

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
ALEXANDRE MOREAU

PRODUCTION SIMULTANÉE DE BIOHYDROGÈNE ET D'ENZYMES  
CELLULOLYTIQUES AVEC LA BACTÉRIE *CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM*  
CULTIVÉE DANS LES BOUES DE PAPETIÈRES

AOÛT 2012

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Simon Barnabé pour m'avoir accueilli au sein de son équipe afin que je puisse travailler sur un sujet qui me tient à cœur, soit la revalorisation de matières résiduelles. Je le remercie particulièrement pour m'avoir fait rencontrer des gens fort intéressants et pour l'énergie qu'il investit pour ces étudiants. J'ai aussi vraiment apprécié qu'il m'ait confié des stagiaires. Je remercie également le professeur Richard Sparling pour m'avoir partagé ses connaissances, qui m'ont franchement bien aiguillé et qui m'ont permis de démarrer ce projet. Merci au professeur Daniel Montplaisir de m'avoir introduit au monde des pâtes et papiers, qui m'était tout à fait inconnu avant mon arrivé à Trois-Rivières.

Je remercie Kokou Adjallé, auxiliaire de recherche, il était toujours présent et me permettait de partager mes craintes par rapport à mes résultats et expériences.

Un grand merci aux stagiaires : Caroline Bourque, Mégane Dubos et Clément Baudier. Vos travaux m'ont vraiment aidé et m'ont obligé à vulgariser mon projet afin de pouvoir le partager. Je vous souhaite du succès pour vos projets respectifs.

Merci finalement à tout les membres du laboratoire pour votre agréable compagnie : Julien Bley, Martin Dubé, Cynthia Casgrain, François Laframboise, Gabriel St-Pierre Lemieux, Karine Saucier, Nathalie Bourdeau, Stéphane Ouellet, Thanh Tong Lai et Thi Thanh Ha. Il est plaisant de travailler avec vous.

## RÉSUMÉ

L'industrie des pâtes et papiers est un acteur économique important du Québec. Cette industrie fait actuellement face à des défis économiques de plus en plus importants. Notons, entre autres, le resserrement des règlements de protection de l'environnement qui contraint l'industrie à traiter leurs effluents d'eaux usées avant le rejet au milieu récepteur. Ces traitements génèrent des boues qui doivent être gérées de façon sécuritaire et économique.

Environ 3 millions de tonnes humides de résidus, incluant les boues d'épuration, ont été générées en 2008 par les papetières du Québec. Le tiers de ceux-ci ont été enfouis. Il existe différents types de boues, selon le type de production de l'usine et l'étape de production à laquelle elles ont été extraites. Ces boues sont une source de nutriments, de carbone, d'azote et de phosphore pouvant permettre la croissance bactérienne. Ce projet évalue la capacité des différents types de boues de papetières en tant que milieu de culture alternatif pour le *Clostridium thermocellum*. Les boues ont été préalablement stérilisées et enrichies d'une source d'azote et de vitamines afin de favoriser la croissance du microorganisme.

Le *C. thermocellum* est un micro-organisme anaérobie capable de produire de l'hydrogène à partir de résidu cellulosique. Pour ce faire, il dépolymérise la cellulose grâce à un ensemble de protéines enzymatiques : le cellulosome. Le cellulosome permet au *C. thermocellum* de dépolymériser la cellulose dans toutes les formes cristallines et amorphes retrouvées dans la nature. Les sucres générés par cette dépolymérisation sont consommés par la bactérie, ce qui donnera, en tant que produits issus du catabolisme du glucose : de l'acétate, du lactate, du formate, de l'éthanol, de l'hydrogène et du gaz carbonique. De ces métabolites d'intérêts, l'hydrogène pourrait être utilisé au sein de l'entreprise en tant que source d'énergie. Aussi, les cellulosomes pourraient être récupérés comme un produit utilisable sur place ou commercialisable.

Le but du projet est d'explorer une nouvelle voie de valorisation des boues de papetières. Ceci permettrait à l'industrie papetière de diversifier sa production tout en valorisant ces matières résiduelles. Aussi, puisque la cellulose contenue dans les eaux usées est sous forme de matière en suspension, celle-ci est retirée au traitement primaire, elle n'est donc actuellement pas traitée à l'aide de microorganismes. Alors, l'utilisation d'un microorganisme pour réduire la quantité de cellulose résiduelle offrirait un type novateur de traitement des eaux usées de papetières.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet démontrent que les boues primaires répondent particulièrement bien au traitement avec la bactérie *C. thermocellum*. Une croissance de la bactérie a effectivement été notée lorsque ces boues étaient utilisées comme substrat, cette croissance était comparable à celle rencontrée dans un milieu

synthétique. La bactérie a dépolymérisé la cellulose présente dans les boues primaires, réduisant de 75 % la quantité de matières volatiles en suspension (M.V.E.S.) présentes dans le milieu, cette diminution correspond à 66 % des matières en suspension (M.E.S.). Les sucres générés ont été consommés par la bactérie pour produire 0,90 mol d'hydrogène par mole de glucose consommé, ce qui correspond aux valeurs les plus faibles par rapport aux expériences utilisant divers substrats cellulosiques d'autres laboratoires. Finalement, une activité cellulolytique maximale dans le surnageant du milieu de 1,22  $\mu\text{mol}$  de liens hydrolysés  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  a été observée et ce, lorsque la cellulose présente dans le milieu était complètement dépolymérisée.

Des bilans stœchiométriques ont permis de valider les résultats obtenus. L'évaluation des métabolites acétate, lactate et éthanol a été utilisée afin d'évaluer la quantité de glucose consommé par *C. thermocellum*. La quantité de glucose consommé semble en effet correspondre en masse à la quantité de M.V.E.S. ayant été dégradées durant la fermentation. Le ratio des métabolites produits par *C. thermocellum* à un carbone sur ceux à deux carbones (C1/C2) montre que la quantité de  $\text{CO}_2$  a possiblement été sous-estimée, ce qui a également débalancé le ratio de métabolites oxydés sur ceux réduits. La formation de carbonate qui accompagne l'augmentation de la quantité de  $\text{CO}_2$  solubilisé expliquerait le manque de  $\text{CO}_2$ .

Ces travaux ont démontré qu'il était possible d'utiliser un microorganisme afin de revaloriser les boues primaires de papeteries comme source de carbone alternatif et bon marché à raison de 5 g/l en milieu de culture. Comme les expériences ont été menées avec des échantillons de 50 ml, il y aurait lieu de les porter en bioréacteur. Les conditions de fermentation mieux contrôlées permettraient d'améliorer les rendements de la bactérie. Enfin, cette bactérie produit d'autres métabolites d'intérêt. Il y aurait lieu d'étudier la production de ces métabolites avec le procédé développé dans ce travail. Ce projet aura certainement des retombées importantes, car la compagnie Kruger manifeste beaucoup d'intérêt à intégrer la production de ce microorganisme dans ses boues papeteries pour non seulement les traiter, mais aussi pour en tirer divers produits à valeur ajoutée.

