitaires Films polyoléfinés (PE et PP) Emballages PET Bouteilles eau Bassines en PP Drains en PVC Polystyrène Ecorces de jardinage	3,10	3,10 6,80 1,00 1,30* 1,60 1,40 3,30	1,24 2,32 0,40 0,52 0,64 0,56 1,32
7	Plastiques	Emballages en verre Autres déchets en verre	Verre	13,10	13,10	5,24
8	Combustibles non classés	Emballages en métaux ferreux Autres déchets en métaux ferreux Emballages en aluminium Autres déchets en aluminium Autres déchets autres métaux	Fer Aluminium Autres métaux	4,10	3,40 0,50 0,20	1,36 0,20 0,08
9	Verre	Incombustibles non classés Déchets spéciaux	Incombustibles non classés Déchets spéciaux	8,80	6,80 0,50 0,00	2,72 0,20 0,00
10	Métaux	Éléments fins (<20mm)	Fines	0,50	0,50	0,20
11	Incombustibles non classés			0,00	0,00	0,00
12	Déchets spéciaux			0,00	0,00	0,00
13	Éléments fins (<20mm)			99,5 %	99,5 %	39,8 g
Total (sans les déchets spéciaux)				99,5 %	99,5 %	39,8 g

* La somme des sous-catégories plastiques donnent 11,20% alors que la catégorie plastique est donnée à 11,10%. Le pourcentage de la sous-catégorie bouteilles-flacons polyoléfinés à été diminué de 0,1% pour rattraper cet écart.

1.2.1.2. Protocole de préparation

La première étape de la préparation du déchet reconstitué consiste à réunir l'ensemble des éléments choisis pour représenter chacune des sous-catégories. Ensuite, une étape de préparation est souvent nécessaire avant l'étape de broyage. Cette étape consiste généralement à retirer les impuretés (agrafes, colle, ...). Le broyage est réalisé à l'aide d'un broyeur-destructeur à cisailles rotatives (broyeur Blick BB230, 3 kW, 38 couteaux de 8 mm d'épaisseur) (Figure 39). Jusqu'à trois passages de la fraction peuvent être nécessaires afin d'obtenir la granulométrie désirée ($\emptyset > 1$ cm). Aucune des fractions putrescibles ne nécessite d'étape de broyage mais, certaines nécessitent une étape de cuisson qui est généralement réalisée immédiatement avant leur utilisation. Les modalités de préparation sont listées dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Modalités de préparation des fractions du déchet reconstitué.

Éléments	Préparation	Broyage
Biscotte	∅	∅
Steaks hachés (bœuf 15 % de MG)	Cuisson	∅
Marc de café	Cuisson	∅
Riz cuit	Cuisson	∅
Pommes de terre cuites	Cuisson	∅
Foin	∅	∅
Journaux	Retirer les agrafes	Oui (3 fois)
Magazines	Retirer les agrafes	Oui (3 fois)
Papiers de bureau	Retirer les agrafes	Oui (3 fois)
Cartons plats divers	Retirer les agrafes, les parties avec de la colle et les étiquettes	Oui (3 fois)
Cartons ondulés	Retirer les agrafes, les parties avec de la colle, le scotch et les étiquettes	Oui (3 fois)
Emballages de liquide alimentaire	Retirer le bouchon et nettoyer l'intérieur de la brique	Oui (3 fois)
Draps en coton	∅	Oui (3 fois)
Couches	∅	Oui (3 fois)
Sacs poubelle	∅	Oui (1 fois)
Bouteilles d'eau	Retirer le bouchon, l'anneau, l'étiquette et les parties avec de la colle	Oui (3 fois)
Bassines en PP	Retirer les étiquettes	Oui (3 fois)
Drains en PVC	Nettoyer à l'eau	Oui (3 fois)
Polystyrène	∅	Oui (1 fois)
Écorces de jardinage	∅	Oui (1 fois)
Billes en verre	∅	∅
Clous	∅	∅
Feuilles d'aluminium	Ne pas broyer le cylindre en carton	Oui (1 fois)
Fils de cuivre	∅	∅
Graviers	Nettoyer à l'eau et tamiser à deux millimètres	∅

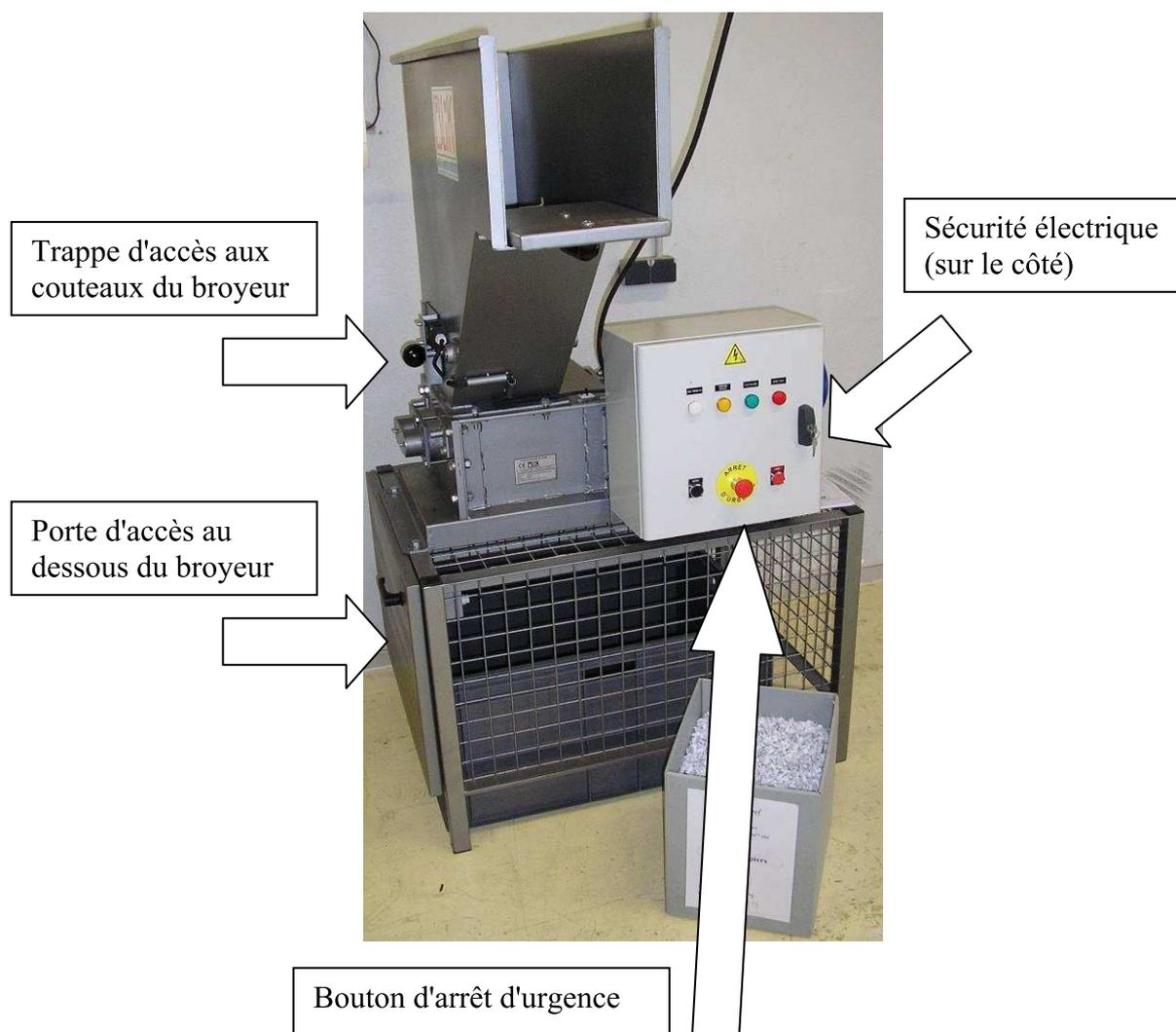


Figure 39 : Broyeur-destructeur à cisailles rotatives.
(broyeur Blick BB230, 3 kW, 38 couteaux de 8 mm d'épaisseur).

Au terme de la préparation, chaque catégorie de déchets est collectée sous une forme propre broyée ($\varnothing > 1\text{cm}$) ou cuite. Les masses de chaque catégorie de déchets à introduire dans le dispositif d'incubation sont calculées à partir des données de l'Ademe (Ademe 1999), en % de la masse humide et en fonction de la masse totale de déchets à reconstituer (Tableau 20).

1.2.2. Biodéchet reconstitué

Pour les besoins d'expériences spécifiques, un biodéchet a également été reconstitué. Aucune donnée nationale n'ayant pu être trouvée en ce qui concerne la composition type d'un biodéchet, ce dernier a été reconstitué pour se situer dans la gamme des données issues de l'étude bibliographique réalisée (Chapitre 1, § 1.5 Caractérisation des OM et des biodéchets). Les mêmes fractions de putrescibles que celles utilisées dans l'OM reconstituée (Chapitre 3, § 1.2.1.1 Description) sont utilisées dans la composition du biodéchet. Afin d'obtenir un ratio C/N correspondant aux résultats de l'étude bibliographique (entre 14,8 et 36,4) soit 24,22, les proportions de chaque catégorie ont été ajustées. La composition finale du biodéchet est donnée dans le Tableau 22.

Afin de simuler une fraction des biodéchets correspondant aux déchets verts, une fraction supplémentaire a également été créée et caractérisée suite à l'étude bibliographique

réalisée (Chapitre 1, § 1.5 Caractérisation des OM et des biodéchets). Afin d'obtenir un ratio C/N correspondant aux résultats de l'étude bibliographique (entre 7 et 14,9) soit 8,23, de l'herbe de jardin a été sélectionnée pour en être l'élément constitutif. Cette fraction est également présentée dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Composition du biodéchet reconstitué.

	Constituants	Pourcentage	MV	MS	C/N
Biodéchet	Biscottes	26,60 %	92,04 %	94,20 %	25,60
	Steaks hachés cuits	4,93 %	36,91 %	38,13 %	6,21
	Marc de café	7,88 %	48,92 %	50,20 %	17,99
	Riz cuit	14,78 %	28,18 %	31,04 %	34,42
	Patates cuites	43,33 %	16,26 %	17,46 %	23,10
	Journaux	1,50 %	90,44 %	94,12 %	67,96
	Total biodéchet	100 %			24,22

	Constituants	Pourcentage	MV	MS	C/N
Déchet vert	Herbes coupées	100,00 %	25,25 %	30,11 %	8,23

2. Les consortia microbiens dit inocula

Afin d'apporter un consortium microbien contenant les micro-organismes nécessaires aux processus de digestion anaérobie, des inocula sont ajoutés. Le but est d'obtenir la mise en place rapide de la digestion anaérobie. Différents inocula ont été utilisés afin de tester l'effet de la nature de ces derniers sur les voies métaboliques de la méthanogenèse.

Des variations temporelles de qualité des lixiviats et des boues servant à la préparation des inocula pouvant exister, chaque série d'expériences est, sauf indication contraire, réalisée avec des inocula provenant du même prélèvement.

2.1. Lixiviats d'ISDND

Pour préparer les inocula, plusieurs prélèvements de lixiviat de l'ISDND de Vert-le-Grand (91) ont été réalisés par le puits (412 BL) d'un casier en méthanogenèse stable. Je remercie la société CEL de m'avoir permis de prélever à plusieurs reprises, des lixiviats sur leur site.



Figure 40 : Photographies du prélèvement de lixiviats et d'un inoculum.

Les inocula ont été préparés par centrifugations successives de lixiviats d'ISDND. Le lixiviat est centrifugé (SIGMA 4K35, rotor 12256-H, 1313 ref, 4°C, pendant 15 min), le surnageant est vidé, puis le même tube est de nouveau rempli avec du lixiviat puis centrifugé de nouveau. Cette méthode est employée jusqu'à l'obtention de culots correspondant au volume de lixiviat désiré. Les différents culots ainsi préparés sont ensuite réunis dans un volume précis de surnageant. L'inoculum homogène ainsi obtenu est ensuite aliquoté dans des tubes Falcon de 15 mL. Ces tubes sont centrifugés puis vidés de leur surnageant et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les tubes ainsi obtenus contiennent des culots semblables correspondant à la quantité de lixiviat désirée.

2.2. Boues digérées de station d'épuration

Les boues utilisées sont celles de la station d'épuration d'Evry (91) qui ont été prélevées en sortie du digesteur de boues. Ce digesteur fonctionne en conditions mésophiles (37°C). A ce jour, les boues ont été utilisées, sans préparation ni conservation préalable, à la fois comme inoculum et substrat de dégradation ou bien après centrifugation dans des tubes Falcon de 50 mL vidés de leur surnageant puis congelés à -80°C. Je remercie la SEE (société des Eaux de l'Essonne) exploitant de la station d'épuration d'Evry, de m'avoir permis de prélever à plusieurs reprises des boues digérées de STEP.

2.3. Boues de méthaniseur d'OM thermophiles

Du digestat d'OM a été collecté (bidon en plastique) dans un méthaniseur d'OM fonctionnant en conditions thermophiles. Le digestat contenant de nombreux résidus d'OM de taille importante et non digérés, il a fallu les éliminer tout en limitant au maximum l'exposition du digestat à l'air afin de préserver les micro-organismes anaérobies stricts. La viscosité initiale du digestat ne permettait ni de le filtrer, ni de le tamiser directement. Le protocole suivant a donc été retenu. Dans un premier temps, le digestat a été lavé à l'eau, et le mélange obtenu a été filtré pour éliminer les imputrescibles ou les gros résidus d'OM résiduels. Le liquide obtenu a ensuite été mis à incuber à 55°C pour stabiliser les populations de micro-organismes. Le mélange à 55°C a été centrifugé par fraction de 50 mL, dans des tubes Falcon de 50 mL. Une fois vidés de leur surnageant, ces tubes sont ensuite conservés à -80°C.

En raison de l'impossibilité de trouver un méthaniseur d'OM mésophile en régime stabilisé lors du démarrage de la thèse, une partie de la boue obtenue précédemment a également été incubée à 35°C pour constituer un inoculum mésophile. La boue placée à 35°C a ensuite été centrifugée par fraction de 50 mL, dans des tubes Falcon de 50 mL. Une fois vidés de leur surnageant, ces tubes sont ensuite conservés à -80°C.

Dans le cadre d'une autre série d'expériences, du digestat a été collecté (bidon en plastique) dans l'unité de méthanisation d'OM de Montpellier "Améthyst" (34). Le digesteur est un méthaniseur fonctionnant en conditions thermophiles. Le protocole de préparation est identique à celui utilisé pour le digestat précédent

Chacun des tubes ainsi obtenus contient un inoculum correspondant à une quantité connue de boues préparées et centrifugées.

3. Les milieux d'incubations

3.1. Solution carbonate

Dans toutes les incubations en microcosme, il a été décidé de tamponner le milieu réactionnel dans la gamme de pH optimale pour la méthanogenèse (6 à 9), afin d'accélérer le processus global de dégradation et d'obtenir des résultats significatifs en une période relativement courte.

Afin de tamponner le milieu, l'utilisation d'une solution d'ions bicarbonates permet de stabiliser initialement le pH autour de 8,38 (couple acide : H_2CO_3/HCO_3^- , $pK_{a1}=6,35$; base : HCO_3^-/CO_3^{2-} , $pK_{a2}=10,4$). C'est le bicarbonate de sodium qui a été retenu. Le choix du sel à utiliser pour préparer la solution de bicarbonate a été fait à partir de données bibliographiques des concentrations inhibitrices en différents sels pour la méthanogenèse (cf. Chapitre 2, 1.2.6.2 Les ions, concentration limite d'inhibition de la méthanogenèse par Na^+).

En se basant sur des expériences menées au Cemagref (Alcuta 2006), il faut apporter $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ d'espèces carbonatées pour apporter un pouvoir tampon suffisant afin d'éviter une inhibition de la méthanogenèse due à une chute de pH trop importante. Avec la solution de $NaHCO_3$, si on apporte $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ de HCO_3^- , la même quantité de Na^+ est aussi apportée. La masse molaire du sodium étant de 23 g.mol^{-1} , l'apport en ions sodiums est de $3,22 \text{ g.L}^{-1}$. Même en considérant que les déchets vont libérer du sodium (de l'ordre de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$), l'apport en Na^+ reste inférieur à la limite basse d'inhibition ($3,5 \text{ g.L}^{-1}$).

$$3,22 \text{ g.L}^{-1} + 0,1 \text{ g.L}^{-1} < 3,5 \text{ g.L}^{-1}$$

(solution tampon) + (déchets) < (limite basse inhibition)

Équation 8

Bilan des apports en Na^+ dans les incubations

La masse de bicarbonate de sodium (Aldrich, 99 %) à utiliser pour préparer 1 litre de solution tampon est 11,76 g (cf. Équation 9).

$$M(NaHCO_3) = 84 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$m(NaHCO_3) = C * M * V = 0,14 * 84 * 1 = 11,76 \text{ g}$$

Équation 9

Calcul de la masse de bicarbonate de sodium nécessaire à la préparation d'un litre de solution tampon.

3.2. Milieu d'incubation

Dans certaines incubations, il a également été nécessaire d'introduire l'ensemble des éléments indispensables au développement des micro-organismes. Pour ce faire, la solution décrite dans la norme NF EN ISO 11734 concernant l'évaluation de la biodégradabilité anaérobie "ultime" des composés organiques dans les boues de digesteurs, a été utilisée. Elle correspond à la solution appelée BMP dans la suite du manuscrit et dont la composition est donnée dans le Tableau 23. Cette solution est complétée par l'ajout d'hydrogénocarbonate de sodium afin de tamponner le milieu réactionnel. La même concentration ($0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ de HCO_3^-) que dans la solution carbonate seule (Chapitre 3, § 3.1 Solution carbonate) est ajoutée.

Il est à noter que la résazurine, élément contenant du carbone, ne servant qu'en tant qu'indicateur d'oxygène, n'a pas été utilisée afin d'éviter l'ajout de carbone potentiellement dégradable dans les incubations.

Tableau 23 : Composition du milieu BMP.

Milieu BMP		Solution mère d'éléments traces	
Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	0,27 g	Chlorure de manganèse tétrahydraté ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,05 g
Monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12 g	Acide orthoborique (H_3BO_3)	0,005 g
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	0,53 g	Chlorure de zinc (ZnCl_2)	0,005 g
Chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075 g	Chlorure de cuivre(II) (CuCl_2)	0,003 g
Chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g	Molybdate disodique dihydraté ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,001 g
Chlorure de fer(II) tétrahydraté ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g	Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Résazurine (indicateur d'oxygène)	0,001 g	Chlorure de nickel hexahydraté ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Sulfure de sodium nonahydraté ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (voir note 1)	0,1 g	Sélénite disodique (Na_2SeO_3)	0,005 g
Solution mère d'éléments traces (facultative)	10 ml	Eau (6.1), q.s.p.	1 litre
Eau désoxygénée (6.1), q.s.p.	1 litre		

4. Les flacons à plasma ou microcosmes

4.1. Le dispositif expérimental

Les bioréacteurs anaérobies sont réalisés avec des flacons à plasma gradués de différentes contenances selon l'expérience (330 mL ou 1,1 L utile) (Fisher Scientific Labosi), en verre borosilicaté (cf. Figure 41). Ces bouteilles sont fermées hermétiquement par un septum en caoutchouc d'une épaisseur de 5,5 mm et par une bague à vis de 40 mm de diamètre. Ce système permet de réaliser des prélèvements de gaz et de liquide à l'aide d'une seringue tout en conservant l'étanchéité du pilote (Bureau 2003).

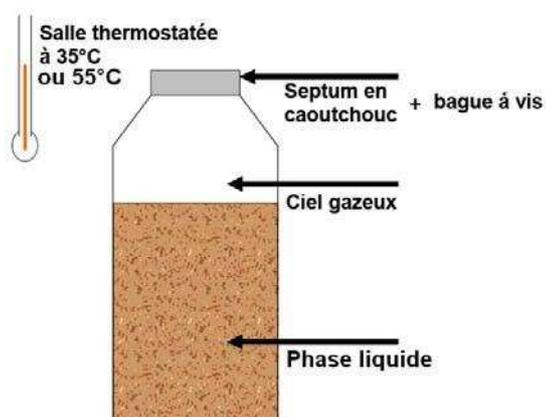


Figure 41 : Les flacons à plasma.

Ces bouteilles, une fois remplies selon les besoins de l'expérimentation, sont placées dans une pièce thermostatée à $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ou dans une étuve à $55^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2. Mode opératoire

4.2.1. Remplissage des microcosmes

La préparation des microcosmes dépend de l'objectif qui lui est associé. En effet, en fonction des différentes conditions expérimentales à mettre en œuvre, les éléments introduits diffèrent fortement.

4.2.1.1. Introduction du substrat

4.2.1.1.1. Introduction du déchet

Si l'expérience utilise le déchet reconstitué, ce dernier est introduit en premier en pesant les fractions une à une. Les bouteilles vides sont pesées avec et sans le dispositif de fermeture (septum en caoutchouc et bague à vis). Ensuite, dans chaque bouteille, une quantité précise de déchet reconstitué (OM ou biodéchets) est introduite. Chaque catégorie de déchets est pesée séparément à l'aide d'une balance précise à 0,01 g (Sartorius, BP31000s) car il est impossible de répartir de façon homogène dans les différents microcosmes un mélange de déchets préparé en grande quantité préalablement. Le poids réel introduit, de chaque catégorie de déchets, est scrupuleusement noté.



Figure 42 : Photographie d'une bouteille contenant le mélange de déchet.

4.2.1.1.2. Introduction d'autres substrats

Lorsque le substrat à introduire n'est pas un déchet, on procède comme suit :

- Si le substrat est solide (poudre ou solide homogène), il est introduit dans le milieu qui va être utilisé après pesée sur une balance à 0,01 g (Sartorius, BP31000s). L'idéal est de préparer la solution nécessaire pour les trois incubations du triplicat puis de la répartir entre les différentes bouteilles.
- Si le substrat est un liquide homogène, il est introduit dans le milieu qui va être utilisé à l'aide d'une pipette. La concentration est ajustée dans la solution du milieu. L'idéal est de préparer la solution nécessaire pour les trois incubations du triplicat puis de la répartir entre les différentes bouteilles.
- Si le substrat est un mélange gazeux, l'introduction est réalisée à l'aide du même protocole que celui utilisé pour la mise en conditions anaérobies (Chapitre 3, § 4.2.2.2 Mise en conditions anaérobies).

4.2.1.2. Introduction de l'inoculum

Dans la majorité des bouteilles, un inoculum (cf. Chapitre 3, § 2 Les consortia microbiens dit inocula) est également introduit. Pour ce faire, l'inoculum conservé à - 80°C

dans un tube Falcon est introduit dans la bouteille par rinçage des tubes Falcon avec le milieu d'incubation ou par pesée à l'aide d'une balance à 0,01 g (Sartorius, BP31000s).

4.2.1.3. Introduction du milieu d'incubation

Dans le cas des incubations avec des substrats purs, le milieu est introduit directement avec le substrat et l'inoculum comme nous venons de le voir. Dans le cas des incubations de déchets, le milieu d'incubation est introduit après le substrat. Le volume nécessaire est mesuré avec une éprouvette graduée puis introduit dans les flacons à plasma.

4.2.2. Incubation des microcosmes

4.2.2.1. Fermeture des microcosmes

Une fois que l'ensemble des éléments a été introduit dans la bouteille, cette dernière est fermée avec son septum et sa bague à vis. La bouteille est ensuite agitée pour homogénéiser la répartition des différents composants.

4.2.2.2. Mise en conditions anaérobies

Cette étape consiste à remplacer l'air contenu dans le ciel gazeux du microcosme par un gaz inerte (azote) ou par un mélange gazeux spécifique (H_2/N_2 , H_2/CO_2) afin de se placer en conditions anaérobies. Pour ce faire, une rampe à vide réalisée à la demande du Cemagref par la société Swagelok est utilisée :

- Jusqu'à dix microcosmes peuvent être connectés simultanément sur la rampe à vide ;
- Un cycle de vide est réalisé dans les microcosmes ;
- Le ciel gazeux des microcosmes est saturé avec de l'azote (pureté 4.5, Linde gas SA) ou avec un autre gaz. Cette opération est réalisée jusqu'à l'obtention d'une pression de 500 mbar environ ;
- Les deux dernières étapes sont répétées 5 fois ;
- Les microcosmes sont déconnectés de la rampe à vide.

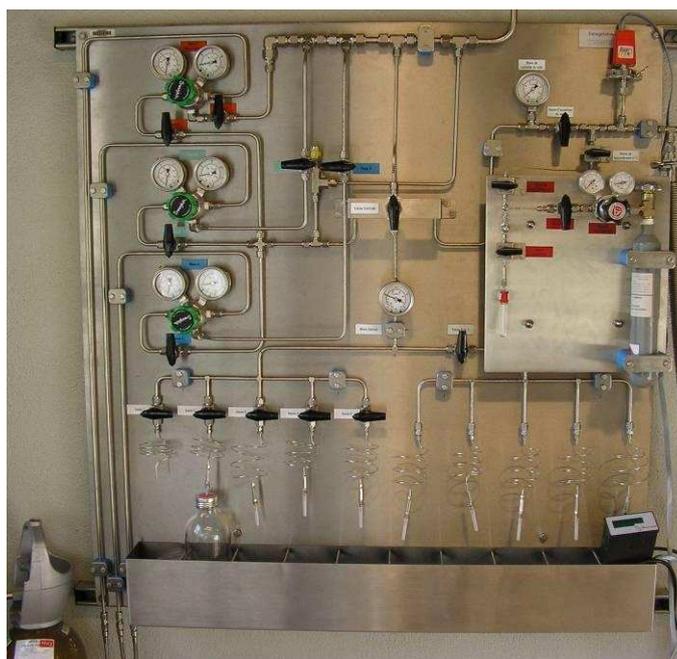


Figure 43 : Photographie de la "rampe à vide".

Enfin, après avoir évacué le surplus de gaz pour diminuer la pression ($P > 400$ mbar), une analyse du ciel gazeux permet de vérifier que la concentration en oxygène est inférieure à 0,3 %. Si tel n'est pas le cas, les opérations sont répétées jusqu'à l'obtention de cette teneur. Un prélèvement de lixiviat est réalisé à ce stade à l'aide d'une seringue.

4.2.2.3. Incubation des microcosmes

Les microcosmes sont dégazés à pression atmosphérique et la pression est relevée. Ils sont ensuite placés à la température d'incubation souhaitée (35°C ou $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) dans une pièce thermostatée (35°C) ou une étuve (55°C).

4.2.3. Protocole de suivi des microcosmes

Pour suivre l'évolution des incubations, un suivi discontinu est réalisé par des analyses régulières des effluents gazeux et liquides. De manière pratique, quand la pression dans la bouteille est suffisamment élevée ($P > 300$ mbar), le ciel gazeux est analysé, la production de biogaz est mesurée et un prélèvement de lixiviat est effectué. Le protocole utilisé est généralement le suivant (avec quelques adaptations selon les expériences) :

- **Mesure de la pression** dans les bouteilles à l'aide d'un manomètre différentiel (Digitron 2082P, gamme de mesure de 0 à 2 000 mbar, précision 4 mbar) équipé d'un tube relié à une aiguille (\varnothing de 0,45 mm). Cette mesure est réalisée directement dans la pièce thermostatée ($35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) ou dans l'étuve ($55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) (Figure 44).

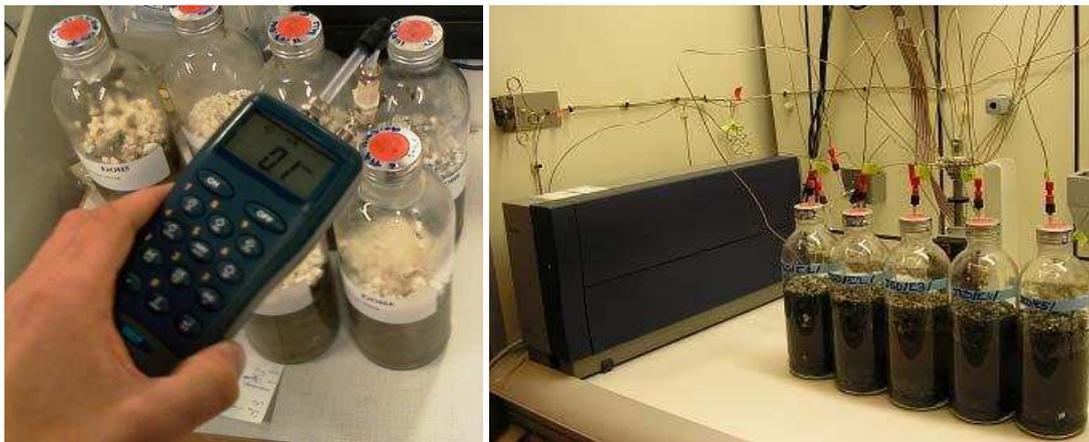


Figure 44 : Photographie de la mesure de pression et de l'analyse du biogaz.

- **Analyse du biogaz** dans les microcosmes après les avoir sortis de la pièce thermostatée (ou de l'étuve) et placés à température ambiante pendant 30 minutes. Si la pression dans les microcosmes est inférieure à 1000 mbar, le biogaz est directement analysé dans la bouteille à l'aide d'un dispositif reliant une aiguille (\varnothing de 0,45 mm) au système d'injection de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse (μGC , cf. Chapitre 3, § 6.1.1 Analyse de la composition du biogaz). Si la pression est supérieure à 1000 mbar, un léger dégazage (afin de ramener la pression à une valeur inférieure à 1000 mbar) suivi d'une mesure de pression est réalisé. Avant l'analyse, toutes les mesures sont prises pour éviter la présence d'humidité ou d'impureté sous le septum en raison de la sensibilité du μGC à l'humidité (Figure 44).

- **Mesure de la pression** après analyse par μGC . Cette mesure est nécessaire pour évaluer le volume de gaz prélevé par le μGC (variation selon la pression initiale des bouteilles) (Figure 44).

- **Prélèvement de gaz pour analyse isotopique** 2 fois 7 mL sont prélevés avec une seringue à gaz (SGE, gas tight 10 mL) munie d'un système de fermeture, puis introduits dans des vacutainers préalablement évacués et identifiés de la manière décrite sur la Figure 45.

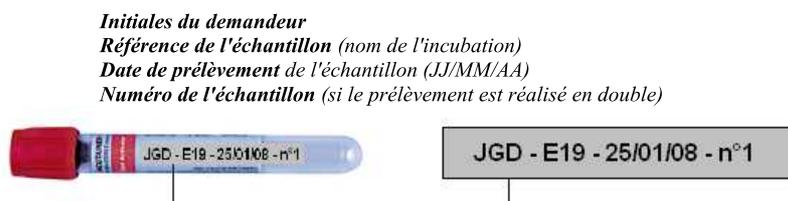


Figure 45 : Dispositif de conservation des prélèvements gazeux pour les analyses isotopiques.

- **Dégazage du biogaz** : à l'aide d'une seringue à gaz de 100 mL jusqu'à retour à la pression atmosphérique. Cette étape est réalisée en plusieurs fois.
- **Mesure de la pression** : après dégazage. Cette mesure est nécessaire pour évaluer le volume de biogaz (composition connue) restant dans le ciel gazeux (Figure 44).
- **Homogénéisation de la phase liquide** par agitation de la bouteille.
- **Prélèvement de lixiviat** : 2,5 mL de lixiviat sont prélevés à l'aide d'une seringue (TERUMO, 2,5 mL) munie d'une aiguille (\varnothing de 0,70 mm). La bouteille est retournée et le prélèvement est réalisé par un mouvement de va et vient du piston. Les 2,5 mL de lixiviat sont répartis dans 4 tubes Eppendorf (cf. Figure 46).
- **Mesure du pH** sur le lixiviat brut après agitation (cf. Chapitre 3, § 6.2.1 Mesure du pH).
- **Centrifugation** de 2 mL de lixiviat dans 2 tubes Eppendorf à 13 400 rpm pendant 10 min (Minispin, Eppendorf), puis extraction du surnageant avec une pipette munie d'un cône à usage unique. Le surnageant de chaque tube est introduit dans un tube Eppendorf de 1,5 mL.
- **Congélation** des 4 tubes Eppendorf préalablement étiquetés (bouteille, date, type d'échantillon) (1 brut, 2 culots de centrifugation, 1 surnageant de centrifugation) pour analyses ultérieures. La congélation à -20°C a pour but de conserver les échantillons

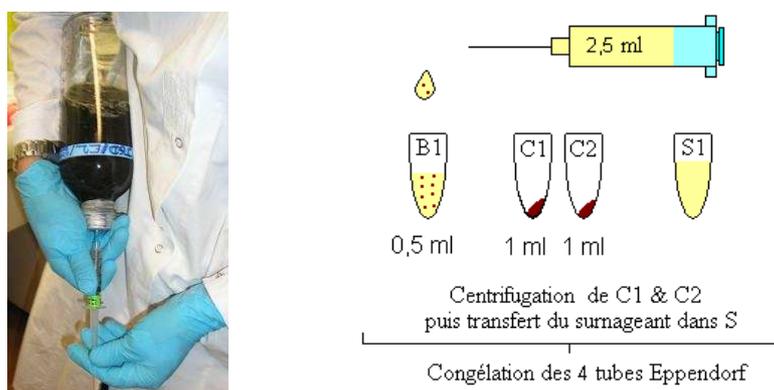


Figure 46 : Protocole et photographie de l'échantillonnage du lixiviat.

Les données relevées lors des opérations de dégazage et de prélèvements/injection de liquide sont entrées dans un tableur Excel qui permet de traiter l'ensemble des informations.

4.3. Récapitulatif de l'ensemble des microcosmes

Différents essais en microcosmes ont été réalisés au cours de ce travail doctoral. Cette partie se propose de faire une synthèse/description de l'ensemble des essais utilisés par la suite dans le chapitre 4 de ce manuscrit intitulé "résultats et discussion". Le Tableau 24, Tableau 25 et le Tableau 26 répertorient le détail de ces incubations.

Tableau 24 : Nomenclature des expériences en microcosmes (partie 1/3).

Expériences "Facteur de fractionnement"						
Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	[NH₄⁺] (g.L⁻¹)
Lixi-T (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISDND	∅	∅	Milieu BMP + carbonate	35°C	0,180
Lixi-A (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹			
Lixi-H _{forte} (1,2 & 3)		H ₂ /CO ₂	80 % / 20 %			
Lixi-H _{faible} (1,2)		N ₂ /H ₂	95 % / 5 %			
BMt-T (1,2 & 3)	Boue de méthaniseur thermophile	∅	∅	Milieu BMP + carbonate	55°C	0,180
BMt-A (1)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹			
BMt-H _{forte} (1,2,3)		H ₂ /CO ₂	80 % / 20 %			
BMt-H _{faible} (1,2)		N ₂ /H ₂	95 % / 5 %			
BMm-T (1,2 & 3)	Boue de méthaniseur adapté mésophile	∅	∅	Milieu BMP + carbonate	35°C	0,180
BMm-A (1)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹			
BMm-H _{faible} (1,2)		N ₂ /H ₂	95 % / 5 %			
Expériences "Effet de la température (Déchets)"						
Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	[NH₄⁺] (g.L⁻¹)
DRF-35 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISDND	Déchets reconstitués français	10 g	Carbonate	35°C	0,000
T-35-négatif (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISDND	∅	0 g	Carbonate	35°C	0,000
DRF-55 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISDND	Déchets reconstitués français	10 g	Carbonate	55°C	0,000
T-55-négatif (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISDND	∅	0 g	Carbonate	55°C	0,000
Expériences "Effet de la température (Acétate)"						
Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	[NH₄⁺] (g.L⁻¹)
Lixi-T-35 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISDND	∅	∅	Milieu BMP + carbonate	35°C	0,180
Lixi-A-35 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹			
Lixi-T-55 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISDND	∅	∅	Milieu BMP + carbonate	55°C	0,180
Lixi-A-55 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹			
BoueOM-T-35 (1,2 & 3)	Boue de méthaniseur thermophile	∅	∅	Milieu BMP + carbonate	35°C	0,180
BoueOM-A-35 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹			
BoueOM-T-55 (1,2 & 3)	Boue de méthaniseur thermophile	∅	∅	Milieu BMP + carbonate	35°C	0,180
BoueOM-A-55 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹			

- **Essais "calculs de facteur de fractionnement"**

Les premiers essais ont été réalisés dans l'objectif de déterminer les facteurs de fractionnements induits lors de la méthanogenèse par des inocula provenant de systèmes industriels de traitement de déchets (ISD, méthaniseur, etc.), car de telles données n'étaient

pas disponibles dans la littérature. Trois inocula provenant de systèmes de traitement anaérobie de déchets ont été utilisés : un lixiviat d'ISDND, une boue de méthaniseur thermophile et la même boue de méthaniseur thermophile adaptée aux conditions mésophiles (cf. Chapitre 3, § 2 Les consortia microbiens dit inocula). Afin de déterminer les facteurs de fractionnements associés à chacune des deux voies métaboliques principales de la méthanogenèse (acétoclaste et hydrogénotrophe) induits par ces inocula, des incubations d'acétate et de CO_2/H_2 en microcosmes ont été réalisées. L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 24.

- **Essais "effet de la température (déchets)"**

La température étant un facteur influençant fortement les processus de digestion anaérobie des déchets non dangereux, des essais spécifiques sur déchet reconstitué ont été réalisés. Des incubations en flacons à plasma de 330 mL, avec inoculum provenant de lixiviat d'ISDND, 10 g d'OM françaises reconstituées et 210 mL de tampon carbonate ont été placés en conditions mésophiles et thermophiles après mise en condition anaérobie. L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 24.

- **Essais "effet de la température (acétate)"**

Afin de mieux comprendre le déterminisme des effets de la température observés lors de la dégradation de déchets reconstitués sur les voies métaboliques de la méthanogenèse, il a été décidé de travailler sur un substrat plus simple que le déchet reconstitué. Des incubations d'acétate à différentes températures (35°C et 55°C , températures identiques à l'expérience réalisée sur des déchets reconstitués) ont été réalisées avec deux inocula provenant d'installation de traitement anaérobie de déchets. Le premier inoculum est issu d'un lixiviat d'ISDND (plage de température mésophile) et le second d'une boue de méthaniseur de déchets (plage de température thermophile) (cf. Chapitre 3, § 2 Les consortia microbiens dit inocula). L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 24.

- **Essais "effet de la $[\text{NH}_4^+]$ "**

L'azote ammoniacal est un des facteurs identifié comme responsable de nombreux phénomènes d'inhibition lors des processus de digestion anaérobie (cf. Chapitre 2, § 1.2.6.3 L'azote ammoniacal). L'effet de l'azote ammoniacal sur la méthanisation de l'acétate en conditions mésophiles, a donc été investigué dans une série d'expériences spécifiques. La nomenclature utilisée dans le cadre de ces expériences est détaillée dans le Tableau 25. Un inoculum issu d'un lixiviat d'ISDND a préalablement été adapté à consommer de l'acétate, série A (cette série correspond à celle appelée Lixi-A-35 dans les expériences "effet de la température (acétate)"). Ensuite, la phase liquide contenant l'inoculum provenant de cette série a été utilisée pour tester l'effet de quatre concentrations en NH_4^+ (séries C1 à C4) sur la dégradation de l'acétate. Pour ce faire, la concentration en NH_4^+ a été ajustée avec du NH_4Cl (Labosi, 99,5 %). Pour ces essais, réalisés en triplicat, deux des incubations ont reçu de l'acétate naturel et la troisième de l'acétate dont l'atome de carbone du groupement méthyle est enrichi à 100 % en carbone 13. L'utilisation d'une approche marquée a pour but de conforter les résultats obtenus avec l'acétate naturel (cf. Chapitre 2, § 2.4.5 Points spécifiques : utilisation de substrats marqués). Enfin, des réinjections d'acétate ont été réalisées à la fin des

incubations de la série C3 et C4 (séries C3-b, C4-b et C4-c). Ces incubations, contenant les deux plus hautes concentrations en NH_4^+ , ayant présenté une latence importante avant le démarrage de la production de méthane, les réinjections avaient pour but de confirmer l'acclimatation de l'inoculum.

Tableau 25 : Nomenclature des expériences en microcosmes (partie 2/3).

Expériences "Concentration NH_4^+ "										
Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	$[\text{NH}_4^+]$ (g.L ⁻¹)				
T (1,2 & 3)	Lixi ISDND	Ø	Ø	Milieu BMP + carbonate	35	0,180				
A (1,2 & 3)	Lixi ISDND	Acétate	3,0 g.L ⁻¹							
C1 (1 & 2)	Lixi ISDND acclim*	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	Milieu BMP + carbonate		35	0,180			
C1 (3)		Acétate marqué**								
C2 (1 & 2)		Acétate								
C2 (3)		Acétate marqué**								
C3 (1 & 2)		Acétate								
C3 (3)		Acétate marqué**								
C4 (1 & 2)		Acétate								
C4 (3)		Acétate marqué**								
C3-b (1 & 2)		Lixi ISDND acclim****			Acétate			3,3 g.L ⁻¹	Milieu BMP + carbonate	3,600
C4-b (1 & 2)									Milieu BMP + carbonate	5,400
C4 (1 & 2)	Lixi ISDND acclim****	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	Milieu BMP + carbonate	35	5,400				
C4 (3)		Acétate marqué**								
Expériences "OSA"										
Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	$[\text{NH}_4^+]$ (g.L ⁻¹)				
Lixi-I1 (1)	Lixiviat d'ISDND *1	Acétate	3,0 g.L ⁻¹	milieu BMP + carbonate	35	4,500				
Lixi-I1 (2)		Acétate marqué*								
Lixi-I2 (1)	Lixiviat d'ISDND *5	Acétate								
Lixi-I2 (2)		Acétate marqué*								
Lixi-I3 (1)	Lixiviat d'ISDND *10	Acétate								
Lixi-I3 (2)		Acétate marqué*								

*Lixi ISD après acclimatation à l'acétate
 *** 2nd injection d'acétate

** marqué uniquement sur l'atome de carbone du groupement méthyle $\text{C}^*\text{H}_3\text{COOH}$

• **Essais "OSA"**

Afin d'étudier les micro-organismes impliqués dans la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate identifiée dans certaines des expériences précédentes, trois séries d'incubation ont été réalisées. Afin de privilégier l'établissement de cette réaction, une concentration élevée en azote ammoniacal a été utilisée (cf. Chapitre 2, § 1.2.6.3 L'azote ammoniacal). Différentes quantités d'inoculum (provenant d'un lixiviat d'ISDND) ont été introduites dans les microcosmes afin de favoriser la mise en place de populations de micro-organismes hétérogènes. Ces expériences, réalisées en duplicat, ont reçu comme substrat pour l'une, de l'acétate naturel et pour l'autre, de l'acétate enrichi sur le groupement méthyle (approche déjà utilisée pour les essais "effet de la $[\text{NH}_4^+]$ "). La nomenclature utilisée dans le cadre de ces expériences est détaillée dans le Tableau 25.

• Essais "Méthanisation"

Tableau 26 : Nomenclature des expériences en microcosmes (partie 3/3).

Expériences "Méthanisation"						
Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	[NH ₄ ⁺] (g.L ⁻¹)
BG1-35 (1, 2 et 3)	Boue digéré de STEP	100 % Biodéchets / 0 % Déchets verts	5 g de MV	Solution carbonate utilisée pour ajuster le taux de MS à 90 %	35	0
BG2-35 (1, 2 et 3)		75 % Biodéchets / 25 % Déchets verts				
BG3-35 (1, 2 et 3)		50 % Biodéchets / 50 % Déchets verts				
BG4-35 (1, 2 et 3)		25 % Biodéchets / 75 % Déchets verts				
BG5-35 (1, 2 et 3)		0 % Biodéchets / 100 % Déchets verts				
BG1-55 (1, 2 et 3)	Boue de digesteur thermophile	100 % Biodéchets / 0 % Déchets verts	5 g de MV	Solution carbonate utilisée pour ajuster le taux de MS à 90 %	55	0
BG2-55 (1, 2 et 3)		75 % Biodéchets / 25 % Déchets verts				
BG3-55 (1, 2 et 3)		50 % Biodéchets / 50 % Déchets verts				
BG4-55 (1, 2 et 3)		25 % Biodéchets / 75 % Déchets verts				
BG5-55 (1, 2 et 3)		0 % Biodéchets / 100 % Déchets verts				
B (1 et 2)	Inoculum de digesteur thermophile adapté à la consommation de biodéchets	100 % Biodéchets puis au 2/3 de la production de méthane, 100 % Biodéchets de nouveau	1 g de MV, puis de nouveau 1 g de MV au 2/3 de la production de méthane	Solution carbonate utilisée pour ajuster le taux de MS à 90 %	55	0, puis 8 g.L ⁻¹ lors de la seconde introduction de biodéchets
BN (1 et 2)		100 % Biodéchets puis au 2/3 de la production de méthane, 100 % Biodéchets de nouveau				
BV (1 et 2)		100 % Biodéchets puis au 2/3 de la production de méthane, 25 % Biodéchets / 75 % déchets verts				

Généralement, lors de la méthanisation des DND, des déchets verts sont également introduits. A certaines périodes (printemps), les méthaniseurs doivent faire face à un afflux important de déchets verts. Dans ces méthaniseurs, il a pu être constaté une diminution de la production de méthane. L'hypothèse envisagée, suite à ce constat, est que la dégradation des déchets verts entraînerait une production importante d'azote ammoniacal, conduisant à l'inhibition de la méthanogenèse. Dans le cadre de cette problématique, le système expérimental (microcosmes) a été adapté afin de reproduire au mieux les conditions de fonctionnement des méthaniseurs industriels de déchets.

Dans une première série d'expériences, l'augmentation effective de la concentration en azote ammoniacal lors de l'introduction de quantités plus importantes de déchets verts, a été vérifiée. L'effet du mélange sur les premières étapes de la dégradation anaérobie (avant la méthanogenèse) a également pu être étudié. Pour ce faire, différentes proportions d'un mélange déchets verts/biodéchets ont été incubées à 35 et 55°C, en condition de méthanisation humide, avec respectivement un inoculum provenant d'une boue digérée de STEP (mésophile) et un inoculum provenant d'un méthaniseur de déchets (thermophile). La nomenclature utilisée dans le cadre de ces expériences est détaillée dans le Tableau 26.

La deuxième série d'expériences a été réalisée pour tenter de définir dans quelles mesures le NH_4 est responsable des phénomènes d'inhibition de la DA. Des incubations avec des conditions similaires à celles d'un méthaniseur ont été effectuées. Ces incubations ont été réalisées à 55°C, avec des biodéchets et un inoculum provenant d'un méthaniseur thermophile de déchets non dangereux préalablement acclimaté à consommer le biodéchets reconstitué. Après une première incubation de biodéchets, lorsque la production de biogaz a atteint les 2/3 de la production théorique attendue, des biodéchets ont été réinjectés, mélangés soit avec 8 g.L⁻¹ de NH_4 (BN) soit avec 75 % de déchets verts (BV). Un témoin est réalisé en réinjectant seulement des biodéchets (B). La nomenclature utilisée dans le cadre de ces expériences est détaillée dans le Tableau 26.



Figure 47 : Photographies des microcosmes à 35°C et 55°C.

5. Les colonnes de percolation ou mésocosmes

L'objectif principal de la mise en œuvre et du suivi de ces essais sur colonnes de percolation (tâche 1.2.5 du projet ANR-Precodd-Bioréacteur) est de quantifier l'impact de la recirculation d'effluents de différentes qualités, sélectionnés à partir des résultats obtenus lors d'expériences en microcosmes (réalisées dans le cadre de la tâche 1.2.4 du projet ANR-Precodd-Bioréacteur), sur l'intensité et la cinétique des processus de dégradation des déchets lors de leur stockage à travers des expérimentations en pilotes de laboratoire en condition de recirculation. Les trois effluents testés en duplicat pour la recirculation sont : un lixiviat d'installation de stockage de déchets non dangereux (Lix-ISDND), une boue digérée de station d'épuration (Boue-STEP) et un lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts (Lix-PCDV).

A cette fin, 6 essais (Tableau 27) ont été mis en œuvre.

Tableau 27 : Nomenclature des expériences en colonnes de percolation.

Colonne	Lix-ISDND		Boue-STEP		Lix-PCDV	
	N°1	N°2	N°1	N°2	N°1	N°2
Substrat	5 kg de déchet reconstitué					
Effluent recirculé	Lixiviat d'ISDND		Boue digérée de STEP		Lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts	

5.1. Le dispositif expérimental

5.1.1. Les colonnes de percolation

Six colonnes de percolation (cf. Figure 48) ont été conçues et réalisées spécifiquement dans le cadre du projet Precodd-Bioréacteur. Elles sont constituées de matériaux permettant d'éviter toute contamination par des micropolluants organiques (inox, téflon...) et disposent chacune d'un couvercle démontable (afin de faciliter le remplissage) qui les rend hermétiques et résistantes à une surpression d'au moins 1 bar.



Figure 48 : Les colonnes de percolation.

Les dimensions et les caractéristiques des colonnes de percolation sont données dans le Tableau 28 et la Figure 49.

Tableau 28 : Dimensions des colonnes.

Dimensions extérieures (sans sondes et robinets) (hauteur *section)	525 x 330	<i>mm x mm</i>
Hauteur intérieure	460	<i>mm</i>
Diamètre intérieur	269	<i>mm</i>
Section intérieure	0,057	<i>m²</i>
Volume intérieur	0,026	<i>m³</i>
	soit 26,13	<i>L</i>

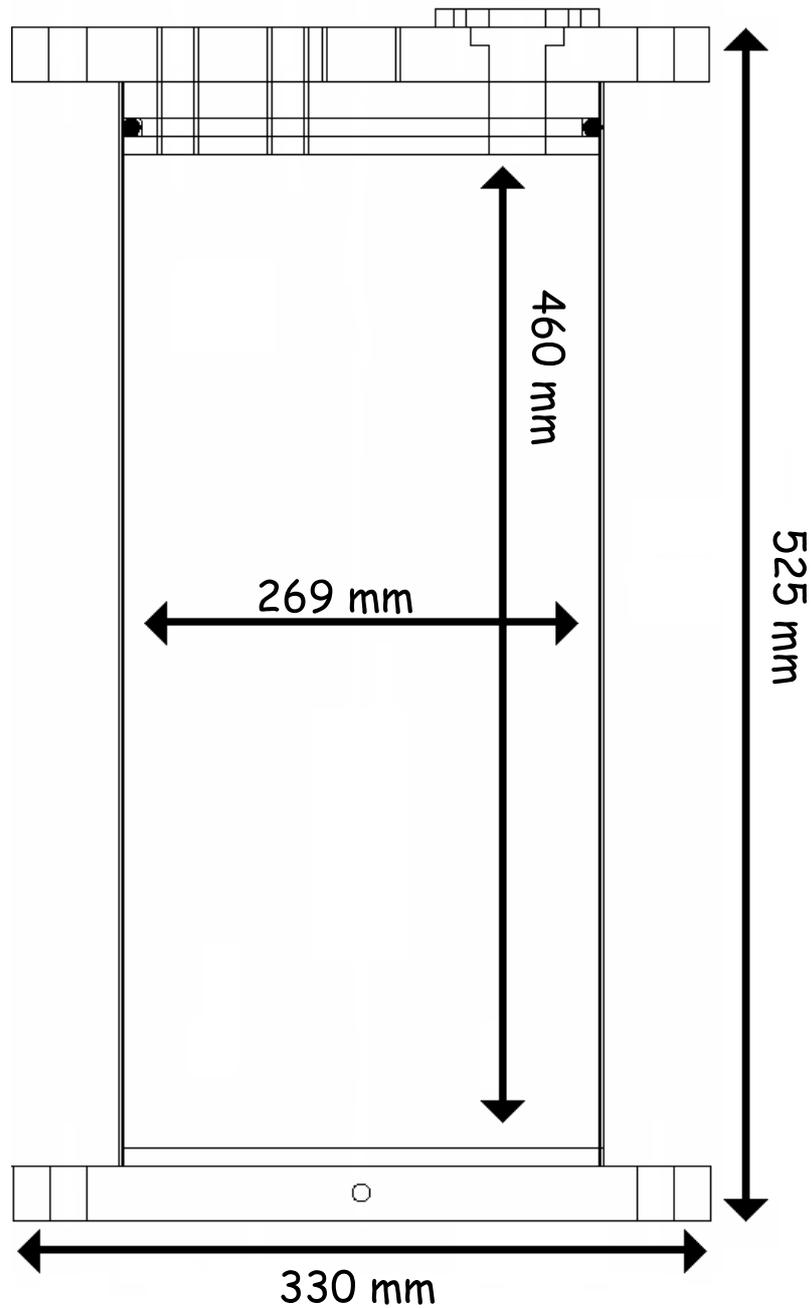


Figure 49 : Schéma technique des dimensions des colonnes.

La Figure 50 détaille le schéma de principe des colonnes de percolation. Le déchet introduit dans les colonnes sur une couche drainante va produire du biogaz en se dégradant. Ce biogaz peut être collecté en actionnant une électrovanne qui libère le surplus (par rapport à la pression atmosphérique) dans un sac Tedlar. L'analyse de la composition de ce biogaz est ensuite réalisée sur un microGC (μ GC, cf. Chapitre 3, § 6.1.1 Analyse de la composition du biogaz). Les colonnes sont également équipées d'un dispositif d'injection d'effluent à leurs sommets. Ce dispositif permet, grâce à un dispositif d'aspersion, de répartir uniformément le liquide injecté à la surface des déchets. Un dispositif de prélèvement de lixiviat est situé en

bas des colonnes et un système de surveillance du niveau de liquide dans les colonnes est également présent.

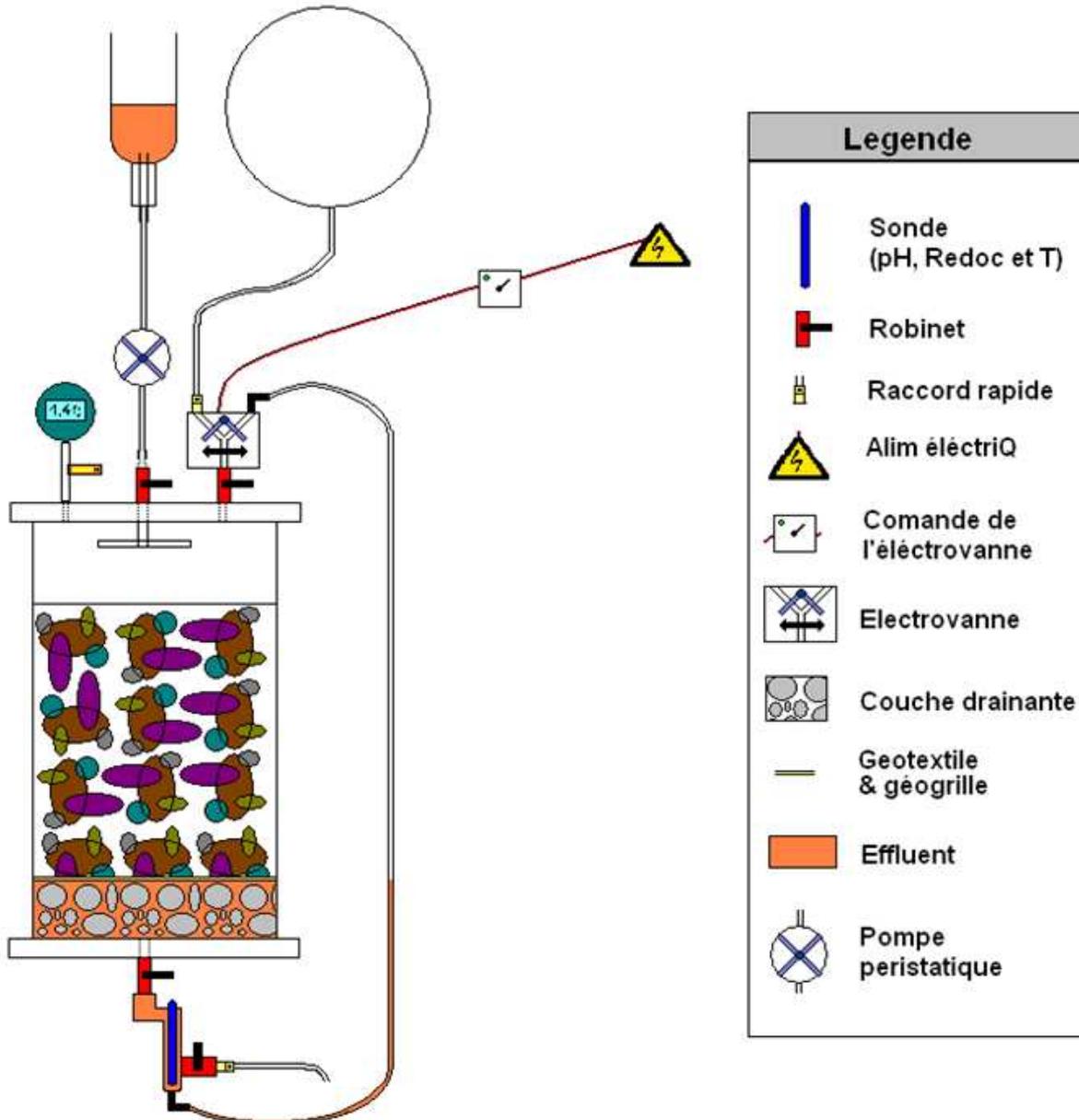


Figure 50 : Schéma de principe des colonnes.

Les colonnes, une fois remplies et connectées aux instruments de mesures (cf. Chapitre 3, § 5.1.2 Instrumentation et système d'acquisition), sont placées dans une pièce thermostatée (4 m x 3 m x 3 m) maintenue à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ construite spécifiquement pour les besoins de cette expérience (cf. Figure 51).

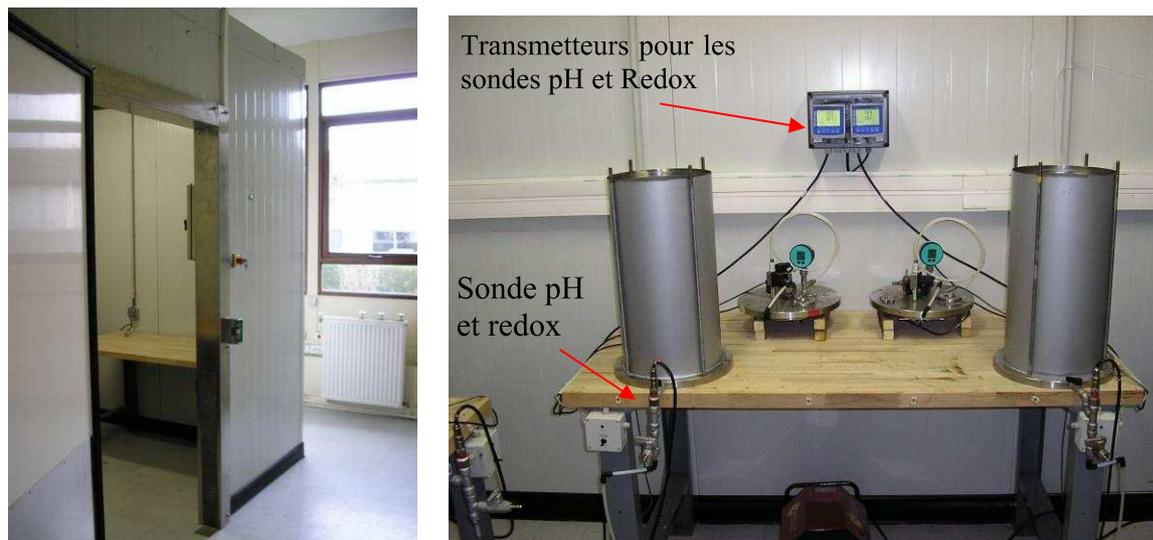


Figure 51 : Vue extérieure et intérieure de l'enceinte thermostatée.

5.1.2. Instrumentation et système d'acquisition

La pression, la température, le pH et le potentiel redox sont suivis en continu. En effet, le développement d'une centrale d'acquisition et d'une interface graphique, programmée sous Labview (réalisées par l'équipe "instrumentation et mesure" de l'unité Hydrosystèmes et Bioprocédés du Cemagref d'Antony) permet l'acquisition des données toutes les 10 minutes.

Les sondes combinées pH, température et potentiel d'oxydo-réduction (électrode pH Redox et température Inprop® 4250 SG 120/PT1000/ISM, Metler Toledo) ont leur électronique associée (transmetteur M 300, Metler Toledo), fournissant des signaux analogiques 0-20 mA. Les manomètres de pression (manomètre numérique LEO3, Citec) fournissent un signal 4-20 mA. Chaque pilote est équipé d'une électrovanne (commandée manuellement ou par logiciel) afin de prélever le biogaz pour analyses.

Un système autonome de régulation de température (Figure 52) a été mis en place afin de maintenir une température de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans l'enceinte thermostatée (régulateur PID, sonde PT100, relais statique et radiateur électrique soufflant). Ce dispositif est entièrement indépendant du reste de la chaîne de mesure. Il s'agit d'un régulateur fabriqué par la société WATLOW, à boucle PID. Il est utilisé en association avec une sonde de type PT100, d'une interface de puissance type relais statique pour la commande de puissance, et d'un radiateur électrique soufflant (type C3 SOVELOR).

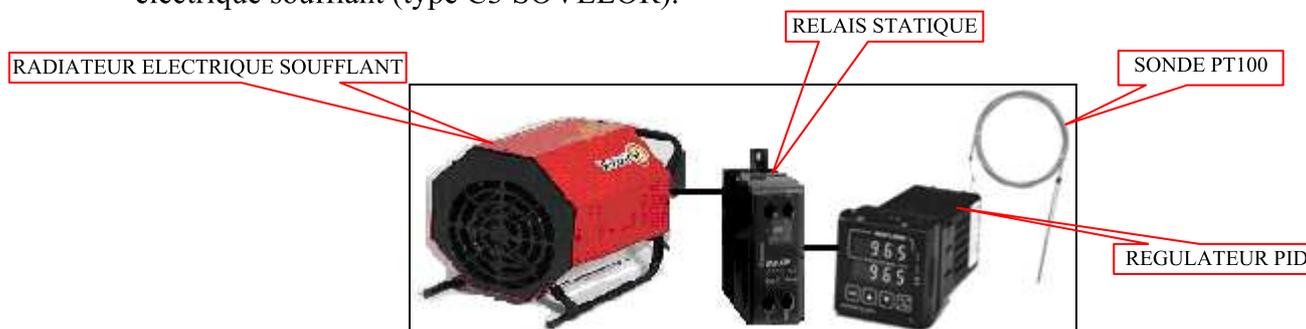


Figure 52 : Système de régulation de température de l'enceinte thermostatée.

Pour des questions de sécurité, l'ensemble de la chaîne d'acquisition est situé à l'extérieur de la salle thermostatée. Pour cela, nous avons eu recours au système modulaire NI CompactDAQ, en utilisant un châssis NI cDAQ-9172 équipé de :

- 4 modules NI 9203 de 8 entrées analogiques 0-20 mA ; 6 entrées par modules sont utilisées et chaque module gère un type de paramètre (1 module pour les températures, 1 pour le pH...);
- 1 module spécifique NI 9217 pour sonde PT100 pour le suivi de la température ambiante de la salle thermostatée ;
- 1 module NI 9421 pour les interrupteurs de commandes manuelles des électrovannes ;
- 1 module NI 9472 pour actionner les électrovannes ;
- Le châssis est connecté à l'ordinateur par liaison USB.

Le logiciel, développé sous LabVIEW, est composé de plusieurs onglets :

- L'onglet principal indique l'ensemble des valeurs de mesures et affiche les alarmes des paramètres hors tolérances. Ces paramètres sont prédéfinis dans l'onglet n°2.
- Les 4 onglets suivants sont les représentations graphiques, dans le temps, de l'évolution des paramètres températures, pH, Redox et pressions.

Le logiciel enregistre tous les paramètres à un pas de temps prédéfini. Les changements d'états des électrovannes sont enregistrés en temps réel dans le fichier (n° d'électrovanne, ouverture, fermeture). Le fichier mensuel, ainsi constitué, est horodaté et exploité par la suite à l'aide d'un tableur.

Du fait de l'éloignement du bâtiment où se trouve l'enceinte thermostatée par rapport aux bureaux, et afin de faciliter la surveillance régulière des pressions, le système est connecté au réseau informatique interne afin de permettre l'accès à distance au programme de surveillance des paramètres (pression, température, pH et potentiel d'oxydo-réduction) ainsi qu'à certaines commandes (ouverture/fermeture des électrovannes).

5.1.3. Les substrats

5.1.3.1. Le déchet reconstitué

Le déchet reconstitué utilisé dans les colonnes de percolation est le même que celui utilisé dans les microcosmes (cf. Chapitre 3, § 1.2.1 Déchet reconstitué (type OM)). La quantité de déchets introduite dans chaque colonne a été adaptée afin, qu'une fois l'ensemble des éléments introduits (couche drainante, déchets et système d'aspersion), un ciel gazeux suffisamment important soit conservé et un bon fonctionnement de l'ensemble du système d'injection soit possible. Une masse de 5 kg de déchets reconstitués a été déterminée comme étant adaptée.

5.1.3.2. Les effluents

A partir d'expériences préliminaires réalisées avec quinze effluents différents (tâche 1.2.4 du projet ANR Precodd-Bioréacteur) trois effluents ont été sélectionnés: un lixiviat d'ISDND (ISDND de Vert-le-Grand, 91), une boue de STEP (digesteur d'Evry, 91) et un lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts (plateforme de compostage de Vert-le-Grand, 91). Le lixiviat d'ISDND sert de "témoin" de ce qui se pratique actuellement dans les ISDND bioactives. La boue de STEP a été sélectionnée car il s'agit d'un effluent contenant une flore méthanogène active importante. Enfin, le lixiviat de plateforme de compostage de

déchets verts a, quant à lui, été choisi car lors des expériences préliminaires en microcosme il avait semblé avoir un effet sur la dégradation de la matière organique réfractaire contenue dans les déchets. Les prélèvements ont été réalisés le 26 janvier 2009, dans de grands bidons en inox (50 L) et sont depuis stockés en chambre froide à 4°C.

Suite à l'épuisement des réserves d'effluents, une seconde série de prélèvements a dû être réalisée afin de pouvoir continuer les réinjections hebdomadaires. Le lixiviat d'ISDND (ISDND de Vert-le-Grand, 91) et le lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts (plateforme de compostage de Vert-le-Grand, 91) ont été à nouveau prélevés le 14 avril 2010. La boue de STEP (digesteur de Creil, 60) a été prélevée le 10 juin 2010. La réinjection des nouveaux effluents (second stock) a débuté simultanément sur l'ensemble des colonnes le 17 juin 2010.

5.2. Paramètres

5.2.1. Taux de compactage

Le tassement des déchets dans les colonnes a été fixé à $300 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Cette valeur relativement faible pour une ISD avait pour but d'obtenir une cinétique de dégradation acceptable à l'échelle de notre expérimentation.

5.2.2. Débit de recirculation

Le débit de recirculation est fixé à 5,7 litres d'effluents par tonne de déchets et par jour ou $2,08 \text{ m}^3/\text{tonne}/\text{an}$. En pratique, cela correspond à une injection de 200 mL par semaine. Le choix de ce taux de recirculation relativement élevé (cf. Tableau 4) avait pour but de maximiser l'effet des effluents injectés sur la dégradation des déchets et accélérer les cinétiques de dégradation.

5.3. Modes opératoires

5.3.1. Remplissage des colonnes

Dans chaque pilote 5 kg de déchets ont été introduits en février 2009. Les déchets utilisés proviennent du stock de déchets reconstitués selon la composition modecom (cf. Chapitre 3, § 1.2.1 Déchet reconstitué (type OM)). Une couche granulaire (géotextile – granulats – géotextile) a tout d'abord été placée au fond de chaque pilote afin de faciliter le drainage des effluents, comme illustré sur les photographies présentées en Figure 53. Le géotextile est un géotextile non tissé aiguilleté dont l'ouverture de filtration est de $72 \pm 6 \mu\text{m}$ ($k=2$). La couche drainante de granulats (granulats concassés silicieux de granulométrie inférieure à 20mm) fait 5 cm d'épaisseur. Les géotextiles placés sous et sur la couche drainante ont pour but d'empêcher le passage des déchets.

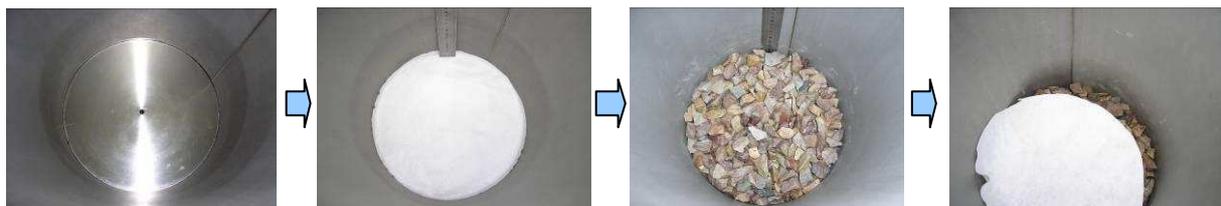


Figure 53 : Mise en place de la couche granulaire.

Les 5 kg de déchets humidifiés (6 litres d'eau pour 5 kg de déchets) ont ensuite été introduits dans un moule ayant le même diamètre que les pilotes, comme illustré sur la Figure 54. Les déchets ont ensuite été compactés à l'aide d'une presse afin d'obtenir une densité de 0,3 (Figure 54). Les déchets compactés ont enfin été introduits dans les pilotes (Figure 54).



Figure 54 : Remplissage, compaction et introduction des déchets dans les pilotes.

Une première saturation à l'eau de 24 heures dans chaque pilote, suivie d'une vidange, a été effectuée afin de se placer à la capacité au champ. Dans chaque colonne, 700 mL d'effluent ont ensuite été introduits. Au bout d'une semaine, les pilotes ont été à nouveau vidangés afin de se placer à la capacité au champ et, depuis, 200 mL d'effluent sont introduits chaque semaine ce qui correspond à un débit d'injection de $2,08 \text{ m}^3 \cdot \text{tonne}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$.

5.3.2. Suivi des pilotes

Pour suivre l'évolution de la dégradation des déchets dans les colonnes de percolation, un suivi continu de quatre paramètres (température, pH, potentiel d'oxydo-réduction et pression) est réalisé grâce à un enregistrement continu des données *via* l'interface développée sous Labview. Ce suivi est complété par un suivi discontinu réalisé par des analyses régulières des effluents gazeux et liquides. De manière pratique, une fois par semaine, 200 mL d'effluent sont injectés en tête de colonne et 200 mL de lixiviat sont prélevés en fond de colonne. De plus, quand la pression dans la colonne est suffisamment élevée ($P > 300 \text{ mbar}$), l'excédent de biogaz présent dans le ciel gazeux est prélevé. Le protocole utilisé pour un suivi des phases gazeuse et liquide est généralement le suivant :

- **Mesure de la pression** à l'aide des manomètres respectivement montés sur chacune des colonnes. Cette mesure est réalisée directement dans la pièce thermostatée ($35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$).
- **Prélèvement et analyse du biogaz.** Si la pression dans les colonnes est supérieure à 300 mbar, le biogaz est prélevé jusqu'à ce que les colonnes soient en équilibre avec la pression atmosphérique. Pour ce faire un sac de prélèvement en Tedlar (sachet Tedlar®, fluorure de polyvinyle (PVF), 8L) préalablement vidé de tout gaz et munie d'un système de connexion adapté (raccord rapide avec clapet d'arrêt activé à l'ouverture du raccord, $\varnothing 6,4 \text{ mm}$ Derlin), est connecté à l'électrovanne de chaque colonne. Le robinet de sortie liquide en bas de colonne est fermé afin d'éviter au liquide qui se trouve dans le système de contrôle du niveau ne se vide et que l'électrode ne se retrouve hors du lixiviat. L'électrovanne est ensuite actionnée. Une fois que l'équilibre est atteint, la pression finale est notée puis l'électrovanne est fermée. Le sac tedlar est ensuite déconnecté puis connecté au système d'injection de

l'appareil de chromatographie en phase gazeuse afin d'analyser la composition du biogaz (μ GC, cf. Chapitre 3, § 6.1.1 Analyse de la composition du biogaz).

- **Prélèvement de gaz pour analyse isotopique** : 2 fois 7 mL sont prélevés avec une seringue à gaz (SGE, gas tight 10 mL) munie d'un système de fermeture, puis introduits dans des vacutainers préalablement évacués et identifiés de la manière décrite en Figure 45.



Figure 55 : Photographies (A) du prélèvement du biogaz dans les colonnes, (B) du prélèvement de lixiviat et (C) de l'injection de l'effluent.

- **Prélèvement de lixiviat** réalisé chaque semaine. Pour ce faire, le robinet de sortie du gaz situé sous l'électrovanne est fermé afin d'éviter que le gaz puisse s'échapper par le système de contrôle du niveau de liquide lors de l'ouverture du robinet de prélèvement liquide. 200 mL de lixiviat en fond de pilote sont vidangés en une fois chaque semaine. 50 mL sont conservés dans un tube Falcon de 50 mL. 1,5 mL de lixiviat sont prélevés dans ce tube et transférés dans un tube Eppendorf de 2 mL.

- **Mesure du pH** sur le lixiviat brut dans le tube Falcon après agitation (cf. Chapitre 3, § 6.2.1 Mesure du pH).

- **Centrifugation** de 1,5 mL de lixiviat dans 2 tubes Eppendorf à 13 400 rpm pendant 10 min (Minispin, Eppendorf), puis extraction du surnageant avec une pipette munie d'un cône à usage unique. Le surnageant de chaque tube est introduit dans un second tube Eppendorf de 2 mL.

- **Congélation** des 3 tubes (2 Eppendorfs et un Falcon) préalablement étiquetés (bouteille, date, type d'échantillon) (1 brut, 1 culot de centrifugation, 1 surnageant de centrifugation) pour analyses ultérieures. La congélation à -20°C a pour but de conserver les échantillons en l'état.

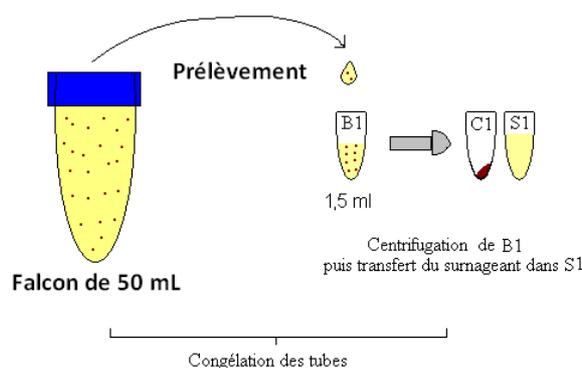


Figure 56 : Protocole de l'échantillonnage du lixiviat.

- **Préparation des effluents** réalisée chaque semaine. Depuis leurs prélèvements, les effluents sont stockés en chambre froide à 4°C dans des bidons en inox. Chaque semaine, la quantité nécessaire à l'injection est prélevée dans ces bidons. Avant tout prélèvement, les effluents sont agités afin de permettre aux prélèvements d'être homogènes. Ils sont transférés dans des bouteilles en verres. La boue digérée de station d'épuration est passée sur un tamis (\varnothing de 2 mm) pour éviter au système d'injection de la colonne de se retrouver obstrué. Les deux autres effluents ne nécessitent pas cette étape. Régulièrement, des échantillons des effluents sont prélevés pour évaluer leurs évolutions au cours du temps.

- **Injection d'effluents** réalisée chaque semaine. 200 mL d'effluents sont injectés sur le haut du massif de déchets. Pour ce faire, l'effluent est introduit dans une ampoule de coulée graduée de 1000 mL. Cette ampoule est ensuite reliée à une pompe péristaltique qui permet d'injecter la quantité désirée d'effluents dans chacune des colonnes.

Les données continues et les données relevées lors des opérations de dégazage et de prélèvements/injection de liquide sont entrées dans un tableur Excel qui permet de traiter l'ensemble des informations.

6. Méthodes analytiques

6.1. Analyse du biogaz

6.1.1. Analyse de la composition du biogaz

La composition du biogaz est analysée à l'aide d'un appareil de micro-chromatographie portable en phase gazeuse (Varian CP4900) dit μ GC. L'analyse se déroule directement dans la bouteille grâce à un montage qui relie le μ GC à une aiguille ($\varnothing = 0,45$ mm) insérée dans le microcosme à travers le septum (ou directement dans le sac tedlar grâce à une connexion spécifique). L'instrument permet de lancer jusqu'à 15 analyses à la suite *via* l'utilisation d'une séquence d'analyse et d'un système d'injection multivoies. Chaque analyse est réalisée 2 fois pour éliminer les gaz qui auraient pu contaminer le système d'injection.

Le μ GC utilisé est équipé de quatre colonnes d'élution montées en parallèles qui permettent de séparer et de quantifier les gaz suivants : O_2 , N_2 , CH_4 , CO_2 , N_2O , H_2S , NH_3 . Le détecteur est un détecteur à conductivité thermique (TCD), c'est-à-dire qu'il renvoie un signal correspondant à la différence de conductivité thermique entre les composés de l'échantillon et le gaz vecteur. La sensibilité dépend de la différence de conductivité thermique entre les gaz de l'échantillon et le gaz vecteur, c'est pourquoi, l'hélium est utilisé comme gaz vecteur sur 3 colonnes d'élution et l'Argon sur la colonne permettant de visualiser le pic de NH_3 .



Figure 57 : Photographie du μ GC et de son dispositif d'injection.

L'étalonnage du μ GC est réalisé régulièrement avec trois mélanges de gaz : un mélange de 5 % NH_3 et de 95 % N_2 (Linde Gas SA), un mélange de 38 % CO_2 , 2 % H_2 , 0,5 % H_2S , 6,5 % N_2 , 3 % N_2O , 50 % CH_4 (Air products) et un mélange de 95 % N_2 et de 5 % H_2 (Linde Gas SA).

6.1.2. Mesure de la composition isotopique du biogaz

Les compositions isotopiques du méthane et du dioxyde de carbone sont analysées à l'aide du couplage entre un chromatographe en phase gazeuse (Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation, USA), un four de combustion (Finnigan GC combustion III, Thermo Electron Corporation, USA) et un spectromètre de masse isotopique (Delta plus Isotope Ratio Mass Spectrometer, Thermo Electron Corporation, USA). L'ensemble (GC-C-IRMS) est équipé d'un passeur automatique (Triplus AS, Thermo Electron Corporation, USA).



Figure 58 : Photographie de la plateforme d'analyse isotopique du Cemagref.

Le couplage chromatographie en phase gazeuse-combustion-spectrométrie de masse isotopique (GC-C-IRMS) est représenté Figure 59. L'injection est réalisée par le passeur automatique (Triplus AS, Thermo Electron Corporation, USA) qui vient prélever le gaz directement à travers le septum des vachutainers. A cette fin, il est équipé d'une seringue à gaz de 100 μL de capacité. Le chromatographe en phase gazeuse (GC) est quant à lui équipé d'une colonne (Paraplot Q) qui permet de séparer les gaz (CH_4 et CO_2). Les paramètres utilisés pour réaliser cette séparation sont, au niveau de l'injecteur, l'utilisation du mode split avec un ratio de 20 à une température de 150°C . En ce qui concerne les paramètres du four du GC, le programme utilisé est le suivant : 3 min à 35°C puis une montée en température de 60°C par minute jusqu'à 180°C suivie d'un plateau de 24 secondes à 180°C . Le flux de gaz vecteur (hélium) dans la colonne est constant et fixé à $1,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Ensuite, ces gaz passent dans le four capillaire de combustion (constitué d'un tube de quartz rempli d'oxyde de cuivre porté à 940°C) où ils sont transformés en CO_2 . D'autres composés tels que de l'eau ou des oxydes d'azote peuvent également être formés. Les oxydes d'azote sont réduits en N_2 par passage à travers un four capillaire rempli de cuivre porté à 600°C . L'eau est ensuite éliminée grâce à

une membrane hygroscopique (piège à eau). Le CO_2 résultant de la combustion de chaque composé carboné ainsi purifié est introduit dans la source à impact électronique du spectromètre de masse isotopique. Le CO_2 ainsi ionisé est chargé positivement. Les ions CO_2^+ sont accélérés et projetés sous forme d'un faisceau très fin dans un champ magnétique où ils sont déviés sur différentes trajectoires circulaires en fonction de leur rapport masse sur charge. Les différents isotopes du carbone sont ensuite détectés par trois collecteurs distincts (3 cages de Faraday) placés sur la trajectoire des ions de masse m/z 44, 45, 46. Un amplificateur relié aux collecteurs permet d'amplifier les signaux électriques qui dépendent de la quantité d'ions collectés. Ces signaux sont ensuite transmis à un ordinateur où ces données sont analysées et les rapports isotopiques 45/44 et 46/45 sont déterminés et comparés à ceux d'un gaz de référence (étalonné par rapport au standard international) introduit en début et fin d'analyse. Ces données permettent de calculer le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de chaque composé présent dans le mélange. Chaque analyse est réalisée 3 fois pour s'assurer de la bonne répétabilité de la mesure.

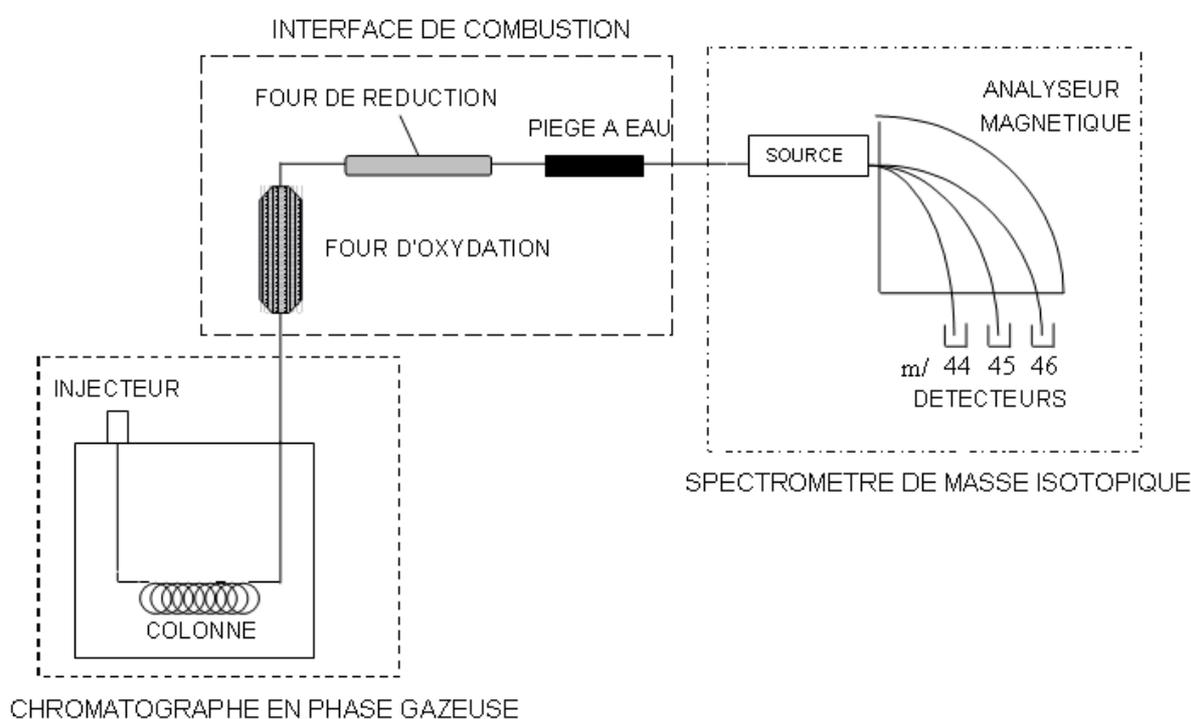


Figure 59 : Représentation schématique du couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse isotopique.

6.2. Analyse du lixiviat

6.2.1. Mesure du pH

Le pH est mesuré lors de chaque prélèvement liquide dans l'échantillon brut. La mesure est réalisée avec un pH-mètre IQ160 de résolution 0,01. L'échantillon est agité, puis la sonde est plongée dans le lixiviat tout en étant lentement agitée jusqu'à stabilisation de la mesure.

6.2.2. Mesure du Carbone Dissous (COD/CID)

Le CID et le COD sont analysés sur les surnageants des échantillons centrifugés. La norme utilisée est la norme NF EN 1484. Une acidification de l'échantillon permet de transformer le carbone inorganique en dioxyde de carbone, qui est détecté par un analyseur infrarouge à double faisceau. Une oxydation est alors faite au persulfate de potassium à 95°C

de façon à transformer le carbone organique en dioxyde de carbone. L'appareil utilisé est un analyseur BIORITECH model 1010. La calibration est faite en 3 points (0, 10 & 50 mgC.L⁻¹ de solution de phtalate de potassium).

6.2.3. Mesure des AGV

Les concentrations en AGV (acide lactique, formique, acétique, propionique, butyrique, isobutyrique) sont déterminées par chromatographie ionique (Dionex DX-120) sur les surnageants conservés à -20°C. Le chromatographe est équipé d'une colonne échangeuse d'ions IONPAC® ICE-AS1 (9*250 mm) et la détection est réalisée par conductimétrie. Les éluents employés sont l'acide heptafluorobutyrique à 0,4 mmol.L⁻¹ et le TBAOH à 5 mmol.L⁻¹. Les calibrations sont faites entre 10 et 500 mg.L⁻¹ d'AGV. Les échantillons sont injectés à l'aide d'un autosampler (Dionex, A550).

6.2.4. Mesure des cations

Les concentrations en cations (NH₄⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺) sont déterminées par chromatographie ionique (Dionex DX-120) sur les surnageants conservés à -20°C. La norme NFT 90-048 a été utilisée. Le chromatographe est équipé d'une précolonne NG-1. La précolonne et la colonne échangeuse de cations sont respectivement IONPAC® CG16 (5*50 mm) et IONPAC® CS16 (5*250 mm). L'éluant employé est l'acide méthane sulfonique à 30 mmol.L⁻¹. Les calibrations sont faites entre 5 et 100 mg.L⁻¹ de cations. Les échantillons sont injectés à l'aide d'un autosampler (Dionex, A550).

6.2.5. Mesure de la composition isotopique du carbone de l'acétate

Les analyses de la composition isotopique de l'acétate ont été réalisées au Max Planck Institute (MPI) for Terrestrial Microbiology dans le département de Biogéochimie par M. Peter Claus et le Prof. Ralf Conrad. Deux types d'analyses différentes y ont été réalisés.

6.2.5.1. Mesure de la composition isotopique globale du carbone de l'acétate (moyenne des deux atomes de carbone)

Le dispositif utilisé au MPI pour réaliser ces analyses a déjà été décrit (Penning, Tyler et *al.* 2006d) et est rappelé succinctement ci-après.

Les instruments utilisés sont un IRMS de type Finnigan Delta Plus Advantage (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), une pompe-HPLC de type Spectra System P1000 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) et une interface LC-IRMS de type Finnigan LC IsoLink (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Les paramètres du HPLC sont : Phase mobile : 2 mM H₂SO₄; Colonne HPLC : Aminex HPX-87H (Bio Rad, Hercules, CA) ; Température : 35 °C; Flux : 300 µL.min⁻¹. Les paramètres de l'interface sont : Pompe de réactif 1 : 50 g.L⁻¹ Na₂S₂O₄, Flux : 50 µL.min⁻¹ ; Pompe de réactif 2 : 1,5 mol.L⁻¹ H₃PO₄, Flux: 50 µL.min⁻¹ ; Température : 99 °C)

6.2.5.2. Mesure de la composition isotopique du carbone du groupement méthyle de l'acétate

Le dispositif utilisé au MPI pour réaliser ces analyses est décrit par Penning en 2006 (Penning, Tyler et *al.* 2006d) et est rappelé succinctement ci-après.

L'acétate de l'échantillon liquide est purifié par HPLC qui collecte la fraction d'acétate. L'échantillon purifié est ensuite ajouté à une solution concentré de NaOH et séché sous vide

dans un tube en Pyrex. Les réactifs séchés sont pyrolysés sous vide à 400°C ce qui permet la conversion des carbonates des groupements carbonyle en dioxyde de carbone et celui des groupements méthyle en méthane. Les gaz sont ensuite analysés par GC-C-IRMS.

6.3. Analyses microbiologiques

6.3.1. Extraction d'ADN

Les culots des échantillons prélevés et centrifugés dans les incubations décrites précédemment sont utilisés pour l'extraction de l'ADN selon le protocole décrit dans le kit commercial QiaCube (QIAamp® DNA Stool Handbook) (Annexe 3).

6.3.2. PCR-ARISA

L'ADN extrait a été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les amorces (Tableau 29) :

- Archées 1389F pour des gènes 16S rRNA (Loy, Lehner et *al.* 2002) et 71R pour des gènes 23S rRNA (Casamayor, Massana et *al.* 2002), ce qui va amplifier la région intergénique située entre le 16S et le 23S.
- Bactéries ITSF - ITSREub pour les Bactéries

Tableau 29 : Amorces utilisées pour la PCR pré-ARISA.

Nom	Groupe ciblé	Séquence ciblée	Position E.coli1	Séquence (5'-3')	Références
ITSF	<i>Bacteria</i>	16S	1423-1443	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	(Cardinale, Brusetti et <i>al.</i> 2004)
ITSREub		23S	38-23	GCFCAAGCATCCACC	
1389F	<i>Archaea</i>	16S	1389-1406	ACGGGCGGTGTGTGCAAG	(Loy, Lehner et <i>al.</i> 2002)
71R		23S	71-92	TCGGYGCCGAGCCGAGCCATCC	(Casamayor, Massana et <i>al.</i> 2002)

La PCR a été réalisée selon le kit de Takara (Annexe 4). Pour cela, 1 µL d'ADN est mélangé à du Tampon PCR 1X, 0,025 Unités.µL⁻¹ de Taq polymérase, 0,2 mM de dNTP chacun (kit TaKaRa Ex Taq, TAKARA BIO INC.), 0,5 µg.mL⁻¹ de T4 gene 32 Protein (BioLabs) et 0,4 µM de chaque amorce pour un volume final de 25 µL. Le profil de températures utilisé sur un thermocycleur (ABI 9700) est le suivant :

Archées :

- Avant les cycles, 94°C pendant 5 min pour activer l'enzyme Taq polymérase,
 - 94°C pendant 1 min (phase de dénaturation),
 - 54,8°C pendant 1 min (phase d'hybridation des amorces),
 - 72°C pendant 2 min (phase d'élongation),
 - 72°C pendant 10 min (phase d'élongation finale).
- } 25 cycles sont effectués

Bactérie :

- Avant les cycles, 94°C pendant 5 min pour activer l'enzyme Taq polymérase,
 - 94°C pendant 1 min (phase de dénaturation),
 - 54,5°C pendant 1 min (phase d'hybridation des amorces),
 - 72°C pendant 2 min (phase d'élongation),
 - 72°C pendant 10 min (phase d'élongation finale).
- } 35 cycles sont effectués

La méthode ARISA (Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis) cible la région ITS (Intergenic transcribed spacer) située entre le gène de l'ARNr 16S et 23S. Cette région présente une hétérogénéité très élevée de taille et de composition en bases nucléotidiques (Fisher et Triplett 1999). Ces types de variations permettent de distinguer les micro-organismes phylogénétiquement proches. Un profil de la communauté microbienne est obtenu par une séparation électrophorétique des produits de PCR marqués par un fluorophore et ensuite par une détection sensible par laser sur un séquenceur automatisé. Fisher et Triplett (Fisher et Triplett 1999) ont rapporté que la taille des fragments ITS se trouve dans une gamme allant de 400 à 1.200 bp dans une étude de la diversité microbienne de trois environnements d'eau douce. Le principe de la technique ARISA est expliqué sur la Figure 60.

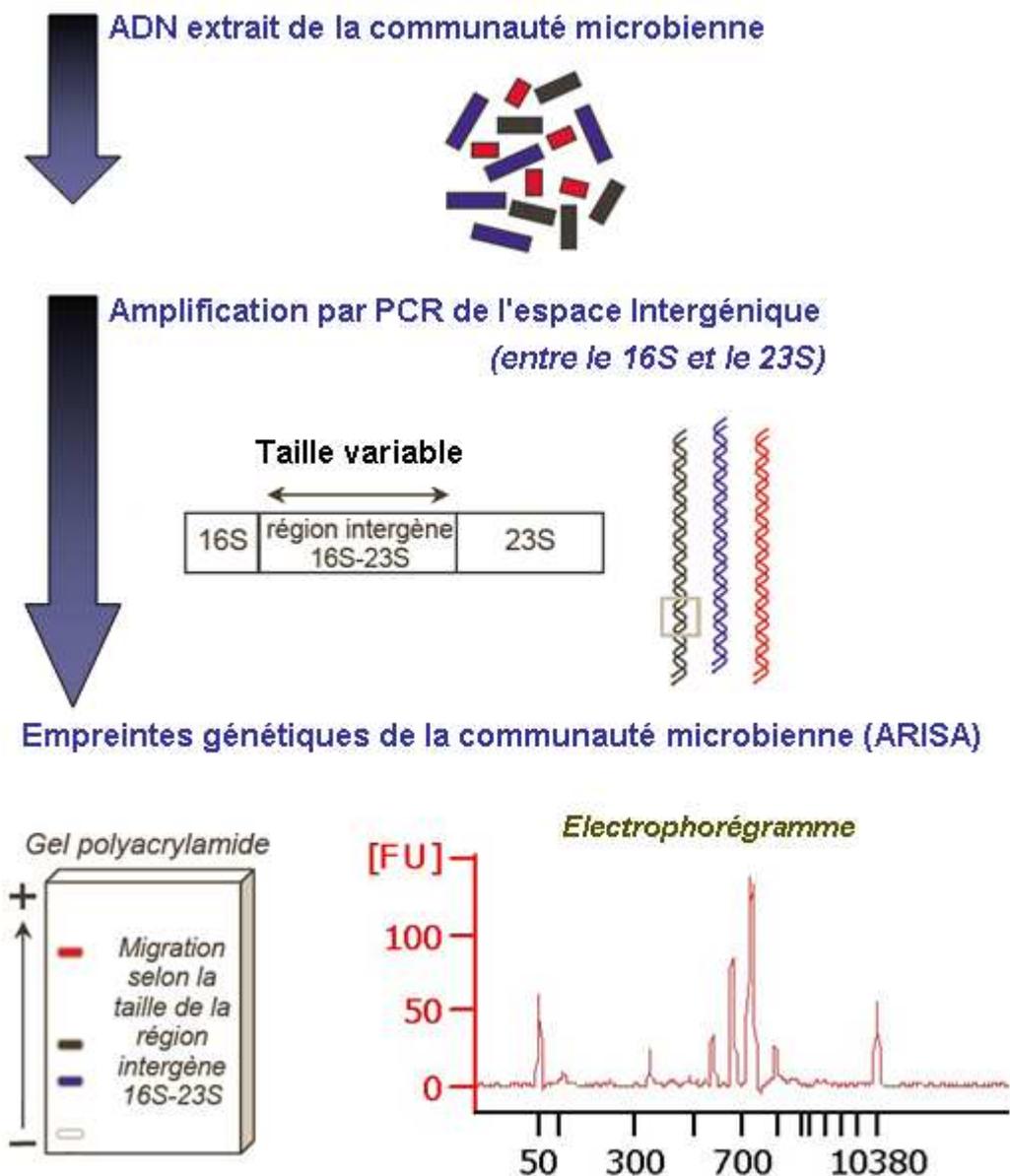


Figure 60 : Schéma de principe de l'ARISA.

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en fonction de leur taille en suivant le protocole Agilent DNA 7500 Kit (Agilent Technologies Inc., CA) (Annexe 5), puis

analysés par le logiciel Agilent 2100 Bioanalyzer (AgilentTechnologies Inc.). Le fichier de sortie du programme est un gel de migration et un électrophoregramme. La taille des bandes est déterminée par comparaison avec les électrophoregrammes obtenus pour des fragments étalons de tailles connues (ladder). L'aire des pics est également calculée par le logiciel.

6.3.3. FISH

Afin de visualiser in situ les populations pré-identifiées, la méthode FISH a été utilisée. Comme toute hybridation moléculaire, cette technique est basée sur l'appariement par liaison hydrogène de séquences complémentaires de la sonde et d'acides nucléiques recherchés. L'hybridation sur cellules entières est une technique qui permet d'observer l'image du micro-organisme au sein d'un échantillon complexe et de l'identifier. Le principe de la technique FISH est expliqué sur la Figure 61.