Mots clés : *Clostridium thermocellum*, boue d'épuration, pâtes et papiers, hydrogène, cellulases.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Contexte économique des papetières du Québec.....	1
1.2 Les rejets industriels des papetières du Québec.....	1
1.3 Gestion et avenues de valorisation des boues de papetières.....	5
1.4 Le <i>C. thermocellum</i> , une bactérie productrice d'hydrogène.....	8
1.5 Le cellulosome et les applications industrielles des cellulases.....	12
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>OBJECTIFS DU PROJET.....</b>	<b>18</b>
2.1 But du projet.....	18
2.2 Hypothèses.....	18
2.2.1 Les boues en tant que milieu de culture.....	19
2.2.2 La production d'hydrogène.....	19
2.2.3 L'activité cellulolytique.....	20
2.2.4 Production simultanée d'hydrogène et de cellulase.....	20
2.3 Objectifs.....	21
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>22</b>
3.1 Plan expérimental.....	22
3.2 Provenance des produits chimiques.....	24
3.3 Échantillonnage des boues.....	24
3.4 Source du <i>C. thermocellum</i> et caractéristiques.....	25
3.5 Milieux de culture synthétique et semi-synthétique.....	26
3.6 Solides totaux et en suspension.....	26

3.7	Évaluation de la croissance bactérienne.....	26
3.8	Analyse des gaz.....	28
3.9	Analyse des métabolites : acétate, formate, lactate.....	28
3.10	Analyse des métabolites : éthanol.....	28
3.11	Activité enzymatique du surnageant.....	28
<b>CHAPITRE IV</b>		
<b>RÉSULTATS.....</b>		<b>30</b>
4.1	Croissance de <i>C. thermocellum</i> avec les boues de papetières comme substrat..	30
4.2	Diminution des matières en suspension dans le milieu avec boue primaire.....	32
4.3	Activité cellulolytique.....	35
4.4	Métabolites produits lors de la fermentation.....	37
4.5	Équivalent glucose consommé lors de la fermentation.....	40
4.6	Bilan C1/C2.....	42
4.7	Bilan oxydo-réduction.....	43
<b>CHAPITRE V</b>		
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>46</b>
5.1	Croissance de la bactérie <i>C. thermocellum</i> .....	46
5.2	Diminution des matières en suspension.....	49
5.3	Activité cellulolytique du surnageant.....	52
5.4	Équivalent glucose théorique consommé et ratio hydrogène/glucose.....	54
5.5	Ratio C1/C2 et O/R.....	57
<b>CHAPITRE VI</b>		
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>60</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>		<b>63</b>
<b>ANNEXE A</b>		
<b>COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE ATCC 1191 (ATCC, 2010).....</b>		<b>67</b>
<b>ANNEXE B</b>		
<b>PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES BOUES DE PAPETIÈRES.....</b>		<b>69</b>
<b>ANNEXE C</b>		
<b>EXEMPLES DE CALCULS.....</b>		<b>72</b>
C.1	Volume de milieu de culture dans une bouteille.....	72

C.2	Calcul pour la production des acides organiques.....	72
C.2.1	Acétate, lactate et formate.....	72
C.2.2	Éthanol.....	73
C.3	Quantité de gaz dans l'espace gazeux des bouteilles de culture.....	73
C.3.1	Volume d'espace gazeux dans la bouteille.....	73
C.3.2	Quantité initial d'azote dans les bouteilles.....	74
C.4	Calcul de la quantité de gaz après fermentation dans l'espace gazeux.....	74
C.4.1	Quantité de gaz total après fermentation.....	74
C.4.2	Quantité d'hydrogène.....	75
C.4.3	Quantité de dioxyde de carbone.....	75
C.5	Quantité de gaz dissous dans le milieu de culture des bouteilles.....	75
C.5.1	Coefficient d'Henry pour l'hydrogène.....	76
C.5.2	Coefficient d'Henry pour le dioxyde de carbone.....	76
C.6	Pression partielle des gaz dans l'espace gazeux.....	77
C.6.1	Pression partielle d'hydrogène.....	77
C.6.2	Pression partielle de dioxyde de carbone.....	77
C.7	Calcul pour la concentration et quantité de gaz dissous.....	77
C.7.1	Concentration d'hydrogène dissous.....	77
C.7.2	Quantité d'hydrogène dissous dans le milieu en bouteille.....	78
C.7.3	Concentration de dioxyde de carbone dissous.....	78
C.7.4	Quantité de dioxyde de carbone dissous dans le milieu en bouteille.....	78
C.8	Équilibre entre $\text{CO}_2$ dissous et $\text{HCO}_3^-$ .....	78
C.9	Balance C1/C2.....	80
C.10	Rapport entre les produits oxydés et réduits.....	81

## LISTE DES FIGURES

1.1	Traitement des eaux de procédé de l'industrie des pâtes et papiers (MDDEP, 2008).....	3
1.2	Évolution de la gestion des boues d'épuration de fabriques de pâtes et papiers au Québec (MDDEP, 2008). Les masses sont en poids humide.....	6
1.3	Catabolisme déduit du cellobiose par <i>C. thermocellum</i> . Les flèches pleines sont des voies vérifiées par l'analyse d'activité enzymatique, les flèches pointillées sont des voies déduites par la présence des enzymes dans le code génétique de <i>C. thermocellum</i> . Les enzymes sont : Lactate déshydrogénase (LDH), pyruvate:formate lyase (PFL), pyruvate ferredoxine oxidoréductase (PFO), acétaldéhyde déshydrogénase/alcool déshydrogénase (ALDH/ADH), phosphotransacetylase (PTA), acétate kinase (ACK), ferredoxine hydrogénase (Fd H <sub>2</sub> ase) et NAD(P)H hydrogénase (NAD(P)H H <sub>2</sub> ase) (Rydzak et al., 2009).....	9
1.4	Représentation schématique du cellulosome (Bayer et al., 1998).....	13
3.1	Étapes avant l'inoculation des milieux synthétiques et semi-synthétiques avec boues.....	23
3.2	Concentration de protéines particulières: séparation des protéines solubles du milieu et lyse cellulaire.....	27
4.1	Croissance de <i>C. thermocellum</i> en utilisant les boues primaires comme substrat. Concentration en protéines particulières dans le milieu ATCC 1191 contenant les différents substrats après le temps de fermentation à 60°C. Le temps 0 heure correspond au temps tout de suite après l'inoculation. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type.....	30
4.2	Diminution des matières en suspension dans les boues primaires de papeteries. Milieu ATCC 1191 contenant le substrat cellulose ou boue primaire, inoculé avec <i>C. thermocellum</i> . Le temps 0 correspond à l'instant après l'inoculation. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.....	33
4.3	Décantabilité des M.E.S. dans le milieu 1191 contenant 5 g/l de boue primaire sèche de papetière après l'inoculation de la bactérie <i>C. thermocellum</i> .....	34
4.4	Activité CMC-ase du surnageant de culture de <i>C. thermocellum</i> . Cultivé dans le milieu ATCC 1191 contenant les substrats cellulose ou boue primaire. Les temps en heures correspondent au temps de fermentation et le temps de réaction correspond à l'hydrolyse de la CMC avec le surnageant de	