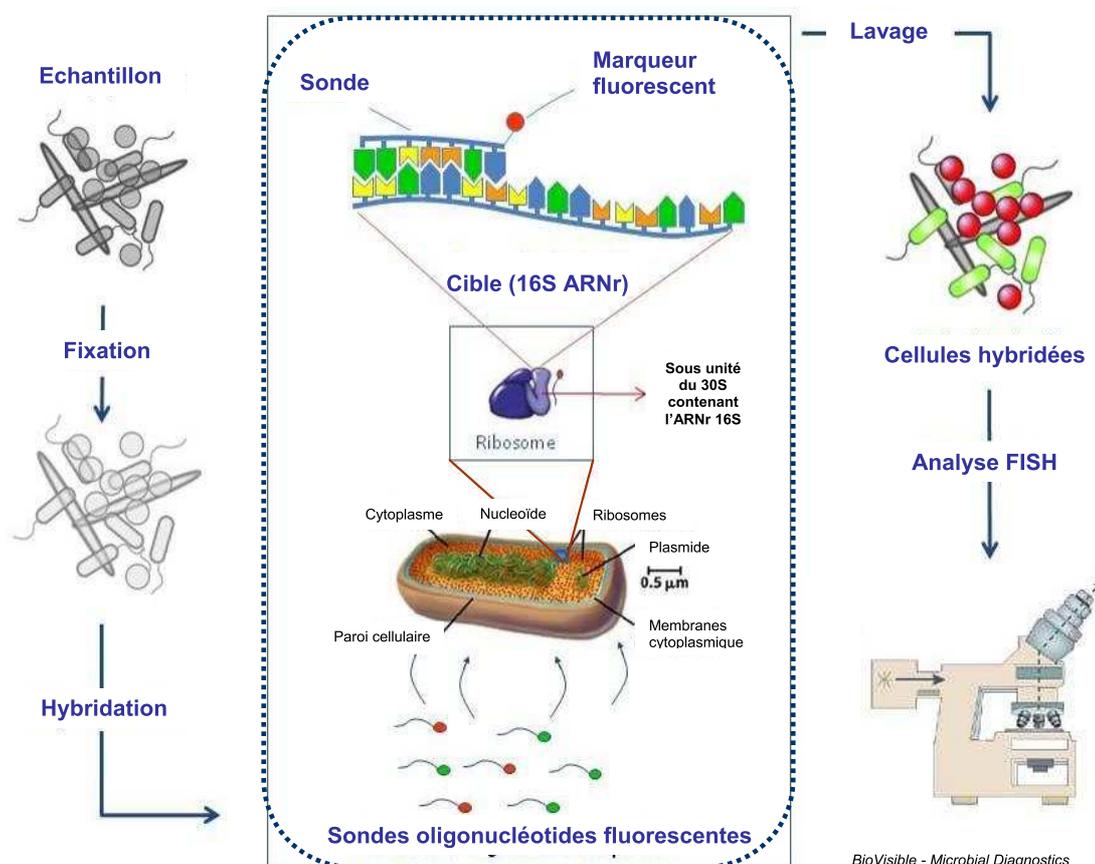


Figure 61 : Schéma de principe du FISH.

Les sondes ciblant l'ARNr16S sont des oligonucléotides d'ADN, complémentaires de "séquences signatures". Les séquences des sondes à utiliser sont déterminées par des logiciels s'appuyant sur une base de séquences d'ARN ribosomiques 16S. Les sondes utilisées sont marquées par un fluorophore pour permettre leur visualisation. Les trois colorants fluorescents utilisés couramment sont le Cyanine 3 (Cy3), le Cyanine 5 (Cy5) et la fluorescéine (FITC). Avant utilisation d'une sonde, l'optimisation des conditions de stringence est essentielle pour obtenir une hybridation de bonne qualité et empêcher les hybridations aspécifiques.

6.3.3.1. Fixation

Au préalable, les culots utilisés sont fixés au paraformaldéhyde 4 % (PFA). Pour cela, les culots sont repris dans 0,5 mL de solution saline 1X (PBS 1X) et 1,5 mL de PFA 4 % frais. Après une incubation à 4°C de 15 minutes pour les échantillons thermophiles, ou d'une heure pour les échantillons mésophiles, une centrifugation de 10 minutes à 13400 rpm est réalisée. Le surnageant est alors éliminé et les culots sont lavés dans 0,5mL de PBS 1X avant d'être centrifugés 10 minutes à 13400 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot conservé à -20°C dans 0,5 mL de PBS 1X et 0,5 mL d'éthanol 95 %.

6.3.3.2. Hybridation

Pour l'hybridation, 10 µL d'échantillon fixé sont déposés sur une lame (Thermo Scientific) avant d'être mis à sécher à 46°C. Une fois l'échantillon sec, la lame est placée dans trois bains successifs de plus en plus concentrés en éthanol (50 %, 80 % et 96 %) pendant 3 minutes chacun. Les échantillons sont séchés après le dernier bain et 10 µL de solution d'hybridation (NaCl 0,9 M ; Tris-HCl 0,02 M pH8 ; formamide ; SDS 0,02 %) ainsi que la sonde (50 ng.L⁻¹) sont ajoutés. L'hybridation se déroule à 46°C pendant 1h30. La lame est ensuite placée dans la solution de rinçage (TrisHCl 0,02 M ; NaCl 0,102 M ; EDTA 0,005 M ; 50 µL SDS 10 %) et est mise à incuber 10 minutes au bain-marie à 48°C. Enfin, l'échantillon est rincé avec de l'eau distillée puis séché (Annexe 6).

Pour la détermination des micro-organismes, différentes sondes ont été utilisées. A chaque sonde correspond un pourcentage en formamide de la solution d'hybridation. Le Tableau 30 récapitule l'ensemble de ces informations.

Tableau 30 : Sondes oligonucléotides utilisées en FISH.

Nom	Séquence 5'-3'	Position E.coli *	Groupe ciblé	Formamide (%)	Référence
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	<i>Bacteria</i>	0-50	(Amann, Binder et al. 1990)
ARC915	GTGCTCCCCGCAATTCCT	915-934	<i>Majorité des Archaea</i>	-	(Crocetti, Murto et al. 2006)
MS1414	CTCACCCATACCTCACTCGGG	1414-1435	<i>Methanosarcinaceae</i>	50	(Raskin, Stromley et al. 1994)
hMS1395	GGTTTGACGGGCGGTGTG	1395-1412	MS1414 helper	-	(Crocetti, Murto et al. 2006)
hMS1480	CGACTTAACCCCTTGC	1480-1497	MS1414 helper	-	(Crocetti, Murto et al. 2006)
MX825	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	825-845	<i>Methanosaetaceae</i>	50	(Raskin, Stromley et al. 1994)
MX1361	ACGTATTCACCGGTTCTGT	1361-1380	<i>Methanosaetaceae</i>	25	(Crocetti, Murto et al. 2006)
MG1200b-A	CAGATAATTCGGGGCATGCTG	1200-1220	<i>Methanomicrobiales</i>	20	(Crocetti, Murto et al. 2006)
MG1200b-G	CGGATAATTCGGGGCATGCTG				

* toutes les sondes cibles l'ARNr 16S

6.3.3.3. Observation au microscope confocal à balayage laser

Pour l'observation, la lame est montée, c'est-à-dire que sur chaque échantillon est ajouté une goutte de citifluor (Biovalley) (utilisé comme milieu de montage, ou comme additif pour les échantillons), une lamelle est déposée et une goutte d'huile d'immersion est ajoutée avant l'observation. Les échantillons sur lame sont analysés à l'aide d'un microscope confocal

(Axiovert 200M, Zeiss) à balayage laser. L'acquisition et le traitement des images sont ensuite réalisés en utilisant le logiciel ZenLightEdition.

6.3.4. NanoSIMS

6.3.4.1. Principe

Lors des analyses NanoSIMS, la démonstration formelle de l'implication d'un micro-organisme dans un processus biogéochimique particulier repose sur la mise en évidence *in situ* simultanée de l'hybridation d'une sonde nucléique (technique FISH), qui révèle l'identité du micro-organisme, et de l'incorporation cellulaire de l'isotope rare avec lequel le composé dont on veut étudier le devenir est marqué, qui témoigne de sa fonction métabolique. Dans le cadre des travaux de thèse, un couplage direct entre NanoSIMS et FISH a été utilisé pour visualiser *in situ* à la fois l'identité et la fonction des micro-organismes (technique SIMSISH, (Li, Wu et *al.* 2008))

La technique de spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) permet d'obtenir une cartographie en deux dimensions de la composition atomique et isotopique de la surface d'un échantillon. Initialement, la technique SIMS permettait d'obtenir des informations spatiales sur la composition isotopique moléculaire des matériaux (Pacholski et Winograd 1999). Cette technique a été introduite dans les années 1960 par Castaing et Slodzian (Castaing et Slodzian 1962), et deux types de SIMS sont disponibles (statiques et dynamiques). La spectrométrie de masse d'ions secondaires statique est généralement utilisée pour obtenir une information moléculaire et de surface (moins de 1 nm de profondeur), tandis que la SIMS dynamique est en routine utilisée pour acquérir l'information élémentaire et isotopique de la partie superficielle de quelques nm de l'échantillon (Adams, Van Vaeck et *al.* 2005). Le Cameca NanoSIMS50s (Cameca) (Slodzian, Daigne et *al.* 1992) représente actuellement la dernière génération de SIMS dynamique. C'est cet instrument qui a été utilisé dans le cadre de ce travail.

Le procédé d'analyse de surface, connu sous le nom de SIMS, consiste à bombarder en continu la surface de l'échantillon à analyser avec un faisceau d'ions énergétiques. Un faisceau primaire de Cs^+ ou O^- est utilisé pour renforcer la formation des ions négatifs ou positifs, respectivement, ce qui aboutit à la pulvérisation de la surface supérieure de l'échantillon et, par conséquent, à la libération des ions secondaires (Figure 62). Ces ions secondaires sont triés sur la base de leur énergie dans le secteur électrostatique de l'instrument, avant d'être dispersés dans un spectromètre de masse en fonction de leur rapport masse/charge. Par l'acquisition d'une série de spectres point par point à la surface de l'échantillon, une cartographie peut être produite pour une masse atomique choisie. L'information des rapports isotopiques sur une région d'intérêts peut être obtenue. Du fait de la pulvérisation de la surface de l'échantillon, la technique permet la reconstitution de "profils en profondeur" jusqu'à une profondeur de 10 micromètres. Le système est maintenu sous ultravide (typiquement 10^{-10} Torr dans la chambre d'analyse) pour éviter les interférences atmosphériques avec des ions primaires et secondaires.

Un premier test de couplage entre SIMS et FISH a été effectué par Orphan et *al.* sur un échantillon de sédiment marin, pour identifier les groupes fonctionnels intervenant dans l'oxydation anaérobie du méthane (Orphan, House et *al.* 2001). Cependant, la résolution du SIMS à l'époque n'était pas suffisamment élevée pour permettre une mesure à l'échelle d'un micro-organisme. En conséquence, les analyses SIMS n'étaient réalisées que sur des agrégats

de cellules. En outre, le signal de FISH et la mesure de SIMS ont été acquis par deux analyses séparées. Une relocalisation était alors nécessaire.

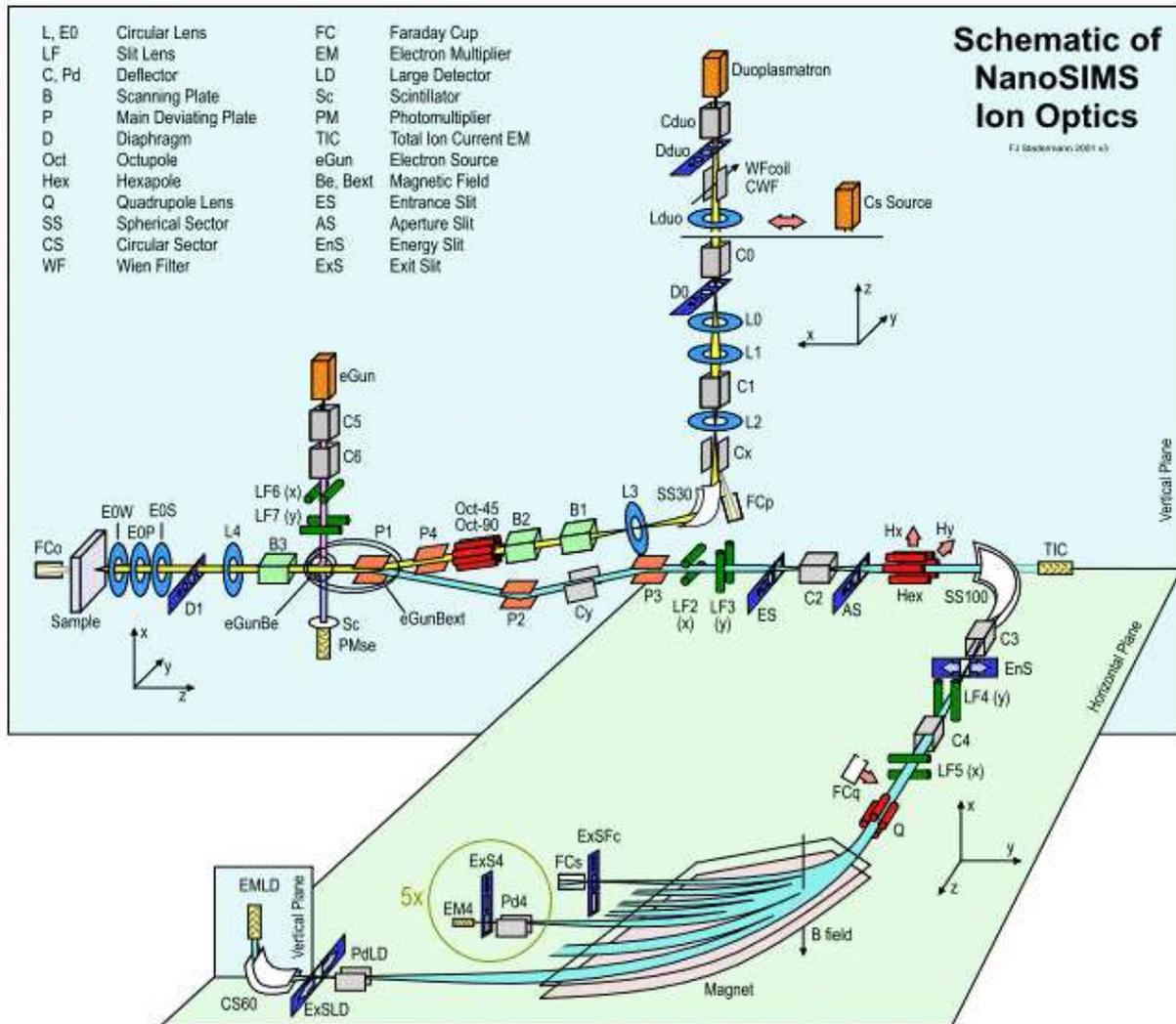


Figure 62 : Schéma du NanoSIMS.

Source : F.J. Statermann, Washington University, St Louis, Missouri,
<http://presolar.wustl.edu/nanosims/schematic.html>

Aujourd'hui, grâce à de récents développements technologiques, le NanoSIMS présente une résolution spatiale de 50 nm tout en maintenant une très bonne sensibilité à haute résolution en masse (Guerquin-Kern, Wu et *al.* 2005). Cet instrument offre également la possibilité d'effectuer l'acquisition de cinq images ioniques en parallèles. Il est ainsi possible de mesurer, en plus de la composition isotopique, l'enrichissement de la zone d'analyse en tel ou tel atome avec une précision de 0,01 % (Peteranderl et Lechene 2004). La visualisation simultanée de l'identité des micro-organismes, grâce à l'hybridation de sondes nucléiques spécifiques (marquées à l'aide d'un atome peu présent dans la biomasse tel que le fluor, brome ou l'iode), et de leur fonction (incorporation d'isotopes stables) peut ainsi être effectuée simultanément sur un NanoSIMS. En résumé, le couplage NanoSIMS-FISH permet non seulement de savoir si les souches suspectées sont bien impliquées dans la dégradation du composé, mais aussi de savoir si d'autres micro-organismes ne sont pas également impliqués dans le processus (zones enrichies en ^{13}C mais pas en l'atome d'halogène incorporé dans la sonde nucléique utilisée).

6.3.4.2. Préparation de l'échantillon

Les échantillons (issus d'expériences utilisant un substrat marqué en ^{13}C) utilisés pour le NanoSIMS sont traités de la même manière que pour le FISH, c'est-à-dire qu'ils doivent être fixés au PFA avant d'être hybridés. La différence majeure des échantillons préparés pour le NanoSIMS, par rapport à ceux préparés pour le FISH, est le support sur lequel l'échantillon est fixé. Des puces de silicium à haute pureté (7x7 mm) (Silicon Quest International) sont utilisées comme support. Le processus d'hybridation est identique à celui du FISH hormis l'étape de lavage qui passe de 10 à 15 minutes. Les sondes utilisées présentent les mêmes caractéristiques que les sondes FISH (Tableau 30), cependant elles sont marquées avec de l'iode, du brome ou du fluor afin de pouvoir être visualisées par la technique NanoSIMS.

La bonne hybridation des sondes sur les micro-organismes ciblés est ensuite vérifiée par la visualisation au microscope du signal du fluorophore incorporé aux sondes (le Cyanine 3 également appelé Cy3). Si l'hybridation est convenable, un repérage des zones d'intérêts est réalisé (prise de photo et repérage des coordonnées XY) et l'échantillon est ensuite analysé sur le NanoSIMS de l'Institut Curie (Orsay, France).

6.3.4.3. Analyse de l'échantillon

Les analyses NanoSIMS présentées dans le cadre de ce manuscrit ont été réalisées en collaboration avec M. Ting-Di Wu et le Dr. Jean-Luc Guerquin-Kern au sein de l'unité de recherche Imagerie intégrative: de la molécule à l'organisme de l'Institut Curie et de l'Inserm.

Les carrés de silicium sont introduits dans le NanoSIMS puis, à l'aide des photos en lumière blanche et des images issues des repérages préliminaires, les zones d'intérêts de chaque échantillon hybridé sur carré de silicium sont repérées. Le bombardement de l'échantillon peut commencer. Suite au bombardement avec les ions Cs^+ , différents types d'ions secondaires sont éjectés et peuvent être collectés. Plusieurs images sont ainsi obtenues (CN, Br, I, S, O, ^{12}C et ^{13}C).

Par la suite, le pourcentage de carbone 13 est calculé grâce au logiciel Image J (Image Processing And Analysis in Java) (Wayne Rasband, USA) à partir des images ^{12}C et ^{13}C et d'après la formule suivante:

$$\text{Abondance } ^{13}\text{C} = \left(\frac{^{13}\text{C}^-}{^{12}\text{C}^- + ^{13}\text{C}^-} \right) \times 100 \% \quad (\text{Li, Wu et al. 2008}).$$

Équation 10

Après avoir sélectionné le micro-organisme désiré, nous dessinons son contour sur l'image avec les outils du logiciel, et Image J détermine ensuite le pourcentage de ^{13}C moyen de la cellule.

Nous avons donc au final des informations micro-organisme par microorganisme sur leur identité grâce à la localisation des atomes d'halogène incorporés aux sondes et sur l'incorporation des substrats grâce à la détermination de l'abondance en carbone 13. Les résultats ainsi obtenus en ^{13}C permettront de comparer les valeurs de ^{13}C entre les différents échantillons.

Grâce au couplage avec l'hybridation in situ de sondes nucléotidiques spécifiques, la technique NanoSIMS-FISH est développée pour simultanément identifier un micro-organisme et mesurer son enrichissement isotopique. Ceci fournit une possibilité de caractériser la physiologie de groupes phylogénétiques de micro-organismes non cultivables, à travers le

suivi de l'évolution de leurs enrichissements isotopiques résultant de l'assimilation d'un substrat marqué.

6.3.5. Clonage / Séquençage

6.3.5.1. Clonage

Le gène codant pour l'ARNr 16S archées ou bactérie est amplifié sur les ADN extraits des différents échantillons. Le mélange réactionnel pour la PCR est le même que celui utilisé pour la PCR-ARISA. Le programme PCR est identique pour les archées et les bactéries et est le suivant :

Archées et Bactéries

- Avant les cycles, 94°C pendant 2 min pour activer l'enzyme Taq polymérase,
- 94°C pendant 30 sec (phase de dénaturation),
- 60°C pendant 30 sec (phase d'hybridation des amorces),
- 72°C pendant 30 sec (phase d'élongation),
- 72°C pendant 10 min (phase d'élongation finale).

25 cycles sont effectués

Les amorces nécessaires sont 27F-1390R pour les bactéries et 21F-1390R pour les archées (Tableau 31). L'amplification est vérifiée sur gel d'agarose 1 % contre un marqueur de taille 1kb (Sigma). La taille attendue pour l'échantillon est d'environ 1400 pb.

Tableau 31 : Amorces utilisées pour le clonage.

Nom	Groupe ciblé	Séquence ciblée	Séquence (5'-3')	Référence
27F	Bactéries	16S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
21F	Archées	16S	TTCCGGTTGATCC(CT)GCCGGA	
1390R	Universelle	16S	GACGGGCGGTGTGTACAA	
M13F	pCR [®] 4-TOPO [®]		GTAAAACGACGGCCAG	Invitrogen
M13R			CAGGAAACAGCTATGAC	Invitrogen

Si le fragment obtenu a la taille attendue, il est alors ligué au plasmide pCR[®]4-TOPO[®] (cf. Figure 63) selon le protocole du kit TOPO TA[®] cloning (Invitrogen). 4 µL d'ADN est mélangé à une solution saline (0,2 M NaCl, 0,01 M MgCl₂) et à 1,67 ng.µL⁻¹ de plasmide, pour un volume final de 6 µL. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 2 µL sont ajoutés à des cellules thermo-compétentes. Un choc thermique est réalisé par transfert des tubes de la glace à 42°C pendant 30 secondes, suivi d'un retour sur glace. Du milieu S.O.C (2 % tryptone, 0,5 % extraits de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) est ajouté aux cellules transformées avant d'être incubé sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Une fois l'incubation terminée, 100 µL du mélange est étalé sur du milieu LB-agar et ampicilline (50 µg.mL⁻¹) et est incubé toute la nuit à 37°C. Sur les différentes colonies qui ont poussées sur la boîte, 96 clones sont repiqués sur le milieu LB-agar et ampicilline et remis à incuber toute la nuit à 37°C.

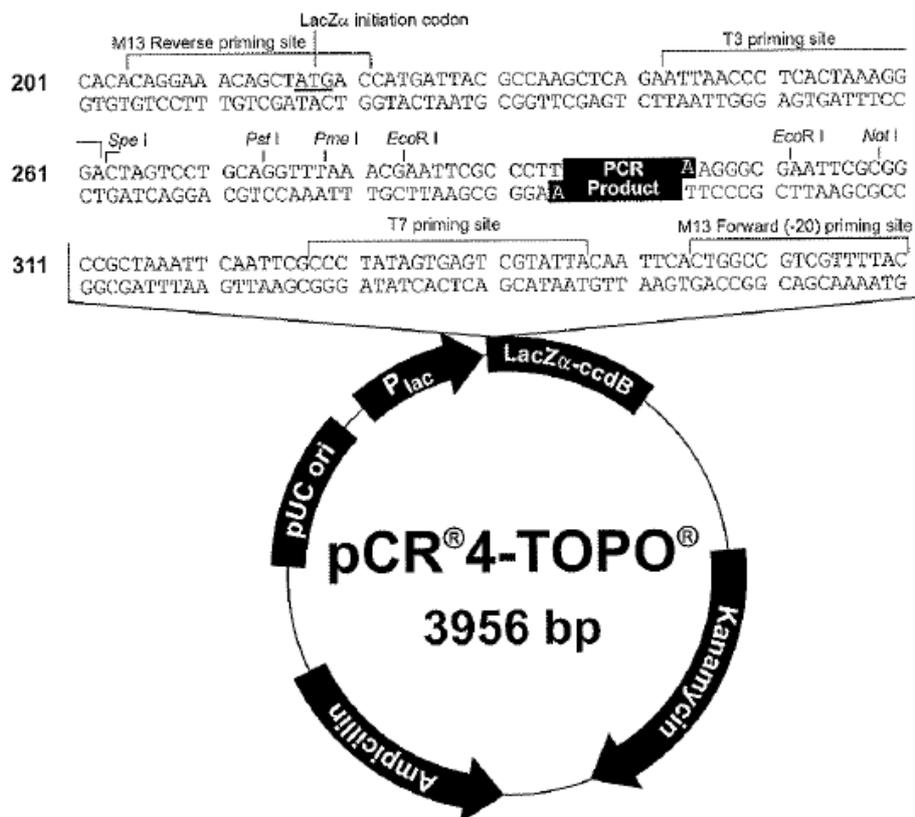


Figure 63 : Carte du plasmide pCR[®] 4-TOPO[®] (Invitrogen).

Chacun de ces clones sont analysés par PCR. Le mélange réactionnel est constitué de Tampon PCR 1X, 0,025 Unités.μL⁻¹ de Taq polymérase, 0,2 mM de dNTP chacun (kit TaKaRa Ex Taq, TAKARA BIO INC.) et 0,4 μM de chaque amorce pour un volume final de 25 μL. Les amorces utilisées sont celles du plasmide, M13F et M13R (cf. Tableau 31). Le programme PCR est le suivant :

- Avant les cycles, 94°C pendant 2 min pour activer l'enzyme Taq polymérase,
 - 94°C pendant 1 min (phase de dénaturation),
 - 55°C pendant 1 min (phase d'hybridation des amorces),
 - 72°C pendant 1 min (phase d'élongation),
 - 72°C pendant 7 min (phase d'élongation finale).
- } 30 cycles sont effectués

Les amplifications sont vérifiées sur gel d'agarose 1 % contre un marqueur de taille 1 kb (Sigma) et la taille attendue de l'échantillon est environ 1500 pb. Les clones ayant la taille attendue sont alors incubés dans du milieu LB-glycérol 20 % et sont envoyés à séquencer chez Bekman Coulter Genomics.

6.3.5.2. Séquençage

Le séquençage est réalisé par la société Bekman Coulter Genomics par la méthode de Sanger (http://www.beckmangenomics.com/genomic_services/dna_sequencing.html).

6.3.5.3. Traitements des résultats

Les séquences d'ARNr 16S des 96 clones obtenues pour chaque échantillon ont été comparés avec la base de données complète ARB-SILVA (SSU_ref_NR_102) et la présence de séquences chimères a été contrôlée en utilisant l'outil CHECK-CHIMERA, disponible sur

"Ribosomal Database Project release 8.1" (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Une première affiliation des séquences a été réalisée par le programme de classification "RDP II online classifier program", prenant en considération les affiliations avec un intervalle de confiance de 95 %. Une analyse phylogénétique plus précise a ensuite été réalisée en utilisant les logiciels disponibles sur le site phylogenie.fr (<http://www.phylogeny.fr/>) (alignement des séquences sur MUSCLE, Affinage des alignements sur Gblocks, Réalisation de l'arbre sur PhyML). La visualisation de l'arbre a été réalisée sur figtree.

6.4. Analyse des solides

6.4.1. Analyse élémentaire

La quantité de carbone et d'azote contenue dans les échantillons solides est analysée sur un échantillon broyé et séché à 105°C. La quantité de déchets mise dans les nacelles en aluminium pour l'analyse par analyseur élémentaire (Elementar, VARIO EL III, Bioritech) est d'environ une dizaine de milligrammes. Chaque analyse a été faite au moins en triplicat.

6.4.2. Teneur en eau, matières sèches et pertes au feu

Les échantillons à analyser sont séchés à 105°C dans des coupelles en porcelaine afin de déterminer la teneur en eau (masse d'eau sur masse de déchets humides) et en Matières Sèches (MS) (masse de déchets secs sur masse de déchets humides). Ces essais ont été réalisés en triplicat. Le protocole utilisé correspond à la norme NF EN 12880 pour la caractérisation des boues.

Après séchage à 105°C, chaque résidu est passé à 550°C pendant 90 minutes. La coupelle est mise dans un dessiccateur. Lorsque l'échantillon est à température ambiante, la masse est mesurée. L'échantillon est alors remis à 550 C. L'opération est renouvelée jusqu'à obtention d'une masse constante. Le résidu obtenu dans la coupelle (résidu de calcination) correspond aux Matières Minérales (MM). Ces essais ont été réalisés en triplicat. Le protocole utilisé correspond à la norme NF EN 12879 pour la caractérisation des boues.

6.5. Calculs

6.5.1. Calcul de production

Le calcul de la production de biogaz est réalisé sous Excel. L'ensemble des données collectées lors des suivis des pilotes est entré dans le logiciel qui les enregistre et qui permet de les exploiter. Dans la suite de cette section, seuls les calculs de production de biogaz sont détaillés (cf. Annexe 7). Tout d'abord, afin de connaître le volume du ciel gazeux des bouteilles, il faut tenir compte des prélèvements de lixiviats et de la transformation des composés solides en AGV et en biogaz.

$$V_{ciel}(j) = V_{ciel}(0) + \sum_{k=1}^j (V_{lixiv}(k-1) + V_{dégrad}(k))$$

Équation 11

$V_{ciel}(j)$: Volume du ciel gazeux de la bouteille au jour j.

$V_{ciel}(0)$: Le volume du ciel gazeux initial. Il a été calculé en soustrayant au volume total de la bouteille le volume de liquide introduit et le volume propre des déchets en tenant compte de leur porosité.

$V_{lixiv}(k)$: Volume de lixiviat prélevé au jour k pour l'analyse des lixiviats. Le volume prélevé au jour k est comptabilisé au jour suivant et non le jour même car le prélèvement est

réalisé après analyse du ciel gazeux pour éviter que le septum en caoutchouc soit humidifié et endommage le μ GC.

$V_{\text{dégazé}}(\mathbf{k})$: Variation de volume due à la transformation du déchet solide en AGV et en biogaz. On considère cette variation négligeable devant les prélèvements de lixiviats.

Calcul du volume du ciel gazeux au jour j.

Comme les dégazages ne sont pas effectués systématiquement tous les jours à la même heure, c'est la production cumulée, correspondant au volume de biogaz, ramenée au Standard Temperature and Pressure* (STP, 0°C, 1 atm), produite depuis le début de l'expérience qui est calculée. Pour réaliser ce calcul, le biogaz est assimilé à un gaz parfait.

$$V_{\text{cum_biogaz}}(j, STP) = \sum_{k=1}^j V_{\text{biogaz}}(k, STP)$$

Équation 12

$$V_{\text{biogaz}}(j, STP) = \underbrace{V_{\text{analyse_}\mu\text{GC}}(j, STP) + V_{\text{dégazé}}(j, STP) + V_{\text{restant_dans_ciel}}(j, STP)}_{\text{Volume mesuré au jour j}} - \underbrace{V_{\text{restant_dans_ciel}}(j-1, STP)}_{\text{Volume restant du jour j-1}}$$

$V_{\text{cum_biogaz}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de biogaz produit depuis le jour de lancement de l'incubation.

$V_{\text{biogaz}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de biogaz produit entre la mesure du jour j et celle du jour j-1.

$V_{\text{analyse_}\mu\text{GC}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de biogaz prélevé par le μ GC lors de l'analyse. Ce volume est calculé à partir des pressions mesurées avant et après analyse.

$V_{\text{dégazé}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de biogaz dégazé à la seringue à gaz au jour j.

$V_{\text{restant_dans_ciel}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de biogaz restant dans le ciel gazeux après analyse le jour j.

Remarque : L'ensemble des volumes est ramené aux STP.

Calcul du volume de biogaz produit au jour j dans une bouteille.

Ensuite, pour obtenir la production cumulée spécifique de chaque gaz, les résultats obtenus lors des analyses par μ GC (cf. Chapitre 3, § 6.1.1 Analyse de la composition du biogaz) sont utilisés.

$$V_{\text{cum_gaz_i}}(j, STP) = \left(\sum_{k=1}^j V_{\text{gaz_i}}(k, STP) \right) - V_{\text{gaz_i}}(0, STP)$$

Équation 13

$$V_{\text{gaz_i}}(j, STP) = \%_{\text{gaz_i}}(j) * V_{\text{mesuré}}(j) - \%_{\text{gaz_i}}(j-1) * V_{\text{restant_dans_ciel}}(j-1)$$

$V_{\text{cum_gaz_i}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de gaz(i) produit depuis le jour de lancement de l'incubation.

$V_{\text{gaz_i}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de gaz(i) produit entre la mesure du jour j et celle du jour j-1.

$\%_{\text{gaz_i}}(\mathbf{j})$: Fraction volumique du gaz(i) dans le gaz analysé au μ GC au jour j.

$V_{\text{mesuré}}(\mathbf{j}, \text{STP})$: Volume de biogaz mesuré au jour j. Ce terme correspond à la somme du volume de biogaz utilisé par le μ GC, plus le volume dégazé à la seringue, plus ce qui reste dans le ciel gazeux après analyse.

Remarque : L'ensemble des volumes est ramené aux STP.

Calcul du volume de gaz(i) produit au jour j.

6.5.2. Caractérisation des courbes de production cumulée de méthane

Les courbes de production cumulée de méthane peuvent (pour certaines) être modélisées en utilisant une équation de croissance de Gompertz modifiée (Zwietering,

Jongenburger *et al.* 1990; Lay, Li *et al.* 1998; Lay, Li *et al.* 1998; El Hadj, Astals *et al.* 2009; Zhu, Gikas *et al.* 2009).

$$Pcm(t) = Pcm(\infty) \times \exp\left(-\exp\left(\frac{Rm \times e}{Pcm(\infty)} \times (\lambda - t) + 1\right)\right)$$

Équation 14

Equation de croissance de Gompertz modifiée.

$Pcm(\infty)$ correspond à la production cumulée de méthane à la fin de l'expérience (mL.g^{-1} STP); Rm , est le taux de production maximum du méthane (mL.g^{-1} STP.jour⁻¹); e , l'exponentiel de 1; λ , le temps de latence (jour). Ces paramètres sont ajustés en utilisant le solveur d'Excel pour minimiser la somme des carrés des erreurs entre l'expérience et la modélisation. Les paramètres λ , Vm et $Pcm(\infty)$ sont ensuite utilisés pour caractériser et comparer différentes courbes.

6.5.3. Recalcul de la composition isotopique

Afin d'obtenir la composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone formés depuis la dernière analyse, il est nécessaire d'effectuer un calcul afin d'éliminer celle des gaz restant dans le ciel gazeux après la dernière mesure. La signature isotopique du nouveau gaz est calculée par rapport à deux points de mesure et à partir de l'équation bilan suivante :

$$\delta_2 = f_n \delta_n + (1 - f_n) \delta_1$$

Équation 15

- δ_n : signature isotopique du gaz nouvellement formé
- f_n : fraction du gaz nouvellement formé
- δ_1 : signature isotopique du gaz lors de la précédente mesure
- δ_2 : signature isotopique du gaz lors de la mesure

(Fey, Claus *et al.* 2004; Penning, Plugge *et al.* 2005; Penning, Claus *et al.* 2006c; Penning et Conrad 2007)

Recalcul de la composition isotopique.

6.5.4. Calcul du facteur de fractionnement apparent

Le facteur de fractionnement apparent se calcule avec la formule (Whiticar, Faber *et al.* 1986; Whiticar 1999) suivante :

$$\alpha_{CO_2-CH_4} = \alpha_{app} = \frac{(\delta^{13}C_{CO_2} + 10^3)}{(\delta^{13}C_{CH_4} + 10^3)}$$

Équation 16

Facteur de fractionnement apparent.

Ce paramètre permet d'identifier la voie métabolique dominante car il est généralement admis que lorsque α_{app} est supérieur à 1,065 l'environnement est dominé par la voie CO_2 -dépendante et que lorsque α_{app} est inférieur à 1,055 l'environnement est dominé par la voie acétate-dépendante (Whiticar, Faber *et al.* 1986; Whiticar 1999; Conrad 2005).

6.5.5. Calcul des facteurs de fractionnement

Le fractionnement isotopique d'une réaction peut être défini par le rapport des constantes de vitesse de la réaction pour les deux espèces isotopiques. Ce rapport se note α et s'appelle le facteur de fractionnement. Le fractionnement isotopique d'un substrat et de son produit de dégradation peut également être exprimé par le rapport des abondances isotopiques de ceux-ci.

$$\alpha_{\text{substrat} \rightarrow \text{produit}} = \frac{\delta_{\text{substrat}} + 10^3}{\delta_{\text{produit}} + 10^3}$$

Équation 17

Facteur de fractionnement isotopique.

Dans le cas d'un réservoir de substrat de taille infinie : la composition isotopique du substrat ($\delta^{13}\text{C}_{\text{substrat}}$) ne sera pas modifiée par la réaction.

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{produit}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{substrat}} + \varepsilon$$

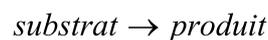
Équation 18

Composition isotopique du produit si le réservoir de substrat est infini.

Dans le cas d'un milieu clos : la composition isotopique du substrat ($\delta^{13}\text{C}_{\text{substrat}}$) est modifiée par la réaction et doit être prise en compte dans les calculs par utilisation de l'équation de distillation de Rayleigh.

6.5.5.1. Facteur de fractionnement de la méthanogenèse acétoclaste

Le facteur de fractionnement de la méthanogenèse acétoclaste peut être calculé à partir d'incubation d'acétate. Cette réaction unidirectionnelle entre un réservoir de substrat (l'acétate) et un produit (le méthane) conduit à un fractionnement isotopique cinétique.



Le modèle de distillation de Rayleigh peut être utilisé pour décrire ce processus. Le fractionnement "idéal" de Rayleigh nécessite que les deux isotopes soient homogènement répartis dans un réservoir fini (ce postulat est admis pour nos expériences) (Mariotti, Germon et al. 1981; Wynn, Bird et al. 2005).

L'équation proposée par Mariotti et al. est utilisée pour calculer l'effet isotopique (ε) associé à la méthanogenèse acétoclaste. Sa détermination est réalisée à partir du substrat résiduel :

$$\delta_{\text{substrat}, t} = \delta_{\text{substrat}, 0} + \varepsilon [\ln(1 - f)]$$

Équation 19

$\delta_{\text{substrat}, 0}$: composition isotopique du substrat au début de l'incubation;

$\delta_{\text{substrat}, t}$: composition isotopique du substrat résiduel à l'instant t ;

f : fraction du produit à l'instant t ($0 \leq f \leq 1$) (cf. Équation 20);

ε : facteur d'enrichissement d'un produit par rapport à son substrat (cf. Équation 5).

Équation proposée par Mariotti et al., .

$$f = \left(1 - \frac{[\text{substrat}]_t}{[\text{substrat}]_0} \right)$$

Équation 20

Fraction du produit à l'instant t.

La régression linéaire de $\delta_{s,t}$ par rapport à $\ln(1 - f)$ donne la valeur d' ϵ égale à la pente de la droite de régression. Ensuite, le facteur d'enrichissement est converti en facteur de fractionnement en utilisant l'équation 6.

La valeur de ce paramètre caractérise le fractionnement isotopique qui a lieu pour un type de dégradation donné et dans les conditions de validité du modèle de Rayleigh.

6.5.5.2. Facteur de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe

Afin de calculer le facteur d'enrichissement isotopique (ϵ) associé à la méthanogenèse hydrogénotrophe, une approche envisageable est la réalisation d'incubations au sein desquelles la méthanogenèse a lieu uniquement *via* réduction du CO₂ (utilisant l'hydrogène comme substrat). La mesure du $\delta^{13}\text{CH}_4$ et du $\delta^{13}\text{CO}_2$ permet la détermination du facteur de fractionnement apparent (Équation 16) qui est dans ce cas, égal au facteur de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe.

6.5.6. Calcul de la concentration en NH₃

Pour calculer la concentration de la forme libre d'azote ammoniacal, la formule suivante qui utilise la température, le pH et la concentration en ion ammonium a été utilisée (Anthonisen, Loehr et *al.* 1976).

$$\text{NH}_3 - \text{N} = \text{NH}_4^+ - \text{N} \times 10^{\text{pH}} / \left(e^{6344/273+T(^{\circ}\text{C})} + 10^{\text{pH}} \right)$$

Équation 21

Calcul de la concentration en NH₃.

6.5.7. Expressions des résultats

Dans le chapitre "résultats et discussion" de ce manuscrit, afin de simplifier la présentation des résultats des incubations réalisées en triplicat ou duplicat, c'est généralement la moyenne arithmétique empirique et son écart-type empirique corrigé qui sont présentés.

La fonction "=MOYENNE(nombre1;nombre2;...)" d'Excel est utilisée et correspond à la formule suivante :

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} X_i}{n}$$

Équation 22

\bar{X} : moyenne arithmétique empirique;
 X_i : valeurs des observations de la variable X;
 n : nombre d'observations.

L'estimation de la variance (σ^2 qui correspond à la moyenne des carrés des déviations de la moyenne arithmétique) est réalisée par le calcul de la variance empirique corrigée (S_{n-1}^2). On l'utilise lorsque la moyenne est une estimation, c'est-à-dire que sa valeur exacte est inconnue (c'est par exemple le cas dans beaucoup de sciences expérimentales où l'on a accès qu'à la moyenne des valeurs mesurées). Elle permet d'évaluer l'écart type d'une population en se basant sur un échantillon de cette population. L'écart type est donné sous une forme corrigée. L'écart-type empirique corrigé (S_{n-1}) est la racine carrée de la variance empirique corrigée. La fonction "`=ECARTYPE(nombre1 ; nombre2 ; ...)`" d'Excel est utilisée et correspond à la formule suivante :

$$S_{n-1} = \sqrt{S_{n-1}^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = S_{n-1} \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Équation 23

\bar{x} : moyenne de la variable X;
 S_{n-1} : écart-type empirique corrigé;
 S_{n-1}^2 : variance empirique corrigée;
i : observation «i» de la variable X;
n : nombre d'observations.

Chapitre 4

Résultats & discussion

Chapitre

4

Résultats et discussion

Les résultats liés aux volumes de gaz produits présentés dans la suite de ce chapitre sont donnés après normalisation aux conditions STP (Standard Temperature and Pressure conditions) (0°C, 1 atm).

1. Validation de l'utilisation de l'approche isotopique pour l'étude de la digestion anaérobie des déchets

1.1. Introduction

Les approches reposant sur les mesures de la composition isotopique du carbone, lors du processus de digestion anaérobie, peuvent permettre d'identifier et d'élucider la succession des voies métaboliques responsables de la formation du méthane. L'utilisation de cette technique devrait ainsi permettre d'approfondir et d'affiner nos connaissances sur les processus intervenant lors de la biodégradation anaérobie de la matière organique contenue dans les déchets.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, la première étape essentielle a consisté à vérifier que les approches isotopiques, déjà utilisées pour étudier la méthanogenèse dans les milieux naturels (rizières, tourbières, sédiments etc.), étaient transposables aux milieux méthanogènes "artificiels" que représentent les systèmes industriels anaérobies de traitements des déchets. Pour cela, les facteurs de fractionnement induits lors de la méthanogenèse par des inocula provenant de ce type de systèmes industriels (ISD, méthaniseur, etc.), ont été déterminés car de telles données ne sont pas disponibles dans la littérature.

Trois inocula provenant de systèmes de traitement anaérobie de déchets ont été utilisés : un lixiviat d'ISDND, une boue de méthaniseur thermophile et la même boue de méthaniseur thermophile adaptée aux conditions mésophiles (cf. Chapitre 3, § 2 Les consortia microbiens dit inocula). Afin de déterminer les facteurs de fractionnement associés à chacune des deux voies métaboliques principales de la méthanogenèse (acétoclaste et hydrogénotrophe) induits par ces inocula, des incubations d'acétate et de CO₂/H₂ en microcosmes ont été réalisées. L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 32.

Des triplicats de témoin négatif (pas de substrat) ont été réalisés pour chacun des inocula. Aucune production de méthane n'est enregistrée après 100 jours d'incubation.

Tableau 32 : Nomenclature des expériences réalisées pour le calcul des facteurs de fractionnement isotopique.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	Température
Lixi-T (1,2 & 3)		Ø	Ø		
Lixi-A (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Acétate	3,0 g.L ⁻¹	milieu BMP + carbonate	35°C
Lixi-H _{forte} (1,2 & 3)		H ₂ /CO ₂	80 % / 20 %		
Lixi-H _{faible} (1,2)		N ₂ /H ₂	95 % / 5 %		
BMt-T (1,2 & 3)		Ø	Ø		
BMt-A (1)	Boue de méthaniseur thermophile	Acétate	3,0 g.L ⁻¹	milieu BMP + carbonate	55°C
BMt-H _{forte} (1,2,3)		H ₂ /CO ₂	80 % / 20 %		
BMt-H _{faible} (1,2)		N ₂ /H ₂	95 % / 5 %		
BMm-T (1,2 & 3)		Ø	Ø		
BMm-A (1)	Boue de méthaniseur adapté mésophile	Acétate	3,0 g.L ⁻¹	milieu BMP + carbonate	35°C
BMm-H _{faible} (1,2)		N ₂ /H ₂	95 % / 5 %		

1.2. Résultats expérimentaux obtenus

1.2.1. Facteurs de fractionnement induits par la méthanogenèse acétoclaste

1.2.1.1. Inoculum de lixiviat d'ISDND (35°C)

Lors des incubations à 35°C avec l'inoculum provenant du lixiviat d'ISDND, la phase de latence précédant le démarrage de la production de méthane dure 65 jours. (Figure 64, A). Pendant cette période, les méthanogènes provenant du lixiviat d'ISDND doivent probablement s'adapter aux nouvelles conditions environnementales et à la concentration initiale d'acide acétique (3,0 g.L⁻¹). Après cette période de latence, la production de méthane démarre et dure environ 15 jours. L'épuisement de l'acétate conduit finalement à la diminution puis à l'arrêt de la production de méthane (Figure 64, A). A la fin des incubations, la production cumulée de méthane est de 360 mL.g⁻¹ d'acétate ce qui représente 96 % de la production de méthane théoriquement attendue (373,5 mL). Il est à noter qu'une très bonne reproductibilité entre les incubations est obtenue, comme en témoignent les faibles écart-types observés entre les incubations du triplicat.

Le fait que les valeurs du facteur de fractionnement apparent (Figure 64, B) restent inférieures à 1,055 tout au long des incubations, indique que le méthane y est majoritairement produit par méthanogenèse acétoclaste. En effet, il est généralement admis que lorsque ce facteur (cf. Chapitre 3, § 6.5.4 Calcul du facteur de fractionnement apparent) est supérieur à 1,065 l'environnement est dominé par la voie hydrogénotrophe et que lorsqu'il est inférieur à 1,055 l'environnement est dominé par la voie acétoclaste. De plus, les évolutions des signatures isotopiques de l'acétate et du méthane sont caractéristiques de la méthanogenèse acétoclaste en système fermé (introduction initiale du substrat sans ajout par la suite). La composition isotopique initiale de l'acétate (moyenne des deux carbones) est de -21 ‰ et celle de son groupement méthyle est de -32 ‰. Le $\delta^{13}\text{C}_{\text{acétate}}$ commence à augmenter dès le démarrage de la production de méthane. Pendant cette période de production, la composition isotopique du substrat (acétate, groupement méthyle de l'acétate) augmente du fait de la consommation préférentielle des molécules légères d'acétate, comme en témoigne le fait que la composition isotopique du méthane formé dès les premiers jours de production soit plus légère d'environ 20 ‰ par rapport au substrat utilisé (groupement méthyle de l'acétate). Par la suite, l'augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ du méthane (de -44 à 15 ‰) est corrélée avec celle du $\delta^{13}\text{C}$ de l'acétate (de -21 à 33 ‰) et du groupement méthyle de l'acétate (de -32 à 10 ‰).

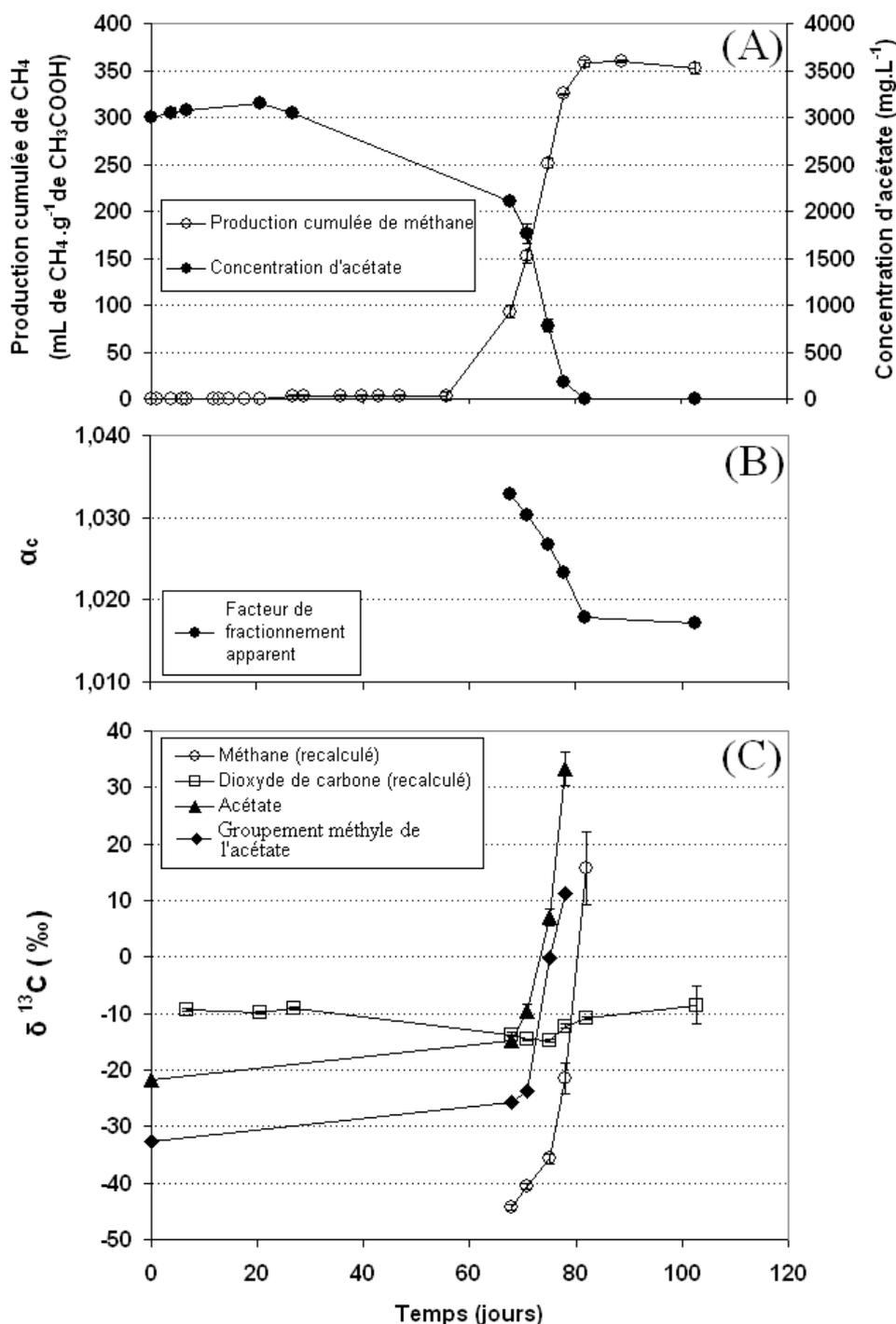


Figure 64 : Suivi des incubations Lixi-A.

(A) Moyenne de la production cumulée de méthane et de la concentration d'acétate ;

(B) Moyenne du facteur de fractionnement apparent au sein des incubations Lixi-A ;

(C) Moyenne de la composition isotopique de l'acétate, du méthane et du dioxyde de carbone ;

Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat (ils sont parfois masqués par les symboles).

Le δ¹³C du dioxyde de carbone, quant à lui, reste autour de -10 ‰ pendant toute la durée des incubations (Figure 64, C). Une légère diminution peut toutefois être relevée pendant le début de la production de méthane. Cette diminution peut être attribuée à la réaction de méthanogenèse acétoclaste qui produit du dioxyde de carbone. Ce dioxyde de carbone est produit à partir du groupement carbonyle de l'acétate (méthanogenèse acétoclaste)

et sa composition isotopique est supérieure à celle de la moyenne des deux atomes de carbone de l'acétate, mais inférieure à celle du dioxyde de carbone du ciel gazeux. L'impact de cette production sur le $\delta^{13}\text{C}$ du dioxyde de carbone reste cependant très faible du fait de la dilution du CO_2 produit avec le carbone inorganique présent initialement en quantité importante dans le milieu. Ensuite, avec l'enrichissement du pool d'acétate (lié à la consommation préférentielle des molécules légères d'acétate), le dioxyde de carbone va s'enrichir de nouveau, d'où l'augmentation qui survient au cours de la production de méthane.

Le facteur de fractionnement isotopique engendré par cet inoculum lors de la méthanogenèse acétoclaste a été déterminé dans ces incubations à partir des données isotopiques de l'acétate et de celles de son groupement méthyle. La méthode utilisée, fondée sur les équations de Mariotti et *al.* (1981), est celle décrite dans le chapitre 3 (cf. Chapitre 3, § 6.5.5.1 Facteur de fractionnement de la méthanogenèse acétoclaste). La Figure 65 illustre la méthode de régression linéaire utilisée pour le calcul des facteurs de fractionnements. Les facteurs d'enrichissement isotopique obtenus en utilisant l'acétate (moyenne des deux carbones) et le groupement méthyle de l'acétate sont de $\varepsilon = -19,467 \pm 0,492 \text{ ‰}$ et $\varepsilon = -13,467 \pm 1,232 \text{ ‰}$ respectivement. Il est à noter que les valeurs mesurées pour une des incubations du triplicat pour le groupement méthyle n'ont pas été prises en compte car les résultats conduisaient à un coefficient de régression faible ($R^2 = 0,836$). La conversion des facteurs d'enrichissement mesurés sur l'ensemble de l'acétate et sur le groupement méthyle uniquement en facteur de fractionnement conduit respectivement à des valeurs de $1,019 \pm 0,0005$ et $1,013 \pm 0,001$.

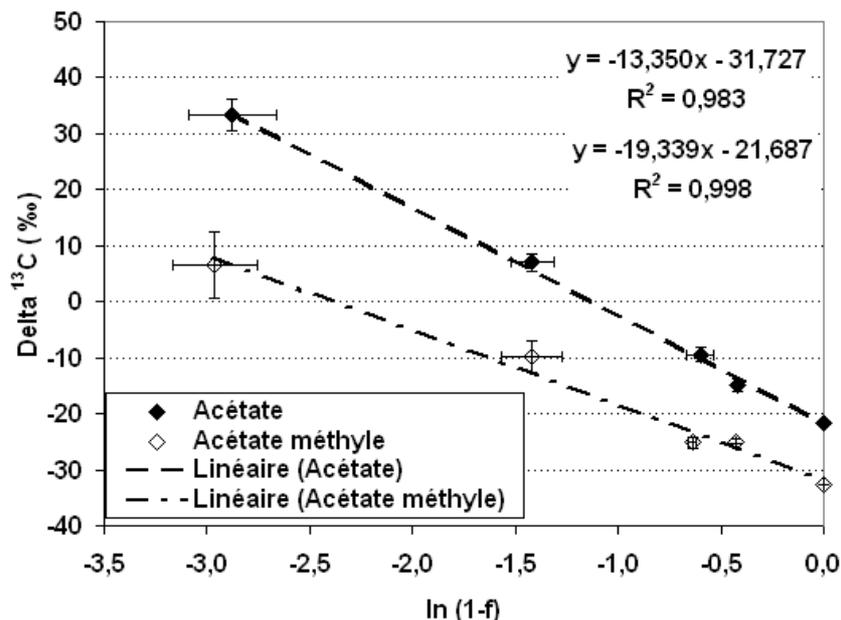


Figure 65 : Moyenne de la composition isotopique de l'acétate pendant la méthanogenèse acétoclaste pour l'inoculum de lixiviat d'ISDND (incubations Lixi-A) en fonction de $\ln(1-f)$ ou f est la fraction de méthane formée (méthode fondée sur les équations adaptées de Mariotti et *al.*, 1981). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat pour l'acétate et duplicat pour le groupement méthyle de l'acétate (ils sont parfois masqués par les symboles).

1.2.1.2. Inocula de boue de méthaniseur (35°C et 55°C)

Des incubations identiques à celles réalisées avec l'inoculum d'ISDND ont également été réalisées avec un inoculum issu d'une boue de méthaniseur d'OM thermophile (Série BMt-A) et de ce même inoculum après adaptation aux conditions mésophiles (Série BMM-A). Les

courbes de production cumulée de méthane et l'évolution du facteur de fractionnement apparent (Figure 66 A) montrent que le méthane est produit à la fois en conditions mésophile et thermophile par la voie acétoclaste (facteur de fractionnement < 1,055) après des temps de latence beaucoup plus courts (5 et 15 jours respectivement en conditions mésophiles et thermophiles) que ceux observés avec l'inoculum provenant d'un lixiviat d'ISDND. La même méthode de calcul que celle utilisée dans le cas de l'inoculum de lixiviat d'ISDND a ensuite été appliquée pour déterminer les facteurs de fractionnement de la méthanogenèse acétoclaste associés à ces deux inocula (Figure 66, B). Les valeurs obtenues sont de 1,025 pour l'inoculum thermophile et 1,022 pour l'inoculum mésophile.

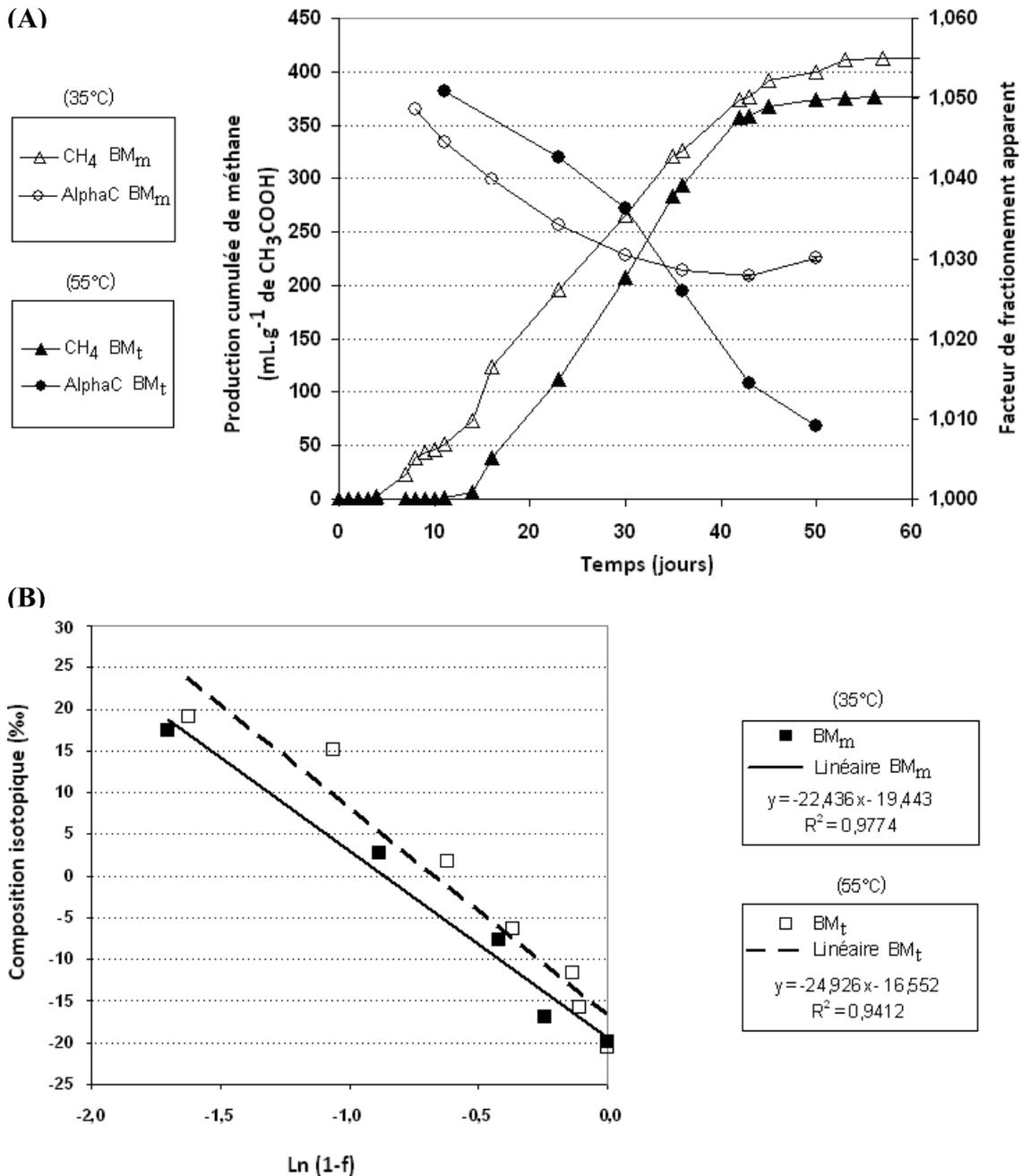


Figure 66 : Suivi des incubations BMm-A et Bmt-A (inocula de méthaniseur (35 et 55°C)).
(A) Production cumulée de méthane et facteur de fractionnement apparent ;
(B) Composition isotopique de l'acétate pendant la méthanogenèse acétoclaste en fonction de ln(1-f) ou f est la fraction de produit formé (méthode fondée sur les équations adaptées de Mariotti et *al.*, 1981).

1.2.2. Facteur de fractionnement induit par la méthanogenèse hydrogénotrophe

Afin de déterminer les facteurs de fractionnement associés à la méthanogenèse hydrogénotrophe, des expériences ont été réalisées à partir de différents inocula à faible et à haute concentration d'hydrogène.

1.2.2.1. Haute concentration d'hydrogène.

Les incubations réalisées (inoculum de lixiviat d'ISDND et de boue de méthaniseur thermophile) à haute concentration en hydrogène (mélange gazeux H₂/CO₂ 80 %/20 %) ont conduit à la consommation de l'hydrogène et du dioxyde de carbone ainsi qu'à la production de méthane. Les mesures de la composition isotopique du dioxyde de carbone et du méthane ont permis de calculer le facteur de fractionnement apparent (Équation 16). Les résultats obtenus sont de $1,031 \pm 0,001$ pour l'inoculum de méthaniseur thermophile et de $1,048 \pm 0,006$ pour l'inoculum de lixiviat et correspondent, dans ces conditions expérimentales, au facteur de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe à haute concentration d'hydrogène.

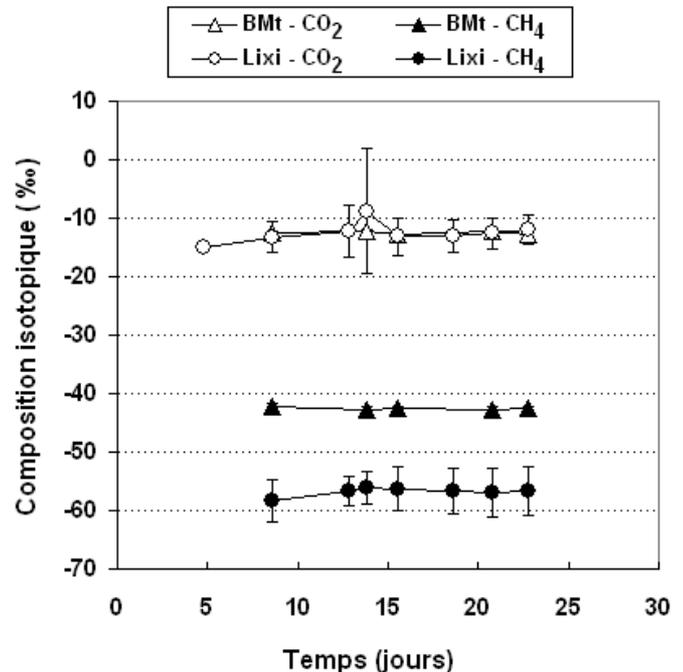


Figure 67 : Évolution des compositions isotopiques dans les incubations hydrogène à 80 %. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat (ils sont parfois masqués par les symboles).

1.2.2.2. Faible concentration d'hydrogène.

Les incubations réalisées avec l'inoculum de lixiviat d'ISDND, de boue de méthaniseur thermophile et boue de méthaniseur adaptée en condition mésophile à faible concentration en hydrogène (mélange gazeux N₂/H₂ 95 %/5 %), ont toutes conduit à la consommation de l'hydrogène ainsi qu'à la production de méthane. Les mesures de la composition isotopique du dioxyde de carbone et du méthane (Figure 68) ont permis de calculer le facteur de fractionnement apparent (Équation 16). La moyenne des facteurs de fractionnement apparent est ensuite calculée pour chacune des incubations. Les valeurs obtenues sont $1,061 \pm 0,003$ pour l'inoculum d'ISDND, $1,053 \pm 0,001$ pour l'inoculum de méthaniseur thermophile et $1,074 \pm 0,001$ pour l'inoculum de méthaniseur thermophile adapté en condition mésophile et correspondent, dans ces conditions expérimentales, au facteur de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe à faible concentration d'hydrogène.

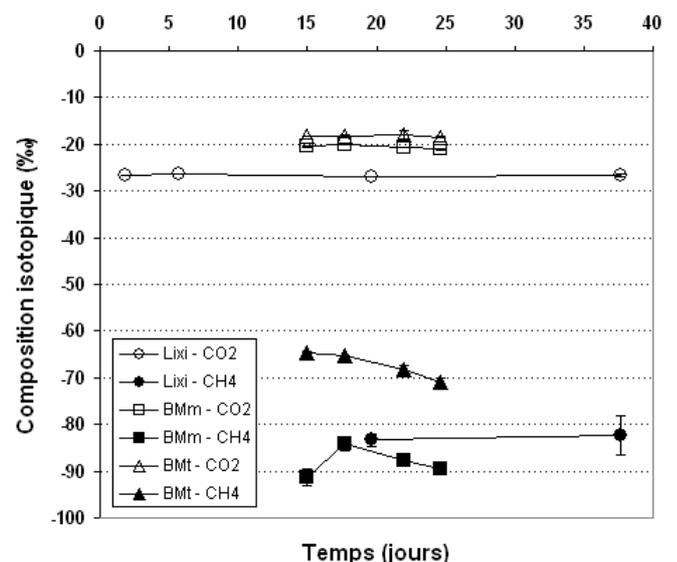


Figure 68 : Évolution des compositions isotopiques dans les incubations hydrogène à 5 %. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat (ils sont parfois masqués par les symboles).

1.3. Discussion

Les valeurs de facteurs de fractionnement déterminées dans le cadre de ce travail sont regroupées dans le Tableau 33 afin de pouvoir les comparer entre elles.

Tableau 33 : Facteurs de fractionnement déterminés expérimentalement.

Inoculum	Substrat	[Substrat]	Température	Facteur de fractionnement	Ecart-type	Réplikat
Lixiviât d'ISD	Acétate méthyle	3,0 g.L ⁻¹	35°C	1,013	0,001	2
	Acétate			1,019	0,000	3
	H ₂ /CO ₂	H ₂ 80 %		1,031	0,001	3
	H ₂ /CO ₂	H ₂ 5 %		1,061	0,003	2
Boue de méthaniseur thermophile	Acétate	3,0 g.L ⁻¹	55°C	1,025	∅	1
	H ₂ /CO ₂	H ₂ 80 %		1,048	0,006	3
	H ₂ /CO ₂	H ₂ 5 %		1,053	0,001	2
Boue de méthaniseur adapté mésophile	Acétate	3,0 g.L ⁻¹	35°C	1,022	∅	1
	H ₂ /CO ₂	H ₂ 5 %		1,074	0,001	2

1.3.1. Facteurs de fractionnement acétoclaste

Les facteurs de fractionnement calculés à partir des incubations d'acétate pour les différents inocula provenant des installations de traitement des déchets étudiées, sont typiques et caractéristiques de ceux trouvés dans la bibliographie pour la méthanogenèse acétoclaste. Les valeurs obtenues (entre 1,013 et 1,025) se situent, en effet, bien dans la gamme des valeurs bibliographiques déterminées lors d'incubations sur cultures pures de méthanogènes acétoclastes (1,007 à 1,035) (Tableau 18) et dans les environnements méthanogènes naturels (1,013 à 1,036) (Tableau 19).

La détermination du facteur de fractionnement de la méthanogenèse acétoclaste a été, dans cette étude et uniquement pour l'inoculum provenant d'ISDND, réalisée à la fois à partir des mesures de la composition isotopique de l'acétate (moyenne des deux atomes de carbone) et de celles du carbone du groupement méthyle. En toute rigueur, la détermination du facteur de fractionnement (entre le substrat et le produit), doit se faire à partir des valeurs obtenues pour le groupement méthyle de l'acétate. En effet, c'est l'atome de carbone de ce groupement qui est utilisé pour produire le méthane lors de la méthanogenèse acétoclaste. Les résultats obtenus mettent en évidence que la composition isotopique du carbone du groupement méthyle de l'acétate est enrichie en ¹²C de 6 ‰ par rapport à celle de la moyenne des deux atomes de carbone de l'acétate. La composition isotopique du groupement carbonyle de l'acétate se trouve donc enrichie d'environ 12 ‰ en carbone 13 par rapport à celle du groupement méthyle. Cette différence est de l'ordre de celle déjà observée (7 à 14 ‰) lors d'expériences sur des échantillons naturels provenant de sédiments marins (Blair et Carter Jr 1992). La mise en évidence de cette différence de composition isotopique intrinsèque à l'acétate, confirme l'intérêt de la détermination des facteurs de fractionnement à partir des mesures de la composition isotopique du groupement méthyle de l'acétate. Toutefois, l'utilisation des valeurs de facteurs de fractionnement déterminées à partir de la moyenne de la composition isotopique de l'acétate reste néanmoins pertinente lors d'expériences cherchant à identifier le métabolisme majoritairement à l'origine de la production du méthane. Lors d'approches plus fines visant à quantifier précisément la contribution des différents métabolismes, il peut néanmoins s'avérer nécessaire d'avoir recours à des valeurs de facteurs

de fractionnement déterminées à partir de la composition isotopique du groupement méthyle de l'acétate (Conrad 2005).

Dans le cadre de ce travail, des incubations ayant été réalisées à la fois en conditions mésophile et thermophile, il est apparu intéressant d'évaluer l'effet de la température sur le facteur de fractionnement isotopique acétoclaste. C'est en effet, un sujet ayant fait l'objet de peu de travaux. Il est important de prendre en compte que, pour les expériences réalisées dans le cadre de ce travail, un inoculum de digesteur de déchets a été incubé à 35°C et 55°C. Cependant, les inocula ne sont pas similaires car ils ont subi une pré-adaptation à différentes températures (35°C pour BM_m et 55°C pour BM_t). Cette période a très probablement entraîné une modification des populations microbiennes présentes et l'effet de la température sur un même inoculum ne peut donc ici être directement étudié. Cependant, les facteurs de fractionnement isotopique obtenus à 35°C (1,019 et 1,022) et 55°C (1,025) pour des inocula différents, semblent présenter des valeurs légèrement plus faibles à 35°C que celles obtenues à 55°C. Il est tout de même délicat de conclure sur un nombre si faible de valeurs. Si toutefois, un effet de la température existe, il semble donc, à priori être minime entre les deux températures classiquement utilisées en méthanisation.

1.3.2. Facteurs de fractionnement hydrogénotrophe

Les facteurs de fractionnement déterminés (1,031 et 1,048) lors des incubations avec un mélange gazeux d'H₂/CO₂ 80 %/20 % (Tableau 33) sont bien situés dans la plage de valeurs retrouvées dans la littérature pour des incubations à partir de cultures pures de méthanogènes hydrogénotrophes (1,021 à 1,071) (Tableau 18) (cf. Chapitre 2, § 2.4.2 Facteurs de fractionnements isotopiques des voies métaboliques de la méthanogenèse). Cependant, ils se situent parmi les valeurs les plus basses de la gamme. Ceci pourrait être dû au fait que ces incubations ont été réalisées à forte pression partielle en hydrogène car un mélange gazeux de H₂/CO₂ à 80 %/20 % a été utilisé. En effet, ce phénomène a déjà été observé et souligné dans la bibliographie (Valentine, Chidthaisong et al. 2004; Penning, Plugge et al. 2005). Il serait lié aux propriétés de réversibilité des étapes de la méthanogenèse hydrogénotrophe. En effet, dans un environnement contenant une importante quantité d'H₂, la réversibilité des réactions serait plus importante et cela diminuerait le fractionnement isotopique associé (Valentine, Chidthaisong et al. 2004). Une seconde explication à ces facteurs de fractionnement faibles a également été avancée (Conrad 2005). En effet, les fortes pressions d'hydrogène pourraient également stimuler la mise en place de la réaction d'homoacétogenèse (formation d'acétate à partir d'hydrogène et de dioxyde de carbone) et cela, particulièrement à hautes concentrations en H₂ (Hoehler, Albert et al. 1999) et à basses températures (Conrad, Bak et al. 1989). Cette réaction pourrait alors entraîner une modification du facteur de fractionnement (Alperin, Blair et al. 1992).

Afin de mesurer des facteurs de fractionnement isotopique à des pressions partielles plus proches de ce que l'on peut observer dans les installations industrielles de traitement de déchets, une seconde série d'expériences a été réalisée avec un mélange gazeux d'N₂/H₂ (95 %/5 %). Des facteurs de fractionnement caractéristiques de la méthanogenèse hydrogénotrophe (entre 1,053 et 1,074) ont alors été mesurés. Les valeurs obtenues (Tableau 33) se situent bien dans la gamme (milieu et haut de la gamme) des valeurs retrouvées dans la bibliographie déterminées sur cultures pures de méthanogènes hydrogénotrophes (Tableau 18) (cf. Chapitre 2, § 2.4.2 Facteurs de fractionnements isotopiques des voies métaboliques de la méthanogenèse).

Ainsi, nos résultats confirment que la pression partielle a un effet non négligeable sur les facteurs de fractionnement hydrogénotrophe. Le fait que les différentes expériences à partir desquelles les facteurs de fractionnement publiés dans la littérature ont été déterminés aient été réalisées à des teneurs en hydrogène différentes, pourrait ainsi expliquer l'étendue importante de la plage des valeurs de facteurs de fractionnement retrouvées pour la voie hydrogénotrophe dans la bibliographie. Il est intéressant de noter à ce sujet que la plupart des valeurs les plus basses déterminées l'ont été lors d'expériences réalisées en présence d'une forte pression partielle en hydrogène (Tableau 18).

Les facteurs de fractionnement isotopique obtenus à 35°C (1,061 et 1,074) et 55°C (1,053) pour des inocula différents, semblent présenter des valeurs légèrement plus faibles à 55°C que celles obtenues à 35°C. Dans la bibliographie, une décroissance du facteur de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe de 0,0025 unité tous les 10°C d'augmentation de la température a été mise en évidence (Botz, Pokojski et *al.* 1996) lors d'expériences réalisées sur des méthanogènes de l'ordre *Methanococcales* entre 35 et 85°C. L'ensemble des valeurs de facteurs de fractionnements isotopiques déterminées à différentes températures dans la bibliographie (Tableau 18) ne semble pas mettre en évidence de relation entre la température et le facteur de fractionnement isotopique hydrogénotrophe. Toutefois, les variations de facteurs de fractionnements isotopiques induites par les différentes teneurs en hydrogène lors des expériences issues de la littérature, pourraient masquer l'effet de la température sur les facteurs de fractionnement de la méthanogenèse hydrogénotrophe.

1.4. Conclusion

Ces résultats montrent que l'on retrouve pour les inocula étudiés, sélectionnés de façon intensive dans les installations industrielles de traitement de déchets, des facteurs de fractionnement classiquement retrouvés dans la littérature pour des écosystèmes naturels, et que ces derniers sont clairement distincts pour les deux grandes voies de la méthanogenèse que sont la méthanogenèse hydrogénotrophe et acétoclaste. Toutefois, de fortes pressions partielles en hydrogène semblent conduire à des facteurs de fractionnements isotopiques, pour la voie métabolique hydrogénotrophe, distincts mais relativement proches de ceux de la voie métabolique acétoclaste. Cependant, dans les systèmes de traitements de déchets tels que les méthaniseurs et les ISDND, les teneurs en dihydrogène restent généralement basses. Les différentes voies métaboliques de la méthanogenèse (acétoclaste et hydrogénotrophe) devraient donc pouvoir être différenciées grâce aux mesures de compositions isotopiques du méthane et du dioxyde de carbone dans le biogaz produit par ces systèmes. Par ailleurs les effets de la température sur les facteurs de fractionnement semblent minimes entre les deux gammes de températures classiquement rencontrées dans les systèmes de traitement des déchets (mésophiles et thermophiles). L'approche isotopique proposée paraît donc adaptée et applicable à l'étude des voies métaboliques méthanogènes lors de la digestion anaérobie des déchets.

2. Effet de la température sur les voies métaboliques méthanogènes

2.1. Effet de la température lors de la digestion anaérobie de déchets

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la température est un des paramètres influençant les processus de digestion anaérobie de la matière organique (cf. Chapitre 2, § 1.2.3 La température). Dans le domaine de la digestion anaérobie des DND, l'étude de ce paramètre présente un intérêt tout particulier lié au développement de la filière

de méthanisation. En effet, deux températures sont généralement mises en œuvre (mésophile ou thermophile) dans les digesteurs comme cela a été présenté dans le chapitre 1 (cf. Chapitre 1, § 3.2.5 Température). Les processus thermophiles semblent présenter des cinétiques de réaction plus rapides (Canalis 1999; Veeken et Hamelers 1999) et favoriseraient l'hygiénisation des digestats par la destruction des bactéries pathogènes (Bendixen 1994; Gallert et Winter 1997). Cependant, les processus thermophiles sont considérés comme étant plus sensibles aux changements environnementaux et peuvent être moins stables que les processus mésophiles et sujet à des inhibitions pouvant entraîner le blocage de certaines réactions (El-Mashad, Zeeman et *al.* 2004). Certaines études ont tout de même montré que l'obtention un processus de digestion anaérobie thermophile stable est possible (Ahring 1994). Dans ce contexte, l'approche isotopique préalablement validée pour l'étude des systèmes industriels de traitements de déchets a été mise en œuvre afin d'étudier l'effet de la température sur les voies métaboliques de la méthanogenèse, en étudiant plus particulièrement les processus se déroulant en conditions mésophiles (35°C) et thermophiles (55°C).

2.1.1. Digestion anaérobie des déchets en conditions mésophiles

2.1.1.1. Introduction

Dans cette partie, le protocole expérimental d'étude de la dégradation du déchet reconstitué en microcosmes, présenté dans le paragraphe 4 du chapitre 3 intitulé "Les flacons à plasma ou microcosmes", a été utilisé. Brièvement, des incubations de 10 g d'OM françaises reconstituées dans 210 mL de tampon carbonate ont été réalisées en conditions mésophiles dans des flacons à plasma de 330 mL et en présence d'un inoculum provenant de lixiviat d'ISDND. L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Nomenclature des expériences d'incubation de déchets en conditions mésophiles.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	Température
DRF-35 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Déchets reconstitués français	10 g	Carbonate	35°C
T-35-négatif (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Ø	10 g	Carbonate	35°C

Un triplicat de témoin négatif (pas de substrat) a été réalisé avec l'inoculum. Aucune production de méthane n'est enregistrée après 100 jours d'incubation.

2.1.1.2. Résultats expérimentaux obtenus

La Figure 69 représente l'évolution des productions cumulées de méthane pour le triplicat d'incubations DRF-35. Des différences de cinétique et de rendement de production de méthane peuvent être observées entre les différentes incubations de déchets réalisées à 35°C (Figure 69). Les valeurs de production de méthane cumulée finale (83,1 L.kg⁻¹) se situent dans la fourchette indiquée dans la bibliographie (entre 60 et 170 L.kg⁻¹) (El-Fadel, Findikakis et *al.* 1996). Dans la suite de cette partie, les résultats détaillés d'une seule de ces incubations (DRF-35 (1)) seront présentés. Le but est de simplifier les interprétations qui nécessitent d'être plus précises que des comparaisons de moyennes lors de la confrontation des différents résultats (isotopie, microbiologie, paramètres chimiques des lixiviats).

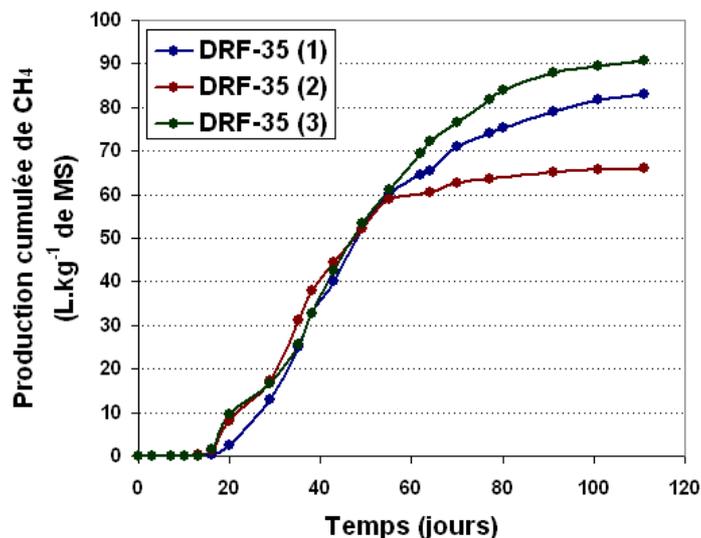


Figure 69 : Évolution de la production cumulée de méthane des incubations DRF-35.

2.1.1.2.1. Production de gaz et évolution des paramètres physico-chimiques du lixiviat

La Figure 70, A montre l'évolution de la production cumulée de méthane et la Figure 70, B celle des concentrations en COD et AGV du lixiviat. Trois phases peuvent être distinguées. La première correspond à la période de latence (Jour 0 à 20). Pendant cette phase, une augmentation massive du COD (composé à 72 % d'AGV) est observée. L'acétate qui est l'AGV formé majoritairement s'accumule jusqu'à atteindre la valeur de 1793 mgC.L^{-1} , ce qui représente 53 % du COD. La seconde période (jour 20 à 50) correspond à la phase active de production de méthane. Pendant cette phase, les concentrations en COD et AGV diminuent. La consommation de l'acétate et celle du butyrate surviennent simultanément alors que celle du propionate intervient plus tard (à partir du jour 50) lorsque la concentration d'acétate devient faible. Enfin, pendant la dernière phase, la production de méthane diminue fortement jusqu'à se stabiliser, après le jour 110, autour de $83,1 \text{ L.kg}^{-1}$ de matière sèche. Le COD se stabilise également à une valeur proche de 400 mgC L^{-1} .

2.1.1.2.2. Composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone

L'évolution des compositions isotopiques du CH_4 ($\delta^{13}\text{CH}_4$) et du CO_2 ($\delta^{13}\text{CO}_2$) est présentée en Figure 70, C. Au début de l'incubation, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ décroît lentement du jour 0 à 20 jusqu'à atteindre $-59,5 \text{ ‰}$. Lorsque la production active de méthane démarre, la composition isotopique du méthane commence également à augmenter. Cette augmentation se poursuit jusqu'à atteindre $-35,4 \text{ ‰}$ au jour 52. Ensuite, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ décroît avant de se stabiliser pendant toute la phase finale de faible production de méthane. Durant la première phase (0-20 jours) le $\delta^{13}\text{CO}_2$ augmente légèrement (de -10 à -5 ‰), il chute ensuite au début de la phase active de méthanogenèse entre les jours 20 et 30 pour atteindre la valeur de -20 ‰ . Il augmente ensuite jusqu'au jour 80 avant de se stabiliser à une valeur située autour de -5 ‰ . Les tendances des valeurs mesurées et recalculées des compositions isotopiques du méthane et du dioxyde de carbone sont relativement similaires. Seules les valeurs minimales et maximales sont légèrement amplifiées par le recalcul.

L'évolution du facteur de fractionnement apparent (Figure 70, D) se caractérise par une augmentation initiale de 1,045 jusque 1,060 pendant les vingt premiers jours. Cette augmentation est suivie d'une diminution à 1,023 entre les jours 20 et 50 puis finalement, le facteur de fractionnement augmente à nouveau et se stabilise à partir du jour 80 à 1,060.

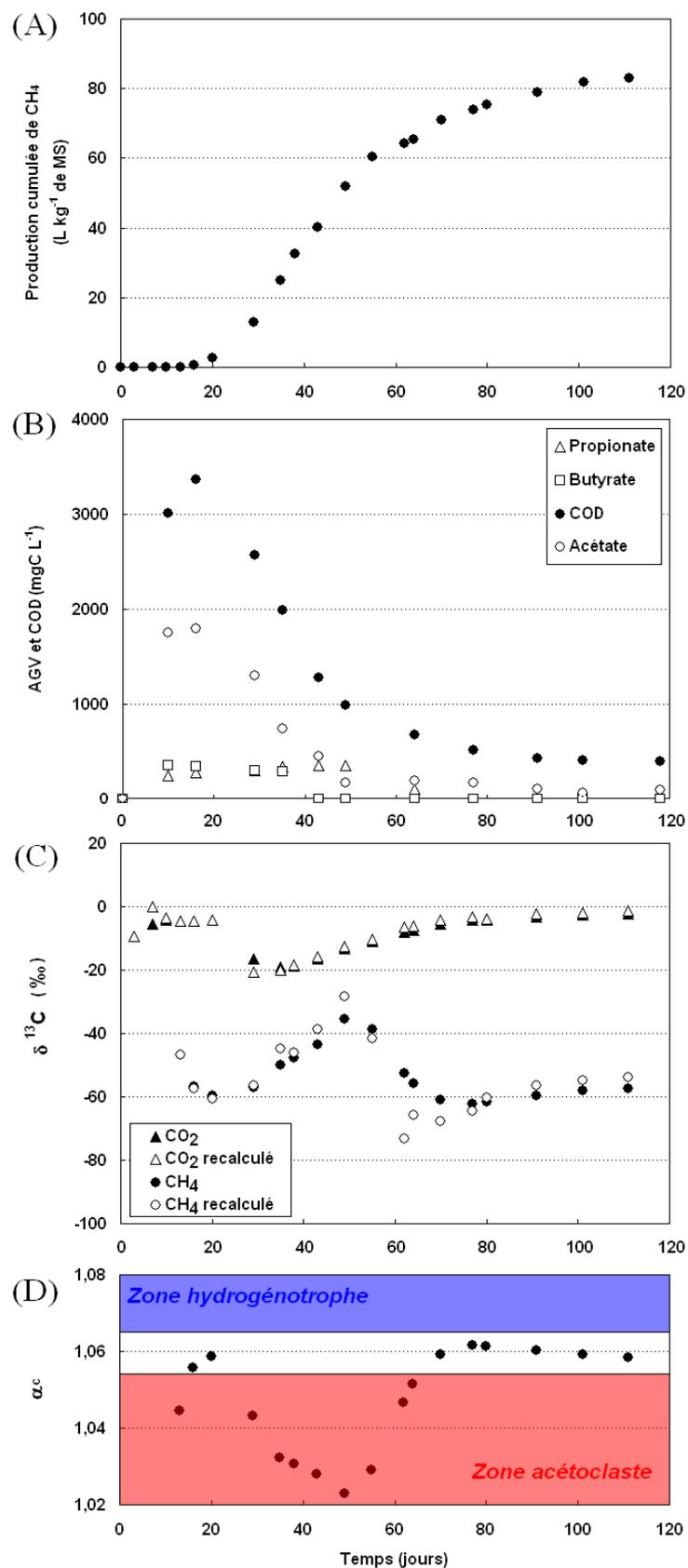


Figure 70 : Suivi d'une incubation de déchets reconstitués français à 35°C (DRF-35 (1)).

- (A) Évolution de la production cumulée de méthane ;
- (B) Évolution de la composition chimique du lixiviat ;
- (C) Évolution des signatures isotopiques du CH₄ et du CO₂.
- (D) Évolution du facteur de fractionnement apparent ;

2.1.1.2.3. Observations FISH

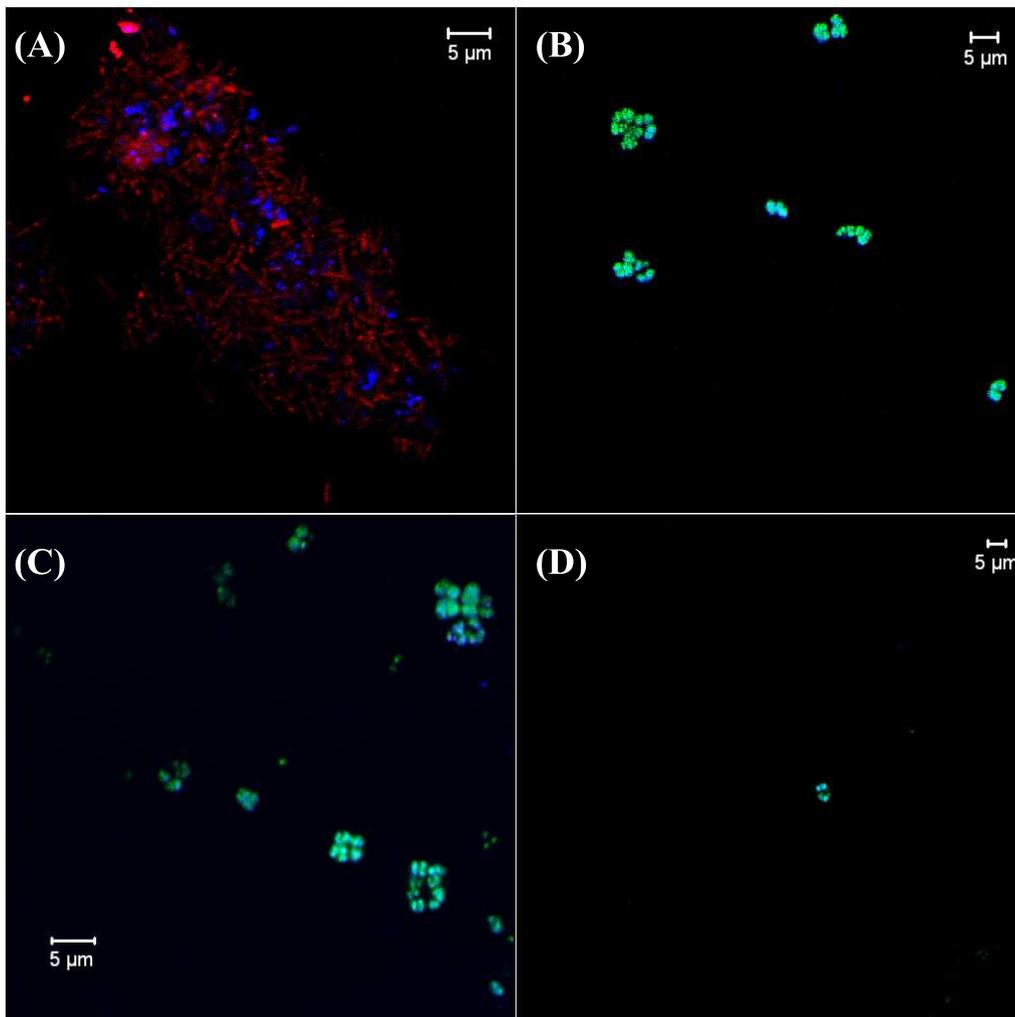


Figure 71 : Observations FISH de DRF-35 (1).

A : Inoculum DRF-35, Sondes MS1414 - Cy5 (bleu), MX825 -Cy3 (rouge).

B : DRF-35 (1), Jour 35, Sondes MS1414 - Cy5 (bleu), MX825 -Cy3 (rouge) & ARC915 – FITC (vert).

C : DRF-35 (1), Jour 43, Sondes MS1414 - Cy5 (bleu), MX825 -Cy3 (rouge) & ARC915 – FITC (vert).

D : DRF-35 (1), Jour 77, Sondes MS1414 - Cy5 (bleu), MX825 -Cy3 (rouge) & ARC915 – FITC (vert).

Les hybridations FISH (Figure 71, A) révèlent que les archées hybridant aux sondes MX825 et MS1414, spécifiques des familles *Methanosaetaceae* et *Methanosarcinaceae* respectivement, sont toutes deux présentes dans l'inoculum provenant du lixiviat. Pendant la phase active de production de méthane (Figure 71, B et C), de nombreux clusters de membres de la famille *Methanosarcinaceae*, car hybridant à la sonde MS1414, sont observés. Pendant la phase finale de stabilisation de la production de méthane (Figure 71, D), des clusters de membres de la famille *Methanosarcinaceae*, car hybridant à la sonde MS1414, sont également observés. Une estimation visuelle réalisée à partir de l'observation de la cohybridation des sondes MS1414 (spécifique à la famille *Methanosarcinaceae*) et ARC915 (sonde archées généraliste), révèle que *Methanosarcinaceae* est la famille d'archées la plus abondante pendant toute la durée de l'incubation (phase active de production et phase de stabilisation de la production du méthane) car 80 à 100 % des archées sont cohybridées par les deux sondes.

2.1.1.3. Discussion

Les évolutions de la composition du lixiviat, de la production de gaz et des signatures isotopiques permettent de distinguer trois phases principales pendant la dégradation du déchet reconstitué français en conditions mésophiles:

2.1.1.3.1. Phase 1 (jour 0 à 20)

Cette phase se caractérise par une phase de latence suivie d'une production de méthane très faible (quasiment nulle). La production de méthane semble débuter par la voie acétoclaste, la contribution de la voie hydrogénotrophe allant ensuite en s'intensifiant tout au long de cette phase, comme l'illustre la diminution de la composition isotopique du méthane et l'augmentation de la valeur du facteur de fractionnement apparent qui montre que le méthane au jour 20 est produit par un mélange des métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe (Figure 70, D). L'hydrogène nécessaire à la production du méthane produit par la voie hydrogénotrophe au cours de cette phase, est certainement produit lors des phases d'hydrolyse et d'acidogenèse. Ces réactions sont en effet particulièrement actives durant cette période comme le montre l'accumulation du COD et des AGV. Cette accumulation des AGV traduit d'ailleurs le fait que les réactions d'hydrolyse et d'acidogenèse sont actives pendant cette période alors que la méthanogenèse n'a pas encore réellement démarré. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la libération massive d'acétate peut conduire à des phénomènes d'inhibition transitoire des archées méthanogènes acétoclastes introduites avec l'inoculum (Ferry 1993).

2.1.1.3.2. Phase 2 (jour 20 à 50)

Cette seconde phase se caractérise par le démarrage de la production active de méthane (Figure 70, A). Le méthane produit pendant cette période, l'est essentiellement par voie acétoclaste comme le révèle les valeurs de la composition isotopique du méthane qui sont supérieures à -60 ‰ (Figure 70, B) et du facteur de fractionnement apparent qui restent inférieures à 1,055 (Figure 70, D). Il est à noter que des valeurs de compositions isotopiques du méthane relativement élevées, allant jusqu'à $-25,4\text{ ‰}$, sont observées. Ceci est certainement dû au fait que notre dispositif expérimental soit un "système fermé". En effet, l'acétate accumulé pendant l'étape d'hydrolyse et d'acidogenèse s'enrichit ensuite progressivement en carbone 13 en raison de la consommation préférentielle des molécules d'acétate contenant du carbone 12 pendant la méthanogenèse acétoclaste comme cela a déjà été observé (Penning et Conrad 2007) et mis en évidence lors des incubations ayant permis de mesurer les facteurs de fractionnement isotopique acétoclaste.

Les observations réalisées à l'aide de la technique FISH pendant cette période révèlent la présence de structures typiques (clusters) des *Methanosarcina*. Cette famille est connue pour être capable de consommer l'acétate et le H_2/CO_2 (Ferry 1993). Ces résultats montrent que les micro-organismes de cette famille sont responsables de la majeure partie de la production du méthane (résultats FISH) et que ce méthane est produit par méthanogenèse acétoclaste (résultats isotopiques) durant cette phase.

2.1.1.3.3. Phase 3 (jour 50 à 120)

Cette phase se caractérise par une diminution du rendement de production de méthane. Pendant cette période, la production de méthane est partiellement due à la réaction d'oxydation syntrophique du propionate qui démarre une fois que la concentration d'acétate devient faible. Cette réaction produit de l'acétate et de l'hydrogène qui doivent être

consommés rapidement afin que la réaction reste énergétiquement favorable (Schink 1997). La réaction globale d'oxydation syntrophique du propionate est détaillée dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Réaction d'oxydation syntrophique du propionate.

Bilan : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 7/4 \text{CH}_4 + 5/4 \text{CO}_2$	
(1) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$	(Oxydation du propionate)
(2) $3\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow 3/4 \text{CH}_4 + 1/4 \text{CO}_2$	(Méthanogenèse hydrogénotrophe)
(3) $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	(Méthanogenèse acétoclaste)

L'évolution de la composition isotopique du méthane met en évidence qu'un changement de métabolisme intervient au début de cette période. Le facteur de fractionnement apparent (Figure 70, D) passe en effet de la zone caractéristique du méthane majoritairement produit par méthanogenèse acétoclaste (en rouge sur la Figure 70, D), à la zone dans laquelle le méthane provient d'un mélange des métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe. Ceci est tout à fait cohérent avec la mise en place de l'oxydation syntrophique du propionate car lors de cette réaction les produits de l'oxydation du propionate (acétate, hydrogène et CO_2) sont consommés dans un deuxième temps par méthanogenèse hydrogénotrophe et acétoclaste (Tableau 35). Les membres de la famille *Methanosarcinaceae* demeurent les méthanogènes dominants (80-100 % des archées (estimation à partir des images FISH)) pendant cette dernière phase. Ces résultats suggèrent que la communauté d'archées présente et active, est dominée par la famille des *Methanosarcinaceae* qui semble capable de réaliser les métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe.