	culture. La quantité d'extrémités réductrices libérées par l'hydrolyse de la CMC a été évaluée avec le réactif à l'acide 3,5-dinitrosalicylique. Les données sont présentées pour 1 ml de surnageant. Les écarts-types de l'activité sont présentés à la figure 4.5.....	36
4.5	Activité CMC-ase du surnageant de culture de <i>C. thermocellum</i> . Cultivé dans le milieu ATCC 1191 contenant les substrats 5 g/l de cellulose ou boue primaire. L'activité est mesurée entre le temps 0 et 10 minutes de réaction avec la solution 2 % CMC.....	37
4.6	Métabolites de fermentation produits par <i>C. thermocellum</i> . Concentration obtenue dans le milieu de culture ATCC 1191 contenant 5 g/l de boue primaire ou de cellulose. Les concentrations initiales de métabolites ont été soustraites pour chaque point. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.....	38
4.7	Voies métaboliques de <i>C. thermocellum</i> , schéma simplifié impliquant le carbone.....	40
4.8	Bilan de glucose consommé théorique durant la fermentation. Quantité de M.V.E.S. à laquelle est ajoutée la quantité théorique de glucose consommé par <i>C. thermocellum</i> . Les numéros représentent les 15 bouteilles utilisées pour chaque série d'expériences utilisant la cellulose ou les boues comme substrat.....	41
4.9	Rapport C1/C2 des métabolites acétate, éthanol, formate et gaz carbonique produit par <i>C. thermocellum</i> dans les différents substrats. Les lignes pointillées représentent la valeur qui devrait être atteinte, soit de 1. Les échantillons 1, 2 et 3 ne sont pas présentés, car elles correspondent au moment de l'inoculation, il n'y avait donc pas de métabolites produits à ce moment.....	43
4.10	Rapport O/R des métabolites produits par <i>C. thermocellum</i> . Les lignes pointillées représentent la valeur qui devrait être atteinte, soit de 1. Les échantillons 1, 2 et 3 ne sont pas présentés, car elles correspondent au moment de l'inoculation, il n'y avait donc pas de métabolites produits à ce moment.....	45
5.1	Équilibre entre le gaz carbonique gazeux et le carbonate.....	57
5.2	Rapport O/R des métabolites produits par <i>C. thermocellum</i> tenant compte des molécules de gaz carbonique manquantes évalué avec le rapport C1/C2. Les bouteilles 1, 2 et 3 ne sont pas présentés, car elles correspondent au moment de l'inoculation, il n'y avait donc pas de métabolites produits à ce moment.....	59

## LISTE DES TABLEAUX

1.1	Gestion des résidus de l'industrie des pâtes et papiers au Québec en 2008 (MDDEP, 2008).....	7
1.2	Rendement de fermentation en H <sub>2</sub> de <i>C. thermocellum</i> .....	10
1.3	Valeurs calorifiques de combustibles à température de 25 °C à 1 atm (DOE, 2008).....	12
1.4	Activité cellulolytique de <i>C. thermocellum</i> .....	16
4.1	Production de métabolites par <i>C. thermocellum</i> . Concentration de métabolites des échantillons des milieu avec cellulose et avec boue primaire prélevés tout de suite après l'inoculation.....	39
4.2	Valeurs d'oxydation des produits de fermentation de <i>C. thermocellum</i> .....	45
A.1	Composition du milieu de culture synthétique ATCC 1191.....	67
A.2	Composition de la solution de vitamines.....	67
A.3	Composition de la solution modifiée de minéraux de Wolfe.....	68
A.4	Composition de la solution de réduction.....	68
B.1	Caractéristiques des boues primaires (valeurs moyennes) (GQ, 1996).....	69
B.2	Caractéristiques des boues secondaires (valeurs moyennes).....	70
B.3	Caractéristiques des boues de désencrage (valeurs moyennes).....	71
C.1	Constantes d'Henry pour la solubilité des gaz (Linstrom et Mallard, 2011).....	76
C.2	Valeurs d'oxydation des produits de fermentation de <i>C. thermocellum</i> .....	81
C.3	Valeurs brutes pour la bouteille C15 du 30 mai 2011, ayant servies pour les exemples de calculs. La pression avant inoculation était de 7,2 psig.....	82

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

S.T.	Solides totaux
M.E.S.	Matières en suspension
M.V.E.S.	Matières volatiles en suspension
M.M.E.S.	Matières minérales en suspension
D.B.O.	Demande biochimique en oxygène
D.C.O.	Demande chimique en oxygène
C1/C2	Rapport entre les molécules à un carbone sur celles à deux carbones
O/R	Rapport entre les molécules oxydées et réduites

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 Contexte économique des papetières du Québec

L'industrie des pâtes et papiers a une activité économique très importante au Québec. En 2008, cette industrie employait environ 26 500 personnes. La valeur de ces exportations était de 7,145 milliards de dollars, ce qui représentait 10,1 % de la valeur totale des exportations du Québec (MDDEP, 2008). Par contre, cette industrie fait face à certaines difficultés reliées notamment à la hausse de la valeur du dollar canadien par rapport à l'américain, ce qui rend les exportations québécoises moins compétitives vers le principal acheteur des produits québécois. Aussi, la demande s'affaiblit pour certains types de papier, par exemple, le papier journal, dû à la concurrence des nouveaux médias de communication tels internet, les ordinateurs portables, les téléphones intelligents, les tablettes numériques, etc. La hausse des prix des carburants ainsi que le coût de production moins élevé en Asie pèsent également dans la balance. De plus, la gestion des résidus devient un enjeu, puisque le coût de l'enfouissement augmente et les règlements de contrôle des rejets sont de plus en plus stricts. L'industrie papetière cherche donc aujourd'hui à développer de nouveaux marchés, tout en atteignant le meilleur rendement énergétique possible et en valorisant leurs sous-produits et résidus.

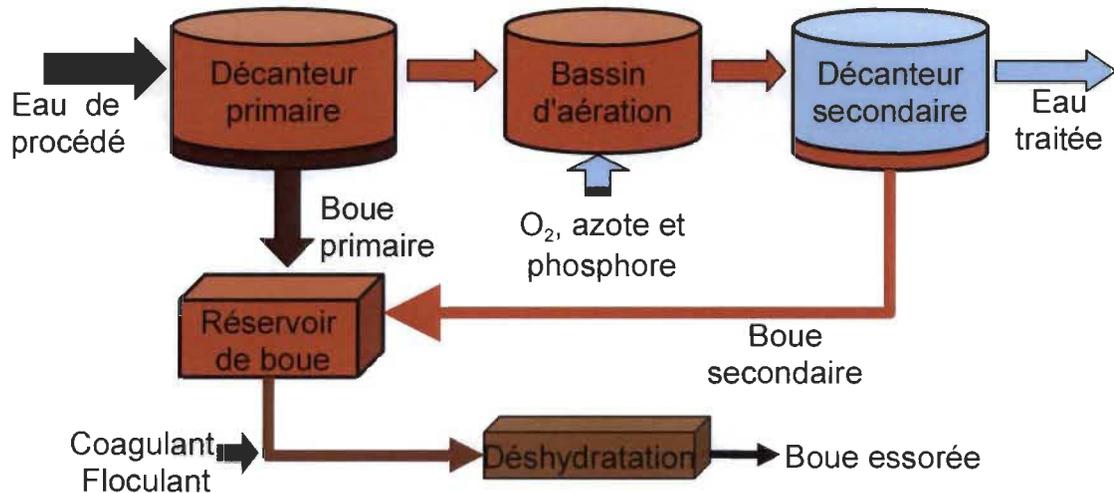
### 1.2 Les rejets industriels des papetières du Québec

Afin d'avoir une idée du type de rejet présent dans l'industrie papetière, il est bon d'avoir une idée générale de la production du papier. Tout d'abord, l'industrie s'alimente principalement de résidus de scierie, le bois rond n'étant plus la source première de fibres de bois. Ceci est dû, entre autres, au coût du transport du bois ainsi qu'aux mesures de protection des forêts qui restreignent la coupe de bois. Le papier recyclé est une autre source importante de fibres.

La production de papier consiste soit à défibrer mécaniquement le bois ou à libérer chimiquement les fibres de cellulose des autres constituants majeurs du bois, soit la lignine et l'hémicellulose. En fait, la quantité de lignine présente dans le papier varie selon la qualité et la fonction du papier. Les procédés mécaniques utilisent en général pas ou peu de produits chimiques, mais produisent une pâte contenant plus de lignine. Les procédés chimiques servent à dissoudre la lignine, ce qui permet de la retirer de la pâte de cellulose. Un procédé chimique très répandu est le procédé sulfate Kraft, qui permet la récupération de la liqueur de cuisson ainsi que la valorisation de la lignine extraite. En effet, la lignine possède une haute valeur calorifique et elle est brûlée afin de produire de l'énergie et de la vapeur d'eau. La pâte obtenue, par ce procédé, peut ensuite passer par un procédé facultatif de blanchiment, une dernière étape afin de retirer la lignine et d'obtenir une pâte de haute blancheur. Des papetières peuvent aussi appliquer des procédés de désencrage afin de récupérer des fibres recyclées. Ce traitement permet de retirer les encres, mais également les additifs du papier ainsi que les matières contaminantes telles les broches et les matières plastiques. Finalement, la mise en feuille consiste principalement à presser et sécher la pâte afin de retirer l'eau, qui constitue environ 97 % de la pâte de papier qui arrive à cette étape. Toutes ces techniques produisent inévitablement des résidus de productions qui doivent être gérés. Aussi, l'eau est un élément indispensable dans la production de la pâte de papier. Tous ces procédés génèrent une eau de production qui doit être traitée afin de répondre aux exigences gouvernementales avant d'être rejetée au milieu récepteur.

Un schéma du traitement actuel des eaux de procédés de l'industrie papetière est présenté à la figure 1.1. D'abord, le traitement primaire réduit les matières en suspension (M.E.S.) soit par gravité dans des décanteurs, par flottation en cellules ou par filtration. Ces méthodes peuvent réduire les M.E.S. d'environ 95 %. Les résidus de ce traitement sont nommés boue primaire. Ensuite, le traitement biologique utilise des microorganismes pour digérer les matières organiques dissoutes, ce qui fait diminuer la demande biochimique en oxygène (D.B.O.). Les microorganismes sont capables de dégrader les acides gras, les résines et les composés phénoliques, ce qui entraîne l'élimination de la toxicité aiguë de l'effluent. Ce bassin de boue activée est alimenté en

azote, phosphore et en oxygène afin de garder les microorganismes actifs. Ces microorganismes sont ensuite décantés. Les boues qui proviennent de ce traitement sont les boues secondaires. Ces boues secondaires sont mélangées aux boues primaires avant de passer à la coagulation et la déshydratation, ce qui forme les boues mélangées, ou boues mixtes.



**Figure 1.1 :** Traitement des eaux de procédé de l'industrie des pâtes et papiers (MDDEP, 2008).

Les installations de désencrage de fibres recyclées sont placées au début de la chaîne de production de papier et produisent également des rejets, catégorisés comme étant les boues de désencrage. Sur certains sites, ces boues sont mélangées avec les boues primaires et secondaires avant la déshydratation. Si l'usine utilise le procédé Kraft, elle récupérera la liqueur de cuisson. Les résidus de cette récupération sont le  $\text{CaCO}_3$ , le sodium, le sulfate, le silicate et d'autres minéraux non réactifs. Ce sont les résidus alcalins des usines de pâte Kraft. Les cendres volantes sont les résidus récupérés lors des traitements des gaz de combustion, et les cendres de grilles proviennent des cendriers des appareils de combustion. Les écorces et résidus de bois forment une autre catégorie de déchet (GQ, 1996). En 2008, environ 3 millions de tonnes métriques humide de ces matières résiduelles ont été produites et 33 % de celles-ci ont été enfouies (MDDEP, 2008).

Ce survol de la production de pâtes et papiers et du traitement des eaux de production permet de comprendre les types de résidus et leur provenance. En bref, ils sont composés de :

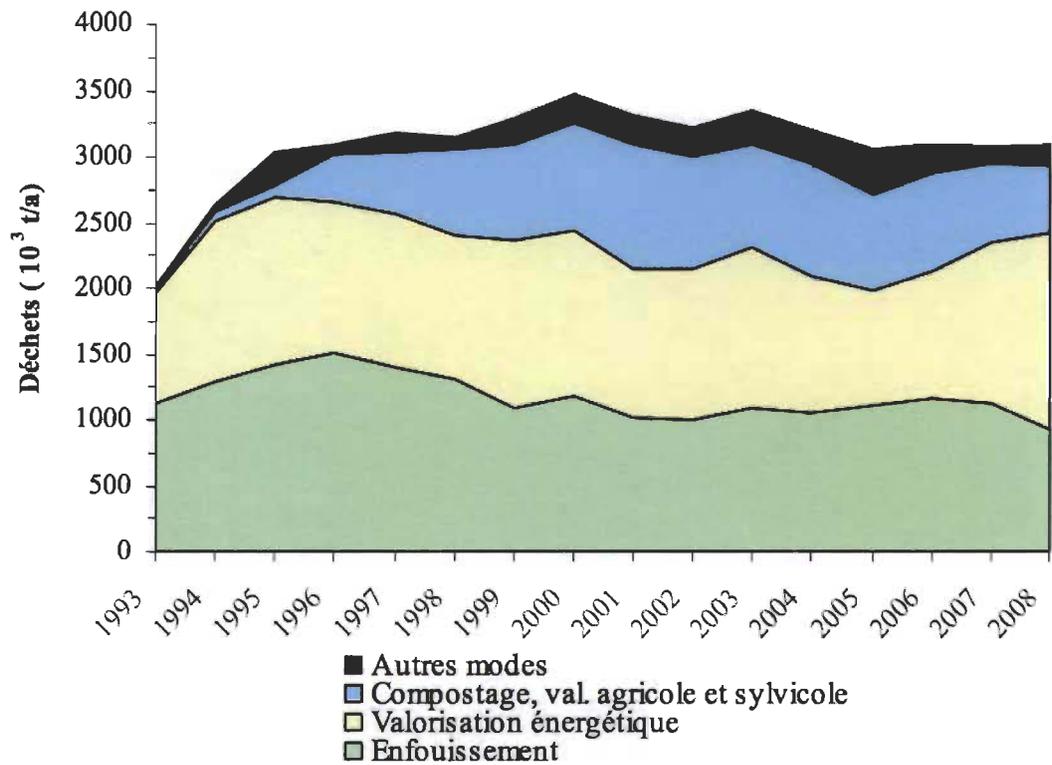
- M.E.S. : fibres de bois, particules de bois, boues biologiques, cendres et additifs;
- Matières organiques (D.B.O. et D.C.O.) : résidus de bois et additifs;
- Composés inorganiques : métaux, sels du bois et additifs;
- Composés phénoliques et acides gras et résiniques : résidus de bois;
- Hydrocarbures pétroliers (C10-C50) : pertes de lubrifiants des machines;
- Traces de BPC : colorants extraits des fibres recyclées et produits chimiques;
- Dioxines et furanes chlorés : lorsque les produits chlorés sont utilisés pour le blanchiment;
- Nutriments, composés d'azote et de phosphore : maintiens de l'activité bactérienne lorsque le traitement biologique est utilisé pour le traitement des eaux usées;
- Matières plastiques et collantes (« stikies ») : résidus de papier recyclé;
- Autres : composés organiques volatils ou semi-volatils, formaldéhyde, hydrocarbures aromatiques polycycliques et acétaldéhyde.