Il est à noter que ces résultats, obtenus sur un déchet reconstitué français inoculé avec un inoculum provenant d'un lixiviat d'ISDND, sont comparables à ceux obtenus lors d'expériences menées parallèlement à ce travail sur le même déchet français reconstitué inoculé avec un autre type d'inoculum (boue de STEP) et sur d'autres types de déchets (déchets reconstitués chinois, déchets putrescibles). L'ensemble de ces données montre que la succession des métabolismes observée dans cette expérience n'est pas fonction du type d'inoculum ou du type de déchet mais semble généralisable.

2.1.1.4. Conclusion

Ces résultats illustrent bien l'intérêt d'une approche combinant les mesures de compositions isotopiques et les observations FISH. En effet, les informations apportées sur la dynamique des métabolismes et des populations microbiennes impliquées permettent d'obtenir une meilleure compréhension du processus de digestion anaérobie des déchets ménagers en conditions mésophiles. Ainsi, ces expériences révèlent que le méthane est produit par différents métabolismes au cours du temps (mélange acétoclaste/hydrogénotrophe, acétoclaste puis acétoclaste/hydrogénotrophe). La majorité du méthane est toutefois produit par méthanogenèse acétoclaste lors de la phase active de production de méthane par des membres de la famille *Methanosarcinaceae*. En fin d'incubation, le méthane semble être produit en partie par oxydation syntrophique du propionate. Cette réaction qui conduit à la formation du méthane par les métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe conjointement, semble impliquer la même communauté d'archées que lors de la phase active de production de méthane (*Methanosarcinaceae*). Ainsi, la combinaison des résultats isotopiques et microbiologiques met en évidence la versatilité métabolique des membres de la famille *Methanosarcinaceae*.

2.1.2. Digestion anaérobie des déchets : conditions mésophiles vs thermophiles

2.1.2.1. Introduction

Dans cette partie, les résultats obtenus lors de la digestion anaérobie de déchets français reconstitués en condition thermophile (55°C), sont présentés et comparés avec ceux observés en condition mésophile (35°C) décrits dans un premier temps dans le paragraphe précédent par souci de clarté. Ainsi, afin d'éviter certaines redondances, seuls les résultats obtenus à 55°C et les résultats additionnels obtenus à 35°C seront présentés en détails. Les incubations thermophiles ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles à 35°C (incubations de 10g d'OM françaises reconstituées en flacons à plasma de 330 mL contenant 210 mL de tampon carbonate avec un inoculum provenant de lixiviat d'ISDND), seule la température d'incubation était différente. L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Nomenclature des expériences d'incubation de déchets.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	Température
DRF-35 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Déchets reconstitués français	10 g	Carbonate	35°C
T-35-négatif (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Ø	0 g	Carbonate	35°C
DRF-55 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Déchets reconstitués français	10 g	Carbonate	55°C
T-55-négatif (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Ø	0 g	Carbonate	55°C

Des triplicats de témoin négatif (pas de substrat) ont été réalisés avec l'inoculum à 35 et 55°C. Aucune production de méthane n'est enregistrée après 100 jours d'incubation.

2.1.2.2. Résultats expérimentaux obtenus

La Figure 72 représente l'évolution des productions cumulées de méthane pour le triplicat d'incubations en condition thermophile (55°C).

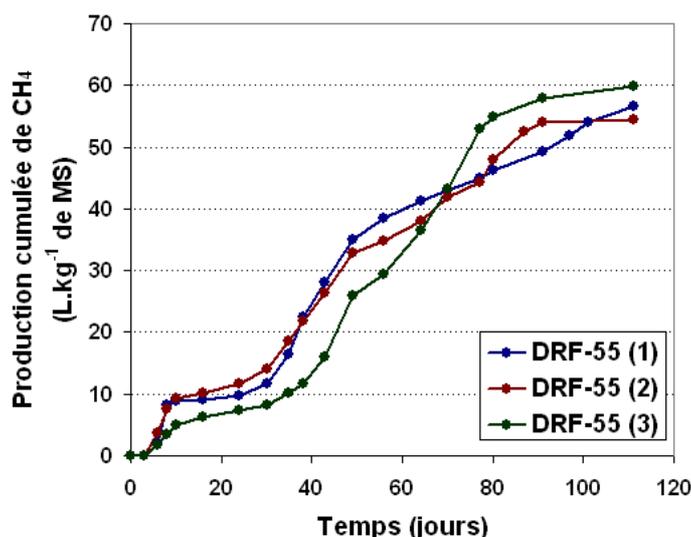


Figure 72 : Évolution de la production cumulée de méthane des incubations DRF-55.

De légères différences de cinétique et de rendement de production de méthane peuvent être observées entre les différentes incubations de déchets réalisées à 55°C (Figure 72).

Cependant, les trois incubations ayant des comportements relativement similaires, dans la suite de cette partie, les résultats détaillés d'une seule de ces incubations (DRF-55 (2)) seront présentés et comparés à ceux déjà présentés dans le paragraphe précédent pour la dégradation des déchets à 35°C.

Cette comparaison apparaît d'autant plus intéressante que la représentation des moyennes avec écarts-type des productions de méthane cumulées observées à 35°C et 55°C (pour les triplicats d'incubations de déchets reconstitués français), met en évidence des différences significatives en termes de temps de latence et de production finale de méthane qui seront discutées dans la suite de cette partie à partir notamment des résultats des approches isotopiques et microbiologiques mises en œuvre dans le cadre de ce travail.

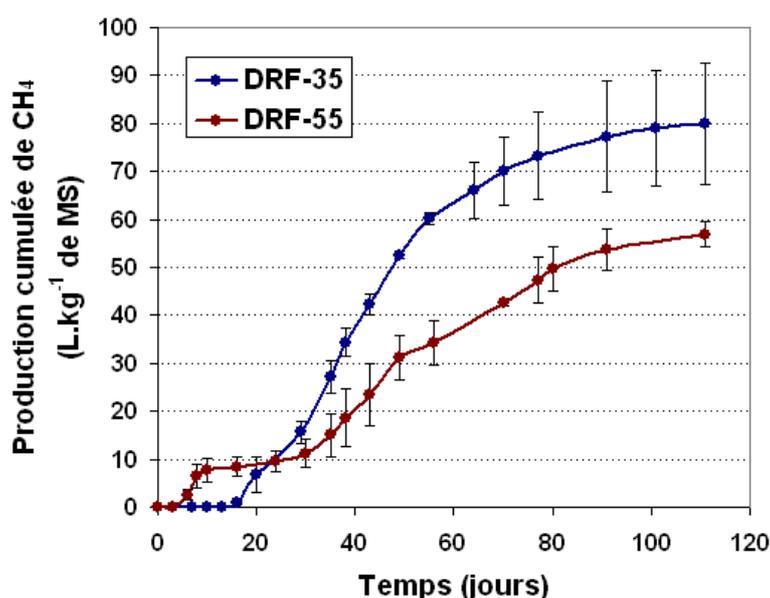


Figure 73 : Évolution des moyennes de production cumulée de méthane des incubations DRF-35 et DRF-55, les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre les incubations du triplicat.

2.1.2.2.1. Production de gaz et évolution des paramètres physico-chimiques du lixiviat

L'évolution de la production cumulée de méthane à 55°C (Figure 74, A) est différente de celle obtenue à 35°C. En effet, la production de méthane à 55°C démarre très rapidement avec une vitesse de production de méthane relativement importante. Cette production se stabilise ensuite à partir du jour 10 avant de redémarrer vers le jour 25. L'évolution initiale de la composition du lixiviat à 55°C (Figure 74, B) est relativement similaire à celle observée à 35°C. En effet, une augmentation massive de la concentration en COD et en AGV a lieu dans les 15 premiers jours d'incubation ($[\text{COD}]_{\text{max}} \approx 3000 \text{ mgC.L}^{-1}$, $[\text{acétate}]_{\text{max}} \approx 1700 \text{ mgC.L}^{-1}$). La concentration en COD et AGV du lixiviat commence à diminuer simultanément avec la reprise de la production de méthane entre les jours 20 et 30. Cette phase de production active de méthane dure environ 70 jours, avec une vitesse de production plus faible que lors de la phase initiale. L'épuisement du stock de COD et d'AGV conduit à la diminution de la production de méthane jusqu'à un niveau très faible. Cependant, à la fin de l'incubation, une importante partie du COD (869 mgC.L^{-1}) reste dans le lixiviat. Le propionate produit pendant l'hydrolyse de la MO des déchets ne semble pas être consommé puisque en fin d'incubation, la concentration de propionate dans le lixiviat est de 359 mgC.L^{-1} . A la fin de la période expérimentale, la production de méthane cumulée est d'environ $55,9 \text{ L.kg}^{-1}$ de matière sèche, soit environ 66 % de la production cumulée obtenue à 35°C.

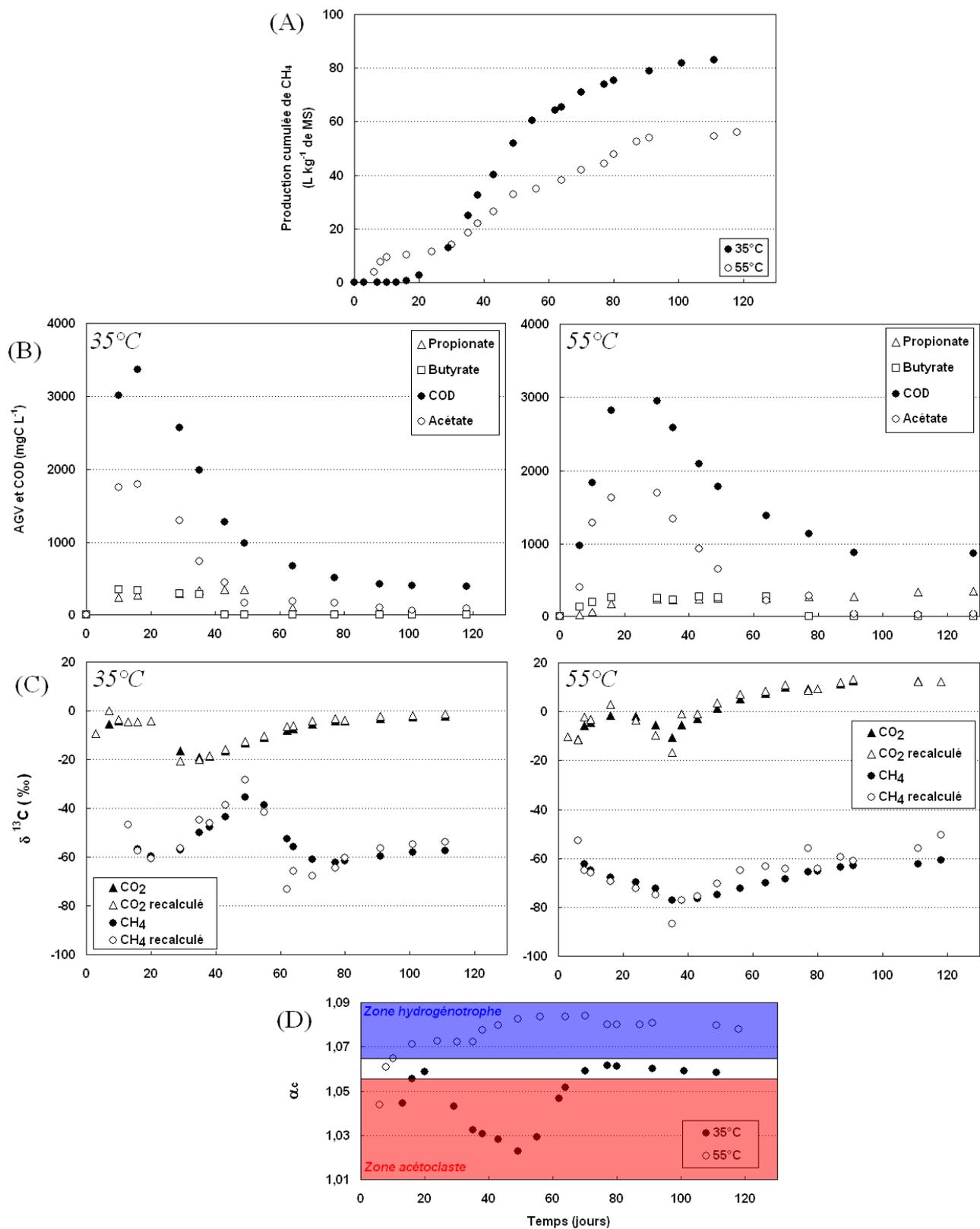


Figure 74 : Suivi des incubations de déchets à 35°C (DRF-35 (1)) et 55°C (DRF-55 (2)).

- (A) Évolution de la production cumulée de méthane ;
- (B) Évolution de la composition chimique du lixiviat ;
- (C) Évolution des signatures isotopiques du CH₄ et du CO₂ ;
- (D) Évolution du facteur de fractionnement apparent.

2.1.2.2.2. Composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone

Les évolutions des compositions isotopiques du CH₄ ($\delta^{13}\text{CH}_4$) et du CO₂ ($\delta^{13}\text{CO}_2$) lors de la dégradation du déchet à 35 et 55°C sont présentées en Figure 74, C. A 55°C, au début de l'incubation, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ décroît lentement du jour 0 à 40 jusqu'à atteindre sa valeur la plus faible (environ -80 ‰). Le $\delta^{13}\text{CO}_2$ reste quant à lui autour de -10 ‰ pendant cette même période. A partir du jour 40, les compositions isotopiques du CH₄ ($\delta^{13}\text{CH}_4$) et du CO₂ ($\delta^{13}\text{CO}_2$) vont toutes deux augmenter progressivement et de façon quasiment parallèle pendant toute la période de production de méthane jusqu'à atteindre -60 ‰ et +10 ‰ respectivement. Les tendances des valeurs mesurées et recalculées des compositions isotopiques sont relativement similaires. Seules les valeurs maximales et minimales sont légèrement amplifiées par le recalcul.

L'évolution du facteur de fractionnement apparent en conditions thermophiles (Figure 74, D) se caractérise par une augmentation initiale rapide de 1,045 jusque 1,070 durant les vingt premiers jours, suivie d'une stabilisation jusqu'au jour 40. Une nouvelle augmentation de la valeur du facteur de fractionnement se produit ensuite pour atteindre 1,080-1,085 au jour 50 et s'y stabiliser.

2.1.2.2.3. Évolution des communautés de micro-organismes (par ARISA)

Nous avons rencontré des difficultés pour réaliser des hybridations FISH sur des échantillons provenant d'incubations à 55°C. Une des raisons envisagée est une différence dans la structure des membranes des cellules entre 35°C et 55°C, qui pourrait rendre le protocole de fixation inadapté. Toutefois, à ce jour, aucune explication définitive ne peut être avancée. L'utilisation de cette technique sur des échantillons provenant d'incubations thermophiles semble toutefois possible comme l'illustrent des résultats obtenus lors d'une étude de la dégradation du phénol en conditions thermophiles (Chen, Wu *et al.* 2008).

En l'absence d'observation FISH, le suivi de l'évolution des communautés microbiennes a été réalisé par PCR-ARISA ciblant le domaine *Archaea* et comparé aux résultats obtenus à 35°C. La Figure 75 présente l'évolution des images dites « Gel-like » sur lesquelles chaque bande correspond à un type de micro-organismes. Il arrive également qu'un seul type de micro-organisme puisse donner plusieurs bandes d'amplification comme nous avons pu le constater lors de PCR ARISA réalisées sur des souches pures.

A 35°C, par rapport à celui de l'inoculum (jour 0), les profils se modifient pendant les quarante trois premiers jours d'incubation. A partir du jour quarante trois, une bonne stabilité des profils peut être observée. Cependant, certaines bandes deviennent beaucoup moins intenses entre les jours 43 et 69 (bandes situées aux environs de 700 paires de bases). A partir du jour 69, la stabilité des profils est remarquable jusqu'à la fin de l'expérience.

A 55°C, les profils sont différents de ceux rencontrés à 35°C. En effet, plusieurs bandes ne sont pas identiques. Le profil en condition thermophile se modifie rapidement et assez profondément par rapport à celui de l'inoculum lors de la première phase de production de méthane (entre les jours 0 et 10). Une deuxième modification de profil est observée entre les jours 10 et 16 (période d'interruption de la production de méthane) avant de se stabiliser à partir du jour 30. La stabilité des profils est remarquable pendant toute la deuxième phase de production (entre les jours 30 et 91).

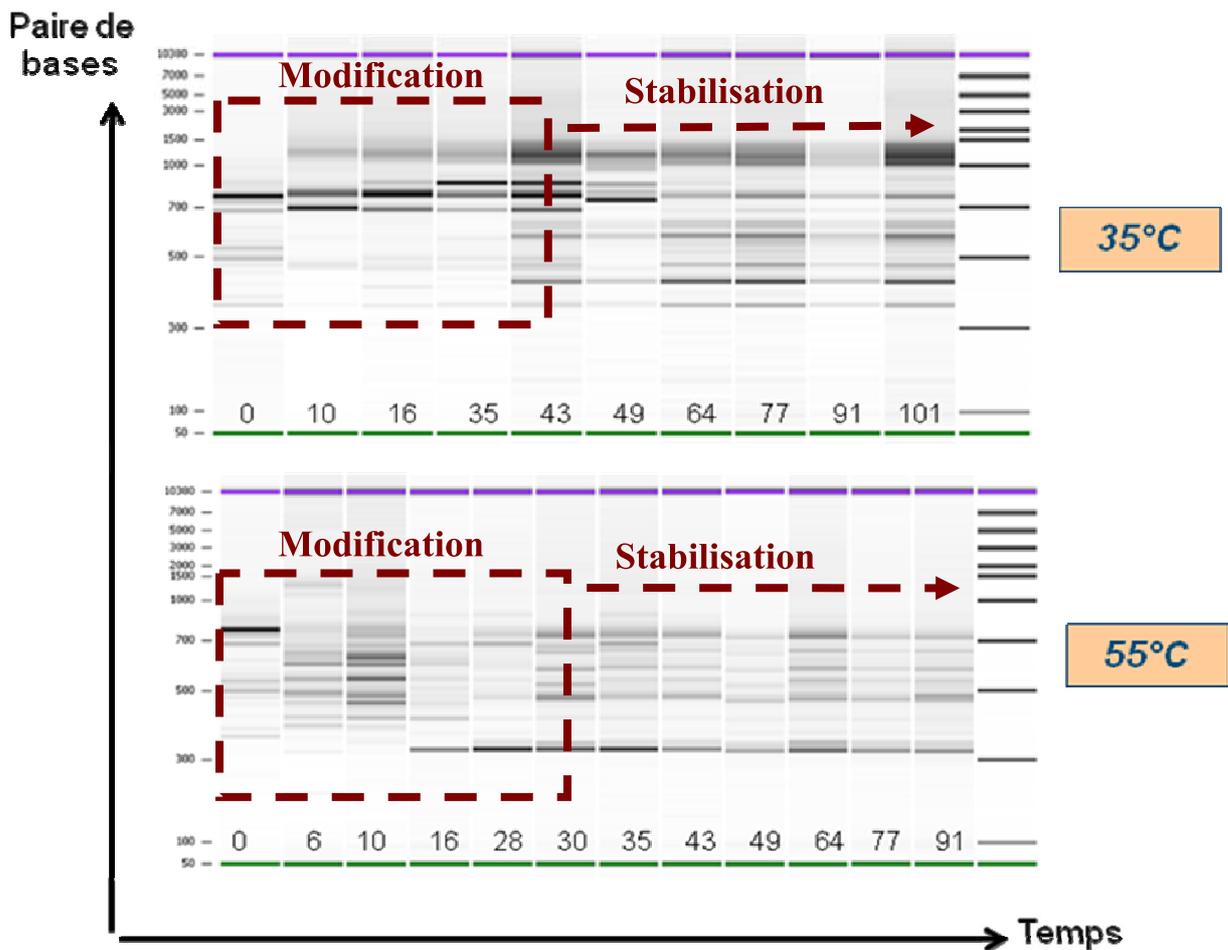


Figure 75 : ARISA archées des incubations à 35°C (DRF-35 (1)) et 55°C (DRF-55 (2)).

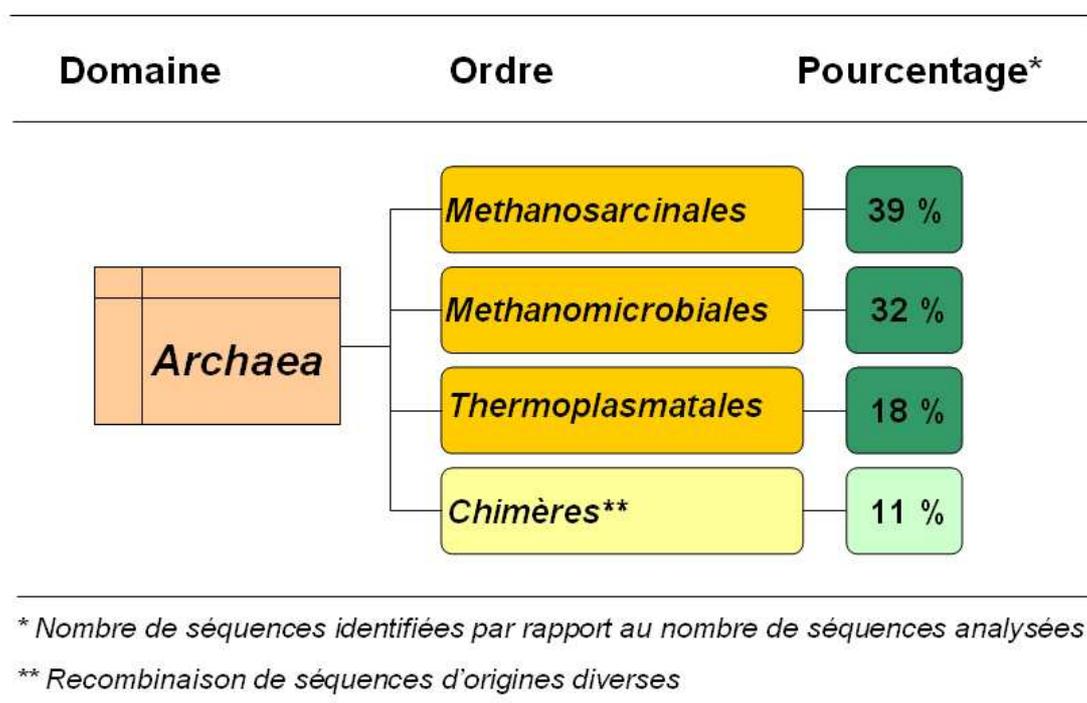
2.1.2.2.4. Identifications des micro-organismes par clonage/séquençage

Un clonage/séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S des archées et des bactéries des échantillons prélevés, extraits et amplifiés au jour 43 des incubations DRF-35 (1) et DRF-55 (2), a été réalisé.

En ce qui concerne l'incubation DRF-35 (1), au jour 43, les micro-organismes du domaine *Archaea* présents, ont été identifiés comme appartenant à trois ordres distincts (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* et *Thermoplasmatales*). Au sein de la banque de clone, on retrouve des *Methanosarcinales* (39 %), des *Methanomicrobiales* (32 %) ainsi que quelques *Thermoplasmatales* (18 %). Plus en détails, des séquences proches de *Methanoculleus palmolei*, de clones référencés comme *Uncultured microbiales*, de *Methanosarcina barkeri* et de "*Terrestrial miscellaneous*" ont pu être identifiés suite à la comparaison avec une banque de séquences (SSURef_102_SILVA).

La présence en proportion dominante des *Methanosarcina barkeri* est cohérente avec les observations réalisées en FISH. Cependant, les *Methanomicrobiales* et les *Thermoplasmatales* n'ont pas été observées lors des hybridations. Il est donc possible que ces micro-organismes soient minoritaires ou ne soient pas ou peu actifs et donc très difficiles à observer par la technique FISH. En effet, l'intensité du signal de fluorescence dépend du

nombre de copie d'ARN ribosomiaux 16S hybridés, or ce nombre dépend directement de l'activité cellulaire du micro-organisme.

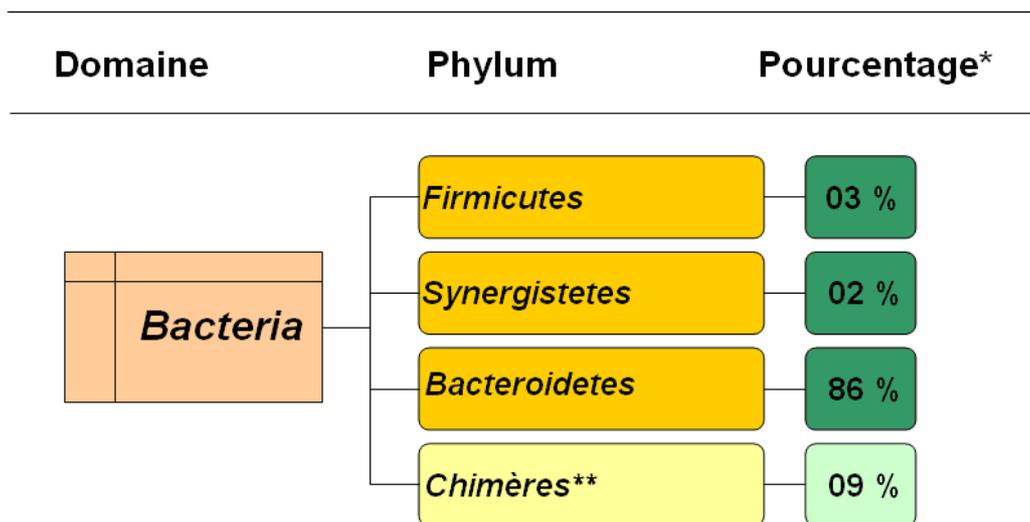


Détails :

Methanosarcinales	Espèce	<i>Methanosarcina barkeri</i>
Methanomicrobiales	Espèce	<i>Methanoculleus palmolei</i>
		<i>Uncultured microbiales</i>
Thermoplasmatales	Groupe	<i>Terrestrial miscellaneous</i>

Figure 76 : Résultats du clonage/séquençage des archées à 35°C (DRF-35 (1) au jour 43) obtenus par analyses phylogénétiques (28 clones archées séquencés).

En ce qui concerne l'incubation DRF-35 (1), au jour 43, les micro-organismes du domaine *Bacteria* présents, ont été identifiés comme appartenant à trois ordres distincts (*Firmicutes*, *Synergistetes* et *Bacteroidetes*). Au sein de la banque de clone, on trouve une grande majorité de *Bacteroidetes* (86 %), mais également quelques *Firmicutes* (3 %) ainsi que quelques *Synergistetes* (2 %). Plus en détails, des séquences proches de *Proteiniphillum*, *Petrimonas*, *Dysgomonas*, *Clostridium phytofermentans* et *Clostridiales bacterium* ont pu être identifiés par comparaison aux banques de séquences répertoriées à ce jour.



* Nombre de séquences identifiées par rapport au nombre de séquences analysées

** Recombinaison de séquences d'origines diverses

Détails :

Bacteroidetes	Genre	<i>Proteiniphillum</i>
	Genre	<i>Petrimonas</i>
	Genre	<i>Dysgomonas</i>
Firmicutes	Espèce	<i>Clostridium phytofermentans</i>
	Groupe	<i>Clostridiales bacterium</i>
∅		<i>Unknown</i>

Figure 77 : Résultats du clonage/séquençage des bactéries à 35°C (DRF-35 (1) au jour 43) obtenus par analyses phylogénétiques (63 clones bactéries séquencés).

En ce qui concerne l'incubation DRF-55 (2), au jour 43, les micro-organismes du domaine *Archaea* présents, ont été identifiés comme appartenant à deux *phyla* distincts (*Methanomicrobiales* et *Thermoplasmatales*). Dans la banque de clones, on trouve une majorité de *Methanomicrobiales* (84 %), mais également des *Thermoplasmatales* (14 %). Plus en détails, des *Methanoculleus thermophilus* ainsi que des *Terrestrial miscellaneous* ont pu être identifiés par comparaison aux banques de séquences répertoriées à ce jour.

Les archées identifiées à 55°C appartiennent très majoritairement à l'ordre des *Methanomicrobiales* (*Methanoculleus thermophilus*). Cependant, ces micro-organismes sont différents de ceux retrouvés à 35°C (*Methanoculleus palmolei* à 35°C et *Methanoculleus thermophilus* à 55°C)

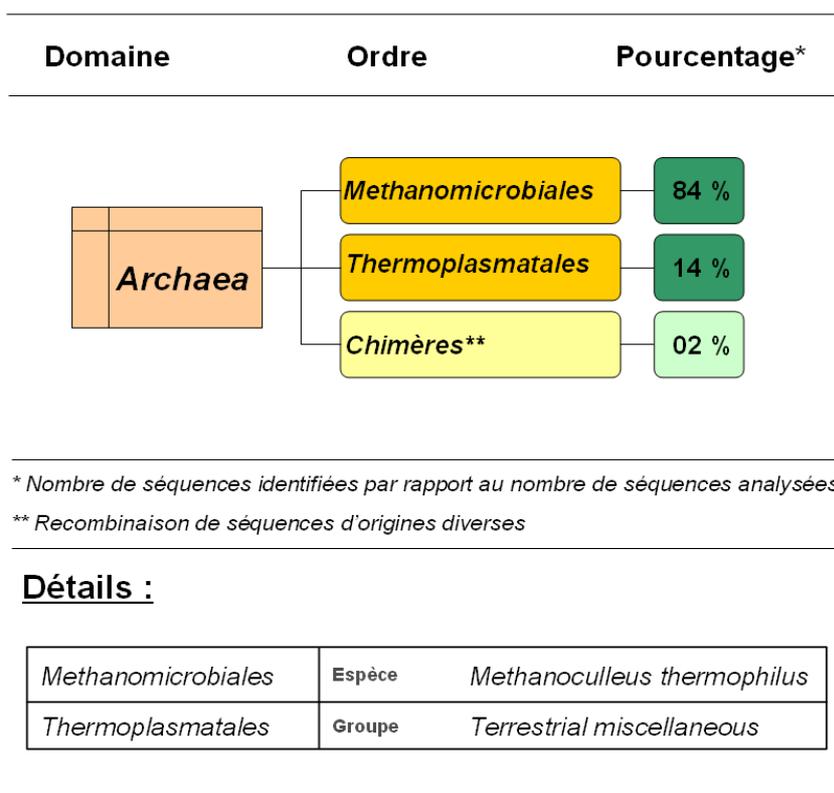


Figure 78 : Résultats du clonage/séquençage des archées à 55°C (DRF-55 (2) au jour 43) obtenues par analyses phylogénétiques (63 clones archées séquencés).

En ce qui concerne l'incubation DRF-55 (2), au jour 43, les micro-organismes du domaine *Bacteria* présents, ont été identifiés comme appartenant à quatre *phyla* distincts (*Firmicutes*, *Thermotogae*, *Synergistetes* et *Bacteroidetes*). Dans la banque de clones, on trouve une majorité de *Firmicutes* (49 %), mais également quelques *Thermotogae* (13 %) et *Bacteroidetes* (12 %) ainsi que quelques *Synergistetes* (6 %).

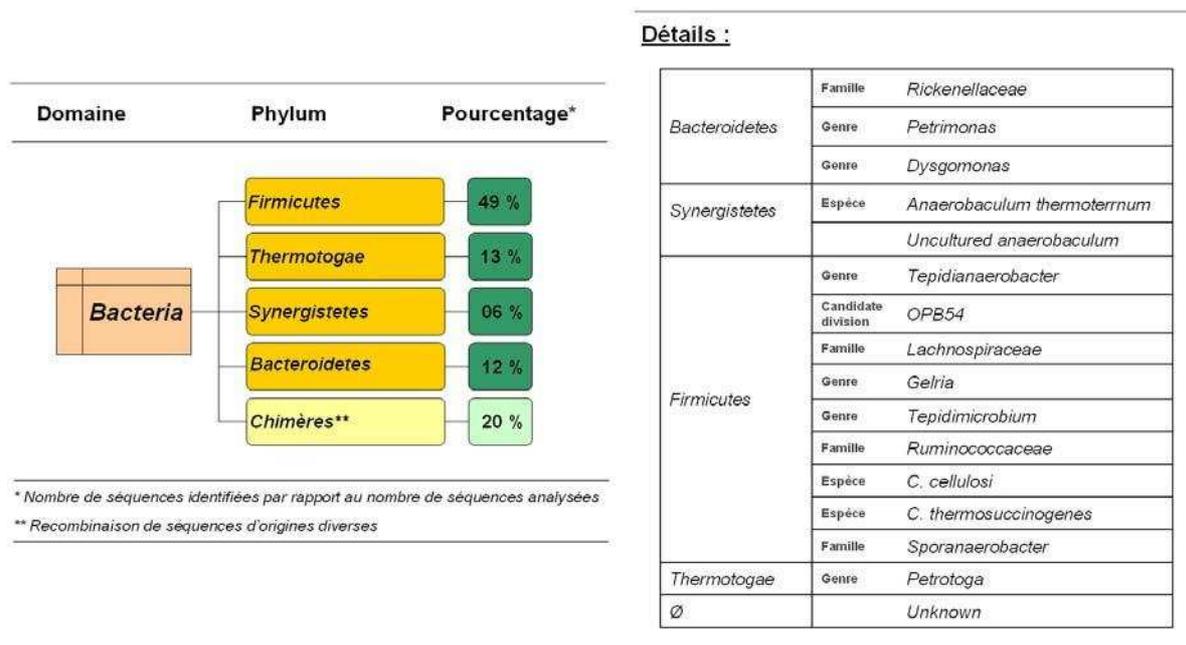


Figure 79 : Résultats du clonage/séquençage des bactéries à 55°C (DRF-55 (2) au jour 43) obtenus par analyses phylogénétiques (78 clones bactéries séquencés).

2.1.2.3. Discussion

La comparaison des résultats issus des microcosmes de dégradation de déchets, réalisés à 35°C et 55°C, met en évidence de nombreuses différences.

2.1.2.3.1. Effet de la température sur la production de méthane et la composition du lixiviat

La température semble, dans nos conditions expérimentales, n'influencer que faiblement les processus d'hydrolyse et d'acidogenèse des déchets. En effet, les quantités et les concentrations d'AGV ainsi que leur distribution, sont relativement similaires à 35 et 55°C lors de la phase qui correspond à leur accumulation dans le milieu. Toutefois, alors que globalement, les quantités de COD produites sont identiques, à 55°C, la production totale de méthane est plus faible que celle obtenue à 35°C (pour la même quantité de déchets) (Figure 74, A). Le démarrage de la méthanogenèse à 55°C intervient quasiment immédiatement, alors qu'il faut 20 jours pour que la production de méthane démarre à 35°C (Figure 74, A). Enfin, la comparaison du COD restant en fin d'incubation dans les lixiviats révèle qu'une importante partie du COD à 55°C (dont 359 mgC.L⁻¹ de propionate) n'est pas minéralisée (à 35°C [COD]_{finale} ≈ 397 mgC.L⁻¹, à 55°C [COD]_{finale} ≈ 869 mgC.L⁻¹) (Figure 74, B), ce qui pourrait expliquer le fait que le rendement de production de méthane soit plus faible à cette température.

Des résultats identiques (rendement de production de méthane plus faibles à 55°C et persistance d'une quantité importante de COD visiblement réfractaire à la biodégradation en fin d'incubation) ont été observés lors d'incubations de déchets reconstitués chinois et putrescibles, avec un inoculum provenant d'une boue de station d'épuration. Cependant, l'absence de consommation du propionate à 55°C survient uniquement sur les déchets français. Il est possible que ces incubations n'étaient pas totalement stabilisées au moment de l'arrêt des expériences. Une partie importante du COD formé en condition thermophile apparaît être réfractaire à la digestion anaérobie, ce qui entraînerait une diminution des rendements de méthanisation à cette température. Des analyses en spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FTICR-MS) sont en cours pour tenter d'identifier la nature de ces molécules.

2.1.2.3.2. Effet de la température sur les métabolismes de la méthanogenèse

La température influence également significativement les métabolismes à l'origine de la production du méthane. A 35°C, la production de méthane, comme nous l'avons déjà vu précédemment, est initialement due à un mélange de métabolismes (acétoclaste/hydrogénotrophe). Ensuite, du fait de la production d'acétate provenant de la dégradation des déchets, elle survient par méthanogenèse acétoclaste (majorité du méthane). Pour finir, suite à l'épuisement de l'acétate dans le milieu, le méthane est produit par un mélange de métabolismes (acétoclaste/hydrogénotrophe) lors notamment de l'oxydation syntrophique du propionate. A 55°C, la production de méthane a lieu par méthanogenèse hydrogénotrophe (composition isotopique du méthane constamment inférieure à -60 ‰ (Figure 74, B) et valeur du facteur de fractionnement supérieure à 1,065 (Figure 74, C)), et cela pendant toute la durée (à l'exception du point initial) de la dégradation (Figure 74, C). Pourtant, l'analyse du lixiviat révèle, en début d'incubation, une importante production d'acétate (Figure 74, C). Cet acétate est ensuite consommé car il disparaît rapidement du lixiviat. La majorité du méthane à 55°C semble ainsi être produit par méthanogenèse hydrogénotrophe, probablement *via* une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate. Le fait que les évolutions de la composition isotopique du dioxyde de carbone et du méthane évoluent de façon parallèle à partir du jour 35, accrédite le fait que le méthane soit produit en

condition thermophile par méthanogenèse hydrogénotrophe. En effet, ceci est certainement dû au fait que le dioxyde de carbone est le substrat carboné utilisé pour former le méthane durant cette période.

Des résultats identiques, confirmant qu'en condition thermophile la méthanogenèse acétoclaste semble être inhibée lors de la digestion anaérobie des déchets et qu'une oxydation syntrophique de l'acétate se met alors en place, ont été observés lors d'incubations de déchets reconstitués chinois et putrescibles avec un inoculum provenant d'une boue de station d'épuration.

Ce même effet de la température sur les voies métaboliques a été mis en évidence dans une étude réalisée en 2004 sur des incubations de sol de rizière. En effet, il a été montré que des voies métaboliques différentes se mettaient en place dans les expériences réalisées dans la gamme 10-37°C (majoritairement acétoclaste) et à 50°C (majoritairement hydrogénotrophe), grâce à l'utilisation des mesures de composition isotopique (Fey, Claus et *al.* 2004). Ce résultat a été confirmé dans une étude récente, où pour des températures inférieures à 40°C, le méthane était produit par un mélange de métabolismes (acétoclaste et hydrogénotrophe), alors que lorsque la température était supérieure à 40°C, le métabolisme était exclusivement hydrogénotrophe (Conrad, Klose et *al.* 2009).

2.1.2.3.3. Effet de la température sur les communautés de micro-organismes

L'évolution des profils ARISA des archées apporte des informations sur les modifications intervenant au sein des communautés microbiennes. Aux deux températures d'incubation, la population microbienne introduite avec l'inoculum est profondément modifiée pendant les premiers jours. Cette période dure environ 60 jours à 35°C, alors qu'elle se termine après 16 jours à 55°C. Ensuite, les populations restent stables jusqu'à la fin des expériences. L'adaptation des populations à 55°C est donc bien plus rapide qu'à 35°C. Cependant, la modification populations par rapport à celles initialement présentes dans l'inoculum (équivalent au profil du jour 0), semble visuellement plus importante à 55°C, ce qui peut s'expliquer du fait de l'utilisation d'un inoculum mésophile.

Les résultats du clonage / séquençage réalisé sur des échantillons prélevés au jour 43 apportent des informations précises sur les micro-organismes présents dans les incubations. La comparaison des résultats obtenus à 35°C et 55°C met en évidence la présence de *Methanosarcina barkeri*, uniquement en conditions mésophiles. Ces observations sont cohérentes avec les observations FISH. La présence de membres de la famille *Methanomicrobiales* et de *Thermoplasmatales* à 35°C et 55°C a été mise en évidence. A 35°C, la présence de *Methanomicrobiales* n'a pas pu être observée en FISH. Trois explications sont envisageables, soit elles sont trop minoritaires pour être observable en FISH, soit elles ne sont pas ou peu actives et de ce fait le signal de fluorescence n'est donc pas observable, soit un problème d'ordre méthodologique a conduit à une mauvaise hybridation. Si toutefois, il s'avère qu'elles sont présentes et actives, il est possible qu'elles jouent un rôle lors de l'oxydation syntrophique du propionate qui conduit à la production d'hydrogène et de dioxyde de carbone utilisables par les méthanogènes hydrogénotrophes. A 55°C, l'identification de membres de la famille *Methanomicrobiales* est cohérente avec le métabolisme de méthanogenèse hydrogénotrophe mis en évidence par les résultats isotopiques. Il est donc également fort probable qu'une des bactéries mis en évidence par les résultats du clonage/séquençage, soit impliquée avec les membres de la famille *Methanomicrobiales* dans la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate. Toutefois, aucune ne correspond à celles déjà mentionnées dans des études trouvées dans la bibliographie (cf.

Chapitre 2, § 1.1.3.3.2 Micro-organismes impliqués). Le rôle des *Thermoplasmatales* (micro-organismes généralement rencontrés dans les milieux acides, thermophiles, voire aérobies) dans nos incubations à 55°C et 35°C, reste inconnu.

2.1.3. Conclusion

L'étude de l'effet de la température (35°C vs 55°C) sur la dégradation de déchets en conditions anaérobies, met en évidence des différences importantes en termes de temps de latence (quasi inexistant à 55°C, 20 jours à 35°C) et de production de méthane (production plus importante à 35°C pouvant être expliquée par le fait qu'une part plus importante de carbone difficilement dégradable soit formée en condition thermophile). L'étude des métabolismes à l'origine de la production de méthane, grâce aux mesures de compositions isotopiques, met en évidence des différences importantes en fonction de la température. A 35°C la majorité du méthane est produite par méthanogenèse acétoclaste, alors qu'à 55°C le méthane est produit quasi exclusivement par méthanogenèse hydrogénotrophe. Toutefois, à 55°C, de l'acétate est bel et bien produit en même proportion qu'à 35°C et consommé, ce qui indique que le méthane est, dans ces conditions, produit par oxydation syntrophique de l'acétate. L'analyse de l'évolution des communautés microbiennes permet de mettre en évidence des modifications qui concordent avec les modifications de métabolisme observées. Ainsi, le couplage entre l'approche isotopique et les analyses de microbiologie moléculaire a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des archées de la famille *Methanosarcinaceae* dans la production de méthane en condition mésophile, tout au long de l'incubation, et ce malgré les changements métaboliques, illustrant ainsi la versatilité métabolique des membres de cette famille d'archées. En condition thermophile, les archées de la famille *Methanosarcinaceae* ont totalement disparu au profit des *Methanoculleus thermophilus* qui produisent le méthane par méthanogenèse hydrogénotrophe certainement en symbiose avec une bactérie réalisant préalablement l'oxydation de l'acétate.

Ces résultats, obtenus sur un déchet reconstitué français inoculé avec un inoculum provenant d'un lixiviat d'ISDND, sont comparables à ceux obtenus lors d'expériences sur d'autres types de déchets (déchets chinois reconstitués, déchets putrescibles) et un autre type d'inoculum (boue de station d'épuration). Les conclusions concernant les différences de métabolisme observées en fonction de la température, ne sont pas relatives à un type d'inoculum ou un type de déchet mais sembleraient donc généralisables.

Cette partie du travail illustre ainsi le potentiel de l'approche isotopique utilisée afin d'étudier la digestion anaérobie de déchets complexes. Afin d'étudier plus finement les changements de métabolisme en fonction de la température et notamment la mise en place de la réaction d'OSA en condition thermophile, des incubations d'acétate ont été réalisées et sont présentées dans la partie suivante.

2.2. Effet de la température sur la méthanisation de l'acétate

2.2.1. Introduction

Afin de mieux comprendre le déterminisme des effets de la température observés lors de la dégradation de déchets reconstitués sur les voies métaboliques de la méthanogenèse (cf. Chapitre 4, § 2.1 Effet de la température lors de la digestion anaérobie de déchets), des incubations d'acétate à différentes températures (35°C et 55°C, températures identiques à celles utilisées lors des expériences présentées dans la partie précédente) ont été réalisées à partir de deux inocula provenant d'installation de traitement anaérobie de déchets. Le premier

est issu d'un lixiviat d'ISDND (plage de température mésophile) et le second d'une boue de méthaniseur de déchets (plage de température thermophile) (cf. Chapitre 3, § 2 Les consortia microbiens dit inocula). L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Nomenclature des expériences sur l'effet de la température sur la dégradation de l'acétate.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	Température
Lixi-T-35 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Ø	Ø	milieu BMP + carbonate	35°C
Lixi-A-35 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹		
Lixi-T-55 (1,2 & 3)	Lixiviat d'ISD	Ø	Ø	milieu BMP + carbonate	55°C
Lixi-A-55 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹		
BoueOM-T-35 (1,2 & 3)	Boue de méthaniseur thermophile	Ø	Ø	milieu BMP + carbonate	35°C
BoueOM-A-35 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹		
BoueOM-T-55 (1,2 & 3)	Boue de méthaniseur thermophile	Ø	Ø	milieu BMP + carbonate	35°C
BoueOM-A-55 (1,2 & 3)		Acétate	3,0 g.L ⁻¹		

Des triplicats de témoin négatif (pas de substrat) ont été réalisés pour chacun des inocula. Aucune production de méthane n'est enregistrée au bout 100 jours d'incubation.

2.2.2. Résultats expérimentaux obtenus

2.2.2.1. Inoculum d'ISDND

Des incubations similaires d'acétate (triplicats, 3 g.L⁻¹ d'acétate, milieu BMP & tampon, inoculum de lixiviat d'ISDND) ont été réalisées à 35°C (Lixi-A-35) et à 55°C (Lixi-A-55). Elles permettent de mettre en évidence des comportements différents en fonction de la température (cf. Figure 80).

A 35°C, après une période de latence importante de 65 jours, la production de méthane a débuté jusqu'à atteindre 360 mL.g⁻¹ d'acétate, ce qui correspond à la valeur théorique attendue (373,5 mL.g⁻¹ d'acétate) (Figure 80, A, Gauche). Quinze jours auront été nécessaires pour que la dégradation soit totale. La production de méthane s'arrête ensuite assez rapidement du fait de l'épuisement du stock d'acétate (Figure 80, B, Gauche). Une très bonne reproductibilité entre les incubations du triplicat (Lixi-A-35) est observée.

A 55°C, les incubations du triplicat ont par contre présenté des comportements très différents. Pour une des incubations (Lixi-A-55 (1)), après une période de latence importante de 68 jours, la production de méthane a débuté jusqu'à atteindre 380 mL.g⁻¹ d'acétate ce qui correspond à la valeur théorique attendue (373,5 mL.g⁻¹ d'acétate) (Figure 80, A, Droite). Ensuite, faute de substrat, elle s'est arrêtée (Figure 80, B, Droite). 51 jours auront été nécessaires pour que celle-ci soit totale. Pour les deux autres incubations (Lixi-A-55 (2 et 3)), la production de méthane n'a jamais débuté (Figure 80, A, Droite).

Au niveau de la composition isotopique, les valeurs se situent dans deux zones différentes : acétoclaste à 35°C (car supérieure à -60 ‰) et hydrogénotrophe à 55°C (car inférieure à -60 ‰) (Figure 80, C, Droite et Gauche).

En conditions mésophiles, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ (recalculé) démarre aux alentours de -45 ‰ et augmente pour atteindre environ 20 ‰. L'augmentation, jusqu'à des valeurs positives, de la composition isotopique du méthane observée à 35°C, traduit l'enrichissement du substrat (cas d'un milieu clos) (Figure 80, C, Gauche).

En conditions thermophiles, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ (recalculé) démarre aux alentours de -80 ‰, diminue légèrement puis augmente ensuite lentement jusqu'à la fin de l'incubation pour atteindre de nouveau sa valeur initiale. La légère augmentation de la composition isotopique du méthane semble être corrélée avec celle du dioxyde de carbone, illustrant ainsi que le CO_2 est certainement le substrat carboné utilisé lors de la méthanogenèse dans cette incubation. Le méthane y est donc produit par oxydation syntrophique de l'acétate (Figure 80, C, Droite).

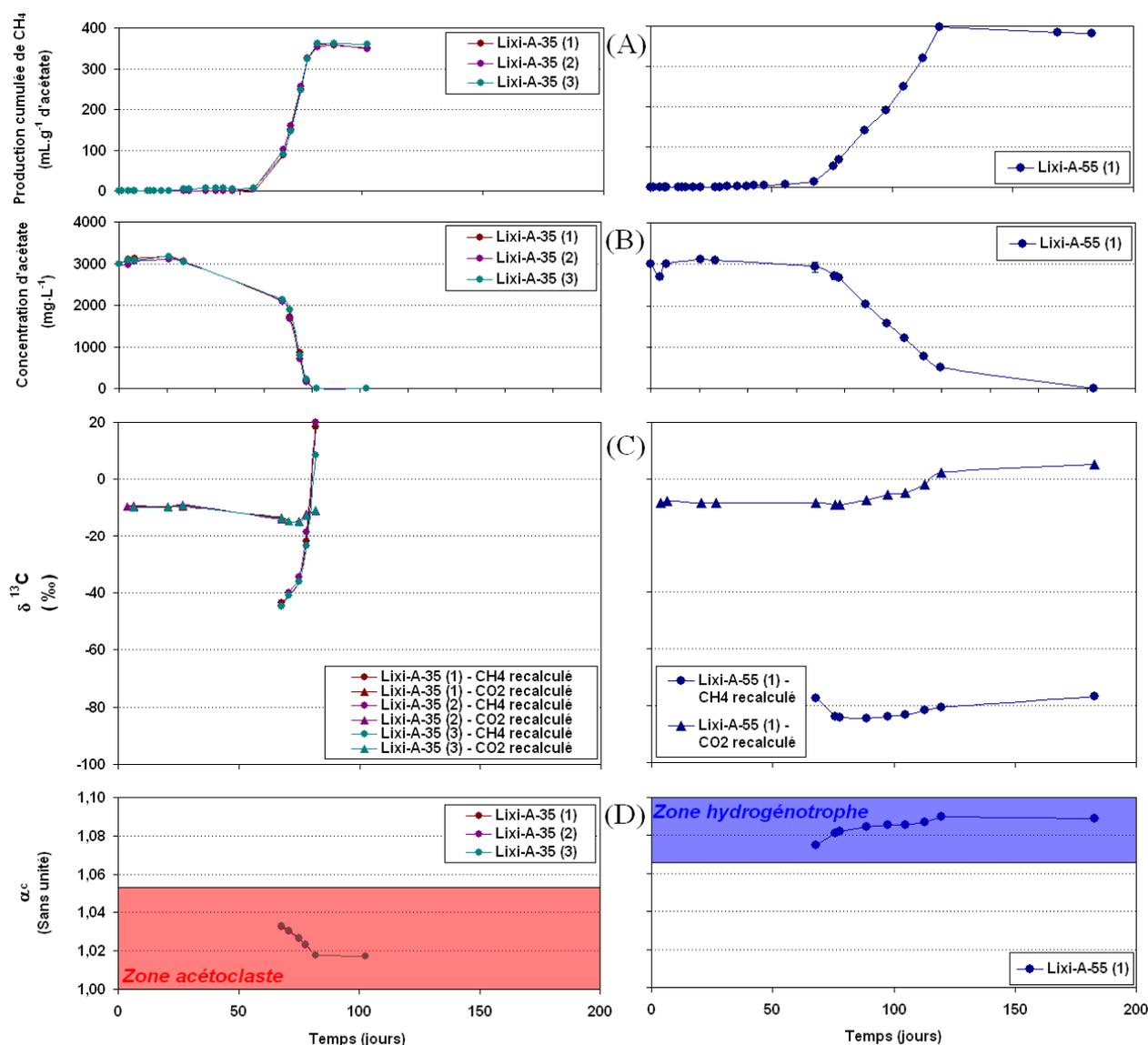


Figure 80 : Évolution des incubations Lixi-A-35 et Lixi-A-55.
(A) Production cumulée de méthane ;
(B) Concentration en acétate ;
(C) Composition isotopique recalculée du CO_2 et CH_4 ;
(D) Facteur de fractionnement apparent.

Ces interprétations, faites à partir de l'évolution des compositions isotopiques sont confirmées par les valeurs du facteur de fractionnement apparent (Figure 80, D, Droite et gauche) puisque ces dernières restent supérieures à 1,065 (limite inférieure de la zone de production par voie hydrogénotrophe) (zone bleu sur la Figure 80, D), dans l'incubation thermophile ayant produit du méthane et inférieures à 1,055 (limite supérieure de la zone de production par voie acétoclaste) (zone rouge sur la Figure 80, D), dans les incubations mésophiles.

2.2.2.2. Inoculum de digesteur d'ordures ménagères

Des incubations similaires d'acétate (triplicats, 3 g.L⁻¹ d'acétate, milieu BMP & tampon, inoculum de digesteur d'ordures ménagères thermophiles) ont été réalisées à 35°C et à 55°C. Elles ont mis en évidence des comportements différents (cf. Figure 81 & Figure 82).

2.2.2.2.1. Incubations mésophiles (35°C)

La production de méthane est beaucoup moins reproductible entre les triplicats avec cet inoculum que lors des incubations réalisées dans les mêmes conditions avec un inoculum provenant d'un lixiviat d'ISDND. Les cinétiques de production sont également beaucoup plus lentes puisque la production maximale de 345 mL.g⁻¹ d'acétate (proche de la production théorique attendue (373,5 mL.g⁻¹ d'acétate)) n'est atteinte au plus tôt (BoueOM-A-35 (1)) qu'au bout de 350 jours (cf. Figure 81, A).

Pour les incubations numéro 1 et 2, un temps de latence très court suivi d'une première phase de production présentant des cinétiques distinctes mais conduisant à une production de méthane similaire (200 mL.g⁻¹ d'acétate), sont observés. Les données isotopiques montrent que, durant cette phase dans ces deux incubations le méthane est produit par méthanogenèse acétoclaste (composition isotopique supérieure à -60 ‰ et facteur de fractionnement apparent inférieur à 1,055 (zone rouge sur la Figure 81, D)). Après une interruption de la production de méthane de 100 jours pour l'incubation 2 et de 30 jours pour l'incubation 1, la production de méthane reprend au jour 200 dans les deux incubations. Les données isotopiques montrent que, durant cette deuxième phase, le méthane est produit dans l'incubation 1 par méthanogenèse hydrogénotrophe (passage en zone bleu sur la Figure 81, D) de façon plus rapide que dans l'incubation 2 au sein de laquelle le métabolisme est resté de type acétoclaste. L'incubation 3 quant à elle, présente un comportement totalement différent puisque la production de méthane débute réellement à partir du jour 300 avec une cinétique de production beaucoup plus rapide que dans les deux premières incubations. En effet, dans cette incubation, la production maximale est atteinte au même jour (jour 480) que dans l'incubation 2 pour laquelle le temps de latence était quasiment nul. Le méthane est produit dans l'incubation 3 exclusivement par la voie hydrogénotrophe *via* une oxydation syntrophique de l'acétate.

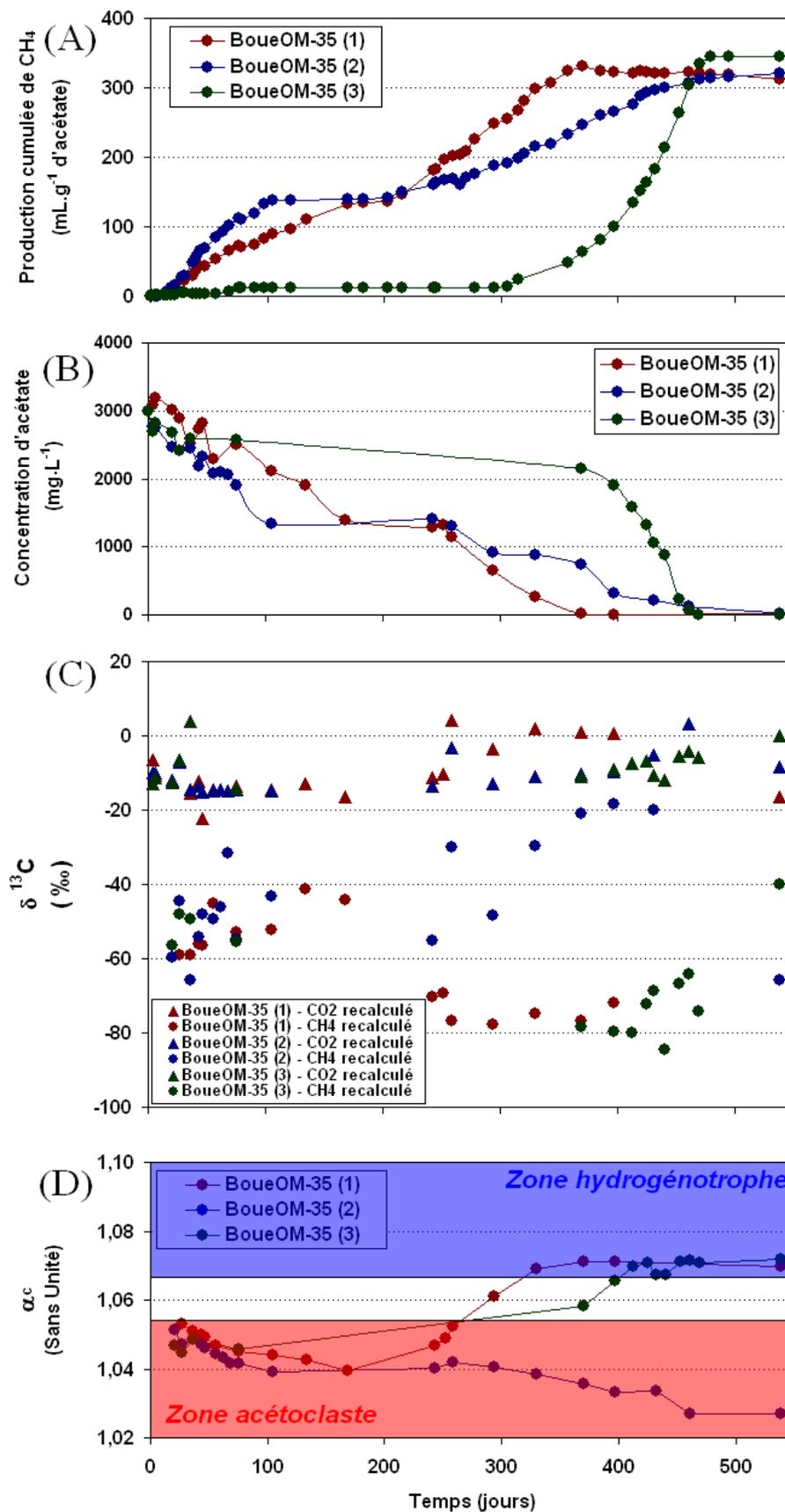


Figure 81 : Évolution des incubations BoueOM-A-35.
 (A) Production cumulée de méthane ; (B) Concentration en acétate ;
 (C) Composition isotopique recalculée du CO₂ et CH₄ ;
 (D) Facteur de fractionnement apparent.

2.2.2.2.2. Incubations thermophiles (55°C)

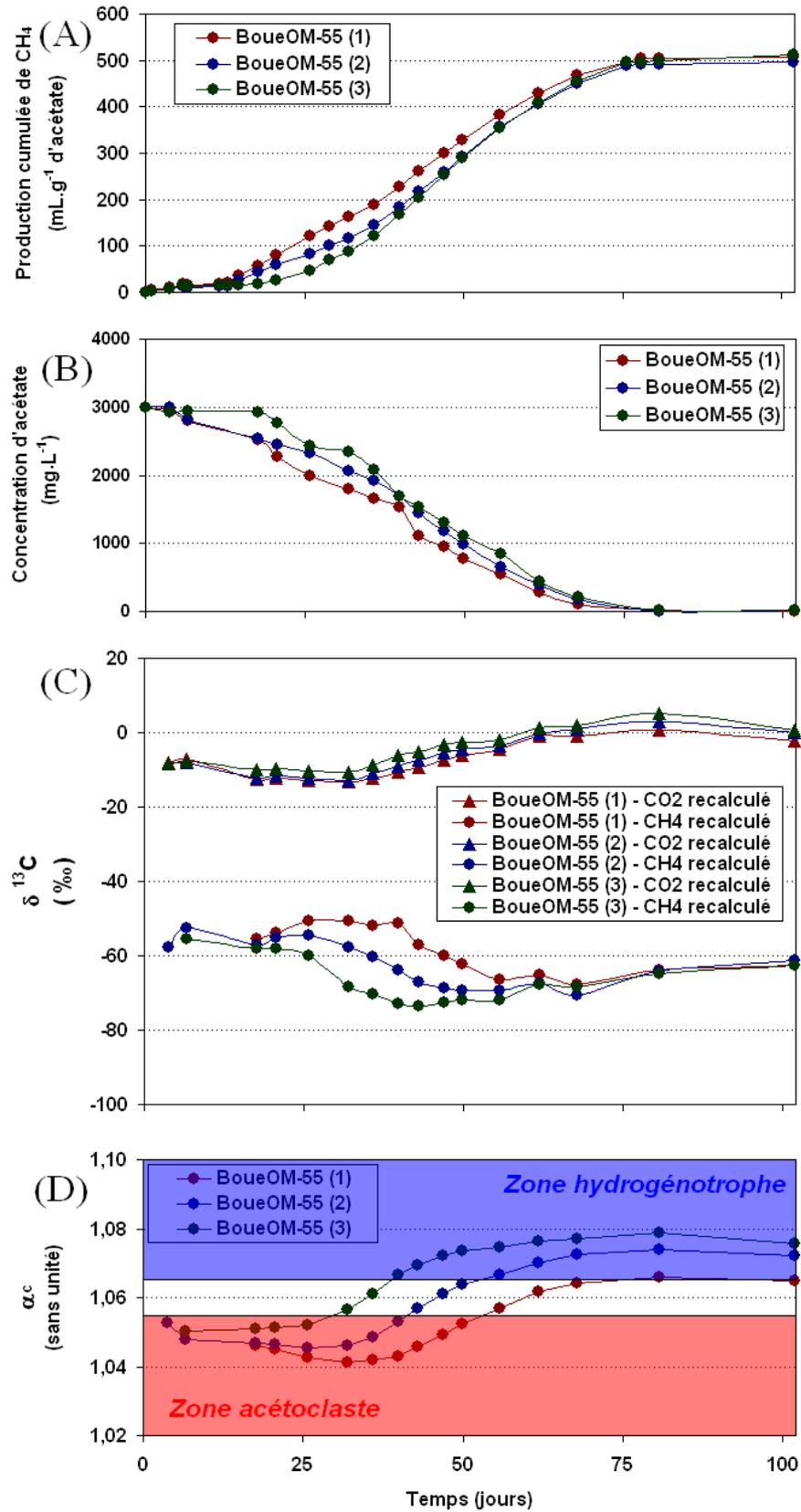


Figure 82 : Évolution des incubations BoueOM-A-55.
 (A) Production cumulée de méthane ; (B) Concentration en acétate ;
 (C) Composition isotopique recalculée du CO₂ et CH₄ ;
 (D) Facteur de fractionnement apparent.

Après une période de latence relativement courte (10 jours), la production d'acétate a débuté jusqu'à atteindre la valeur théorique attendue (Figure 82, A). Peu après le jour 75, faute de substrat (Figure 82, B), elle s'est arrêtée.

Bien que le comportement de ces incubations soit beaucoup plus reproductible que ceux observés à 35°C, une différence de cinétique dans la production de CH₄ à partir du jour 10 peut être observée. Le zoom des courbes présenté en Figure 83 illustre cette observation. Il est à noter que, malgré cette légère différence survenant à partir du jour 10, les trois incubations se stabilisent à une valeur identique de production de méthane cumulée en fin d'incubation.

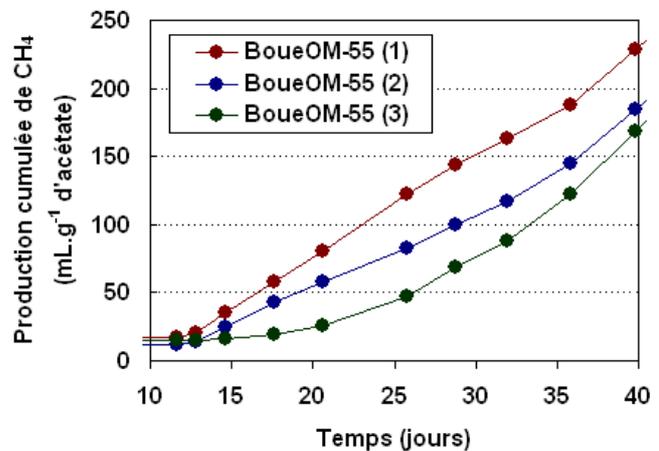


Figure 83 : Zoom du graphique représentant la production de méthane cumulée des incubations BoueOM-A-55.

Les données isotopiques mettent en évidence que le méthane est produit, pour les incubations BoueOM-A-55, dans un premier temps par méthanogenèse acétoclaste puis par méthanogenèse hydrogénotrophe. En effet, dans les premiers jours d'incubation les facteurs de fractionnement apparent se situent dans la zone acétoclaste (zone en rouge de la Figure 82, D) mais rapidement, les valeurs isotopiques passent en zone intermédiaire puis en zone hydrogénotrophe (zone en bleu de la Figure 82, D).

2.2.3. Interprétations et discussions

2.2.3.1. Effet de la nature de l'inoculum

Il est tout d'abord intéressant de noter que lorsque la température d'origine de l'inoculum est utilisée (Lixi-A-35 et BoueOM-A-55), des comportements reproductibles, tant au niveau de la production de méthane que de la mise en place des voies métaboliques, sont observés. Dans le cas inverse (Lixi-A-55 et BoueOM-A-35) des cinétiques très différentes (des inhibitions totales pouvant même être observées (Lixi-A-35 (2) et (3)), pouvant s'expliquer par la mise en place de métabolismes différents comme le montre les analyses isotopiques effectuées, sont observées. Ceci est particulièrement le cas dans les incubations BoueOM-A-35 à 35°C, pour lesquelles des cinétiques et des successions de métabolismes très différentes ont été mises en évidence dans les trois incubations.

2.2.3.2. Effet des changements métaboliques sur la production finale de méthane

La comparaison des quantités de méthane produites en fin des incubations au cours desquelles soit une méthanogenèse acétoclaste ou une oxydation syntrophique se met en place, montre que les rendements de production de méthane sont identiques quel que soit le métabolisme de production de méthane utilisé. En effet, les productions de méthane sont très proches, par exemple en fin des incubations Lixi-A-35 et Lixi-A-55 (1), alors que les métabolismes mis en œuvre dans ces incubations sont respectivement la méthanogenèse acétoclaste et l'oxydation syntrophique de l'acétate. Le même constat peut être fait en comparant les incubations BoueOM-A-35 (2) et BoueOM-A-35 (3). Ainsi, alors qu'on ne pouvait pas exclure que la différence de production de méthane (Figure 74, B) observée entre

les incubations réalisées à 35°C (DRF-35) et 55°C (DRF-55) sur les déchets français reconstitués soit due au fait qu'à 55°C l'OSA se soit mise en place (diminution du rendement de la réaction du fait qu'elle soit réalisée en deux étapes), ces résultats semblent montrer que, dans nos conditions expérimentales, cette hypothèse est peu probable.

2.2.3.3. Effet direct ou indirect de la température sur les changements métaboliques

Les incubations réalisées avec l'inoculum de lixiviat semblent mettre en évidence que la température influence directement la mise en place des métabolismes méthanogènes puisque, comme pour les expériences sur les déchets reconstitués (DRF-35 et DRF-55), une méthanogenèse acétoclaste est observée en condition mésophile alors que, dans la seule incubation ayant produit du méthane en condition thermophile, une méthanogenèse de type hydrogénotrophe se met en place *via* une oxydation syntrophique de l'acétate.

Les incubations BoueOM-A-35 montrent quant à elles, que la température ne semble pas être le seul facteur pouvant expliquer la mise en place de métabolismes différents pour la production de méthane. En effet, à température identique (35°C), le méthane est produit dans les incubations BoueOM-A-35 (1) et (2) et BoueOM-A-35 (3), par des métabolismes différents (acétoclaste et/ou hydrogénotrophe).

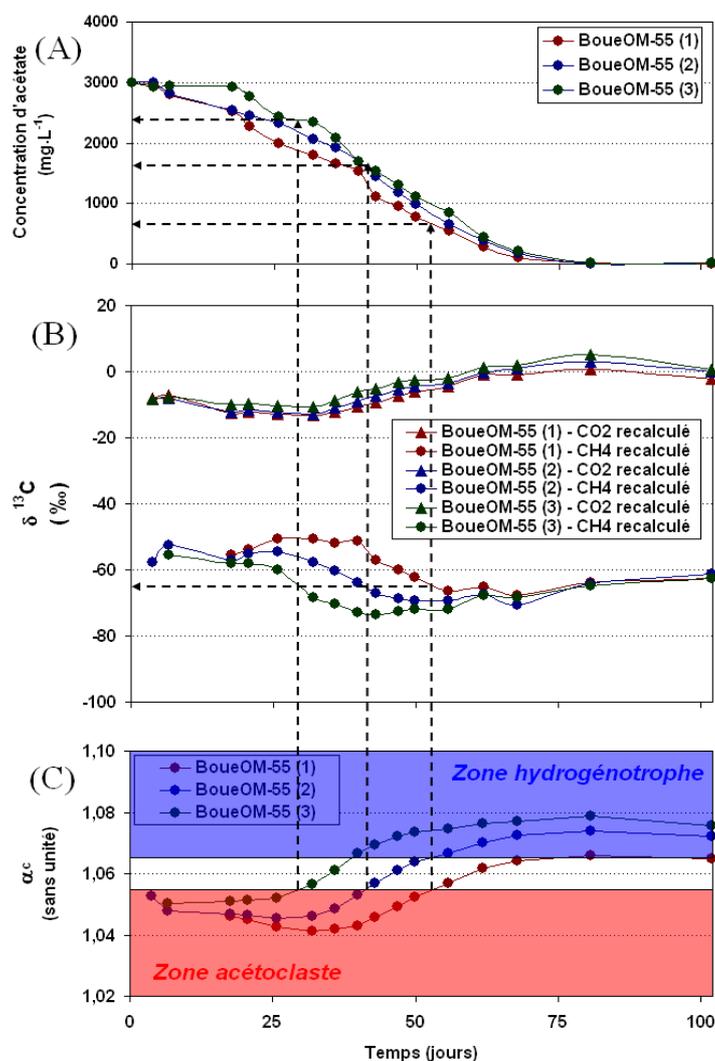


Figure 84 : Localisation du changement de métabolisme dans les incubations BoueOM-A-55.
 (A) Concentration d'acétate ; (B) Composition isotopique recalculée du CO₂ et CH₄ ;
 (C) Facteur de fractionnement apparent.

Dans les incubations BoueOM-A-55, à 55°C, les cinétiques de production de méthane sont différentes. Ainsi, après 30 jours, des productions de CH₄ allant du simple au double sont observées entre les différentes incubations. En fin d'expérience, la production de méthane dans les trois incubations du triplicat converge vers la même valeur. Les données isotopiques indiquent qu'après un démarrage de la production de méthane par voie acétoclaste, une oxydation syntrophique de l'acétate (OSA) se met en place. Il est à noter que ce changement de métabolisme ne s'opère pas au même moment dans les trois incubations. En considérant que la production par voie hydrogénotrophe débute lorsque la valeur du facteur de fractionnement apparent franchit la limite haute de la zone acétoclaste soit 1,055, le changement de métabolisme se produit autour des jours 30, 40 et 53 respectivement pour les incubations 3, 2 et 1 (Figure 84, C). Il est à noter qu'il s'agit également du moment où la composition isotopique passe sous la valeur de -63 ‰ (Figure 84, B) qui est la limite inférieure de la gamme acétoclaste. D'autre part, il apparaît que plus le changement de métabolisme intervient tard, plus la cinétique de production de méthane avant le shift métabolique est rapide (Figure 82, A).

La température ne pouvant être responsable de ce changement de métabolisme (incubations à température constante) nous avons cherché à expliquer le phénomène observé. Un effet de la concentration en acétate a tout d'abord été envisagé puisqu'il a été montré qu'à basse concentration en acétate, l'oxydation syntrophique de l'acétate serait privilégiée par rapport à la méthanogenèse acétoclaste en condition thermophile (Ahring 1995). Dans les incubations BoueOM-A-55, les changements de métabolismes se produisent à des concentrations d'acétate (Figure 84, A) très différentes (environ 700, 1700 et 2400 mg d'acétate par litre respectivement pour BoueOM-A-55 (1), (2) et (3)). La concentration en acétate du milieu n'apparaît donc pas pouvoir d'expliquer, dans le cas de nos incubations, le changement de métabolisme observé.

La possibilité que la concentration en ammoniac qui est suspectée d'avoir un effet inhibiteur plus marqué sur la méthanogenèse acétoclaste (Chen, Cheng et *al.* 2008) que sur la méthanogenèse hydrogénotrophe puisse être responsable de ce changement métabolique a été ensuite évaluée.

La solution BMP utilisée comme milieu de culture contient du NH₄Cl à la concentration de 0,5 g.L⁻¹. A l'aide de la formule donnée en Équation 21, la concentration théorique de NH₃ a pu être calculée en tenant compte du pH et de la température. Pour faire ces calculs, l'hypothèse que la concentration en azote ammoniacal était restée constante durant les incubations a été utilisée. En effet, dans le milieu BMP, l'azote ammoniacal qui sert de source d'azote pour les micro-organismes est ajouté en excès. Des mesures de concentration en cations ont été réalisées (données non présentées) et ont montré que les concentrations en NH₄⁺ dans le milieu n'ont effectivement pas connues d'évolution au cours de l'incubation. Les valeurs calculées de NH₃ atteignent rapidement 100 mg.L⁻¹, ce qui est très proche des valeurs seuils d'inhibition de la méthanogenèse acétoclaste par le NH₃ publiées dans la littérature (128 mg.L⁻¹) lors d'expériences utilisant un inoculum provenant également d'un digesteur anaérobie de déchets solides (Schnurer et Nordberg 2008).

Les courbes représentant l'évolution du facteur de fractionnement apparent des incubations BoueOM-A-55 en fonction de la concentration en NH₃ sont présentées en Figure 85.

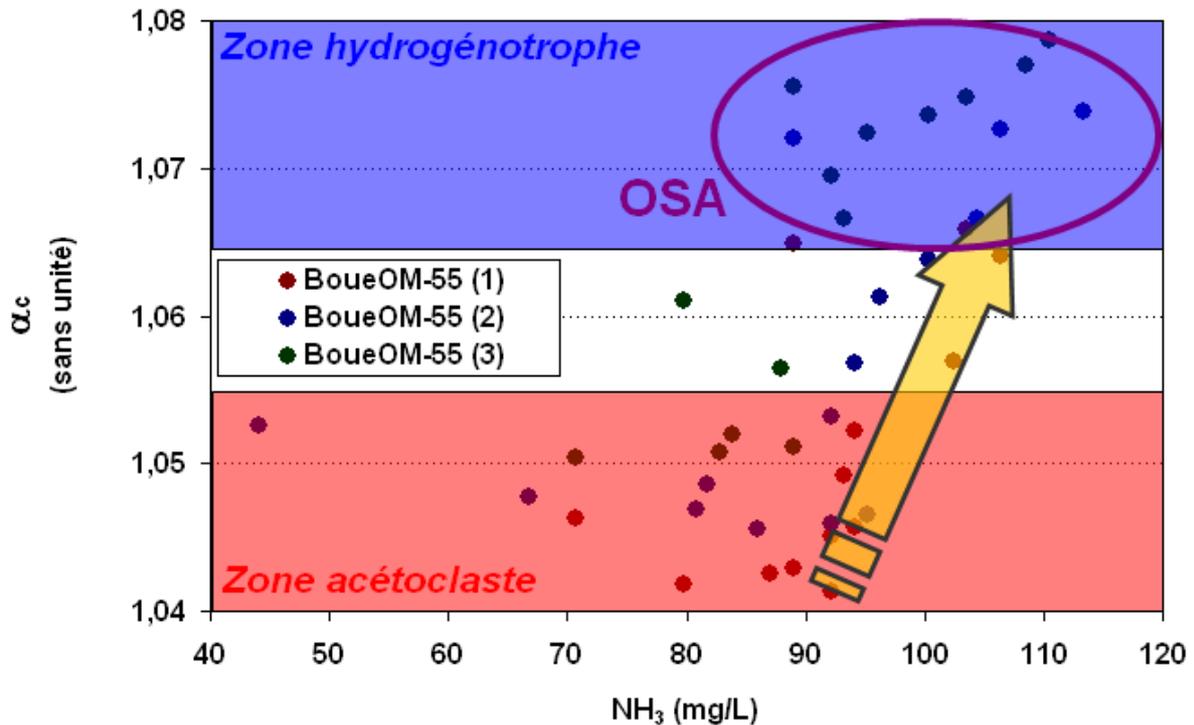


Figure 85 : Facteur de fractionnement apparent (α_{app}) en fonction de la concentration en NH_3 dans les incubations BoueOM-A-55.

Le fait que le changement de métabolisme se produise pour les trois incubations à une même valeur de concentration en ammoniac (entre 90 et 100 mg.L^{-1}) proche d'une concentration potentiellement inhibitrice de la méthanogenèse acétoclaste semble indiquer que la concentration en NH_3 pourrait entraîner le changement de métabolisme acétoclaste vers l'OSA. Il est à noter tout de même que cette montée de la concentration en NH_3 est directement corrélée avec l'augmentation du pH due à la diminution de la concentration en acétate. Il est impossible d'exclure que le pH soit également un paramètre gouvernant ce changement métabolique. Toutefois, lors des incubations réalisées à 35°C, l'évolution de pH est relativement similaire à celle des incubations réalisées à 55°C et n'induit pas les mêmes modifications. Cela laisse penser que le pH n'a pas une influence déterminante sur le changement métabolique.

Il est donc envisageable que l'augmentation de la température, en entraînant un accroissement de la proportion d'azote ammoniacale sous la forme libre, soit indirectement à l'origine de l'inhibition des méthanogènes acétoclastes en condition thermophile. Les hydrogénotrophes, en général plus résistantes à cette forme d'inhibition, pourraient donc dans ces conditions être les seules archées capables de produire du méthane à partir de l'acétate *via* une oxydation syntrophique avec une bactérie.

L'azote ammoniacal pourrait ainsi être responsable des différences de métabolismes observées entre conditions mésophile et thermophile lors des incubations de déchets reconstitués. En effet, alors qu'à 35°C les concentrations en NH_3 observées ne dépassent pas 68 mg.L^{-1} à 55°C les concentrations déterminées sont nettement supérieures à 100 mg.L^{-1} . Cette différence pourrait donc être la cause directe de l'orientation vers le métabolisme hydrogénotrophe en condition thermophile et la température pourrait donc n'avoir qu'un effet indirect.

Enfin, la différence de métabolisme observée entre les incubations avec l'inoculum de lixiviat à 35°C (Lixi-A-35) et à 55°C (Lixi-A-55), pourrait également être due à une inhibition expliquée par la présence de NH₃ plus importante en condition thermophile. En effet, même si les conditions d'incubation sont identiques, le simple passage de 35°C à 55°C modifie l'équilibre NH₄⁺/NH₃ (cf. Équation 21). Ainsi, en fonction de la température et des valeurs de pH au sein des incubations des concentrations en NH₃ pouvant atteindre 94,21 mg.L⁻¹ pour Lixi-A-55 et 39,63 mg.L⁻¹ pour Lixi-A-35 ont été déterminées. Il est donc envisageable que le seuil d'inhibition des micro-organismes acétoclastes par le NH₃ ait été dépassé dans l'incubation Lixi-A-55 (1), d'où un passage par une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate.

Une série d'incubations a été réalisée afin de mettre en évidence l'effet indirect suspecté de la température sur les métabolismes. Des incubations similaires au BoueOM-A-55, mais avec des concentrations différentes de NH₄⁺ (45 mg.L⁻¹, 180 mg.L⁻¹ et 720 mg.L⁻¹) ont été réalisées. La production de méthane a eu lieu par la voie acétoclaste pour les trois concentrations de NH₄⁺. Malheureusement, le pH dans ces incubations est resté inférieur à 8 pendant la production active de méthane. Il nous est donc impossible de vérifier l'effet de la concentration en NH₃ sur les métabolismes, car la concentration en NH₃ s'est révélée trop faible (inférieure à 90-100 mg.L⁻¹) pour reproduire les conditions expérimentales des incubations BoueOM-A-55. Cependant, il est intéressant d'observer que dans les incubations où la concentration en NH₃ reste faible, le méthane est bien entièrement produit par méthanogenèse acétoclaste même à faibles concentrations en acétate en fin d'incubation en condition thermophile.

2.2.4. Conclusion

L'utilisation des données issues des incubations à 35 et 55°C, avec acétate et avec deux types d'inoculum (Boue de digesteur d'OM thermophile et lixiviat d'ISDND), montre la complexité de l'étape de méthanogenèse. L'isotopie permet ici d'améliorer notre compréhension des mécanismes mis en jeu pour la production du méthane et permet l'étude d'un paramètre opérationnel important en digestion anaérobie qu'est la température. Dans les incubations de déchets reconstitués comme dans celles d'acétate, la température semble avoir un rôle déterminant sur la mise en place des métabolismes lors de l'étape de méthanogenèse. Il semblerait qu'à 55°C, la réaction d'OSA soit privilégiée par rapport à la réaction de méthanogenèse acétoclaste pour la consommation de l'acétate. A l'inverse, à 35°C, généralement, l'acétate est consommé par la voie acétoclaste. Toutefois, les changements de métabolisme observés à température constante lors des expériences BoueOM-A-55, laissent penser que l'effet de la température pourrait être indirect. L'analyse des données laisse envisager la possibilité que la concentration en NH₃ (molécule inhibant prioritairement la méthanogenèse acétoclaste) puisse être responsable de ce changement de métabolisme. En effet, l'équilibre liant pH, température et NH₄⁺ conduit à des concentrations en NH₃ plus importantes à 55°C qu'à 35°C.

3. Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la méthanogenèse

Lors de la dégradation de la matière organique des déchets dans les ISDND et les méthaniseurs, des quantités importantes d'azote ammoniacal sont générées lors du processus d'ammonification de la matière organique azotée telles que les protéines. L'azote ammoniacal ainsi produit peut alors s'accumuler car il n'existe pas de processus efficace de dégradation de ce dernier dans ces systèmes (Kayhanian 1999) et atteindre des niveaux relativement élevés

(Wens, Vercauteren et *al.* 2001; Illmer et Gstraunthaler 2009). Il a été montré qu'au sein des installations industrielles de traitement anaérobie des déchets, l'azote ammoniacal, lorsqu'il est présent à des concentrations importantes, peut entraîner l'inhibition du processus de méthanisation (Kayhanian 1994; Wens, Vercauteren et *al.* 2001). Le déterminisme de ces phénomènes d'inhibition est encore mal connu et l'utilisation de l'approche isotopique pourrait s'avérer être un outil particulièrement adapté pour étudier l'effet de l'azote ammoniacal sur les métabolismes mis en jeu lors de la méthanogénèse.

3.1. Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la dégradation de l'acétate en conditions mésophiles

3.1.1. Introduction

L'effet de l'azote ammoniacal sur la méthanisation de l'acétate, en conditions mésophiles par un inoculum issu d'un lixiviat d'ISDND préalablement adapté à la consommation de l'acétate, a été investigué lors d'une série d'incubations spécifiques à différentes concentrations en azote ammoniacal. La nomenclature utilisée dans le cadre de ces expériences est détaillée dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Nomenclature des expériences sur l'effet de la concentration en azote ammoniacal.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Volume liquide initial	[NH ₄ ⁺]
T (1,2 & 3)	Lixi ISD	Ø	Ø	500 mL	0,180 g.L ⁻¹
A (1,2 & 3)	Lixi ISD	Acétate	3,0 g.L ⁻¹	500 mL	0,180 g.L ⁻¹
C1 (1 & 2)	Lixi ISD acclim*	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	100 mL	0,180 g.L ⁻¹
C1 (3)		Acétate marqué**			
C2 (1 & 2)	Lixi ISD acclim*	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	100 mL	1,440 g.L ⁻¹
C2 (3)		Acétate marqué**			
C3 (1 & 2)	Lixi ISD acclim*	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	100 mL	3,600 g.L ⁻¹
C3 (3)		Acétate marqué**			
C4 (1 & 2)	Lixi ISD acclim*	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	100 mL	5,400 g.L ⁻¹
C4 (3)		Acétate marqué**			
C3-b (1 & 2)	Lixi ISD acclim****	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	80 mL	3,600 g.L ⁻¹
C4-b (1 & 2)	Lixi ISD acclim****	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	82 mL	5,400 g.L ⁻¹
C4-c (1)	Lixi ISD acclim****	Acétate	3,3 g.L ⁻¹	67 mL	5,400 g.L ⁻¹
C4-c (2)		Acétate marqué**			

*Lixi VG après acclimatation à l'acétate
 **** 2nd injection d'acétate

** marqué uniquement sur l'atome de carbone du groupement méthyle C*H₃COOH

Avant d'étudier l'effet de la concentration en azote ammoniacal sur la méthanisation de l'acétate, une série d'incubations a été réalisée afin d'acclimater l'inoculum à la consommation d'acétate (Série A, Tableau 38). A la fin de cette première série d'incubations, le milieu liquide contenant l'inoculum adapté à l'acétate a été utilisé, en tant que milieu d'incubation pour les expériences, à différentes concentrations en azote ammoniacal. Pour ce faire, les phases liquides des trois incubations de la série d'acclimatation (A (1,2 & 3)) ont été mélangées puis séparées pour réaliser quatre nouvelles séries d'expériences réalisées en triplicat (Série C1 à C4, Tableau 38) au cours desquelles des concentrations en NH₄⁺ allant de 180 à 5400 mg.L⁻¹ ont été appliquées. De l'acétate présentant une composition isotopique naturelle a été introduit dans deux des incubations de chaque série de triplicat, alors que dans la troisième l'acétate était enrichi en carbone 13 sur le groupement méthyle. Les incubations ont ensuite été placées

dans une pièce thermostatée à 35°C. Les autres conditions expérimentales restent inchangées. La Figure 86 illustre le principe de l'expérience.

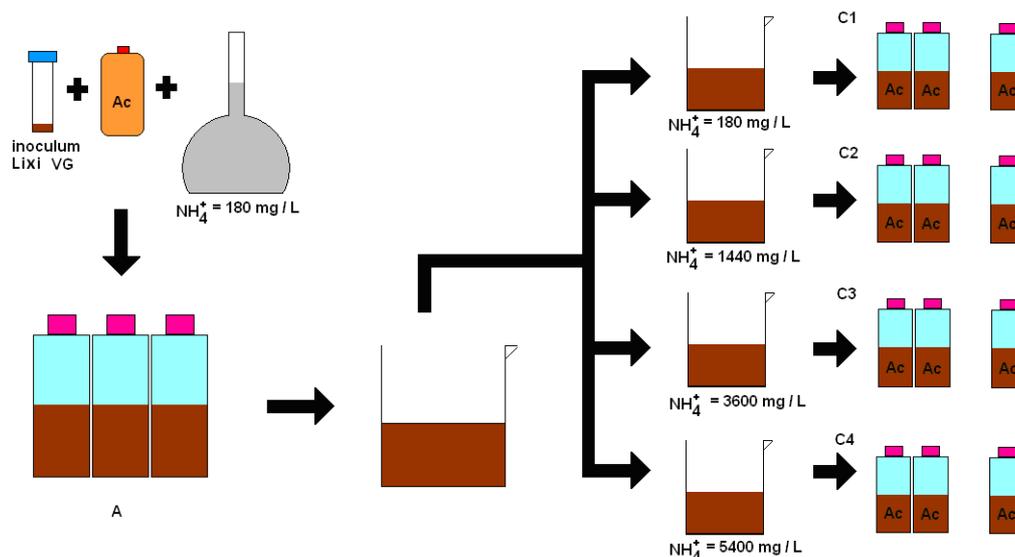


Figure 86 : Schéma de principe de l'expérience sur l'effet de la concentration en azote ammoniacal. (Ac = Acétate & Ac* = Acétate marqué sur le groupement méthyle)

A la fin des incubations aux plus hautes concentrations en azote ammoniacal (C3 et C4), des réinjections d'acétate ont été réalisées (Série C3-b à C4-b et C4-c, Tableau 38).

Un triplicat de témoins négatifs (sans acétate) (Série T, Tableau 38) a également été réalisé. Aucune production de méthane n'est enregistrée après 100 jours d'incubation.

3.1.2. Résultats expérimentaux obtenus

3.1.2.1. Acclimatation de l'inoculum à la consommation d'acétate

Cette expérience d'acclimatation correspond en fait à celle ayant permis de calculer le facteur de fractionnement en conditions mésophiles à partir d'un inoculum de lixiviat d'ISDND (cf. Chapitre 4, 1.2.1.1 Inoculum de lixiviat d'ISDND (35°C)). Afin de pouvoir comparer les cinétiques de production entre les différentes expériences réalisées pour étudier l'effet de l'azote ammoniacal, les courbes de production de méthane ont été modélisées à l'aide du modèle de Gompertz (cf. Chapitre 3, § 6.5.2 Caractérisation des courbes de production cumulée de méthane). Les paramètres obtenus par cette modélisation (λ = latence ; R_m = taux de production maximum de méthane ; P = production cumulée de méthane en fin d'expérience) pour l'ensemble des expériences sont regroupés dans le Tableau 39. Ainsi, lors de cette série dite d'acclimatation, la production de méthane commence après une phase de latence importante de 65 jours (Figure 64). La production de méthane active dure ensuite environ 15 jours avec une vitesse de production maximale de méthane de 30 mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{jour}^{-1}$. L'épuisement de l'acide acétique entraîne la diminution de la production de CH_4 à un niveau résiduel. À la fin de la période expérimentale, la production de méthane cumulée était d'environ 360 mL par gramme d'acide acétique (Tableau 39). Le suivi de la composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone lors de ces incubations a permis de mettre en évidence que le méthane y est produit par méthanogenèse acétoclaste (Figure 64).

3.1.2.2. Incubations d'acétate à différentes concentrations d'azote ammoniacal

3.1.2.2.1. Production de méthane

Les incubations d'acétate réalisées avec l'inoculum obtenu après acclimatation (série A), présentent des évolutions de la production de méthane cumulée (Figure 87) et de la concentration d'acétate (Figure 88) différentes, en fonction de la concentration en azote ammoniacal appliquée.

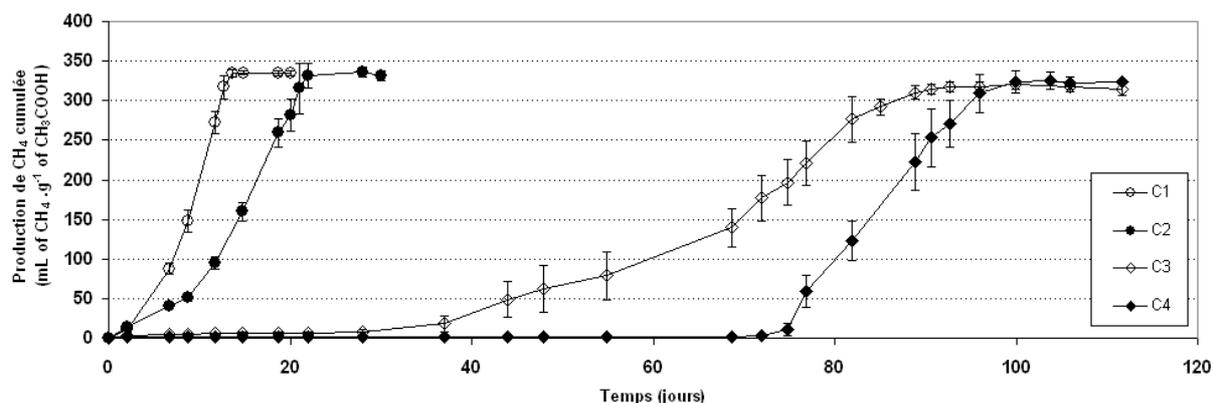


Figure 87 : Production cumulée de méthane pour les incubations C1 à C4.

C1 (0,180 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C2 (1,44 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C3 (3,60 g.L⁻¹ de NH₄⁺), et C4 (5,40 g.L⁻¹ de NH₄⁺).

Les valeurs correspondent à la moyenne du triplicat.

Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre les incubations du triplicat.

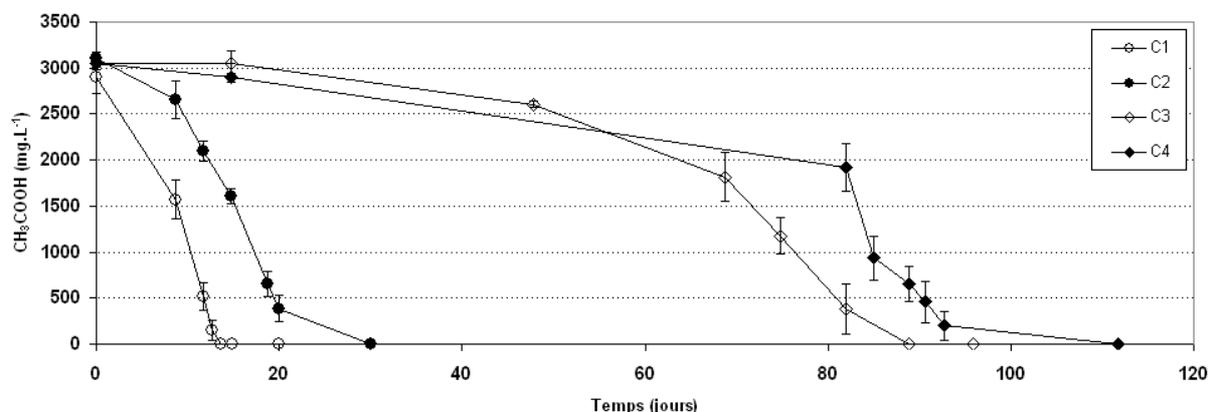


Figure 88 : Évolution de la concentration d'acétate dans les incubations C1 à C4.

C1 (0,180 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C2 (1,44 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C3 (3,60 g.L⁻¹ de NH₄⁺), et C4 (5,40 g.L⁻¹ de NH₄⁺).

Les valeurs correspondent à la moyenne du triplicat.

Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre les incubations du triplicat.

Pour les deux concentrations les plus basses en NH₄⁺ (séries C1 et C2), la production active de méthane commence avant le jour 10 et atteint rapidement 340 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH (Tableau 39). Les courbes de concentration d'acétate sont inversement corrélées avec les courbes de production cumulée de méthane. De légères différences peuvent être observées entre les bioréacteurs C1 et C2. Le temps de latence est un peu plus court et la vitesse de production maximale de méthane est plus élevée pour C1 que pour C2 (Tableau 39). Pour la troisième concentration en NH₄⁺ (série C3), la production de méthane commence après une phase de latence importante de 42 jours (Figure 87 et Tableau 39). La production de méthane active dure pendant environ 50 jours avec une vitesse de production maximale de méthane de 7,5 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH .jour⁻¹ (Tableau 39). L'épuisement de l'acétate

entraîne ensuite la diminution de la vitesse de production de CH₄. À la fin de la période expérimentale, la production cumulée de méthane est d'environ 320 mL par gramme d'acide acétique (Tableau 39). La production de méthane pour la série C4 (concentration en NH₄⁺ de 5,4 g.L⁻¹) démarre après la période de latence la plus importante (75 jours) (Figure 87 & Tableau 39). La période de production active de méthane dure environ 20 jours avec une vitesse maximale de production de méthane de 18,9 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH .jour⁻¹ (Tableau 39). Comme pour les autres concentrations en NH₄⁺, l'épuisement de l'acétate induit la diminution de la production de méthane (Figure 87). À la fin de la période expérimentale, la production cumulée de méthane est d'environ 328 mL par gramme d'acide acétique (Tableau 39).

Tableau 39 : Paramètres de Gompertz. (λ = latence ; Rm = taux de production maximum de méthane ; P= production cumulée de méthane en fin d'expérience).

Incubations	λ			Rm			P		
	(jours)			(mL de CH ₄ .g ⁻¹ d'CH ₃ COOH .jour ⁻¹)			(mL de CH ₄ .g ⁻¹ d'CH ₃ COOH)		
A	65,3	±	0,4	30,1	±	0,6	360,0	±	1,4
C1	5,5	±	0,1	54,9	±	3,0	337,4	±	1,6
C2	8,0	±	0,2	28,1	±	3,0	339,6	±	6,3
C3	42,3	±	3,3	7,5	±	0,2	320,6	±	5,6
C4	75,3	±	0,9	18,9	±	2,4	328,7	±	6,5
C3-b	2,4	±	1,0	19,8	±	2,5	331,9	±	3,9
C4-b	2,8	±	0,5	20,2	±	1,2	330,7	±	12,2

3.1.2.2.2. Résultats des approches isotopiques

- Approche isotopique naturelle

Les signatures isotopiques du méthane ($\delta^{13}\text{CH}_4$) et du dioxyde de carbone ($\delta^{13}\text{CO}_2$) sont proches pour les séries C1 et C2. Pour C1, initialement, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ se situe à -36 ‰ tandis que le $\delta^{13}\text{CO}_2$ commence à -4 ‰. Le $\delta^{13}\text{CO}_2$ reste ensuite relativement stable vers -10 ‰ jusqu'à la fin de la période de production active de méthane, alors que le $\delta^{13}\text{CH}_4$ connaît une augmentation constante pour atteindre -27 ‰. Les valeurs de compositions isotopiques ainsi que leurs évolutions (enrichissement isotopique en ¹³C) indiquent clairement que le méthane est produit par voie acétoclaste à cette concentration en azote ammoniacal. Dans la série C2, initialement, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ se situe à -32 ‰ tandis que le $\delta^{13}\text{CO}_2$ commence à -4 ‰. Le $\delta^{13}\text{CO}_2$ et le $\delta^{13}\text{CH}_4$ restent ensuite relativement stables vers -10 ‰ et -33 ‰ respectivement jusqu'à la fin de la période de production active de méthane. Les valeurs de compositions isotopiques du méthane dans ces incubations montrent que le méthane y est produit par voie acétoclaste. Il est toutefois à noter que lors de ces incubations, l'enrichissement isotopique classique observé au cours des incubations en milieu fermé n'est pas observé. Pour la série C3, au début de la production de méthane, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ se situe à -40 ‰ tandis que $\delta^{13}\text{CO}_2$ est à -8 ‰. Ensuite, pendant la période de production active du méthane, $\delta^{13}\text{CH}_4$ décroît pour atteindre sa plus faible valeur, environ -50 ‰, à la fin de la production de méthane, tandis que le $\delta^{13}\text{CO}_2$ augmente très lentement pour atteindre sa plus haute valeur (environ -2 ‰). L'évolution de la composition isotopique du méthane vers des valeurs de plus en plus faibles, semble mettre en évidence un accroissement de la part de méthane produit par la voie hydrogénotrophe. Ceci implique donc, qu'à cette concentration en azote ammoniacal, une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate se soit mise en place progressivement. Dans la série d'expériences C4, à la plus haute concentration en NH₄⁺, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ reste entre -70 ‰ et -58 ‰ pendant toute la durée des incubations. Un léger accroissement des valeurs de $\delta^{13}\text{CO}_2$ est observé (de -8 ‰

à - 2 ‰) au cours du temps. A cette concentration en azote ammoniacal le méthane semble ainsi être produit majoritairement par la voie hydrogénotrophe (*via* OSA).

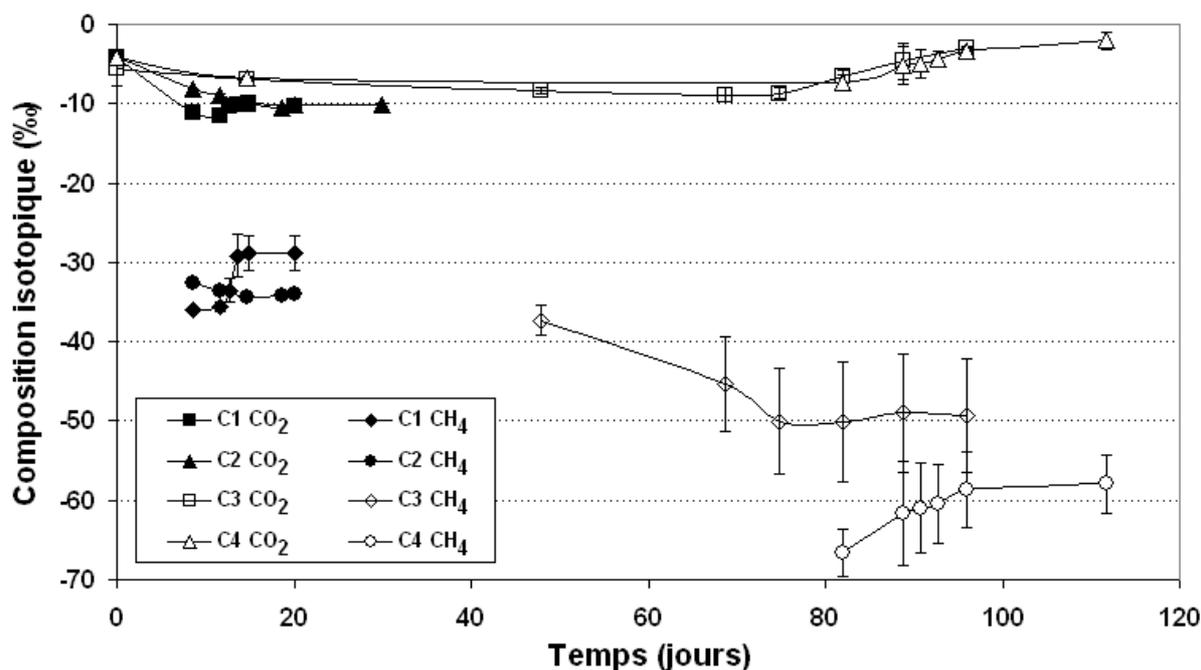


Figure 89 : Évolution des signatures isotopiques du CH₄ et du CO₂ dans les incubations C1 à C4.
 C1 (0,180 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C2 (1,44 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C3 (3,60 g.L⁻¹ de NH₄⁺), et C4 (5,40 g.L⁻¹ de NH₄⁺).
 Les valeurs correspondent à la moyenne du duplicat.
 Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre les incubations du duplicat.

Les facteurs de fractionnement apparent qui permettent de mettre en évidence le métabolisme méthanogène dominant la production de méthane ont été également calculés. Pour les séries C1 et C2, les valeurs sont caractéristiques du méthane produit par méthanogenèse acétoclaste (inférieures à 1,055). En ce qui concerne la troisième série de concentration de NH₄⁺, l'évolution du α_C suggère un changement de métabolisme au cours de la production de méthane, allant du métabolisme acétoclaste (valeurs initiales nettement inférieures à 1,055) vers l'hydrogénotrophe (valeurs finales supérieures à 1,055). Enfin, pour les bioréacteurs de la série C4, l' α_C reste pendant toute la durée de la production de méthane à une valeur caractéristique de la méthanogenèse hydrogénotrophe (1,065). Les interprétations déduites de l'évolution des compositions isotopiques sont ainsi confirmées par le calcul du facteur de fractionnement apparent (données non présentées).

• Approche isotopique marquée

L'utilisation d'acétate enrichi uniquement sur le groupement méthyle permet d'identifier le mécanisme à la base de la production du méthane. En effet, lors de la réaction de méthanogenèse acétoclaste, le groupement méthyle est transformé en CH₄ et le groupement carbonyle est quant à lui transformé en CO₂. Ainsi, dans nos expériences, si le méthane est produit par voie acétoclaste, le méthane devrait être enrichi à 100 % en carbone 13 et le dioxyde de carbone ne devrait pas l'être. Par contre, si le méthane est produit à partir de l'acétate par une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate (OSA), l'oxydation de l'acétate va produire deux molécules de dioxyde de carbone (dont une enrichie). Si les produits de la réaction d'oxydation (CO₂ et H₂) sont dilués dans le milieu d'incubation avant d'être consommés par méthanogenèse hydrogénotrophe, l'enrichissement du méthane sera proche de celui du dioxyde de carbone du milieu, car c'est ce dernier qui sera utilisé lors de la

réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe. Dans nos expériences, la dilution dans le milieu d'incubation qui contient une importante quantité de carbonates, devrait conduire à un enrichissement du méthane et du dioxyde de carbone nettement inférieur à 50 %. Enfin, le dernier cas de figure envisageable est une réaction d'oxydation de l'acétate qui produit, comme précédemment, deux molécules de dioxyde de carbone (dont une enrichie), mais avec une réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe survenant avant la dilution des molécules de dioxyde de carbone dans le milieu. Dans ce cas, l'enrichissement attendu du méthane produit serait d'environ 50 % et celui du dioxyde de carbone inférieur à 50 % (du fait de la dilution dans le milieu de la part non utilisée du CO₂ lors de la méthanogenèse hydrogénotrophe).

Pour les deux concentrations les plus basses en NH₄⁺ (série C1 et C2), l'enrichissement en carbone 13 du méthane produit est supérieur à 96 % pendant toute la durée des incubations et est donc caractéristique d'une production par la voie acétoclaste. Celui du dioxyde de carbone reste sensiblement égal à l'enrichissement naturel ce qui est également cohérent avec une production par la voie acétoclaste.

Pour les concentrations les plus élevées en NH₄⁺, l'évolution de l'enrichissement est différente. A la concentration C3, le méthane initialement produit est enrichi à plus de 90 % ce qui traduit que le méthane y est produit à la fois par méthanogenèse acétoclaste et par oxydation syntrophique de l'acétate avec une contribution majoritaire de la voie acétoclaste. Cet enrichissement diminue ensuite progressivement pour atteindre 70 % en fin d'expérience, mettant ainsi en évidence une augmentation au cours du temps de la proportion de méthane produit par oxydation syntrophique de l'acétate. Le dioxyde de carbone s'enrichit quant à lui en carbone 13 tout au long de l'incubation jusqu'à atteindre 10 % en fin d'expérience, ce qui est cohérent avec une diminution de la part de la méthanogenèse acétoclaste au profit de la voie réactionnelle d'OSA.

Enfin, pour la concentration C4, le méthane produit pendant toute la durée de l'incubation présente un enrichissement situé entre 50 et 60 %. Le dioxyde de carbone s'enrichit progressivement jusqu'à atteindre 16 % (Figure 90). Ainsi, à cette concentration en azote ammoniacal, une part importante de méthane est produite par OSA tout au long de l'incubation.

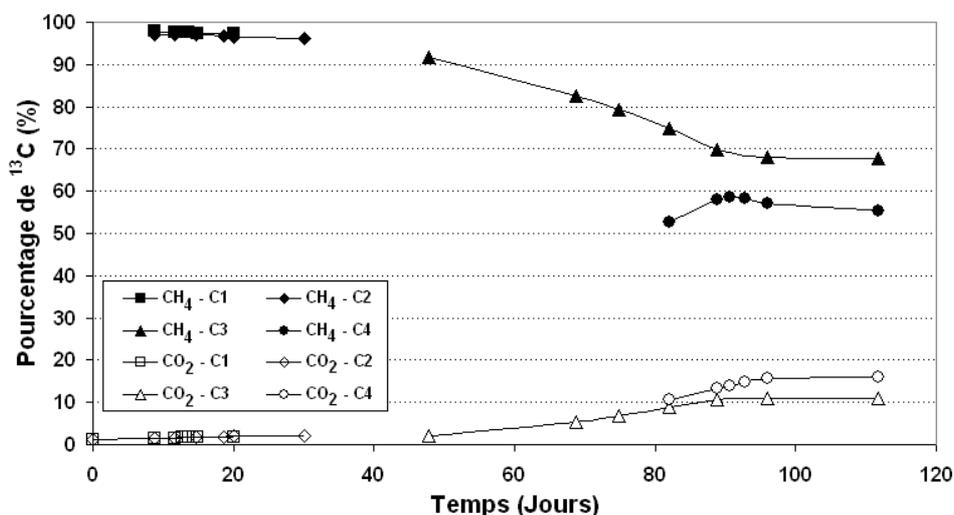


Figure 90 : Évolution de l'enrichissement isotopique du CH₄ et du CO₂ dans les incubations C1 à C4. C1 (0,180 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C2 (1,44 g.L⁻¹ de NH₄⁺), C3 (3,60 g.L⁻¹ de NH₄⁺), et C4 (5,40 g.L⁻¹ de NH₄⁺).

3.1.2.2.3. Étude de la dynamique des communautés de bactéries et d'archées

• ARISA

Des PCR-ARISA ont été réalisées pour comparer les évolutions des populations d'archées entre les différentes incubations d'acétate contenant des concentrations croissantes de NH_4^+ (Figure 91). Dans la phase liquide utilisée comme inoculum, on observe trois bandes majoritaires (450-466, 556-579 et 875-927), mais au total 11 bandes sont observables. Pour la concentration C1, cinq bandes majoritaires sont observées (450-466, 473-490, 556-579, 718-768 et 875-927) et restent stables au cours du temps. Il est à noter que le profil ARISA de l'inoculum est bien conservé au cours de cette incubation. Au cours de l'incubation réalisée à la deuxième concentration en azote ammoniacal, de légères évolutions du profil apparaissent au cours du temps. Ainsi, les bandes à 473-490 et 556-579 pb diminuent et la bande 718-768 pb s'intensifie. Les profils ARISA pour les concentrations C3 et C4 sont proches. A ces concentrations en NH_4^+ , une modification rapide de la structure de la communauté d'archées introduite avec l'inoculum est observée durant les 15 premiers jours. Ainsi, les bandes 473-490 et 556-579 semblent disparaître dès les premiers jours et la bande 718-768 s'intensifie très rapidement. Il est intéressant de noter que la bande qui s'intensifie est la même que celle qui s'était légèrement intensifiée dans les incubations C2. Les profils ARISA restent ensuite particulièrement stables jusqu'à la fin des expériences dans ces incubations.

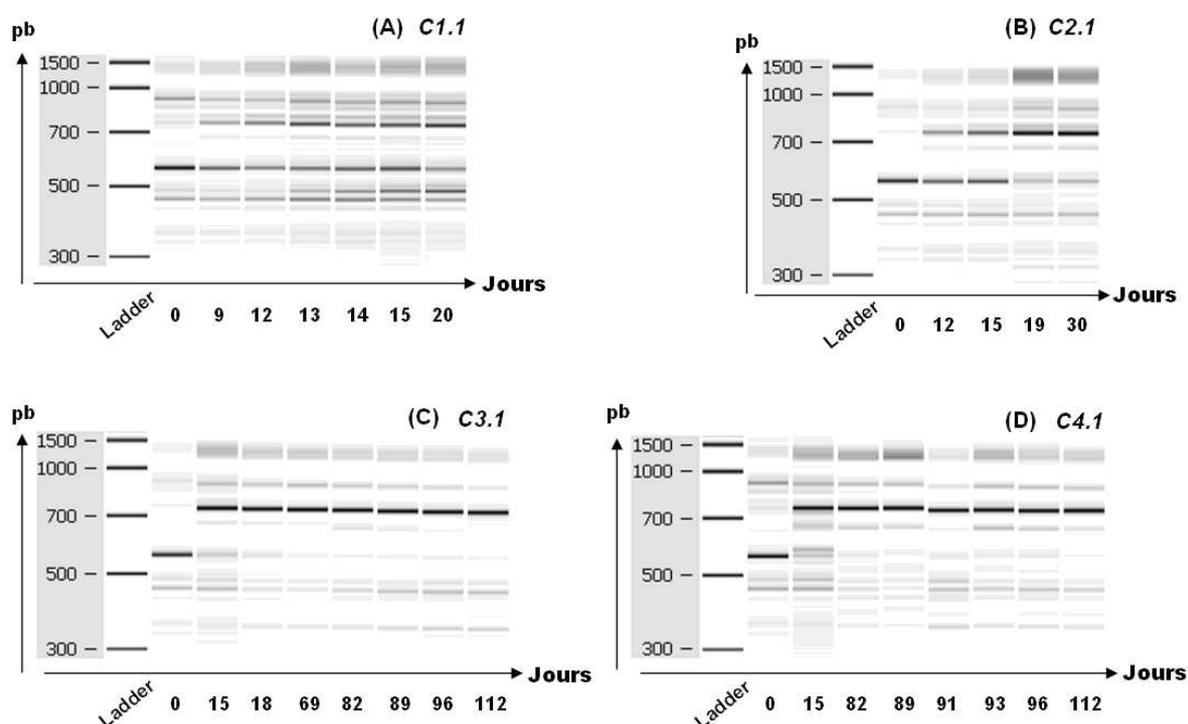


Figure 91 : ARISA archées des incubations C1 à C4.

Des PCR-ARISA ont également été réalisées pour comparer les évolutions des populations de bactéries entre les différentes incubations d'acétate contenant des concentrations croissantes de NH_4^+ (Figure 92). L'incubation C1 présente 8 bandes majoritaires (222-229 ; 246-249 ; 318-330 ; 350-363 ; 507-521 ; 613-628 ; 728-776 ; 780-786

pb) stables au cours du temps. Pour l'incubation C2, six des huit bandes sont retrouvées (222-229 ; 318-330 ; 350-363 ; 613-628 ; 728-776 ; 780-786 pb). Les échantillons C3 et C4 présentent un profil similaire, stable au cours de l'incubation, caractérisé par une bande majoritaire de 613 à 628 pb.

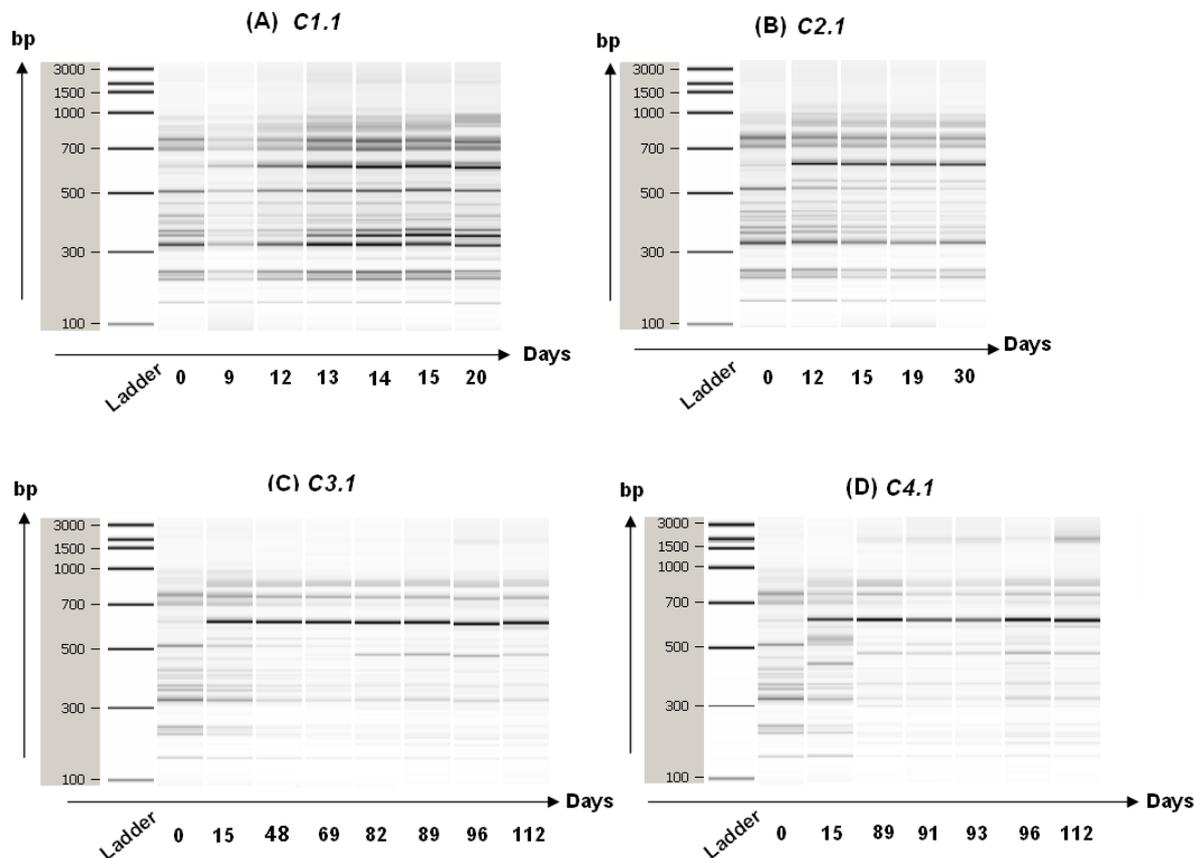


Figure 92 : ARISA bactéries des incubations C1 à C4.

- FISH

Afin d'observer et d'identifier les micro-organismes présents dans ces incubations, la technique FISH a été utilisée. Les observations montrent la présence de membres des familles *Methanosarcinaceae* (sonde MS1414 (bleu)) et *Methanosaetaceae* (sonde MX1361 (rouge)) dans l'inoculum (données non présentées), et au cours des incubations. Une diminution de la proportion de *Methanosaetaceae* est observée avec l'accroissement de la concentration en azote ammoniacal (Figure 93). Dans les observations réalisées à la concentration la plus élevée en NH_4^+ (Figure 93, D), seuls quelques membres de la famille *Methanosaetaceae*, principalement localisés au niveau des clusters de *Methanosarcinaceae*, sont observés alors que des archées de la famille *Methanosarcinaceae* sont détectées de manière systématique. Il peut également être remarqué que la taille des clusters formés par les membres de la famille *Methanosarcinaceae* augmente avec la concentration en azote ammoniacal (Figure 93)

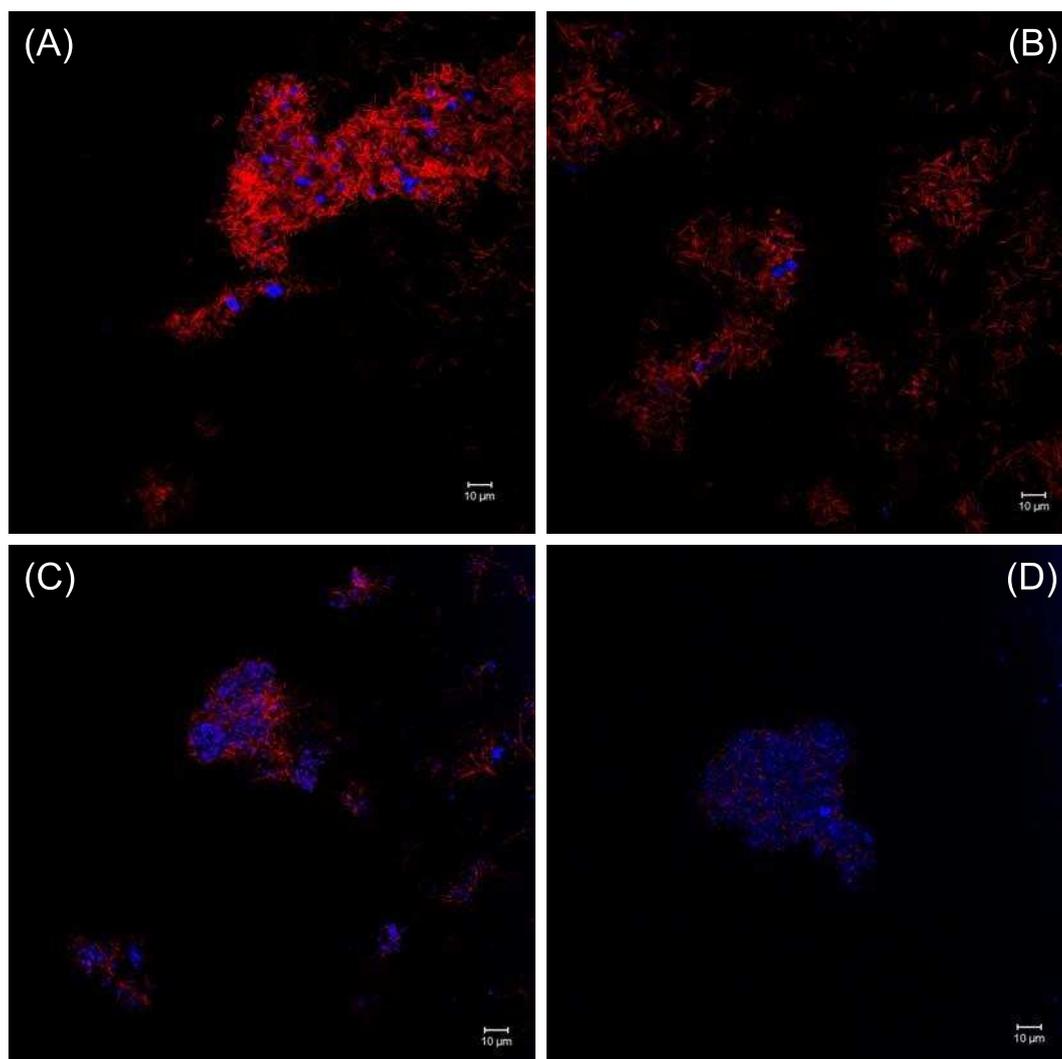


Figure 93 : Observations FISH des familles *Methanosaetaceae* (rouge) et *Methanosarcinaceae* (bleu) dans les séries C1 à C4.

Sondes MS1414+ helper-Cy5 (bleu), MX1361 -Cy3 (rouge).

A : Concentration de 0,18g/l de NH_4^+ au jour 12; B : Concentration de 1,44g/l de NH_4^+ au jour 19, C : Concentration de 3,60g/l de NH_4^+ au jour 75, D : Concentration de 5,40g/l de NH_4^+ au jour 82.

La Figure 94 présente les images obtenues pour les différents fluorophores séparément pour la concentration 1. La présence des deux familles d'archées est bien observée à l'aide de sondes spécifiques sur les figures A (*Methanosarcinaceae*) et B (*Methanosaetaceae*). La figure C est obtenue avec une sonde généraliste hybridant à l'ensemble des archées. Il est ainsi normal que les familles observées sur les figures A et B y soient détectées. On note également que tous les micro-organismes observables à l'aide de la sonde généraliste (figure C) sont retrouvés sur les images obtenues avec les sondes caractéristiques des familles recherchées (figure A et B), indiquant ainsi que seules ces deux familles d'archées étaient actives au moment du prélèvement de l'échantillon. Cette approche reposant sur la cohybridation des sondes a été utilisée sur l'ensemble des échantillons observés, afin de vérifier que d'autres familles d'archées n'étaient pas observées.

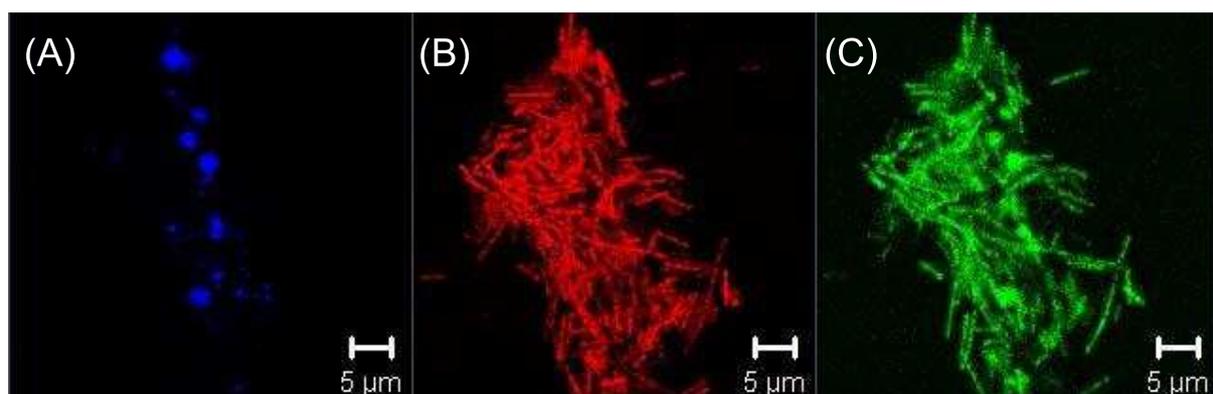


Figure 94 : Exemple de cohybridation obtenue sur une incubation de la série C1 par FISH.
Échantillon provenant d'une incubation de la série C1 (concentration de 0.18g/l de NH_4) au jour 12.
A : sonde MS1414-Cy5 (bleu). B : sonde MX825 :-Cy3 (rouge). C : sonde Arc915-FITC (vert).

La cohybridation entre les signaux de la sonde ARC915 (ciblant l'ensemble des archées) et les sondes MS1414 (spécifique de la famille *Methanosarcinaceae*) et MX825 (spécifique de la famille *Methanosaetaceae*) semble être totale comme nous venons de le voir pour l'ensemble des échantillons analysés. Cependant, des analyses réalisées en PCR quantitative utilisant des amorces spécifiques ciblant les *Methanomicrobiales*, semblent mettre en évidence la présence de certains membres de cette famille dans toutes les incubations, quelque soit la concentration en azote ammoniacal. De nouvelles observations par la technique FISH, à l'aide d'une sonde spécifique de cette famille, tendent à confirmer la présence de membres de cette famille d'archées mais en très faibles proportions, comme l'illustre l'image présentée sur la Figure 95 obtenue en fin d'une des incubations de la série C4.

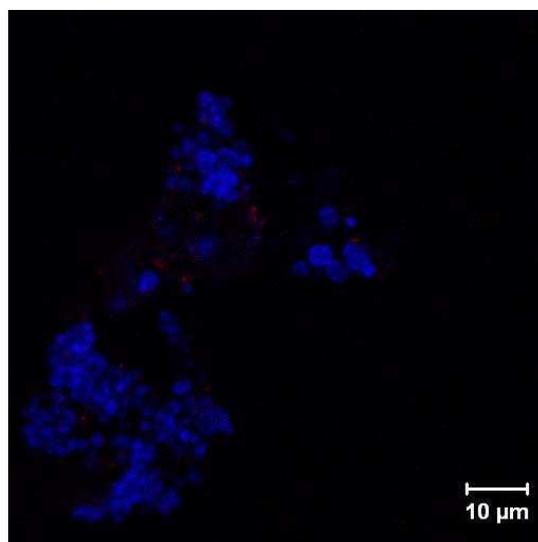


Figure 95 : Observations FISH des *Methanomicrobiales* (rouge) et des *Methanosarcinaceae* (bleu) dans la série C4.
Échantillon provenant d'une incubation de la série C4 (concentration de 5,4 g/l de NH_4) au jour 93.
Sondes MS1414-Cy5 (bleu), MG1200b :-Cy3 (rouge).

Afin d'observer l'arrangement spatial entre archées et bactéries, des observations utilisant simultanément des sondes ciblant l'ensemble des bactéries (EUB I, II, III) et l'ensemble des archées (ARC915) ont également été réalisées sur l'ensemble des incubations. Des photos obtenues pour les séries C1 et C4 sont présentées en Figure 96. Elles montrent que

la proportion de bactéries (en rouge) observées dans les deux cas est relativement faible en comparaison du nombre d'archées, et que ces bactéries sont essentiellement localisées dans les mêmes zones que les archées.

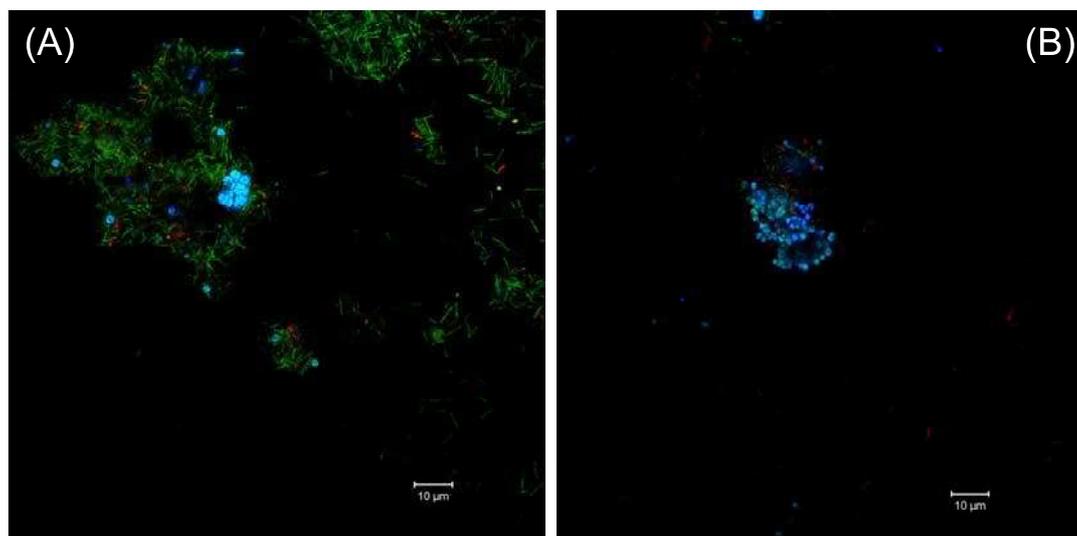


Figure 96 : Observations FISH des Bactéries (rouge), des archées (vert) et de la famille des *Methanosarcinaceae* (bleu) dans les séries C1 et C4.

Sondes MS1414+ helper-Cy5 (bleu), EUB I,II,III -Cy3 (rouge), Arc915-FITC (vert)

A : Concentration de 0,18g/l de NH_4^+ au jour 12 ; B : Concentration de 5,40g/l de NH_4^+ au jour 82.

3.1.2.2.4. Réinjections d'acétate

Des réinjections d'acétate ont été réalisées dans les incubations aux concentrations en azote ammoniacal 3 et 4. La consommation de l'acétate et la production de méthane démarrent immédiatement après la réinjection d'acétate (Figure 97). La cinétique de production du méthane est identique entre les séries C3-b et C4-b. Les vitesses maximales de production mesurées lors de ces essais de réinjection sont également proches de celles observées pour la série initiale C4 (Tableau 39). Une troisième réinjection d'acétate a également été réalisée à la concentration 4 en azote ammoniacal (expérience C4-c, données non présentées). La production de méthane démarre immédiatement et la vitesse maximale de production est très proche de celles observées lors des séries d'expériences C4 et C4-b. Les données isotopiques (données non présentées), notamment celles obtenues pour l'incubation marquée de la série C4-c, confirment les données obtenues pour la série C4 (enrichissement du méthane compris entre 52 et 59 % de ^{13}C pendant toute la durée de l'incubation).

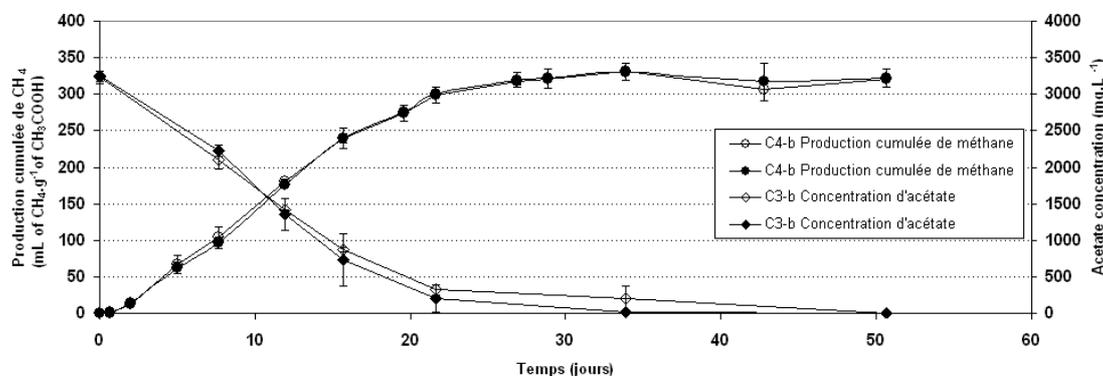


Figure 97 : Évolution de la production cumulée de méthane et de la concentration en acétate dans les incubations C3-b et C4-b.

C3-b (3,60 g.L⁻¹ de NH_4^+), et C4-b (5,40 g.L⁻¹ de NH_4^+). b = réinjection d'acétate. Les valeurs correspondent à la moyenne du triplicat. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre les incubations du duplicat.

3.1.3. Interprétations des résultats

3.1.3.1. Acclimatation de l'inoculum à la consommation d'acétate (Série A)

Durant cette série dite d'acclimatation des micro-organismes à la consommation de l'acétate, une production correspondant à 96 % de la production théorique de méthane attendue (373,5 ml) a été mesurée. Les analyses isotopiques indiquent que la production de méthane a bien lieu par méthanogenèse acétoclaste. Toutefois, une importante phase de latence, pendant laquelle les méthanogènes provenant du lixiviat d'ISDND utilisé ont probablement dû s'adapter aux conditions d'incubations et à la concentration d'acide acétique initiale (3,0 g. L⁻¹), a été nécessaire. Les observations FISH, mettant en évidence la présence de membres des familles *Methanosarcinaceae* et *Methanosaetaceae* (Données non présentées) sont en accord avec les résultats isotopiques. En effet, les membres de ces deux familles sont capables de réaliser la méthanogenèse acétoclaste (Ferry 1993).

3.1.3.2. Dégradation de l'acétate aux basses concentrations d'azote ammoniacal (Séries C1 et C2)

La production de méthane débute rapidement dans les séries d'incubations C1 et C2, comme l'illustre les temps de latence relativement courts (5 et 8 jours respectivement) déterminés à l'aide du modèle de Gompertz (Tableau 39). La comparaison des profils ARISA archées de l'inoculum avec ceux obtenus en début d'incubation dans les séries C1 et C2 montre très peu de différences (Figure 91). L'adaptation préalable de la communauté de micro-organismes à la consommation d'acétate (série A) a probablement permis de sélectionner les micro-organismes les plus adaptés à la dégradation de l'acétate dans ces conditions expérimentales. Ceci explique certainement pourquoi un démarrage rapide de la méthanogenèse est observé dans ces incubations

Les vitesses de production maximale de méthane calculées pour les séries C1 (54,9 mL de CH₄.g⁻¹ d' CH₃COOH.jour⁻¹) et C2 (28,1 mL de CH₄.g⁻¹ d' CH₃COOH.jour⁻¹) sont relativement rapides (Tableau 39). En effet, la vitesse de la série C1 est supérieure à celle de la série A (30,1 mL de CH₄.g⁻¹ d' CH₃COOH.jour⁻¹) (Tableau 39). Cela signifie que pour des conditions identiques, une population déjà adaptée a permis d'augmenter la vitesse de production de méthane. Dans la série C2, la cinétique de production du méthane est légèrement plus lente que celle de la série C1, ce qui semble indiquer un léger effet lié à l'augmentation de la concentration en azote ammoniacal. L'évolution des signatures isotopiques du méthane ($\delta^{13}\text{CH}_4$) et du dioxyde de carbone ($\delta^{13}\text{CO}_2$) des séries C1 et C2, indique que le méthane est produit par méthanogenèse acétoclaste dans ces incubations (valeurs de $\delta^{13}\text{CH}_4$ supérieures à -40 ‰) (Figure 89). Dans les expériences réalisées avec de l'acétate marqué sur le groupement méthyle pour les deux concentrations les plus basses en NH₄⁺ (C1 et C2), les enrichissements du méthane (>96 %) et du dioxyde de carbone obtenus (<3 %) confirment le fait que le méthane y a été produit quasi-exclusivement par méthanogenèse acétoclaste (Figure 90). Le métabolisme est donc le même dans la série d'acclimatation (Série A) et dans les séries C1 et C2. Les différences de cinétique de production de méthane observées entre les séries C1 et C2 ne semblent donc pas pouvoir être expliquées par la mise en place de métabolismes distincts. L'étude de l'évolution des communautés de micro-organismes au cours des incubations C1 et C2, révèle quant à elle des différences pouvant apporter des éléments d'explication. En effet, pour la concentration 1, les cinq bandes majoritaires observées dans le profil ARISA archées de l'inoculum (450-466, 473-490, 556-579, 718-768 et 875-927) restent stables tout au long de l'incubation (Figure 91). Pour C2, de légères évolutions du profil apparaissent au cours du temps. Ainsi, les bandes à 473-490 et 556-579 pb diminuent au cours de la production de méthane et la bande 718-768

pb s'intensifie (Figure 91). Il est donc probable que le fait que la concentration en azote ammoniacal soit plus importante dans les incubations de la série C2 que lors des incubations d'adaptation (série A), ait entraîné une modification des populations d'archées. Les résultats des observations FISH confirment cette hypothèse, puisqu'une diminution de la proportion des membres de la famille *Methanosaetaceae* et une augmentation de celle des membres de la famille *Methanosarcinaceae* sont observées pour la série C2 par rapport à l'inoculum, alors que pour la série C1, il ne semble pas y avoir de modification des proportions (Figure 93). Ainsi, les modifications de la structure de la communauté d'archées induites par l'augmentation de la concentration en azote ammoniacal (par rapport à la phase d'adaptation) dans les incubations C2 sont certainement à l'origine des différences d'ordre cinétique observées entre les incubations réalisées aux deux plus basses concentrations en NH_4^+ .

Enfin, en ce qui concerne les rendements de production de méthane en fin d'incubation, ils sont globalement identiques pour les séries d'incubations C1 et C2 (337,4 et 339,6 mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ d' CH_3COOH respectivement) et proches de la production théorique calculée (375,5 mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ d' CH_3COOH). Le fait que la production théorique attendue ne soit pas atteinte, est probablement dû au fait qu'une partie de l'acétate introduit initialement ait été soustraite du système lors des prélèvements liquides avant de pouvoir être dégradée.

3.1.3.3. Dégradation de l'acétate à moyenne concentration d'azote ammoniacal (Série C3)

Le temps de latence observé pour les incubations de la série C3 est relativement long et la production de méthane ne démarre qu'à partir du jour 42 (Tableau 39). La comparaison des profils ARISA pour les archées de l'inoculum avec ceux obtenus en début d'incubation montre une modification profonde dès le jour 15 (Figure 91). En effet, une des bandes majoritaires (556-579) s'éteint et une autre s'intensifie fortement (718-768). La modification du profil ARISA archées suggère que des changements importants au sein de la communauté de micro-organismes se produisent dès les premiers jours d'incubation en réponse à l'augmentation de la concentration d'azote ammoniacal dans le milieu. Une période d'adaptation correspondant au temps de latence est alors certainement nécessaire avant que cette nouvelle population, ainsi sélectionnée rapidement après le début de l'incubation, soit en mesure de produire du méthane de façon significative.

La production de méthane a lieu en deux phases (phase 1 entre les jours 40 et 70 ; phase 2 entre les jours 70 à 90) présentant des cinétiques distinctes. La vitesse maximale de production de $7,5 \text{ mL de } \text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{ de } \text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{jour}^{-1}$ déterminée à l'aide de l'équation de Gompertz modifiée, est ainsi probablement sous-estimée en raison de la rupture de pente qui entraîne certainement un biais lors de son calcul (Tableau 39 et Figure 87). Il est ainsi difficile de caractériser la cinétique de production de méthane à l'aide de cette seule grandeur. Il apparaît tout de même clairement que la vitesse de production de méthane est nettement plus lente à cette concentration d'azote ammoniacal, puisque la durée de 90 jours, sur laquelle la production de méthane s'étend, est de loin la plus importante. Le changement de métabolisme de production du méthane révélé par l'analyse des résultats isotopiques (naturels et marqués, Figure 89 et Figure 90) permet d'expliquer le fait qu'une production en deux phases soit observée. En effet, la composition isotopique du méthane supérieure à -40 ‰ indique qu'initialement le méthane est majoritairement produit par la voie acétoclaste. Ensuite, la diminution du $\delta^{13}\text{CH}_4$, suggère qu'un changement de métabolisme (acétoclaste vers hydrogénotrophe) survient pendant la production du méthane dans ces incubations. L'incubation réalisée sur substrat marqué confirme ces résultats. A cette concentration d'azote ammoniacal, le méthane est tout d'abord produit très majoritairement par voie acétoclaste

(enrichissement du méthane >90 %). Ensuite, la part de la voie hydrogénéotrophe (*via* OSA) augmente au cours du temps (diminution de l'enrichissement du méthane jusqu'à 70 %). Par ailleurs, le fait qu'un enrichissement du CO₂ soit observé met également en évidence que la réaction d'OSA se met en place progressivement dans cette série d'incubations. Il est surprenant de constater que le profil ARISA de la série C3 soit alors aussi stable, car les résultats isotopiques montrent un changement de métabolisme au cours de l'incubation (acétoclaste puis hydrogénéotrophe). Ce changement de métabolisme au cours de l'incubation ne semble donc pas, a priori, lié à une modification de la population d'archées. Les observations FISH confirment la stabilité de la population d'archées, puisque des membres des familles *Methanosarcinaceae* et *Methanosaetaceae* sont observés en proportions constantes (identiques à celles observées sur la Figure 93, C) tout au long de cette série d'incubation (observations non présentées).

L'ensemble de ces résultats indique que la production de méthane a débuté très majoritairement par voie acétoclaste. La proportion du méthane produit par oxydation syntrophique de l'acétate initialement marginale, augmente ensuite progressivement au cours de cette série d'incubations. Au vu de la stabilité de la population d'archées tout au long des incubations (profil ARISA et observations FISH), il est probable que la famille *Methanosarcinaceae* y opère un changement de métabolisme, car elle est la seule à pouvoir effectuer à la fois la méthanogenèse acétoclaste et hydrogénéotrophe. Il n'est toutefois pas exclu que certains membres de la famille *Methanomicrobiaceae* plus particulièrement les *Methanomicrobiales*, dont la présence en très faible quantité a été mise en évidence par des observations FISH, puissent également participer à la production de méthane par voie hydrogénéotrophe. Cette modification de métabolisme mise en évidence au cours de ces incubations est certainement à l'origine du fait que la production se déroule en deux phases et qu'une cinétique de production particulièrement lente soit observée.

Enfin, en ce qui concerne les rendements de production de méthane en fin d'incubation, ils sont proches de la production théorique calculée (320,6 contre 375,5 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH) (Tableau 39). Le fait que la production théorique attendue ne soit pas atteinte est probablement dû au fait qu'une partie de l'acétate introduit initialement ait été soustraite du système lors des prélèvements liquides avant de pouvoir être dégradée.

3.1.3.4. Dégradation de l'acétate à haute concentration d'azote ammoniacal (Série C4)

C'est à cette forte concentration en azote ammoniacal que le temps de latence, de l'ordre de 75 jours, déterminé à l'aide de l'équation de Gompertz modifiée, est le plus long. La même hypothèse que celle avancée pour expliquer le temps de latence important observé lors des incubations de la série C3, semble pouvoir être mise en avant puisque les profils ARISA sont également modifiés fortement par rapport à celui de l'inoculum dès les premiers jours d'incubation (Figure 91), en réponse à la présence de la forte concentration d'azote ammoniacal dans le milieu. Le fait que le temps de latence soit plus important pour ces incubations que pour C3 pourrait s'expliquer par l'inhibition totale de la production de méthane par voie acétoclaste, comme l'illustrent les premières valeurs de compositions isotopiques du méthane mesurées qui se trouvent dans la gamme classique d'un métabolisme hydrogénéotrophe ($\delta^{13}\text{CH}_4 = -64,5 \text{ ‰}$ pour C4-1 et $-68,8 \text{ ‰}$ pour C4-2 au jour 80 (figure 89)).

La production active de méthane se fait ensuite avec une vitesse maximum de 18,9 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH.jour⁻¹ (Tableau 39). L'analyse des résultats isotopiques (naturels et marqués, Figure 89 et Figure 90) du méthane et du dioxyde de carbone permet de mettre en évidence une production du méthane majoritairement de type hydrogénéotrophe. En effet, la

composition isotopique du méthane reste comprise entre -70 ‰ et -60 ‰ en moyenne. En ce qui concerne l'incubation marquée, le fait que ce soit à cette concentration que l'enrichissement isotopique du CO₂ soit le plus important, confirme que la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate joue un rôle plus particulièrement important dans ces incubations. Le méthane produit au cours de cette incubation présente initialement un enrichissement à 50 ‰, qui augmente ensuite légèrement jusque 60 ‰. Si ces valeurs d'enrichissement mesurées pour le méthane mettent également clairement en évidence l'importance de la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate dans cette série d'incubations, elles peuvent s'expliquer par différentes combinaisons de métabolismes (mélange acétoclaste / hydrogénotrophe).

En effet, la valeur initiale d'enrichissement en carbone 13 du méthane (50 ‰ au jour 80) peut s'expliquer soit, par un mélange de méthane provenant des métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe, ou, par une production exclusivement par oxydation syntrophique. Dans le cas de cette dernière hypothèse, qui semble la plus plausible puisque les données isotopiques naturelles en début d'incubation sont caractéristiques d'une production de méthane par voie hydrogénotrophe (-65 ‰ au jour 80), les produits de la réaction d'oxydation de l'acétate (CO₂ et H₂) seraient consommés immédiatement avant qu'ils ne soient dilués avec les carbonates du milieu et transformés en méthane par méthanogenèse hydrogénotrophe. Le fait ensuite qu'un enrichissement pouvant atteindre des valeurs proches de 60 ‰ soit mesuré, pourrait être dû à une production de méthane par voie acétoclaste. Cette contribution de la voie acétoclaste serait dans ce cas au maximum de 20 ‰. En effet, si l'on considère qu'un taux d'enrichissement de 50 ‰ en ¹³C du méthane correspond à une production faite uniquement par une réaction d'OSA et que, à l'inverse, un taux d'enrichissement de 100 ‰ en ¹³C du méthane correspond à une production réalisée uniquement par méthanogenèse acétoclaste, chaque augmentation de 1 ‰ du taux d'enrichissement en ¹³C du méthane au dessus de 50 ‰ traduit le fait que 2 ‰ du méthane a été produit par méthanogenèse acétoclaste.

Dans cette série d'incubations réalisées à haute concentration en azote ammoniacal, les membres de la famille *Methanosarcinaceae* (pouvant réaliser la méthanogenèse acétoclaste et hydrogénotrophe) sont très largement dominants et forment des clusters de taille plus importante qu'à plus faibles concentrations en azote ammoniacal. Il semblerait donc que la méthanogenèse acétoclaste soit fortement inhibée par l'azote ammoniacal et que les *Methanosarcinaceae* aient été capables de s'adapter à ces hautes concentrations en modifiant leur métabolisme. Il n'est toutefois pas exclu que certains membres de l'ordre *Methanomicrobiales* puissent également participer à la production de méthane par voie hydrogénotrophe, puisque leur présence en très faible quantité a été mise en évidence par des observations FISH.

L'enrichissement du méthane à 50 ‰ dans l'incubation marquée de la série C4 (impliquant une absence de dilution des produits d'oxydation dans le milieu avant méthanogenèse hydrogénotrophe) laisse penser que les *Methanosarcinaceae* pourraient réaliser l'oxydation syntrophique seule. Cette possibilité a d'ailleurs déjà été suggérée lors d'une étude réalisée sur des souches pures (Lovley et Ferry 1985). Cette hypothèse serait tout à fait en accord avec le fait qu'il n'y ait pas de dilution des produits d'oxydation avant méthanogenèse hydrogénotrophe, puisque l'ensemble de la réaction serait alors réalisé au sein des clusters de *Methanosarcina*. Une autre possibilité à ne pas écarter est qu'une réelle relation syntrophique entre des bactéries responsables de l'oxydation et des archées se mette en place, puisque la présence de bactéries imbriquées dans les clusters d'archées, en faibles proportions cependant, est constatée (respectivement en rouge et vert sur la Figure 96). Les

profils ARISA bactéries (Figure 92) ne permettent pas de trancher entre ces deux hypothèses mais apportent cependant des informations sur l'évolution de la communauté de bactéries en fonction de la concentration en NH_4^+ . En effet, l'augmentation de la $[\text{NH}_4^+]$ entraîne une diminution du nombre de bandes, ce qui semble indiquer qu'un nombre important de bactéries est fortement impacté, mais aucune bande prédominante n'apparaît lors de la mise en place de l'OSA. Il est ainsi difficile, à ce stade et à partir des données disponibles, de conclure quant aux acteurs microbiens responsables de l'OSA dans ces incubations. Nous reviendrons sur ce point particulier dans la partie suivante puisque des résultats apportant des éclairages complémentaires ont été obtenus lors d'incubations similaires.

Enfin, en ce qui concerne les rendements de production de méthane en fin d'incubation, ils sont proches de la production théorique calculée (328,7 contre 375,5 mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de CH_3COOH) (Tableau 39). Le fait que la production théorique attendue ne soit pas atteinte est probablement dû au fait qu'une partie de l'acétate introduit initialement ait été soustraite du système lors des prélèvements liquides avant de pouvoir être dégradée.

3.1.3.5. Réinjection d'acétate à haute concentration d'azote ammoniacal (Séries C3-b, C4-b et C4-c)

Une fois la population adaptée à la production de méthane par la réaction d'OSA à haute concentration d'azote ammoniacal (lors des incubations C3 et C4), la consommation d'acétate et la production de méthane démarrent sans aucun temps de latence lors des réinjections d'acétate réalisées (lors des incubations C3-b et C4-b, mais aussi C4-c)) (Tableau 39).

Le métabolisme hydrogénotrophe est toujours à l'origine de la production de méthane (données isotopiques non présentées) et les vitesses de production maximale du méthane n'augmentent pas entre les séries C4 et C4-b (environ 20 mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ d' $\text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{jour}^{-1}$ (Tableau 39) ni pour la série de réinjection suivante (C4-c).

Enfin, en ce qui concerne les rendements en termes de production de méthane finale, ils sont proches de la production théorique calculée (environ 330 contre 375,5 mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de CH_3COOH) (Tableau 39). L'écart entre les valeurs théoriques et expérimentales est probablement lié à une influence des prélèvements liquides, comme expliqué dans les paragraphes précédents.

3.1.4. Discussion

La réponse à une modification de la concentration en azote ammoniacal sur un système capable de dégrader l'acétate par réaction de méthanogenèse acétoclaste, a été exploré au travers des expériences présentées dans cette partie. Les résultats obtenus ne peuvent évidemment pas être extrapolés directement à l'échelle du processus global de digestion anaérobie, ni transposés à celle des procédés, toutefois ils permettent une meilleure compréhension du déterminisme de l'effet d'une augmentation de la concentration en azote ammoniacal sur la méthanogenèse et peuvent apporter des éléments d'information importants concernant la stabilité des procédés de méthanisation.

Tout d'abord, la comparaison des séries d'expériences C2, C3 et C4 avec la série C1 permet de mettre en évidence un effet de l'augmentation de la concentration en azote ammoniacal sur différents paramètres tels que, le temps de latence et la vitesse de production du méthane. Les effets observés sur ces paramètres, dont les implications opérationnelles sont importantes, peuvent s'expliquer par des modifications de populations microbiennes seules ou couplées à un changement de métabolisme à l'origine de la production du méthane. En effet,

l'étude des profils ARISA archées ainsi que les observations FISH ont tout d'abord permis de mettre en évidence un impact de l'augmentation de la concentration en azote ammoniacal sur les communautés microbiennes. Ainsi, la présence d'une des familles d'archées (*Methanosaetaceae*) diminue alors que celle d'une autre (*Methanosarcinaceae*) au contraire augmente et devient majoritaire avec l'augmentation de la concentration en azote ammoniacal. Ce phénomène se traduit également par l'augmentation de la taille des clusters formés par les membres de la famille *Methanosarcinaceae*. Ces résultats confirment que le métabolisme de méthanogenèse acétoclaste semble être plus sensible à la concentration en azote ammoniacal que le métabolisme de méthanogenèse hydrogénotrophe (Chen, Wu et al. 2008). Ils mettent également en évidence que les membres de la famille des *Methanosaetaceae* y sont plus sensibles que les membres de la famille des *Methanosarcinaceae*. Alors que dans le cas de la série C2, ces modifications de populations sont relativement faibles et que le métabolisme utilisé pour produire le méthane reste de type acétoclaste, un léger temps de latence avant le démarrage franc de la production de méthane ainsi qu'une diminution de la vitesse de production de méthane par rapport à celle déterminée pour C1, sont tout de même observés. En présence de plus fortes concentrations en azote ammoniacal, l'augmentation importante des temps de latence semble pouvoir s'expliquer par les modifications immédiates et profondes de la communauté microbienne couplées à une modification de métabolisme. En effet, la voie acétoclaste semble être inhibée et se voit donc remplacée progressivement pour la série C3, et dès le début de la production de méthane pour la série C4, par une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate utilisant la voie métabolique hydrogénotrophe. Lorsque le changement de métabolisme se produit en cours d'incubation, la production de méthane est alors particulièrement lente (cas de la série C3). Il est par contre à noter que lorsque la production de méthane débute directement par voie hydrogénotrophe (cas de la série C4), la vitesse de production est plus rapide.

L'augmentation de la proportion des membres de la famille *Methanosarcinaceae* semble donc pouvoir s'expliquer par sa versatilité métabolique lui permettant notamment de réaliser la méthanogenèse acétoclaste ou hydrogénotrophe. L'augmentation des concentrations de NH_4^+ oriente donc le métabolisme de dégradation de l'acétate vers la réaction d'OSA. Par ailleurs, il est à noter que le développement d'une population capable de dégrader l'acétate par OSA aux plus fortes concentrations d'azote ammoniacal, semble nécessiter du temps, ce qui se traduit par l'observation d'une augmentation des périodes de latence qui deviennent très importantes (jusqu'à plus de 70 jours). Les cinétiques de production de méthane sont également inférieures à haute concentration et tout particulièrement dans le cas de la série C3, certainement car un changement de métabolisme se produit au cours de la phase active de production de méthane.

Afin de comprendre pourquoi l'OSA ne semble se mettre en place que dans les incubations des séries C3 et C4, il est important de rappeler qu'il est probable que la forme toxique soit le NH_3 et non le NH_4^+ . Le calcul des concentrations de NH_3 a été réalisé en fonction des pH mesurés dans chacune des séries d'incubations en utilisant l'Équation 21. Bien que cette détermination souffre certainement d'imprécisions en raison des incertitudes inhérentes aux mesures de pH, elle permet de donner des ordres de grandeur. La concentration théorique de NH_3 est comprise entre 3 et 24 mg.L^{-1} pour C1 ; 33 et 149 mg.L^{-1} pour C2 ; 75 et 372 mg.L^{-1} pour C3 ; 101 et 472 mg.L^{-1} pour C4. Ainsi, il apparaît qu'une concentration de 100 mg.L^{-1} semble être suffisante pour inhiber totalement la production de méthane par voie acétoclaste, puisque que la méthanogenèse démarre dès le début de l'incubation en méthanogenèse hydrogénotrophe dans la série C4 à cette concentration de NH_3 . Le fait que la production de méthane débute dans la série C3 majoritairement par voie acétoclaste, semble

indiquer qu'une concentration en ammoniac de 75 mg.L^{-1} n'inhibe pas totalement la méthanogenèse acétoclaste. Ainsi, le seuil d'inhibition de la méthanogenèse acétoclaste, dans nos conditions expérimentales, semble se situer entre 75 et 100 mg.L^{-1} . Bien qu'il ne soit pas réaliste de vouloir proposer un seuil universel d'inhibition de la méthanogenèse acétoclaste par l'azote ammoniacal, il est intéressant de remarquer que cette valeur est du même ordre que celle évoquée dans les essais réalisés à 55°C à partir d'un inoculum de méthaniseur (Chapitre 4, § 2.2 Effet de la température sur la méthanisation de l'acétate), elle-même proche du seuil d'inhibition de la méthanogenèse acétoclaste par le NH_3 , publié dans la littérature (128 mg/L) lors d'expériences utilisant un inoculum provenant d'un digesteur anaérobie de déchets solides (Schnurer et Nordberg 2008). Il apparaît cohérent que dans l'incubation C1 la méthanogenèse acétoclaste ne soit pas inhibée ($[\text{NH}_3] < 24 \text{ mg.L}^{-1}$). Dans l'incubation C2, le fait que l'on puisse dépasser une concentration de 100 mg.L^{-1} en fin d'incubation pourrait expliquer les légères modifications de populations observées au cours de cette série d'incubations.

Alors que les incubations des séries C2, C3 et C4 apportent des informations sur la capacité d'adaptation et le type de réponse d'un système préalablement adapté à dégrader l'acétate lors d'une augmentation de la concentration en azote ammoniacal, les différentes réinjections réalisées sans perturbation du système apportent elles des informations sur la stabilité des processus. En premier lieu, la comparaison des expériences Série A – Série C1 montrent, qu'à basse concentration en azote ammoniacal, une population préalablement adaptée à consommer de l'acétate est capable de dégrader un nouvel apport d'acétate sans aucun temps de latence et également d'accroître la vitesse de production du méthane. La vitesse limite de production de méthane n'a donc peut être pas été atteinte lors de nos expériences et il est possible qu'une troisième série de réinjections dans des conditions identiques aurait pu conduire à une nouvelle augmentation de la vitesse de production de méthane. Les expériences de réinjections Série C3 – Série C3-b et Série C4 – Série C4-b – Série C4-c permettent quant à elles de mettre en évidence, qu'à haute concentration en azote ammoniacal, une population préalablement adaptée à consommer de l'acétate par OSA est capable de dégrader un nouvel apport d'acétate sans aucun temps de latence. La vitesse maximale de production de méthane semble dans ce cas avoir été atteinte dès la première mise en place du métabolisme d'OSA (série C4), car lors des séries de réinjections, aucune augmentation des vitesses de production de méthane n'est observée. En conclusion, l'ensemble de ces données montre qu'il est possible d'acclimater une communauté microbienne issue d'un système anaérobie au processus de dégradation de l'acétate, à la fois à basse et haute concentration en azote ammoniacal. Il est à noter tout de même que des vitesses de production maximales environ trois fois plus rapides sont obtenues à basse concentration en azote ammoniacal lorsque le métabolisme est de type acétoclaste (R_m de $55 \text{ mL de CH}_4.\text{g}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COOH.jour}^{-1}$) qu'à haute concentration lorsque le méthane est produit par OSA (R_m de $19 \text{ mL de CH}_4.\text{g}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COOH.jour}^{-1}$ en moyenne) dans nos conditions expérimentales.

Par ailleurs, aucun effet significatif de la concentration en azote ammoniacal et par conséquent du métabolisme à l'origine de la production du méthane, n'est observé sur la quantité finale de méthane produite. En effet, pour l'ensemble des concentrations, le rendement théorique calculé à partir de la quantité d'acétate introduite est quasiment atteint. Le passage d'un métabolisme acétoclaste vers hydrogénotrophe *via* une réaction d'OSA ne semble donc pas entraîner de baisse de rendement lors de la dégradation anaérobie d'acétate. Ce même résultat avait été observé lors de l'étude de l'effet de la température (cf. Chapitre 4, § 2.2 Effet de la température sur la méthanisation de l'acétate).

3.1.5. Conclusion

Les expériences menées au laboratoire ont permis, grâce aux mesures de compositions isotopiques qui se sont révélées être l'outil idéal pour tracer les métabolismes utilisés, de mettre en évidence une modification du métabolisme utilisé pour la production de méthane lors de la consommation d'acétate à haute concentration d'azote ammoniacal (acétoclaste vers hydrogénotrophe). Les expériences de réinjections ont permis de montrer qu'une fois la réaction d'OSA mise en place et la population microbienne adaptée, aucune phase de latence n'est nécessaire avant le démarrage de la production de méthane et que la production finale de méthane obtenue est identique à celle obtenue par métabolisme acétoclaste.

Ainsi, ces résultats illustrent qu'un des points clés pour obtenir le bon déroulement du processus de dégradation anaérobie de l'acétate en méthane, réside assez logiquement dans le fait d'éviter toute perturbation (tel qu'un changement de la concentration d'azote ammoniacal), qui risquerait d'impacter la communauté microbienne et nécessiter de sa part une adaptation pouvant conduire à la diminution ou à un blocage temporaire/permanent de la production de méthane. L'ensemble des données obtenues dans cette étude permet de mettre en évidence qu'il est possible d'obtenir une stabilité des processus de dégradation de l'acétate, à la fois à basse et haute concentration de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. Toutefois, la modification des voies métaboliques et/ou des populations de micro-organismes impliqués peut nécessiter des temps d'adaptation relativement importants (à la fois lors de l'acclimatation à la dégradation de l'acétate à basse et haute $[\text{NH}_4^+]$). Enfin, il est à noter que, dans nos conditions expérimentales, la cinétique de production de méthane à partir d'acétate semble être plus performante lors de l'utilisation du métabolisme acétoclaste.

Les archées de la famille *Methanosarcinaceae* semblent plus résistantes aux fortes concentrations en azote ammoniacal que les archées de la famille *Methanosaetaceae*. Ceci pourrait peut être s'expliquer par le fait que cette famille d'archées forme des clusters de plus en plus gros avec l'accroissement de la concentration d'azote ammoniacal, ce qui lui permettrait ainsi de constituer un environnement moins exposé à cet élément inhibiteur. Enfin, la versatilité métabolique des membres de la famille *Methanosarcinaceae* lui permettrait également de se développer aux hautes concentrations d'azote ammoniacal grâce à la production de méthane par la voie hydrogénotrophe. En tout état de cause, nos résultats indiquent que cette famille d'archées est impliquée dans la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été montré.

Par ailleurs, il est à noter que l'approche isotopique marquée a également permis de conforter les résultats obtenus et de valider ainsi l'approche isotopique naturelle.

3.2. Effet de la quantité d'inoculum sur la dégradation de l'acétate à haute concentration en azote ammoniacal en conditions mésophiles

3.2.1. Introduction

Dans la partie précédente, l'effet de la concentration en azote ammoniacal sur les voies métaboliques utilisées lors de la méthanisation de l'acétate a été investigué. Les résultats ont mis en évidence qu'à haute concentration en azote ammoniacal, lors d'incubations d'acétate utilisant un inoculum préalablement adapté à dégrader ce composé, un changement de métabolisme (acétoclaste vers hydrogénotrophe *via* oxydation syntrophique de l'acétate) et l'apparition de temps de latence importants sont observés. Afin de mieux comprendre les mécanismes de dégradation de l'acétate à haute concentration en azote ammoniacal, une

nouvelle série d'incubation d'acétate a été réalisée avec un inoculum provenant de la même installation de stockage de déchets mais n'ayant pas été préalablement acclimaté à la consommation d'acétate. L'influence de la quantité de biomasse apportée en début d'incubation a également été explorée. L'ensemble des paramètres expérimentaux ainsi que la nomenclature utilisée dans le cadre de ces incubations sont détaillés dans le Tableau 40. Les incubations Lixi-I1 ont été réalisées en introduisant le culot de centrifugation de 100 mL de lixiviat comme dans la série précédente. Pour les modalités Lixi-I2 et Lixi-I3 les culots obtenus à partir d'un volume cinq fois et dix fois plus important de ce même lixiviat ont été respectivement introduits. Dans cette série d'incubations toutes les autres conditions expérimentales sont identiques. Il est à noter que la concentration en azote ammoniacal est, dans le cas de cette série d'expériences, et à la différence de la plus haute concentration des expériences précédemment présentées (Série C4) seulement de 4,5 g.L⁻¹ car un des objectifs était d'observer le shift métabolique et de mieux en définir la valeur seuil.

Tableau 40 : Nomenclature des expériences sur l'effet de la quantité d'inoculum.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	Température	[NH ₄ ⁺]
Lixi-I1 (1)	Culot de 100 mL	Acétate				
Lixi-I1 (2)	de lixiviat d'ISD	Acétate marqué*				
Lixi-I2 (1)	Culot de 500 mL	Acétate		150 mL de		
Lixi-I2 (2)	de lixiviat d'ISD	Acétate marqué*	3,0 g.L ⁻¹	milieu BMP + carbonate	35°C	4,5 g.L ⁻¹
Lixi-I3 (1)	Culot de 1 L	Acétate				
Lixi-I3 (2)	de lixiviat d'ISD	Acétate marqué*				

* marqué uniquement sur l'atome de carbone du groupement méthyle C*H₃COOH

3.2.2. Résultats expérimentaux obtenus

3.2.2.1. Production de méthane

Les incubations d'acétate réalisées avec différentes quantités d'inoculum présentent des évolutions de production de méthane cumulée (Figure 98, A) et de la concentration d'acétate (Figure 98, B) différentes. La caractérisation des courbes de production de méthane cumulée grâce à l'équation de Gompertz modifiée permet d'estimer le temps de latence, la vitesse de production maximale de méthane et la production cumulée totale de méthane (Tableau 41).

Pour les deux concentrations les plus hautes en inoculum (séries I2 et I3), la production active de méthane commence respectivement aux jours 63 et 58 (Tableau 41). En ce qui concerne l'incubation ayant reçu la quantité d'inoculum la plus faible, la production de méthane débute plus tardivement au jour 82. Dans l'ensemble des incubations, la production cumulée totale atteint ensuite assez rapidement 317, 320 et 331 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH respectivement pour I3, I2 et I1 (Tableau 41). Une différence entre les incubations des séries I2 et I3 peut être notée au niveau de la vitesse maximale de production de méthane (8,69 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH.jour⁻¹ pour I2 contre 11,27 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH.jour⁻¹ pour I3) (Tableau 41). Enfin, dans la série I1, la vitesse de production maximale du méthane est légèrement supérieure (14,42 mL de CH₄.g⁻¹ de CH₃COOH.jour⁻¹). Les courbes de concentration d'acétate sont inversement corrélées avec les courbes de production cumulée de méthane (Figure 98, B).

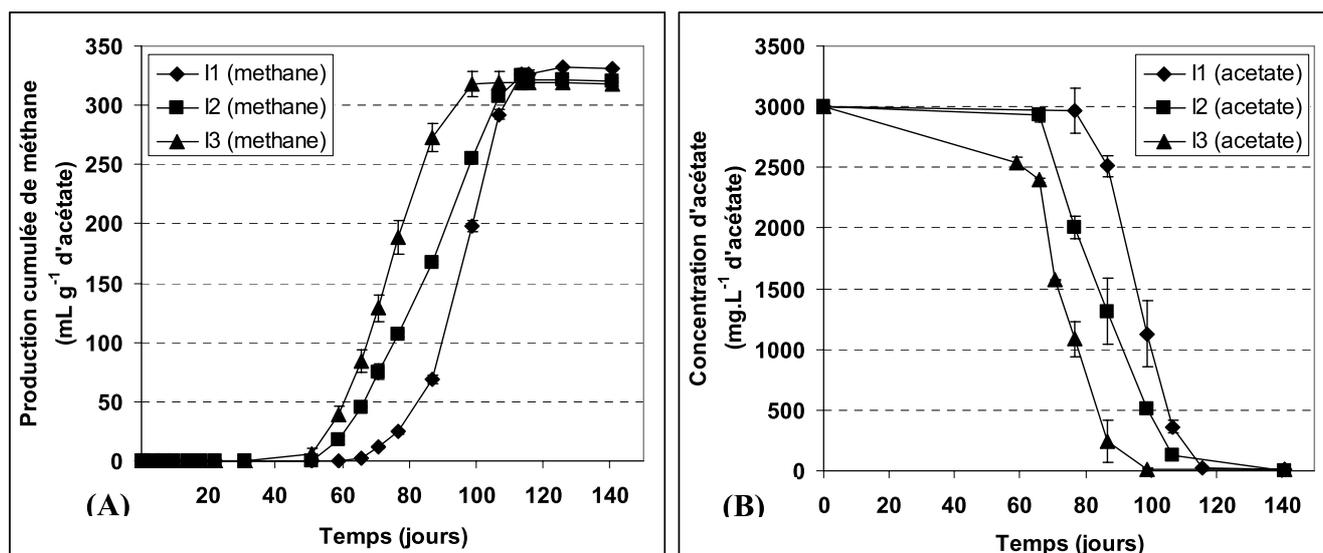


Figure 98 : Production de méthane cumulée (A) et concentration d'acétate (B) dans les incubations I1 à I3. I1 (Inoculum x 1) I2 (Inoculum x 5) et I3 (Inoculum x 10). Les valeurs correspondent à la moyenne du duplicat. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre les incubations du duplicat et peuvent parfois être masquées par les symboles.

Tableau 41 : Paramètres de Gompertz. (λ = latence ; Rm = taux de production maximum de méthane ; P= production cumulée de méthane en fin d'expérience).

Incubations	P		Rm		λ	
	<i>(mL de CH₄.g⁻¹ d' CH₃COOH)</i>		<i>(mL de CH₄.g⁻¹ d' CH₃COOH.jour⁻¹)</i>		<i>(jours)</i>	
I1	331,0	± 1,4	14,42	± 0,50	82,66	± 0,67
I2	320,5	± 2,1	8,69	± 0,04	63,62	± 0,29
I3	317,5	± 2,1	11,27	± 0,51	58,56	± 0,71

3.2.2.2. Approche isotopique

3.2.2.2.1. Approche isotopique naturelle

Des analyses de composition isotopique ont été effectuées pour les incubations réalisées avec de l'acétate non marqué. La Figure 99 représente l'évolution des compositions isotopiques du méthane et du dioxyde de carbone en fonction du temps dans les incubations I1-1, I2-1 et I3-1.

L'ensemble des signatures isotopiques du méthane (série I1, I2 et I3) se situe en dessous de -60 ‰ pendant toute la durée des incubations, ce qui semble indiquer que la production de méthane est associée à la réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe *via* une OSA. Cependant, des différences entre la série I1 et les séries I2 et I3 peuvent être notées. En effet, la signature isotopique du méthane produit dans les incubations I2-1 et I3-1 située initialement aux alentours de -100 ‰ augmente légèrement pendant l'incubation pour atteindre environ -88 ‰. Une augmentation (de -26 ‰ à 0 ‰) est également mesurée pour la signature isotopique du dioxyde de carbone. L'évolution de la signature isotopique de l'incubation I1-1 est plus importante puisqu'elle passe de -95 ‰ à -60 ‰ environ (limite haute pour la méthanogenèse hydrogénotrophe) en fin d'incubation. Inversement, l'augmentation du $\delta^{13}\text{CO}_2$ est moins importante pour cette incubation (-26 ‰ à -8 ‰).

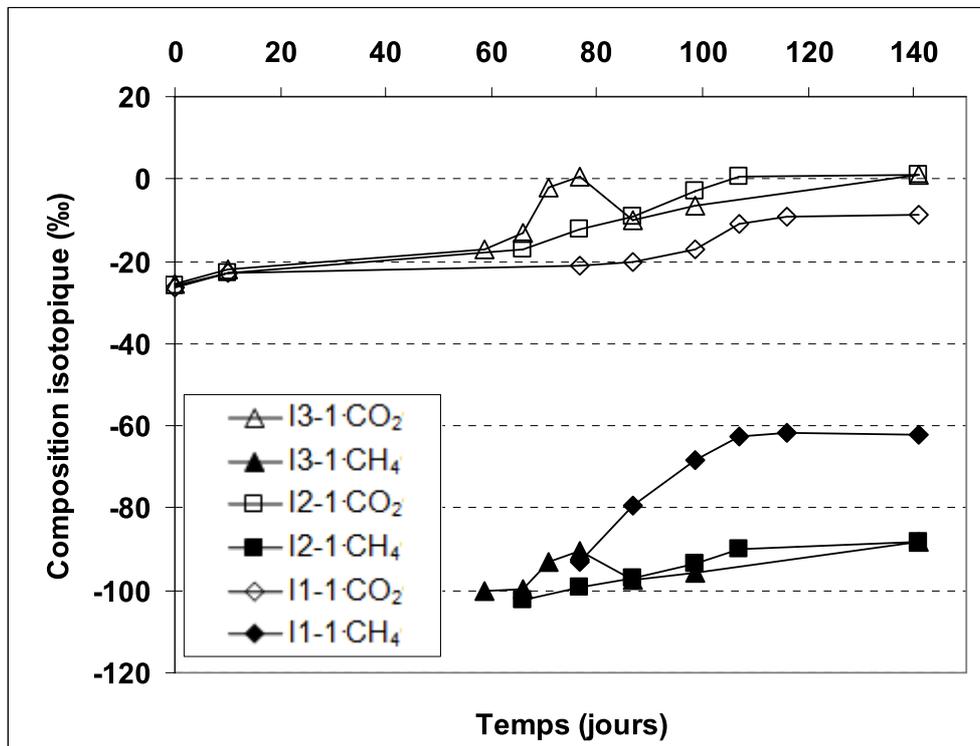


Figure 99 : Composition isotopique du CH₄ et du CO₂ dans les incubations I1-1, I2-1 et I3-1.

3.2.2.2.2. Approche isotopique marquée

L'enrichissement isotopique du méthane a été mesuré pour les incubations réalisées avec de l'acétate marqué uniquement sur le groupement méthyle. La Figure 100 représente l'évolution du pourcentage de ¹³C dans le méthane et le dioxyde de carbone en fonction du temps dans les incubations I1-2, I2-2 et I3-2.

Rappelons que l'utilisation d'acétate enrichi uniquement sur le groupement méthyle permet d'identifier le mécanisme à la base de la production du méthane. En effet :

- Si le méthane est produit par une réaction de méthanogenèse acétoclaste, c'est le groupement méthyle qui est transformé en CH₄ et le groupement carbonyle qui est transformé en CO₂. Ainsi, le méthane devrait être enrichi à 100 % en carbone 13 et le dioxyde de carbone ne devrait pas l'être ;
- Si le méthane est produit à partir de l'acétate par une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate (OSA), l'oxydation de l'acétate va produire deux molécules de dioxyde de carbone (dont une enrichie). Si les produits de la réaction d'oxydation (CO₂ et H₂) sont dilués dans le milieu d'incubation avant d'être consommés par méthanogenèse hydrogénotrophe, l'enrichissement du méthane sera proche de celui du dioxyde de carbone du milieu, car c'est ce dernier qui sera utilisé lors de la réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe. Dans nos expériences, la dilution dans le milieu d'incubation qui contient une importante quantité de carbonates devrait conduire à un enrichissement du méthane et du dioxyde de carbone nettement inférieur à 50 % ;

- Enfin, le dernier cas de figure envisageable est une réaction d'oxydation de l'acétate qui produit, comme précédemment, deux molécules de dioxyde de carbone (dont une enrichie), mais avec une réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe survenant avant la dilution des molécules de dioxyde de carbone dans le milieu. Dans ce cas, l'enrichissement attendu du méthane produit serait d'environ 50 % et celui du dioxyde de carbone inférieur à 50 % (du fait de la dilution dans le milieu de la part non utilisée du CO₂ lors de la méthanogenèse hydrogénotrophe).

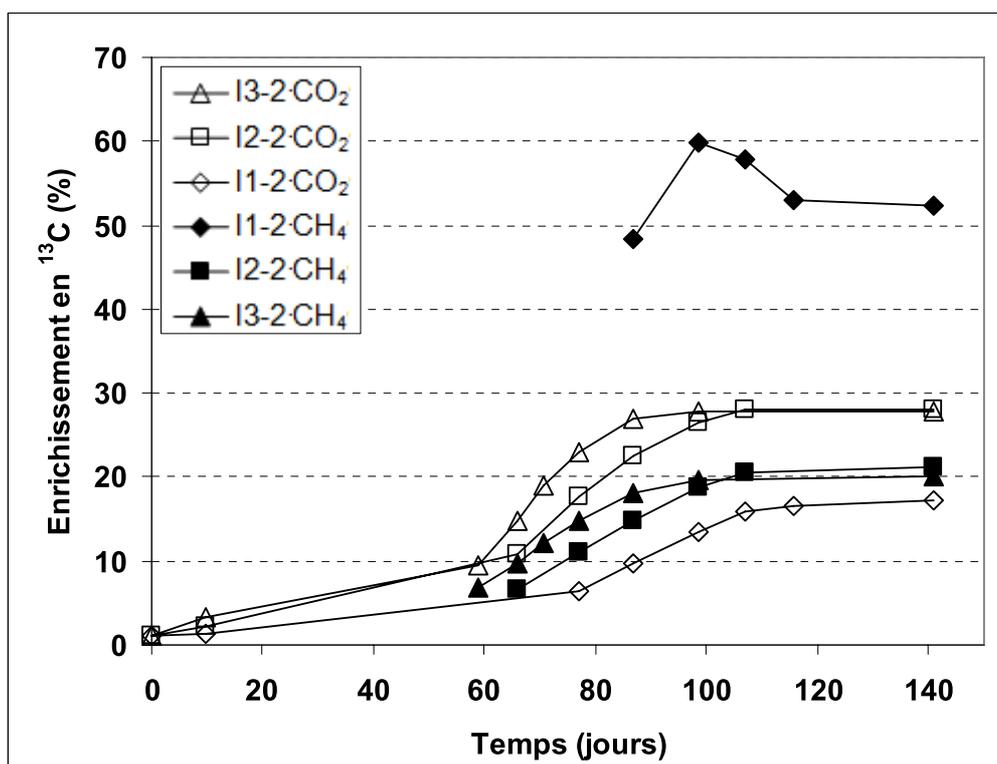


Figure 100 : Enrichissement isotopique en ¹³C du CH₄ et du CO₂ dans les incubations I1-2, I2-2 et I3-2.

Il est tout d'abord à noter pour ces trois incubations qu'aucun enrichissement égal ou proche de 100 % pour le méthane n'est mesuré. Ainsi, dans aucune de ces incubations le méthane n'est produit exclusivement par la voie métabolique acétoclaste. Ceci implique donc que la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate participe à la production de méthane dans l'ensemble des incubations. Cependant, alors que des évolutions d'enrichissement isotopique similaires sont observées pour I2 et I3 elles diffèrent pour l'incubation I1. Ces différences peuvent s'expliquer soit par la mise en place conjointe des métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe en proportions distinctes ou par la mise en place de différents types de réaction d'OSA (avec et sans dilution). Nous reviendrons sur ce point dans la partie discussion.

3.2.2.3. PCR-ARISA

La diversité microbienne au sein de chaque incubation est analysée par PCR-ARISA (cf. Figure 101) sur trois points de prélèvement situés avant, au milieu et en fin de production.

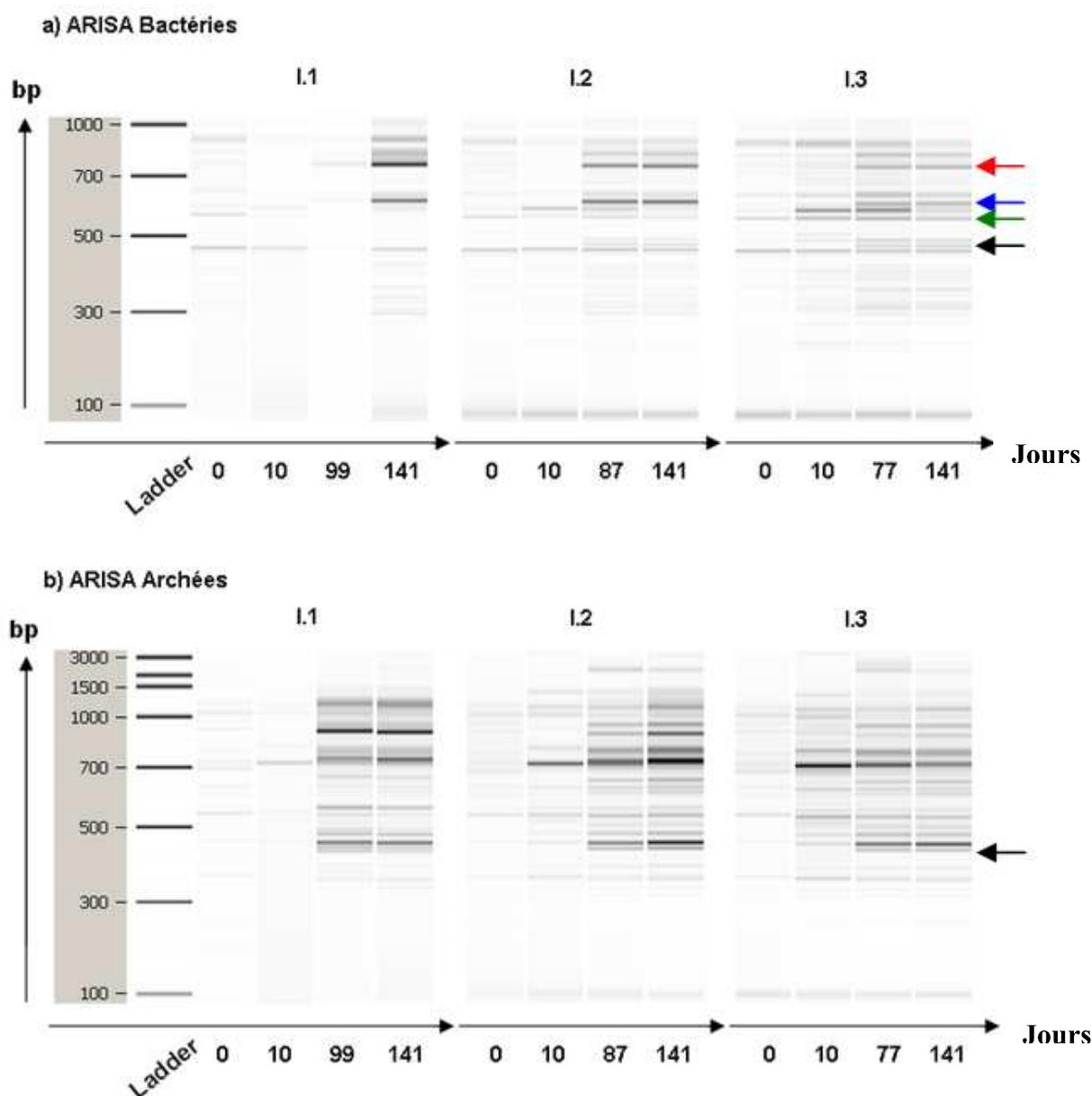


Figure 101 : ARISA archées et bactéries des incubations I1 à I3.

Les profils ARISA des bactéries mettent en évidence que la plupart des bandes présentes dans l'inoculum au cours des incubations (point 0) sont conservées. Toutefois, l'apparition de nouvelles bandes (comme la bande à 608-617 (celle avec la flèche bleue) qui apparaît dans l'ensemble des incubations ou celle à 459-468 (celle avec la flèche noire) qui n'est présente que dans les incubations I2 et I3) ainsi que l'intensification de certaines d'entre elles (bandes à 751-768 (celle en rouge)) montrent que des modifications des populations bactériennes surviennent dans chacune des incubations. Il est à noter que les profils ARISA bactéries des incubations I2 et I3 apparaissent très proches lors de la production de méthane alors que celui observé dans l'incubation I1 se différencie légèrement (absence des bandes 558-563 et 459-468 (flèche verte et noire)).

En ce qui concerne l'évolution des profils ARISA des archées, une différenciation et une intensification des bandes est également observable pour l'ensemble des incubations en comparaison de l'inoculum (temps 0). Entre les incubations elles mêmes quelques bandes peuvent être retrouvées systématiquement (454-459, 479-484, 564-565, 709-755, 785-814 et

887-914 pb). Cependant, comme pour les profils bactéries, les profils archées des incubations I2 et I3 sont relativement proches et se différencient de celui de l'incubation I1. En effet, une bande apparaît à la taille 946-955 pb dans l'incubation I1 et s'intensifie fortement. D'autre part une bande apparaît à 435-439 (flèche noire) uniquement dans l'incubation I1.

3.2.2.4. Clonage –Séquençage

Une image des résultats du séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S archée et bactérie est présentée en Figure 102 pour I1 et en Figure 103 pour I3. Les résultats montrent que pour les incubations I1 et I3, au sein de la banque de clone, on trouve une majorité de micro-organismes appartenant aux mêmes *Phyla* : *Firmicutes* et *Proteobacteria*.

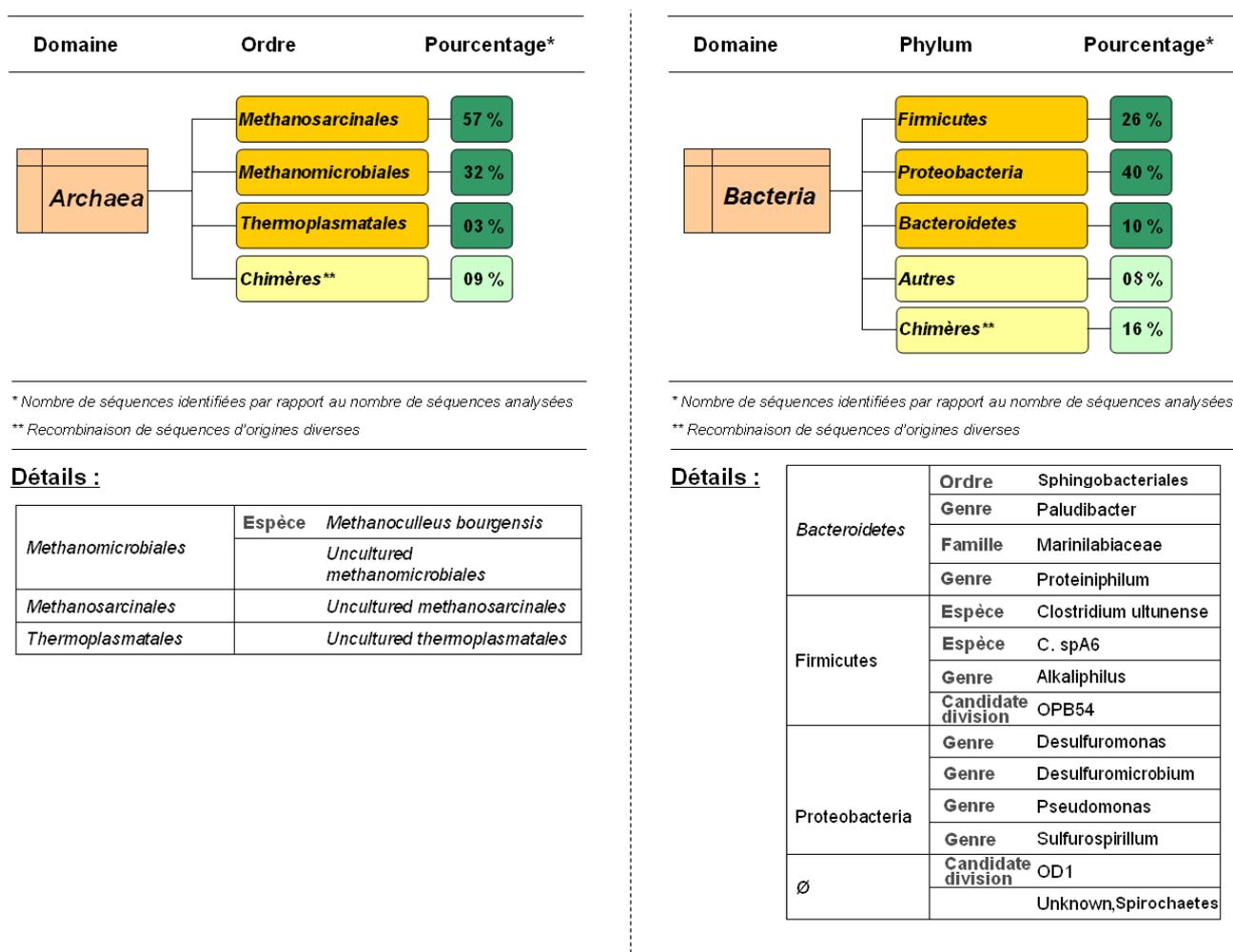


Figure 102 : Résultats du clonage/séquençage des archées et des bactéries pour I1-1 au jour 99 obtenus par analyses phylogénétiques (69 clones archées et 81 clones bactéries séquencés).

Pour la communauté archées, les genres *Methanosarcina* et *Methanoculleus* sont retrouvés dans l'incubation I1 avec une nette dominance des *Methanosarcina*, alors qu'il n'y a que des membres de la famille des *Methanoculleus* essentiellement représentés par *Methanoculleus bourgensis* pour l'incubation I3. Il est à noter que *Methanoculleus bourgensis* fait également partie des archées retrouvées dans l'incubation I1.

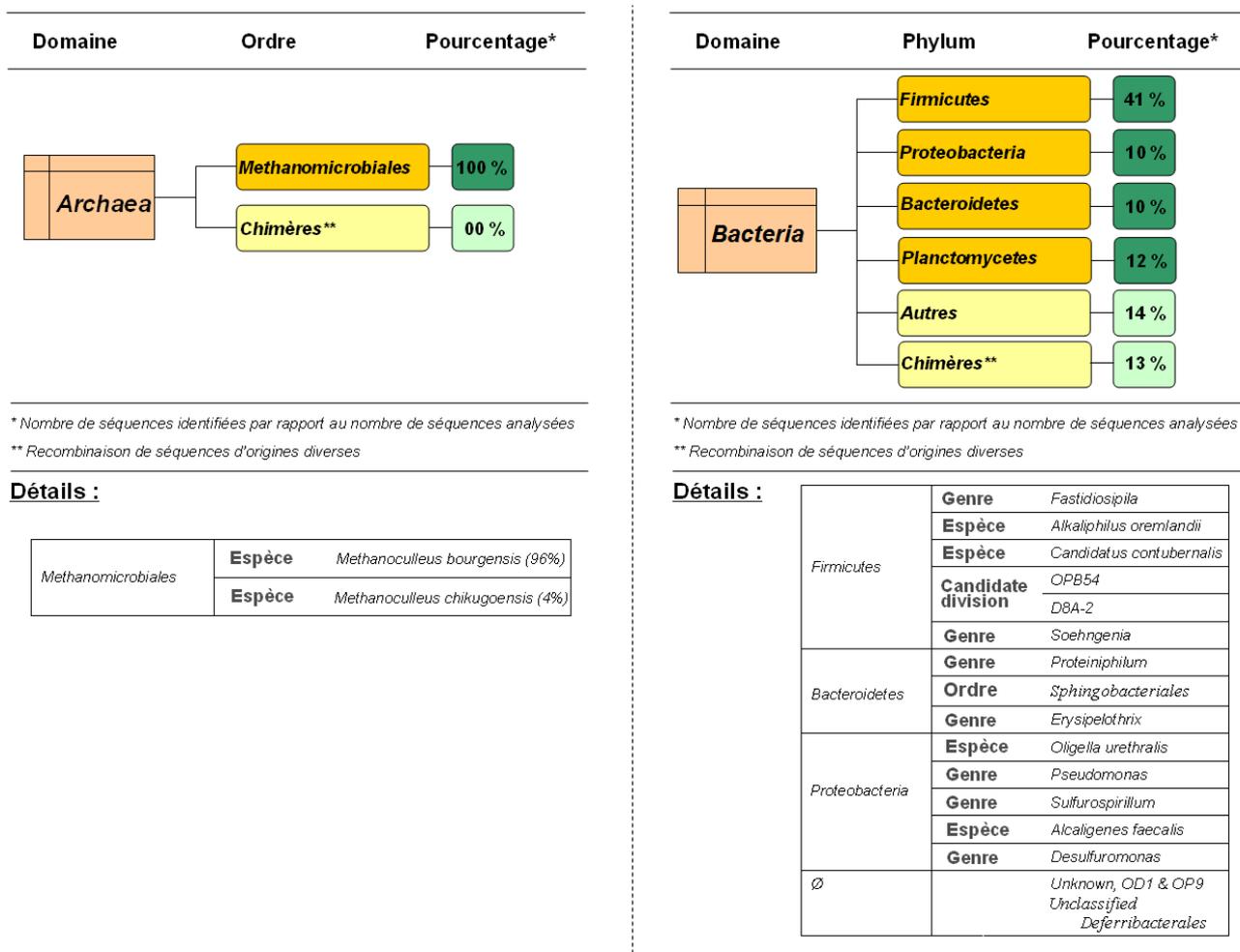


Figure 103 : Résultats du clonage/séquencage des archées et des bactéries pour I3-1 au jour 77 obtenus par analyses phylogénétiques (27 clones archées et 91 clones bactéries séquencés).

3.2.2.5. Hybridation in situ (FISH)

Des hybridations FISH ont été réalisées afin d'identifier les micro-organismes présents dans les différentes incubations. L'utilisation d'une sonde généraliste du domaine *Archaea* (ARC915) a permis de mettre en évidence des populations de morphologies différentes pour I1, I2 et I3. Ainsi, au sein de l'incubation I1, la présence de clusters formés par des membres de la famille *Methanosarcinaceae* (identifiés à l'aide de la sonde MS1414, Figure 104, A et B) a été mise en évidence alors que dans les incubations I2 et I3, la communauté d'archées est uniquement constituée par des petites coques identifiées comme faisant partie de l'ordre *Methanomicrobiales* (hybridées par la sonde MG1200b, Figure 104, D). Il est à noter que des observations réalisées sur des échantillons de l'incubation I1, à l'aide de la sonde spécifique de l'ordre *Methanomicrobiales*, semblent en révéler la présence en faibles proportions comme l'illustre la Figure 104, C (cohybridation des signaux vert et bleu qui donnent une couleur turquoise). La présence de bactéries proches des archées a également été mise en évidence grâce à la sonde généraliste EUB338 dans les différentes incubations, (cf. Figure 104, A et B pour I1 et C pour I3).