Les constituants et les types des boues d'épuration de papeteries peuvent varier d'une usine à l'autre, selon le type de production de l'usine. Il y a, en effet, une spécialisation des usines, par exemple, une usine peut produire de la pâte Kraft pour fournir d'autres usines, tandis que d'autres n'ont pas les installations Kraft, mais produisent à partir de papier recyclé. Par contre, la matière première étant la fibre de bois, celle-ci se retrouve toujours dans les boues. Cette fibre non soluble fait partie des M.E.S., et est retirée principalement au traitement primaire. Voici donc la particularité des boues d'épuration de papeteries, les M.E.S. retirés des eaux de production sont constitués en grande partie de fibres ligno-cellulosiques, donc de matières nutritives utilisables par certaines bactéries, mais ces fibres sont retirées avant le traitement biologique. Il y a donc une possibilité de valoriser ces nutriments ou du moins d'apporter une nouvelle approche de traitement biologique des eaux de production afin de réduire la quantité de boue à gérer.

### 1.3 Gestion et avenues de valorisation des boues de papetières

Les rejets de l'industrie papetière sont normés par des lois spécifiques à l'industrie. Les lois portant sur les eaux usées sont le « Règlement sur les attestations d'assainissement en milieu industriel (L.R.Q., c. Q-2, r.5) » et le « Règlement sur les fabriques de pâtes et papiers (L.R.Q., c. Q-2, r.27) ». L'industrie doit également produire une attestation d'assainissement, cela dans le but de protéger les milieux récepteurs des eaux usées. Aujourd'hui, les usines de pâtes et papiers sont équipées d'une section de traitement des eaux de production. Tous ces efforts ont permis une amélioration considérable de la qualité des eaux rejetées. Cependant, l'arrivée des stations d'assainissement au sein des entreprises a amené une nouvelle réalité, c'est-à-dire la gestion des boues d'épuration. La figure 1.2 montre l'évolution de la gestion de ces boues depuis 1993.

La figure 1.2 montre qu'il n'y a pas eu de grand changement sur la gestion des boues d'épuration durant la dernière décennie. La valorisation agricole, le compostage ainsi que la valorisation sylvicole ont pris tranquillement leur place entre 1993 et 2000, mais semble avoir atteint leur limite en tant que mode de gestion. Fait intéressant, ce mode a permis la revalorisation de la totalité des boues secondaires non mélangées de l'industrie papetière en 2008. Malheureusement, ces boues représentent qu'une très faible portion des matières résiduelles totales. Tel que mentionné plus haut, l'industrie s'alimente de fibre de bois et la pâte chimique Kraft permet de valoriser la lignine. C'est pourquoi une grande partie des résidus est brûlée pour des fins énergétiques, la lignine ayant un grand pouvoir calorifique. Les nœuds, écorces et résidus de bois, qui ne sont pas utilisés pour la production de papier, sont bien évidemment désignés pour la combustion afin de produire de la chaleur. Cette fin est également utilisée pour les boues primaires, cependant, il faut retirer l'eau présente en très grande quantité dans ces boues pour pouvoir les utiliser. Finalement, l'enfouissement est toujours présent, ce mode ayant permis la gestion de 33 %, soit donc 1 million de tonnes humides, de tous les résidus de l'industrie papetière. Le tableau 1.1 montre la proportion des types de résidus et le mode avec lequel ils ont été gérés en 2008 au Québec.



**Figure 1.2 :** Évolution de la gestion des boues d'épuration de fabriques de pâtes et papiers au Québec (MDDEP, 2008). Les masses sont en poids humide.

Une autre avenue de traitement des boues de papetières est la biométhanisation. Cette technique a été tentée dans quatre usines canadiennes, mais était en opération dans seulement deux de celles-ci en 2007, soit : The Lake Utopia Irving Mill et chez Tembec au Témiscaming. Chez Irving, la production de méthane est évaluée à 15,100 m<sup>3</sup>/jour (Elliott et Mahmood, 2007). En fait, si ce mode de gestion des boues a de la difficulté à s'implanter dans l'industrie papetière, c'est principalement à cause du temps de rétention très long que nécessite la biométhanisation des boues de papetières. Celle-ci nécessite entre 20 et 30 jours de rétention, ce qui demande de larges digesteurs anaérobies afin de contenir le volume de boue, ce qui rend l'opération coûteuse, peut-être trop par rapport au bénéfice obtenu par la production de méthane. Tel que revu par les auteurs (Elliott et Mahmood, 2007), divers prétraitements applicables à ce type de boue pourraient diminuer le temps de rétention à 7 jours.

**Tableau 1.1**  
Gestion des résidus de l'industrie des pâtes et papiers au Québec en 2008  
(MDDEP, 2008)

Matières résiduelles	Poids humide (tonnes)	Enfouissement (%)	Valorisation énergétique (%)	Compostage (%)	Valorisation agricole et sylvicole (%)	Autres modes (%)
Écorces, nœuds et résidus de bois	790 985	11,1	80,4	-	-	8,5
Rebuts de pâte, de papier et de carton	35 683	88,6	0,9	-	-	10,5
Cendres	285 484	85,4	-	7,6	5,8	1,2
Boues primaires	76 150	41,3	37,5	0,3	18,9	2,0
Boues biologiques	1 837	-	-	-	100,0	-
Boues de désencrage	192 318	4,3	73,7	2,1	13,3	6,6
Boues mélangées	1 459 450	26,3	40,3	1,0	27,8	4,6
Résidus alcalins	104 234	91,5	-	-	5,9	2,6
Autres types	141 068	96,4	0,5	-	-	3,1
<b>TOTAL</b>	<b>3 087 220</b>	<b>33,0</b>	<b>45,2</b>	<b>1,3</b>	<b>15,2</b>	<b>5,3</b>

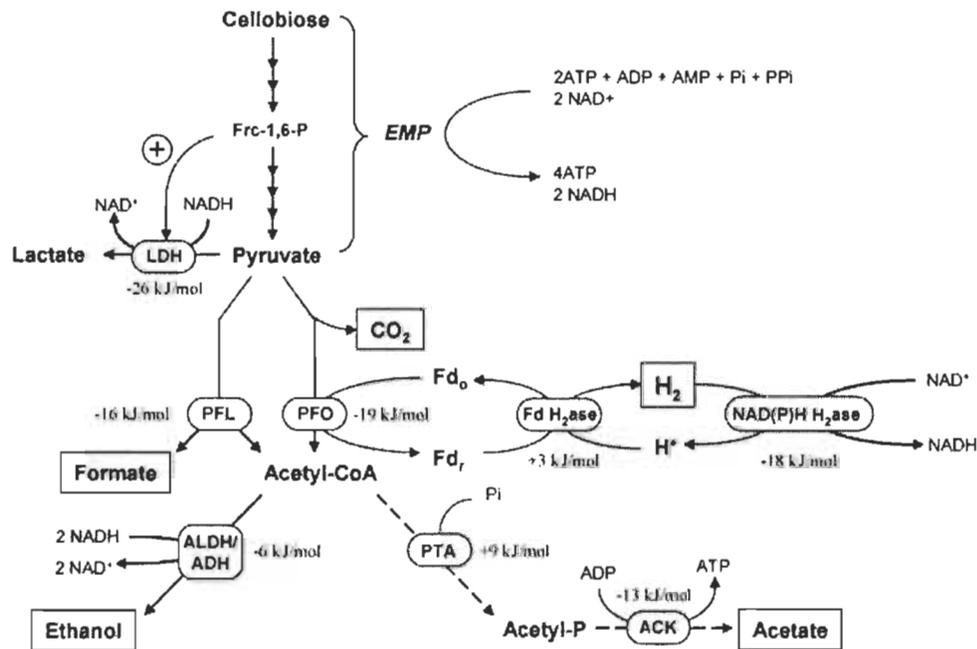
La biométhanisation montre tout de même que les boues de papetières sont une source de nutriment pouvant soutenir l'activité bactérienne. Une bonne partie de la matière organique des boues est composée de cellulose. Cette source de carbone est impossible à assimiler par les microorganismes. Celle-ci doit être hydrolysée par des enzymes, les cellulases, que devront produire les microorganismes pour pouvoir consommer les sucres ainsi produits. Afin de pouvoir exploiter le plein potentiel des boues en tant que milieu de culture, il faut donc une bactérie capable d'hydrolyser efficacement la cellulose.

#### 1.4 Le *C. thermocellum*, une bactérie productrice d'hydrogène

L'activité cellulolytique d'une bactérie anaérobie thermophile isolée a été décrite en 1948 par McBee (Mcbee, 1948). Les propriétés cellulolytiques et physiologiques de cette bactérie nommée *C. thermocellum* furent ensuite caractérisées (Ng et al., 1977). Le *C. thermocellum* est un membre de l'embranchement *Firmicutes*, a la forme d'un bâtonnet droit ou légèrement incurvé de 0,5 à 0,7 µm par 2,5 à 5,0 µm. Un spore ovale peut apparaître en position terminale. Cette bactérie thermophile croît de façon optimale à une température de 60 à 64 °C et est également anaérobie strict. Cette bactérie nécessite la présence de certaines vitamines essentielles afin de croître : la biotine, la pyridoxamine, la vitamine B<sub>12</sub> et l'acide *p*-aminobenzoïque. Ces éléments peuvent être utilisés afin de remplacer l'extrait de levure (Johnson et al., 1981).

L'utilisation d'une bactérie thermophile en fermentation a le désavantage de nécessiter une dépense d'énergie afin de garder le milieu à la température adéquate. Par contre, grâce à cette température élevée, la fermentation aura moins tendance à se contaminer (Demain et al., 2005). D'ailleurs, lors de la culture en continu faite par Magnusson et ses collègues (Magnusson et al., 2009) sur cellulose, aucun signe de contamination n'a été détecté après plus de 3 000 heures d'opération, puisqu'aucune accumulation de butyrate ou de méthane n'avait été détectée. Un autre avantage lié aux microorganismes thermophiles est la stabilité de leurs enzymes. L'éthanol et l'hydrogène sont des produits issus des voies métaboliques en anaérobie très convoités. L'éthanol est plus facile à retirer du milieu à des températures de fermentation près et au-dessus de la température d'évaporation de celui-ci. Cultiver un microorganisme thermophile est un avantage si l'éthanol est le produit désiré ou pour simplement le retirer du milieu afin de réduire les chances d'inhibition de croissance bactérienne. La nature anaérobie d'une culture de *C. thermocellum* permettrait d'économiser l'énergie nécessaire liée à l'aération du milieu à grande échelle. *C. thermocellum* ayant une activité cellulolytique et un bon taux de croissance sur cellulose en fait finalement un excellent candidat afin de produire les carburants éthanol (Lynd et Grethlein, 1987) et hydrogène (Levin et al., 2006) à partir de sources cellulosiques, et ce, en une seule étape.

Les produits de fermentation de *C. thermocellum* sont l'hydrogène, le gaz carbonique, l'acétate, le lactate, l'éthanol et le formate (Islam et al., 2006). L'intérêt porté pour ce microorganisme par la recherche a beaucoup porté sur sa capacité à produire de l'éthanol directement à partir de résidus cellulosiques. Le projet présenté ici porte plutôt sur la production d'hydrogène. Le profil du catabolisme du cellobiose par *C. thermocellum* a été déduit *in silico* et testé *in vitro* et est présenté à la figure 1.3 (Carere et al., 2008; Rydzak et al., 2009) Théoriquement, il serait possible pour cette bactérie de produire 4 molécules de H<sub>2</sub> par molécule de glucose si seulement de l'acétate et du gaz carbonique sont produits. Par contre, ce rendement n'est jamais atteint étant donné la présence de plusieurs voies cataboliques pouvant être utilisées. Les rendements moles de H<sub>2</sub>/moles de glucose obtenus dans la littérature sont résumés au tableau 1.2, selon la source utilisée de carbone.



**Figure 1.3 :** Catabolisme déduit du cellobiose par *C. thermocellum*. Les flèches pleines sont des voies vérifiées par l'analyse d'activité enzymatique, les flèches pointillées sont des voies déduites par la présence des enzymes dans le code génétique de *C. thermocellum*. Les enzymes sont : Lactate déshydrogénase (LDH), pyruvate:formate lyase (PFL), pyruvate ferredoxine oxidoréductase (PFO), acétaldéhyde déhydrogénase/alcool déhydrogénase (ALDH/ADH), phosphotransacetylase (PTA), acétate kinase (ACK), ferredoxine hydrogénase (Fd H<sub>2</sub>ase) et NAD(P)H hydrogénase (NAD(P)H H<sub>2</sub>ase) (Rydzak et al., 2009).

**Tableau 1.2**  
Rendement de fermentation en H<sub>2</sub> de *C. thermocellum*

Substrat	Rendement moles H <sub>2</sub> /moles glucose	références
Cellobiose (0,1 g/l)	1,21	(Islam et al., 2006)
Cellobiose (1,1 g/l)	1,08	(Islam et al., 2006)
Cellobiose (4,5 g/l)	0,97	(Islam et al., 2006)
Cellulose (1 g/l)	1,90 (20 heures de croissance)	(Islam et al., 2009)
Cellulose (5 g/l)	1,36 (15 heures de croissance)	(Islam et al., 2009)
Bois délignifiés (1,1 g/l)	1,47	(Levin et al., 2006)
Bois délignifiés (4,5 g/l)	0,99	(Levin et al., 2006)
Grains de distillerie (5,0 g/l)	1,27	(Magnusson et al., 2008)
Coquilles d'orge infectées par le « fusarium head blight » (5,0 g/l)	1,18	(Magnusson et al., 2008)
Coquilles d'orge (5,0 g/l)	1,24	(Magnusson et al., 2008)

Certains facteurs sont connus pour influencer la production d'hydrogène par la bactérie. Déjà, sa nature thermophile lui confère un avantage par rapport aux bactéries mésophiles (Hallenbeck, 2009). La température élevée du milieu favorise l'activation thermique des réactions biochimiques en plus de rendre la voie métabolique formant l'hydrogène plus favorable thermodynamiquement. Des rendements faibles en hydrogène produit par glucose peuvent, en partie, être expliqués par la pression partielle d'hydrogène qui s'accumule dans un environnement où les gaz ne peuvent s'échapper, comme ce qui se produirait dans une expérience en bouteille fermée hermétiquement. En effet, la quantité d'hydrogène dissous dans le milieu de culture influence la valeur