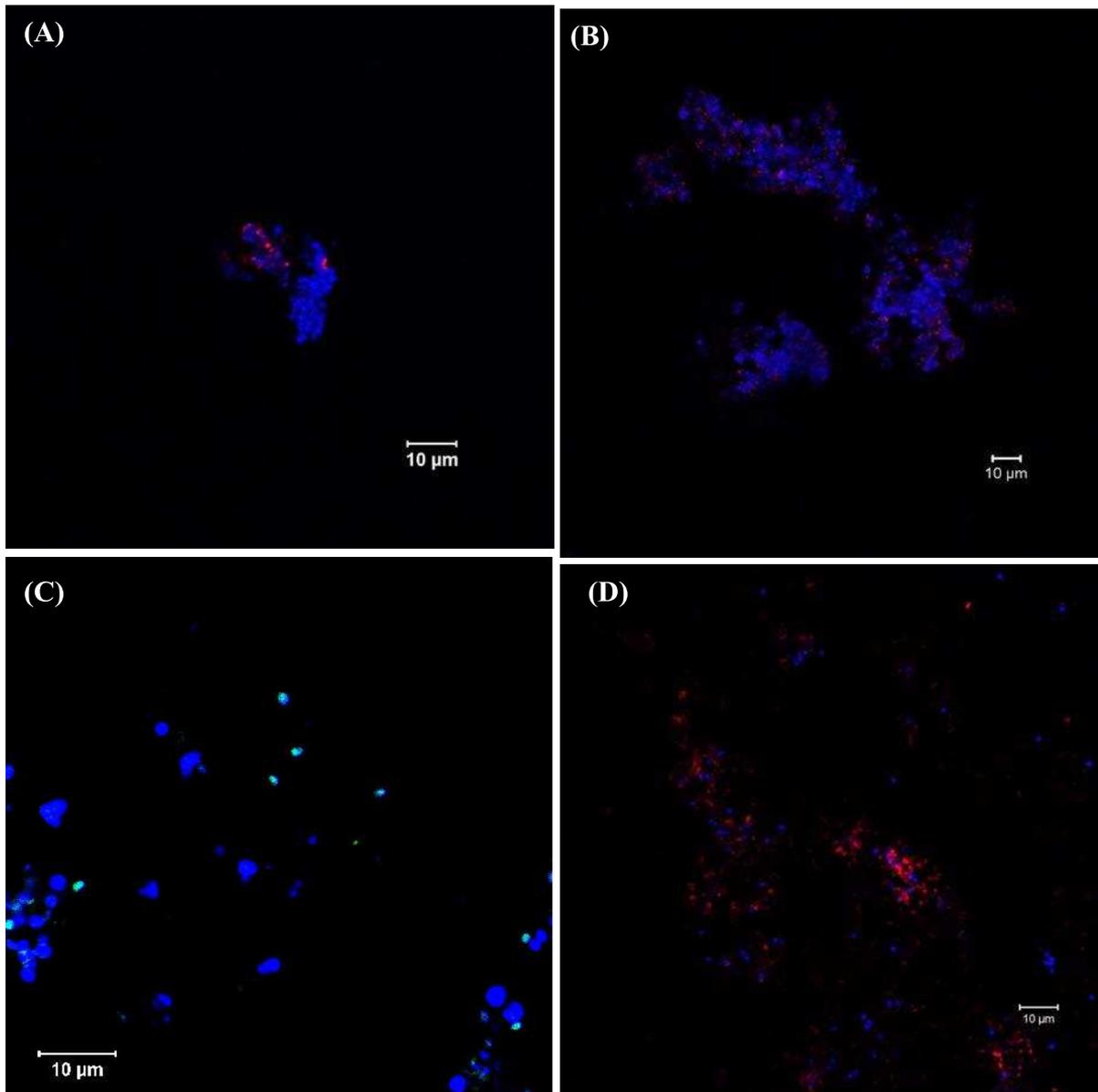


Figure 104 : Observations FISH

- A* : I1-1, 4,5 g.L⁻¹ de NH₄⁺ au jour 87, Sondes MS1414+ helper-Cy5 (bleu), EUB I-Cy3 (rouge) ;
B : I1-1, 4,5 g.L⁻¹ de NH₄⁺ au jour 141, Sondes MS1414+ helper-Cy5 (bleu), EUB I-Cy3 (rouge) ;
C : I1-1, 4,5 g.L⁻¹ de NH₄⁺ au jour 99, Sondes ARC915 Cy5 (bleu), MG1200b-FITC + proteinase k (vert) ;
D : I3-1, 4,5 g.L⁻¹ de NH₄⁺ au jour 77, Sondes MG1200b-Cy5 (bleu), EUB I-Cy3 (rouge).

3.2.3. Interprétation et discussion des résultats

3.2.3.1. Métabolisme et population microbienne à l'origine de la production de méthane

Comme indiqué dans la présentation des résultats, deux cas bien distincts ont été observés, d'une part pour les incubations à faible concentration en inoculum (série I1) et d'autre part pour les incubations aux plus hautes concentrations en inoculum (séries I2 et I3), tant au niveau des micro-organismes présents que des voies métaboliques utilisées lors de la production de méthane. Les résultats obtenus pour chacune de ces situations sont discutés dans un premier temps séparément dans la suite de ce paragraphe.

3.2.3.1.1. Séries I2 et I3

Pour les incubations I2-1 et I3-1, les signatures isotopiques sont clairement caractéristiques d'une production de méthane par voie hydrogénotrophe puisqu'elles se situent initialement à -100 ‰ puis remontent légèrement jusque -88 ‰. La signature isotopique du dioxyde de carbone connaît également une augmentation d'amplitude similaire (de -26 ‰ à -8 ‰). Ces évolutions parallèles du $\delta^{13}\text{CH}_4$ et du $\delta^{13}\text{CO}_2$ sont en accord avec le fait qu'une méthanogenèse hydrogénotrophe se met en place car cela traduit le fait que le CO_2 est le substrat à l'origine du méthane produit dans ces incubations. Les résultats du clonage/séquençage et les observations FISH pour l'incubation I3 sont également en accord avec la mise en évidence d'un tel métabolisme. En effet, les archées séquencées appartiennent à la famille des *Methanomicrobiaceae* et très majoritairement à l'espèce *Methanoculleus bourgensis* qui sont des méthanogènes hydrogénotrophes stricts. Enfin, les observations FISH confirment la présence de membres de cette famille uniquement (cohybridation de la sonde MG1200b et ARC915 à 100 %) et que ces derniers sont actifs durant ces incubations puisqu'ils sont nettement observables à l'aide de cette technique.

Alors que l'interprétation des résultats issus des analyses isotopiques naturelles et des analyses microbiologiques nous permet de conclure sur le métabolisme utilisé dans les incubations I2 et I3 pour produire le méthane, les résultats des incubations avec acétate enrichi sur le groupement méthyle, en plus de confirmer ces interprétations, apportent un complément d'information permettant d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes mis en jeu.

Les évolutions du pourcentage d'enrichissement du méthane et du dioxyde de carbone sont globalement identiques entre les incubations I2-2 et I3-2. Le dioxyde de carbone s'enrichit progressivement pour atteindre, en fin d'incubation, un enrichissement d'environ 28 % de carbone 13. L'enrichissement du méthane, quant à lui, augmente également progressivement pour atteindre, en fin d'incubation, un enrichissement d'environ 21 % de carbone 13. Le fait que les valeurs d'enrichissement du CO_2 et du CH_4 soient proches et largement inférieures à 50 % semble indiquer que les incubations des séries I2 et I3 correspondent au cas de figure d'une oxydation syntrophique de l'acétate avec dilution des produits de l'oxydation de l'acétate (H_2 et CO_2) dans le milieu riche en carbonates avant leurs utilisations pour la méthanogenèse hydrogénotrophe. Par ailleurs, les enrichissements du méthane et du dioxyde de carbone qui suivent les mêmes tendances semblent confirmer que le CO_2 est bien le substrat de la réaction qui produit le méthane. En fin d'incubation, un écart d'enrichissement d'environ 7 % est cependant mesuré entre le dioxyde de carbone et le méthane, alors qu'un enrichissement identique était attendu dans le cas d'une OSA avec dilution des produits de l'oxydation avant la méthanogenèse hydrogénotrophe.

Le méthane produit à chaque instant t , présente un enrichissement identique à celui du dioxyde de carbone utilisé comme substrat. Cependant, le méthane produit à l'instant donné $t+1$ se dilue dans le méthane préalablement produit à partir de dioxyde de carbone présentant un enrichissement plus faible (car, à ce moment, le nombre de molécules d'acétate oxydées, constituant la source en ^{13}C dont le CO_2 est issu était moins important). La Figure 105 illustre ce principe qui, en survenant à chaque instant, aboutit, en fin d'incubation, à un écart non négligeable entre les valeurs d'enrichissement du CO_2 et du CH_4 . La courbe présentée en Figure 105 représente les résultats d'une modélisation simplifiée de la production de méthane à partir d'acétate enrichi uniquement sur le groupement méthyle. La réaction modélisée est une réaction d'oxydation de l'acétate avec dilution des produits de l'oxydation dans le stock de carbonates. Cette première réaction est immédiatement suivie d'une réaction de

méthanogenèse hydrogénotrophe. Les paramètres utilisés pour la réalisation de la modélisation sont donnés dans le Tableau 42. L'oxydation de l'acétate dans le modèle se fait par pas de 10 %, ce qui explique le démarrage de la courbe de méthane à 10 % d'acétate consommé. Les courbes obtenues semblent confirmer que, dans nos conditions expérimentales, l'écart semble pouvoir s'expliquer par le phénomène de dilution évoqué précédemment et être indépendant d'un phénomène de fractionnement isotopique entre le méthane et le dioxyde de carbone.

Tableau 42 : Paramètres utilisés pour réaliser la modélisation simplifiée de la réaction d'OSA des séries d'incubations I2 et I3.

Volume de liquide	149,00	<i>mL</i>
Concentration de NaHCO ₃ initiale	0,14	<i>mol.L⁻¹</i>
Concentration d'acétate initiale (100 % de ¹³ C sur le groupement méthyle)	3,00	<i>g.L⁻¹</i>
Nombre de moles HCO ₃ initial	0,02086	<i>moles</i>
Nombre de moles d'acétate initial	0,00745	<i>moles</i>
Nombre de moles initial HCO ₃ après ajout de l'acétate	2,97914	<i>moles</i>
Pas de temps modélisé (en % d'acétate oxydé)	10	<i>%</i>

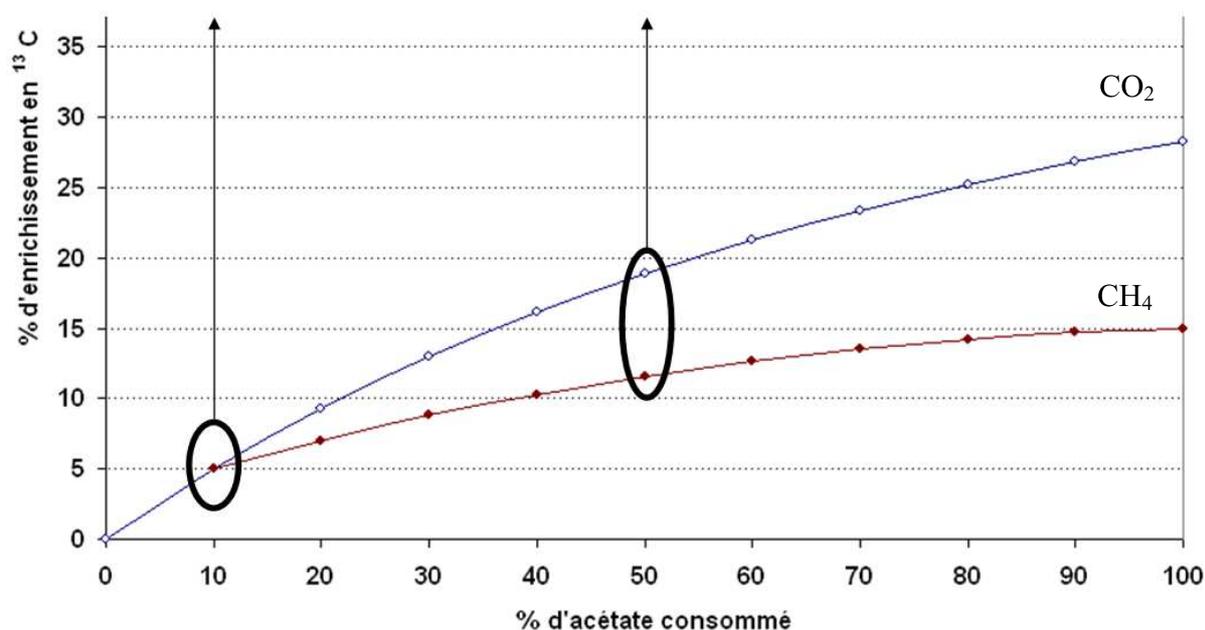
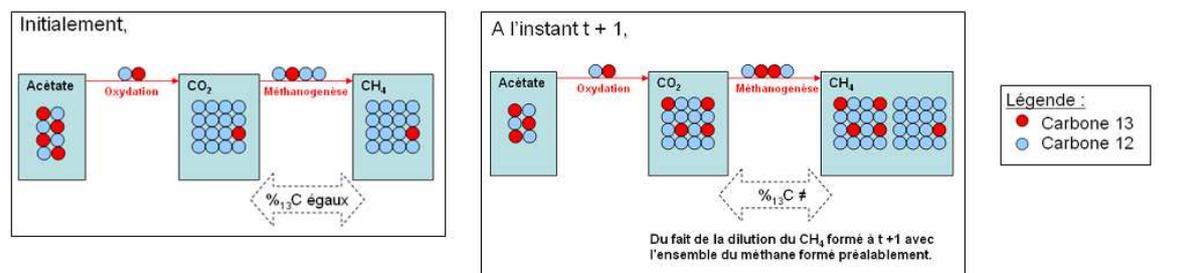


Figure 105 : Modélisation de la réaction d'OSA des séries d'incubations I2 et I3.

L'ensemble des résultats obtenus pour les séries d'incubations I2 et I3 s'accordent avec la mise en place d'une réaction d'OSA avec dilution des produits de l'oxydation dans le milieu. La réaction d'OSA étant peu documentée à ce jour, il est intéressant d'essayer d'identifier les micro-organismes impliqués dans cette réaction lors de nos incubations.

Dans la bibliographie, cinq associations syntrophiques entre une bactérie et une archées ont pu être mises en évidence (cf. Chapitre 2, § 1.1.3.3.2 Micro-organismes impliqués) dont uniquement une en conditions mésophiles (*Clostridium ultunense*/*Methanoculleus sp.* (Schnurer, Schink et al. 1996; Schnurer, Zellner et al. 1999)). Une bactérie capable de réaliser l'oxydation de l'acétate en conditions mésophiles a également été mise en évidence récemment : *Syntrophaceticus schinkii sp.* (Westerholm, Roos et al. 2010). Par ailleurs, ces micro-organismes (*Clostridium ultunense*/*Methanoculleus sp.* et *Syntrophaceticus schinkii sp.*) sont issus de réacteurs opérant en conditions mésophiles et à fortes concentrations en azote ammoniacal, ce qui correspond à nos conditions expérimentales. La capacité à oxyder l'acétate a également été mise en évidence chez certaines bactéries du phylum *Proteobacteria*, notamment chez deux espèces appartenant au genre des *Desulphuromonas* (*Desulphuromonas acetexigens* et *Desulphuromonas acetoxidans*) (Pfennig et Biebl 1976; Finster, Bak et al. 1994), chez une espèce du genre *Desulfomicrobium* (Zhao, Ren et al. 2008) et également chez une bactérie du phylum *Firmicutes* : *Candidatus Contubernalis alkalaceticum* (Zhilina, Zavarzina et al. 2005).

La majorité des bactéries issues des résultats du clonage/séquençage de l'incubation I3-1 appartiennent au phylum des *Firmicutes*, ce qui correspond aux bactéries généralement identifiées dans les écosystèmes au sein desquels la réaction d'OSA se met en place (cf. Chapitre 2, § 1.1.3.3.2 Micro-organismes impliqués). Cependant, des bactéries du genre *Desulphuromonas* ont également été séquencées. L'identification formelle des bactéries qui réalisent l'oxydation de l'acétate dans nos incubations n'est pas possible sans analyses plus poussées à l'aide de la technique stable isotope probing (SIP) notamment. Cependant, il est possible d'avancer l'hypothèse que celles-ci fassent partie des *Firmicutes* identifiés dans les résultats du séquençage comme *Candidatus Contubernalis alkalaceticum* ou bien appartiennent au genre *Desulphuromonas* (phylum *Proteobacteria*) également mis en évidence dans nos incubations.

En ce qui concerne les archées, dans l'incubation I3-1, les observations FISH et le clonage/séquençage ont mis en évidence uniquement la présence de coques irrégulières appartenant à des membres de la famille *Methanomicrobiaceae* proches de *Methanoculleus bourgensis*. Cette archée capable de réaliser la méthanogenèse hydrogénotrophe, et donc potentiellement de participer à l'OSA, est du même genre que celle déjà mise en évidence lors de réaction d'OSA à forte concentration d'azote ammoniacal (Schnurer, Zellner et al. 1999). Ainsi, l'ensemble des éléments disponibles pour les incubations (I2 et I3) laisse penser que les archées du genre *Methanoculleus* sont impliquées dans la réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe constituant l'étape finale de la réaction d'OSA.

3.2.3.1.2. Série I1

L'interprétation des données est plus complexe dans le cas des incubations de la série I1. En effet, alors que la signature isotopique du méthane produit initialement dans l'incubation naturelle est bien caractéristique d'un métabolisme de type hydrogénotrophe (démarrage à -90 ‰), le $\delta^{13}\text{CH}_4$ augmente ensuite de façon plus importante que dans les incubations I2-1 et I3-1 jusqu'à atteindre -60 ‰ en fin d'incubation ce qui correspond à la limite basse du méthane produit par méthanogenèse acétoclaste. L'analyse des résultats pour cette incubation est ainsi plus délicate que pour les incubations I2-1 et I3-1 car il n'est pas possible d'exclure qu'une partie du méthane soit produit par méthanogenèse acétoclaste au cours de cette incubation.

En effet, différentes hypothèses sont envisageables pour expliquer l'évolution de la signature isotopique du méthane observée :

- La première est que le méthane produit lors de cette incubation résulte d'un mélange de méthane d'origine métabolique hydrogénotrophe *via* OSA et acétoclaste). Le méthane initialement produit par méthanogenèse hydrogénotrophe *via* une OSA serait par la suite progressivement produit également par méthanogenèse acétoclaste.
- La seconde est que la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate qui se met en place lors de cette série d'incubations diffère de celle se déroulant dans les séries d'incubations I2 et I3. En effet, si une "OSA sans dilution" des produits d'oxydation de l'acétate avant méthanogenèse hydrogénotrophe se produit, l'augmentation de la composition isotopique du méthane pourrait simplement traduire l'enrichissement isotopique de l'acétate et donc du CO₂ produit lors de la réaction d'oxydation de l'acétate au cours de l'incubation (cas d'un milieu clos). Ce fractionnement isotopique lors de l'oxydation de l'acétate qui se produit aussi certainement lors des incubations I2 et I3 conduirait alors à un enrichissement isotopique du méthane plus important dans I1 du fait de l'absence de dilution du CO₂ produit avec les carbonates du milieu avant méthanogenèse hydrogénotrophe. Ainsi contrairement au cas des incubations I2 et I3 où il apparaît très clairement que la composition isotopique du méthane suit parfaitement celle du CO₂, le CO₂ présent dans le milieu n'étant pas celui consommé lors de la méthanogenèse hydrogénotrophe, la composition isotopique apparente du CH₄ et du CO₂ pourraient apparaître comme décorélées. Si cette hypothèse était vérifiée, le fait que la composition isotopique du CO₂ augmente moins dans le cas de l'incubation I1 pourrait alors s'expliquer par la quantité moins importante de CO₂ enrichi libéré lors de l'oxydation de l'acétate qui se dilue avec les carbonates (car transformé en méthane).

L'étude des résultats de l'incubation réalisée avec de l'acétate marqué sur le groupement méthyle apporte des informations complémentaires permettant d'évaluer les hypothèses émises à partir des résultats obtenus pour l'incubation naturelle. Tout d'abord, le fait que la valeur initiale de l'enrichissement en ¹³C du méthane soit proche de 50 % (jour 87, 48,33 % d'enrichissement) suggère qu'une oxydation syntrophique de l'acétate, avec consommation des produits de l'oxydation (H₂ et CO₂) avant leur dilution avec les carbonates, se met en place initialement. Le fait qu'une signature isotopique caractéristique de la méthanogenèse hydrogénotrophe (jour 87, -79,15 ‰) soit observée au même jour dans l'incubation naturelle, en écartant la possibilité qu'un mélange de métabolisme hydrogénotrophe et acétoclaste puisse conduire à cet enrichissement, accrédite clairement l'hypothèse selon laquelle le méthane puisse être produit initialement par une réaction d'OSA, sans dilution des produits de l'oxydation avant la réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe.

Cependant, dans l'incubation marquée, l'enrichissement en ¹³C du méthane atteint ensuite une valeur proche de 60 % avant de se stabiliser à nouveau vers 50 %. Le fait que des valeurs transitoires d'enrichissement en ¹³C du méthane supérieures à 50 % aient été observées conforte quant à lui l'hypothèse d'une contribution du métabolisme acétoclaste dans la production du méthane. Dans ce cas et en considérant que l'OSA se poursuive sans dilution des produits d'oxydation dans le milieu comme observé initialement, la proportion du métabolisme acétoclaste serait au maximum de 20 %. En effet, le pourcentage de carbone 13 du méthane produit par OSA étant de 50 % et celui par voie acétoclaste de 100 %, l'obtention d'un pourcentage de 60 % correspondrait à un mélange de 20 % d'acétoclaste et de 80 % d'OSA sans tenir compte des phénomènes de dilution dans le méthane préalablement produit.

Il est à noter, d'autre part, que l'enrichissement du dioxyde de carbone dans I1-2 est quant à lui inférieur à celui des incubations I2-2 et I3-2 d'environ 10 %. Ce résultat qui pourrait apparaître comme étant le reflet de la mise en place d'un métabolisme acétoclaste dans l'incubation I1-2, ne permet cependant pas de trancher entre les deux hypothèses émises initialement. En effet, il peut également tout à fait s'expliquer par la mise en place d'une OSA sans dilution des produits d'oxydation car dans ce cas de figure une quantité plus importante d'atomes de carbone marqués aurait été libérée sous forme de méthane (qui n'apparaît donc pas sous la forme de CO₂) lors de l'OSA du fait de l'absence de dilution.

Il est également intéressant de mettre en parallèle les résultats de la série I1 avec ceux obtenus à la même concentration en azote ammoniacal pour la série C4, présentés dans la partie précédente (cf. Chapitre 4, § 3.1 Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la dégradation de l'acétate en conditions mésophiles). En effet, les évolutions des signatures isotopiques du méthane et du dioxyde de carbone des incubations naturelles et de leurs enrichissements isotopiques observés dans les incubations marquées sont identiques pour ces deux séries d'incubation bien qu'elles aient été réalisées avec des inocula légèrement différents (Pour la série C4 l'inoculum avait été préalablement acclimaté à la consommation de l'acétate). Le fait que des évolutions des enrichissements en ¹³C identiques pour I1-2 et C4-3 aient été observées (augmentation de 50 % à 60 % avant de se stabiliser ensuite à 50 %) semblent conforter l'hypothèse de la mise en place d'une réaction d'OSA sans dilution des produits de l'oxydation, plutôt que celle d'un mélange de méthanogenèses acétoclaste et hydrogénotrophe (*via* OSA) car cela signifierait que les proportions des différents métabolismes se sont établies de manière absolument identique dans les deux séries d'incubations ce qui est peu probable.

L'obtention d'un enrichissement isotopique supérieur à 50 % reste cependant difficilement explicable dans ce cas de figure. L'une des hypothèses pouvant être avancée concerne les échanges isotopiques pouvant survenir entre le CO₂ enrichi du milieu et le groupement carbonyle de l'acétate entraînant ainsi un enrichissement de l'acétate supérieur à 50 % car il ne serait plus marqué uniquement sur le groupement méthyle. Ce phénomène a déjà été observé par Penning et *al.* (Penning, Tyler et *al.* 2006d). Le CO₂ résultant de l'oxydation serait lui-même enrichi à plus de 50 % expliquant ainsi pourquoi du méthane présentant un enrichissement supérieur à 50 % pourrait être observé. Les mesures de l'enrichissement isotopique de l'acétate réalisées au cours de ces incubations n'ont montré aucun enrichissement de l'acétate supérieur à 50 % écartant ainsi cette hypothèse.

L'ensemble de ces observations est cohérent avec le fait qu'une production initiale de méthane par voie hydrogénotrophe à la suite d'une réaction d'oxydation de l'acétate différente de celle qui a lieu dans les incubations I2 et I3 se met en place. En effet dans les incubations I1, une fois l'acétate oxydé, une des molécules de dioxyde de carbone est probablement utilisée avant sa dilution dans le milieu carbonaté, pour produire le méthane par la voie hydrogénotrophe. La valeur théorique du méthane ainsi produit est de 50 %, ce qui correspond aux valeurs initiales mesurées dans nos incubations. Cependant, il n'est pas possible, en utilisant uniquement les données isotopiques, d'exclure ensuite la participation à la production de méthane de la méthanogenèse acétoclaste ou d'une réaction d'OSA avec dilution des produits d'oxydation dans le milieu.

Différentes analyses microbiologiques ont été réalisées afin d'essayer d'identifier les micro-organismes à l'origine de la réaction d'OSA et d'apporter des éléments permettant de confronter les différentes hypothèses avancées à partir du suivi isotopique réalisé.

Les profils ARISA mettent en évidence des évolutions différentes des populations d'archées entre les incubations I1 et I2/I3. Les hybridations FISH réalisées sur les incubations I1 et I3 confirment que les populations de micro-organismes actives sont belles et bien différentes. En effet, dans les incubations I1 les archées dominantes observées appartiennent à la famille *Methanosarcinaceae* (sonde MS1414) (alors que dans les incubations I3, elles appartenaient à l'ordre des *Methanomicrobiales* (sonde MG1200b)). Enfin, les résultats obtenus par le clonage/séquençage sont en accord avec ceux obtenus par les observations FISH, car les archées dominantes sont bien les membres de la famille *Methanosarcinaceae*. Cependant, des *Methanoculleus* et des *Thermoplasmatales* ont également été séquencés.

Les observations FISH et le clonage séquençage réalisés pour l'échantillon I1 semblent donc confirmer que des membres de la famille *Methanosarcinaceae* puissent être impliqués dans l'oxydation syntrophique de l'acétate, comme nous l'avions déjà observé pour les incubations de la série C4. En effet, ces archées sont observées en FISH au jour 87 alors que le métabolisme est à ce moment là clairement de type hydrogénotrophe.

Dans l'incubation I1, comme dans l'incubation I3, des bactéries sont également observées en FISH à proximité des archées. Le clonage/séquençage réalisé a permis l'identification d'une partie des bactéries présentes. La communauté bactérienne est composée majoritairement de micro-organismes des phyla *Firmicutes* et *Proteobacteria* et, parmi ces dernières, trois types de bactéries connues comme étant capables de réaliser l'oxydation de l'acétate apparaissent : *Clostridium ultunense* (Schnurer, Schink et al. 1996) qui appartient au phylum *Firmicutes* ainsi que *Desulfuromonas* (Pfennig et Biebl 1976; Finster, Bak et al. 1994) et *Desulfomicrobium* (Zhao, Ren et al. 2008) qui appartiennent au phylum *Proteobacteria*.

Ainsi, il apparaît que la différence majeure entre les cas de figure des incubations I1 et I3 et pouvant être à l'origine de l'établissement de voies de production du méthane différentes au sein de ces expériences concerne la présence de membres de la famille *Methanosarcinaceae* dans les incubations I1. Deux hypothèses impliquant cette famille d'archées et pouvant expliquer l'absence de dilution entre l'oxydation de l'acétate et la méthanogenèse hydrogénotrophe dans les incubations I1 peuvent être envisagées.

- La première est une imbrication plus forte entre les bactéries et les archées dans cette incubation que dans I2 et I3. Le dioxyde de carbone n'aurait alors pas la possibilité de se diluer dans le milieu avant d'être consommé par méthanogenèse hydrogénotrophe. Ceci pourrait être lié à l'organisation spatiale entre les membres de la famille *Methanosarcinaceae* qui se regroupent en clusters de taille importante à haute concentration en azote ammoniacal et les bactéries qui apparaissent imbriquées au sein des amas d'archées apparentés aux *Methanosarcina*. Les quelques *Methanoculleus* observés ne semblent pas suffisamment imbriqués au sein des clusters de *Methanosarcinaceae* (cf. Figure 104, C) de manière à pouvoir justifier l'absence de dilution des produits de l'oxydation de l'acétate dans le milieu carbonate en comparaison avec l'organisation observées dans le cas de l'incubation I3.
- La seconde hypothèse est que les membres de la famille *Methanosarcinaceae*, connues pour leur versatilité, soient également capables de réaliser l'oxydation de

l'acétate. Cette possibilité déjà évoquée dans la bibliographie (Lovley et Ferry 1985), permettrait ainsi aux membres de la famille *Methanosarcinaceae* d'oxyder l'acétate et d'en consommer les produits avant passage dans le milieu extracellulaire.

Les observations FISH ne permettant pas de trancher entre ces deux hypothèses pouvant expliquer une consommation directe des produits de la réaction d'oxydation de l'acétate, des analyses complémentaires ont été réalisées afin d'étudier notamment l'arrangement spatial entre bactéries et archées dans les incubations I1 et I3.

3.2.3.2. Arrangement spatial des micro-organismes

Afin de mieux comprendre les mécanismes à la base de la production de méthane par OSA dans les différentes configurations observées au cours de nos incubations, une analyse de l'arrangement spatial des micro-organismes a été réalisée. A partir d'échantillons hybridés en FISH, des images 3D pour les incubations I1 et I3 ont été analysées avec le logiciel Daime. Le but est d'étudier l'arrangement spatial des populations archées et bactéries entre elles afin de savoir s'il y a un lien entre l'arrangement spatial des populations et la nature du métabolisme utilisé pour la dégradation de l'acétate. Cette méthode combine les images 3D obtenues en FISH avec une analyse d'image par la fonction de corrélation de paires.

Pour réaliser cette analyse, les échantillons sont hybridés selon le protocole FISH classique. Une dizaine d'images 3D est réalisée sur différents points de la lame contenant des agrégats biologiques ou flocs au sein desquels on peut distinguer les deux populations de micro-organismes (bactéries et *Methanosarcinaceae* pour I1 et bactéries et *Methanoculleus* pour I3). Par la suite, ces images sont traitées à partir du logiciel Daime (diminution du bruit de fond par la fonction median filter, définition des populations par seuillage) avant d'être analysées sur deux dimensions (x et y) par ce même logiciel. L'arrangement spatial des populations est mesuré grâce à la fonction de corrélation de paires. Cette fonction de corrélation noté $g(r)$ donne la densité moyenne des individus situés à la distance vectorielle r d'un individu considéré (Daims, Lückner et al. 2006). Elle est calculée par rapport à la probabilité $P(r)$ que deux individus soient voisins l'un de l'autre à la distance r , sur la densité de chaque population, pour deux populations distribuées aléatoirement (D_1 : population 1 ; D_2 : population 2). La formule est la suivante :

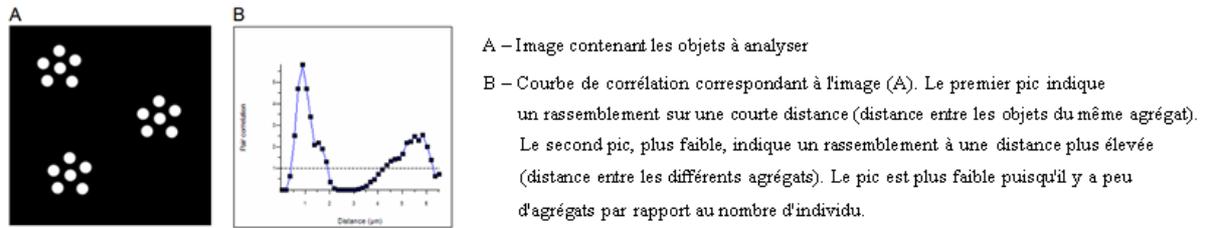
$$g(r) = P(r) / (2D_1D_2)$$

Équation 24

En conséquence, la valeur de $g(r)$ obtenue indique si deux populations sont positivement ou négativement corrélées sur une distance r donnée :

- $g(r) = 1$ si la répartition des populations est aléatoire ;
- $g(r) > 1$ si les micro-organismes ont une répartition de type aggrégative à la distance r (cela signifie que les deux populations s'attirent) ;
- $g(r) < 1$ si les micro-organismes ont une répartition de type répulsive à la distance r (cela signifie que les deux populations tendent à se repousser).

L'analyse est réalisée sur chaque membre de la population considérée et permet d'obtenir un graphique $g(r)$ (cf. Figure 106).



Source : <http://www.microbial-ecology.net/daime/daime-manual.asp>

Figure 106 : Exemple d'analyse de l'arrangement d'image virtuelle.

Les graphiques présentés en Figure 107 représentent la fonction de corrélation de paires (noté $g(r)$) pour les échantillons I1 (graphique A, B et C) et I3 (graphiques D, E et F) en considérant les paires bactéries/bactéries, archées/archées et bactéries/archées.

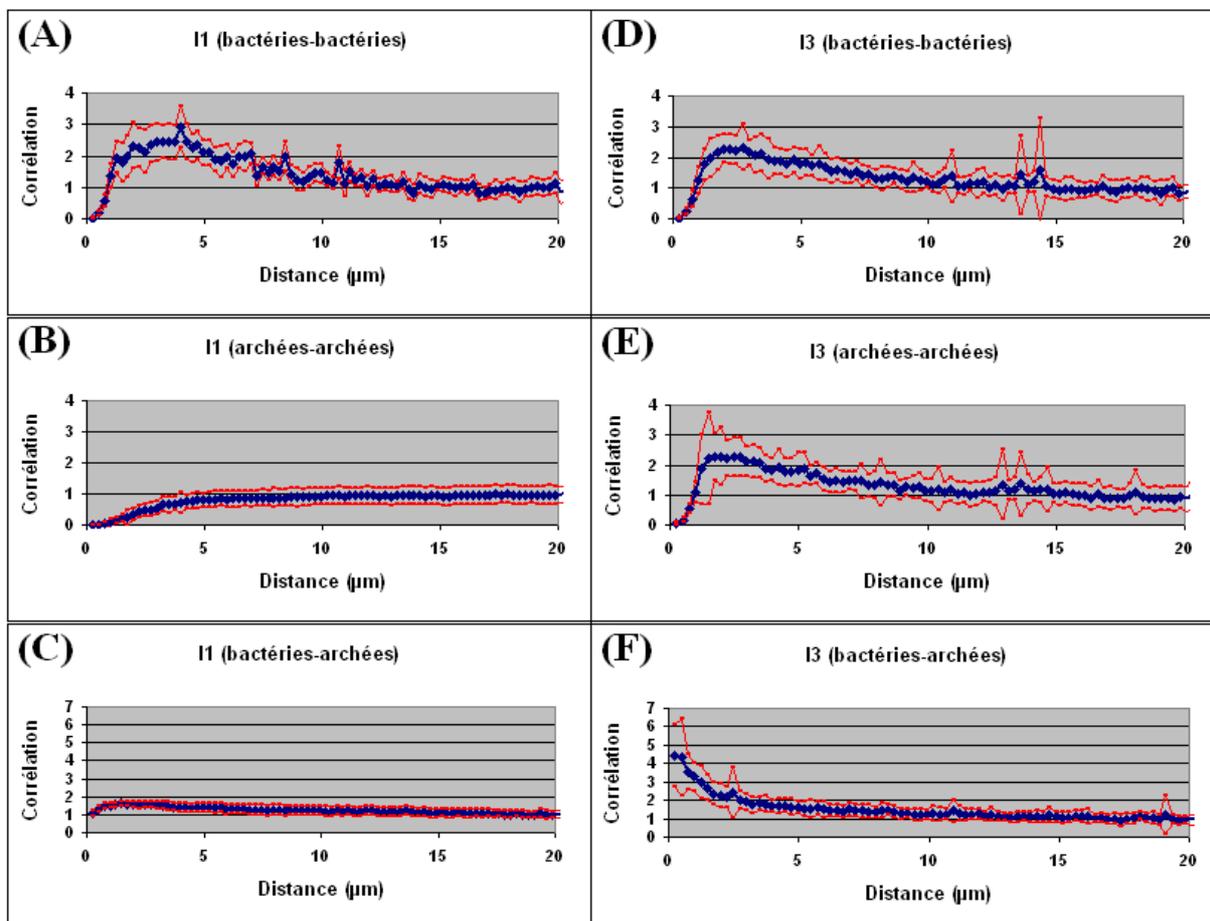


Figure 107 : Résultats des analyses de fonction de corrélation de paires pour les différentes populations de I1 et I3 (A à C : incubation I1 ; D à F : incubation I3).

Le profil des $g(r)$ de la communauté bactérienne entre elle est similaire pour les deux échantillons (cf. Figure 107, A et D). En effet, les deux courbes présentent la même forme, entre 0 et 1 μm de distance. A cette distance, la courbe est inférieure à 1 du fait de l'exclusion spatiale liée à l'encombrement stérique des individus. Ensuite, la courbe est supérieure à 1 jusqu'à 12 μm , avec une valeur maximale obtenue à environ 3 μm . Ce pic pourrait être dû à la division microbienne très rapide pour les bactéries, qui induit une probabilité plus forte de trouver une cellule fille à proximité de la cellule mère dont elle est issue. Au delà, la courbe se

stabilise à des valeurs proches de 1, ce qui indique plutôt une répartition aléatoire des bactéries dans l'échantillon.

L'analyse des paires archées/archées montre des différences pour les deux échantillons (cf. Figure 107, B et E). Pour l'incubation I1, la courbe est inférieure à 1 pour la distance entre 0 et 10 μm . Pour l'analyse sur Daime, les archées n'ont pas pu être totalement individualisées du fait que *Methanosarcina* forme des tétrades où les individus sont très rapprochés. Ainsi, la première partie de la courbe (0 à 5 μm), moins pentue pour I1 que pour I3, peut s'expliquer par la distance physique supérieure entre deux tétrades d'archées par rapport à celle entre deux micro-organismes. En revanche, il semble que les archées se repoussent pour les distances entre 5 et 10 μm . Par la suite, la courbe présente une valeur autour de 1, donc les micro-organismes sont répartis aléatoirement sur la distance de 10 à 25 μm . Pour l'échantillon I3, la courbe de corrélation des paires archées/archées est quasiment la même que pour celle des bactéries entre elles. C'est-à-dire, un départ inférieur à 1, probablement dû à la taille des *Methanoculleus*. Puis, un pic à 3 μm de distance et une descente vers 10 μm . La division cellulaire d'une archée hydrogénotrophe étant relativement rapide, le pic ainsi s'expliquer par la division cellulaire ou par une attraction des micro-organismes entre eux. Enfin, jusqu'à 20 μm la courbe est égale à 1, ce qui correspond donc à une répartition aléatoire des micro-organismes.

Enfin, le résultat le plus frappant concerne l'analyse spatiale des paires bactéries/archées. Il peut être observé une différence importante entre les deux incubations (cf. Figure 107, C et F). En effet, dans les deux cas il semble que les deux populations s'attirent, cependant, la valeur obtenue par la fonction de corrélation est de 4,5 pour I3 alors qu'elle est de 1,5 pour I1.

Les données fournies par l'analyse d'image FISH 3D par la fonction de corrélation de paires vont donc dans le sens de l'hypothèse formulée précédemment selon laquelle il y aurait une syntrophie réelle bactérie-archée dans I3, plus précisément *Methanoculleus*-bactérie, alors que *Methanosarcina* pourrait être seule responsable dans la transformation de l'acétate en méthane pour l'incubation I1. En effet, l'analyse spatiale des paires bactéries/archées permet d'observer une attirance entre les archées et les bactéries dans I1 et I3. Cependant, la valeur obtenue par la fonction de corrélation est nettement plus forte pour I3 que pour I1, ce qui montre que les *Methanoculleus*, présents dans l'incubation I3, sont nettement plus regroupés autour des bactéries que les *Methanosarcina* dans l'incubation I1.

3.2.3.3. Analyses NanoSIMS

Dans le but de clarifier l'implication des différents micro-organismes suspectés de participer aux différentes réactions d'OSA qui se sont mises en place dans les incubations des séries d'expériences I, des mesures d'enrichissement en carbone 13 des micro-organismes ont été réalisées sur certains échantillons d'intérêt. La technique NanoSIMS présentée dans la partie matériel et méthodes (cf. Partie 3, § 6.3.4 NanoSIMS) a été utilisée pour réaliser ces mesures. Grâce au couplage avec l'hybridation *in-situ* de sondes nucléotidiques spécifiques contenant des atomes d'halogène, la technique SIMSISH permet simultanément d'identifier un micro-organisme et de mesurer son enrichissement isotopique (Li, Wu et *al.* 2008). Ainsi, en permettant de mieux caractériser la physiologie des groupes microbiens non cultivables présents dans nos incubations, à travers le suivi de l'évolution de leurs enrichissements isotopiques résultant de l'assimilation de l'acétate marqué, ces analyses devraient apporter des éléments d'information permettant de mieux caractériser les réactions d'OSA se produisant.

Les échantillons sélectionnés dans le cadre de ces mesures spécifiques sont issus des incubations réalisées avec de l'acétate marqué uniquement sur le groupement méthyle rappelées brièvement ci-après :

- **Incubation mésophile C1-3** dont les résultats sont présentés en Partie 4, § 3.1 Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la dégradation de l'acétate en conditions mésophiles. Dans cette incubation d'acétate à basse concentration en azote ammoniacal, la consommation de l'acétate et la production de méthane ont eu lieu par voie acétoclaste. Le méthane produit présente (Figure 108, A) un enrichissement proche de 100 % pendant toute la durée de l'incubation et le dioxyde de carbone produit présente un enrichissement proche de l'enrichissement naturel pendant toute la durée de l'incubation. L'échantillon analysé en NanoSIMS a été prélevé en fin de production de méthane alors que 90 % du méthane avaient été produits (NanoSIMS n°1).

- **Incubation mésophile I1-2** dont les résultats sont présentés en Partie 4, § 3.2 Effet de la quantité d'inoculum sur la dégradation de l'acétate à haute concentration en azote ammoniacal en conditions mésophiles. Dans cette incubation d'acétate à haute concentration d'azote ammoniacal ($4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NH_4^+), la consommation de l'acétate et la production de méthane ont eu lieu majoritairement par la voie hydrogénotrophe, après oxydation de l'acétate en dioxyde de carbone et hydrogène. Le méthane produit présente un enrichissement compris entre 50 % et 60 % pendant toute la durée de l'incubation (Figure 108, B) et le dioxyde de carbone produit présente un enrichissement progressif qui atteint 17 % en fin d'incubation. Dans cette incubation, les produits de l'oxydation de l'acétate ne se mélangent a priori pas au carbone inorganique du milieu avant la réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe. Les échantillons analysés ont été prélevés aux moments où environ 20 % (NanoSIMS n°2) et 60 % (NanoSIMS n°3) de méthane ont été produits.

- **Incubation mésophile I3-2** dont les résultats sont présentés en Partie 4, § 3.2 Effet de la quantité d'inoculum sur la dégradation de l'acétate à haute concentration en azote ammoniacal en conditions mésophiles. Dans cette incubation d'acétate à haute concentration en azote ammoniacal ($4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NH_4^+), la consommation de l'acétate et la production de méthane ont eu lieu majoritairement par la voie hydrogénotrophe, après oxydation de l'acétate en dioxyde de carbone et hydrogène. Le méthane produit présente un enrichissement progressif qui atteint 20 % en fin d'incubation (Figure 108, C) et le dioxyde de carbone produit présente un enrichissement progressif qui atteint 28 % en fin d'incubation. Dans cette incubation, les produits de l'oxydation de l'acétate sont a priori mélangés au carbone inorganique du milieu qui est utilisé comme substrat pour la réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe. L'échantillon analysé a été prélevé au moment où environ 55 % de méthane avaient été produits (NanoSIMS n°4).

Les graphiques présentés en Figure 108 présentent l'enrichissement en ^{13}C du méthane et du dioxyde de carbone en fonction du pourcentage de méthane produit pour chacune de ces incubations (100 % représentant le pourcentage de méthane maximum déterminé expérimentalement pour chacune des incubations).

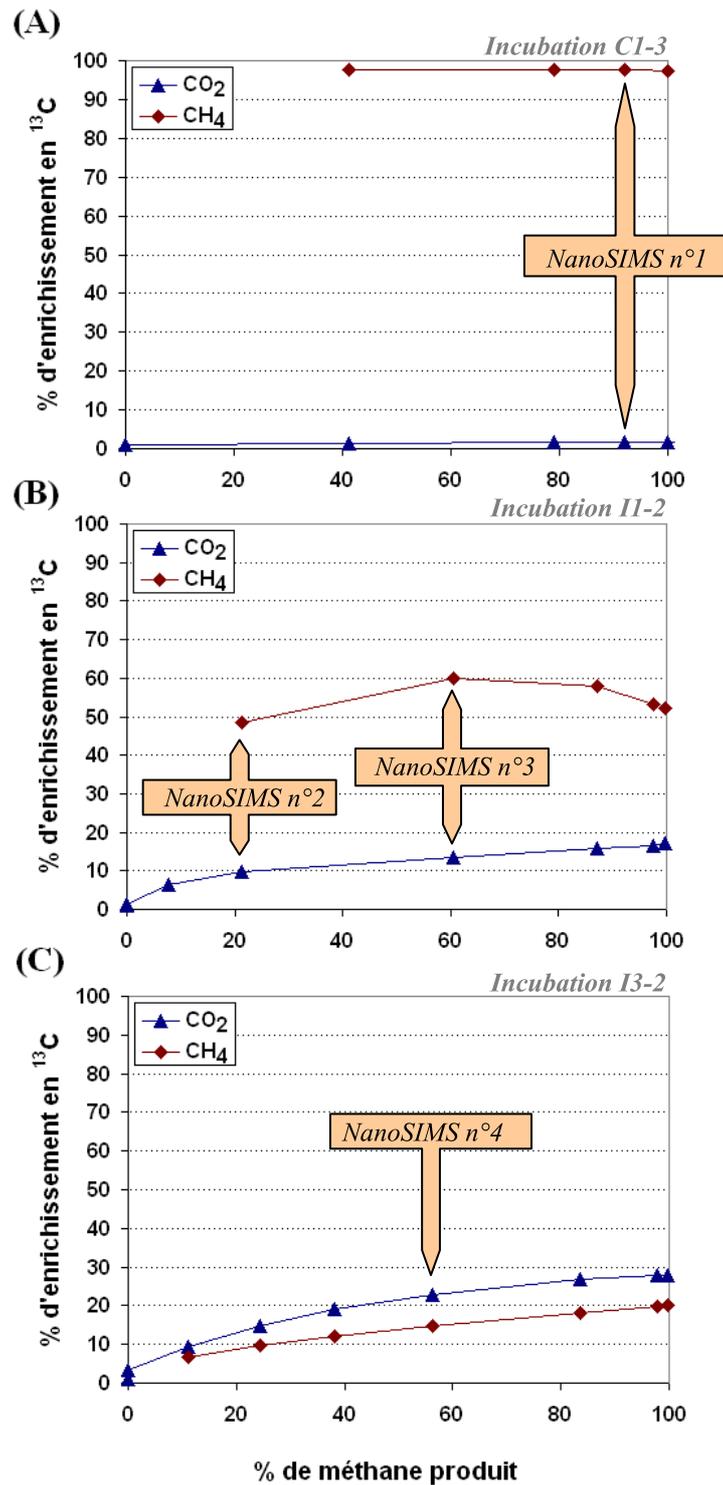


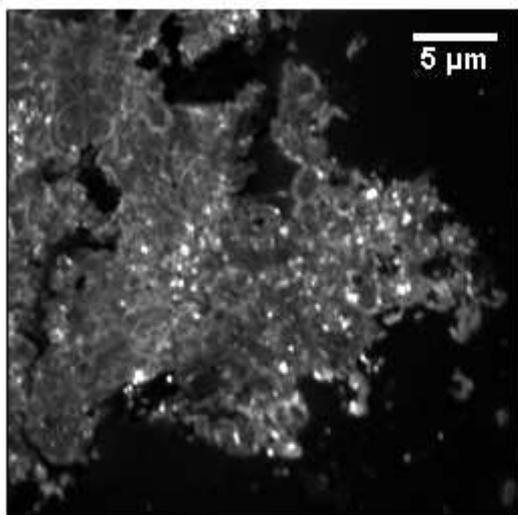
Figure 108 : Évolution de l'enrichissement en carbone 13 du CH_4 et du CO_2 dans les incubations C1-3 (A), I1-2 (B) et I3-2 (C) en fonction du % de méthane produit.

Une image des mesures de l'enrichissement en carbone 13 de la biomasse, réalisée par NanoSIMS sur l'échantillon prélevé dans l'incubation I1-2 au jour 86, soit à environ 20 % de la production mesurée de méthane (NanoSIMS n°2) est présentée en Figure 109.

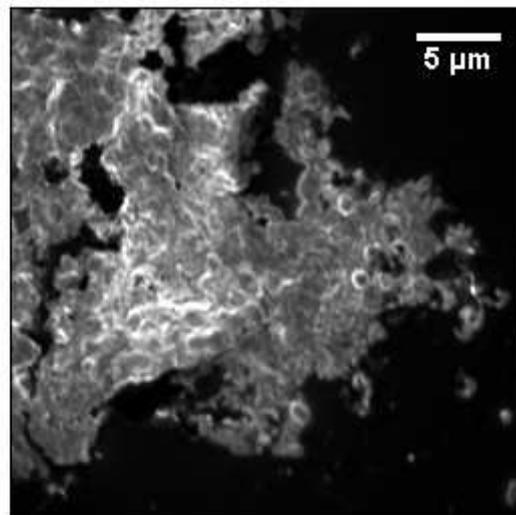
NanoSIMS n°2, (incubation I1-2)

Point 1/2

(A) - S



(B) - CN



(C) - I, sonde MS1414

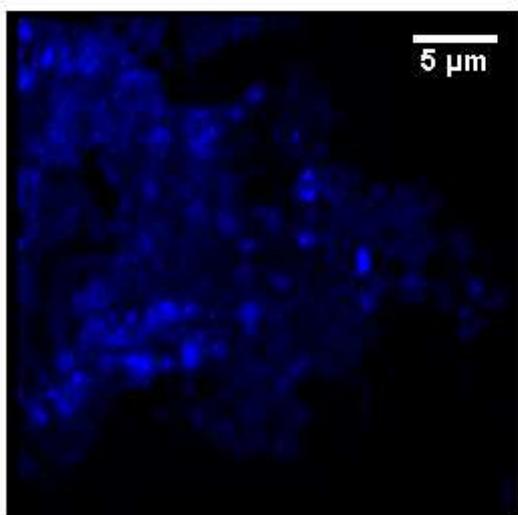
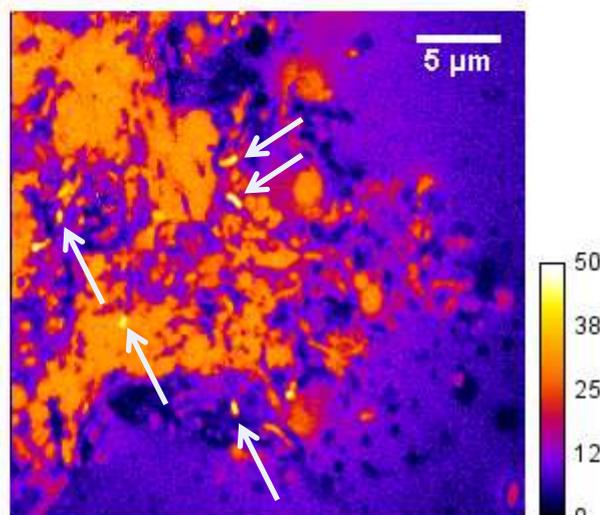
(D) - % ^{13}C 

Figure 109 : Images NanoSIMS de l'incubation I1-2 (NanoSIMS n°2, jour 86, point 1/2). Soufre (A), CN (B), Iode (C) et % de carbone 13 (D).

Sur l'image D de la Figure 109, des formes caractéristiques des clusters formés par les membres de la famille *Methanosarcinaceae* peuvent être observées. Le signal d'iode obtenu sur l'image C de la Figure 109, confirme qu'il s'agit bien de clusters formés par des *Methanosarcinaceae* car ils sont bien hybridés avec la sonde MS1414 enrichie en iode, utilisée dans le cadre de ces analyses et spécifique aux membres de cette famille. Le fait que les membres de la famille *Methanosarcinaceae* présentent un enrichissement non naturel en ^{13}C (enrichissement moyen en carbone 13 d'environ 30 %) montre qu'ils ont assimilé du carbone venant de l'acétate lors de cette incubation. Au moment du prélèvement de cet échantillon, les valeurs de fractionnements isotopiques du méthane dans le duplicat d'incubation réalisé avec de l'acétate non marqué et l'enrichissement en carbone 13 pour l'incubation marquée, indiquent clairement qu'un métabolisme de type hydrogénotrophe *via*

une réaction d'OSA sans dilution des produits de l'oxydation de l'acétate (CO_2 et H_2) dans les carbonates avant l'étape de méthanogenèse se produit. Ainsi, l'enrichissement des micro-organismes de la famille *Methanosarcinaceae* semble confirmer leur participation à cette réaction. Une des hypothèses envisagées précédemment est que les membres de cette famille puissent réaliser seuls les deux étapes de l'OSA (oxydation de l'acétate et méthanogenèse hydrogénotrophe). Ceci est tout à fait envisageable puisque cette famille d'archées est connue pour être capable de réaliser la méthanogenèse hydrogénotrophe et qu'il a été récemment mis en évidence que certains membres de cette famille étaient potentiellement capables de réaliser l'oxydation de l'acétate (Rother et Metcalf 2004) puisqu'ils sont équipés du même système enzymatique que celui utilisé par les bactéries acétotrophes (cycle de Wood/Ljungdahl (sens inverse), Figure 23). Sur l'image D de la Figure 109, le fait que des spots enrichis à 45-50 % en carbone 13 correspondant à des micro-organismes de morphologie différente soient observés (localisés par les flèches sur la Figure 109, D) semble en désaccord avec cette hypothèse car cela met en évidence que des micro-organismes autres que des membres de la famille *Methanosarcinaceae* sont impliqués dans le processus biogéochimique en cours. Les formes de ces micro-organismes laissent penser qu'il pourrait s'agir de bactéries. Cependant, il est impossible de l'affirmer avec certitude car l'hybridation spécifique des bactéries (utilisation de la sonde bromée EUB) ne semble pas avoir fonctionné correctement car aucun signal enrichi en brome pouvant correspondre à des micro-organismes n'a été observé. L'autre hypothèse envisageable selon laquelle ces zones enrichies à 45-50 % pourraient correspondre à des archées de type *Methanoculleus* (dont la présence dans ces incubations a été mise en évidence par clonage/séquençage et par FISH) semble quant à elle peu probable car ces archées se présentent sous forme de coques irrégulières.

En admettant que ces micro-organismes sont les bactéries impliquées dans la réaction d'OSA, elles apparaissent être présentes en très faibles proportions par rapport aux archées de la famille *Methanosarcinaceae*. Or ces proportions semblent insuffisantes pour pouvoir assurer le bon fonctionnement d'une telle réaction syntrophique. Afin de vérifier qu'un tel déséquilibre entre la présence des *Methanosarcinaceae* et de ces supposées bactéries était retrouvé au sein de l'ensemble de l'échantillon, une seconde image (NanoSIMS n°2 (point 2/2), Figure 110) de l'incubation I1-2 au même jour (jour 86) a été réalisée.

NanoSIMS n°2, (incubation I1-2)

Point 2/2

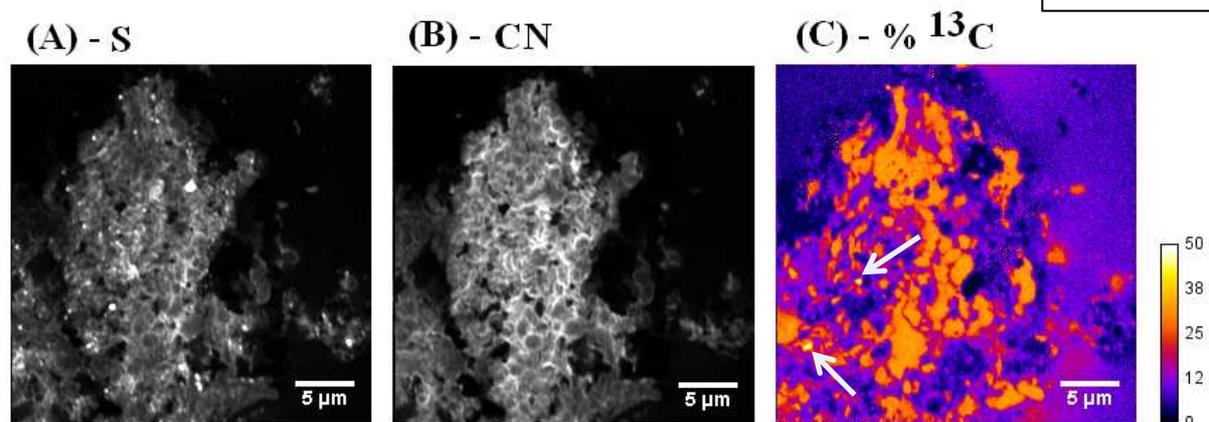


Figure 110 : Images NanoSIMS de l'incubation I1-2 (NanoSIMS n°2, jour 86, point 2/2). Soufre (A), CN (B) et % de carbone 13 (C).

Cette deuxième analyse NanoSIMS confirme les résultats déjà obtenus (observation de membres de la famille *Methanosarcinaceae* enrichi à environ 30 % et de supposées bactéries

enrichies entre 45 et 50 %). Le nombre de "bactéries" enrichies à 45-50 % observé est à nouveau très faible (localisées par les flèches sur la Figure 110, C) ce qui semble conforter l'hypothèse d'une implication des membres de la famille *Methanosarcinaceae* dans l'étape d'oxydation de l'acétate.

L'analyse de l'échantillon prélevé lors de cette même incubation I1-2 au jour 99 (NanoSIMS n°3), soit au moment ou environ 60 % du méthane a été produit, est intéressante car à cette période le méthane produit s'enrichit jusqu'à atteindre 60 % de carbone 13. Une participation de la méthanogenèse acétoclaste est une des hypothèses envisagées pour expliquer le fait que l'enrichissement en carbone 13 du méthane dépasse 50 %. L'analyse NanoSIMS pourrait peut-être apporter des informations complémentaires permettant de confirmer cette hypothèse si l'enrichissement des *Methanosarcinaceae* se révèle être différent en fonction du métabolisme utilisé. Les images obtenues lors de l'analyse NanoSIMS n°3 sont présentées en Figure 111.

NanoSIMS n°3, (incubation I1-2)

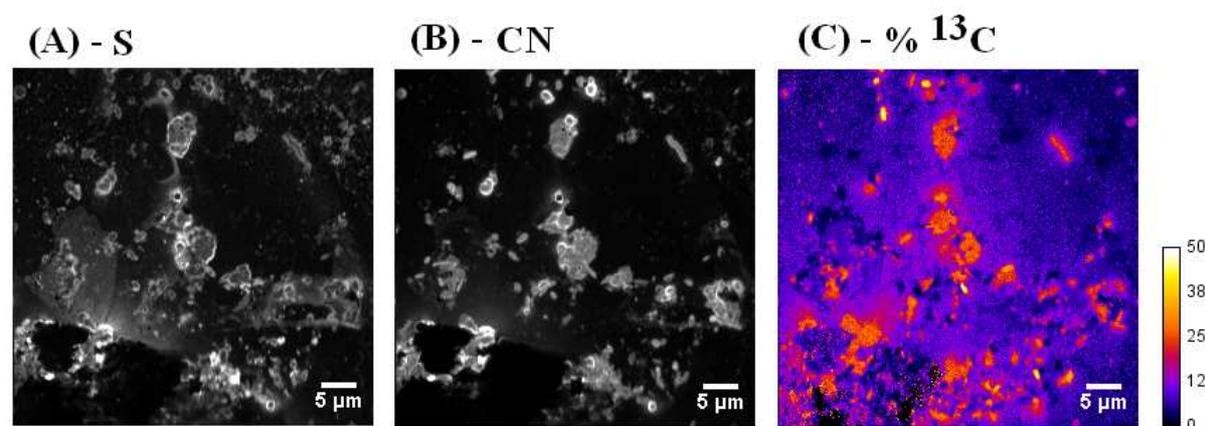


Figure 111 : Images NanoSIMS de l'incubation I1-2 (NanoSIMS n°3, jour 99). Soufre (A), CN (B) et % de carbone 13 (C).

L'enrichissement des *Methanosarcinaceae* se révèle proche de celui déjà mesuré au cours de cette incubation au jour 86 (NanoSIMS n°2 (point 1 & 2)), mais est toutefois légèrement plus faible (environ 25 %). De même, quelques spots enrichis entre 45 et 50 % sont également retrouvés. De plus, sur cette image, les supposées bactéries ne sont pas spécialement proches des spots d'enrichissement correspondant aux *Methanosarcinaceae*, ce qui est confirmé par les résultats de l'arrangement spatial des micro-organismes (cf. résultats sur l'arrangement spatial des micro-organismes, Chapitre 4, § 3.2.3.2 Arrangement spatial des micro-organismes). A priori, aucune différence remarquable n'est donc observée entre ses deux points d'analyse lors de cette incubation. Afin de vérifier si l'enrichissement aurait bel et bien dû être différent si une méthanogenèse acétoclaste s'était mise en place progressivement entre les jours 86 et 99, des mesures de l'enrichissement en ¹³C des *Methanosarcinaceae* ont été réalisées sur un échantillon de l'incubation C1-3 au cours de laquelle le méthane est clairement produit par méthanogenèse acétoclaste. L'enrichissement des membres des familles *Methanosaetaceae* et *Methanosarcinaceae* lors de la production de méthane par méthanogenèse acétoclaste a ainsi pu être mesuré. Les images obtenues (NanoSIMS n°1, correspondant au jour 12 de l'incubation C1-3, soit à environ 80 % de la production mesurée de méthane pour cette incubation) sont présentées en Figure 112.

NanoSIMS n°1, (incubation C1-3)

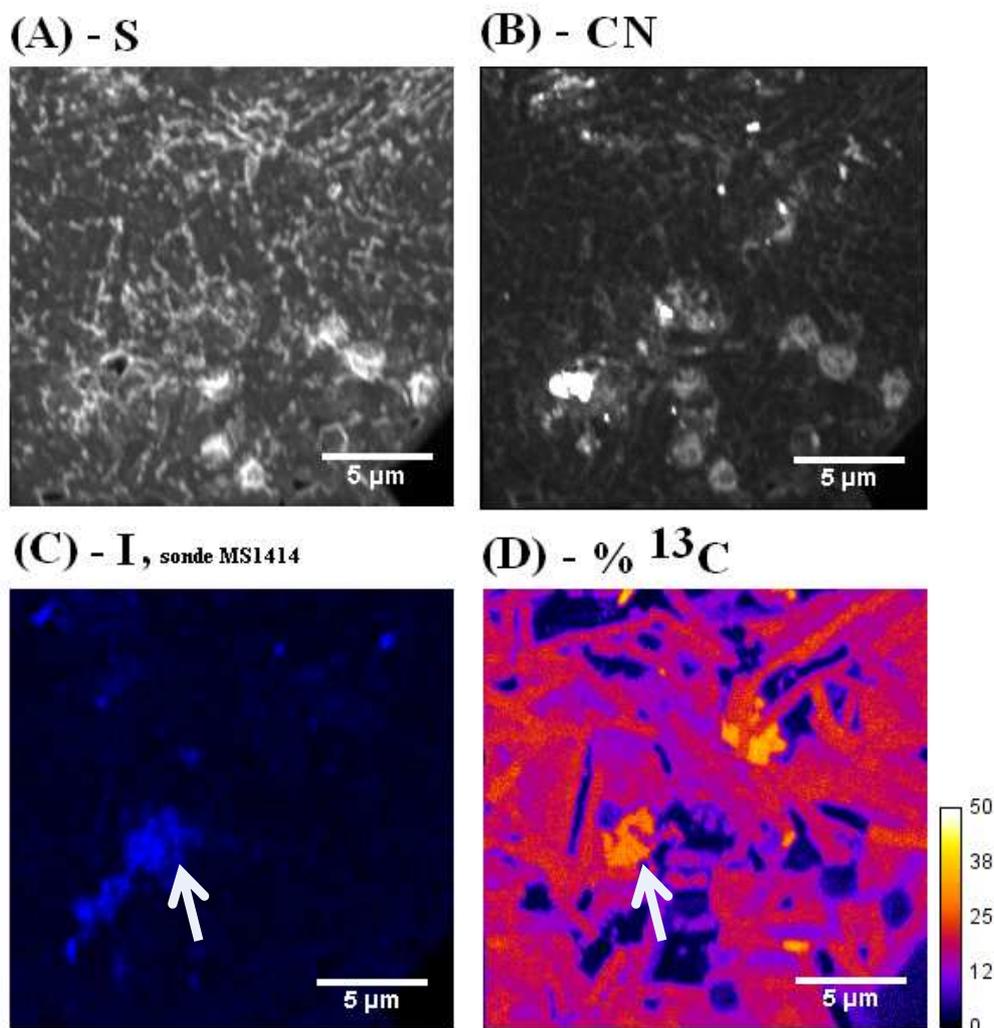


Figure 112 : Images NanoSIMS de l'incubation C1-3 (NanoSIMS n°1, jour 12). Soufre (A), CN (B), Iode (C) et % de carbone 13 (D).

Sur l'image D de la Figure 112, un cluster (cluster au centre le plus à gauche, marqué par une flèche blanche) est clairement identifié par le signal d'iode (image C de la Figure 112) comme étant composé de membres de la famille *Methanosarcinaceae*. L'enrichissement mesuré est d'environ 28 % et est donc proche de celui mesuré lors de analyses NanoSIMS n°2 et n°3 dans l'incubation I1-2 lorsqu'une réaction d'OSA se produit. Ainsi, les analyses NanoSIMS ne permettent a priori pas de différencier le métabolisme utilisé par les membres de la famille *Methanosarcinaceae* lors de la production de méthane. Le fait que des enrichissements en carbone 13 proches aient été observés aux jours 86 et 99 dans l'incubation I1-2 ne permet donc pas d'exclure qu'une méthanogenèse de type acétoclaste puisse s'être mise en place progressivement et puisse expliquer qu'un enrichissement supérieur à 50 % en carbone 13 du méthane soit observé au jour 99.

Un pourcentage de carbone 13 de 21 % en moyenne a été mesuré pour les membres de la famille *Methanosaetaceae* facilement identifiables sur l'image D de la Figure 112 grâce à leur forme de long bâtonnet.

Afin d'essayer d'expliquer le fait que les valeurs d'enrichissement en carbone 13 mesurées pour les différentes archées lors de cette étude sont inférieures à celle du substrat utilisé, nous nous sommes intéressés aux voies anaboliques décrites chez les archées. Les données disponibles dans la bibliographie sur l'assimilation de l'acétate par les archées méthanogènes indiquent que deux voies principales d'assimilation peuvent être utilisées (Shieh et Whitman 1987; Blaut 1994) pour la synthèse des acides aminés. Ces deux voies utilisent le cycle incomplet des acides tricarboxyliques pour former l'alpha-cétoglutarate (ou 2-Oxoglutarate) qui peut notamment ensuite servir de précurseur pour la formation des acides aminés de la famille des glutamates (Blaut 1994). L'utilisation de la première voie qui utilise ce cycle dans le sens réductif a été mise en évidence pour *Methanobacterium thermoautotrophicum* et *Methanococcus maripaludis* (Shieh et Whitman 1987; Blaut 1994). Cette voie est présentée en détail en Figure 113. Le recours à la seconde voie qui utilise ce même cycle mais dans le sens oxydatif a été mis en évidence pour *Methanosarcina barkeri* (Kenealy et Zeikus 1982; Blaut 1994). Cette dernière serait également utilisée par *Methanosaetacea concilii* (Simpson et Whitman 1993; Blaut 1994). Cette voie est présentée en détail en Figure 114. L'oxaloacetate est quant à lui le précurseur des acides aminés de la famille des aspartates.

La Figure 113 et la Figure 114 permettent de suivre le devenir de chacun des atomes de carbone impliqué dans chaque cycle incomplet des acides tricarboxyliques (réductif et oxydatif) grâce à un code couleur. Ensuite, en considérant que seuls les atomes de carbone du groupement méthyle de l'acétate et donc de l'acétyl-CoA sont enrichis, il est possible de calculer l'enrichissement théorique de l'alpha-cétoglutarate et de l'oxaloacétate qui sont des précurseurs des acides aminés et sont donc assimilés par les micro-organismes. Ainsi, l'utilisation du cycle incomplet des acides tricarboxyliques à partir de molécules d'acétate enrichies à 100 % en carbone 13 sur le groupement méthyle conduit à la formation de molécules contenant :

- dans le cas du cycle réductif lors de la formation de l'alpha-cétoglutarate, un seul atome de carbone est enrichi sur cinq. L'enrichissement théorique de l'alpha-cétoglutarate est donc de 20 %.
- dans le cas du cycle oxydatif lors de la formation de l'alpha-cétoglutarate, deux atomes de carbone sont enrichis sur cinq. L'enrichissement théorique de l'alpha-cétoglutarate est donc de 40 %.
- lors de la formation de l'oxaloacétate, un seul atome de carbone est enrichi sur quatre. L'enrichissement théorique de l'oxaloacétate est donc de 25 %.

D'après les données bibliographiques, il apparaît que les *Methanosarcinaceae* utiliseraient le cycle incomplet des TCA (acides tricarboxyliques) dans le sens oxydatif (Kenealy et Zeikus 1982; Blaut 1994) puisque cette voie d'assimilation a été mise en évidence à la fois pour *Methanosarcina barkeri* et *mazei*. Cette même voie pourrait être utilisée par les *Methanosaetaceae* puisqu'elle a été mise en évidence pour *Methanosaeta concilii* (Ekiel, Sprott et al. 1985). Ces deux familles de méthanogènes devraient donc former, dans nos conditions expérimentales des acides aminés de la famille du glutamate enrichis à 40 % et de la famille de l'aspartate enrichis à 25 %. Les archées des familles utilisant le cycle dans sa partie réductrice produisent eux des acides aminés de la famille du glutamate enrichis à 20 %.

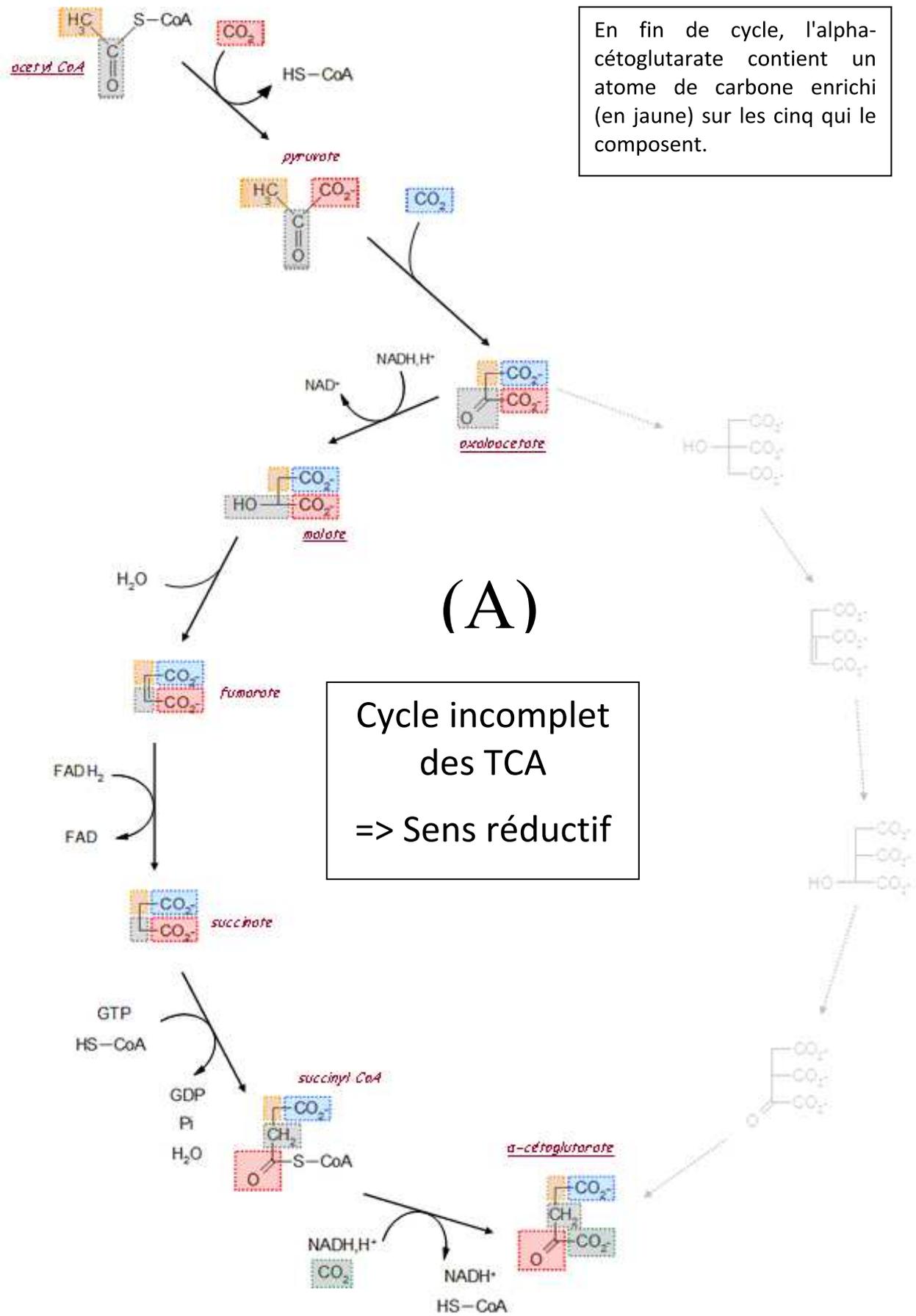


Figure 113 : Cycle réductif incomplet des acides tricarboxyliques.

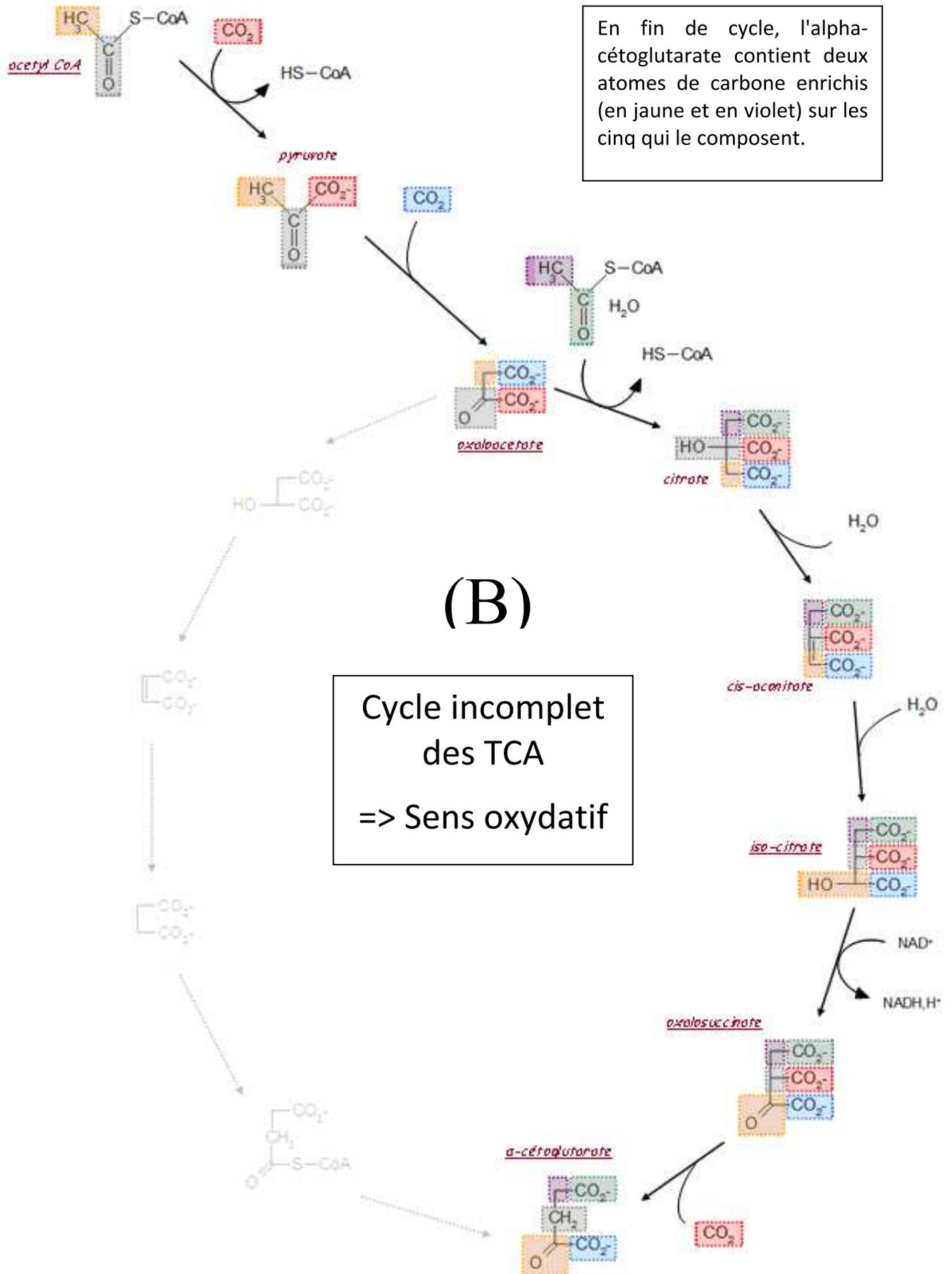


Figure 114 : Cycle oxydatif incomplet des acides tricarboxyliques.

D'un point de vue plus général, il apparaît donc clairement que lors de la biosynthèse des acides aminés, une incorporation de carbone ne provenant pas de l'acétate se produit et entraîne ainsi une dilution du carbone du groupement méthyle au sein des acides aminés et donc des protéines. Il est donc normal que l'enrichissement des micro-organismes soit inférieur à celui du substrat.

Il est d'autre part intéressant de remarquer que les différents acides aminés ne présentent pas les mêmes enrichissements, comme l'illustre le cas des acides aminés de la famille des glutamates et aspartates pris en exemple. De plus, les autres constituants cellulaires tels que les lipides et polysaccharides, pour ne citer qu'eux, sont produits selon d'autres cycles biosynthétiques pouvant conduire à des enrichissements spécifiques.

Ceci montre qu'il semble assez délicat pour les micro-organismes étudiés dans le cadre de ce travail de relier directement l'enrichissement isotopique d'un micro-organisme avec sa fonction car les mécanismes d'assimilations sont multiples et complexes. Des mesures similaires lors d'incubations de cultures pures de bactéries sur du glucose réalisées dans le cadre d'un travail précédent afin de valider l'utilisation de la technique SIMSHIS (Li, Wu et *al.* 2008) avait conduit à l'obtention d'enrichissements isotopiques de la biomasse identiques à celui du substrat. Ainsi, le cas particulièrement complexe étudié ici ne doit pas laisser penser qu'il est dans tous les cas illusoire d'essayer de relier le niveau d'enrichissement isotopique des micro-organismes avec leur fonction mais inciter à la plus grande prudence dans les interprétations.

Enfin, les résultats "NanoSIMS n°4" obtenus pour l'incubation I3-2 au jour 77, soit à environ 60 % de la production de méthane mesurée dans l'incubation I3-2 sont présentés en Figure 115.

NanoSIMS n°4, (incubation I3-2)

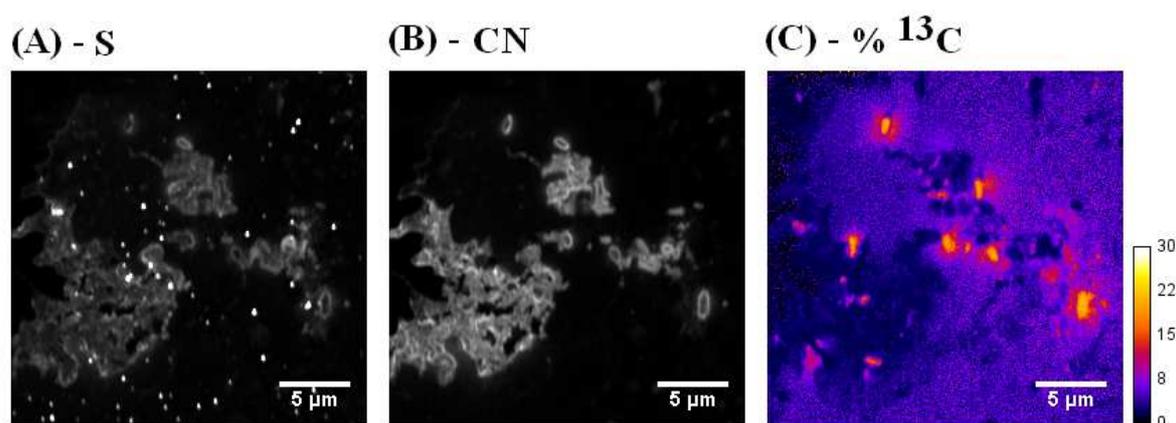


Figure 115 : Images NanoSIMS de l'incubation I3-2 (NanoSIMS n°4, jour 77). Soufre (A), CN (B) et % de carbone 13 (C).

Ces images mettent en évidence la présence de micro-organismes enrichis en carbone 13. Deux niveaux d'enrichissement distincts sont ainsi mesurés : 19 % et 12 % (cf. Figure 116).

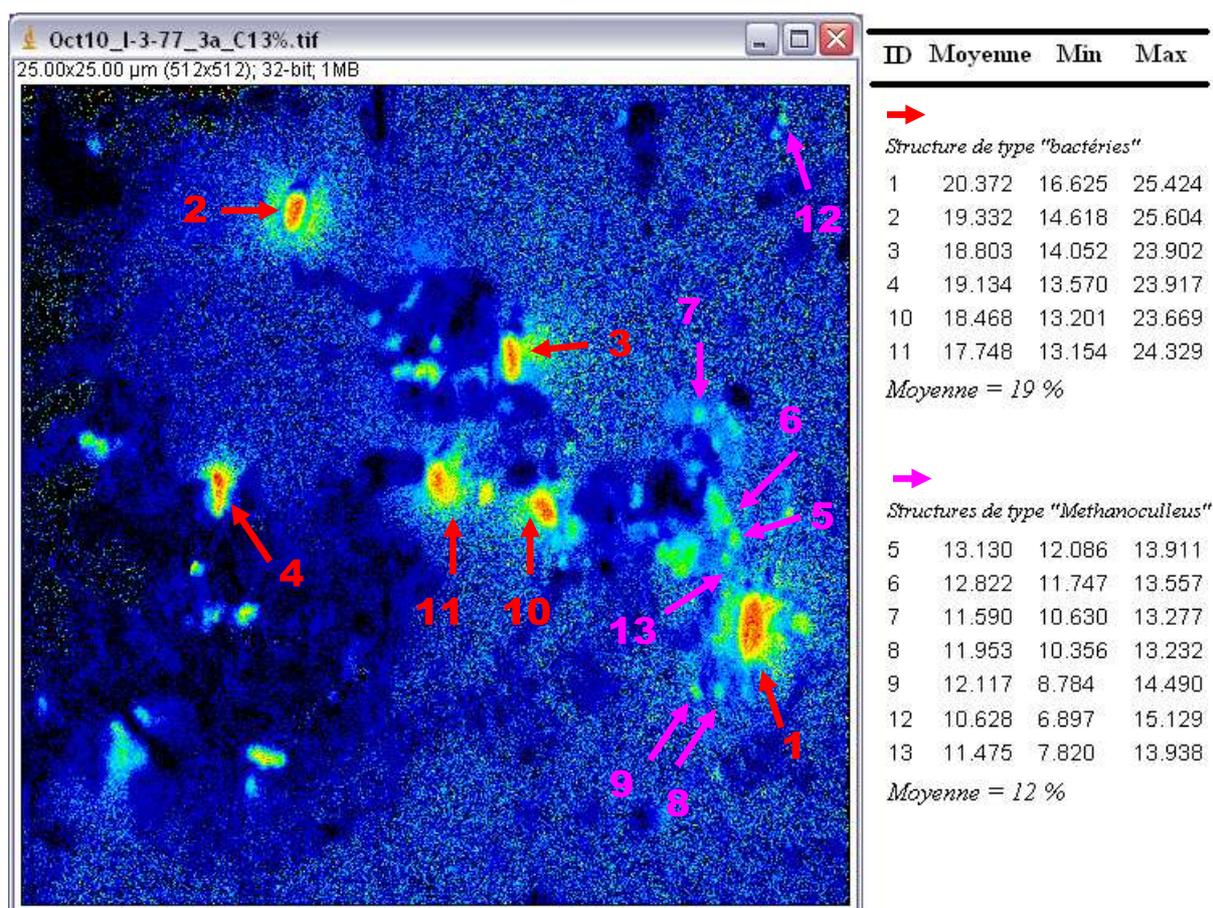


Figure 116 : Agrandissement de l'image ^{13}C NanoSIMS de l'incubation I3-2 (NanoSIMS n°4, jour 77).

Malheureusement, les hybridations réalisées avec la sonde iodée MG1200b et la sonde Bromée EUB n'ont pas fonctionné. Il est donc impossible d'identifier de manière certaine les différents micro-organismes présents. Cependant, les formes des micro-organismes enrichis à 19 % semblent correspondre à celles de bactéries alors que les formes des micro-organismes enrichis à 12 % pourraient correspondre à celles des *Methanoculleus*. Il serait intéressant de reproduire cette analyse en modifiant les conditions d'hybridation afin de confirmer ces hypothèses.

3.2.3.4. Analyses métabolomiques

Les résultats présentés précédemment n'ayant pas permis de mettre en évidence formellement que des archées du genre *Methanosarcina* réalisaient à la fois l'oxydation de l'acétate et la méthanogenèse hydrogénotrophe dans les incubations réalisées à partir d'une faible quantité d'inoculum, des analyses du métabolome exprimé au cours des incubations C4, I1 et I3 ont été réalisées. Ce travail n'ayant pas été réalisé directement dans le cadre de cette thèse mais lors d'un post doctorat (post-doctorat de Lü Fan), il ne sera pas présenté en détail. Ces résultats apportant de nouveaux éléments en faveur de cette hypothèse, il a semblé intéressant de les mentionner.

Ainsi, dans le cas des incubations I3 les résultats montrent clairement que les enzymes responsables de l'oxydation de l'acétate sont synthétisées par des bactéries et que les enzymes responsables de la méthanogenèse hydrogénotrophe le sont par des archées de l'ordre *Methanomicrobiales*. Ces résultats sont en accord avec la syntrophie mise en évidence entre

des membres du genre *Methanoculleus* et des bactéries et étayés par l'ensemble des résultats présentés précédemment.

Dans le cas de l'incubation C4, la très grande majorité des protéines identifiées ont été synthétisées par des archées du genre *Methanosarcina*. Très peu de protéines attribuables à des bactéries ont été retrouvées et en particulier aucune ne pouvant être impliquées dans l'oxydation de l'acétate. Il faut cependant nuancer ce résultat car l'identification des spectres de masse a été réalisée à partir de bases de données publiques non redondantes (Uniprot), donc en l'absence de référence métagénomique spécifique à notre échantillon. Il est donc possible que des protéines bactériennes, présentes dans l'échantillon mais non répertoriées dans les banques de données publiques, n'aient pas été identifiées. Parmi les enzymes synthétisées par des membres du genre *Methanosarcina* certaines répertoriées comme actives lors de la méthanogenèse acétoclaste ont été retrouvées. Ces enzymes pourraient potentiellement être communes à l'oxydation de l'acétate et à la méthanogenèse acétoclaste. D'autre part, les enzymes impliquées dans la méthanogenèse hydrogénotrophe synthétisées par des membres du genre *Methanosarcina* ont été retrouvées. D'autres archées semblent être également impliquées dans cette réaction. Il pourrait s'agir de membres du genre *Methanoculleus* puisque quelques protéines pouvant leur être attribuées ont été mises en évidence.

Dans le cas de l'incubation I1, dont le comportement est très proche de celui de l'incubation C4, le métaprotéome exprimé est également similaire. La seule différence notable concerne la mise en évidence en très faible quantité d'enzymes d'origine bactérienne impliquées dans l'oxydation de l'acétate. Ceci pourrait expliquer pourquoi quelques bactéries enrichies ont été mises en évidence lors des analyses NanoSIMS pour cet échantillon.

Ainsi si ces résultats ne permettent pas d'affirmer sans réserve que des archées du genre *Methanosarcina* réalisent à elles seules l'oxydation syntrophique de l'acétate dans les incubations à basse quantité d'inoculum, ils permettent toutefois d'apporter des éléments allant plutôt dans le sens de cette hypothèse.

3.2.3.5. Effet de la quantité initiale d'inoculum sur la production de méthane

Des différences de cinétiques de production de méthane et de temps de latence sont observées entre les différentes incubations (Figure 98, A). Il apparaît ainsi que, plus la quantité d'inoculum apportée en début d'incubation est importante, plus la production de méthane débute tôt (82, 63 et 58 jours pour I1, I2 et I3 respectivement, Tableau 41). Cependant, la période de latence reste, dans les trois cas de figure, relativement importante. Ainsi, une augmentation par 10 de la quantité d'inoculum ne permet pas à elle seule de réduire de façon drastique le temps de latence. En ce qui concerne la vitesse de production maximale de méthane, il est intéressant de remarquer que même si les différences sont relativement faibles, c'est dans celles dans lesquelles la quantité la plus faible d'inoculum a été introduite (I1) que cette dernière est la plus élevée (14,42, 8,69 et 11,27 mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ d'acétate par jour pour I1, I2 et I3 respectivement, Tableau 41). Les différences de vitesse maximale de production de méthane entre I2 et I3 peuvent a priori s'expliquer uniquement par la quantité plus importante d'inoculum introduit dans I3, car les populations d'archées ainsi que les voies métaboliques utilisées apparaissent être similaires au sein de ces deux incubations (analyses ARISA et isotopiques). L'obtention d'une vitesse de production maximale plus élevée au sein de l'incubation I1 apparaît par contre incohérente avec le fait qu'une quantité plus faible d'inoculum y soit introduite. Il est probable que la mise en place de métabolismes et de populations de micro-organismes distincts de ceux observés aux deux plus fortes

concentrations en inoculum, puisse expliquer ce résultat. Seule la quantité d'inoculum introduite peut être à l'origine de ces différences entre incubation car c'est le seul paramètre qui diffère entre elles. Ainsi, l'introduction d'effectifs différents de chaque type de micro-organismes en fonction de la quantité d'inoculum, pourrait être le facteur qui a influencé la mise en place de la réaction d'OSA *Methanoculleus*/bactéries dans nos incubations des séries I2 et I3. Il est possible que la mise en place de cette relation syntrophique nécessite un effectif minimum d'individu de chaque espèce. Dans le cas où cette syntrophie ne se met pas en place, des membres de la famille *Methanosarcinaceae*, qui semblent réaliser seuls la réaction d'OSA d'après nos résultats, se développeraient alors pour réaliser cette réaction. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, il est envisageable que les effectifs introduits avec la quantité la plus faible d'inoculum ne permettent pas aux couples "*Methanoculleus*/bactéries oxydant l'acétate" de développer une relation symbiotique. L'augmentation de la quantité d'inoculum rendrait par contre possible l'établissement d'une telle symbiose.

3.2.4. Conclusion

Ces expériences ont permis de confirmer qu'une réaction d'OSA, lors de la méthanisation de l'acétate à haute concentration en azote ammoniacal, se mettait en place. De même que lors des expériences avec un inoculum préalablement adapté à dégrader l'acétate par voie acétoclaste réalisées précédemment, des temps de latence importants ont pu être observés à partir d'un inoculum non adapté et cela, quelque soit la quantité d'inoculum testée. Un léger raccourcissement des temps de latence est cependant constaté lorsqu'une quantité plus importante d'inoculum est introduite en début d'expérience. Cette absence d'effet significatif sur les temps de latence de la quantité d'inoculum introduite pourrait s'expliquer par le fait que les quantités introduites n'étaient pas drastiquement différentes (même ordre de grandeur). Cependant, ces différences ont entraîné la mise en place de réactions d'OSA différentes. En effet, à basse concentration d'inoculum, cette réaction semble s'opérer sans dilution des produits de l'oxydation de l'acétate avant leur consommation par réaction de méthanogenèse hydrogénotrophe et semble être réalisée par des membres de la famille *Methanosarcinaceae*. Lorsqu'une quantité d'inoculum plus importante est introduite, le mécanisme d'OSA est différent et correspond au mécanisme déjà décrit dans la bibliographie. Ce mécanisme nécessite la mise en place d'une relation syntrophique entre une archée hydrogénotrophe (*Methanoculleus* lors de nos expériences) qui consomme l'hydrogène libéré préalablement par une bactérie qui elle, réalise l'étape d'oxydation de l'acétate. Cette réaction se différencie de la première notamment car les molécules de dioxyde de carbone libérées lors de l'oxydation de l'acétate sont mélangées avec celui du milieu environnant avant leur consommation lors de l'étape de méthanogenèse.

Afin, d'approfondir nos connaissances sur la réaction d'OSA, des analyses complémentaires (étude de l'arrangement spatiale, NanoSIMS, métaprotéomiques) ont été réalisées afin de mieux appréhender notamment le rôle des membres de la famille *Methanosarcinaceae* dans l'OSA. En effet, à notre connaissance c'est la première fois qu'il est observé expérimentalement dans un écosystème complexe. La versatilité métabolique des membres de la famille *Methanosarcinaceae* qui les rend capables de réaliser les réactions de méthanogenèse acétoclaste, hydrogénotrophe, méthylotrophe et d'oxydation de l'acétate fait que l'hypothèse selon laquelle ces archées pourraient réaliser seules les deux réactions composant l'OSA est plausible mais également particulièrement difficile à mettre en évidence de façon formelle. L'étude de l'arrangement spatial des *Methanosarcinaceae* et des bactéries ne met pas en évidence une attirance (nécessaire à la réaction d'OSA) aussi forte que celle observée dans le cas de figure classique entre *Methanoculleus*/bactéries. Les analyses NanoSIMS ont permis de confirmer l'implication de membres de la famille

Methanosarcinaceae dans l'OSA, sans pouvoir totalement mettre en évidence qu'ils réalisent les deux réactions. Cependant, l'absence d'autres micro-organismes en nombre important présentant un enrichissement isotopique non naturel irait plutôt dans ce sens. Enfin, la comparaison des métagénomés exprimés lors des différentes incubations montre qu'alors que dans les incubations dans lesquelles la plus importante quantité d'inoculum a été introduite, l'oxydation de l'acétate a été réalisée par des bactéries. Dans le cas où une quantité plus faible a été utilisée, cette même implication des bactéries n'est pas mise en évidence.

Si ces résultats complémentaires ne permettent pas de prouver formellement que des membres de la famille *Methanosarcinaceae* réalisent seuls l'OSA, ils apportent des éléments allant clairement dans le sens de cette hypothèse.

4. Application aux procédés anaérobies de traitements des déchets non dangereux

L'ensemble des résultats obtenus dans les parties précédentes lors d'incubation d'acétate, a permis de mettre en évidence que la concentration en azote ammoniacal jouait un rôle majeur dans l'orientation des voies métaboliques lors de l'étape de méthanogenèse. Il s'avère ainsi nécessaire de mieux appréhender l'effet de ce paramètre opérationnel dans le but d'optimiser les procédés de digestion anaérobie des DND se produisant dans les ISDND bioactives et les méthaniseurs. Ainsi, dans cette partie, sont présentées des expériences visant à explorer l'effet de la concentration en azote ammoniacal sur la dégradation anaérobie des déchets lors de leur traitement par ces deux types de procédés. La première expérience présentée dans cette partie a pour objectif d'étudier l'influence de la recirculation de différentes qualités d'effluents (contenant notamment des concentrations en azote ammoniacal différentes) lors d'essais en colonnes de percolation simulant la dégradation des déchets en ISDND bioactive. Dans une seconde partie, sont présentés les résultats obtenus lors d'essais réalisés afin d'étudier le rôle que pourrait jouer la concentration en azote ammoniacal sur la production de méthane lors de la codigestion biodéchets/déchets verts en méthaniseur.

4.1. Influence de la recirculation en ISDND bioactives de différentes qualités d'effluents sur la dégradation des déchets non dangereux

4.1.1. Introduction

Dans les installations de stockage de déchets non dangereux bioactives, les quantités de lixiviats générées et pouvant alimenter les systèmes de recirculation sont généralement insuffisantes pour atteindre, au sein du massif de déchets, un taux d'humidité permettant d'accélérer significativement la dégradation des déchets et les cinétiques de production de biogaz. L'utilisation d'autres effluents liquides pourrait être une solution à ce manque de lixiviat. L'objectif de cette expérience était ainsi de comparer l'effet de la recirculation de différentes qualités d'effluent sur la dégradation des déchets ménagers. Trois effluents ont été sélectionnés lors d'une étude préalable réalisée en microcosme à partir d'une quinzaine d'effluents différents. Les effluents ayant été retenus sont (i) un lixiviat d'ISDND car c'est l'effluent généralement recirculé en ISDND, (ii) une boue digérée de station d'épuration car elle apporte une flore méthanogène active, (iii) un lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts car un effet favorisant la dégradation de la matière organique difficilement biodégradable semble avoir été mis en évidence lors des essais préliminaires en microcosme. Le choix de ces effluents a également été guidé par le fait qu'ils présentent des concentrations en azote ammoniacal très différentes permettant ainsi d'étudier l'effet de ce dernier lors de la digestion anaérobie des DND. Lors de ces expériences, réalisées sur cinq kilogrammes de

DND reconstitués placés en colonnes de percolation simulant le mode de gestion d'une ISDND bioréacteur (cf. Chapitre 3, § 5 Les colonnes de percolation ou mésocosmes), en plus du suivi de la production de biogaz et de la qualité du lixiviat, la composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone a été mesurée afin d'identifier les voies métaboliques méthanogènes. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, les expériences n'étaient pas totalement terminées. Cependant, nous verrons que l'analyse des résultats montre que celles-ci touchaient à leur fin et que les résultats obtenus peuvent tout de même, être exploités avec confiance, avec quelques réserves cependant.

4.1.2. Résultats expérimentaux obtenus.

4.1.2.1. Caractérisation et évolution des effluents utilisés lors de leur stockage avant injection dans les pilotes

L'objet de cette expérience étant d'étudier l'effet de la recirculation de différentes qualités d'effluents, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux caractéristiques physico-chimiques des effluents réinjectés dans les différents pilotes et avons réalisé un suivi dans le temps de ces derniers lors de leur stockage. Le stock n°1 correspond au premier stock conservé à 4°C et utilisé pour les injections pendant les 475 premiers jours environ. Le stock n°2 correspond au stock prélevé suite à l'épuisement du premier et toujours utilisé pour les réinjections au moment de la rédaction de ce manuscrit.

4.1.2.1.1. pH

La Figure 117 présente l'évolution du pH des effluents pendant leur stockage. Le lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts (Lix-PCDV) et la boue de STEP (Boue-STEP) présentent un pH initial et une évolution de ce dernier relativement similaires. En effet, initialement, pour le premier stock, le pH est de 7,5 et augmente d'environ une unité sur 475 jours. Les pH initiaux du second stock pour ces deux effluents sont légèrement inférieurs à ceux du premier, 7,1 pour le lixiviat de PCDV et 7,35 pour la boue de STEP. Le pH du lixiviat d'ISDND (Lix-ISDND) suit une évolution dans le temps similaire aux deux autres effluents mais est toujours supérieur d'environ une unité. Ainsi, le pH est initialement de 8,1 pour le premier stock et augmente jusqu'à atteindre 9,0 après 475 jours de stockage. Pour le second stock, le pH est initialement de 7,9.

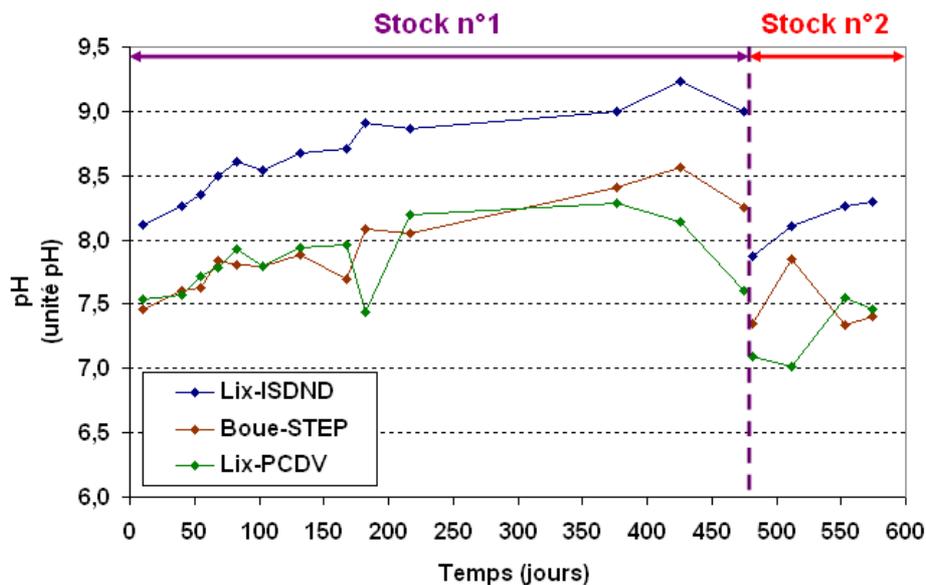


Figure 117 : Évolution du pH des effluents pendant leur stockage.

4.1.2.1.2. COD/CID

La Figure 118 présente l'évolution des concentrations en COD et CID des effluents pendant leur stockage.

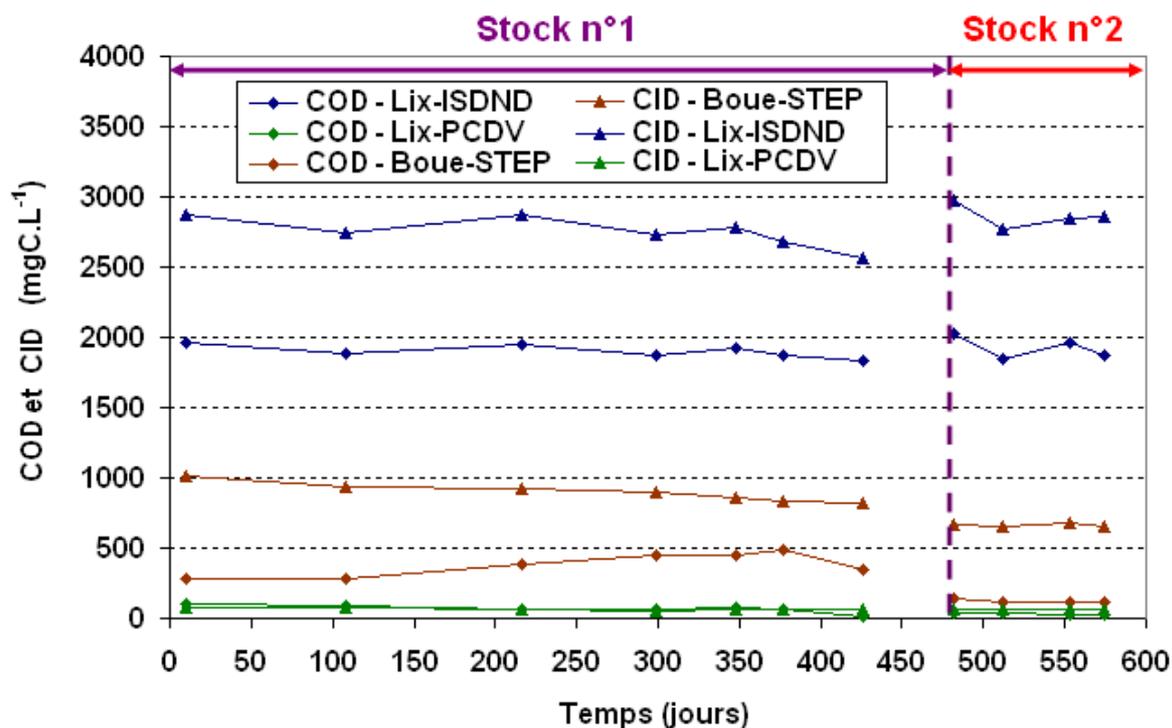


Figure 118 : Évolution des concentrations de COD et CID des effluents pendant leur stockage.

La concentration en COD pour le lixiviat d'ISDND reste relativement constante autour de 2000 mgC.L⁻¹ alors que celle du CID enregistre une baisse de 2900 à 2600 mgC.L⁻¹ au cours du stockage du premier lot. En ce qui concerne le lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts, les valeurs de COD et de CID sont nettement plus faibles que celles rencontrées dans le lixiviat d'ISDND (entre 15 et 100 mgC.L⁻¹ pour le COD et 53 et 81 mgC.L⁻¹ pour le CID) et restent relativement constantes au cours du stockage. Enfin, les teneurs en COD et CID dans la boue de STEP présentent des valeurs intermédiaires à celles observées dans les deux autres effluents. On observe pour cet effluent une diminution du CID de 1000 à 821 mgC.L⁻¹ et une augmentation du COD de 276 à 480 mgC.L⁻¹ lors du stockage du premier lot. Dans cet effluent seulement, des différences assez importantes entre les deux stocks sont observées. En effet, le stock n°2 est moins concentré en COD d'environ 130 mgC.L⁻¹ et en CID d'environ 650 mgC.L⁻¹.

4.1.2.1.3. Acides organiques

Les concentrations en acides lactique, formique, acétique, propionique et butyrique dans les effluents sont initialement nulles ou très proches de zéro. Aucune évolution significative au cours du temps n'a été enregistrée et de ce fait, aucune représentation graphique n'est présentée. Des concentrations en acide acétique de l'ordre de 50 mgC/L ont tout de même été enregistrées dans la boue de STEP (stock n°1) en fin de période de stockage.

4.1.2.1.4. Cations

Aucune évolution des concentrations en cations (Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺ et Ca²⁺) des effluents lors de leur stockage au cours du temps n'a été observée. La Figure 119 représente la

moyenne des valeurs mesurées des concentrations des cations pendant toute la période de stockage du stock n°1 et du stock n°2.

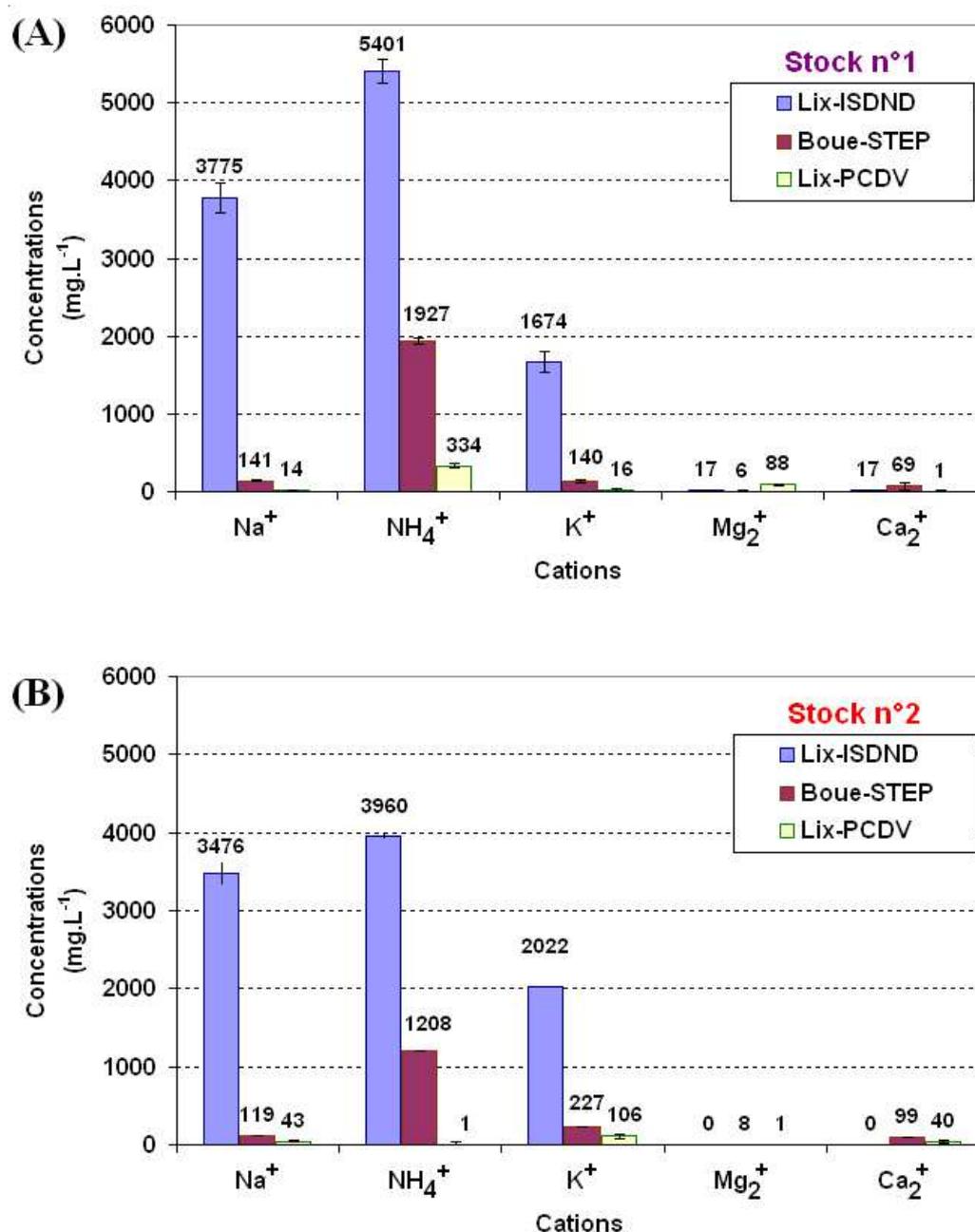


Figure 119 : Concentrations en cations dans les effluents.

Moyenne et écart-type sur l'ensemble de la période de stockage du stock n°1 (A) et du stock n°2 (B).

Des différences importantes sont observées entre les effluents. Ainsi, le lixiviat d'ISDND présente des concentrations nettement plus importantes en ions Na⁺ et K⁺ que les deux autres effluents. Les concentrations en Mg₂⁺ et Ca₂⁺ sont quant à elles inférieures à 100 mg.L⁻¹ dans l'ensemble des effluents.

Concernant l'ion ammonium, qui est le cation qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette étude, il est à noter que c'est le cation présent aux plus fortes concentrations dans l'ensemble des effluents. Il est particulièrement retrouvé dans le lixiviat d'ISDND (5,4 g.L⁻¹ pour le stock n°1 et 3,8 g.L⁻¹ pour le stock n°2) et dans une moindre

mesure dans la boue de station d'épuration. Enfin, dans le lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts, il est quasiment absent. Ainsi, une gamme de concentration en NH_4^+ très étendue (forte pour le lixiviat d'ISDND jusqu'à très faible pour le lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts) particulièrement adaptée à l'étude de l'influence de l'azote ammoniacal est obtenue en utilisant ces trois effluents.

4.1.2.1.5. Potentiel méthanogène

Des tests ont été réalisés sur les effluents du stock n°1 afin d'évaluer le potentiel méthanogène (BMP) de chaque effluent. Pour ces tests, un inoculum provenant d'un culot de 50 mL de boue de STEP centrifugée a été introduit dans des flacons à plasma contenant 100 mL de l'effluent à tester. Un témoin négatif a également été réalisé afin de déterminer la production de méthane liée à l'inoculum introduit. L'ensemble des tests a été réalisé en duplicat.

Des potentiels méthanogènes différents ont été mesurés pour chaque type d'effluent. Ainsi, le lixiviat d'ISDND et le lixiviat de PCDV présente des potentiels méthanogènes nuls alors que celui de la boue de STEP est de 0,989 L de CH_4 par litre. Ces informations mettent notamment en évidence que l'importante quantité de COD mesurée dans les lixiviats d'ISDND, correspond en fait à de la matière organique à priori difficilement biodégradable.

4.1.2.2. Dégradation des déchets lors des essais en colonnes de percolation

200 mL de chaque effluent, caractérisé dans le paragraphe précédent, ont été injectés hebdomadairement au sein de deux colonnes de percolation contenant 5 kg de déchets non dangereux reconstitués (cf. Chapitre 3, § 5 Les colonnes de percolation ou mésocosmes) pendant presque 600 jours. Ainsi, 15 litres de chaque effluent ont été injectés au sein de chaque pilote et un volume d'environ 15 litres de lixiviat a été prélevé en sortie de colonne.

Les résultats issus du suivi de ces expériences sont présentés dans la suite de ce paragraphe.

4.1.2.2.1. Suivi de la production et de la composition du biogaz

Sur la Figure 120, sont représentées les productions cumulées mesurées de biogaz (A), de CH_4 (B) et de CO_2 (C) au cours des 600 premiers jours, dans les pilotes ayant reçu le lixiviat d'installation de stockage de déchets non dangereux (Lix-ISDND 1 et 2), la boue digérée de station d'épuration (Boue-STEP 1 et 2) et le lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts (Lix-PCDV 1 et 2).

La bonne reproductibilité en terme de production de biogaz observée entre les pilotes ayant reçu les mêmes effluents durant les 200 premiers jours et notamment au moment du démarrage de la méthanogenèse (cf. écart-types faibles sur la courbe moyenne de production de biogaz de chaque duplicat, Figure 120, A), montre que le système expérimental développé spécifiquement dans le cadre de ce travail est robuste et qu'il est possible d'interpréter les différences observées entre les pilotes ayant reçu des effluents différents avec confiance. Le fait que les écart-types augmentent ensuite, traduit de légères différences de cinétiques notamment pour les deux pilotes ayant reçu le lixiviat d'ISDND.

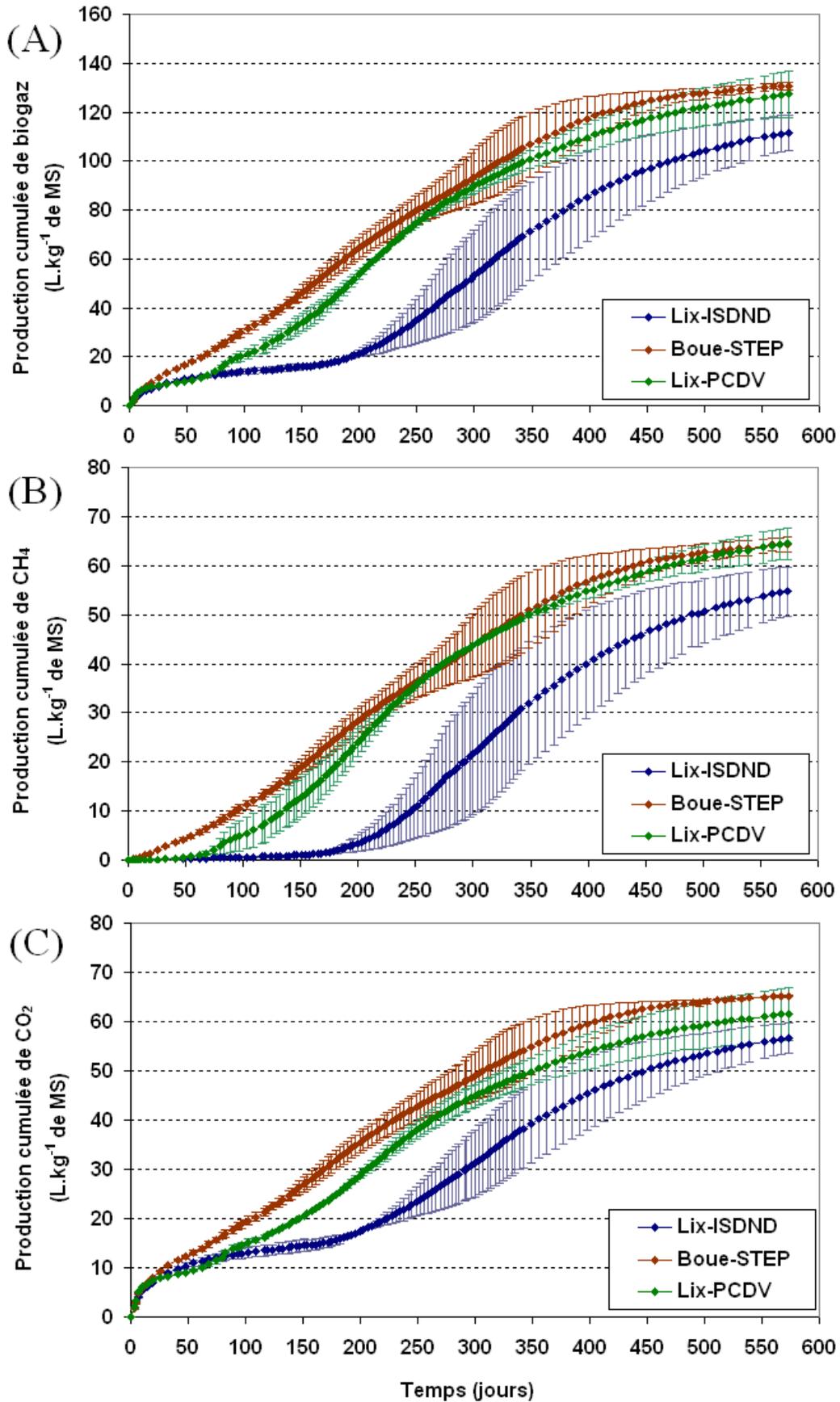


Figure 120 : Productions cumulées de biogaz (A), de CH₄ (B) et de CO₂ (C) dans les pilotes.
 (Les courbes représentent la moyenne de chaque duplicat de colonnes
 les barres d'erreurs représentent les écart-types).

On constate tout d'abord une première production d'une vingtaine de litres de biogaz par kilogramme de matière sèche, essentiellement composé de dioxyde de carbone durant les dix premiers jours dans les pilotes quelque soit l'effluent injecté. Des comportements très différents sont ensuite observés en fonction de la nature de l'effluent utilisé. Ainsi, alors que, dans les pilotes recevant le lixiviat d'installation de stockage de déchets non dangereux et le lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts, la production de biogaz stagne, dans ceux ayant reçu la boue de station d'épuration, une production de biogaz significative continue à être enregistrée. Cette production s'explique par le démarrage rapide de la production de méthane dans les pilotes ayant reçu la boue de station d'épuration, alors que dans les autres pilotes, on observe un démarrage de la méthanogenèse plus tardif (Figure 120, B). En effet, la production de méthane ne démarre qu'après environ 90 jours dans les pilotes ayant reçu les lixiviats de plateforme de compostage de déchets verts et après environ 200 jours dans ceux dans lesquels du lixiviat d'ISDND est introduit.

La caractérisation des courbes de production de méthane cumulée grâce à l'équation de Gompertz modifiée permet de déterminer le temps de latence (λ), la vitesse de production maximale de méthane (R_m) et la production cumulée totale de méthane (P) (Tableau 43).

Tableau 43 : Paramètres de Gompertz. (λ = latence ; R_m = taux de production maximum de méthane ; P = production cumulée de méthane en fin d'expérience).

Incubations	P			Rm			λ		
	(L de CH ₄ .kg ⁻¹ de MS)			(L de CH ₄ .kg ⁻¹ de MS .jour ⁻¹)			(jours)		
Lix-ISDND	54,67	±	5,08	0,25	±	0,05	214,55	±	29,19
Boue-STEP	64,33	±	1,48	0,20	±	0,03	57,60	±	5,77
Lix-PCDV	64,52	±	3,22	0,23	±	0,02	93,66	±	22,65

Ces résultats confirment que des temps de latence (λ) très différents sont observés en fonction de l'effluent recirculé. La méthanogenèse démarre ainsi beaucoup plus rapidement avec la boue de station d'épuration (à partir du jour 57,6). Il est également intéressant de comparer les valeurs maximales de production de méthane (R_m). En effet, il apparaît que la vitesse la plus rapide est obtenue pour les pilotes Lix-ISDND avec 0,25 L de CH₄ .kg⁻¹ de MS .jour⁻¹ contre 0,23 et 0,20 L de CH₄ .kg⁻¹ de MS .jour⁻¹ pour les pilotes Lix-PCDV et Boue-STEP respectivement. En ce qui concerne les productions cumulées totales de méthane, elles sont significativement plus faibles pour les pilotes Lix-ISDND et globalement identiques pour les pilotes Boue-STEP et Lix PCDV. Cependant, les expériences n'étant pas encore tout-à-fait terminées, il est probable que celles-ci puissent évoluer encore légèrement.

L'analyse de l'évolution de la composition du biogaz, notamment en dioxyde de carbone et méthane (Figure 121), permet de confirmer la mise en place rapide de la méthanogenèse dans les pilotes dans lesquels de la boue de station d'épuration a été introduite, puisque le pourcentage de méthane dans le ciel gazeux commence à augmenter dès le démarrage des expériences pour se stabiliser à une valeur de 50 % au bout de cent jours. Ensuite, il augmente progressivement jusqu'à se stabiliser vers 60 % en fin d'expérience. Dans le cas des expériences avec le lixiviat de compostage de déchets verts, du méthane commence à être produit dès le vingtième jour. La proportion de méthane dans le biogaz produit augmente ensuite pour se stabiliser autour de 55-60 % après environ 125 jours. Enfin, dans le cas des pilotes recevant des lixiviats d'ISDND, l'augmentation du pourcentage de méthane a été très lente jusqu'au 150^{ème} jour. Une accélération de l'augmentation du pourcentage de méthane dans le biogaz est ensuite observée et conduit à la stabilisation de ce dernier autour de 55-60 % à partir du jour 280 environ.

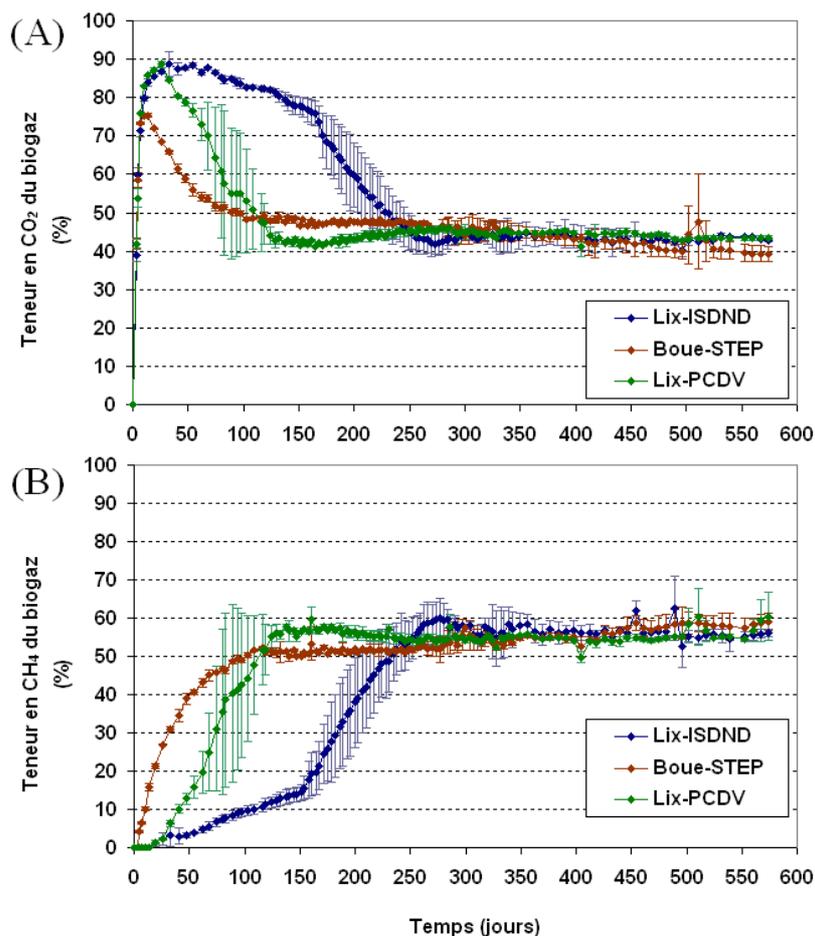


Figure 121 : Évolutions des teneurs en CO₂ (A) et CH₄ (B) dans le biogaz produit dans les pilotes.
(Les courbes représentent la moyenne de chaque duplicat de colonnes, les barres d'erreurs représentent les écart-types).

L'évolution de la teneur en oxygène dans l'ensemble des colonnes montre une disparition rapide dès le jour 4. En ce qui concerne la présence de dihydrogène, des teneurs comprises entre 14 et 18 % de la composition du biogaz ont été mesurées au jour 4 pour l'ensemble des colonnes. Cependant, il disparaît très rapidement pour ne plus être mesuré dès le jour 10 (données non présentées).

4.1.2.2.2. Suivi des paramètres physico-chimiques des lixiviats des colonnes

- **pH**

Les évolutions du pH sont similaires entre les pilotes pendant les 100 premiers jours. Le pH chute pendant les 10 premiers jours pour atteindre sa valeur minimale de 5. Ensuite, le pH opère une lente remontée, identique dans les six pilotes, pour atteindre 5,5 au jour 100. L'évolution est alors différente pour les pilotes recevant le lixiviat de PCDV car le pH remonte plus rapidement vers une valeur de 7 atteinte au jour 150, alors que pour les autres pilotes, le pH augmente lentement pour atteindre des valeurs comprises entre 6 et 6,5 au jour 200. Les valeurs mesurées avec les sondes pH en fond de colonnes deviennent ensuite difficilement exploitables du fait d'une dérive des sondes. Afin de pallier aux problèmes de mesures en continu par les sondes, des mesures de pH manuelles ont ensuite été réalisées, dans les lixiviats prélevés chaque semaine, depuis le jour 400. Entre le jour 400 et les dernières mesures, le pH des lixiviat en fond de colonnes recevant le lixiviat d'ISDND et la

boue de STEP a augmenté lentement de 7,3 à 7,5 environ, alors que celui des colonnes recevant le lixiviat de PCDV subit au contraire une légère diminution passant de 6,7 à 6,4.

- **Potentiel d'oxydo-réduction**

Les mesures de potentiel d'oxydo-réduction réalisées en continu grâce à la sonde située en fond de colonne, permettent d'observer une rapide chute du potentiel d'oxydo-réduction dans les dix premiers jours d'incubation pour atteindre -400 à -600 mV. Malheureusement, les opérations de prélèvement réalisées chaque semaine ont entraîné des variations des potentiels d'oxydo-réduction (remontée des valeurs probablement due à une légère entrée d'oxygène dans la partie basse du robinet où se trouve la sonde). Du fait de ce problème, les valeurs de potentiel ne sont pas exploitables et ne seront pas présentées plus en détails.

- **COD/CID**

L'évolution des concentrations de carbone organique et inorganique total dans les lixiviats prélevés en sortie de pilotes (moyenne des duplicats) est présentée sur la Figure 122.

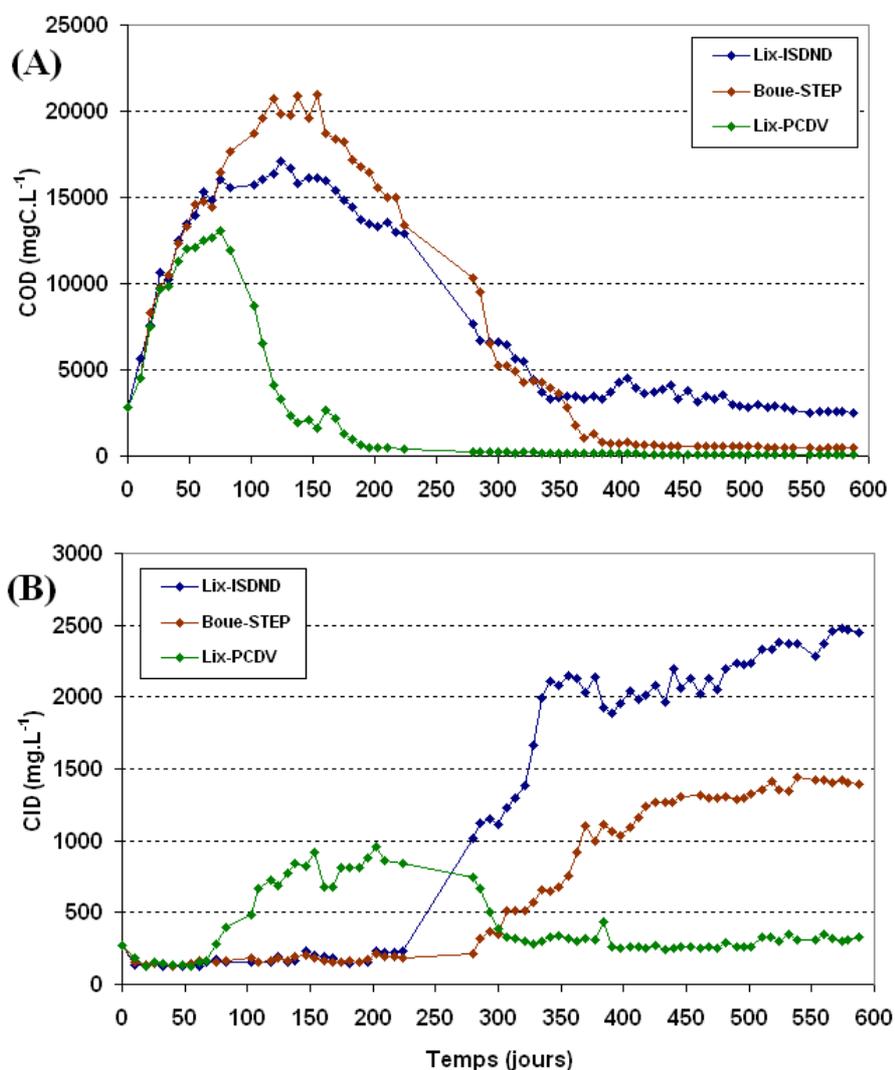


Figure 122 : Évolutions des concentrations en COD (A) et CID (B) dans les lixiviats collectés en sortie des colonnes.

(Les courbes représentent la moyenne pour chaque duplicat de colonnes).

Jusqu'au jour 30, la concentration en carbone organique dissous augmente très rapidement et de façon similaire dans l'ensemble des colonnes jusqu'à atteindre une valeur de 10 gC.L^{-1} . A partir de ce jour, les courbes vont se différencier en fonction du type d'effluent ayant été recirculé. Pour les colonnes "Lix-ISDND", la concentration en COD continue à augmenter avant de se stabiliser pendant une centaine de jours, à partir du jour 75, à une valeur d'environ 15 gC.L^{-1} . Ensuite, la diminution progressive du COD a conduit à une stabilisation du COD autour de $3,3 \text{ gC.L}^{-1}$ au jour 350. Depuis ce jour, elle diminue très lentement et est, au jour 575 de $2,56 \text{ gC.L}^{-1}$. Il est à noter que cette valeur est proche de la concentration en COD présente dans le lixiviat d'ISDND injecté (2000 mgC.L^{-1}). Le carbone organique présent dans le lixiviat et injecté dans les pilotes semble ainsi réfractaire à la digestion anaérobie, comme le confirment les résultats des tests BMP réalisés sur les effluents. Ce résultat est également en accord avec le fait que le lixiviat injecté est un lixiviat prélevé dans un casier en phase de méthanogenèse stable, généralement riche en MO difficilement dégradable (DCO dure). Pour les colonnes "Boue-STEP", la concentration en COD continue à augmenter entre les jours 30 et 110, jour à partir duquel elle se stabilise pendant environ 40 jours à des valeurs proches de 20 gC.L^{-1} . Ensuite, à partir du jour 150, la diminution progressive du COD va conduire à une stabilisation de ce dernier à $0,8 \text{ gC.L}^{-1}$ au jour 380. Depuis ce jour, elle diminue très lentement et est, au jour 575 de $0,48 \text{ gC.L}^{-1}$. Enfin, pour les colonnes "Lix-PCDV", à partir du jour 30, la concentration en COD augmente plus lentement que dans les autres pilotes pour atteindre sa valeur maximale de $12,5 \text{ gC.L}^{-1}$ au jour 75. Ensuite, une chute rapide de la concentration en COD est enregistrée, suivie d'une diminution plus lente qui va conduire à une stabilisation du COD à des valeurs inférieures à $0,25 \text{ gC.L}^{-1}$ à partir du jour 280.

La concentration en carbone inorganique dissous reste stable à 150 mgC.L^{-1} jusqu'au jour 50 pour les colonnes "Lix-PCDV". Ensuite, la concentration augmente lentement jusque environ 820 mgC.L^{-1} et y demeure pendant 150 jours. Au jour 280, la concentration de CID dans ces pilotes diminue rapidement pour se stabiliser à 300 mgC.L^{-1} . Il est intéressant de remarquer que l'augmentation du CID se produit de façon concomitante avec la diminution de la concentration en COD. L'augmentation du CID pourrait ainsi être expliquée par la dissolution sous forme de carbonate du CO_2 produit lors de la méthanogenèse. Dans les autres pilotes, la concentration en carbone inorganique dissous reste stable à 150 mgC.L^{-1} jusqu'au jour 234 pour les colonnes "Lix-ISDND" et 279 pour les colonnes "Boue-STEP". Dans les pilotes "Lix-ISDND", le CID augmente ensuite rapidement pour atteindre la valeur de $2,0 \text{ C.L}^{-1}$ au jour 340. Une augmentation plus lente conduisant à dépasser $2,5 \text{ gC.L}^{-1}$ est observée depuis. Dans les pilotes "Boue-STEP", à partir du jour 279, la concentration augmente lentement pour se stabiliser légèrement en dessous de $1,5 \text{ gC.L}^{-1}$.

- **AGV**

Les concentrations en acides lactique et formique dans les lixiviats prélevés en sortie de l'ensemble des colonnes sont nulles ou très proches de zéro. Aucune évolution significative au cours du temps n'a été enregistrée et, de ce fait, aucune représentation graphique n'est présentée pour ces acides. Les concentrations en acide acétique, acide propionique et acide butyrique sont présentées en Figure 123.

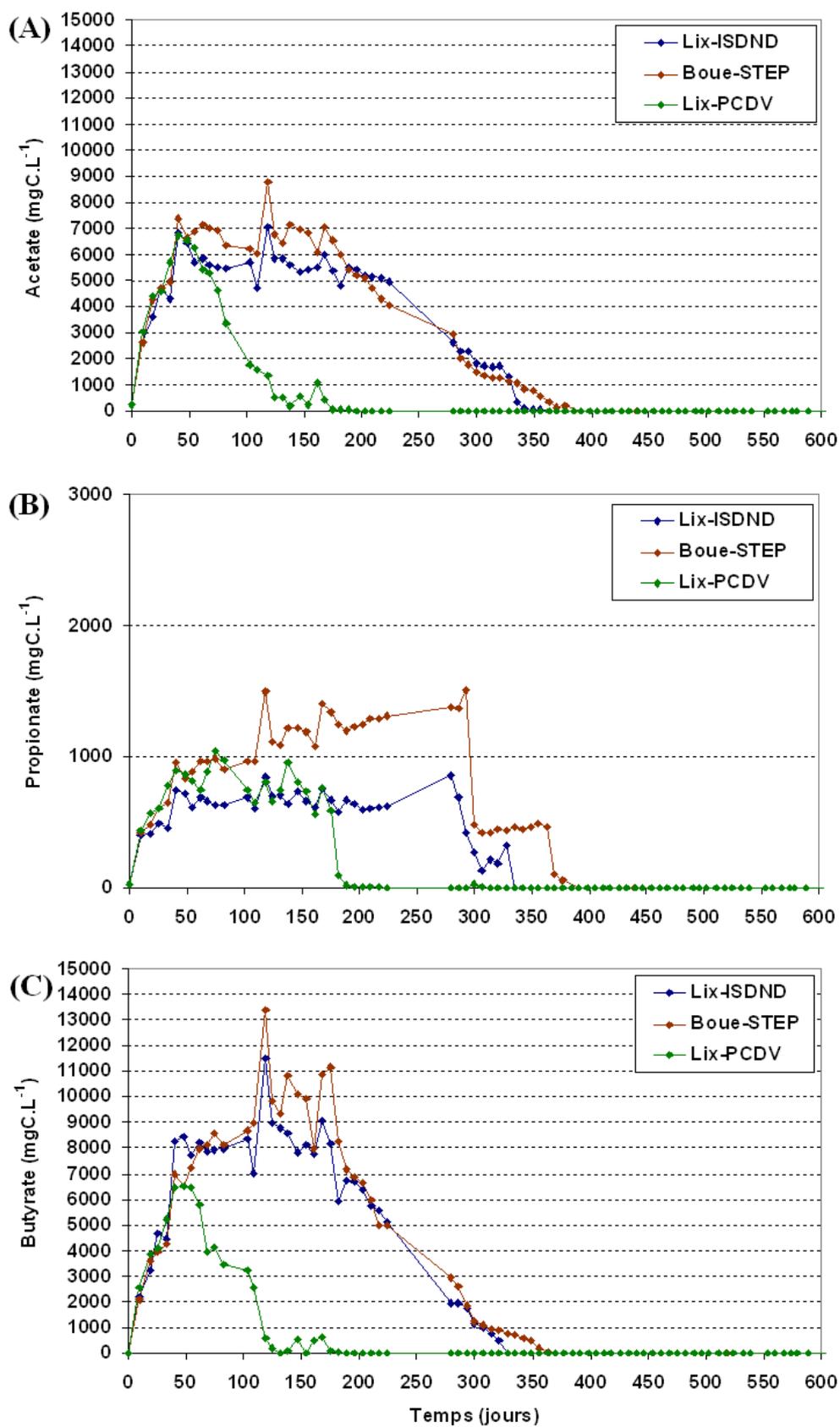


Figure 123 : Évolutions des concentrations en AGV dans les lixiviats collectés en sortie des colonnes. Acétate (A), propionate (B), butyrate (C). (Les courbes représentent la moyenne de chaque duplicat de colonnes).

L'évolution des concentrations en AGV dans l'ensemble des colonnes est identique pendant les 50 premiers jours. La concentration en acétate augmente ainsi durant cette période de 0 à 7gC.L^{-1} , celle du propionate de 0 à presque $0,7-0,8\text{gC.L}^{-1}$ et celle du butyrate de 0 à $6,5-8\text{gC.L}^{-1}$.

Ensuite les évolutions sont différentes en fonctions des effluents recirculés. Les tendances sont relativement proches pour les colonnes "Lix-ISDND" et "Boue-STEP". L'acétate se stabilise autour de 7gC.L^{-1} entre les jours 50 et 178 pour les colonnes "Boue-STEP" et 190 pour les "Lix-ISDND". La diminution est ensuite progressive pour atteindre 0 avant le jour 350 pour "Lix-ISDND" et au jour 375 pour "Boue-STEP". L'évolution de la concentration du butyrate est assez similaire à celle de l'acétate pour ces colonnes. En effet une stabilisation autour de 8gC.L^{-1} entre les jours 50 et 175 est observée pour les colonnes "Lix-ISDND". Une concentration légèrement plus importante est mesurée (11gC.L^{-1}) dans les colonnes "Boue-STEP" à la fin de cette période. La diminution est ensuite progressive pour atteindre 0 au jour 328 pour "Lix-ISDND" et vers le jour 350 pour "Boue-STEP", soit environ 25 jours avant la disparition de l'acétate dans ces mêmes colonnes. L'évolution des concentrations de propionate est différente de celle de l'acétate et du butyrate. Pour les colonnes "Lix-ISDND", la concentration du propionate se stabilise entre 600 et 700mgC.L^{-1} entre les jours 50 et 375. Pour les colonnes "Boue-STEP", la concentration augmente lentement depuis le jour 50 pour atteindre 1500mgC.L^{-1} au jour 290. La concentration chute ensuite soudainement dans les colonnes recevant la boue de STEP puis se stabilise avant de chuter de nouveau brutalement jusqu'à 0mgC.L^{-1} au jour 370. Cette chute en deux étapes s'explique par le fait que les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne du duplicat de colonnes au sein desquelles le propionate ne disparaît pas exactement au même moment. Pour les colonnes recevant le lixiviat d'ISDND la concentration en propionate chute également une première fois autour du jour 290 puis chute à nouveau jusqu'à atteindre 0mgC.L^{-1} au jour 330. Cette chute en deux temps s'explique par les mêmes raisons que les colonnes Boue-STEP.

En ce qui concerne les évolutions des concentrations d'AGV dans les pilotes "Lix-PCDV", alors qu'elles étaient similaires à celles des autres pilotes entre les jours 0 et 50, à partir du jour 50 les évolutions sont différentes car les concentrations d'acétate et de butyrate commencent immédiatement à diminuer. Elles sont proches de zéro au jour 130 mais oscillent entre zéro et 1gC.L^{-1} jusqu'au jour 170 à partir duquel elles se stabilisent définitivement à zéro. Pour le propionate, les concentrations sont stables entre les jours 50 et 170 aux alentours de 750mgC.L^{-1} puis elles chutent subitement pour atteindre et ce maintenir à 0gC.L^{-1} . Il est à noter que cette chute est concomitante avec la disparition totale de l'acétate et du butyrate. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus précédemment lors des incubations de déchets reconstitués en batch réalisées lors de l'étude de l'effet de la température (cf. Chapitre 4, § 2.1.1 Digestion anaérobie des déchets en conditions mésophiles) et s'explique par le fait qu'en présence d'acétate la réaction d'oxydation syntrophique du propionate qui produit dans une première étape de l'acétate est thermodynamiquement peu favorable. Ainsi cette réaction ne se produit que lorsque la concentration en acétate devient négligeable.

Au delà du jour 375 l'analyse de plusieurs échantillons n'a révélé aucune présence quantifiable d'AGV dans aucun des pilotes.

- **Cations**

L'évolution des concentrations en cations dans les lixiviats récupérés en fond de colonnes est présentée sur la Figure 124 pour quatre cations (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , et Ca^{2+}).

L'évolution de la concentration en Mg^{2+} n'a pas été représentée graphiquement car aucune différence significative n'est observée en fonction du type d'effluents injectés. Les valeurs initiales de la concentration en ion Mg^{2+} sont d'environ 36 mg.L^{-1} , elles augmentent ensuite jusqu'à environ 200 mg.L^{-1} entre les jours 50 et 100 puis diminuent lentement depuis cette période.

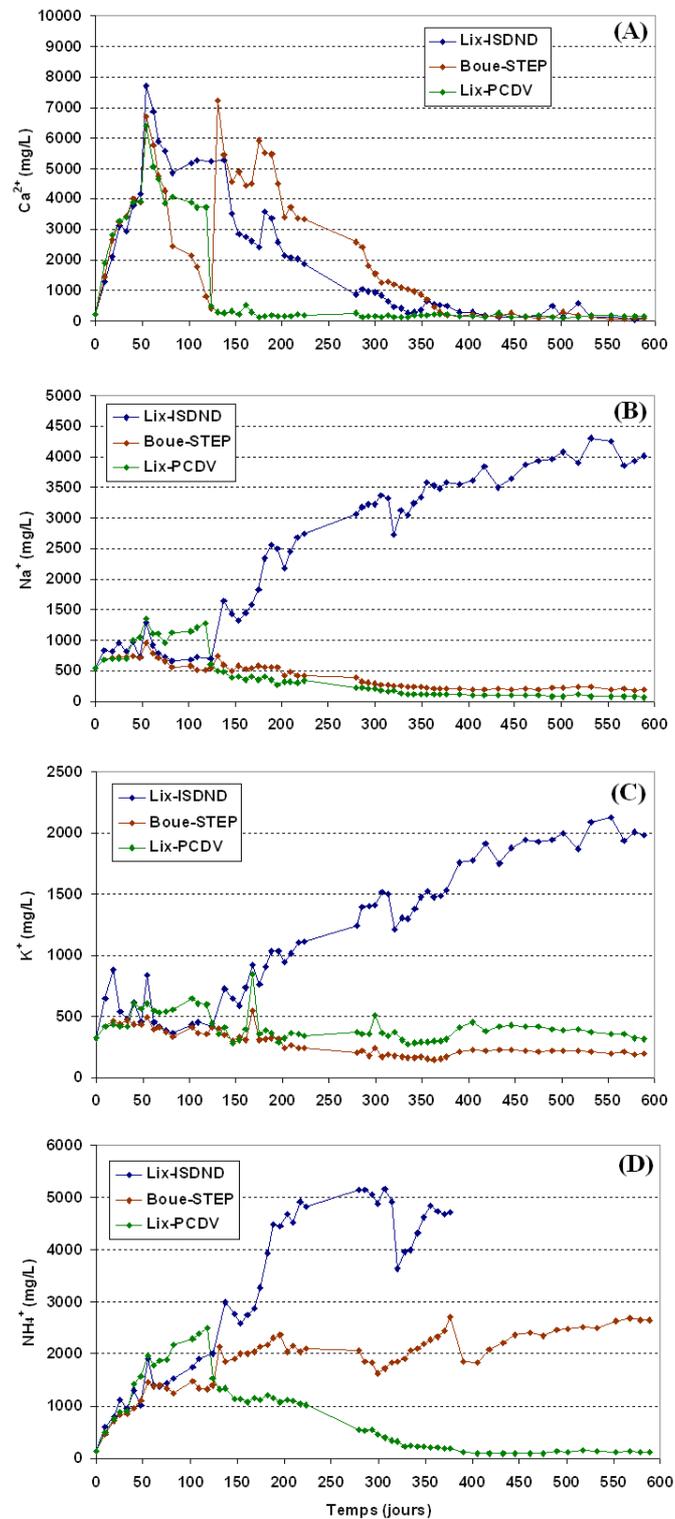


Figure 124 : Évolutions des concentrations en cations des lixiviats collectés en sortie des colonnes.

Ca^{2+} (A), Na^+ (B), K^+ (C), NH_4^+ (D).

(Les courbes représentent la moyenne de chaque duplicat de colonnes).

L'évolution des concentrations en cations dans les lixiviats récupérés en fond de colonnes est identique pour toutes les colonnes pendant les cinquante premiers jours, puis restent proches jusqu'au jour 125. D'importantes différences sont ensuite observées. La plus remarquable concerne la très forte augmentation des concentrations en Na^+ , K^+ , NH_4^+ dans les lixiviats issus des colonnes recevant les lixiviats d'ISDND. En effet, à partir du jour 125, les concentrations de ces trois ions, présents en quantités importantes dans les lixiviats d'ISDND, augmentent très fortement pour atteindre, aux jours 550, $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ et $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ pour Na^+ et K^+ respectivement et semblent se stabiliser. En ce qui concerne l'ion NH_4^+ pour les colonnes Lix-ISDND, les données ne sont pas disponibles après le jour 350 en raison de l'obtention de valeurs aberrantes lors de l'analyse des échantillons. Cependant, la valeur était, au jour 350, atteint les 5 g.L^{-1} et semblait tendre à se stabiliser. Il est à noter que ces valeurs sont proches de celles retrouvées dans les stocks de lixiviat d'ISDND ($[\text{Na}^+] \approx 3,4\text{-}3,7 \text{ g.L}^{-1}$, $[\text{K}^+] \approx 1,6\text{-}2,0 \text{ g.L}^{-1}$, $[\text{NH}_4^+] = 3,8\text{-}5,4 \text{ g.L}^{-1}$).

Il semble donc que le lixiviat d'ISDND introduit ait mis 125 jours pour migrer de haut en bas de la colonne. Cela semble être également le cas pour les autres effluents, car on remarque une augmentation brutale de la concentration en ions NH_4^+ en bas des colonnes recevant la boue de STEP (car cet effluent est également concentré en NH_4^+) et une diminution de la concentration en ions Na^+ , K^+ et NH_4^+ dans celles recevant du lixiviat de PCDV (car cet effluent contient de faibles quantités de ces ions) également au jour 125. D'autre part, le fait qu'au 350^{ème} jour les concentrations en sortie de colonne soient proches de celles mesurées dans les effluents, semble indiquer que l'effluent a alors chassé l'ensemble de la phase liquide présente au sein du déchet après la saturation-désaturation initiale à l'eau. Ces interprétations, bien que certainement moins précises que celles qui auraient pu découler d'un traçage au lithium par exemple, permettent d'avoir une première caractérisation du fonctionnement hydrodynamique des pilotes. Ces éléments sont importants pour l'interprétation des données de ces expériences qui ne peuvent être analysées aussi simplement que celles obtenues lors des expériences de "type batch" décrites jusqu'à présent dans ce manuscrit.

Ainsi les cations détectés en sortie de colonne avant le jour 125 proviennent du déchet et sont soit simplement lixiviés ou produits lors de la biodégradation, comme les ions ammoniums qui sont formés par le processus d'ammonification lors de l'hydrolyse des déchets. Ceci est d'autant plus vrai pour les colonnes ayant reçu du lixiviat de PCDV, car cet effluent est très faiblement chargé en cations. Ainsi, par exemple, les teneurs en NH_4^+ proches de 2 g.L^{-1} observées durant cette période sont bien dues à la dégradation des déchets et mettent en évidence que des niveaux relativement élevés peuvent ainsi être atteints lors de la dégradation anaérobie de la matière organique. Ainsi, si ce même lixiviat est directement recirculé sans traitement il y a un fort risque d'accumulation de l'azote ammoniacal à des concentrations potentiellement inhibitrices de la méthanogenèse car il n'existe pas de processus de dégradation efficace de ce dernier en condition anaérobie.

4.1.2.2.3. Suivi des compositions isotopiques du CH_4 et du CO_2

L'évolution des compositions isotopiques du dioxyde de carbone et du méthane produits par les différents pilotes ainsi que celle du facteur de fractionnement apparent sont présentées sur la Figure 125. Il est tout d'abord à noter que des résultats reproductibles entre pilotes ayant reçu les mêmes effluents sont obtenus comme en témoignent les faibles écarts-types observés, cela traduit ainsi que des évolutions métaboliques similaires s'y produisent. Il est alors possible d'interpréter ces résultats avec confiance pour comparer l'effet des différents effluents sur la mise en place des voies métaboliques méthanogènes.

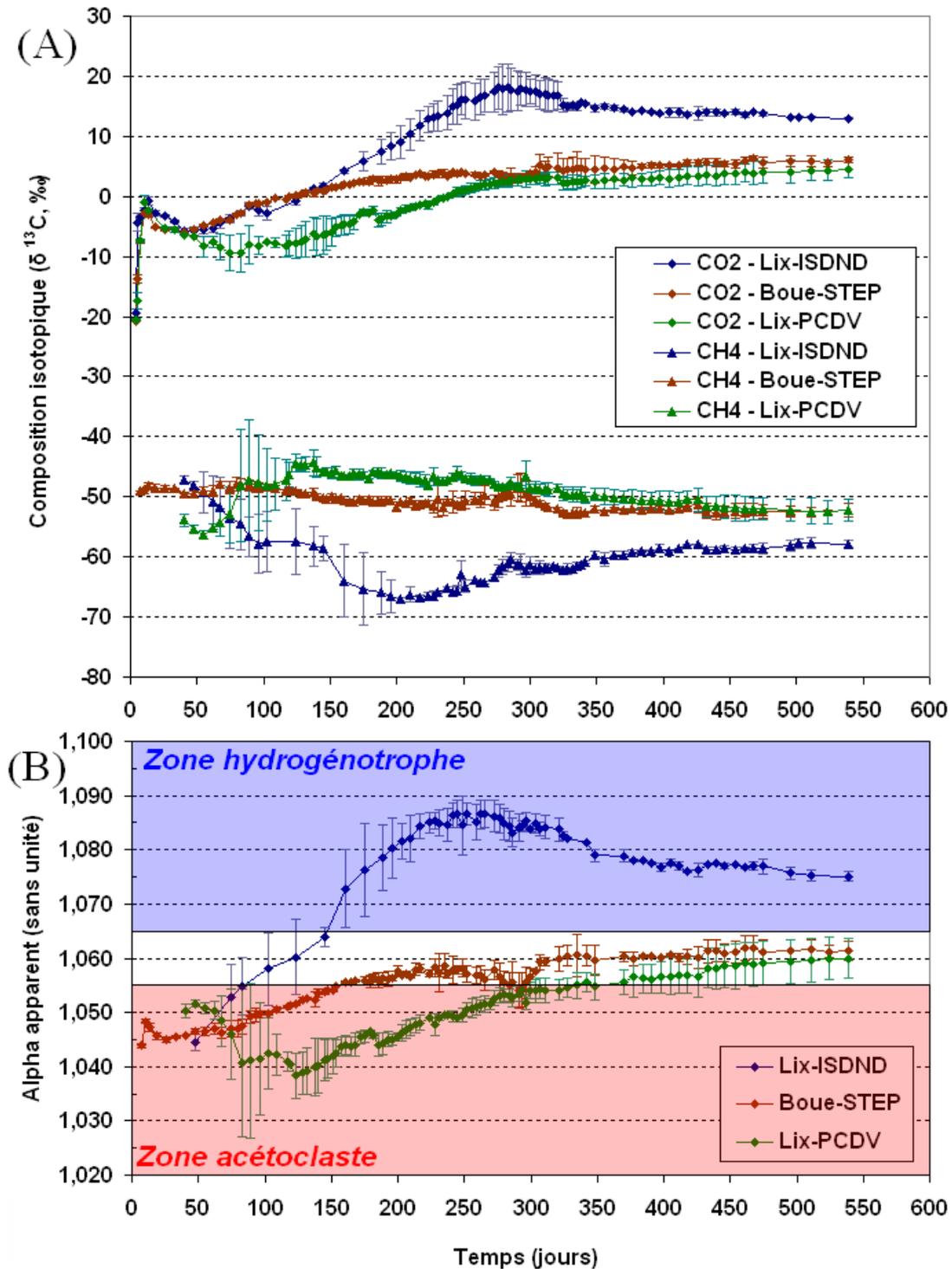


Figure 125 : Évolutions de la composition isotopique du CH_4 et du CO_2 (A) et du facteur de fractionnement apparent (B) dans les pilotes.

(Les courbes représentent la moyenne de chaque duplicat de colonnes, les barres d'erreurs représentent les écart-types).

Les signatures isotopiques du méthane pour les trois types de pilotes se situent initialement à des valeurs caractéristiques d'une production de méthane par méthanogenèse acétoclaste (valeurs supérieures à -60 ‰) (-47 ‰, -49 ‰ et -54 ‰ respectivement pour Lix-ISDND, Boue-STEP et Lix-PCDV) (Figure 125, A). Le calcul des facteurs de fractionnement

apparent confirme cette observation car les valeurs initiales obtenues sont bien inférieures à 1,055 (zone en rouge sur la Figure 125, B). Ensuite, les résultats d'analyse isotopique du méthane et du dioxyde de carbone montrent que des métabolismes différents se mettent en place en fonction des effluents injectés. Une première analyse de ces seuls résultats indique que dans les pilotes recevant le lixiviat d'ISDND, dès que le méthane commence à être produit de façon significative, soit à partir du jour 150, la composition isotopique du méthane passe sous la valeur de -60 ‰ et le facteur de fractionnement apparent devient supérieur à 1,065 indiquant ainsi que le méthane est produit quasi exclusivement par méthanogenèse hydrogénotrophe dans ces pilotes. Dans les pilotes recevant la boue de station d'épuration, la composition isotopique du méthane reste assez constante et caractéristique (-50 ‰) d'une production plutôt de type acétoclaste. Cependant, d'après les valeurs de facteur de fractionnement apparent, le méthane produit à partir du jour 150 le serait à la fois par voie hydrogénotrophe et acétoclaste et cela jusqu'à la fin des mesures réalisées (entre les zones bleue et rouge sur la Figure 125, B). Enfin, dans les pilotes dans lesquels du lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts est introduit, le méthane semble majoritairement produit par la voie acétoclaste jusqu'au jour 350 (zone en rouge sur la Figure 125, B) puis par un mélange des métabolismes acétoclaste et hydrogénotrophe. Ces premières interprétations seront mises en regard de l'ensemble des résultats afin d'être affinées dans la partie suivante.

4.1.3. Interprétations de l'ensemble des résultats

L'ensemble des résultats présentés précédemment a été analysé afin d'étudier le couplage entre les réactions d'hydrolyse et de méthanogenèse et l'effet de la qualité des effluents sur la mise en place des voies métaboliques méthanogènes.

4.1.3.1. Couplage hydrolyse/méthanogenèse et zonation des processus

L'hydrolyse semble se mettre en place rapidement dans l'ensemble des colonnes comme en témoigne la baisse rapide du pH dans les dix premiers jours et l'augmentation des concentrations en COD et AGV dès le démarrage des expériences. L'évolution par la suite des concentrations en COD dans les lixiviats collectés en fond de colonnes apporte des informations sur le couplage entre les réactions d'hydrolyse et de méthanogenèse. En effet, lorsque la réaction d'hydrolyse de la MO est plus rapide que celle de la méthanogenèse, la concentration en COD du milieu a tendance à augmenter. Dans le cas inverse la concentration en COD du milieu a tendance à diminuer. La dégradation de la MO lors de l'hydrolyse ne débute par contre pas simultanément dans tous les pilotes. En effet, 154 et 161 jours sont nécessaires avant que le COD diminue dans les pilotes "Boue-STEP" et "Lix-ISDND" respectivement. L'hydrolyse apparaît même être inhibée dans ces pilotes puisque les valeurs de COD et d'AGV restent stables pendant une longue période. Les quantités importantes d'AGV qui se sont accumulées sont probablement à l'origine de cette inhibition car dans l'ensemble des pilotes la concentration de ces derniers se stabilise à des valeurs proches et comprises dans la gamme des concentrations potentiellement inhibitrices de l'hydrolyse. La chute du COD intervient plus rapidement dans les pilotes "Lix-PCDV" puisqu'elle débute dès le jour 75. A partir de ce jour, dans ces pilotes, la méthanogenèse semble ainsi avoir démarrée même en bas de la colonne alors que dans les autres pilotes "Lix-ISDND" et "Boue-STEP", la méthanogenèse ne semble pas y avoir débutée. Il est à noter qu'il est alors surprenant d'observer que dans les pilotes recevant la boue de station d'épuration une production de méthane soit enregistrée durant cette période.

Une mise en place différenciée de la méthanogenèse en fonction de la hauteur de déchets pourrait être à l'origine de ce phénomène. Ainsi, dans les colonnes recevant la boue de station d'épuration il est probable que la méthanogenèse ait débuté dans le haut de la colonne

mais qu'elle ne soit pas encore active dans le bas de cette dernière. Cela semble cohérent avec le fait que l'injection de la boue digéré de STEP se fasse par le haut des colonnes. En effet, l'introduction de cet effluent possédant une flore méthanogène active est probablement à l'origine du démarrage très rapide de la méthanogenèse. L'hypothèse envisageable pour expliquer la diminution plus précoce du COD dans les lixiviats récoltés en fond des colonnes "Lix-PCDV", serait alors une mise en place de la méthanogenèse plus rapide dans le bas du "massif" de déchets dans ces pilotes.

Afin d'essayer de valider cette hypothèse, des analyses de PCR-quantitative ont été réalisées à partir des échantillons liquides prélevés en fond de colonnes après extraction de l'ADN. Les évolutions des populations Archées et Bactéries sont présentées en Figure 126. Les amorces utilisées sont ARC787F, ARC915F & ARC1059R pour les archées et BAC338F, BAC516F & BAC805R pour les bactéries.

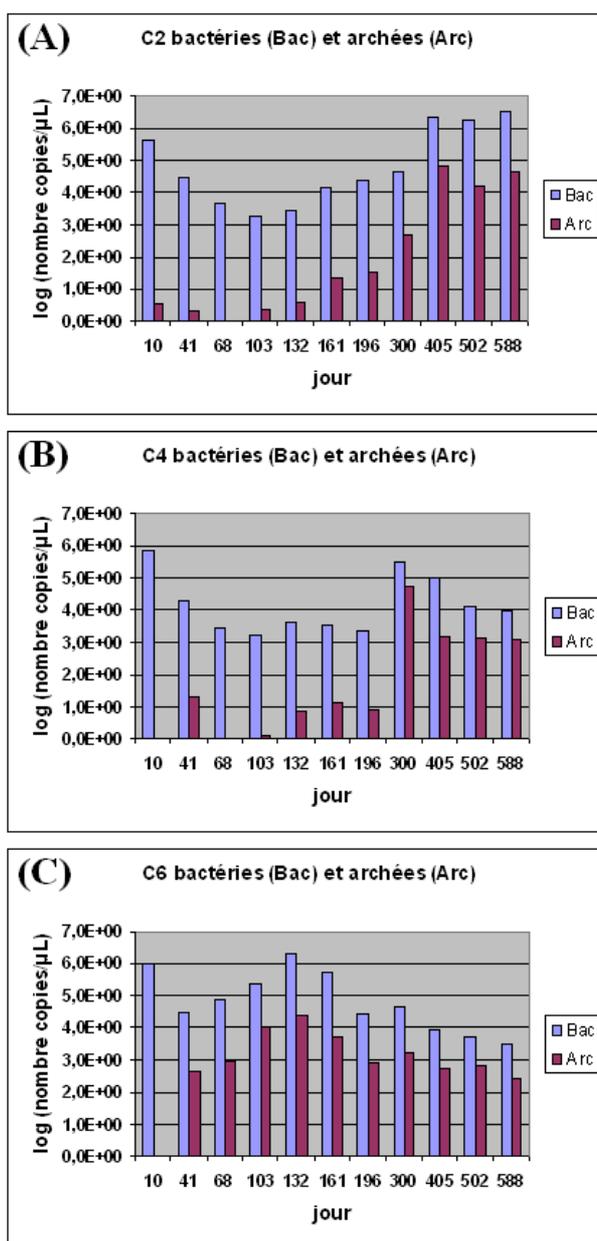


Figure 126 : Évolution du nombre d'archées et de bactéries dans les colonnes. C2 (Lix-ISDND) (A), C4 (Boue-STEP) (B) et C6 (Lix-PCDV) (C).

Les résultats semblent mettre en évidence une augmentation de la population d'Archées bien plus précoce (à partir du jour 41) dans la colonne recevant le lixiviat de PCDV (Figure 126, C) que dans celles recevant la boue de STEP (Figure 126, B) et le lixiviat d'ISDND (Figure 126, A). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse formulée d'une mise en place plus rapide de la méthanogenèse en bas des colonnes « Lix-PCDV ». Une des explications envisagée est un comportement hydrodynamique différent dans ces colonnes en raison de la nature du liquide réinjecté qui entraînerait sa percolation plus rapide. Cependant, l'analyse des courbes d'évolution des concentrations en cations dans les colonnes ne permet pas de mettre en évidence une telle différence de comportements (et donc d'élution des effluents) entre les différentes colonnes. En effet, la chute brutale de la concentration de l'ensemble des cations enregistrée autour du jour 125 semble indiquer que le lixiviat de PCDV injecté au sommet de la colonne arrive en bas (car ces cations sont peu concentrés dans l'effluents injecté) à cette période comme dans les autres pilotes. En l'absence d'un réel traçage au lithium par exemple, il est tout de même difficile d'écarter cette hypothèse.

4.1.3.2. Effet de la qualité des effluents sur la mise en place des voies métaboliques

Dans les pilotes ayant reçu le lixiviat d'ISDND au jour 50, même si à cette période, la production de méthane est très faible, la première mesure de $\delta^{13}\text{CH}_4$ située à -47 ‰ indique clairement une production de méthane due à un métabolisme acétoclaste. A partir du jour 50, la signature isotopique du méthane diminue lentement, passe sous la barre des -60 ‰ (limite haute de la zone hydrogénotrophe) et continue à diminuer jusqu'au jour 200 pour atteindre -67 ‰. L'analyse de la courbe de teneur en méthane et de la courbe du facteur de fractionnement apparent pour les pilotes Lix-ISDND permet de mettre en évidence qu'à partir du jour 150 environ, la teneur en méthane dans le biogaz commence à augmenter rapidement et que cette augmentation est concomitante avec le passage du facteur de fractionnement en zone hydrogénotrophe. Le méthane est ainsi produit par méthanogenèse hydrogénotrophe lors de la phase active de production.

Le méthane dans ces colonnes semble donc être initialement produit par une méthanogenèse acétoclaste. Cette dernière semble ensuite être inhibée puisqu'une méthanogenèse de type hydrogénotrophe se met en place après qu'une flore méthanogène hydrogénotrophe capable de réaliser l'OSA se soit développée. Des résultats obtenus par PCR quantitatives avec des amorces spécifiques des différentes familles d'archées (*Methanosaetaceae* : Mst702F, Mst753F & Mst862R ; *Methanosarcinaceae* : Msc380F, Msc492F & Msc828R ; *Methanomicrobiales* : MMB282F, MMB749F & MMB832R) confirment cette hypothèse puisqu'ils montrent une augmentation importante de certains membres de la famille des *Methanomicrobiales* qui sont uniquement capables de réaliser la méthanogenèse hydrogénotrophe à partir du jour 200. L'implication de cette même famille d'archées a été mise en évidence dans l'OSA dans les incubations I3 (forte concentration en inoculum). Ce résultat conforte ainsi le fait qu'une OSA se soit mise en place dans ces pilotes. Des observations FISH ont permis de mettre en évidence des bactéries et des archées du genre *Methanoculleus* (Figure 127, images A et B). Ces observations sont bien cohérentes avec l'hypothèse de la mise en place de la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate. La forte concentration en NH_4^+ présente dans le lixiviat d'ISDND pourrait être à l'origine de ce changement de métabolisme comme nous avons pu l'observer lors des incubations d'acétate à forte concentration en azote ammoniacal (incubation C4 et I).

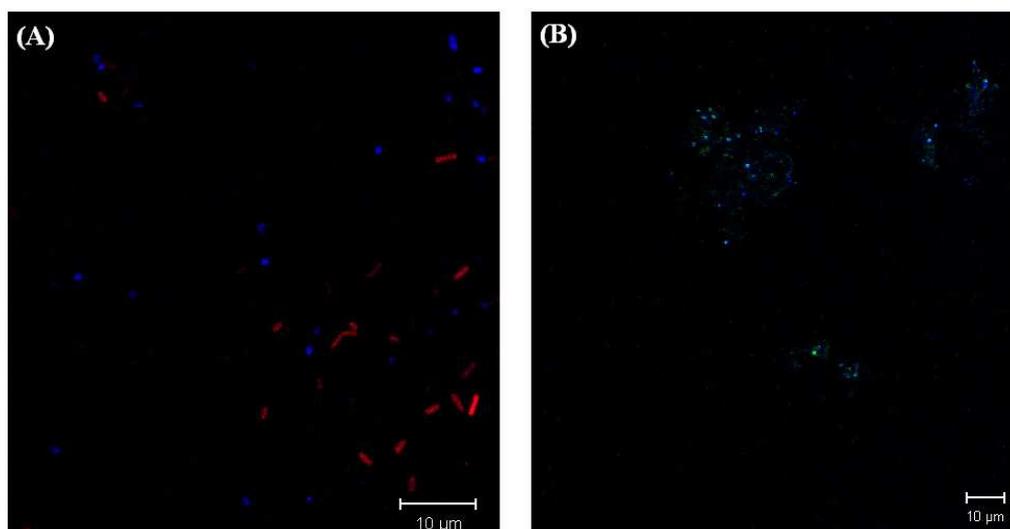


Figure 127 : Observation FISH de Lix-ISDND au jour 300.

(A) Sondes MG1200b-Cy5 (bleu), EUB338-Cy3 (vert) ;
 (B) Sondes MG1200b-Cy5 (bleu), ARC915-FITC (vert).

Dans les pilotes au sein desquels de la boue de station d'épuration a été injectée, du fait du démarrage de la production de méthane quasi-immédiate, des mesures de la composition isotopique du méthane sont disponibles dès le jour 7. Pendant les 50 premiers jours, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ se situe vers -49 ‰ et sont, de même que le facteur de fractionnement calculé pour cette période (situé vers 1,045), caractéristiques de méthane produit par méthanogenèse acétoclaste. Depuis le jour 50, la signature isotopique du méthane produit reste relativement stable aux alentours de -50 ‰. Une analyse plus précise révèle tous de même une très faible diminution du $\delta^{13}\text{CH}_4$ de 3 ‰ en 500 jours. La signature isotopique du dioxyde de carbone connaît, quant à elle, à l'inverse une augmentation. Entre les jours 50 et 150, l'augmentation est d'environ 6 ‰ puis reste ensuite relativement stable jusqu'au jour 550 pour se situer à 6 ‰. Alors que le $\delta^{13}\text{CH}_4$ se situe vers -50 ‰, ce qui est caractéristique de la méthanogenèse acétoclaste, l'augmentation du $\delta^{13}\text{CO}_2$ entraîne une augmentation du facteur de fractionnement apparent vers une production de méthane du à un mélange de métabolisme (acétoclaste et hydrogénotrophe). Il est donc fort probable que les deux métabolismes interviennent dans la production de méthane rapidement dans les pilotes comme semble l'indiquer l'augmentation du facteur de fractionnement apparent aux environs de la centaine de jours d'expérience.

Enfin dans les pilotes ayant reçus du lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts la première mesure de $\delta^{13}\text{CH}_4$ située à -53 ‰ indique une production de méthane probablement due à un métabolisme acétoclaste. A partir du jour 50, la signature isotopique du méthane commence à augmenter (jusque -44 ‰ au jour 123) alors que celle du dioxyde de carbone diminue pour atteindre environ -10 ‰. Une production de méthane à partir de l'acétate peut conduire à ce phénomène. De plus les compositions isotopiques du méthane qui augmentent de -56 ‰ à -44 ‰ entre les jours 50 à 120 traduisent probablement une consommation rapide d'un stock d'acétate limité (enrichissement en ^{13}C de l'acétate au cours de sa consommation). Le fait que cette période d'évolution rapide des compositions isotopiques corresponde à une diminution des concentrations de COD, d'acétate et de butyrate conforte cette hypothèse. Des observations FISH (Figure 128, la couleur turquoise provient de la cohybridation du signal bleu (sonde MS1414) et vert (sonde ARC915)), ont de plus mis en évidence la présence majoritaire d'archées de la famille *Methanosarcinaceae*. Ces micro-organismes étant capables de réaliser notamment la méthanogenèse acétoclaste, l'ensemble des éléments en notre possession est donc bien cohérent avec le fait qu'un métabolisme

acétoclaste domine la production du méthane. A partir du jour 120 et ce jusqu'à la fin des mesures, le $\delta^{13}\text{CH}_4$ va ensuite lentement diminuer (de -44 ‰ à -52 ‰) alors que le $\delta^{13}\text{CO}_2$ va lentement augmenter (de -10 ‰ à 5 ‰). Les valeurs de $\delta^{13}\text{CH}_4$ indiquent que le méthane continue à être produit par méthanogenèse acétoclaste mais l'augmentation de $\delta^{13}\text{CO}_2$ semble indiquer que la proportion de méthanogenèse hydrogénotrophe va en augmentant. Le calcul du facteur de fractionnement apparent confirme cette interprétation. Ceci pourrait être dû à la mise en place de l'oxydation syntrophique du propionate qui produit du méthane à la fois par méthanogenèse hydrogénotrophe et acétoclaste.

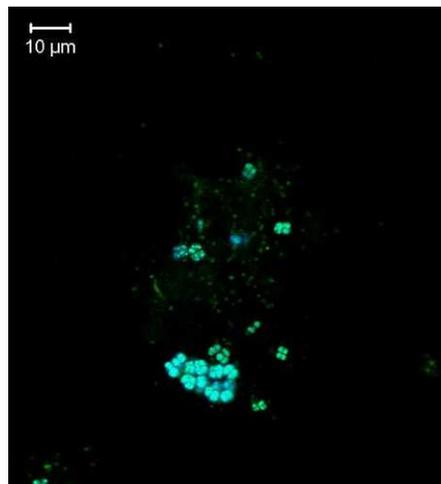


Figure 128 : Observation FISH de Lix-PCDV au jour 200.
Sondes MS1414+ helper-Cy5 (bleu), ARC915-FITC (vert).

Ainsi, des différences importantes de métabolisme responsable de la production de méthane selon l'effluent utilisé pour la recirculation ont été mises en évidence grâce notamment aux mesures de composition isotopique réalisées au cours des 600 premiers jours d'expériences en colonnes de percolations. En effet, l'injection du lixiviat d'ISDND entraîne la mise en place d'un métabolisme hydrogénotrophe alors que celle des autres effluents (boue de STEP et lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts) conduit à la mise en place d'un métabolisme de type acétoclaste dans un premier temps, suivi d'un mélange des deux métabolismes (acétoclaste / hydrogénotrophe).

4.1.4. Discussion relative aux paramètres opérationnels

4.1.4.1. Démarrage de la méthanogenèse

L'une des différences les plus marquantes entre les résultats obtenus pour les différents effluents concerne les temps de latence observés. En effet, en fonction du type d'effluent injecté, le processus de méthanogenèse ne se met pas en place au même moment (Figure 120) :

- L'utilisation de la boue de STEP permet le démarrage immédiat de la production de méthane. Ce démarrage précoce est probablement dû à l'introduction d'une flore méthanogène active en quantité importante, apportée par la boue, dans le massif de déchet.
- L'utilisation du lixiviat d'ISDND ne conduit quant à lui au démarrage de la production de méthane qu'après un temps de latence très important de 200 jours. Ce résultat est assez inattendu car le lixiviat contient des micro-

organismes méthanogènes. Une possible inhibition temporaire du processus (inhibition de la méthanogenèse acétoclaste entraînant la mise en place d'un métabolisme de type hydrogénotrophe *via* une OSA) est envisageable en raison des caractéristiques intrinsèques du lixiviat utilisé. En effet, les fortes concentrations en cations et tout particulièrement en NH_4^+ présentes dans le lixiviat utilisé peuvent conduire à ce type d'inhibition comme nous l'avons déjà observé lors des incubations d'acétate réalisées lors des séries d'expériences C (cf. Chapitre 4, § 3.1 Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la dégradation de l'acétate en conditions mésophiles).

- Enfin, les résultats obtenus lors de l'utilisation du lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts sont assez étonnants puisque la production de méthane démarre avant le jour 100 dans ces pilotes, soit bien avant ceux ayant reçu le lixiviat d'ISDND. Même s'il est possible que cet effluent contienne des micro-organismes méthanogènes, il est probable qu'ils soient présents en faible quantité. D'autre part, le fait que la méthanogenèse semble démarrer plus rapidement dans le bas de la colonne que dans les autres pilotes avec cet effluent reste à ce jour inexplicable. Un suivi hydrodynamique plus approfondi des pilotes aurait certainement permis d'apporter des éléments permettant d'expliquer ce phénomène et peut être le démarrage rapide de la méthanogenèse dans ces pilotes.

Les résultats de cette expérience montrent donc que la présence en quantités importantes des méthanogènes dans l'effluent recirculé, les cinétiques de croissance des populations méthanogènes, ainsi que l'inhibition de la méthanogenèse sont autant de facteurs pouvant avoir une influence directe sur le démarrage effectif de la méthanogenèse.

4.1.4.2. Cinétiques de dégradation

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que les temps de latence avant le démarrage de la méthanogenèse sont différents en fonction du type d'effluent recirculé. En ce qui concerne les vitesses de production maximum de méthane (obtenues *via* la modélisation des courbes de production de méthane cumulée par l'équation de Gompertz modifié), elles ne sont pas réellement différentes (0,25, 0,20 et 0,23 L de CH_4 .kg⁻¹ de MS .jour⁻¹ pour les pilotes "Lix-ISDND", "Boue-STEP" et "Lix-PCDV" respectivement) (Tableau 43). Il semblerait donc que le type d'effluent recirculé ait plutôt un effet sur les temps de latence avant démarrage de la production de méthane que sur la cinétique de production de méthane à proprement parler. Il est ainsi intéressant de noter que des vitesses de production de méthane proches sont obtenues dans les différents pilotes bien que les voies métaboliques empruntées y soient différentes. On peut tout de même remarquer que c'est dans les pilotes dans lesquels la production de méthane démarre le plus tard (Lix-ISDND) et que le métabolisme est de type hydrogénotrophe *via* une OSA, que la vitesse de production est la plus rapide.

4.1.4.3. Rendements de dégradation

L'allure des courbes (cf. Figure 120) suggère que la production de biogaz commence à se stabiliser dans l'ensemble des pilotes. Il est donc possible de dresser un premier bilan sur les rendements de dégradation des déchets obtenus en fonction du type d'effluent recirculé. Toutefois, ce bilan réalisé au 575^{ème} jour ne peut pas être considéré comme un bilan final.

Pour réaliser ce bilan, les quantités de biogaz, méthane et dioxyde de carbone effectivement produites lors de cette expérience en condition de recirculation ont été

comparées avec la production mesurée pour le même déchet lors d'expériences réalisées en microcosme en condition saturée (Tests BMP). Le Tableau 44 présente les productions de biogaz, méthane et dioxyde de carbone enregistrées lors de ces essais réalisés sur 40g de déchets reconstitués (identiques en termes de composition et de granulométrie à ceux utilisés dans les colonnes de percolation), placés en condition saturée, dans une solution tampon de carbonate, inoculés avec un inoculum d'ISDND et placés à 35°C en condition anaérobie. Dans ces conditions une production de biogaz de 126 L.kg⁻¹ de MS composé d'environ 50 % de méthane et 50 % de dioxyde de carbone a été mesurée.

Tableau 44 : Productions de biogaz, CH₄ et CO₂ obtenues lors des expériences en microcosmes.

	Biogaz (L.kg ⁻¹ de MS)	CH₄ (L.kg ⁻¹ de MS)	CO₂ (L.kg ⁻¹ de MS)
Production maximale mesurée lors des tests réalisés en microcosmes (conditions saturées à 35°C)	126,63	64,34	62,44

En comparant ces valeurs de production, que nous considérerons comme étant la production maximale attendue, avec celles observées lors des expériences en colonne de percolation (Tableau 45) les rendements de production présentés dans le Tableau 46 ont été déterminés.

Tableau 45 : Productions de biogaz, CH₄ et CO₂ au jour 575 lors des expériences en colonnes de percolation.

	Lix-ISDND (L.kg ⁻¹ de MS)	Boue-STEP (L.kg ⁻¹ de MS)	Lix-PCDV (L.kg ⁻¹ de MS)
Production mesurée de biogaz	111,52	130,71	127,26
Production mesurée de CO₂	56,56	65,22	61,57
Production mesurée de CH₄	54,67	64,33	64,52

Tableau 46 : Rendements de dégradation au jour 575 lors des expériences en colonnes de percolations.

		Lix-ISDND	Boue-STEP	Lix-PCDV
Rendement calculé par rapport à la production mesurée en microcosmes	% de biogaz	88,07	103,22	100,50
	% de CO₂	90,59	104,46	98,61
	% de CH₄	84,98	99,99	100,29

Toutefois, afin d'être plus rigoureux, la quantité de carbone potentiellement méthanisable introduite avec les effluents lors de leur injection au cours des 575 jours d'expérience dans les colonnes ne peut être négligée et doit être prise en compte dans les bilans. Cela d'autant plus que les trois effluents présentent des potentiels méthanogènes très différents. Il est donc nécessaire d'intégrer à ces bilans la quantité de méthane qui peut être potentiellement produite par l'effluent lui même au cours de l'expérimentation.

Les résultats des essais permettant le calcul du potentiel exact de méthane associé au volume d'effluent injecté ont été présentés dans la partie résultats. Le potentiel méthanogène des 15 litres de ces effluents ayant été injectés est donc considéré. Les lixiviats d'ISDND et de PCDV n'ont pas produit de méthane lors de ces essais. En ce qui concerne la boue de STEP, pour 14,82 litres de boue injectés au jour 575, le potentiel de méthane associé est de 14,65 L.

Tableau 47 : Rendements de dégradation des déchets dans les colonnes de percolations en tenant compte du potentiel méthanogène des effluents recirculés au jour 575

		Lix-ISDND	Boue-STEP	Lix-PCDV
Rendement calculé par rapport à la production mesurée en microcosmes	% de CH ₄ / microcosmes	84,98	99,99	100,29
	% de CH ₄ / microcosmes & théorique effluent	84,98	96,43	100,29

Enfin, pour être totalement rigoureux, il est également nécessaire de tenir compte de l'influence sur la production de méthane des prélèvements liquides contenant du carbone organique qui aurait pu être méthanisé s'il n'avait pas été soustrait des pilotes. Des quantités moyennes totales de COD de 10,94, 11,54 et 4,683 g de carbone ont été prélevées lors des prélèvements liquides au cours des 575 jours d'expériences pour les pilotes "Lix-ISDND", "Boue-STEP" et "Lix-PCDV" respectivement. Si l'on considère que l'ensemble de ce carbone aurait pu se transformer en biogaz (approximation grossière car une partie du COD apparaît être récalcitrante à la biodégradation), 20, 21 et 8,7 L soit, ramené à notre masse de déchet sec, 3,31, 3,49 et 1,41 L.kg⁻¹ de MS de biogaz auraient pu être produits. Cette correction n'a pas été effectuée car il est difficile de connaître les proportions de méthane et dioxyde de carbone dans le biogaz qui aurait ainsi pu être produit. En tout état de cause, au vu des faibles quantités de biogaz estimées, l'influence des prélèvements liquides apparaît minime et ne remet pas en cause les rendements de dégradation présentés dans le Tableau 47.

Il apparaît ainsi que les rendements de production de méthane en tenant compte du potentiel méthanogène des effluents injectés (Tableau 47) sont plus élevés et proches de 100 % pour les colonnes dans lesquelles le lixiviat de PCDV (100 %) a été recirculé. Avec la boue de STEP un rendement légèrement plus faible est observé (96 %). Enfin un rendement bien plus faible est observé pour les pilotes dans lesquels le lixiviat d'ISDND a été recirculé (85 %). Il est cependant à noter que la production de méthane dans ces pilotes qui a débuté plus tardivement n'est pas encore totalement terminée. Il n'est donc pas impossible qu'*in fine*, un rendement proche de 100 % soit également obtenu. Il est ainsi difficile de conclure à ce jour, sur l'influence du type d'effluent recirculé sur les rendements de dégradation des DND. En tout état de cause, si influence il y a, cette dernière semble relativement minime.

D'autre part, il est intéressant de remarquer que les conditions de recirculation mises en place lors de ces expériences (fréquence et quantité injectée) permettent en un temps raisonnable, à l'échelle de vie d'une ISDND, d'obtenir des rendements de dégradation identiques à ceux obtenus en conditions saturées. Ce résultat est toutefois à nuancer car dans le cadre de ces expériences la densité des déchets était plus faible que celle généralement observée sur site et le déchet a été saturé à l'eau initialement.

4.1.4.4. Effet d'une forte concentration en azote ammoniacal

L'effet d'une circulation d'un effluent contenant une forte concentration d'azote ammoniacal sur la dégradation de déchets a pu être étudié lors du suivi des pilotes dans lesquels le lixiviat d'ISDND a été injecté. En effet, la concentration mesurée dans cet effluent est de 5400 mg.L⁻¹ pour le stock n°1, ce qui correspond à la valeur la plus haute des concentrations testées dans les expériences présentées précédemment (cf. Chapitre 4, § 3 Effet de la concentration en azote ammoniacal sur la méthanogenèse). Les temps de latence importants avant le démarrage de la méthanogenèse observés dans ces pilotes et la mise en place d'un métabolisme hydrogénotrophe *via* une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate, sont deux des effets potentiellement attribuable à cette concentration élevée puisqu'ils concordent avec ceux observés lors des incubations d'acétate à fortes concentrations

en azote ammoniacal. Tout comme lors de ces expériences en microcosme, aucun effet significatif sur la quantité finale de méthane produite n'a été enregistré lors de ces expériences mettant à nouveau en évidence le fait que la mise en place d'une oxydation syntrophique de l'acétate n'entraîne pas de diminution du rendement de production de méthane.

4.1.5. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette expérience, utilisant un dispositif permettant de simuler le devenir d'un volume élémentaire de déchets au sein d'une ISD bioactive, montrent clairement que la nature de l'effluent recirculé a un impact important essentiellement sur la mise en place de la méthanogenèse dans le massif de déchets. Ainsi, l'introduction d'une boue digérée de station d'épuration et d'un lixiviat de plateforme de compostage de déchets vert permettent un démarrage plus rapide de la méthanogenèse qu'avec un lixiviat d'ISDND (effluent le plus souvent recirculé). Ce résultat n'est cependant pas généralisable à l'ensemble des lixiviats car celui utilisé dans le cadre de ce travail présente des caractéristiques intrinsèques particulières notamment en termes de concentration en azote ammoniacal.

Dans le cadre de ce travail, l'un des résultats particulièrement intéressant réside dans le fait que l'injection d'un lixiviat d'ISDND chargé en azote ammoniacal conduit à des phénomènes identiques à ceux observés lors des expériences réalisées précédemment en microcosme (incubation d'acétate). En effet, dans ces différentes expériences un temps de latence important et une mise en place d'une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate (et donc la méthanogenèse hydrogénotrophe) plutôt qu'une réaction de méthanogenèse acétoclaste sont observés. L'impact de ce changement de métabolisme sur le rendement final de production de méthane reste à vérifier en continuant le suivi de ces expérimentations mais, s'il existe, il devrait être de faible ampleur. Dans ces expériences, la vitesse de production de méthane une fois que cette dernière a débuté n'est pas non plus significativement différente à forte concentration en NH_4^+ . L'ensemble de ces résultats semble indiquer qu'à priori, une ISDND bioactive peut être, après acclimatation, performante en termes de production de méthane à de relativement hautes concentrations en azote ammoniacal. Ainsi, dans les ISDND recirculant du lixiviat brut au sein desquelles l'azote ammoniacal s'accumule progressivement, il est possible qu'une acclimatation permettant la mise en place d'un métabolisme de type OSA puisse se produire expliquant ainsi pourquoi la production de méthane puisse s'y maintenir. Cependant, au-delà d'une certaine concentration en azote ammoniacal une inhibition totale des processus n'est pas à exclure.

La fin du suivi, ainsi que l'autopsie des colonnes de percolation devraient permettre d'apporter les informations nécessaires à une meilleure compréhension des résultats obtenus lors de ces essais simulant le fonctionnement d'une ISDND bioactive.

4.2. Codigestion d'un mélange biodéchets/déchets verts

4.2.1. Introduction

Durant le printemps, les méthaniseurs doivent faire face à un afflux important de déchets verts. Il a pu être constaté dans ces méthaniseurs une diminution dans la production du méthane après introduction d'importantes quantités de déchets verts. Une des hypothèses soulevée est que la dégradation des déchets verts puisse entraîner une production importante d'azote ammoniacal dans le méthaniseur, inhibant alors la méthanogenèse (Guichardaz 2008). Deux séries d'expériences ont été lancées pour étudier ce phénomène :

- La première série d'expériences a pour but de vérifier que l'introduction d'une quantité croissante de déchets verts conduit bien à une augmentation de la concentration en azote ammoniacal et d'en étudier l'effet sur la dégradation anaérobie. Des incubations de biodéchets mélangés avec une quantité croissante de déchets verts (0, 25, 50, 75 et 100 % (en MV)) ont été réalisées à 35°C et 55°C en reproduisant les conditions de méthaniseurs de déchets en terme d'humidité (*i.e.* méthanisation humide).
- La seconde série d'expériences a été réalisée pour tenter d'évaluer si l'augmentation de la concentration en azote ammoniacal induite par l'introduction massive de déchets verts pouvait être responsable de l'inhibition constatée du processus de digestion anaérobie des digesteurs de déchets dans de tels cas de figure. Des incubations avec des conditions similaires à celle d'un méthaniseur ont été effectuées (*i.e.* méthanisation humide). Ces incubations ont été réalisées à 55°C, avec des biodéchets et un inoculum provenant d'un méthaniseur thermophile de déchets non dangereux préalablement acclimaté à consommer le biodéchet reconstitué. Après une première incubation de biodéchets, lorsque la production de biogaz a atteint les 2/3 de la production théorique attendue, des biodéchets ont été réinjectés, mélangés soit avec 8 g.L⁻¹ de NH₄⁺ (BN) soit avec 75 % de déchets verts (BV). Un témoin est réalisé en réinjectant seulement des biodéchets (B).

4.2.2. Incubation de différents mélanges biodéchets / déchets verts

La nomenclature de la première série d'expérience est donnée dans le Tableau 48.

Tableau 48 : Nomenclature des expériences en microcosmes.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	[NH ₄ ⁺] (g.L ⁻¹)
BG1-35 (1, 2 et 3)	Boue digéré de STEP	100 % Biodéchets / 0 % Déchets verts	5 g de MV	Solution carbonate utilisée pour ajuster le taux de MS à 90 %	35	0
BG2-35 (1, 2 et 3)		75 % Biodéchets / 25 % Déchets verts				
BG3-35 (1, 2 et 3)		50 % Biodéchets / 50 % Déchets verts				
BG4-35 (1, 2 et 3)		25 % Biodéchets / 75 % Déchets verts				
BG5-35 (1, 2 et 3)		0 % Biodéchets / 100 % Déchets verts				
BG1-55 (1, 2 et 3)	Boue de digesteur thermophile	100 % Biodéchets / 0 % Déchets verts	5 g de MV	Solution carbonate utilisée pour ajuster le taux de MS à 90 %	55	0
BG2-55 (1, 2 et 3)		75 % Biodéchets / 25 % Déchets verts				
BG3-55 (1, 2 et 3)		50 % Biodéchets / 50 % Déchets verts				
BG4-55 (1, 2 et 3)		25 % Biodéchets / 75 % Déchets verts				
BG5-55 (1, 2 et 3)		0 % Biodéchets / 100 % Déchets verts				

4.2.2.1. Résultats expérimentaux obtenus

Les cinq séries d'essais réalisées en microcosmes avec différentes proportions d'un mélange biodéchets / déchets verts, reproduisent les conditions opérationnelles de digesteur

de déchets en condition humide (taux d'humidité de 90 %). Elles ont été réalisées à 35°C et 55°C afin de vérifier l'impact de la proportion de déchets verts sur la digestion anaérobie à ces deux températures couramment utilisées dans les méthaniseurs. Un suivi des gaz, du pH ainsi que des concentrations de différents cations et acides organiques a été réalisé et est présenté dans la suite de cette partie.

4.2.2.1.1. Analyse de la phase gazeuse

A 35°C, la production de biogaz a lieu dans les 10 premiers jours puis se stabilise ensuite. La majeure partie du gaz produit est du dioxyde de carbone (600 mL), un peu d'hydrogène (environ 125 mL pour BG1-35 et BG2-35 et environ 35 mL pour les autres essais BG3-35, BG4-35 et BG5-35) et quelques mL de méthane (moins de 20 mL). A 55°C, le biogaz est produit pendant les 10 premiers jours d'incubation puis se stabilise également. Pour BG1-55, 500 mL de CO₂ et 200 mL d'H₂ sont produits. Pour BG2-55, BG3-55 et BG4-55, 800 mL de CO₂, 100 mL de méthane et entre 150 et 400 mL d'H₂ sont produits. Enfin, le comportement de BG5-55 est différent. En effet, dans cette série d'incubations, au contraire des autres, une production significative de méthane débute rapidement. L'évolution de la production de biogaz se différencie de celle des autres essais à partir du jour 7, jour où la production de méthane démarre.

4.2.2.1.2. Analyse de la phase liquide

- pH

Le pH initial des incubations est de 8,38 (Figure 129). Pendant l'étape d'hydrolyse, le pH au sein de la phase liquide chute rapidement à des valeurs très basses (minimum 3,61 dans l'incubation contenant 100 % de biodéchets à 35°C) puis s'y stabilise pour la majorité des incubations jusqu'à la fin. Une seule des séries d'incubations (BG5-55) se comporte différemment. En effet, dans ces incubations, le pH remonte au dessus de 8. Il est à noter qu'il s'agit des seules incubations au sein desquelles une production significative de méthane a été enregistrée. A 35°C il est intéressant de remarquer que plus la proportion de biodéchets est importante plus le pH atteint une valeur basse.

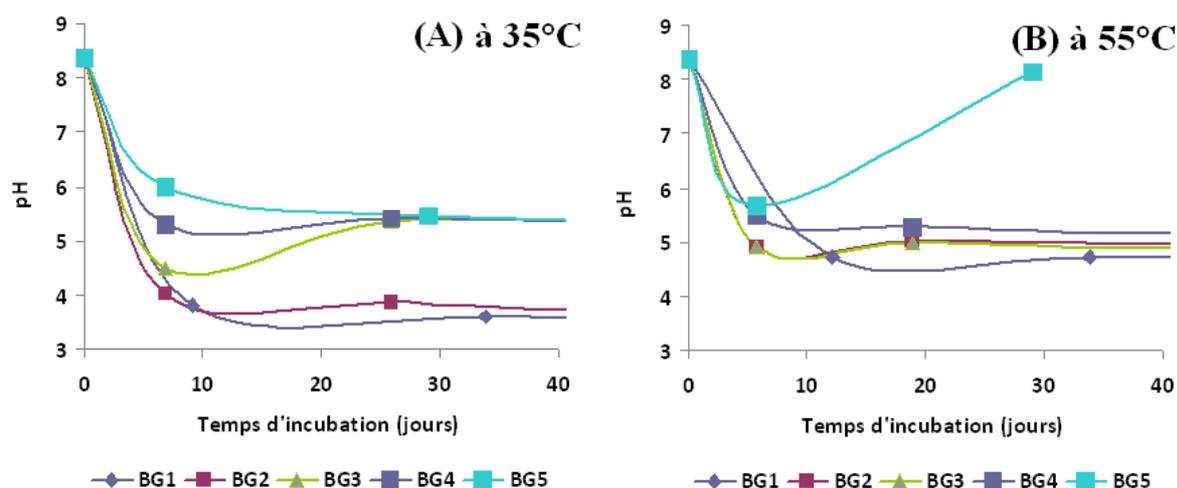


Figure 129 : Évolution du pH des bioréacteurs BG à 35°C (A) et à 55°C (B).