thermodynamique de la formation d'hydrogène par *C. thermocellum*. Si une voie n'est pas thermodynamiquement favorable par rapport aux autres voies, son activité sera diminuée par rapport aux autres (Lee et Zinder, 1988). Comme exemple, une culture de *C. thermocellum* sous une pression élevée avec une concentration d'hydrogène dissous plus élevée, a produit plus d'éthanol et moins d'acétate qu'une culture à pression normale. À 7 MPa, le ratio éthanol/acétate était près de 60 fois plus élevé que la culture à 0,1 MPa (Bothun et al., 2004). En co-culture avec un organisme méthanogène nécessitant de l'hydrogène pour sa chaîne catabolique, l'hydrogène produit par *C. thermocellum* ne pouvait pas s'accumuler dans le milieu, puisqu'il était aussitôt utilisé par le méthanogène. Le résultat fut une forte production d'acétate et une baisse de production d'éthanol (Weimer et Zeikus, 1977). Finalement, la production de tous les produits du métabolisme de *C. thermocellum* semble être régie par la thermodynamique plutôt qu'au niveau d'expression des enzymes du métabolisme (Rydzak et al., 2011). En présence de concentration élevée des produits du métabolisme, mais sous le niveau qui inhiberait la croissance de la bactérie, les différences d'activité des enzymes ne corrélaient pas nécessairement avec la production de métabolites. Sauf pour le formate et l'acétate, la présence de ces métabolites en excès a également montré une influence sur le taux de croissance de la bactérie. Le trait commun des métabolites ayant cet effet est qu'ils sont les accepteurs d'électron du NADH. Le NAD<sup>+</sup> étant nécessaire pour la glycolyse, un niveau moindre de sa disponibilité entraînerait une baisse de l'activité de la glycolyse, donc une baisse du taux de croissance.

L'hydrogène fait partie des candidats pouvant contribuer à réduire la consommation de carburants fossiles. Pourtant, l'hydrogène n'est pas une source d'énergie, c'est plutôt un réservoir d'énergie. Contrairement aux sources d'énergie fossiles, il n'est pas possible de puiser une source d'hydrogène directement utilisable à des fins énergétiques. Il faut donc fournir de l'énergie afin de produire de l'hydrogène, comme ce qui se produit avec l'électrolyse de l'eau. Cette molécule peut tout de même contenir beaucoup d'énergie par rapport à son poids, ayant une valeur calorifique de 142,18 kJ/g, ce qui est nettement plus élevée que d'autres types de combustibles courants tels ceux présentés au tableau 1.3. Une approche alternative afin de produire de

l'hydrogène est de profiter de l'énergie contenue dans la biomasse par fermentation, tel que présenté ici.

**Tableau 1.3**

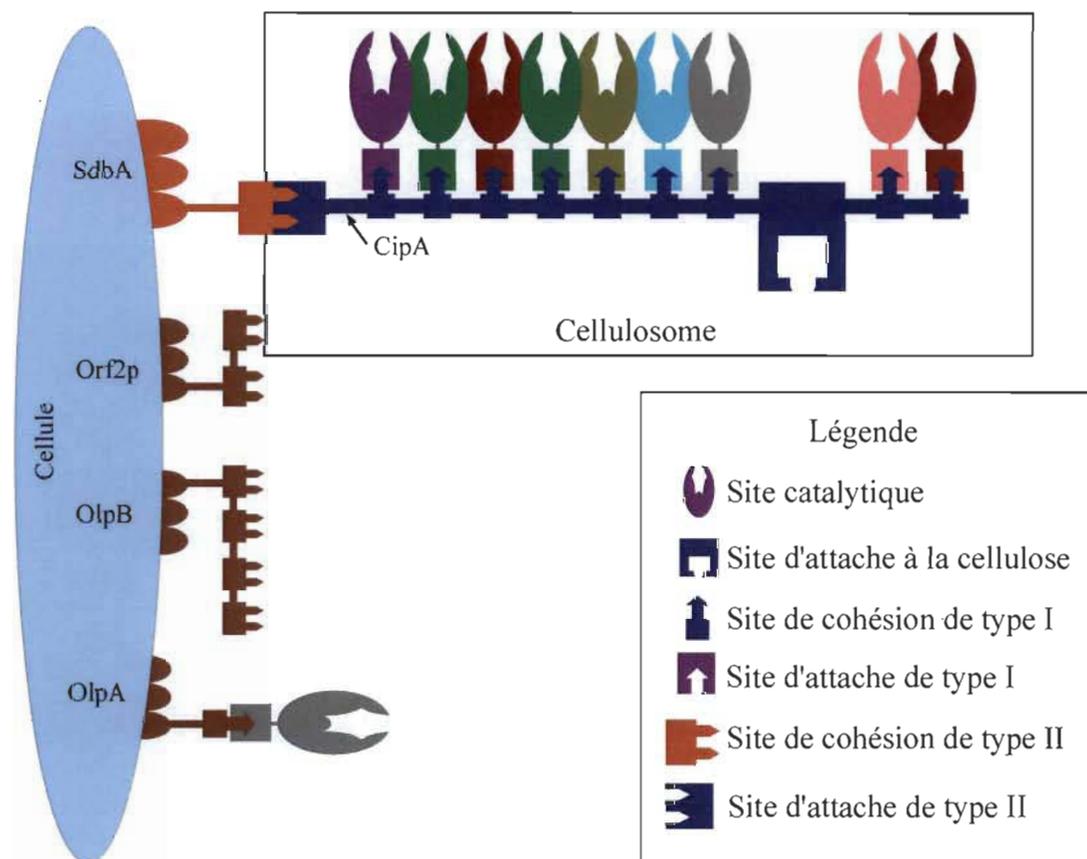
Valeurs calorifiques de combustibles à température de 25 °C à 1 atm (DOE, 2008)

Combustible	Valeur calorifique brute (kJ/g)
Hydrogène	142,18
Gaz naturel	52,23
Propane	50,23
Gazoline	46,54
Diesel faible en soufre	45,58
Éthanol	29,85
Méthanol	22,88

### 1.5 Le cellulosome et les applications industrielles des cellulases

Le cellulosome est la machinerie enzymatique qui permet au *C. thermocellum* de dépolymériser la cellulose. Il a longtemps été pensé que plusieurs types de cellulases libres travaillaient en concert pour pouvoir dépolymériser les structures de celluloses. C'est d'ailleurs le cas pour plusieurs microorganismes aérobies. Le cellulosome est, quant à lui, un complexe d'enzymes liées ensemble (Bayer et al., 1998). L'ensemble est premièrement constitué d'un des modules d'encrage à la paroi cellulaire, appelés OlpA, OlpB, Orf2p et SdbA. Le site SLH « S-layer homologous domain » est placé en C-terminal de ces protéines. OlpB, Orf2p et SdbA sont également équipés de sites de cohésion de type II, auxquels se lieront les cellulosomes avec leur site d'attache de type II.

Le cellulosome présente une protéine de haut poids moléculaire, le CipA pour « Cellulosome-integrating protein ». C'est cette protéine qui possède le site d'attache de type-II. Elle possède également un domaine de liaison à la cellulose (CBD) et neuf domaines de cohésion de type-I. Ces neuf domaines permettront l'attache des protéines enzymatiques telles que les exoglucanases, endoglucanases, xylanases, xyloglucanases et autres (Gold et Martin, 2007). Ces enzymes ont un point en commun, un site d'attache de type-1 (Doc1) qui permet l'attache à CipA. Dans le code génétique du *C. thermocellum*, il y a plus de soixante cadres de lecture comprenant un site Doc1, donc autant de protéines possibles pouvant interagir avec CipA. Le cellulosome est donc un ensemble très diversifié de protéines enzymatiques. Il a été démontré que la fréquence de chaque type d'enzyme présente dans les cellulosomes varie selon la source de carbone présente dans le milieu (Gold et Martin, 2007).