100 % biodéchets (BG1), 75 % biodéchets / 25 % déchets verts (BG2), 50 % biodéchets / 50 % déchets verts (BG3), 25 % biodéchets / 75 % déchets verts (BG4), 100 % déchets verts (BG5).

Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des incubations de chaque série.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

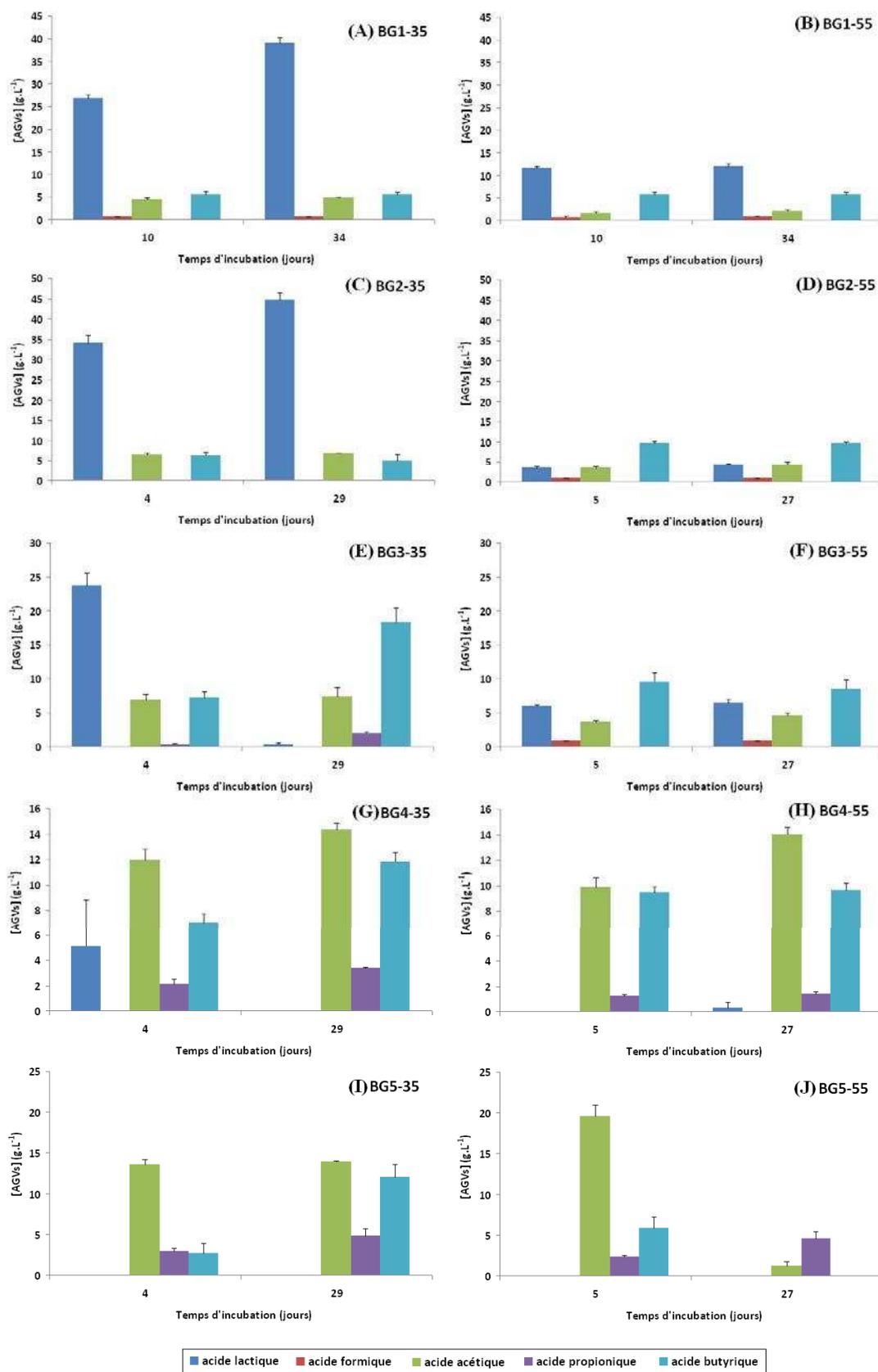


Figure 130 : Concentrations en acides organiques des bioréacteurs BG.

(Les bâtons représentent la moyenne de chaque triplicat, les barres d'erreurs représentent l'écart-type).
 100 % biodéchets (BG1) à 35°C (A) et à 55°C (B), 75 % biodéchets / 25 % déchets verts (BG2) à 35°C (C) et à 55°C (D), 50 % biodéchets / 50 % déchets verts (BG3) à 35°C (E) et à 55°C (F), 25 % biodéchets / 75 % déchets verts (BG4) à 35°C (G) et à 55°C (H), 100 % déchets verts (BG5) à 35°C (I) et à 55°C (J).

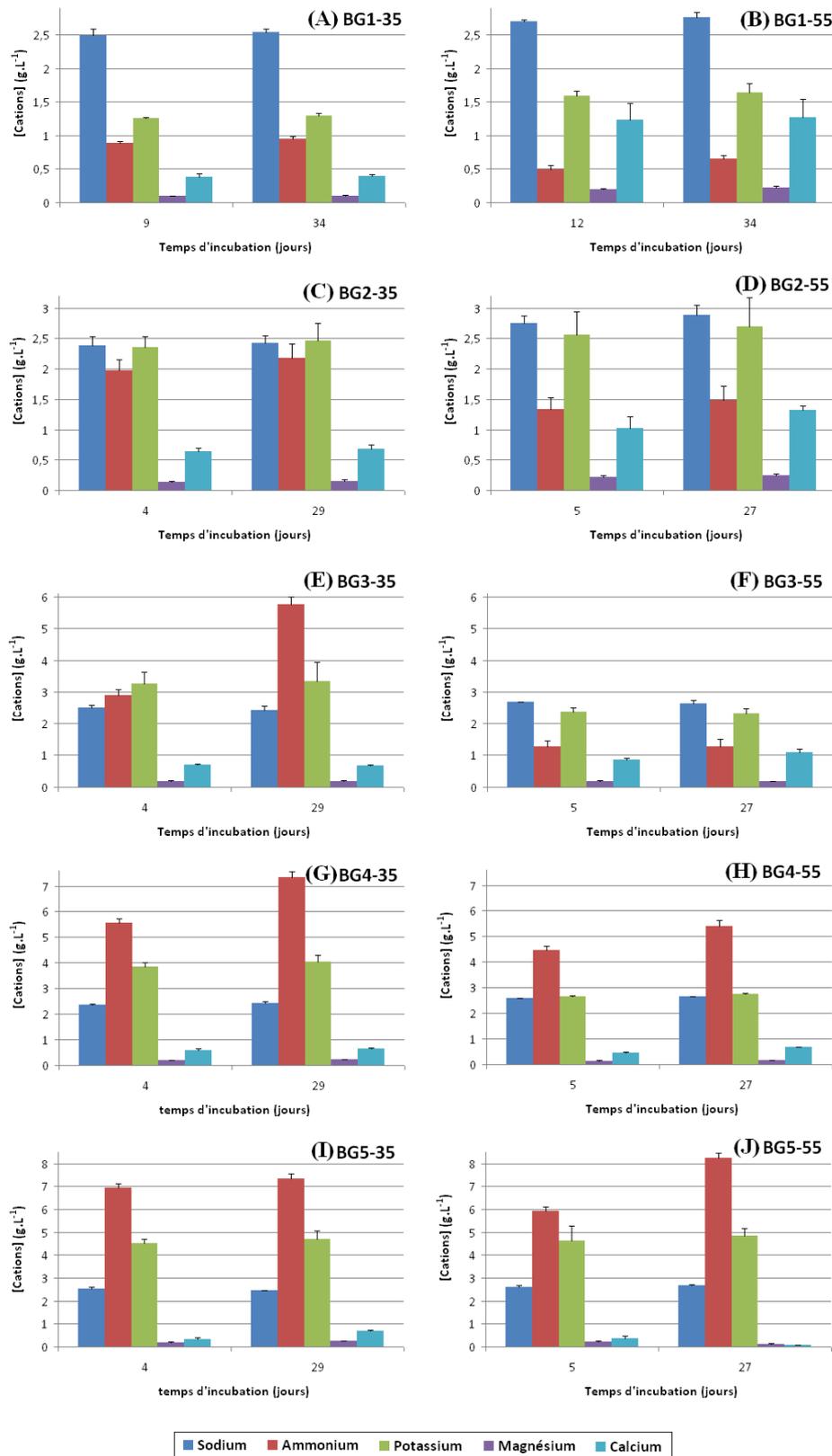


Figure 131 : Concentrations en cations (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+) des bioréacteurs BG.
 (Les bâtons représentent la moyenne de chaque triplicat, les barres d'erreurs représentent l'écart-type).
 100 % biodéchets (BG1) à 35°C (A) et à 55°C (B), 75 % biodéchets / 25 % déchets verts (BG2) à 35°C (C) et à 55°C (D), 50 % biodéchets / 50 % déchets verts (BG3) à 35°C (E) et à 55°C (F), 25 % biodéchets / 75 % déchets verts (BG4) à 35°C (G) et à 55°C (H), 100 % déchets verts (BG5) à 35°C (I) et à 55°C (J).

- **AGV**

Les concentrations en acides organiques mesurées dans la phase liquide des différents essais sont présentées dans la Figure 130 (attention les échelles sont différentes). La concentration en acide lactique est plus importante dans les microcosmes contenant au moins 50 % de biodéchets et tout particulièrement à 35°C. Elle atteint d'ailleurs des valeurs très élevées (supérieures à 40 g.L⁻¹) Au contraire, les concentrations en acétate, propionate et butyrate sont plus élevées dans les microcosmes contenant plus de 50 % de déchets verts. Enfin, les concentrations en acide formique sont très faibles pour l'ensemble des essais. La série (BG5-55) présente un comportement différent. En effet, entre les jours 5 et 27, l'acide acétique et l'acide butyrique disparaissent presque totalement de la phase liquide alors que dans les autres incubations elles ont plutôt tendance à stagner voire à augmenter.

- **Cations**

De même que pour les acides organiques, les concentrations de cinq cations dans la phase liquide des incubations ont été déterminées et sont présentées dans la Figure 131 (attention les échelles sont différentes). Dans l'ensemble des essais, la concentration en sodium est relativement similaire et stable (environ 2,5 g.L⁻¹). Elle peut ainsi servir de référence afin de comparer les concentrations des cations entre les différents essais.

L'observation de la Figure 131 permet de mettre en évidence une augmentation de la concentration en ions ammonium et potassium lorsque le pourcentage de déchets verts augmente et cela que ce soit à 35 ou 55°C. La concentration en ion ammonium est comprise entre 0,5 g.L⁻¹ pour les BG1 et 8,2 g.L⁻¹ pour BG5. Les niveaux en ions magnésium et calcium sont faibles, moins de 0,5 g.L⁻¹ et 1,25 g.L⁻¹ respectivement.

- **COD**

Les concentrations en COD et CID sont stables pendant les incubations au cours du temps, excepté pour la série BG5-55 où le COD chute après le jour 5. Les niveaux de COD diminuent avec l'ajout croissant de déchets verts et sont compris entre 15 gC.L⁻¹ et 27 gC.L⁻¹ à 35°C et 15 gC.L⁻¹ et 33 gC.L⁻¹ à 55°C au jour 5.

4.2.2.2. Discussion

Lors de ces expériences, des proportions croissantes de déchets verts ont été introduites avec un biodéchet. Au cours de ces incubations, simulant les conditions opérationnelles d'une méthanisation humide, la phase d'hydrolyse a eu lieu. Cependant, cette phase a conduit à la libération de quantités très importantes d'ions, d'acides organiques et à une diminution importante du pH. L'étape de méthanogenèse n'ayant pas eu lieu, excepté pour une des séries (BG5-55), la discussion se focalisera sur l'effet des différents mélanges biodéchets / déchets verts sur les produits libérés lors de la phase d'hydrolyse principalement. L'effet de la température (35°C vs 55°C) pourra également être discuté.

- **Effet de la proportion de déchets verts sur la production d'acides organiques**

Une chute de pH plus importante dans les incubations mésophiles des séries BG1-35 et BG2-35 (100 % et 75 % de biodéchet) est observée. L'analyse des concentrations en acides organiques révèle des concentrations en acide lactique particulièrement élevées pour ces deux séries d'incubations avec des valeurs maximales de l'ordre de 45 g.L⁻¹ (Figure 132). De telles concentrations expliquent probablement les valeurs de pH de 4 atteintes dans ces deux séries

d'incubations. Le tracé de la concentration d'acide lactique maximale atteinte au cours des 30 premiers jours d'incubations en fonction du pourcentage de déchet vert utilisé, met en évidence que l'acide lactique est produit préférentiellement à 35°C et aux faibles teneurs en déchets verts. L'acide lactique semble ainsi provenir de l'hydrolyse du biodéchet reconstitué. Le fait que les concentrations soient nulles lors des incubations contenant 100 % de déchets verts confirme cette hypothèse.

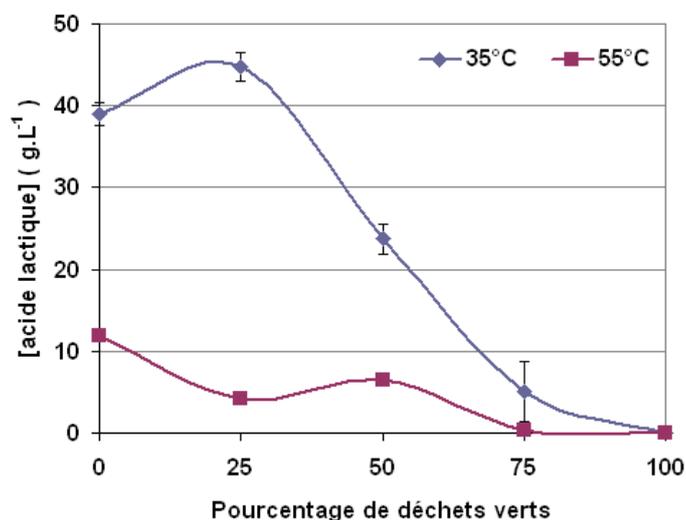


Figure 132 : Concentrations maximales en acide lactique en fonction de la teneur en déchets verts à 35°C et 55°C.

(Moyenne de chaque triplicat, les barres d'erreurs représentent l'écart-type).

Cette production d'acide lactique en quantité importante est particulièrement intéressante car ce composé peut être considéré comme une molécule à haute valeur ajoutée car il est le monomère utilisé pour former une nouvelle génération de matière plastique biodégradable (PLA: poly(acide lactique)). Ainsi l'exploitation de ces résultats dans les travaux de recherche sur le bioraffinage actuellement en plein essor pourrait s'avérer être très intéressante.

Une autre tendance générale à souligner est la proportion plus importante d'acides acétique, propionique et butyrique à 35°C comme à 55°C lorsque la teneur en déchets verts est de 50 % et plus. L'acide propionique est d'ailleurs totalement absent lorsque la teneur en biodéchets est de 100 ou 75 %.

En conclusion, il semblerait ainsi que lorsque la proportion de biodéchets est importante, les étapes d'hydrolyse et d'acidogenèse orientent les voies métaboliques vers la production d'acide lactique (particulièrement à 35°C) alors que l'augmentation de la teneur en déchets verts (et donc la diminution de celle de biodéchets) favorise la production d'acide acétique, propionique et butyrique.

- **Effet de la proportion de déchets verts sur la concentration en azote ammoniacal**

La Figure 133 présente la concentration en ion ammonium dans la phase liquide des incubations en fonction du pourcentage de déchets verts à 35 et 55°C. Il peut être observé

qu'aux deux températures utilisées, la concentration en ion ammonium augmente avec le pourcentage de déchets verts.

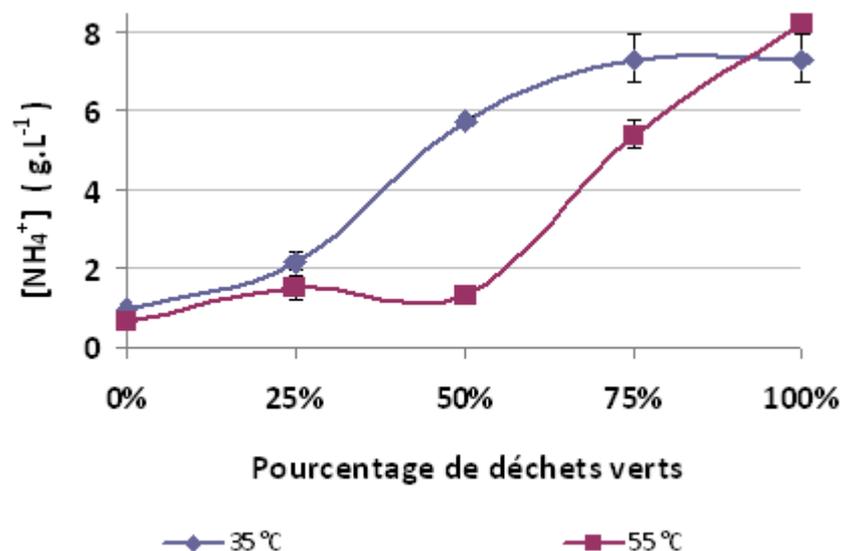


Figure 133 : Concentrations en NH_4^+ en fonction de la teneur en déchets verts à 35°C et 55°C.
(Moyenne de chaque triplicat, les barres d'erreurs représentent l'écart-type).

Des concentrations maximales similaires (environ 8 g.L⁻¹) sont atteintes à 35°C et 55°C lors des expériences sur déchets verts. Il peut cependant être noté que la concentration en NH_4^+ augmente fortement dès que la teneur en déchets verts est de 25 % du mélange à 35°C et de 50 % à 55°C. Ces résultats confirment donc qu'une augmentation de la proportion de déchets verts introduits dans le méthaniseur, conduit bien à une augmentation de la concentration en ion ammonium, et que d'importantes concentrations peuvent être atteintes dans des méthaniseurs de déchets opérant en méthanisation humide en conditions mésophile aussi bien que thermophile.

L'ajustement du ratio biodéchets/déchets verts apparaît donc comme étant un paramètre opérationnel essentiel qu'il est nécessaire de contrôler afin d'éviter une inhibition des processus de digestion anaérobie. Cependant étant donné qu'une inhibition de la méthanogenèse a été observée dans la quasi-totalité des incubations de cette expérience à la fois à basse et haute concentration en azote ammoniacal, certainement en raison des fortes teneurs en AGV atteintes, il n'a pas été possible d'évaluer l'effet de cette augmentation de la concentration en ion NH_4^+ sur les cinétiques de production de méthane et les éventuelles inhibitions qui auraient pu se produire. Une nouvelle série d'expériences a alors spécifiquement été réalisée afin d'étudier ces effets.

4.2.3. Effet d'une introduction de déchets verts / ammonium sur un processus de méthanisation thermophile de biodéchets stabilisé.

Pour cette expérience, différents essais (incubations de biodéchets avec régulation du pH) ont du être réalisés préalablement afin de rendre possible la méthanisation de biodéchets par l'inoculum initialement issu d'un méthaniseur de déchets thermophile. Une fois le processus de méthanisation stabilisé, l'inoculum ainsi préparé a été utilisé pour réaliser les expériences dont les résultats sont présentés ci après. Comme rappelé en introduction de cette partie, après une première incubation de biodéchets, lorsque la production de biogaz a atteint les 2/3 de la production attendue, des biodéchets ont été introduits, mélangés soit avec 8 g.L⁻¹

de NH_4^+ (essais BN) soit avec 75 % de déchets verts (essais BV). Un témoin a également été réalisé en réinjectant seulement des biodéchets (essais B). L'ensemble des essais a été réalisé en duplicat.

La nomenclature de cette seconde série d'expériences est donnée dans le Tableau 49.

Tableau 49 : Nomenclature des expériences en microcosmes.

Incubations	Inoculum	Substrat	[Substrat]	Milieu	T (°C)	$[\text{NH}_4^+]$ (g.L ⁻¹)
B (1 et 2)		100 % Biodéchets puis au 2/3 de la production de méthane, 100 % Biodéchets de nouveau	1 g de MV, puis de	Solution carbonate utilisée pour ajuster le taux de MS à 90 %		0
BN (1 et 2)	Inoculum de digesteur thermophile adapté à la consommation de biodéchets	100 % Biodéchets puis au 2/3 de la production de méthane, 100 % Biodéchets de nouveau	nouveau 1 g de MV au 2/3 de la production de		55	0, puis 8g.L ⁻¹ lors de la seconde introduction de biodéchets
BV (1 et 2)		100 % Biodéchets puis au 2/3 de la production de méthane, 25 % Biodéchets / 75 % déchets verts	méthane			0

4.2.3.1. Résultats expérimentaux obtenus

4.2.3.1.1. Analyses de la phase gazeuse

La courbe de production de dioxyde de carbone cumulée (Figure 134, A) montre deux phases de production qui correspondent, d'une part, au lancement des incubations avec uniquement des biodéchets (jour -7 à 0) et d'autre part, à la production suite à la réinjection de biodéchets seuls (témoins B), de biodéchets mélangés à 8 g.L⁻¹ de NH_4^+ (BN) et de biodéchets mélangés à 75 % de déchets verts (BV) (jour 0 à 31). Les productions de dioxyde de carbone sont relativement similaires entre les trois séries d'incubation pendant toute la durée des essais. Cependant, si elles sont totalement identiques pendant la première phase de l'expérience (avant la réinjection de déchets), quelques différences peuvent toutefois être observées suite à la réinjection de déchets (matérialisée par la ligne violette au jour 0 sur la Figure 134). La production de dioxyde de carbone redémarre plus lentement dans les pilotes BV et connaît une rupture de pente au jour 3, qui traduit une diminution de la vitesse de production. Les volumes finaux des séries B et BN sont identiques (415 L.kg⁻¹ de MV) alors que celui des pilotes de la série BV est légèrement inférieur (387 L.kg⁻¹ de MV)

Les courbes de production de méthane cumulée (Figure 134, B) présentent également deux phases de production. Avant la réinjection, les productions de méthane cumulées sont identiques pour les séries B, BN et BV, ce qui est normal puisque le même biodéchet a été introduit dans l'ensemble des pilotes pendant cette période. Suite à la réinjection, d'importantes différences peuvent être notées. La production de méthane des pilotes BN est cinétiquement plus lente que celle des autres séries. De plus, elle se stabilise à une valeur inférieure (453 L.kg⁻¹ de MV). La production de méthane des pilotes BV est cinétiquement identique à celle de la série témoin B pendant les trois jours et demi qui suivent l'injection du mélange biodéchets /déchets verts. Ensuite, un ralentissement brusque de la cinétique de production de méthane est observé. Le volume final de méthane produit atteint une valeur intermédiaire entre les séries B et BN (497 L.kg⁻¹ de MV). Enfin, le volume final de méthane produit pour la série B est le plus important (543 L.kg⁻¹ de MV).

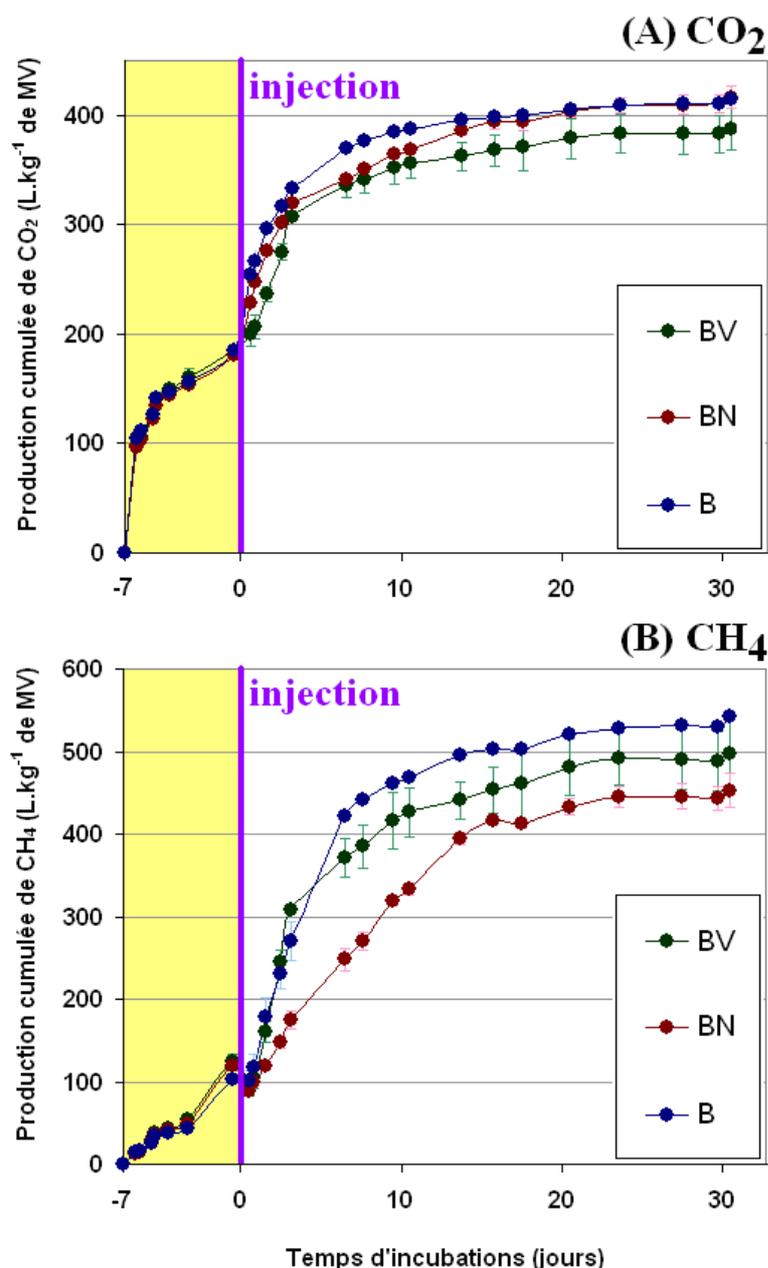


Figure 134 : Production cumulée de dioxyde de carbone (A) et méthane (B).

(Les courbes représentent la moyenne de chaque duplicat de colonnes, les barres d'erreurs représentent les écart-types, La ligne violette matérialise le jour de l'injection).

4.2.3.1.2. Analyses de la phase liquide

Des mesures des concentrations en acides organiques (acide lactique, formique, acétique, propionique, iso-butyrique et butyrique) ont été réalisées au cours des deux phases des expériences. Ces données sont présentées en Figure 135. L'évolution des concentrations est similaire pour les trois essais avant l'étape d'injection, ce qui illustre la reproductibilité du système expérimental utilisé. Suite à l'injection, des proportions d'AGV différentes sont observées. On peut notamment remarquer que dans les essais B et BV, la concentration d'acide acétique a fortement diminué (environ 2,5 g.L⁻¹) alors que dans les essais BN, cette dernière a augmenté et a atteint une valeur proche de 15 g.L⁻¹. On observe également que l'acide butyrique n'est mesuré à cette date (jour 3), que dans les essais B et, qu'au contraire, l'absence d'acide iso-butyrique est spécifique aux essais BN. Au jour 3, le seul point commun

entre les trois essais (B, BN et BV) est la présence d'acide propionique en concentration similaire. En fin d'expérience (i.e. jour 31), les proportions d'AGV observées pour les trois modalités sont proches (4 à 5 g.L⁻¹ d'acide propionique et autant d'acide isobutyrique). La seule différence concerne la présence d'acide formique dans les essais BV.

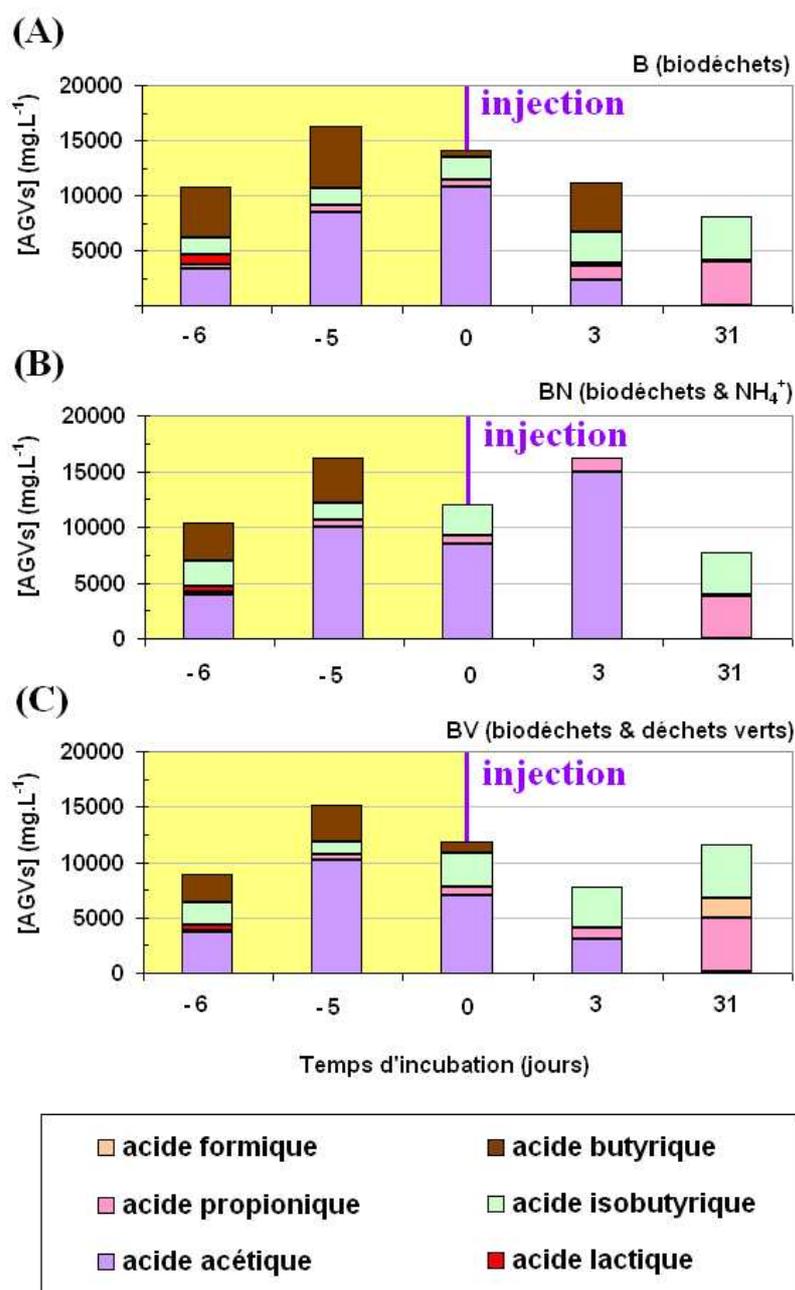


Figure 135 : Concentrations en acides organiques pour les incubations B (A), BN (B) et BV (C).
 (Les courbes représentent la moyenne de chaque duplicat de colonnes,
 La ligne violette matérialise le jour de la l'injection).

4.2.3.1.3. Analyses isotopiques

Les résultats des mesures de compositions isotopiques sont présentés en Figure 136.

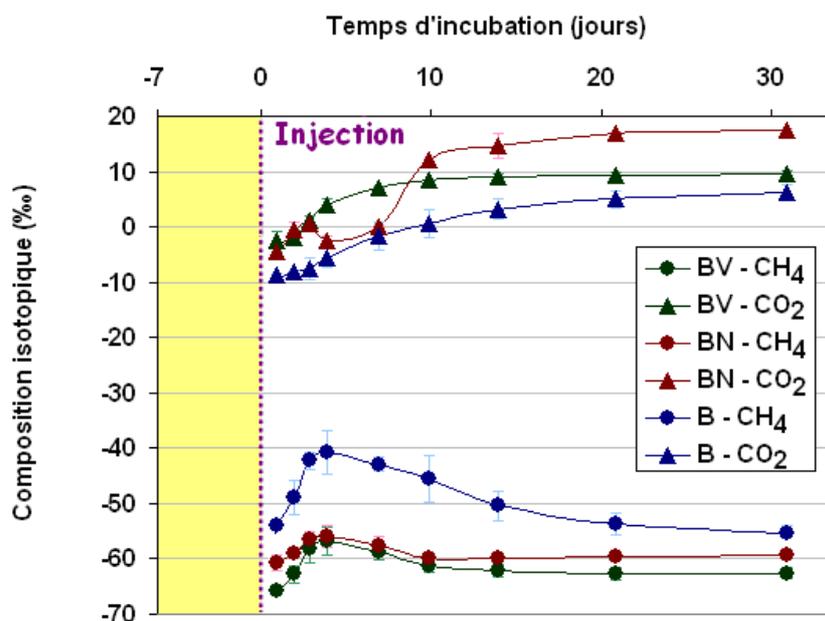


Figure 136 : Évolution des compositions isotopiques du CO₂ et CH₄ pour les incubations B, BV et BN.

Suite aux différents types d'injections réalisées au jour 0 (matérialisées par la ligne pointillée violette sur la Figure 136), les évolutions des signatures isotopiques vont se différencier. La composition isotopique du méthane produit dans les essais B (injection de biodéchets) augmente immédiatement à des valeurs caractéristiques d'une production de méthane par méthanogenèse acétoclaste. A partir du jour 3, une lente diminution de la composition isotopique du méthane s'amorce, du fait d'une augmentation de la part de méthane produit par méthanogenèse hydrogénotrophe. Pour les essais BN (injection de biodéchets + NH₄⁺) et BV (injection de biodéchets + déchets verts), une très légère augmentation de la composition isotopique du méthane est également observée après l'injection. Cependant, les valeurs et l'évolution des courbes laissent plutôt penser que dans ces incubations, le méthane est essentiellement produit par méthanogenèse hydrogénotrophe.

4.2.3.2. Discussion

Les essais avant la phase d'injection présentent, d'après l'ensemble des résultats, un comportement bien reproductible. Le système expérimental développé pour étudier le processus de digestion anaérobie en simulant les conditions d'un méthaniseur thermophile opérant à un taux d'humidité de 90 %, est donc suffisamment robuste pour permettre d'interpréter les différences entre les résultats obtenus et donc d'étudier l'effet d'une introduction de déchets verts ou d'azote ammoniacal.

Lorsque du biodéchet est introduit, le méthane est produit rapidement par méthanogenèse acétoclaste durant les trois jours suivants l'injection de biodéchets. La diminution de la composition isotopique observée ensuite pourrait être la résultante de la mise en place de l'oxydation syntrophique du propionate. Ainsi, il est intéressant de remarquer que, lors de la dégradation de ce biodéchet en condition thermophile, des évolutions de compositions isotopiques et donc de métabolismes identiques à celle observées lors de la dégradation d'un DND en condition mésophile sont observées. Ce résultat illustre à nouveau le fait que la méthanogenèse ne se produit pas systématiquement par la voie hydrogénotrophe en condition thermophile.

Lorsque ce même biodéchet est introduit mélangé avec une quantité importante de NH_4^+ (incubation BN), un comportement différent est observé puisque la production de méthane est alors nettement plus lente que dans les incubations témoin en absence d'ajout d'azote ammoniacal (incubation B). L'effet de l'injection est immédiat puisque la vitesse de production de méthane subit un ralentissement en comparaison de celle observée dans les incubations dans lesquelles du NH_4^+ n'a pas été introduit. Les mesures des concentrations des acides organiques montrent que, dans ces essais (BN), la concentration d'acide acétique augmente de 8 g.L^{-1} (jour 0) à 15 g.L^{-1} (jour 3), alors que celle-ci diminue rapidement dans les incubations témoins. Il semblerait donc que l'introduction d'une forte concentration en NH_4^+ dans le milieu, ait entraîné une inhibition de la méthanogenèse. Une légère augmentation de la composition isotopique du méthane est tout d'abord observée. Cependant, le fait qu'elle n'atteigne pas des valeurs clairement acétoclastes, comme cela est observé dans les incubations témoins, montre qu'une inhibition de la méthanogenèse acétoclaste s'est probablement produite. L'importante quantité d'acétate accumulée suite à l'inhibition partielle de la méthanogenèse est ainsi très probablement consommée par réaction d'OSA, d'où les signatures isotopiques mesurées. Ce résultat met en évidence que, pour un substrat plus complexe que l'acétate, ici le biodéchet, la présence de concentrations importantes d'azote ammoniacal entraîne la mise en place d'une oxydation syntrophique.

Enfin, lorsqu'un mélange biodéchets / déchets verts est injecté (incubation BV), aucun effet immédiat n'est observé sur la production cumulée de méthane et celle-ci est similaire à celle de la série témoin B jusqu'au jour 3. A partir du jour 3, cette production va connaître un ralentissement significatif. Les mesures des concentrations d'acides organiques ne révèlent pas d'accumulation d'acétate dans les incubations BV entre les jours 0 et 3. Cette absence d'accumulation de l'acétate est en accord avec le fait que la production de méthane démarre, dans l'incubation biodéchets / déchets verts, de la même manière que dans l'incubation témoin. En effet, cela confirme que la méthanogenèse n'a pas été inhibé, dans un premier temps, probablement dû à la production progressive de NH_4^+ lors de la dégradation des déchets verts. Cependant, la signature isotopique du méthane est distincte de celle de l'incubation témoin et reste à des valeurs plutôt caractéristiques de la méthanogenèse hydrogénotrophe.

4.2.4. Conclusion

Dans un premier temps, ces expériences ont permis de confirmer que plus la proportion de déchets verts est importante dans un mélange biodéchets/déchets verts plus la quantité d'azote ammoniacal produite était importante.

D'autre part, lors d'une expérience simulant l'introduction d'une quantité importante de déchets verts dans un méthaniseur thermophile acclimaté à la dégradation de biodéchets, il a été mis en évidence que lorsque du biodéchet était introduit, le méthane était produit essentiellement par méthanogenèse acétoclaste alors que, dans le cas d'un mélange biodéchets/déchets verts, un changement de métabolisme semblait se produire entraînant la mise en place d'une méthanogenèse hydrogénotrophe *via* une OSA. Des résultats similaires ont été observés lorsqu'une quantité importante de NH_4^+ a été introduite avec du biodéchet.

Ce changement de métabolisme observé dans les expériences avec le mélange de déchets verts/biodéchets et le biodéchet enrichi en azote ammoniacal n'a cependant pas entraîné les mêmes effets sur la production de méthane. En effet, alors que le ralentissement de la production de méthane est immédiat lorsque du NH_4^+ a été introduit, il intervient beaucoup plus tard dans le cas de l'incubation ayant reçue le mélange déchets

verts/biodéchets. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que, lorsque le NH_4^+ est introduit directement, l'inhibition a été brutale alors que, dans le deuxième cas, l'azote ammoniacal étant produit progressivement lors de l'hydrolyse des déchets verts, les micro-organismes ont réussi à s'acclimater. L'inhibition observée par la suite pourrait être due au fait qu'une quantité très importante d'azote ammoniacal se soit accumulée, entraînant ainsi une inhibition partielle du métabolisme précédemment mis en place.

Ces résultats préliminaires montrent bien l'intérêt de l'approche isotopique pour l'étude de la codigestion déchets verts/biodéchets. Cependant, des expériences complémentaires seront nécessaires avant de pouvoir réellement tirer des conclusions d'ordre opérationnel.

5. Expérience sur site : ISDND

5.1. Introduction

5.1.1. Objectifs de l'étude

L'ISDND peut être considérée comme un système fermé au sein duquel des processus biochimiques conduisent à la dégradation plus ou moins complète des déchets. Cette biodégradation entraîne la formation de biogaz qui est extrait hors du massif de déchets afin d'être brûlé ou valorisé. La consommation des molécules contenant le moins d'isotope 13 du carbone (isotope "lourd") peut conduire à un enrichissement en carbone 13 du stock de carbone contenu dans le massif de déchets (notamment lors de l'étape de méthanogenèse hydrogénotrophe ou le dioxyde de carbone "léger" va être consommé préférentiellement et ainsi conduire à l'enrichissement du dioxyde de carbone restant dans le milieu).

Dans les expériences réalisées au laboratoire, les mesures de compositions isotopiques du carbone ont été utilisées pour étudier les mécanismes de dégradation des déchets. Les expériences réalisées sur une ISDND de SITA France ont pour but d'évaluer la possibilité d'élaborer de nouveaux indices de maturité des déchets en ISDND reposant sur des mesures de compositions isotopiques.

5.1.2. Mise en œuvre

Un nombre important de prélèvements (50 prélèvements) a été réalisé les 15 et 16 juillet 2009. Suite à des discussions préalables avec les exploitants, les puits de biogaz du site ont été classés en trois catégories en fonction de l'âge des casiers (Figure 137) :

- Zone 1 : 1977 à 1987
- Zone 2 : 1987 à 1996
- Zone 3 : 1996 à 2009

Dans chacune des zones, un maximum de prélèvements de biogaz a été réalisé en fonction des possibilités. Les prélèvements ont été réalisés directement sur les puits de biogaz (en dépression) à l'aide d'une seringue à gaz (Figure 138) puis transférés dans un vacutainer pour analyse de la composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone au laboratoire.

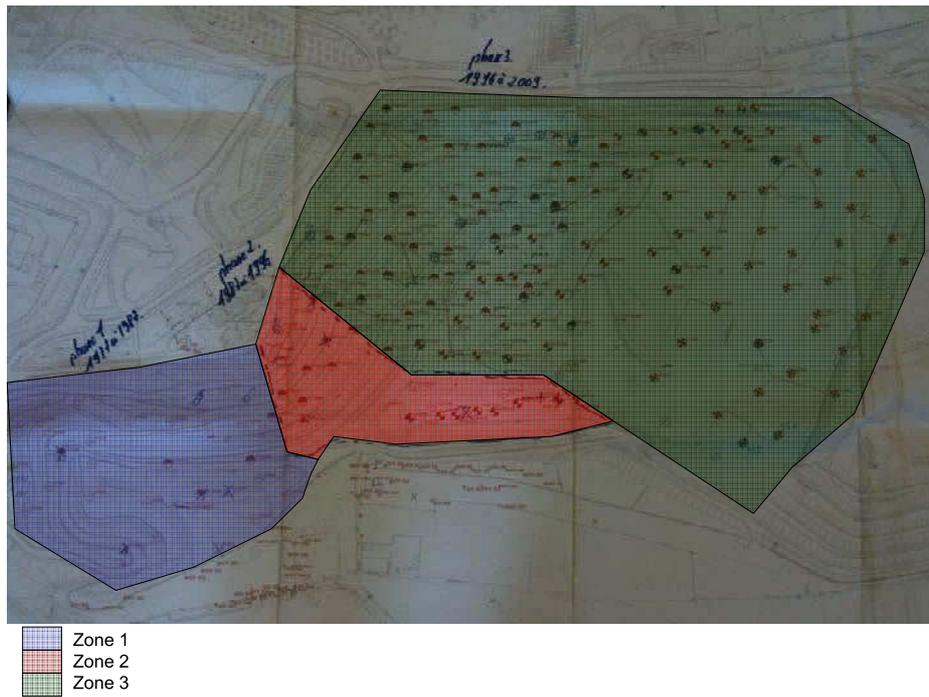


Figure 137 : Découpage en zone de l'ISDND de SITA France.

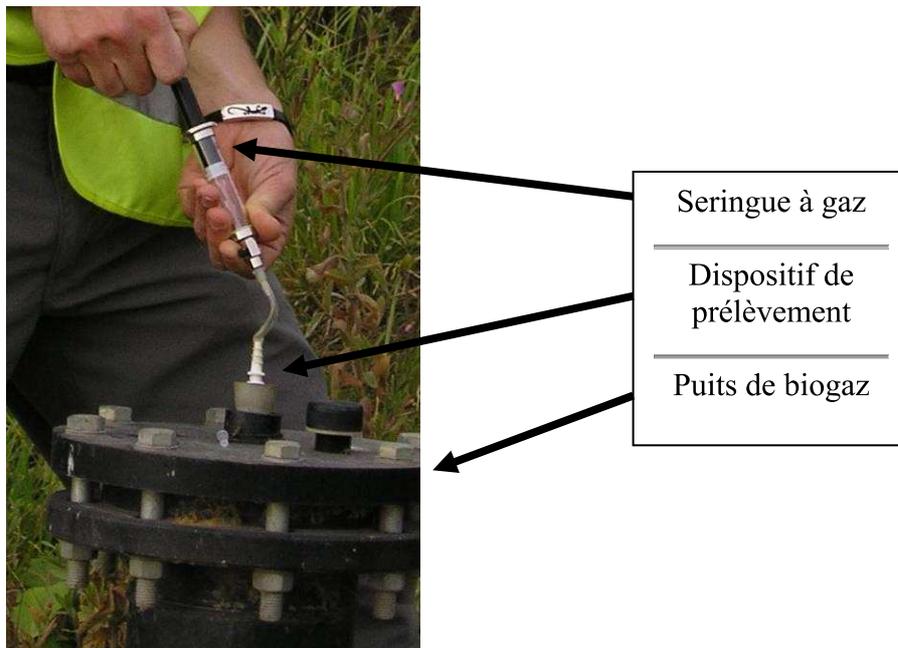


Figure 138 : Prélèvements de biogaz.

Enfin des prélèvements liquides correspondant à chacune des zones (1 à 3) ont été réalisés pour analyse de la composition isotopique du carbone inorganique dissous. Chacun des échantillons liquides est ensuite injecté dans un premier vacutainer et acidifié. Le dioxyde de carbone libéré par l'acidification est ensuite prélevé et placé dans un second vacutainer à l'aide d'une seringue à gaz. L'analyse de la composition isotopique est réalisée sur le second vacutainer de manière identique à celle des biogaz prélevés.

5.2. Résultats expérimentaux obtenus

Il semblerait que certains puits de biogaz, du fait de fortes dépressions principalement, n'aient pas permis aux prélèvements de se faire de manière correcte. Sur l'ensemble des prélèvements réalisés sur site (50 prélèvements), la moitié présentait des teneurs en méthane et/ou dioxyde de carbone insuffisantes pour pouvoir utiliser les résultats obtenus avec confiance. Toutefois, l'autre moitié des prélèvements s'est déroulée de manière satisfaisante (21 sur 50). Ce sont donc uniquement ces résultats qui sont présentés dans la suite de cette partie.

Les mesures de composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone ainsi que les valeurs de facteur de fractionnement apparent sont présentés en fonction de leurs zones de prélèvement en Figure 139.

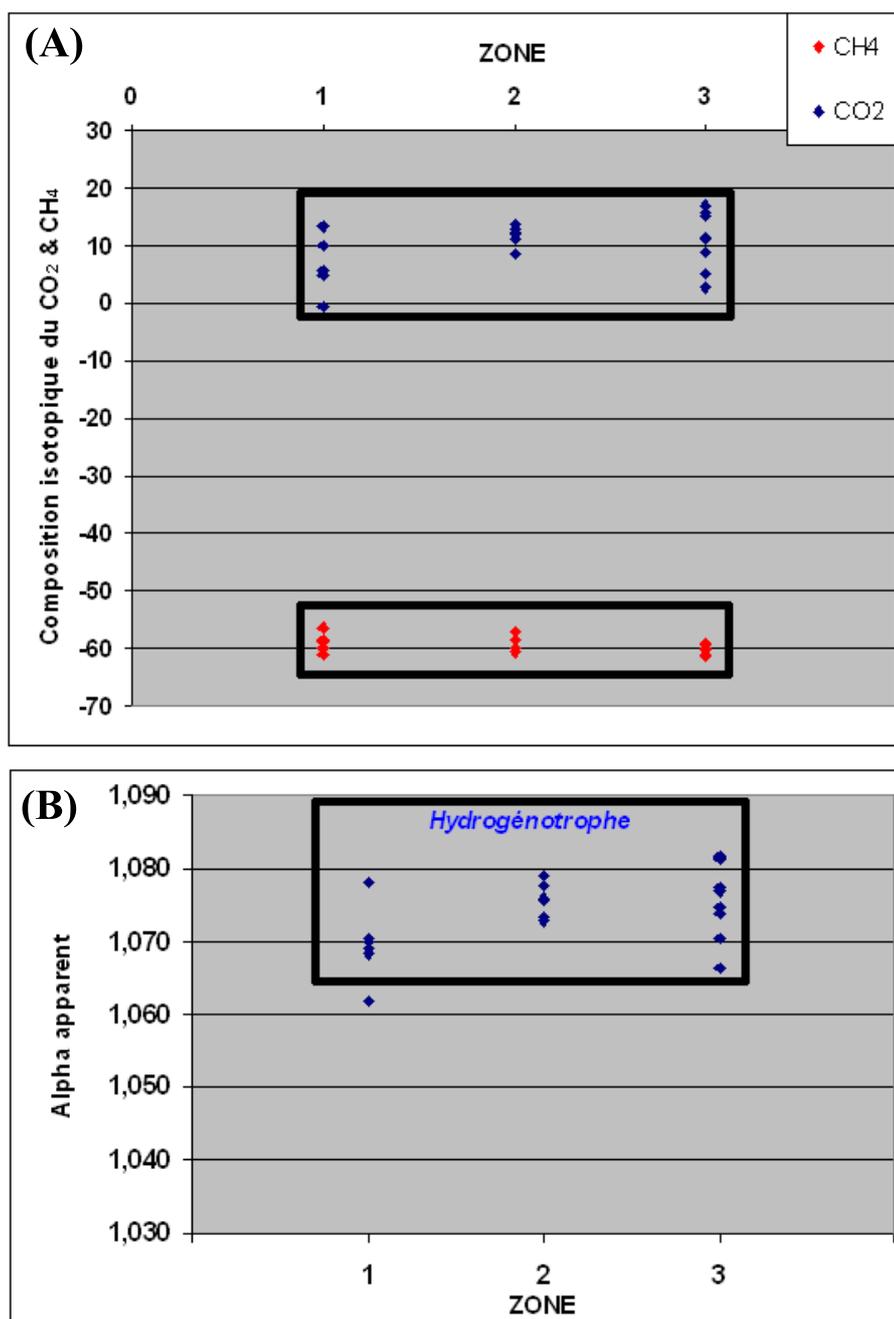


Figure 139 : Résultats des analyses de composition isotopique.

Le Tableau 50 indique le nombre de prélèvements réalisé dans chaque zone, la valeur moyenne, l'écart-type, le minimum et le maximum pour la composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone.

Tableau 50 : Moyenne, écart-type, minimum et maximum des compositions isotopiques du CO₂ et du CH₄ mesurés sur l'ISDND de SITA France.

Zone de prélèvement	1	2	3	Total
Nbr de prélèvements	6	6	9	21
Moyenne $\delta^{13}\text{CH}_4$ (‰)	-59,06	-59,45	-60,38	-59,73
Ecart-type $\delta^{13}\text{CH}_4$ (‰)	1,61	1,39	0,73	1,30
Maximum $\delta^{13}\text{CH}_4$ (‰)	-56,35	-57,00	-59,10	-56,35
Minimum $\delta^{13}\text{CH}_4$ (‰)	-60,90	-60,57	-61,15	-61,15
Moyenne $\delta^{13}\text{CO}_2$ (‰)	6,39	11,72	10,98	9,88
Écart-type $\delta^{13}\text{CO}_2$ (‰)	4,83	1,83	4,77	4,58
Maximum $\delta^{13}\text{CO}_2$ (‰)	13,45	13,59	16,89	16,89
Minimum $\delta^{13}\text{CO}_2$ (‰)	-0,50	8,39	2,76	-0,50

Les trois échantillons de lixiviats provenant respectivement de puits de lixiviat des zones 1, 2 et 3 ont été utilisés afin d'analyser la composition isotopique du CID. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 51.

Tableau 51 : Moyenne, écart-type, de la composition isotopique du CID mesurés sur l'ISDND de SITA France.

Zone de prélèvement	1	2	3	Total
Nbr de prélèvements	1	1	1	3
Moyenne $\delta^{13}\text{CH}_4$ (‰)	20,255	19,706	20,024	19,995
Ecart-type $\delta^{13}\text{CH}_4$ (‰)	0,057	0,085	0,201	0,266

5.3. Discussion

L'étude bibliographique (cf. Chapitre 2, 2.4.4.1 Mesure de la composition isotopique des effluents d'ISD) situe la composition isotopique du méthane et du dioxyde de carbone mesurée dans des ISDND, dans des gammes de valeurs de -42 ‰ à -61 ‰ et de -7 ‰ à +20 ‰ respectivement. Les valeurs mesurées dans le biogaz de l'ISDND SITA France sur laquelle les prélèvements ont été réalisés, correspondent aux valeurs bibliographiques (moyenne de -59,73 ‰ pour le méthane et de 9,88 ‰ pour le dioxyde de carbone).

Les mesures de composition isotopique ne présentent pas de différence significative (pour le méthane et pour le dioxyde de carbone) en fonction de la zone de prélèvement (Figure 139, A & Tableau 50). Les mesures de compositions isotopiques réalisées sur le biogaz ne permettent donc pas de différencier les phases d'exploitation en fonction de leurs âges.

Le calcul du facteur de fractionnement apparent (Figure 139, B) situe la production de méthane plutôt par voie hydrogéntrophe. Cette interprétation est à considérer avec précaution car peu de cas d'étude en système complexe existe et parce que les valeurs de composition isotopique du CO₂ sont élevées ce qui complique l'interprétation des données.

En effet, l'enrichissement isotopique du dioxyde de carbone (ou des carbonates du milieu) peut entraîner un chevauchement des plages des compositions isotopiques caractéristiques du méthane produit par voie acétoclaste et hydrogénotrophe comme l'illustre la Figure 140.

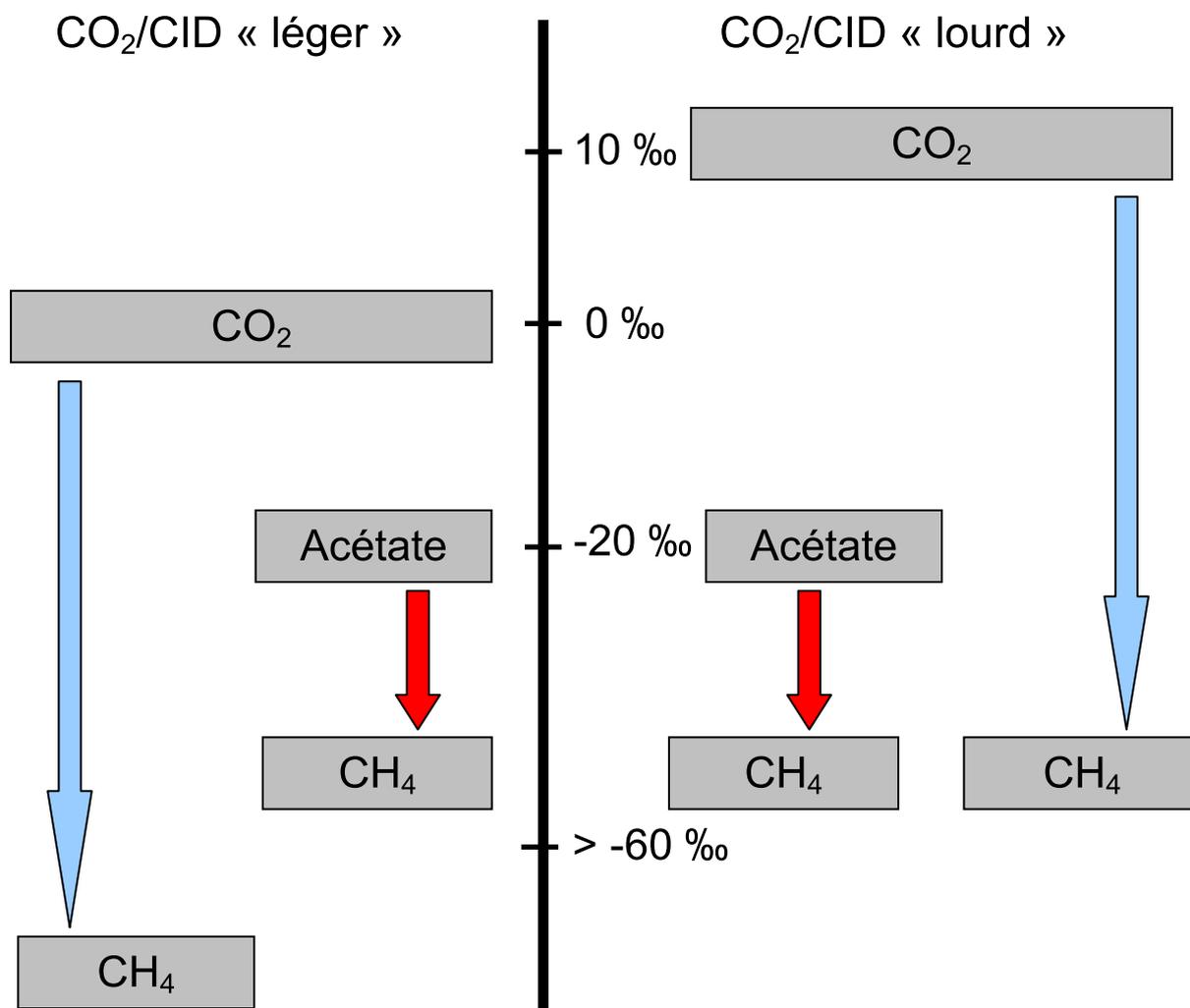


Figure 140 : Effet de l'enrichissement isotopique du CO₂ sur les plages de composition isotopique des différentes voies métaboliques méthanogènes.

Dans le cas de figure où le CO₂ est particulièrement enrichi, le facteur de fractionnement apparent (qui repose sur l'écart entre la composition isotopique du CO₂ et du méthane) sera alors identique quelque soit la voie métabolique utilisée.

L'étude bibliographique (cf. Chapitre 2, 2.4.4.1 Mesure de la composition isotopique des effluents d'ISD) situe la composition isotopique du carbone inorganique des lixiviats mesurée dans des ISDND dans un intervalle de valeurs comprises entre -5,1 ‰ et +22 ‰. Les valeurs mesurées dans les lixiviats de l'ISDND SITA France correspondent aux valeurs bibliographiques (moyenne de -19,99 ‰).

Les mesures de composition isotopique du CID réalisées sur des échantillons de lixiviat, provenant de chacune des zones d'âges différents, ne présentent également pas de différence

significative (Tableau 51). Les mesures de composition isotopique réalisées sur le lixiviat ne permettent donc pas de différencier les phases d'exploitation en fonction de leurs âges.

5.4. Conclusion

La série de mesures réalisée sur une ISDND de SITA France avait pour objectif de tester les potentialités d'une utilisation de l'approche isotopique en vue d'établir un indicateur de maturité permettant d'estimer l'état de dégradation du massif de déchets. Les résultats obtenus lors de ces essais ne permettent pas de mettre en évidence des différences de signatures isotopiques en fonction des différentes zones d'âges. Il est possible, que les déchets en ISDND, du fait d'une diffusion très progressive des liquides, produisent, à l'échelle des zones étudiées, du biogaz de composition similaire en raison de la mise en place progressive et continu de nouvelles zones de dégradation. L'approche envisagée ne semble donc pas applicable à l'échelle de l'ISDND. D'autre part, l'identification du métabolisme responsable de la production du méthane présent dans le biogaz prélevé sur une ISDND est rendue compliquée par le fait que des valeurs de composition isotopique du dioxyde de carbone particulièrement élevées sont observées. En effet l'enrichissement du dioxyde de carbone au cours de la dégradation des déchets entraîne un chevauchement des compositions isotopiques du méthane produit par les voies métaboliques acétoclaste et hydrogénotrophe.

Toutefois, les compositions isotopiques mesurées sont bien comprises dans la gamme des valeurs bibliographiques obtenues sur d'autres ISDND. Les compositions isotopiques mesurées dans le biogaz (notamment celle du dioxyde de carbone) sont spécifiques de ce type d'installation. Cela conforte les possibilités d'une utilisation des mesures de composition isotopique afin de confirmer ou d'infirmier une éventuelle contamination de l'environnement liée à l'exploitation d'une ISDND.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail de recherche avait tout d'abord pour objectif de valider les possibilités d'une application de l'approche isotopique à l'étude des métabolismes de production de méthane dans les systèmes industriels de traitement de déchets opérant en conditions anaérobies. Des expériences ont ainsi été réalisées afin de mesurer les facteurs de fractionnement isotopique engendrés par des inocula provenant de systèmes industriels de traitement des déchets, car ces données étaient absentes de la littérature. Les résultats obtenus ont mis en évidence que, **pour des inocula sélectionnés de façon intensive dans les installations industrielles (ISDND et méthaniseur), les facteurs de fractionnement isotopique mesurés sont similaires à ceux classiquement retrouvés dans les écosystèmes naturels (sols, rizières,...)**. Ils sont donc également bien distincts pour les deux grandes voies de la méthanogenèse que sont la méthanogenèse hydrogénotrophe et acétoclaste. De plus, il a été mis en évidence que l'effet de la température sur les facteurs de fractionnement isotopique mesurés, semble être peu important entre les deux gammes de températures classiquement rencontrées dans les systèmes de traitement des déchets (mésophiles et thermophiles). Certaines limites ont tout de même été mises en évidence. Ainsi, la présence de fortes pressions partielles en hydrogène entraîne l'obtention de valeurs de facteurs de fractionnement isotopique, pour la voie métabolique hydrogénotrophe, distinctes mais relativement proches de celles de la voie métabolique acétoclaste. Cependant, dans les systèmes de traitement de déchets étudiés, les teneurs en hydrogène restent généralement inférieures à celles entraînant l'obtention de ces fractionnements isotopiques atypiques.

Il est à noter que la mise en œuvre d'une approche isotopique marquée, reposant sur l'utilisation d'acétate enrichi en ^{13}C à 100 % sur le groupement méthyle, a permis de valider l'approche isotopique naturelle puisque les interprétations découlant de ces deux méthodologies se sont avérées être concordantes.

L'approche isotopique proposée apparait donc être adaptée et applicable à l'étude des voies métaboliques méthanogènes lors de la digestion anaérobie des déchets.

Après avoir été validée, l'approche isotopique a été mise en œuvre afin d'étudier l'effet de différents paramètres opérationnels, tels que la température et la concentration en azote ammoniacal, sur les voies métaboliques de la méthanogenèse, lors de la digestion anaérobie des déchets. Couplée à des analyses relevant de la microbiologie moléculaire, cette approche a, de plus, permis d'apporter des éléments permettant d'expliquer les changements de population microbienne observés.

Conclusion générale

Les principaux résultats relatifs à l'effet de la température sur la digestion anaérobie des déchets, et plus particulièrement sur l'orientation des voies métaboliques méthanogènes lors de ce processus sont synthétisés ci-dessous.

L'approche isotopique a tout d'abord été utilisée lors d'expériences sur la dégradation des déchets en conditions mésophiles dans des incubations de type batch et en conditions saturées. Elle a permis de révéler qu'**une succession de différents métabolismes à l'origine de la production de méthane se met en place (acétoclaste puis mélange de métabolismes acétoclaste/hydrogénotrophe) en conditions mésophiles**. La combinaison des mesures de compositions isotopiques et des analyses microbiologiques a ensuite permis de mettre en évidence que **des membres de la famille *Methanosarcinaceae* semblaient être impliqués dans la production du méthane tout au long de l'incubation, quelque soit le métabolisme mis en jeu**. Ce résultat met ainsi en évidence la versatilité métabolique de cette famille d'archées dans un écosystème complexe.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus à 55°C lors d'incubations similaires, a clairement mis en évidence que la température avait un effet sur les voies métaboliques utilisées lors de la digestion anaérobie des déchets. En effet, si en conditions thermophiles, l'hydrolyse des déchets a bien conduit à la formation d'acétate, d'après les mesures de composition isotopique, **la totalité du méthane produit dans ces incubations l'a été par méthanogenèse hydrogénotrophe. Il apparaît ainsi que, dans ces incubations réalisées en conditions thermophiles, l'acétate est consommé par une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate**. Les micro-organismes méthanogènes identifiés (*Methanoculleus thermophilus*) sont différents de ceux rencontrés à 35°C. Le fait que ces archées soient connues pour être capables de réaliser uniquement la méthanogenèse hydrogénotrophe, a permis de conforter les interprétations issues des données isotopiques. **L'étude de l'effet de la température (35°C vs 55°C) sur la dégradation de déchets en conditions anaérobies, met également en évidence des différences importantes en terme de temps de latence (quasi inexistant à 55°C, 20 jours à 35°C) et de production de méthane (production plus importante à 35°C)**. La production plus faible de méthane observée en conditions thermophiles pourrait s'expliquer par le fait qu'une part plus importante de carbone difficilement dégradable soit formée dans ces conditions.

Des résultats complémentaires sur l'effet de la température ont été obtenus lors d'incubations d'acétate en présence de différents types d'inocula, réalisées à 35°C et 55°C, afin d'étudier plus finement le déterminisme des différences métaboliques observées précédemment (acétoclaste à 35°C et hydrogénotrophe à 55°C). Ces résultats ont montré que ces différences ne s'établissaient pas de façon systématique. En effet, lorsqu'un inoculum issu d'un lixiviat d'ISDND a été utilisé, cette même différence de métabolisme en fonction de la température a été observée, alors qu'avec un inoculum de méthaniseur thermophile, la situation s'est avérée être plus complexe. Dans certaines incubations le méthane y a été produit par méthanogenèse hydrogénotrophe en conditions mésophiles et par méthanogenèse acétoclaste en condition thermophile. L'analyse de l'ensemble des données obtenues lors de cette partie du travail semble montrer que la concentration en ammoniac, (molécule suspectée d'inhiber prioritairement la méthanogenèse acétoclaste et dont la concentration dans le milieu dépend de la température) pourrait être responsable de ce changement de métabolisme. Il est donc envisageable que **l'augmentation de la température, entraînant un accroissement de la proportion d'azote ammoniacal sous la forme libre, soit indirectement à l'origine de l'inhibition des méthanogènes acétoclastes en condition thermophile. Les hydrogénotrophes, en général plus résistantes à cette forme d'inhibition, pourraient donc dans ces conditions être les seules archées capables de produire du méthane à partir de l'acétate via une oxydation syntrophique avec une bactérie**.

Concernant l'effet de l'azote ammoniacal sur l'orientation des voies métaboliques lors de la digestion anaérobie des déchets, les principaux résultats obtenus sont synthétisés ci-dessous.

Des expériences de dégradation d'acétate réalisées en conditions mésophiles ont tout d'abord confirmé qu'une **augmentation de la concentration d'azote ammoniacal orientait la production de méthane vers une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate**. Alors que ce changement de métabolisme, lors d'incubations réalisées à partir d'un inoculum adapté à la consommation de l'acétate par voie acétoclaste, entraîne **l'apparition de temps de latence importants et une diminution de la vitesse de production de méthane, aucune différence de rendement de production finale de méthane n'a été mise en évidence**. Des réinjections d'acétate dans ces incubations à haute concentration en azote ammoniacal, ont ensuite permis de montrer qu'**une fois la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate mise en place et la population microbienne adaptée, aucune phase de latence n'est nécessaire avant le démarrage de la production de méthane par OSA**.

Un résultat particulièrement intéressant a été obtenu lors des expériences réalisées à **haute concentration en azote ammoniacal et avec différentes quantités d'inoculum, puisque deux réactions distinctes d'oxydation syntrophique ont pu être mises en évidence** grâce aux mesures de compositions isotopiques et des analyses microbiologiques. Lorsque des quantités importantes d'inoculum ont été introduites, la réaction d'OSA implique des archées du genre *Methanoculleus* pour la réalisation de la méthanogenèse hydrogénotrophe et des bactéries pour la réalisation de l'oxydation de l'acétate. A plus faible quantité d'inoculum, **les membres de la famille *Methanosarcinaceae* pourraient être impliqués à la fois dans la réalisation de la méthanogenèse hydrogénotrophe et de l'oxydation de l'acétate**. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible qu'il a été mis en évidence récemment que certains membres de cette famille d'archées présentaient les capacités métaboliques leur permettant de réaliser l'oxydation de l'acétate. Des analyses complémentaires (étude de l'arrangement spatial des archées et des bactéries, NanoSIMS, métaprotéomique) ont permis d'apporter des éléments permettant d'étayer cette hypothèse.

D'un point de vue plus opérationnel, deux séries d'expériences ont été réalisées.

La première utilise un dispositif permettant de simuler le devenir d'un volume élémentaire de déchets au sein d'une ISD bioactive. Les résultats montrent clairement que **la nature de l'effluent recirculé a un impact important, essentiellement sur le temps de latence nécessaire à la mise en place de la méthanogenèse dans le massif de déchets**. Ainsi, l'injection d'une boue de station d'épuration entraîne un démarrage rapide de la production de méthane, certainement en raison de l'apport important de micro-organismes méthanogènes qui en résulte. L'injection d'un lixiviat de plateforme de compostage de déchets verts semble, quant à elle, favoriser, pour une raison qu'il n'a pas été possible d'identifier, la mise en place de la méthanogenèse tout le long de la colonne de déchets, comme l'illustre la diminution plus rapide de la quantité de matière organique présente dans les lixiviats de ces pilotes. Enfin, **l'introduction d'un lixiviat d'ISDND chargé en azote ammoniacal, conduit à un allongement des temps de latence important pouvant être expliqué par le fait que, dans ce cas, une réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate se soit mise en place en raison des fortes concentrations en azote ammoniacal atteintes au sein des déchets**. Il est à noter que, par contre, dans ces expériences, la vitesse de production de méthane, une fois que cette dernière a débuté, n'est pas significativement différente quelque soit la

Conclusion générale

concentration en azote ammoniacal de l'effluent utilisé, tout comme les rendements de production de méthane.

La seconde regroupe un ensemble d'expériences réalisées en microcosmes, à des taux d'humidité similaires à ceux pratiqués en méthanisation industrielle humide, visant à étudier la codigestion biodéchets/déchets verts, et plus particulièrement les effets de l'introduction d'une quantité de déchets verts importante au sein d'un méthaniseur recevant essentiellement des biodéchets, comme cela se produit dans certains méthaniseurs au printemps. Les résultats obtenus ont tout d'abord permis de **confirmer que l'introduction de déchets verts au sein de biodéchets, en conditions mésophiles et thermophiles, entraînait l'augmentation de la concentration en azote ammoniacal dans le milieu.** Par ailleurs, l'introduction d'une quantité importante de déchets verts et/ou de NH_4^+ favorise, en conditions thermophile, une production de méthane par méthanogenèse hydrogénotrophe, alors que celle-ci se fait par méthanogenèse acétoclaste lorsque seul un biodéchet est présent. Ce changement de métabolisme pouvant s'expliquer par la présence de fortes concentrations en azote ammoniacal, n'a cependant pas entraîné de ralentissement très important de la production de méthane dans le cas où le déchet vert a été introduit, contrairement à ce qui a été observé lors de l'ajout d'azote ammoniacal directement. Ainsi, des travaux supplémentaires apparaissent nécessaires pour mieux appréhender les effets réels du changement métabolique mis en évidence.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse confirme que la température et la concentration en azote ammoniacal sont des paramètres ayant directement ou indirectement une influence importante sur le processus de digestion anaérobie de la fraction organique des déchets.

Un certain nombre d'enseignements d'ordre plutôt opérationnel peuvent être mis en avant à partir des résultats obtenus lors des expériences réalisées au laboratoire. Il est cependant important de prendre en considération le fait que ces expériences ont été réalisées lors d'essais simulant à une échelle réduite et de façon très simplifiée les procédés et qu'il n'est donc pas possible d'extrapoler *stricto sensu* ces conclusions à l'échelle des installations de traitement de déchets.

- (i) **La dégradation des déchets en conditions thermophiles semble permettre un démarrage plus rapide de la production de méthane, mais conduit à un rendement de production inférieur à celui qui est obtenu en conditions mésophiles.** Cette diminution de production en condition thermophile pourrait être due à la formation de DCO dure.
- (ii) Une augmentation de la concentration en azote ammoniacal entraîne un changement de métabolisme (acétoclaste vers oxydation syntrophique de l'acétate). Ce changement s'accompagne généralement de temps de latence importants et dans certains cas d'une diminution de la vitesse de production du méthane. Cependant, aucune différence de rendement final de production n'a pu être constatée. De plus, une fois les micro-organismes acclimatés et la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate mise en place, aucune phase de latence n'est nécessaire avant le démarrage de la production de méthane. L'ensemble des données obtenues met ainsi en évidence **qu'il semble possible d'obtenir une stabilité des processus de dégradation de l'acétate, à la fois à basse et haute concentration en azote ammoniacal par méthanogenèse acétoclaste et hydrogénotrophe respectivement.** Au-delà d'une certaine concentration en azote ammoniacal, une inhibition totale de la méthanogenèse aurait certainement été observée.

- (iii) L'augmentation des temps de latence ou les comportements non reproductibles observés, que ce soit lors d'un changement de température ou de la concentration en azote ammoniacal, illustre le fait, comme cela a souvent été observé sur les installations elles-mêmes, qu'il est **primordial de maintenir la stabilité de ces paramètres opérationnels afin de garantir un bon fonctionnement**. Les résultats obtenus lors de ce travail permettent de mettre en évidence que **les dysfonctionnements observés sur site lors du changement de certains paramètres, peuvent s'expliquer notamment par l'inhibition de certaines voies métaboliques et donc, par la nécessaire adaptation de la communauté microbienne présente afin qu'elle puisse réaliser le nouveau métabolisme se mettant en place**. Ainsi, par exemple, la gestion des entrants, et notamment du ratio biodéchets / déchets verts, peut se révéler être un paramètre clef, car une augmentation de la proportion de déchets verts conduit à une augmentation de la concentration en azote ammoniacal pouvant entraîner une perturbation métabolique et possiblement un dysfonctionnement du méthaniseur.
- (iv) Les résultats obtenus lors de l'expérience visant à étudier l'effet de la recirculation de différents effluents dans une ISDND bioactive, montrent qu'il semble tout à fait envisageable d'utiliser d'autres effluents que les lixiviats d'ISDND eux-mêmes. L'utilisation de boues de station d'épuration ou de lixiviats de plate forme de compostage de déchets verts pourrait ainsi permettre de pallier à l'insuffisance des volumes de lixiviat produits, afin d'atteindre un taux d'humidité optimal pour la dégradation des déchets.

Enfin, une série de mesures réalisée sur une ISDND a permis de tester les potentialités d'une utilisation de l'approche isotopique pour évaluer l'état de dégradation du massif de déchets. Les résultats obtenus lors de ces essais n'ont pas permis de mettre en évidence des différences de signatures isotopiques en fonction de l'âge du déchet. Toutefois, les valeurs de composition isotopique mesurées sont bien comprises dans la gamme des valeurs bibliographiques spécifiques obtenues sur d'autres ISDND. Cet élément conforte les **possibilités d'une utilisation des mesures de composition isotopique afin de confirmer ou d'infirmer une éventuelle contamination de l'environnement**. Néanmoins, les valeurs mesurées *in-situ* ont également mis en évidence des compositions isotopiques du dioxyde de carbone particulièrement élevées. Ces valeurs atypiques sont à l'origine d'un recouvrement possible des gammes de composition isotopique du méthane produit par méthanogenèse hydrogénotrophe et acétoclaste. Il devient alors difficile d'identifier le métabolisme à l'origine de la production de méthane à partir d'un prélèvement unique.

L'ensemble des résultats obtenus démontre l'intérêt de l'approche isotopique, notamment car elle a permis de mettre en évidence l'importance de la réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate. Cette réaction généralement peu considérée lors de processus de méthanisation des DND, est ainsi probablement largement sous-estimée. Il apparaît notamment important de la prendre en considération lors de la modélisation du processus de digestion anaérobie. Le couplage des analyses isotopiques avec des analyses microbiologiques s'est révélé un complément essentiel pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors des changements métaboliques mis en évidence.

Toutefois, ces approches n'ont, à ce jour, pas permis de répondre à l'ensemble des interrogations soulevées lors de ce travail.

Conclusion générale

Tout d'abord, le déterminisme de l'effet de la température sur le métabolisme à l'origine de la production de méthane n'a pas été clairement établi lors de ce travail. En effet, bien que la concentration en azote ammoniacal soit suspectée d'être le facteur agissant directement, il n'est pas possible d'exclure l'effet individuel ou combiné d'autres paramètres (pH, concentration en acétate...). Il serait notamment intéressant de réaliser des incubations complémentaires en utilisant la méthode des plans d'expériences. En effet, cette approche est une solution envisageable afin de bien prendre en compte l'ensemble des phénomènes d'interactions pouvant intervenir entre les différents paramètres à tester.

Le rôle exact des membres de la famille *Methanosarcinaceae* dans la réaction d'OSA n'a également pas pu être déterminé de façon formelle. La réalisation d'incubations à haute concentration en azote ammoniacal en présence d'acétate (naturel et enrichi) en cultures pures d'archées de la famille *Methanosarcinaceae* avec et sans bactéries capables d'oxyder l'acétate, pourrait permettre d'évaluer la capacité des *Methanosarcinaceae* à réaliser entièrement la réaction d'OSA.

D'autres perspectives permettant de compléter ou d'étendre l'application des approches proposées peuvent être envisagées.

Il serait notamment intéressant de valider et d'appliquer l'approche isotopique reposant sur la mesure des rapports isotopiques de l'hydrogène, à l'étude des processus de méthanisation des DND. En effet, le couplage des approches isotopiques relatives aux isotopes du carbone et de l'hydrogène permettrait, sans nul doute, de faciliter et d'assoir les interprétations.

Le développement actuel des procédés industriels de méthanisation nécessite un effort de recherche important afin de permettre d'évaluer directement l'effet de certains paramètres opérationnels sur les installations afin d'en optimiser le fonctionnement. Des outils tels que l'approche isotopique développée dans le cadre de ce travail, en permettant d'évaluer la stabilité métabolique du fonctionnement de ces installations, seraient certainement d'une grande aide. L'apparition d'instruments plus simples (technique reposant sur une mesure optique) en rendant possible l'acquisition de mesures isotopiques *in situ* en continu, pourrait faciliter le déploiement de cette méthodologie sur site.

Enfin, il serait intéressant d'appliquer l'approche isotopique développée, à l'étude de l'effet d'autres paramètres opérationnels (taux d'humidité, agitation...) des méthaniseurs de déchets et à la digestion anaérobie d'autres types de matrices telles que les boues de STEP, les lisiers...

Références bibliographiques

- Abelson, P. H. et T. C. Hoering (1961). "Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **47**(5): 623-632.
- Achour, F. (2008). Caractérisation de la matière organique dans les ordures ménagères. recherche d'indicateurs de stabilité. INSA Lyon: 164 pages + annexes.
- Adams, F., L. Van Vaeck, et *al.* (2005). "Advanced analytical techniques: platform for nano materials science." Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy **60**(1): 13-26.
- Ademe (1993). MODECOM™. Méthode de Caractérisation des Ordures Ménagères, Connaître pour agir - Manuel de base.
- Ademe (1999). Composition des ordures ménagères en France (données et références): 60 pages.
- Ademe (1999). La composition des ordures ménagères en France (données et références). Paris, Ademe éditions.
- Ademe (1999b). Les installations de stockage de déchets ménagers et assimilés : techniques et recommandations. Paris, Ademe Editions.
- Ademe (2007). Les déchets en chiffres - Edition 2007: 14 pages.
- Ademe (2010). La composition des ordures ménagères et assimilées en France - Résultats de la campagne nationale de caractérisation de 2007. Paris, Ademe éditions.
- Aguilar-Juarez, O. (2000). Analyse et modélisation des réactions biologiques aérobies au cours de la phase d'exploitation d'un casier d'un centre d'enfouissement technique., INSA de Toulouse. **Thèse de doctorat spécialité Génie des Procédés**,: 233 p.
- Aguilera, R., M. Becchi, et *al.* (1996). "Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids." Journal of Mass Spectrometry **31**(2): 169-176.
- Ahring, B. K. (1994). "Status on science and application of thermophilic anaerobic digestion." Water Science and Technology **30**(12): 241-249.
- Ahring, B. K. (1995). "Methanogenesis in thermophilic biogas reactors." Antonie van Leeuwenhoek **67**(1): 91-102.
- Alcuta, A. (2006). Préparation des déchets ménagers et assimilés avant enfouissement : stratégies pour une gestion optimisée: 88 pages + annexes.
- Alperin, M. J., N. E. Blair, et *al.* (1992). "Factors that control the stable carbon isotopic composition of methane produced in an anoxic marine sediment." Global Biogeochem. Cycles **6**(3): 271-291.

Références bibliographiques

- Amann, R. I., B. J. Binder, et al. (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." Appl. Environ. Microbiol. **56**(6): 1919-1925.
- Angelidaki, I. et B. K. Ahring (1994). "Anaerobic Thermophilic Digestion of Manure at Different Ammonia Loads - Effect of Temperature." Water Research **28**(3): 727-731.
- Anthonisen, A. C., R. C. Loehr, et al. (1976). "Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous-Acid." Journal Water Pollution Control Federation **48**(5): 835-852.
- Archer, D. B. et B. H. Kirsop (1990). The microbiology and control of anaerobic digestion. In Anaerobic Digestion, a Waste Treatment Technology, Wheatley, A
- Attal, A., J. C. Akunna, et al. (1992). "Anaerobic Degradation of Municipal Wastes in Landfill." Water Science and Technology **25**(7): 243-253.
- Avery Jr, G. B., R. D. Shannon, et al. (1999). "Effect of seasonal changes in the pathways of methanogenesis on the ¹³C values of pore water methane in a Michigan peatland." Global Biogeochemical Cycles **13**(2): 475-484.
- Baedecker, M. J. et W. Back (1979). "Modern marine sediments as a natural analog to the chemically stressed environment of a landfill." J. Hydrol. (Amst.) **43**: 393-414.
- Balabane, M., E. Galimov, et al. (1987). "Hydrogen and carbon isotope fractionation during experimental production of bacterial methane." Organic Geochemistry **11**(2): 115-119.
- Barber, C. et P. J. Maris (1984). "Recirculation of Leachate as a Landfill Management Option: Benefits and Operational Problems." Quarterly journal of engineering geology **17**: 19-29.
- Barina, G., A. Budka, et al. (2001). Identification and Assesment of Leachate Recirculation Effects at a Real-Scale Landfill. Sardinia 2001, Heighth International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, CISA.
- Barlaz, M. A., R. K. Ham, et al. (1990). Methane Production from Municipal Refuse: a Review of Enhancement Techniques and Microbial Dynamics. Critical Reviews in Environmental Control. C. Press. **19**: 557-584.
- Barlaz, M. A., D. M. Schaefer, et al. (1989). "Bacterial population development and chemical characteristics of refuse decomposition in a simulated sanitary landfill." Applied and Environmental Microbiology **55**(1): 55-65.
- Batstone, D. J., J. Keller, et al. (2002). Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). International Water Association Scientific and Technical report n°13, London UK, IWA publishing. **45**: 68 p.
- Battistuzzi, F. U., A. Feijao, et al. (2004). "A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land." Bmc Evolutionary Biology **4**.

- Becher, B., V. Muller, et *al.* (1992). "N5-methyl-tetrahydromethanopterin:Coenzyme M methyltransferase of Methanosarcina strain Go1 is an Na⁺-translocating membrane protein." Journal of Bacteriology **174**(23): 7656-7660.
- Belyaev, S. S., R. Wolkin, et *al.* (1983). "Methanogenic Bacteria from the Bondyuzhskoe Oil Field: General Characterization and Analysis of Stable-Carbon Isotopic Fractionation." Appl. Environ. Microbiol. **45**(2): 691-697.
- Bendixen, H. J. (1994). "Safeguards against pathogens in Danish biogas plants." Water Science and Technology **30**(12): 171-180.
- Bergamaschi, P. et G. W. Harris (1995). "Measurements of stable isotope ratios (¹³CH₄/¹²CH₄; ¹²CH₃D/¹²CH₄) in landfill methane using a tunable diode laser absorption spectrometer." Global Biogeochemical Cycles **9**(4): 439-447.
- Bergamaschi, P., C. Lubina, et *al.* (1998). "Stable isotopic signatures (¹³C, D) of methane from European landfill sites." Journal of Geophysical Research D: Atmospheres **103**(D7): 8251-8265.
- Bergamaschi, P., M. Schupp, et *al.* (1994). "High-precision direct measurements of (¹³CH₄/¹²CH₄ and ¹²CH₃D/¹²CH₄) ratios in atmospheric methane sources by means of a long-path tunable diode laser absorption spectrometer." Applied Optics **33**(33): 7704-7716.
- Bernander, R. (1998). "Archaea and the cell cycle." Molecular Microbiology **29**(4): 955-961.
- Bhattacharya, S. K., R. L. Madura, et *al.* (1995a). "Toxic Effects of Cadmium on Methanogenic Systems." Water Research **29**(10): 2339-2345.
- Bhattacharya, S. K. et G. F. Parkin (1989). "The Effect of Ammonia on Methane Fermentation Processes." Journal Water Pollution Control Federation **61**(1): 55-59.
- Bhattacharya, S. K., V. Uberoi, et *al.* (1995b). "Effect of Cobalt on Methanogenesis." Environmental Technology **16**(3): 271-278.
- Blair, N. E. et W. D. Carter Jr (1992). "The carbon isotope biogeochemistry of acetate from a methanogenic marine sediment." Geochimica et Cosmochimica Acta **56**(3): 1247-1258.
- Blaut, M. (1994). "Metabolism of methanogens." Antonie van Leeuwenhoek **66**(1): 187-208.
- Bogner, J. E., R. E. Sweeney, et *al.* (1996). "Using isotopic and molecular data to model landfill gas processes." Waste Management & Research **14**(4): 367-376.
- Borja, R., E. Sanchez, et *al.* (1996). "Influence of Ammonia Concentration on Thermophilic Anaerobic Digestion of Cattle Manure in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors." Process Biochemistry **31**(5): 477-483.
- Börjesson, G., J. Samuelsson, et *al.* (2007). "Methane oxidation in Swedish landfills quantified with the stable carbon isotope technique in combination with an optical method for emitted methane." Environmental Science and Technology **41**(19): 6684-6690.

Références bibliographiques

- Botz, R., H.-D. Pokojski, et *al.* (1996). "Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO₂ reduction." Organic Geochemistry **25**(3-4): 255-262.
- Bouchez, T. et C. Bourdon (2001). Projet recirculation : Impact de la réinjection de concentrats de lixiviats dans un massif de déchets ménagers. Convention CReeD: 103 pages + annexes.
- Braun, R., P. Huber, et *al.* (1981). "Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion." Biotechnology Letters **3**(4): 159-164.
- Buffière, P., M. Carrere, et *al.* (2007). Guide méthodologique pour l'exploitation d'unités de méthanisation de déchets solides. METHAPI-Expertise.
- Buivid, M. G., D. L. Wise, et *al.* (1981). "Fuel Gas Enhancement by Controlled Landfilling of Municipal Solid Waste." Resources and Conservation **6**: 3-20.
- Bureau, C. (2003). Impact de l'injection d'oxydes d'azote (nitrite ou nitrate) sur les processus de biodégradation de déchets ménagers: 43 pages + annexes.
- Burton, S. A. Q. et I. A. Watson-Craik (1997). Nitrogen Balances in Landfills. The EPA, Waste Management Information Bureau. Abingdon, Oxfordshire, UK, Department of the Environment Report No CWM A 125b/97.
- Burton, S. A. Q. et I. A. Watson-Craik (1999). Accelerated Landfill Refuse Decomposition by Recirculation of Nitrified Leachate. Sardinia 1999, Seventh International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, CISA.
- Cabral, A. R., M. A. Capanema, et *al.* (2010). "Quantifying microbial methane oxidation efficiencies in two experimental landfill biocovers using stable isotopes." Water, Air, and Soil Pollution **209**(1-4): 157-172.
- Canalis, G. (1999). Hydrolysis of particulate starch under sub-optimal temperature conditions: Determining the effect of temperature on the rate of hydrolysis, enzyme production and enzyme activity. The Netherlands, Wageningen University. **MSc**.
- Cardinale, M., L. Brusetti, et *al.* (2004). "Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities." Applied and Environmental Microbiology **70**(10): 6147-6156.
- Casamayor, E. O., R. Massana, et *al.* (2002). "Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern." Environmental Microbiology **4**(6): 338-348.
- Castaing, R. et G. Slodzian (1962). "Microanalyse par émission ionique secondaire." Journal de Microscopie **1**: 395-410.
- Chan, G. Y. S., L. M. Chu, et *al.* (2002). "Effects of Leachate Recirculation on Biogas Production from Landfill Co-disposal of Municipal Solid Waste, Sewage Sludge and Marine Sediment." Environmental Pollution **118**: 393-399.

- Chan, O. C., P. Claus, et al. (2005). "Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment." Environmental Microbiology **7**(8): 1139-1149.
- Chanton, J. et K. Liptay (2000). "Seasonal variation in methane oxidation in a landfill cover soil as determined by an in situ stable isotope technique." Global Biogeochemical Cycles **14**(1): 51-60.
- Chanton, J. P., D. K. Powelson, et al. (2008). "Effect of temperature and oxidation rate on carbon-isotope fractionation during methane oxidation by landfill cover materials." Environmental Science and Technology **42**(21): 7818-7823.
- Chanton, J. P., D. K. Powelson, et al. (2008). "Improved field methods to quantify methane oxidation in landfill cover materials using stable carbon isotopes." Environmental Science and Technology **42**(3): 665-670.
- Chanton, J. P., C. M. Rutkowski, et al. (1999). "Quantifying methane oxidation from landfills using stable isotope analysis of downwind plumes." Environmental Science and Technology **33**(21): 3755-3760.
- Chen, A. C., A. Ohashi, et al. (2003). "Acetate Synthesis from H₂/CO₂ in Simulated and Actual Landfill Samples." Environmental Technology **24**: 435-443.
- Chen, C.-L., J.-H. Wu, et al. (2008). "Identification of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia." Water Research **42**(8-9): 1963-1976.
- Chen, H., H. Ecke, et al. (1995). Biochemical methane potential assays of solid waste samples. V International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, October, Proceedings Sardinia 1995.
- Chen, W. H., S. K. Han, et al. (2003). "Sodium inhibition of thermophilic methanogens." Journal of Environmental Engineering **129**(6): 506-512.
- Chen, Y., J. J. Cheng, et al. (2008). "Inhibition of anaerobic digestion process: A review." Bioresource Technology **99**(10): 4044-4064.
- Chian, E. S. K. et F. B. De Walle (1976). "Sanitary Landfill Leachates and their Treatment - A Review." Journal of Environmental Engineering - ASCE **102**: 416-431.
- Chidthaisong, A., K. J. Chin, et al. (2002). "A comparison of isotope fractionation of carbon and hydrogen from paddy field rice roots and soil bacterial enrichments during CO₂/H₂ methanogenesis." Geochimica Et Cosmochimica Acta **66**(6): 983-995.
- Christensen, T. H. et P. Kjeldsen (1989). "Basic Biochemical Processes in Landfills." Sanitary Landfilling: Process, Technology and Environmental Impact(cité par Yuen, S. T. S. (1999)).
- Codina, J. C., M. A. Munoz, et al. (1998). "The Inhibition of Methanogenic Activity from Anaerobic Domestic Sludges as a Simple Toxicity Bioassay." Water Research **32**(4): 1338-1342.

Références bibliographiques

- Coleman, D. D., C. L. Liu, et *al.* (1993). Identification of landfill methane using carbon and hydrogen isotope analysis. Proceedings of 16th International Madison Waste Conference, , Municipal & Industrial Waste, Dept. of Engineering Professional Development, Univ. of WisconsinMadison,.
- Conrad, R. (1999). "Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments." FEMS Microbiology Ecology **28**(3): 193-202.
- Conrad, R. (2005). "Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal." Organic Geochemistry **36**(5): 739-752.
- Conrad, R., F. Bak, et *al.* (1989). "Hydrogen Turnover by Psychrotrophic Homoacetogenic and Mesophilic Methanogenic Bacteria in Anoxic Paddy Soil and Lake Sediment." Fems Microbiology Ecology **62**(5): 285-294.
- Conrad, R. et P. Claus (2005). "Contribution of methanol to the production of methane and its ¹³C-isotopic signature in anoxic rice field soil." Biogeochemistry **73**(2): 381-393.
- Conrad, R. et M. Klose (1999). "How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil?" Fems Microbiology Ecology **30**(1): 47-56.
- Conrad, R., M. Klose, et *al.* (2000). "Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots." Applied and Environmental Microbiology **66**(2): 828-831.
- Conrad, R., M. Klose, et *al.* (2002). "Pathway of CH₄ formation in anoxic rice field soil and rice roots determined by ¹³C-stable isotope fractionation." Chemosphere **47**(8): 797-806.
- Conrad, R., M. Klose, et *al.* (2009). "Functional and structural response of the methanogenic microbial community in rice field soil to temperature change." Environmental Microbiology **11**(7): 1844-1853.
- Cresson, R. (2006). Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation. Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm, Université Montpellier II: 260 pages + annexes.
- Crocetti, G., M. Murto, et *al.* (2006). "An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH)." Journal of Microbiological Methods **65**(1): 194-201.
- Daims, H., S. Lüscher, et *al.* (2006). "daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research." Environmental Microbiology **8**(2): 200-213.
- Debaere, L. A., M. Devocht, et *al.* (1984). "Influence of High NaCl and NH₄Cl Salt Levels on Methanogenic Associations." Water Research **18**(5): 543-548.
- Delineau, T. et A. Budka (2000). Le concept du bioréacteur. Paris, Convention Ademe/SITA/9906013, Ademe éditions.

- Demeyer, A., F. Jacob, et al. (1981). La fermentation méthanique. La conversion bioénergétique du rayonnement solaire et les biotechnologies. Paris, Technique et Documentation: 213-249.
- Demir, A., M. S. Bilgili, et al. (2004b). "Effect of Leachate Recirculation on Refuse Decomposition Rates at Landfill Site: a Case Study." International Journal of Environment and Pollution **21**(2): 175-187.
- Demir, A., B. Ozkaya, et al. (2004a). "The Effects on Waste Stabilization of Leachate Recirculation in Landfills." Fresenius Environmental Bulletin **13**(10): 918-922.
- Demirel, B. et P. Scherer (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**(2): 173-190.
- Deppenmeier, U., T. Lienard, et al. (1999). "Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea." FEBS Letters **457**(3): 291-297.
- Dimroth, P. et A. Thomer (1989). "A primary respiratory Na⁺ pump of an anaerobic bacterium: the Na⁺-dependent NADH:quinone oxidoreductase of *Klebsiella pneumoniae*." Archives of Microbiology **151**(5): 439-444.
- Ehrig, H. J. (1983). "Quality and Quantity of Sanitary Landfill Leachate." Waste Management and Research **1**: 53-68.
- Ekiel, I., G. D. Sprott, et al. (1985). "Acetate and CO₂ assimilation by *Methanotrix concilii*." Journal of bacteriology **162**: 905-908.
- El-Fadel, M. (1999). "Leachate Recirculation Effects on Settlement and Biodegradation Rates in MSW Landfills." Environmental Technology **20**: 1-13.
- El-Fadel, M., A. N. Findikakis, et al. (1996). "Estimating and Enhancing Methane Yield from Municipal Solid Waste." Hazardous Waste & Hazardous Materials **13**(3): 309-331.
- El-Mashad, H. M., G. Zeeman, et al. (2004). "Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure." Bioresource Technology **95**(2): 191-201.
- El Hadj, T. B., S. Astals, et al. (2009). "Ammonia influence in anaerobic digestion of OFMSW." Water Science and Technology **59**(6): 1153-1158.
- Farquhar, G. J. et F. A. Rovers (1973). "Gas Production during Refuse Decomposition." Water Air Soil Pollution **2**: 483.
- Feijoo, G., M. Soto, et al. (1995). "Sodium Inhibition in the Anaerobic-Digestion Process - Antagonism and Adaptation Phenomena." Enzyme and Microbial Technology **17**(2): 180-188.
- Ferry, J. G. (1993). "Fermentation of acetate." In Ferry, J. G. (Ed.) Methanogenesis. Chapman and Hall, New York.: 305-324.

Références bibliographiques

- Ferry, J. G. (1999). "Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways." FEMS Microbiology Reviews **23**(1): 13-38.
- Fey, A., P. Claus, et al. (2004). "Temporal change of C-13-isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures." Geochimica Et Cosmochimica Acta **68**(2): 293-306.
- Finster, K., F. Bak, et al. (1994). "Desulfuromonas acetexigens; sp. nov., a dissimilatory sulfur-reducing eubacterium from anoxic freshwater sediments." Archives of Microbiology **161**(4): 328-332.
- Fisher, M. M. et E. W. Triplett (1999). "Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities." Applied and Environmental Microbiology **65**(10): 4630-4636.
- François, V. (2004). Détermination d'indicateur d'accélération et de stabilisation de déchets ménagers enfouis. Etude de l'impact de la recirculation de lixiviats sur colonnes de déchets. Université de Limoges: 151 pages + annexes.
- Francou, C., M. Linères, et al. (2008). "Influence of green waste, biowaste and paper-cardboard initial ratios on organic matter transformations during composting." Bioresource Technology **99**(18): 8926-8934.
- Frenzel, P. et U. Bosse (1996). "Methyl fluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production." FEMS Microbiology Ecology **21**(1): 25-36.
- Fuchs, G., R. Thauer, et al. (1979). "Carbon isotope fractionation by Methanobacterium thermoautotrophicum." Archives of Microbiology **120**(2): 135-139.
- Gachet, C. (2005). Evolution bio-physico-chimique des déchets enfouis au Centre de Stockage de Déchets Ultimes du SYDOM du Jura sous l'effet de la recirculation des lixiviats. INSA Lyon: 222 pages + annexes.
- Gallert, C., S. Bauer, et al. (1998). "Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population." Applied Microbiology and Biotechnology **50**(4): 495-501.
- Gallert, C. et J. Winter (1997). "Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production." Applied microbiology and biotechnology **48**(3): 405-410.
- Galushko, A. S. et B. Schink (2000). "Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by Geobacter sulfurreducens in pure culture and in syntrophic coculture." Archives of Microbiology **174**(5): 314-321.
- Games, L. M. et J. M. Hayes (1977). "Carbon isotopic study of the fate of landfill leachate in groundwater." Journal of the Water Pollution Control Federation **49**(4): 668-677.
- Games, L. M., J. M. Hayes, Robert, et al. (1978). "Methane-producing bacteria: natural fractionations of the stable carbon isotopes." Geochimica et Cosmochimica Acta **42**(8): 1295-1297.

- Gartner, P., D. S. Weiss, et al. (1994). "N-methyltetrahydromethanopterin: Coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Catalytic mechanism and sodium ion dependence." European Journal of Biochemistry **226**(2): 465-472.
- Gelwicks, J. T., J. B. Risatti, et al. (1994). "Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis." Applied and Environmental Microbiology **60**(2): 467-472.
- Girguis, P. R., V. J. Orphan, et al. (2003). "Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor." Applied and Environmental Microbiology **69**(9): 5472-5482.
- Goevert, D. et R. Conrad (2009). "Effect of substrate concentration on carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *M. acetivorans* and in rice field soil." Applied and Environmental Microbiology **75**(9): 2605-2612.
- Gomec, C. Y., I. Letsiou, et al. (2008). "Identification of Archaeal population in the granular sludge of an UASB reactor treating sewage at low temperatures." Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering **43**(13): 1504-1510.
- Gottschalk, G. et R. K. Thauer (2001). "The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea." Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics **1505**(1): 28-36.
- Guerquin-Kern, J. L., T. D. Wu, et al. (2005). "Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy)." Biochim Biophys Acta **1724**(3): 228-38.
- Guichardaz, O. (2008). "Méthanisation : Les pionniers essuient les platres." Environnement & Technique **280**: 23-27.
- Gurijala, R. K. et J. M. Suflita (1993). "Environmental Factors Influencing Methanogenesis from Refuse in Landfill Samples." Environmental Science and Technology **27**(6): 1176-1181.
- Hackley, K. C., C. L. Liu, et al. (1996). "Environmental isotope characteristics of landfill leachates and gases." Ground Water **34**(5): 827-836.
- Hallam, S. J., P. R. Girguis, et al. (2003). "Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea." Applied and Environmental Microbiology **69**(9): 5483-5491.
- Harms, U., D. S. Weiss, et al. (1995). "The energy conserving N5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum* is composed of eight different subunits." European Journal of Biochemistry **228**(3): 640-648.
- Harries, C. R., C. R. Cross, et al. (2001a). Application of biochemical methane potential (BMP) testing to the study of MSW decomposition in a municipal solid waste

Références bibliographiques

- lysimeter. Sardinia 2001, Heighth International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, CISA.
- Harries, C. R., C. R. Cross, et al. (2001b). Development of a biochemical methane potential (BMP) test and application to testing of municipal solid waste samples. Sardinia 2001, Heighth International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, CISA.
- Harries, C. R., A. Scrivens, et al. (1990). "Initiation of Methanogenesis in Municipal Solid-Waste. The Effect of Heavy-Metals on the Initiation of Methanogenesis in MSW Leachate." Environmental Technology **11**(12): 1169-1175.
- Hattori, S. (2008). "Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments." Microbes and Environments **23**(2): 118-127.
- Hattori, S., Y. Kamagata, et al. (2000). "Thermacetogenium phaeum gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **50**(4): 1601-1609.
- Hein, R., P. J. Crutzen, et al. (1997). "An inverse modeling approach to investigate the global atmospheric methane cycle." Global Biogeochemical Cycles **11**(1): 43-76.
- Heiss-Ziegler, C. et P. Lechner (1999). Behaviour of stabilized organic matter under anaerobic landfill conditions. VII International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, October, Proceedings Sardinia 1999.
- Hendriksen, H. V. et B. K. Ahring (1991). "Effects of ammonia on growth and morphology of thermophilic hydrogen-oxidizing methanogenic bacteria." FEMS Microbiology Ecology **85**(3): 241-246.
- Heyer, J., H. Hübner, et al. (1976). "Isotopenfraktionierung des Kohlenstoffs bei der mikrobiellen Methanbildung." Isotopenpraxis Isotopes in Environmental and Health Studies **12**(5): 202 - 205.
- Hoefs, J. (1997). Stable isotope geochemistry.
- Hoehler, T. M., D. B. Albert, et al. (1999). "Acetogenesis from CO₂ in an anoxic marine sediment." Limnology and Oceanography **44**(3): 662-667.
- Hornibrook, E. R. C., F. J. Longstaffe, et al. (2000). "Evolution of stable carbon isotope compositions for methane and carbon dioxide in freshwater wetlands and other anaerobic environments." Geochimica et Cosmochimica Acta **64**(6): 1013-1027.
- Illmer, P. et G. Gstraunthaler (2009). "Effect of seasonal changes in quantities of biowaste on full scale anaerobic digester performance." Waste Management **29**(1): 162-167.
- Janssen, L. H. J. M., J. G. J. Olivier, et al. (1999). "Comparison of CH₄ emission inventory data and emission estimates from atmospheric transport models and concentration measurements." Environmental Science & Policy **2**(3): 295-314.

- Janssen, P. H. et P. Frenzel (1997). "Inhibition of methanogenesis by methyl fluoride: Studies of pure and defined mixed cultures of anaerobic bacteria and archaea." Applied and Environmental Microbiology **63**(11): 4552-4557.
- Jee, H. S., T. Mano, et *al.* (1988). "Influence of Redox Potential on Methanisation of Methanol by *Methanosarcina barkeri* in Eh-stat batch Culture." Journal of Fermentation Technology **66**: 123-126.
- Jokela, J. P. Y., R. H. Kettunen, et *al.* (1999). Influence of Waste Moisture on Methane Production and Leachate Characteristics. Sardinia 1999, Seventh International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, CISA.
- Jouzel, J., R. D. Koster, et *al.* (1994). "Stable water isotope behavior during the last glacial maximum: a general circulation model analysis." Journal of Geophysical Research **99**(D12).
- Karakashev, D., D. J. Batstone, et *al.* (2006). "Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosacetaceae*." Applied and Environmental Microbiology **72**(7): 5138-5141.
- Kato, M. T., J. A. Field, et *al.* (1997). "Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment." Brazilian Journal of Chemical Engineering **14**(4): 395-407.
- Kayhanian, M. (1994). "Performance of a High-Solids Anaerobic-Digestion Process under Various Ammonia Concentrations." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **59**(4): 349-352.
- Kayhanian, M. (1999). "Ammonia inhibition in high-solids biogasification: An overview and practical solutions." Environmental Technology **20**(4): 355-365.
- Keltjens, J. T. et G. D. Vogels (1993). Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics. New York, Chapman & Hall.
- Kenealy, W. R. et J. G. Zeikus (1982). "One-Carbon Metabolism in Methanogens: Evidence for Synthesis of a Two-Carbon Cellular Intermediate and Unification of Catabolism and Anabolism in *Methanosarcina barkeri*." J. Bacteriol. **151**(2): 932-941.
- Kepler, F., S. Laukenmann, et *al.* (2010). "Measurements of ¹³C/¹²C methane from anaerobic digesters: Comparison of optical spectrometry with continuous-flow isotope ratio mass spectrometry." Environmental Science and Technology **44**(13): 5067-5073.
- Kim, J. et F. G. Pohland (2003). "Process Enhancement in Anaerobic Bioreactor Landfills." Water Science and Technology **48**(4): 29-36.
- Knittel, K., T. Lösekann, et *al.* (2005). "Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps." Applied and Environmental Microbiology **71**(1): 467-479.
- Koschorreck, M., K. Wendt-Potthoff, et *al.* (2008). "Methanogenesis in the sediment of the acidic Lake Caviahue in Argentina." Journal of Volcanology and Geothermal Research **178**(2): 197-204.

Références bibliographiques

- Koster, I. W. et G. Lettinga (1988). "Anaerobic-Digestion at Extreme Ammonia Concentrations." Biological Wastes **25**(1): 51-59.
- Kotsyurbenko, O. R., K. J. Chin, et al. (2004). "Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog." Environmental Microbiology **6**(11): 1159-1173.
- Kroeker, E. J., D. D. Schulte, et al. (1979). "Anaerobic treatment process stability." Journal of the Water Pollution Control Federation **51**(4): 718-727.
- Krzycki, J. A., W. R. Kenealy, et al. (1987). "Stable Carbon Isotope Fractionation by *Methanosarcina barkeri* during Methanogenesis from Acetate, Methanol, or Carbon Dioxide-Hydrogen." Appl. Environ. Microbiol. **53**(10): 2597-2599.
- Lansdown, J. M., P. D. Quay, et al. (1992). "CH₄ production via CO₂ reduction in a temperate bog: A source of ¹³C-depleted CH₄." Geochimica et Cosmochimica Acta **56**(9): 3493-3503.
- Lay, J. J., Y. Y. Li, et al. (1998). "Dynamics of methanogenic activities in a landfill bioreactor treating the organic fraction of municipal solid wastes." Water Science and Technology **38**(2): 177-184.
- Lay, J. J., Y. Y. Li, et al. (1998). "The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion processes." Water Environment Research **70**(5): 1075-1082.
- Lay, J. J., Y. Y. Li, et al. (1998). "Mathematical model for methane production from landfill bioreactor." Journal of Environmental Engineering-Asce **124**(8): 730-736.
- Leckie, J. O., J. G. Pacey, et al. (1979). "Landfill Management with Moisture Control." Journal of Environmental Engineering - ASCE **105**(EE2): 337-355.
- Lee, M. J. et S. H. Zinder (1988). "Isolation and Characterization of a Thermophilic Bacterium Which Oxidizes Acetate in Syntrophic Association with a Methanogen and Which Grows Acetogenically on H₂-CO₂." Applied and Environmental Microbiology **54**(1): 124-129.
- Lelieveld, J., P. J. Crutzen, et al. (1998). "Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane." Tellus **50B**: pp. 18-150.
- Lessner, D. J., L. Li, et al. (2006). "An unconventional pathway for reduction of CO₂ to methane in CO-grown *Methanosarcina acetivorans* revealed by proteomics." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(47): 17921-17926.
- Li, T. (2008). Groupes microbiens fonctionnels impliqués dans la méthanisation de la cellulose et du méthanol : diversité, fonction et influence de la température., Université Paris XI: 225 pages + annexes.
- Li, T., T. D. Wu, et al. (2008). "Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS." Environmental Microbiology **10**(3): 580-588.

- Lin, C. Y. (1992). "Effect of Heavy-Metals on Volatile Fatty-Acid Degradation in Anaerobic-Digestion." Water Research **26**(2): 177-183.
- Lin, C. Y. (1993). "Effect of Heavy-Metals on Acidogenesis in Anaerobic-Digestion." Water Research **27**(1): 147-152.
- Lin, C. Y. et C. C. Chen (1999). "Effect of Heavy Metals on the Methanogenic UASB Granule." Water Research **33**(2): 409-416.
- Liptay, K., J. Chanton, et al. (1998). "Use of stable isotopes to determine methane oxidation in landfill cover soils." Journal of Geophysical Research D: Atmospheres **103**(D7): 8243-8250.
- Liu, C. L., K. C. Hackley, et al. (1992). Application of environmental isotopes to characterize landfill gases and leachate. Geol. Soc. of Am., Abstracts with Programs, 1992 Annual Meeting, Cincinnati, OH. p. A35.
- Liu, T. et S. Sung (2002). "Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens." Water Science and Technology **45**(10): 113-120.
- Lovley, D. R. et J. G. Ferry (1985). "Production and Consumption of H-2 During Growth of Methanosarcina Spp on Acetate." Applied and Environmental Microbiology **49**(1): 247-249.
- Lovley, D. R. et M. J. Klug (1983). "Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake." Applied and Environmental Microbiology **45**(4): 1310-1315.
- Loy, A., A. Lehner, et al. (2002). "Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment." Applied and Environmental Microbiology **68**(10): 5064-5081.
- Mahieu, K., A. De Visscher, et al. (2008). "Modelling of stable isotope fractionation by methane oxidation and diffusion in landfill cover soils." Waste Management **28**(9): 1535-1542.
- Mariotti, A., J. C. Germon, et al. (1981). "Experimental-Determination of Nitrogen Kinetic Isotope Fractionation - Some Principles - Illustration for the Denitrification and Nitrification Processes." Plant and Soil **62**(3): 413-430.
- Mata-Alvarez, J. (2003). Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes, IWA.
- Mata-Alvarez, J., S. Mace, et al. (2000). "Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives." Bioresource Technology **74**(1): 3-16.
- Mazeas, L. (2000). Etude de l'origine et du devenir des hydrocarbures dans le milieu marin : Approches moléculaire et isotopique. Application aux pollutions pétrolières., Université Bordeaux I: 97 pages + annexes.

Références bibliographiques

- Mc Carty, P. L. (1964). "Anaerobic waste treatment fundamentals." Public Works **95**(9): 107-112.
- McInerney, J. O., M. Wilkinson, et al. (1995). "Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder." Applied and Environmental Microbiology **61**(4): 1646-1648.
- Mehta, R., M. A. Barlaz, et al. (2002). "Refuse Decomposition in the Presence and Absence of Leachate Recirculation." Journal of Environmental Engineering - ASCE **128**(3): 228-236.
- Melbinger, N. R. et J. Donnellon (1971). "Toxic effects of ammonia-nitrogen in high rate digestion." J. Water Pollut. Control Fed., **43**: pp. 1658-1670.
- Michaelis, W., R. Seifert, et al. (2002). "Microbial reefs in the black sea fueled by anaerobic oxidation of methane." Science **297**(5583): 1013-1015.
- Mohammadzadeh, H., I. Clark, et al. (2005). "Compound Specific Isotopic Analysis (CSIA) of landfill leachate DOC components." Chemical Geology **218**(1-2): 3-13.
- Moletta, R. (2002). Note de synthèse du rapport : étude bibliographique sur la méthanisation des déchets organiques. Record.
- Moletta, R. (2008). La méthanisation.
- Mook, W. G., J. C. Bommerson, et al. (1974). "Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide." Earth and Planetary Science Letters **22**(2): 169-176.
- Mueller, R. F. et A. Steiner (1992). "Inhibition of Anaerobic-Digestion Caused by Heavy-Metals." Water Science and Technology **26**(3-4): 835-846.
- Nauhaus, K., A. Boetius, et al. (2002). "In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area." Environmental Microbiology **4**(5): 296-305.
- North, J. C., R. D. Frew, et al. (2006). "Can stable isotopes be used to monitor landfill leachate impact on surface waters?" Journal of Geochemical Exploration **88**(1-3): 49-53.
- Nozhevnikova, A., M. Glagolev, et al. (2003). The analysis of methods for measurement of methane oxidation in landfills. Water Science and Technology. **48**: 45-52.
- Nozhevnikova, A. N., A. B. Lifshitz, et al. (1993). "Emission of methane into the atmosphere from landfills in the former USSR." Chemosphere **26**(1-4): 401-417.
- Nusslein, B., W. Eckert, et al. (2003). "Stable Isotope Biogeochemistry of Methane Formation in Profundal Sediments of Lake Kinneret (Israel)." Limnology and Oceanography **48**(4): 1439-1446.
- Oremland, R. S. (1988). Biogeochemistry of Methanogenic Bacteria. Biology of Anaerobic Microorganisms. A. J. B. E. Zehnder. New York, John Wiley and sons: 641-705.

- Oremland, R. S., L. Marsh, et al. (1982). "Methanogenesis in Big Soda Lake, Nevada: an Alkaline, Moderately Hypersaline Desert Lake." Appl. Environ. Microbiol. **43**(2): 462-468.
- Orphan, V. J., C. H. House, et al. (2001). "Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis." Science **293**(5529): 484-487.
- Owens, J. M. et D. P. Chynoweth (1993). "Biochemical Methane Potential of Municipal Solid-Waste (MSW) Components." Water Science and Technology **27**(2): 1-14.
- Ozkaya, B., A. Demir, et al. (2004). "Enhanced stabilization and methane potential of MSWs in a field-scale landfill with leachate recirculation." International Journal of Environment and Pollution **21**(3): 277-292.
- Pacey, J. (1999). "Landfill performance expectations." MSW Management: 84-87.
- Pacholski, M. L. et N. Winograd (1999). "Imaging with mass spectrometry." Chemical Reviews **99**(10): 2977-+.
- Palmisano, A. C. et M. A. Barlaz (1996). Microbiology of solid waste, Boca Raton : CRC Press, Inc.
- Park, R. et S. Epstein (1960). "Carbon isotope fractionation during photosynthesis." Geochim. et Cosmochim. Acta; Journal Volume: Vol: 21;: Pages: 110-26.
- Parkin, G. F. et S. W. Miller (1983). Response of methane fermentation to continuous addition of selected industrial toxicants. Proceedings of the Industrial Waste Conference.
- Pavlostathis, S. G. et E. Giraldo-Gomez (1991). "Kinetics of anaerobic treatment: A critical review." Critical Reviews in Environmental Control **21**(5-6): 411-490.
- Pelmont, J. (1993). Bactéries et environnements, adaptations physiologiques, Editions Pug.
- Penning, H., P. Claus, et al. (2006c). "Carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosaeta concilii* in culture and a lake sediment." Applied and Environmental Microbiology **72**(8): 5648-5652.
- Penning, H. et R. Conrad (2007). "Quantification of carbon flow from stable isotope fractionation in rice field soils with different organic matter content." Organic Geochemistry **38**(12): 2058-2069.
- Penning, H., C. M. Plugge, et al. (2005). "Variation of carbon isotope fractionation in hydrogenotrophic methanogenic microbial cultures and environmental samples at different energy status." Global Change Biology **11**(12): 2103-2113.
- Penning, H., S. C. Tyler, et al. (2006d). "Determination of isotope fractionation factors and quantification of carbon flow by stable carbon isotope signatures in a methanogenic rice root model system." Geobiology **4**(2): 109-121.
- Percheron, G. (1997). Dépollution carbonée et azotée d'un effluent industriel riche en sulfate. Université de Montpellier-II. Montpellier: 177 pages.

Références bibliographiques

- Peteranderl, R. et C. Lechene (2004). "Measure of carbon and nitrogen stable isotope ratios in cultured cells." J Am Soc Mass Spectrom **15**(4): 478-85.
- Peters, V. et R. Conrad (1995). "Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils." Applied and Environmental Microbiology **61**(4): 1673-1676.
- Pfennig, N. et H. Biebl (1976). "Desulfuromonas acetoxidans; gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium." Archives of Microbiology **110**(1): 3-12.
- Pohland, F. G. (1975). Sanitary Landfill Stabilization with Leachate Recycle and Residual Treatment. Cincinnati, Ohio, EPA.
- Pohland, F. G. et B. Al-Yousfi (1994). "Design and Operation of Landfills for Optimum Stabilization and Biogas Production." Water Science and Technology **30**(12): 117-124.
- Prescott, L., J. Harley, et al. (2003). Microbiologie, De Boeck Université.
- Qu, X., L. Mazeas, et al. (2008). "Combined monitoring of changes in $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ and archaeal community structure during mesophilic methanization of municipal solid waste." FEMS Microb Ecol.
- Qu, X., V. A. Vavilin, et al. (2009). "Anaerobic biodegradation of cellulosic material: Batch experiments and modelling based on isotopic data and focusing on aceticlastic and non-aceticlastic methanogenesis." Waste Management **29**(6): 1828-1837.
- Radajewski, S., P. Ineson, et al. (2000). "Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology." Nature **403**(6770): 646-649.
- Raghoebarsing, A. A., A. Pol, et al. (2006). "A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification." Nature **440**(7086): 918-921.
- Raskin, L., J. M. Stromley, et al. (1994). "Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens." Applied and Environmental Microbiology **60**(4): 1232-1240.
- Rees, J. F. (1980). "Optimisation of Methane Production and Refuse Decomposition in Landfills by Temperature Control." Journal of chemical technology and biotechnology **30**: 458.
- Reinhart, D. R. (1996). "Full-Scale Experiences with Leachate Recirculation Landfills: Case Studies." Waste Management and Research **14**: 347-365.
- Reinhart, D. R. et A. B. Al-Yousfi (1996). "The Impact of Leachate Recirculation on MSW Landfill Operating Characteristics." Waste Management and Research **14**: 337-346.
- Reinhart, D. R. et T. G. Townsend (1998). "Landfill Bioreactor Design and Operation." Lewis Publishers, Boca Raton, NY: 189 pages.

- Rinzema, A., J. van Lier, et *al.* (1988). "Sodium Inhibition of Acetoclastic Methanogens in Granular Sludge from a UASB Reactor." Enzyme and Microbial Technology **10**(1): 24-32.
- Robbins, J. E., S. A. Gerhardt, et *al.* (1989). "Effects of Total Ammonia on Anaerobic-Digestion and an Example of Digester Performance from Cattle Manure Protein Mixtures." Biological Wastes **27**(1): 1-14.
- Rosenfeld, W. D. et S. R. Silverman (1959). "Carbon isotope fractionation in bacterial production of methane." Science **130**(3389): 1658-1659.
- Rother, M. et W. W. Metcalf (2004). "Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: An unusual way of life for a methanogenic archaeon." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(48): 16929-16934.
- San, I. et T. T. Onay (2001). "Impact of Various Leachate Recirculation Regimes on Municipal Solid Waste Degradation." Journal of Hazardous Materials **87**(1-3): 259-271.
- Schink, B. (1997). "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation." Microbiology and Molecular Biology Reviews **61**(2): 262-280.
- Schmidt, J. E. et B. K. Ahring (1993). "Effects of magnesium on thermophilic acetate-degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors." Enzyme and Microbial Technology **15**(4): 304-310.
- Schnurer, A. et A. Nordberg (2008). "Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature." Water Science and Technology **57**(5): 735-740.
- Schnurer, A., B. Schink, et *al.* (1996). "*Clostridium ultunense* sp nov, a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium." International Journal of Systematic Bacteriology **46**(4): 1145-1152.
- Schnurer, A., G. Zellner, et *al.* (1999). "Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors." FEMS Microbiology Ecology **29**(3): 249-261.
- Shieh, J. S. et W. B. Whitman (1987). "Pathway of acetate assimilation in autotrophic and heterotrophic methanococci." J. Bacteriol. **169**(11): 5327-5329.
- Shigematsu, T., Y. Tang, et *al.* (2004). "Effect of Dilution Rate on Metabolic Pathway Shift between Aceticlastic and Nonaceticlastic Methanogenesis in Chemostat Cultivation." Appl. Environ. Microbiol. **70**(7): 4048-4052.
- Siegert, I. et C. Banks (2005). "The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors." Process Biochemistry **40**(11): 3412-3418.
- Simpson, P. G. et W. B. Whitman (1993). "Anabolic pathways in methanogens." In Ferry, J. G. (Ed.) Methanogenesis. Chapman and Hall, New York.: 445-472.

Références bibliographiques

- Slodzian, G., B. Daigne, et al. (1992). "Scanning Secondary Ion Analytical Microscopy with Parallel Detection." Biology of the Cell **74**(1): 43-50.
- Smith, B. N. et S. Epstein (1971). "Two Categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios for Higher Plants " Plant Physiology **47**(3): 380-384.
- Song, M., S. G. Shin, et al. (2010). "Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater." Bioresource Technology **101**(1, Supplement 1): S23-S28.
- Speece, R. E. et G. F. Parkin (1983). The Response of Methane Bacteria to Toxicity. 3th International Symposium on Anaerobic Digestion, Boston.
- Sprott, G. D. et G. B. Patel (1986). "Ammonia Toxicity in Pure Cultures of Methanogenic Bacteria." Systematic and Applied Microbiology **7**(2-3): 358-363.
- Sprott, G. D., K. M. Shaw, et al. (1984). "Ammonia-Potassium Exchange in Methanogenic Bacteria." Journal of Biological Chemistry **259**(20): 2602-2608.
- Suflita, J. M., C. P. Gerba, et al. (1992). "The World's Largest Landfill." Environmental Science and Technology **26**: 1486-1495.
- Sugimoto, A. et E. Wada (1993). "Carbon isotopic composition of bacterial methane in a soil incubation experiment: Contributions of acetate and." Geochimica et Cosmochimica Acta **57**(16): 4015-4027.
- Summons, R. E., P. D. Franzmann, et al. (1998). "Carbon isotopic fractionation associated with methylotrophic methanogenesis." Organic Geochemistry **28**(7-8): 465-475.
- Tchobanoglous, F., H. Theisen, et al. (1993). Integrated Solid Waste Management: Engineering Principles and Management Issues, McGraw-Hill, New York, Cité par Burton S. A. Q. et Watson-Craik I. A.(1998).
- Thauer, R. K., K. Jungermann, et al. (1977). "Energy-Conservation in Chemotropic Anaerobic Bacteria." Bacteriological Reviews **41**(1): 100-180.
- Tholozan, J.-L. (1988). Métabolisme des acides gras volatils dans les écosystèmes méthanogènes: application de la RMN du carbone 13, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois: 96.
- Titlebaum, M. E. (1982). "Organic Carbon Content Stabilization Through Landfill Leachate Recirculation." Journal of Water Pollution Control Federation **54**(5): 428-433.
- Tyler, S. C., R. S. Bilek, et al. (1997). "Methane oxidation and pathways of production in a Texas paddy field deduced from measurements of flux, $\delta\text{C-}^{13}$, and δD of CH_4 ." Global Biogeochemical Cycles **11**(3): 323-348.
- Valentine, D. L. (2002). "Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: A review." Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology **81**(1-4): 271-282.

- Valentine, D. L., A. Chidthaisong, et *al.* (2004). "Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens." Geochimica Et Cosmochimica Acta **68**(7): 1571-1590.
- Van Breukelen, B. M. et J. Griffioen (2004). "Biogeochemical processes at the fringe of a landfill leachate pollution plume: Potential for dissolved organic carbon, Fe(II), Mn(II), NH₄, and CH₄ oxidation." Journal of Contaminant Hydrology **73**(1-4): 181-205.
- van Breukelen, B. M., W. F. M. Roling, et *al.* (2003). "Biogeochemistry and isotope geochemistry of a landfill leachate plume." Journal of Contaminant Hydrology **65**(3-4): 245-268.
- Vavilin, V. A., X. Qu, et *al.* (2008). "Methanosarcina as the dominant acetoclastic methanogens during mesophilic anaerobic digestion of putrescible waste." Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology **94**(4): 593-605.
- Vavilin, V. A., S. V. Rytov, et *al.* (1996). "A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter." Bioresource Technology **56**(2-3): 229-237.
- Veeken, A. H. M. et B. V. M. Hamelers (1999). "Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components." Bioresource Technology **69**(3): 249-254.
- Vigeneron, V. (2005). Voies de réduction des oxydes d'azote lors de leur injection dans un massif de déchets ménagers et assimilés. Contribution à l'étude de la recirculation de lixiviat nitrifié dans une installation de stockage de déchets ménagers et assimilés bioactive., Université Paris XII - Val de Marne: 250 pages + annexes.
- Waldron, S., I. A. Watson-Craik, et *al.* (1998). "The carbon and hydrogen stable isotope composition of bacteriogenic methane: A laboratory study using a landfill inoculum." Geomicrobiology Journal **15**(3): 157-169.
- Warith, M. A., W. Zekry, et *al.* (1999). "Effect of leachate recirculation on municipal solid waste biodegradation." Water Quality Research Journal of Canada **34**(2): 267-280.
- Weimer, P. J. et J. G. Zeikus (1978). "One carbon metabolism in methanogenic bacteria. Cellular characterization and growth of Methanosarcina barkeri." Archives of Microbiology **119**(1): 49-57.
- Weimer, P. J. et J. G. Zeikus (1979). "Acetate assimilation pathway of Methanosarcina barkeri." Journal of Bacteriology **137**(1): 332-339.
- Welander, P. V. et W. W. Metcalf (2005). "Loss of the mtr operon in Methanosarcina blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(30): 10664-10669.
- Wens, P., T. Vercauteren, et *al.* (2001). Factors Inhibiting Anaerobic Degradation in a Landfill. Sardinia 2001, Eighth International waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, CISA.

Références bibliographiques

- Westerholm, M., S. Roos, et al. (2010). "Syntrophaceticus schinkii gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter." FEMS Microbiology Letters **309**(1): 100-104.
- Whiticar, M. J. (1999). "Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane." Chemical Geology **161**(1-3): 291-314.
- Whiticar, M. J., E. Faber, et al. (1986). "Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation-Isotope evidence." Geochimica et Cosmochimica Acta **50**(5): 693-709.
- Whittmann, C., A. P. Zeng, et al. (1995). "Growth inhibition by ammonia and use of pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenolicum*." Appl. Microbiol. Biotechnol(44): pp. 519-525.
- Wiegant, W. M. et G. Zeeman (1986). "The Mechanism of Ammonia Inhibition in the Thermophilic Digestion of Livestock Wastes." Agricultural Wastes **16**(4): 243-253.
- Woese, C. R., O. Kandler, et al. (1990). "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(12): 4576-4579.
- Wong, W. W. et W. M. Sackett (1978). "Fractionation of stable carbon isotopes by marine phytoplankton." Geochimica et Cosmochimica Acta **42**(12): 1809-1815.
- Wynn, J. G., M. I. Bird, et al. (2005). "Rayleigh distillation and the depth profile of C-13/C-12 ratios of soil organic carbon from soils of disparate texture in Iron Range National Park, Far North Queensland, Australia." Geochimica Et Cosmochimica Acta **69**(8): 1961-1973.
- Yuen, S. T. S., J. R. Styles, et al. (1995). An Active Landfill Management by Leachate Recirculation: a Review and an Outline of Full-Scale Project. Sardinia 1995, Fifth International Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Sardinia, Italy, CISA.
- Zeeman, G., W. M. Wiegant, et al. (1985). "The influence of the total-ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure." Agricultural Wastes **14**(1): 19-35.
- Zhang, R., H. M. El-Mashad, et al. (2007). "Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion." Bioresource Technology **98**(4): 929-935.
- Zhao, Y., N. Ren, et al. (2008). "Dynamic characteristics of bacterial community in a sulphate-reducing bioreactor fed with acetate and intermittent ethanol." International Journal of Biotechnology **10**: 3-15.
- Zhilina, T., D. Zavarzina, et al. (2005). "Candidatus Contubernalis alkalaceticum an Obligately Syntrophic Alkaliphilic Bacterium Capable of Anaerobic Acetate Oxidation in a Coculture with *Desulfonatronum cooperativum*." Microbiology **74**(6): 695-703.

- Zhou, G. M. et H. H. P. Fang (1998). "Competition Between Methanogenesis and Sulfidogenesis in Anaerobic Wastewater Treatment." Water Science and Technology **38**(8-9): 317-324.
- Zhu, B., P. Gikas, et *al.* (2009). "Characteristics and biogas production potential of municipal solid wastes pretreated with a rotary drum reactor." Bioresource Technology **100**(3): 1122-1129.
- Zinder, S. H. et M. Koch (1984). "Non-Aceticlastic Methanogenesis from Acetate - Acetate Oxidation by a Thermophilic Syntrophic Coculture." Archives of Microbiology **138**(3): 263-272.
- Zwietering, M. H., I. Jongenburger, et *al.* (1990). "Modeling of the Bacterial-Growth Curve." Applied and Environmental Microbiology **56**(6): 1875-1881.
- Zyakun, A. M., V. A. Bondar, et *al.* (1988). "Fractionation of carbon isotopes under the growth of methane-producing bacteria on various substrates" Mikrobio- logiceskij Zhurnal **50**: pp. 16-22.

Références bibliographiques

Liste des figures, tableaux et équations

Liste des figures

Figure 1 : Répartition en masse des DND selon leur origines (Ademe 2007).	- 30 -
Figure 2 : Progression de la production d'OM par habitant en provenance stricte des ménages (Ademe 2007).	- 32 -
Figure 3 : Mode de traitement des OM (Ademe 2007).	- 33 -
Figure 4 : Composition moyenne nationale des ordures ménagères.	- 35 -
Figure 5 : Schéma d'une ISDND.	- 39 -
Figure 6 : Schéma du système d'étanchéité composite du fond et des flancs de casiers d'une ISDND, (Vigneron 2005).	- 40 -
Figure 7 : Couverture imperméable et exemple d'éléments constitutifs, (Vigneron 2005).	- 40 -
Figure 8 : Évolution de la composition du biogaz au cours des différentes phases de dégradation - (Farquhar et Rovers 1973).	- 41 -
Figure 9 : Schéma de principe de la valorisation du biogaz (CEL /GAS).	- 42 -
Figure 10 : Schéma de principe des réacteurs mélangé et piston.	- 46 -
Figure 11 : Schéma de principe de la filière méthanisation.	- 48 -
Figure 12 : Schéma de principe d'un système, (A) d'agitation mécanique, (B) d'agitation par recirculation du biogaz.	- 50 -
Figure 13 : Schéma de principe des technologies de fermentation sèches - (Moletta 2002).	- 51 -
Figure 14 : Schéma de principe de l'utilisation des effluents de la méthanisation.	- 53 -
Figure 15 : Les étapes de la digestion anaérobie.	- 59 -
Figure 16 : Illustration de la niche méthanogène - (Cresson 2006).	- 62 -
Figure 17 : Arbre phylogénétique de la vie basé sur l'analyse comparative des gènes ARNr. (D'après Carl Woese).	- 64 -
Figure 18 : Principales réactions impliquées dans l'étape de méthanogenèse. (Triangle réactionnel entre acétate, CO ₂ et H ₂ et méthane).	- 67 -
Figure 19 : Métabolisme de la méthanogenèse acétoclaste (en bleu) - (Welande et Metcalf 2005).	- 69 -
Figure 20 : Métabolisme de la méthanogenèse hydrogénotrophe (en rouge).	- 70 -
Figure 21 : Métabolisme de la méthanogenèse méthylotrophe (en vert) et de réduction du méthyle (en orange).	- 71 -
Figure 22 : cycle de Krebs – d'après (Galushko et Schink 2000).	- 72 -
Figure 23 : Métabolisme de Wood/Ljungdahl (homoacétogenèse).	- 73 -
Figure 24 : Variations du taux de croissance relatif des méthanogènes en fonction de la température.	- 77 -
Figure 25 : Illustration de l'effet de la température et du pH sur l'équilibre NH ₄ ⁺ /NH ₃ .	- 80 -
Figure 26 : Représentation structurelle d'un atome.	- 82 -
Figure 27 : Notation atomique des éléments.	- 83 -
Figure 28 : Courbe de potentiel d'interaction entre deux atomes en fonction de la distance-interatomique.	- 84 -
Figure 29 : Isotopes du carbone.	- 85 -

Liste des figures, tableaux et équations

Figure 30 : Abondance naturelle des isotopes du carbone.	- 85 -
Figure 31 : Axe de représentation de la composition isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$).	- 86 -
Figure 32 : Fractionnements isotopiques associés aux modes de biosynthèse de la matière organique - (Mazéas 2000).	- 88 -
Figure 33 : Compositions isotopiques de différents types de matières vivantes et de différents types de sédiments récents - (Mazéas 2000).	- 89 -
Figure 34 : Structure chimique de la testostérone.	- 90 -
Figure 35 : "Thermomètre isotopique" - (Jouzel, Koster et <i>al.</i> 1994).	- 91 -
Figure 36 : Représentation du processus de fractionnement isotopique entre substrat et produit.	- 92 -
Figure 37 : Fractionnement isotopique des différentes voies métaboliques de la méthanogenèse.	- 92 -
Figure 38 : Représentation schématique de l'approche isotopique permettant de déterminer la contribution des différentes voies métaboliques dans la production de méthane.	- 97 -
Figure 39 : Broyeur-destructeur à cisailles rotatives.	- 111 -
Figure 40 : Photographies du prélèvement de lixiviats et d'un inoculum.	- 112 -
Figure 41 : Les flacons à plasma.	- 115 -
Figure 42 : Photographie d'une bouteille contenant le mélange de déchet.	- 116 -
Figure 43 : Photographie de la "rampe à vide".	- 117 -
Figure 44 : Photographie de la mesure de pression et de l'analyse du biogaz.	- 118 -
Figure 45 : Dispositif de conservation des prélèvements gazeux pour les analyses isotopiques.	- 119 -
Figure 46 : Protocole et photographie de l'échantillonnage du lixiviat.	- 119 -
Figure 47 : Photographies des microcosmes à 35°C et 55°C.	- 124 -
Figure 48 : Les colonnes de percolation.	- 125 -
Figure 49 : Schéma technique des dimensions des colonnes.	- 126 -
Figure 50 : Schéma de principe des colonnes.	- 127 -
Figure 51 : Vue extérieure et intérieure de l'enceinte thermostatée.	- 128 -
Figure 52 : Système de régulation de température de l'enceinte thermostatée.	- 128 -
Figure 53 : Mise en place de la couche granulaire.	- 130 -
Figure 54 : Remplissage, compaction et introduction des déchets dans les pilotes.	- 131 -
Figure 55 : Photographies (A) du prélèvement du biogaz dans les colonnes, (B) du prélèvement de lixiviat et (C) de l'injection de l'effluent.	- 132 -
Figure 56 : Protocole de l'échantillonnage du lixiviat.	- 132 -
Figure 57 : Photographie du μGC et de son dispositif d'injection.	- 133 -
Figure 58 : Photographie de la plateforme d'analyse isotopique du Cemagref.	- 134 -
Figure 59 : Représentation schématique du couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse isotopique.	- 135 -
Figure 60 : Schéma de principe de l'ARISA.	- 138 -
Figure 61 : Schéma de principe du FISH.	- 139 -
Figure 62 : Schéma du NanoSIMS.	- 142 -
Figure 63 : Carte du plasmide pCR®4-TOPO® (Invitrogen).	- 145 -
Figure 64 : Suivi des incubations Lixi-A.	- 157 -
Figure 65 : Moyenne de la composition isotopique de l'acétate pendant la méthanogenèse acétoclaste pour l'inoculum de lixiviat d'ISDND (incubations Lixi-A) en fonction de	

ln(1-f) ou f est la fraction de méthane formée (méthode fondée sur les équations adaptées de Mariotti et <i>al.</i> , 1981). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat pour l'acétate et duplicat pour le groupement méthyle de l'acétate (ils sont parfois masqués par les symboles).	- 158 -
Figure 66 : Suivi des incubations BMm-A et BMt-A (inocula de méthaniseur (35 et 55°C)).	- 159 -
Figure 67 : Évolution des compositions isotopiques dans les incubations hydrogène à 80 %. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat (ils sont parfois masqués par les symboles).	- 160 -
Figure 68 : Évolution des compositions isotopiques dans les incubations hydrogène à 5 %. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat (ils sont parfois masqués par les symboles).	- 160 -
Figure 69 : Évolution de la production cumulée de méthane des incubations DRF-35.	- 165 -
Figure 70 : Suivi d'une incubation de déchets reconstitués français à 35°C (DRF-35 (1)).	- 166 -
Figure 71 : Observations FISH de DRF-35 (1).	- 167 -
Figure 72 : Évolution de la production cumulée de méthane des incubations DRF-55.	- 170 -
Figure 73 : Évolution des moyennes de production cumulée de méthane des incubations DRF-35 et DRF-55, les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre les incubations du triplicat.	- 171 -
Figure 74 : Suivi des incubations de déchets à 35°C (DRF-35 (1)) et 55°C (DRF-55 (2)).	- 172 -
Figure 75 : ARISA archées des incubations à 35°C (DRF-35 (1)) et 55°C (DRF-55 (2)).	- 174 -
Figure 76 : Résultats du clonage/séquençage des archées à 35°C (DRF-35 (1) au jour 43) obtenus par analyses phylogénétiques (28 clones archées séquencés).	- 175 -
Figure 77 : Résultats du clonage/séquençage des bactéries à 35°C (DRF-35 (1) au jour 43) obtenus par analyses phylogénétiques (63 clones bactéries séquencés).	- 176 -
Figure 78 : Résultats du clonage/séquençage des archées à 55°C (DRF-55 (2) au jour 43) obtenues par analyses phylogénétiques (63 clones archées séquencés).	- 177 -
Figure 79 : Résultats du clonage/séquençage des bactéries à 55°C (DRF-55 (2) au jour 43) obtenus par analyses phylogénétiques (78 clones bactéries séquencés).	- 177 -
Figure 80 : Évolution des incubations Lixi-A-35 et Lixi-A-55.	- 182 -
Figure 81 : Évolution des incubations BoueOM-A-35.	- 184 -
Figure 83 : Évolution des incubations BoueOM-A-55.	- 185 -
Figure 82 : Zoom du graphique représentant la production de méthane cumulée des incubations BoueOM-A-55.	- 186 -
Figure 84 : Localisation du changement de métabolisme dans les incubations BoueOM-A-55.	- 187 -
Figure 85 : Facteur de fractionnement apparent (α_{app}) en fonction de la concentration en NH ₃ dans les incubations BoueOM-A-55.	- 189 -
Figure 86 : Schéma de principe de l'expérience sur l'effet de la concentration en azote ammoniacal.	- 192 -
Figure 87 : Production cumulée de méthane pour les incubations C1 à C4.	- 193 -
Figure 88 : Évolution de la concentration d'acétate dans les incubations C1 à C4.	- 193 -
Figure 89 : Évolution des signatures isotopiques du CH ₄ et du CO ₂ dans les incubations C1 à C4.	- 195 -
Figure 90 : Évolution de l'enrichissement isotopique du CH ₄ et du CO ₂ dans les incubations C1 à C4.	- 196 -
Figure 91 : ARISA archées des incubations C1 à C4.	- 197 -
Figure 92 : ARISA bactéries des incubations C1 à C4.	- 198 -
Figure 93 : Observations FISH des familles <i>Methanosaetaceae</i> (rouge) et <i>Methanosarcinaceae</i> (bleu) dans les séries C1 à C4.	- 199 -

Liste des figures, tableaux et équations

Figure 94 : Exemple de cohybridation obtenue sur une incubation de la série C1 par FISH.	- 200 -
Figure 95 : Observations FISH des <i>Methanomicrobiales</i> (rouge) et des <i>Methanosarcinaceae</i> (bleu) dans la série C4.	- 200 -
Figure 96 : Observations FISH des Bactéries (rouge), des archées (vert) et de la famille des <i>Methanosarcinaceae</i> (bleu) dans les séries C1 et C4.	- 201 -
Figure 97 : Évolution de la production cumulée de méthane et de la concentration en acétate dans les incubations C3-b et C4-b.	- 201 -
Figure 98 : Production de méthane cumulée (A) et concentration d'acétate (B) dans les incubations I1 à I3.	- 211 -
Figure 99 : Composition isotopique du CH ₄ et du CO ₂ dans les incubations I1-1, I2-1 et I3-1.	- 212 -
Figure 100 : Enrichissement isotopique en ¹³ C du CH ₄ et du CO ₂ dans les incubations I1-2, I2-2 et I3-2.	- 213 -
Figure 101 : ARISA archées et bactéries des incubations I1 à I3.	- 214 -
Figure 102 : Résultats du clonage/séquençage des archées et des bactéries pour I1-1 au jour 99 obtenus par analyses phylogénétiques (69 clones archées et 81 clones bactéries séquencés).	- 215 -
Figure 103 : Résultats du clonage/séquençage des archées et des bactéries pour I3-1 au jour 77 obtenus par analyses phylogénétiques (27 clones archées et 91 clones bactéries séquencés).	- 216 -
Figure 104 : Observations FISH	- 217 -
Figure 105 : Modélisation de la réaction d'OSA des séries d'incubations I2 et I3.	- 219 -
Figure 106 : Exemple d'analyse de l'arrangement d'image virtuelle.	- 225 -
Figure 107 : Résultats des analyses de fonction de corrélation de paires pour les différentes populations de I1 et I3 (A à C : incubation I1 ; D à F : incubation I3).	- 225 -
Figure 108 : Évolution de l'enrichissement en carbone ¹³ du CH ₄ et du CO ₂ dans les incubations C1-3 (A), I1-2 (B) et I3-2 (C) en fonction du % de méthane produit.	- 228 -
Figure 109 : Images NanoSIMS de l'incubation I1-2 (NanoSIMS n°2, jour 86, point 1/2).	- 229 -
Figure 110 : Images NanoSIMS de l'incubation I1-2 (NanoSIMS n°2, jour 86, point 2/2).	- 230 -
Figure 111 : Images NanoSIMS de l'incubation I1-2 (NanoSIMS n°3, jour 99).	- 231 -
Figure 112 : Images NanoSIMS de l'incubation C1-3 (NanoSIMS n°1, jour 12).	- 232 -
Figure 113 : Cycle réductif incomplet des acides tricarboxyliques.	- 234 -
Figure 114 : Cycle oxydatif incomplet des acides tricarboxyliques.	- 235 -
Figure 115 : Images NanoSIMS de l'incubation I3-2 (NanoSIMS n°4, jour 77).	- 236 -
Figure 116 : Agrandissement de l'image % ¹³ C NanoSIMS de l'incubation I3-2 (NanoSIMS n°4, jour 77).	- 237 -
Figure 117 : Évolution du pH des effluents pendant leur stockage.	- 241 -
Figure 118 : Évolution des concentrations de COD et CID des effluents pendant leur stockage.	- 242 -
Figure 119 : Concentrations en cations dans les effluents.	- 243 -
Figure 120 : Productions cumulées de biogaz (A), de CH ₄ (B) et de CO ₂ (C) dans les pilotes.	- 245 -
Figure 121 : Évolutions des teneurs en CO ₂ (A) et CH ₄ (B) dans le biogaz produit dans les pilotes.	- 247 -
Figure 122 : Évolutions des concentrations en COD (A) et CID (B) dans les lixiviats collectés en sortie des colonnes.	- 248 -
Figure 123 : Évolutions des concentrations en AGV dans les lixiviats collectés en sortie des colonnes.	- 250 -
Figure 124 : Évolutions des concentrations en cations des lixiviats collectés en sortie des colonnes.	- 252 -

Liste des figures, tableaux et équations

Figure 125 : Évolutions de la composition isotopique du CH ₄ et du CO ₂ (A) et du facteur de fractionnement apparent (B) dans les pilotes.	- 254 -
Figure 126 : Évolution du nombre d'archées et de bactéries dans les colonnes.	- 256 -
Figure 127 : Observation FISH de Lix-ISDND au jour 300.	- 258 -
Figure 128 : Observation FISH de Lix-PCDV au jour 200.	- 259 -
Figure 129 : Évolution du pH des bioréacteurs BG à 35°C (A) et à 55°C (B).	- 265 -
Figure 130 : Concentrations en acides organiques des bioréacteurs BG.	- 266 -
Figure 131 : Concentrations en cations (Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺) des bioréacteurs BG.	- 267 -
Figure 132 : Concentrations maximales en acide lactique en fonction de la teneur en déchets verts à 35°C et 55°C.	- 269 -
Figure 133 : Concentrations en NH ₄ ⁺ en fonction de la teneur en déchets verts à 35°C et 55°C.	- 270 -
Figure 134 : Production cumulée de dioxyde de carbone (A) et méthane (B).	- 272 -
Figure 135 : Concentrations en acides organiques pour les incubations B (A), BN (B) et BV (C).	- 273 -
Figure 136 : Évolution des compositions isotopiques du CO ₂ et CH ₄ pour les incubations B, BV et BN.	- 274 -
Figure 137 : Découpage en zone de l'ISDND de SITA France.	- 277 -
Figure 138 : Prélèvements de biogaz.	- 277 -
Figure 139 : Résultats des analyses de composition isotopique.	- 278 -
Figure 140 : Effet de l'enrichissement isotopique du CO ₂ sur les plages de composition isotopique des différentes voies métaboliques méthanogènes.	- 280 -

Liste des figures, tableaux et équations

Liste des tableaux

Tableau 1 : Contribution des différents secteurs à la production de déchets.	- 31 -
Tableau 2 : Teneur en eau, MV, C et N org des OM françaises en 1993 - (Ademe 1999).	- 36 -
Tableau 3 : Biodégradabilité anaérobie de déchets ménagers ou fractions de déchets - (Gachet 2005).	- 37 -
Tableau 4 : Débits de recirculation de lixiviats sur sites - (Vigneron 2005).	- 44 -
Tableau 5 : Comparaison des performances de différents procédés de digestion anaérobie - (Moletta 2008).	- 52 -
Tableau 6 : Estimations des émissions annuelles planétaires de méthane - (Janssen, Olivier et <i>al.</i> 1999).	- 58 -
Tableau 7 : Réaction d'hydrolyse des polymères (hydrocarbonés).	- 60 -
Tableau 8 : Bactéries hydrolytiques de la digestion anaérobie - (Moletta 2008).	- 60 -
Tableau 9 : Quelques réactions de dégradation du glucose (acidogénèse).	- 61 -
Tableau 10 : Quelques réactions de formation d'acétate (acétogénèse).	- 62 -
Tableau 11 : Réaction d'oxydation anaérobie du méthane.	- 64 -
Tableau 12 : Taxonomie des <i>Euryarchaea</i> .	- 65 -
Tableau 13 : Réactions de méthanogénèse - (Moletta 2008).	- 67 -
Tableau 14 : Types de méthanogénèse réalisables selon l'ordre des micro-organismes.	- 68 -
Tableau 15 : Réaction de l'oxydation syntrophique de l'acétate.	- 72 -
Tableau 16 : Méthanogènes prédominants en fonction de la température et de la concentration en acétate.	- 75 -
Tableau 17 : Quelques réactions d'homoacétogénèse.	- 76 -
Tableau 18 : Facteurs de fractionnement en cultures pures – d'après (Conrad 2005).	- 93 -
Tableau 19 : Facteurs de fractionnement déterminés pour différents inocula.	- 96 -
Tableau 20 : Composition du déchet reconstitué.	- 109 -
Tableau 21 : Modalités de préparation des fractions du déchet reconstitué.	- 110 -
Tableau 22 : Composition du biodéchet reconstitué.	- 112 -
Tableau 23 : Composition du milieu BMP.	- 115 -
Tableau 24 : Nomenclature des expériences en microcosmes (partie 1/3).	- 120 -
Tableau 25 : Nomenclature des expériences en microcosmes (partie 2/3).	- 122 -
Tableau 26 : Nomenclature des expériences en microcosmes (partie 3/3).	- 123 -
Tableau 27 : Nomenclature des expériences en colonnes de percolation.	- 125 -
Tableau 28 : Dimensions des colonnes.	- 125 -
Tableau 29 : Amorces utilisées pour la PCR pré-ARISA.	- 137 -
Tableau 30 : Sondes oligonucléotides utilisées en FISH.	- 140 -
Tableau 31 : Amorces utilisées pour le clonage.	- 144 -
Tableau 32 : Nomenclature des expériences réalisées pour le calcul des facteurs de fractionnement isotopique.	- 156 -
Tableau 33 : Facteurs de fractionnement déterminés expérimentalement.	- 161 -
Tableau 34 : Nomenclature des expériences d'incubation de déchets en conditions mésophiles.	- 164 -

Liste des figures, tableaux et équations

Tableau 35 : Réaction d'oxydation syntrophique du propionate.	- 169 -
Tableau 36 : Nomenclature des expériences d'incubation de déchets.	- 170 -
Tableau 37 : Nomenclature des expériences sur l'effet de la température sur la dégradation de l'acétate.	- 181 -
Tableau 38 : Nomenclature des expériences sur l'effet de la concentration en azote ammoniacal.	- 191 -
Tableau 39 : Paramètres de Gompertz. (λ = latence ; R_m = taux de production maximum de méthane ; P = production cumulée de méthane en fin d'expérience).	- 194 -
Tableau 40 : Nomenclature des expériences sur l'effet de la quantité d'inoculum.	- 210 -
Tableau 41 : Paramètres de Gompertz. (λ = latence ; R_m = taux de production maximum de méthane ; P = production cumulée de méthane en fin d'expérience).	- 211 -
Tableau 42 : Paramètres utilisés pour réaliser la modélisation simplifiée de la réaction d'OSA des séries d'incubations I2 et I3.	- 219 -
Tableau 43 : Paramètres de Gompertz. (λ = latence ; R_m = taux de production maximum de méthane ; P = production cumulée de méthane en fin d'expérience).	- 246 -
Tableau 44 : Productions de biogaz, CH_4 et CO_2 obtenues lors des expériences en microcosmes.	- 261 -
Tableau 45 : Productions de biogaz, CH_4 et CO_2 au jour 575 lors des expériences en colonnes de percolation.	- 261 -
Tableau 46 : Rendements de dégradation au jour 575 lors des expériences en colonnes de percolations.	- 261 -
Tableau 47 : Rendements de dégradation des déchets dans les colonnes de percolations en tenant compte du potentiel méthanogène des effluents recirculés au jour 575	- 262 -
Tableau 48 : Nomenclature des expériences en microcosmes.	- 264 -
Tableau 49 : Nomenclature des expériences en microcosmes.	- 271 -
Tableau 50 : Moyenne, écart-type, minimum et maximum des compositions isotopiques du CO_2 et du CH_4 mesurés sur l'ISDND de SITA France.	- 279 -
Tableau 51 : Moyenne, écart-type, de la composition isotopique du CID mesurés sur l'ISDND de SITA France.	- 279 -

Liste des équations

Équation 1	- 86 -
Équation 2	- 86 -
Équation 3	- 87 -
Équation 4	- 87 -
Équation 5	- 87 -
Équation 6	- 98 -
Équation 7	- 102 -
Équation 8	- 114 -
Équation 9	- 114 -
Équation 10	- 143 -
Équation 11	- 146 -
Équation 12	- 147 -
Équation 13	- 147 -
Équation 14	- 148 -
Équation 15	- 148 -
Équation 16	- 148 -
Équation 17	- 149 -
Équation 18	- 149 -
Équation 19	- 149 -
Équation 20	- 150 -
Équation 21	- 150 -
Équation 22	- 150 -
Équation 23	- 151 -
Équation 24	- 224 -

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1 : Compilation de ratio C/N (données internet)	- 322 -
Annexe 2 : Eléments constitutifs du déchet reconstitué	- 324 -
Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN	- 332 -
Annexe 4 : Protocole de PCR (kit takara)	- 334 -
Annexe 5 : Protocole de l'ARISA	- 335 -
Annexe 6 : Protocole de préparation FISH	- 341 -
Annexe 7 : Calcul de production de biogaz (détail)	- 343 -

Annexe 1 : Compilation de ratio C/N (données internet)

Type	Nom	C/N	Source
B	coquilles de cacahuètes	35	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
B	déchets alimentaires	15	http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/needs_carbon_nitrogen.htm
B	déchets alimentaires	15	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
B	déchets de cuisine	10 à 25	http://users.swing.be/compost/Main_Rapport%20_C_N.htm
B	déchets de cuisine	20 à 25	http://www.lamaisondujardin.org/fiches/fiche73.pdf
B	fruits	35	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm
B	Marc de café	20	http://www.marsi.ca/jardin/composte.html
B	Marc de café	20	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
B	Marc de café	20	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
B	reste de légume	11 à 13	http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-024.htm
B	restes alimentaires	20	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
B	restes de cuisine	12 à 30	http://www.marsi.ca/jardin/composte.html
B	restes de cuisine	20 à 25	http://www.eauvivante.net/tose/tose_compostage.php?navorig=tose&pgfocus=4
B	restes de fruit/légume	25	http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/needs_carbon_nitrogen.htm
B	restes de fruit/légume	25	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
B	restes de fruits	35	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
B	restes de fruits	35	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
B	restes de fruits	20 à 25	http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-024.htm
B	restes de légume	12 à 20	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
B	restes de légume	10 à 20	http://www.agbio.ca/Docs/Cefs/Field_Compost_f.pdf
B	restes de table	15	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm
P	papier journal	170	http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/needs_carbon_nitrogen.htm
P	papier journal	175	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
P	papier journal	50 à 200	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
P	papier journal	400 à 800	http://www.agbio.ca/Docs/Cefs/Field_Compost_f.pdf
P	papier journal	170	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm
V	aiguille de pin	30	http://users.swing.be/compost/Main_Rapport%20_C_N.htm
V	aiguille de pin	90	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm
V	aiguille de pin	60 à 110	http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/needs_carbon_nitrogen.htm
V	aiguille de pin	80	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
V	aiguille de pin	60 à 110	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
V	déchets de jardin	30	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
V	déchets verts de plante	20 à 60	http://users.swing.be/compost/Main_Rapport%20_C_N.htm
V	feuille d'arbre à la chute	20 à 60	http://users.swing.be/compost/Main_Rapport%20_C_N.htm
V	feuilles	40 à 80	http://www.setom.fr/Upload/medias/le_compostage_de_dechets_verts.pdf
V	feuilles	35 à 85	http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/needs_carbon_nitrogen.htm
V	feuilles	60	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
V	feuilles	60	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
V	feuilles	40 à 80	http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-024.htm
V	feuilles d'arbre	25 à 60	http://www.eauvivante.net/tose/tose_compostage.php?navorig=tose&pgfocus=4
V	feuilles d'automne	80	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm
V	feuilles de chêne	26	http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/needs_carbon_nitrogen.htm
V	feuilles de chêne vertes	26	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
V	feuilles mortes	50	http://www.marsi.ca/jardin/composte.html
V	feuilles mortes de chêne	50 à 60	http://www.lamaisondujardin.org/fiches/fiche73.pdf
V	feuilles sèches	30 à 80	http://www.agbio.ca/Docs/Cefs/Field_Compost_f.pdf
V	feuilles vertes	40	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm
V	foin	25	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
V	foin de graminées	15	http://www.caussade-semences.com/File/doc_varietes08.pdf
V	foin sec	25	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm

Type	Nom	C/N	Source
V	gazon coupé	20	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
V	gazon	10	http://users.swing.be/compost/Main_Rapport%20C_N.htm
V	gazon	12	http://www.marsi.ca/jardin/composte.html
V	gazon	19	http://www.lesbeauxjardins.com/jardinons/potager/apcompost.htm
V	gazon tondu	10 à 20	http://www.setom.fr/Upload/medias/le_compostage_de_dechets_verts.pdf
V	gazon tondu	10 à 15	http://www.eauvivante.net/tose/tose_compostage.php?navorig=tose&pgfocus=4
V	gazon tondu	19	http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/needs_carbon_nitrogen.htm
V	gazon tondu	20	http://www.compostinfo.com/tutorial/ElementOfComposting.htm
V	gazon tondu	10 à 15	http://www.lamaisondujardin.org/fiches/fiche73.pdf
V	gazon tondu	9 à 25	http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-024.htm
V	luzerne	16 à 20	http://users.swing.be/compost/Main_Rapport%20C_N.htm
V	luzerne	17	http://www.caussade-semences.com/File/doc_varietes08.pdf
V	luzerne	12	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
V	luzerne	15 à 19	http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-024.htm
V	matière végétale verte mauvaises herbes avant maturation des graines	7	http://users.swing.be/compost/Main_Rapport%20C_N.htm
V	maturation des graines	7	http://www.marsi.ca/jardin/composte.html
V	ray-grass anglais (vert)	16	http://www.caussade-semences.com/File/doc_varietes08.pdf
V	trèfle	23	http://www.composting101.com/c-n-ratio.html
V	trèfle vert	12	http://www.caussade-semences.com/File/doc_varietes08.pdf

Données issues du stage réalisé pendant cette thèse par A. Beaugrand

Annexe 2 : Eléments constitutifs du déchet reconstitué

Des photographies des éléments constitutifs de la matrice déchets reconstitués de type : *Cemagref* / MODECOMTM 1993 sont présentées dans les pages suivantes.

Catégorie n° 1 : Déchets putrescibles

1 sur 25 : Biscottes



2 sur 25 : Steaks hachés (bœuf 15 % de MG)



4 sur 25 : Riz



3 sur 25 : Café



6 sur 25 : Foin



5 sur 25 : Pommes de terre



Catégorie n°2 : Papiers

7 sur 25 : Journaux



8 sur 25 : Magazines



9 sur 25 : Papiers de bureau



Catégorie n°3 : Cartons

10 sur 25 : Cartons plat divers



11 sur 25 : Cartons ondulés



Catégorie n°4 : Complexes

12 sur 25 : Briques de lait



Catégorie n°5 : Textiles

13 sur 25 : Draps en coton



Catégorie n° 6 : Textiles sanitaires

14 sur 25 : Couches

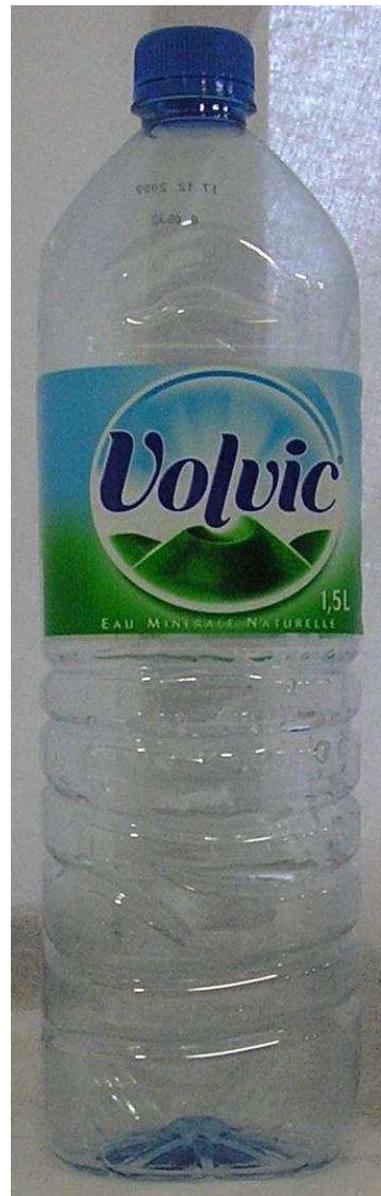


Catégorie n° 7 : Plastiques

15 sur 25 : Sacs poubelles



16 sur 25 : Bouteilles d'eau

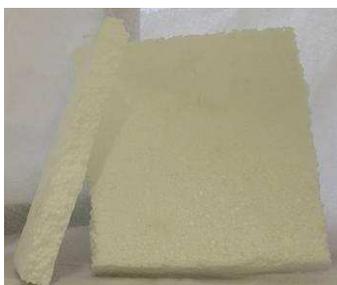


17 sur 25 : Bassines en PP



18 sur 25 : Drains en PVC

19 sur 25 : Polystyrène



Catégorie n° 8 : Combustibles non classés

20 sur 25 : Ecorces de jardinage



Catégorie n° 9 : Verres

21 sur 25 : Billes en verre



Catégorie n° 10 : Métaux

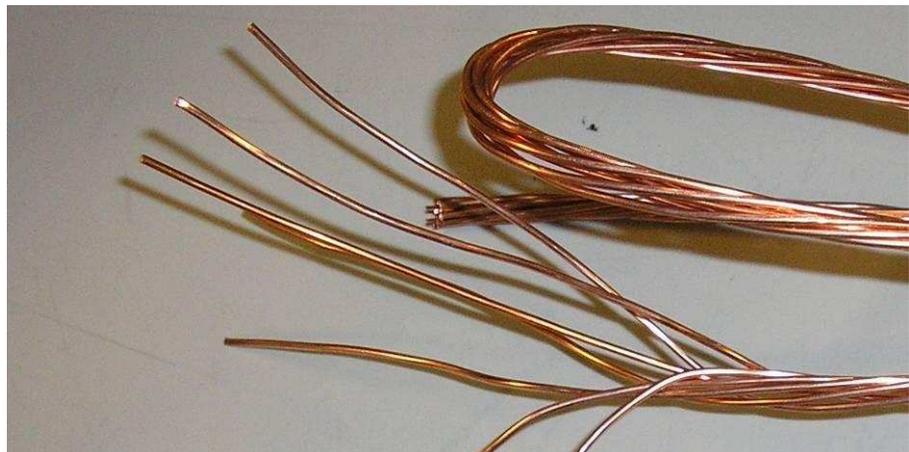
22 sur 25 : Clous



23 sur 25 : Papier aluminium



24 sur 25 : Fils de cuivre



Catégorie n° 11 : Incombustibles non classés

25 sur 25 : Graviers à béton



Catégorie n° 12 : Déchets spéciaux

Non représentée

Catégorie n° 13 : Fines

Non représentée

Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN

Qiagen :QIAamp DNA Stool Human DNA Analysis (sur Qiacube)

Avant l'extraction, il faut préparer les buffers AW1 et AW2 selon les instructions sur les tubes.

Vortexer tous les buffers avant utilisation.

S'il y a eu une précipitation de ces buffers, les dissoudre en incubant à 70°C.

Chauffer un bain-marie à 70°C.



<http://www1.qiagen.com/>

- a- Peser 180 à 220 mg d'échantillon dans un tube 2ml et le mettre dans la glace. le protocole est optimisé pour ce poids mais il est possible de réduire cet échantillon.
- b- Ajouter 1.6ml de Buffer ASL dans chaque échantillon. vortexer une minute ou jusqu'à homogénéisation
- c- Centrifuger 1 min au plus vite de la centrifugeuse
- d- Pipeter 1.4ml de surnageant dans un nouveau tube 2ml et jeter le culot
- e- Ajouter 1 tablette d'InhibitEX dans chaque tube et vortexer pendant 1minute ou jusqu'à dissolution complète. incubé 1 minute à température ambiante
- f- Centrifuger à vitesse maximum pendant 3 min. (parfois plus)
- g- Pipeter tout le surnageant dans un nouveau tube 1.5ml et jeter le culot. centrifuger pendant 3 min à vitesse maximum. **à partir d'ici le Qiacube peut faire seul.**
- h- Pipeter 25µL de protéinase K dans un tube 2 ml
- i- Pipeter 600µL de surnageant de "g" dans ce tube
- j- Ajouter 600µL de Buffer *AL* et vortexer 15S (ne jamais mettre la protéinase K directement dans le Buffer *AL*)
- k- Incuber à 70°C à 10 min

- l- Ajouter 600 μ L d'éthanol (96-100 %) dans le lysat et vortexer
- m- Mettre une colonne de filtration dans un tube de 2ml. mettre 600 μ L de lysat "l" et centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute. jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube et recommencer 2 fois
- n- Ajouter 500 μ L de Buffer AW1 dans la colonne, centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute, jeter le filtrat et replacer la colonne dans un tube
- o- Ajouter 500 μ L de buffer AW2. centrifuger à vitesse maximum pendant 3 min, jeter le filtrat
- p- Remettre la colonne dans un tube et centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute
- q- Transférer la colonne dans un nouveau tube 1.5ml, ajouter 200 μ L de buffer AE sur la membrane. incubé 1 minute à température ambiante, centrifuger à vitesse maximum 1 minute pour éluer l'ADN
- r- Conserver à -20°C

Annexe 4 : Protocole de PCR (kit takara)

Solutions stock	[C] initiale	[C] finale	Vol/puits (µl)
PCR Mix	[10X]	[1X]	2,5
dNTP Mix	2.5 mM chaque	0,2 mM	2
Primer ITSF	10 µM	0,4 µM	1
Primer ITSReub	10 µM	0,4 µM	1
Gene T4	0.05 mg.ml ⁻¹	0,0005	0,25
Takara Ex Taq TM	5 U.µL ⁻¹	0,025	0,125
ADN	Variable	20 ng	1
Eau stérile qsp 25 µL			17,125

Kit TAKARA

Annexe 5 : Protocole de l'ARISA

DECONTAMINATION DES ELECTRODES

A faire avant et après chaque puce !!!!

Utiliser la puce de nettoyage spécifique à l'eau.

Attention au maniement du couvercle du Bioanalyseur : renseignez-vous et apprenez à le manipuler ! Ne JAMAIS le laisser se refermer sans le retenir !!!

Les électrodes sont très sensibles à la formation de dépôts de sels, qui gênent la migration, rendue alors ininterprétable.

- Remplir doucement la puce de nettoyage «eau» avec 350 µl d'eau
- Vérifier que tous les puits sont remplis, ne pas vortexer
- Ouvrir le couvercle de l'appareil
- Placer la puce de nettoyage «eau»
- Fermer très délicatement le couvercle et laisser 1 minute
- Ouvrir le couvercle de l'appareil et retirer la puce de nettoyage «eau»
- Laisser ouvert quelques minutes pour permettre le séchage des électrodes.
- Les mêmes puces de nettoyage sont utilisables avant et après une puce Agilent.
- Vider les puces de nettoyage de leur contenu, les rincer à l'eau, les sécher et les stocker à l'abri de la poussière.

PREPARATION DU MELANGE GEL-DYE

S'assurer que les solutions sont à température ambiante depuis au moins 30 minutes. Cette étape est essentielle car :

- il ne faut pas d'échange thermique au sein de la puce pendant l'analyse.

- le DMSO contenu dans le dye a tendance à cristalliser à froid.

Protéger la solution de dye concentrée et le mélange gel-dye de la lumière (dans la boîte du kit fermée, c'est suffisant !)

Filtration du gel :

- Vortexer quelques secondes le tube de gel (bouchon rouge)
- Placer 550 µl de gel matrice dans la partie supérieure d'une colonne de filtration spin filter
- Centrifuger à 1500 g pendant 10 minutes (4000 rpm)
- Indiquer la date de filtration sur le tube, le gel filtré est utilisable plusieurs mois.

Mélange gel-dye

Annexes

- Placer 65 µl de gel filtré dans un tube Eppendorf stérile
- Vortexer le tube dye (bouchon bleu) pendant...10 secondes MINIMUM !!!!!
- Ajouter aux 65 µl de gel filtré 1 µl de dye concentré vortexé.
- Vortexer le mélange pendant 10 secondes MINIMUM !!!!!
- Noter la date de préparation du mélange sur le tube.
- Centrifuger le mélange 10 minutes à 13 000 rpm
- Ce mélange peut être conservé 4 semaines, s'il est stocké dans de bonnes conditions

(Absence de lumière, +4°C).

- Recentrifuger le mélange avant toute nouvelle utilisation
- Au-delà de 4 semaines, les résultats ne sont pas garantis !

MONTAGE DE LA PUCE DANS LA CHIP PRIMING STATION

Derniers conseils avant de se lancer dans le montage de la puce

- Vérifier que le Bioanalyseur est connecté à l'ordinateur ! Pour cela, double-cliquer sur l'icône « 2100 Expert » du bureau. Assurez-vous que le contexte choisi est 'instrument' et placez-vous sur l'onglet 'instrument'. L'image de l'appareil doit apparaître en clair, elle doit montrer l'ouverture du couvercle lorsque ce dernier est ouvert. Si la connexion ne s'établit pas, vérifiez que le port com sélectionné est le n°4. Appareil non connecté appareil connecté



appareil non connecté



appareil connecté



- Vérifier que tout le matériel est prêt : chip priming station, ladder, ARN, réactifs, électrodes nettoyées, bain-marie allumé, etc.
- Suivre très scrupuleusement ce protocole dans tous ses détails ; c'est en effet à cette étape que se situe la grande majorité des problèmes (80 %). Ce n'est pas difficile, mais c'est délicat !!
- Porter une grande attention au temps de vortexage, qu'il faut respecter très scrupuleusement.
- Ne jamais s'arrêter au cours du processus, la puce est utilisable dans les 5 minutes qui suivent le montage, maximum (dégradation du dye).

Protocole :

- Sortir la Chip Priming Station de sa boîte
- Oter le bouchon transparent sur le dessus et vérifier que l'orifice n'est pas bouché
- Vérifier les points suivants sans n'en oublier aucun :
- Joint blanc sans trace de dépôt de gel, en bon état. Sinon, le changer ou le nettoyer avec un papier KimWipes mouillé à l'eau distillée et sécher à l'air comprimé.
- Orifice au niveau du joint blanc : absence de poussières, sinon donner un coup d'air comprimé
- Réglage du taquet de blocage de la seringue : position haute
- Réglage du socle de la station : position C
- Visser fermement la seringue avec son support noir.
- Prendre une nouvelle RNA chip. Noter son numéro de lot.
- Placer la chip dans le logement de la Chip Priming Station
- Centrifuger le mélange gel-dye 10 minutes à 13 000 rpm si cela n'a pas été fait. Ne pas

vortexer.

- Prélever 9 μ l de mélange gel-dye, placer le cône au fond du puits marqué d'un, et injecter le gel-dye



- S'assurer que le piston de la seringue est sur **1 ml**
- Fermer la Chip Priming Station, sans faire d'à-coups en appuyant assez fort sur le couvercle pour fermer le clip de fermeture (la première fois, demander une démonstration, c'est assez délicat)
- Presser le piston jusqu'à ce qu'il soit retenu par le clip
- Attendre **exactement 30 secondes**
- Actionner le clip pour relâcher le piston, puis laisser revenir progressivement le piston à l'équilibre. Noter avec précision le volume auquel le piston est remonté seul (on doit être au dessus de 0,8mL ; c'est un bon indicateur de l'absence de micro fuites d'air au niveau du joint), puis le ramener manuellement jusqu'à **1 ml**.
- Ouvrir la Chip Priming Station délicatement (la première fois, demander une démonstration)



- Pipeter **9 μ l** de mélange gel-dye dans chacun des 2 puits marqués
- Déposer **5 μ l** de Marker au fond du puits du ladder marqué d'une échelle. .



- Déposer **5 μ l** de Marker au fond des puits échantillons

Remarque : Tous les puits doivent être remplis ; si moins de 12 échantillons sont analysés, on peut directement remplir les puits »vides « avec 6 μ L de RNA 6000 Nano Marker au lieu des 5 μ l.

CHARGEMENT DES ECHANTILLONS

- Dénaturation des échantillons et du marqueur de poids moléculaire :

On prélève 1,2 μ L d'un aliquot de marqueur de poids moléculaire (ladder Ambion conservé à -80°C).

Cet aliquote est chauffé au bain marie à sec à 70°C pendant 2 minutes, ainsi que chaque échantillon à analyser. Remettre les ARN sur la glace puis les centrifuger et les conserver dans un portoir à température ambiante.

- Dépôts au niveau de la puce :

Déposer 1 μ L de marqueur de poids moléculaire (ladder) dans le fond du puits

Déposer 1 μ L d'échantillon dans le fond des puits correspondants (1 à 12).



dépôts dans les puits orangés

- Vortexer la puce à l'aide de l'appareil correspondant (Vortex Mixer :IKA modèle MS2-

S9), pendant **1 minute précise**. Cela permet d'éliminer d'éventuelles bulles d'air, et d'homogénéiser le mélange au sein de chaque puits. Attention au renflement de mousse du vortex qui doit être bien positionné, le long de la puce et pas en-dessous.

Dans le cas contraire, la puce risque d'être violemment éjectée...Pour éviter l'éjection de la puce, la maintenir à la main dans l'emplacement du vortex ou mettre une bande de scotch.

LANCEMENT DU PROGRAMME

Mise en route

Allumer l'ordinateur

Allumer le Bioanalyseur

6 Vérifier les connexions et le port com

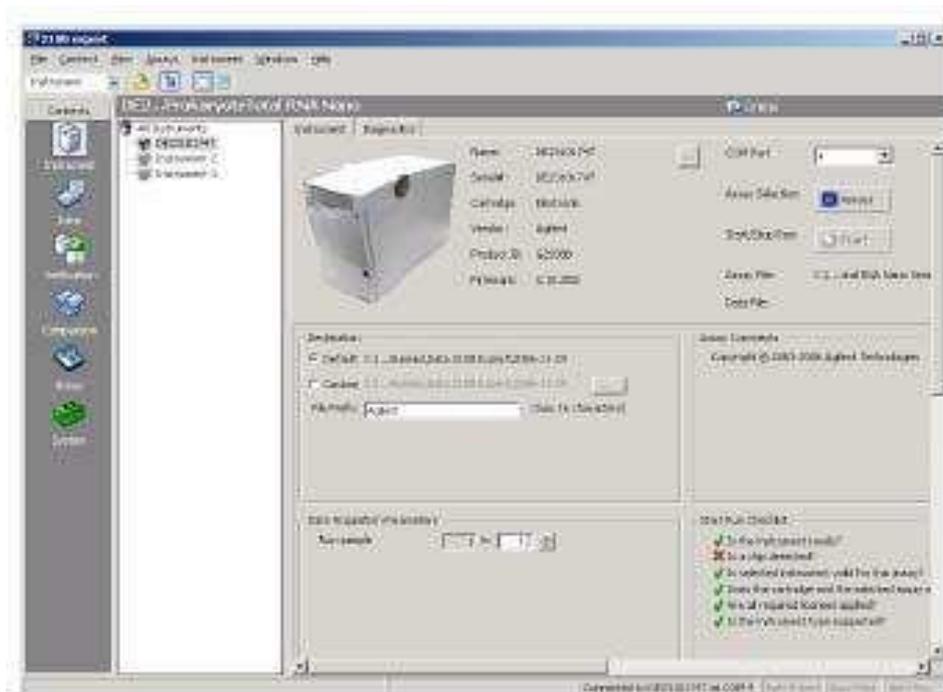


Ouvrir l'application 2100 Expert (icône sur le bureau).

Il existe 2 contextes d'utilisation principaux: INSTRUMENT et DATA.

- INSTRUMENT : 2 onglets
 - ✓ instrument : permet de faire un run
 - ✓ diagnostic : utilisé en cas de problème matériel
- DATA
 - ✓ Permet de suivre, voir, analyser, corriger les profils
 - ✓ Imprimer, exporter les résultats en format pdf

Vérifier que l'appareil apparaît en clair dans l'onglet instrument du contexte Instrument



Dans la partie « start run checklist », vérifier que l'ensemble des points est coché en vert, exceptée la question 'is a chip detected ?' qui ne sera cochée en vert qu'une fois la puce présente dans l'appareil et le couvercle fermé.

Démarrage du run

Placer la puce dans le Bioanalyseur 2100 Agilent

Cliquer sur l'icône Assay et choisir le type d'analyse RNA désirée (procaryote/eucaryote, nano/pico, total/messenger).

Tous les éléments de la checklist doivent être cochés en vert.

Dans la rubrique « Destination », choisir le préfixe du nom de votre fichier (indiquer votre nom est conseillé, pour retrouver facilement vos données). Par défaut, l'emplacement de sauvegarde est un dossier « nommé « Data 2100 Expert » placé sur le bureau du PC.

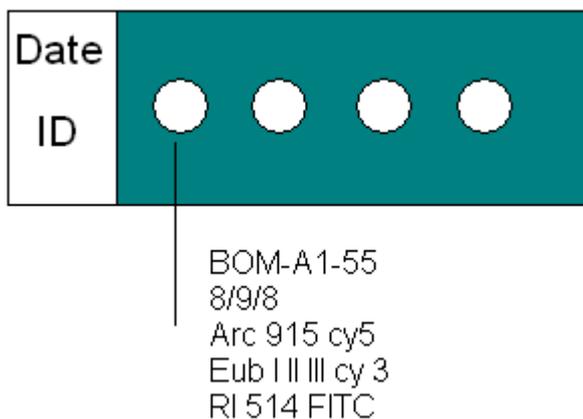
Dans la rubrique « Data acquisition parameters », choisir le nombre d'échantillons déposés sur la puce (de 1 à 12).

Cliquer sur l'icône start.

Annexe 6 : Protocole de préparation FISH

Protocole de préparation pour le FISH

1. Allumer le four d'hybridation (vérifier que la température est bien de 46°C)
2. Allumer le bain marie (vérifier que la température est bien de 48°C)
3. Mettre sa blouse et une paire de gants
4. Remplir le sceau avec de la glace
5. Aller chercher les sondes ainsi que les échantillons préalablement fixés
6. Sortir les produits suivants (dans le frigo µbio) :
 - a. TrisHCl à 1 M
 - b. EDTA à 0,1 M
 - c. NaCl à 5 M
 - d. Formamide (mettre sous la hotte)
7. Sortir les lames (avec des petits ou des grands puits selon le besoin)
8. Ecrire sur la lame au crayon de papier et la représenter dans le cahier de suivi FISH (cf. illustration ci-dessous)



9. Placer la lame sur un support puis ajouter l'échantillon :
 - a. 5 µl pour un petit puits
 - b. 10 µl pour un grand puits
10. Placer la lame 10 minutes au four d'hybridation
11. Préparer le Tampon d'hybridation (formamide à 30 %) :
 - a. Prendre un Eppendorf d'1,5 ml
 - b. 180 µl de NaCl
 - c. 20 µl de TrisHCl

Annexes

- d. 500 µl d'eau MilliQ
 - e. 300 µl de formamide (sous hotte à partir de maintenant)
 - f. 2 µl de SDS à 10 % (à la fin sinon précipitation)
12. Préparer le tampon de lavage :
- a. Prendre un tube Falcon de 50 ml (% du tampon d'hybridation utilisé)
 - b. 1000 µl de TrisHCl
 - c. 1020 µl de NaCl
 - d. 2500 µl d'EDTA
 - e. Ajuster à 50 ml avec de l'eau milliQ
 - f. 50 µl de SDS (à la fin)
 - g. Placer le tampon dans le bain marie
13. Préparer les 3 bains d'éthanol (50 %, 80 % et 98 %) puis y plonger les lames pendant trois minutes dans chacun
14. Décongeler les sondes (les placer entre ses doigts)
15. Préparer un petit bout de sopalin
16. Sous la hotte, ajouter dans chaque puit de la lame :
- a. 5 µl (ou 10 pour un grand puit) de tampon d'hybridation (sans toucher la lame)
 - b. 0,5 µl (ou 1 µl pour un grand puit) des sondes à utiliser (toucher la goutte sans pour autant toucher la lame)
17. Placer la lame dans le tube vert (% du tampon d'hybridation utilisé), ensuite, mettre le sopalin sous la lame et y verser le reste du tampon d'hybridation. Enfin fermer le tube et le placer pendant 1 h 30 dans le four d'hybridation
18. Sortir le tampon de lavage du bain marie et sortir la lame du four
19. Rincer un coup la lame avec le tampon de lavage puis plonger la lame dans le falcon contenant le tampon de lavage. Placer ensuite le falcon fermé dans le bain marie pendant 10 minutes
20. Sortir la lame puis la rincer sous le robinet d'eau distillée (faible débit)
21. Placer la lame sur un sopalin puis la sécher avec le bulleur

Voilà la lame est finie, il reste soit, à la monter pour observation, soit à la placer à – 20°C pour conservation.

Montage et démontage d'une lame

1. Déposer une toutes petite goutte de cytofluor dans chaque puits de la lame bien sèche
2. Déposer la lamelle (sans la faire glisser une fois déposer)
3. Mettre un bout de scotch (cf. illustration)

Annexe 7 : Calcul de production de biogaz (détail)

Le calcul de la production de biogaz a été automatisé sous Excel. L'ensemble des données collectées lors des suivis des pilotes est entré dans le fichier qui les enregistre et qui permet de les exploiter. Dans la suite de cette section, seuls les calculs de production de biogaz sont détaillés.

Tout d'abord, afin de connaître le volume du ciel gazeux des bouteilles, il faut tenir compte des prélèvements de lixiviats et de la transformation des composés solides en AGV et en biogaz.

$$V_{ciel}(j) = V_{ciel}(0) + \sum_{k=1}^j (V_{lixiv}(k-1) + V_{dégrad}(k))$$

$V_{ciel}(j)$: Volume du ciel gazeux de la bouteille au jour j.

$V_{ciel}(0)$: Le volume du ciel gazeux initial. Il a été calculé en soustrayant au volume total de la bouteille le volume de liquide introduit et le volume propre des déchets en tenant compte de leur porosité.

$V_{lixiv}(k)$: Volume de lixiviat prélevé au jour k pour l'analyse des lixiviats. Le volume prélevé au jour k est comptabilisé au jour suivant et non le jour même car le prélèvement est réalisé après analyse du ciel gazeux pour éviter que le septum en caoutchouc soit humidifié et endommage le μ GC.

$V_{dégrad}(k)$: Variation de volume due à la transformation du déchet solide en AGV et en biogaz. On considère cette variation négligeable devant les prélèvements de lixiviats.

Calcul du volume du ciel gazeux au jour j.

Comme les dégazages ne sont pas effectués systématiquement tous les jours à la même heure, c'est la production cumulée correspondant au volume de biogaz ramenée au Standard Temperature and Pressure* (STP, 0°C, 1 atm) produit depuis le début de l'expérience qui est calculée. Pour réaliser ce calcul, le biogaz est assimilé à un gaz parfait.

$$V_{cum_biogaz}(j, STP) = \sum_{k=1}^j V_{biogaz}(k, STP)$$

$$V_{biogaz}(j, STP) = \underbrace{V_{analyse_μGC}(j, STP) + V_{dégazé}(j, STP) + V_{restant_dans_ciel}(j, STP)}_{\text{Volume mesuré au jour j}} - \underbrace{V_{restant_dans_ciel}(j-1, STP)}_{\text{Volume restant du jour j-1}}$$

$V_{cum_biogaz}(j, STP)$: Volume de biogaz produit depuis le jour de lancement de l'incubation.

$V_{biogaz}(j, STP)$: Volume de biogaz produit entre la mesure du jour j et celle du jour j-1.

$V_{analyse_μGC}(j, STP)$: Volume de biogaz prélevé par le μ GC lors de l'analyse. Ce volume est calculé à partir des pressions mesurées avant et après analyse.

$V_{dégazé}(j, STP)$: Volume de biogaz dégazé à la seringue à gaz au jour j.

$V_{restant_dans_ciel}(j, STP)$: Volume de biogaz restant dans le ciel gazeux après analyse le jour j.

Remarque : L'ensemble des volumes est ramené aux STP.

Calcul du volume de biogaz produit au jour j dans une bouteille.

Les éléments du calcul précédent sont détaillés ci-dessous :

$$V_{analyse_μGC}(j, STP) = \frac{Vm(STP) * V_{ciel}(j)}{R} * \left[\left(\frac{P_{atm_réelle}(j) + \Delta P_{initiale}(j)}{T_{incubation}} \right) - \left(\frac{P_{atm_réelle}(j) + \Delta P_{ap_analyse_μGC}(j)}{T_{amb}(j)} \right) \right]$$

$$V_{dégazé}(j, STP) = V_{dégazé}(j, T_{amb}(j), P_{atm_réelle}(j)) * \frac{T_{STP} * P_{atm_réelle}(j)}{(T_{amb}(j)) * P_{TSP}}$$

$$V_{restant_dans_ciel}(j, STP) = \frac{P_{atm_réelle}(j) + \Delta P_{finale}(j)}{P_{TSP}} * \frac{T_{STP}}{T_{amb}(j)} * V_{ciel}(j)$$

V_{analyse_μGC(j,STP)} : Volume de biogaz prélevé par le μGC lors de l'analyse. Ce volume est calculé à partir des pressions mesurées avant et après analyse.

V_{dégazé(j,STP)} : Volume de biogaz dégazé à la seringue à gaz au jour j (STP).

V_{dégazé(j,T_{amb}(j),P_{atm_réelle}(j))} : Volume de biogaz dégazé à la seringue le jour j.

V_{restant_dans_ciel(j,STP)} : Volume de biogaz restant dans le ciel gazeux après analyse le jour j.

P_{atm_réelle}(j) : prise à 1000 mbar mais possibilité de variations dans LGPE.

ΔP_{initiale}(j) : Différence de pression mesuré au manomètre à T_{incubation} avant toutes manipulations le jour j.

ΔP_{finale}(j) : Différence de pression mesuré au manomètre à T_{amb} après analyse et dégazage du biogaz le jour j.

ΔP_{ap_analyse_μGC}(j) : Différence de pression mesuré au manomètre à T_{amb} après analyse du biogaz au μGC le jour j.

T_{amb}(j) : prise à 25°C mais possibilité de variations dans LGPE.

T_{inc} : Température d'incubation des pilotes.

T_{STP} : 0°C

P_{STP} : 1 atm

Calcul du volume de biogaz produit au jour j dans une bouteille.

Si la pression dans la bouteille le jour j est supérieure à 1000 mbar, il est impossible de faire directement l'analyse au μGC au risque de l'endommager. La bouteille est donc légèrement dégazée après un temps d'attente qui a préalablement mis le gaz à température ambiante. Une mesure de pression est alors effectuée et le calcul de V_{analyse_μGC} est fait avec la nouvelle mesure de pression à la place de ΔP_{initiale} et T_{amb} à la place de T_{inc}. Ensuite, pour obtenir la production cumulée spécifique de chaque gaz, les résultats obtenus lors des analyses par μGC sont utilisés.

$$V_{cum_gaz_i}(j, STP) = \left(\sum_{k=1}^j V_{gaz_i}(k, STP) \right) - V_{gaz_i}(0, STP)$$

$$V_{gaz_i}(j, STP) = \%_{gaz_i}(j) * V_{mesuré}(j) - \%_{gaz_i}(j-1) * V_{restant_dans_ciel}(j-1)$$

V_{cum_gaz_i(j,STP)} : Volume de gaz(i) produit depuis le jour de lancement de l'incubation.

V_{gaz_i(j,STP)} : Volume de gaz(i) produit entre la mesure du jour j et celle du jour j-1.

%_{gaz_i}(j) : Fraction volumique du gaz(i) dans le gaz analysé au μGC au jour j.

V_{mesuré}(j,STP) : Volume de biogaz mesuré au jour j. Ce terme correspond à dégazé à la somme du volume de biogaz utilisé par le μGC, plus le volume dégazé à la seringue, plus ce qui reste dans le ciel gazeux après analyse.

Remarque: L'ensemble des volumes est ramené aux STP.

Calcul du volume de gaz(i) produit au jour j.

Title:**Isotopic fractionation ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) generated by methanogenesis: contribution to the understanding of biodegradation processes occurring during anaerobic digestion.
Application to municipal solid waste anaerobic treatment processes****Summary:**

Anaerobic waste treatment processes are clearly part of the answer to a current important socio-economic issue in waste management: energy production from the organic fraction of municipal solid waste. The anaerobic digestion of municipal solid waste is a complex process involving numerous reactions and microorganism communities. At the end of the degradation process, some biogas with a particularly high methane content is produced. A detailed knowledge on how operational parameters affect metabolism orientations is required to optimize these treatment processes. This is in particular the case for the last degradation reaction called methanogenesis. In this context, an isotopic approach based on isotopic composition measurements ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) for methane and carbon dioxide can provide some clues with regard to this objective. Indeed, this methodology enables the determination of the methanogenic pathways by which methane is produced.

Transferability of the isotopic approach used for natural ecosystems to the field of anaerobic digestion of municipal solid waste was first experimentally verified. In a second time, the effects of some operational parameters known to strongly impact the anaerobic digestion process, such as temperature and ammonia concentration, were studied. During anaerobic digestion of reconstituted municipal solid waste in thermophilic conditions, it was shown that acetoclastic methanogenesis (occurring in mesophilic conditions) was replaced by a syntrophic acetate oxidation reaction. Additional experiments using acetate as sole substrate were performed and showed that this effect on the metabolic pathways was not systematic. Consequently, it cannot be due to a direct effect of the temperature increase. It could rather be explained by the induced and indirect increase in ammonia concentration. Additional experiments clearly demonstrated that an increase in ammonia concentration led to the establishment of a syntrophic acetate oxidation reaction. The isotopic approach was combined with microbiological analyses and showed that the syntrophic acetate oxidation reaction occurring at high ammonia concentration during acetate incubations could have been performed through a syntrophic relationship between bacteria and strict hydrogenotrophic archaea, as previously described in the literature. Interestingly, the syntrophic acetate oxidation could also have occurred using a different pathway relying on members of the Methanosarcinaceae family putatively able to perform the two steps of the reaction (oxidation and hydrogenotrophic methanogenesis). In addition, the implementation of the isotopic approach during an experiment designed to simulate a landfill bioreactor evidenced the influence of the effluent's nature on the methanogenesis metabolism orientation. The influence of green waste proportion during the co-digestion of biowaste / green waste mixtures on resulting ammonia concentrations and methanogenesis pathways was also studied through dedicated experiments. Finally, the potential of the isotopic approach for landfill-scale application was investigated through a measurement campaign on a landfill site.

Key words:

Biodegradation, anaerobic digestion, methanogenesis, municipal solid waste, stable isotope, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, temperature, ammonia, syntrophic acetate oxidation, landfill, anaerobic digesters.

Laboratory:

This study was conducted within the Hydrosystems and Bioprocesses research unit (HBAN) in Cemagref Antony (France), as part of the research topic TED (processes and technologies for water and waste).

*Address: Unité HBAN, Cemagref groupement d'Antony, Parc de Tourvoie – BP 44, 92163 Antony cedex, FRANCE

Titre de la thèse :

**Fractionnements isotopiques ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) engendrés par la méthanogenèse : apports pour la compréhension des processus de biodégradation lors de la digestion anaérobie.
Application aux procédés anaérobies de traitement des déchets non dangereux.**

Résumé :

Les procédés anaérobies de traitement de déchets apparaissent clairement pouvoir répondre à l'enjeu socio-économique actuel que représente la valorisation énergétique de la fraction organique contenue dans les déchets ménagers. En effet, les processus de dégradation anaérobies font intervenir en cascade, différentes réactions et populations de micro-organismes permettant de transformer la matière organique en biogaz riche en méthane. Une bonne connaissance des effets des paramètres opérationnels sur l'orientation des métabolismes s'avère ainsi nécessaire à l'émergence de solutions permettant d'optimiser ces procédés. Ceci est notamment le cas pour la dernière étape, appelée méthanogenèse. Dans ce contexte, l'approche isotopique reposant sur la mesure de la composition isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) du méthane et du dioxyde de carbone, devrait pouvoir répondre à cet objectif en permettant l'identification des métabolismes à l'origine de la production du méthane.

La transposabilité à l'étude de la digestion anaérobie des déchets de cette approche isotopique déjà utilisée dans les écosystèmes naturels, a tout d'abord été vérifiée expérimentalement. Les effets de certains paramètres opérationnels connus pour avoir un impact fort sur le processus de digestion anaérobie, tels que la température et la concentration en azote ammoniacal, ont ensuite été étudiés. Il a été mis en évidence qu'en condition thermophile, la méthanogenèse acétoclaste observée en condition mésophile, était remplacée par une oxydation syntrophique de l'acétate lors de la digestion anaérobie des déchets ménagers. Des expériences sur acétate ont montré que cet effet sur les voies métaboliques n'était toutefois pas systématique et pourrait ne pas être dû à un effet direct d'une augmentation de la température, mais plutôt à l'accroissement de la concentration en ammoniac qui en résulte. D'autres expériences ont clairement établi qu'une augmentation de la concentration en azote ammoniacal conduisait également à la mise en place de l'oxydation syntrophique de l'acétate. Le couplage de l'approche isotopique avec des analyses microbiologiques a révélé que cette réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate, à haute concentration en azote ammoniacal, pouvait s'établir telle que déjà décrite, par la mise en place d'une relation symbiotique bactéries/archées hydrogénéotrophes strictes, mais également de manière différente en impliquant des membres de la famille *Methanosarcinaceae* qui pourraient réaliser seuls les deux étapes de la réaction (oxydation et méthanogenèse hydrogénéotrophe). L'application de l'approche isotopique a également permis de mettre en évidence, lors d'une expérience visant à simuler la recirculation de différents effluents au sein d'une installation de stockage de déchets bioactive, l'influence de la nature de l'effluent sur l'orientation des métabolismes méthanogènes. Enfin, l'influence de la proportion de déchets verts, lors de la co-digestion biodéchets / déchets verts, sur la concentration en ions ammonium libérés ainsi que sur l'orientation du métabolisme en résultant, a été étudiée. Les potentialités d'une utilisation de l'approche isotopique sur site ont également été investiguées au travers d'une campagne de mesures sur une installation de stockage de déchets non dangereux.

Mots clés :

Biodégradation, digestion anaérobie, méthanogenèse, déchets ménagers, isotope stable, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, température, azote ammoniacal, oxydation syntrophique de l'acétate, ISDND (Installation de Stockage de Déchets Non Dangereux), méthaniseur.

Laboratoire d'accueil :

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au Cemagref d'Antony*, au sein de l'unité Hydrosystèmes et Bioprocédés (HBAN), dans le cadre du thème de recherche TED (Technologies et procédés pour l'Eau et les Déchets)

* Adresse : Unité HBAN, Cemagref groupement d'Antony, Parc de Tourvoise – BP 44, 92163 Antony cedex, FRANCE