**Figure 1.4 :** Représentation schématique du cellulosome (Bayer et al., 1998).

La synthèse des cellulosomes semble être contrainte par une régulation de répression catabolique. En effet, lorsque *C. thermocellum* est en culture avec du cellobiose, il produit neuf fois moins de cellulosomes que lorsqu'il est en culture avec la forme cristalline Avicel® de la cellulose. La répression par le cellobiose serait tel que la production de milligrammes de cellulases par grammes de cellules passerait de 173 mg/g dans une concentration de moins de 0,11 g/l de cellobiose à 27 mg/g dans une concentration de plus de 0,2 g/l de cellobiose (Zhang et al., 2005). Les différentes formes de celluloses n'induisent pas la même réponse en activité enzymatique de la part du *C. thermocellum* (Ng et al., 1977). Une autre voie de régulation a été proposée, via un facteur  $\sigma$  (Nataf et al., 2010). Le mécanisme impliquerait une protéine transmembranaire Rsgl/Rsi24C. Celle-ci possède, du côté extracellulaire, un module qui interagit avec les différents polysaccharides de plante. Les domaines CBM3 et GH5 visant la cellulose, GH10 le xylane et la cellulose, CBM42 l'arabinoxylane et PA14 la pectine. Lorsque la protéine Rsgl/Rsi24C est activée par l'interaction avec le polysaccharide, celle-ci libère le facteur  $\sigma$  qui interagit avec l'ARN polymérase et les régions promotrices sur l'ADN et commande la transcription des gènes du cellulosome. Ce mécanisme a été démontré avec le gène de *CelS*, soit l'exoglucanase étant l'enzyme la plus abondante sur le cellulosome.

Le cellulosome du *C. thermocellum* a la capacité de dégrader la cellulose micro-cristalline tels le coton et l'Avicel® avec une grande efficacité. Son activité n'est pas inhibée par la présence de cellobiose, c'est-à-dire le produit de la dépolymérisation de la cellulose (Demain et al., 2005). Ceci est un avantage intéressant, puisque l'accumulation de glucose et de cellobiose est un inhibiteur majeur de certaines cellulases (Hodge et al., 2008). Une cellulase pouvant être inhibée par son produit restreint la concentration de substrat cellulosique pouvant être fractionné dans un réacteur, ce qui influencera la quantité d'eau et la taille des réacteurs. Même si le *C. thermocellum* est une bactérie anaérobie stricte, l'activité du cellulosome n'est pas affectée par la présence d'oxygène sur une courte période de temps. Par contre, au-delà de 24 heures, l'activité cellulolytique sera arrêtée si l'enzyme n'est pas en présence d'agent réducteur (Johnson et al., 1982). Des agents oxydants peuvent inhiber les

cellulases du cellulosome. Les agents réducteurs tels le dithiothreitol (DTT), la cystéine, le dithionite de sodium, le glutathion ou le mercaptoéthanol protègent l'activité du cellulosome. Le pH optimum pour l'activité endo et exoglucanase est entre 5,2 et 5,4 et baisse de 60 à 80 % à pH de 7. Pour ce qui est de la température, l'activité est optimale entre 62 et 65°C. L'enzyme reste tout de même stable pour 45 minutes à 70°C et est complètement dénaturée après 10 minutes à 90°C (Ng et al., 1977). La présence de Ca<sup>+</sup> est nécessaire au bon fonctionnement du cellulosome. En milieu réduit et en présence de Ca<sup>+</sup>, le coton, l'Avicel® et le papier filtre sont complètement solubilisés. Le cellulosome est une composante ancrée à la membrane cellulaire du *C. thermocellum* et à la cellulose durant le début de la phase exponentielle de croissance microbienne. Environ la moitié de l'activité cellulolytique se retrouve libre dans le surnageant à la fin de la phase exponentielle de croissance et lorsque la cellulose est complètement hydrolysée (Zhang et al., 2005). Lorsque les cellulosomes libres du bouillon fermenté sont récoltés du milieu de culture, ils gardent leur activité enzymatique pour au moins un mois, lorsque conservés à 4°C, ou pour au moins 4 mois à -20°C (Johnson et al., 1982).

Plusieurs méthodes sont répertoriées dans la littérature afin de mesurer l'activité enzymatique des cellulases, ce qui rend la comparaison des données difficile. Une première est la mesure du poids sec de celluloses avant et après incubation avec une solution contenant les cellulases. La mesure de la turbidité à 660 nm d'une suspension de cellulose est également employée, cette turbidité diminue à mesure que la cellulose est hydrolysée. D'autres évaluent l'activité en mesurant la quantité d'extrémités réductrices de glucose libérées par l'hydrolyse de la cellulose. En plus de rencontrer différentes méthodes, la nature du substrat utilisé pour chacune d'elles diffère. En effet, la cellulose se présente sous différentes formes cristallines, ce qui influence l'activité des cellulases. Les sources de cellulose de référence généralement utilisées sont l'Avicel® et le papier filtre. La carboxyméthyle cellulose (CMC) peut également être utilisée comme substrat, ayant l'avantage d'être soluble, donc répartie de manière plus uniforme dans la solution. Par contre, l'activité mesurée avec ce substrat ne correspond pas à celle retrouvée sur les substrats naturels de cellulose. Le pH auquel sont fait les tests varie également d'un

article à l'autre. Le tableau 1.4 montre les mesures données par certains auteurs ainsi que les méthodes utilisées.

**Tableau 1.4**  
Activité cellulolytique de *C. thermocellum*

Source des enzymes	Substrat des cellulosomes et méthodes.	Activité	Références
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405, cellulases purifiées	• Avicel PH-105, mesure des sucres avec la méthode phénol-acide sulfurique.	$2,3 \pm 0,053 \mu\text{mol équivalent glucose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg}_{\text{pro}})^{-1}$	(Zhang et Lynd, 2003)
<i>C. thermocellum</i> JW20 (ATCC 31549), surnageant de culture	• CMC, mesure des sucres réducteurs avec l'acide dinitrosalicylique. • Papier filtre (Macherey MN-214), mesure des sucres réducteurs avec l'acide dinitrosalicylique.	$2,5 \text{ à } 4,5 \mu\text{mol SRF}^* \cdot (\text{min} \cdot \text{ml}_{\text{sc}}^{**})^{-1}$ $1,0 \text{ à } 1,8 \mu\text{mol SRF} \cdot (\text{min} \cdot \text{ml}_{\text{sc}})^{-1}$	(Freier et al., 1988)
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	• Avicel, mesure de la turbidité.	$10,2 \text{ à } 12,2 \text{ nmol de cellobiose} \cdot (\text{min} \cdot \text{ml})^{-1}$	(Johnson et al., 1985)
<i>C. thermocellum</i> N1, surnageant de culture	• Avicel, mesure des sucres réducteurs avec le réactif au cuivre. • CMC, mesure des sucres réducteurs avec l'acide dinitrosalicylique.	$3,6 \mu\text{mol SRF} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{mg}_{\text{pro}}^{***})^{-1}$ $1,5 \mu\text{mol SRF} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg}_{\text{pro}})^{-1}$	(Ng et al., 1977)

\* SRF : sucres réducteurs formés

\*\* ml<sub>sc</sub> : ml de surnageant de culture

\*\*\* mg<sub>pro</sub> : mg de protéine

Les enzymes, en général, permettent de réaliser des réactions sans l'ajout de grande quantité de produits chimiques. Ces réactions enzymatiques se font dans des conditions proches de celles retrouvées chez le vivant. Il y donc économie d'énergie et de réactifs chimiques. Les enzymes agissent comme catalyseurs, de petites quantités d'enzymes et d'eau suffisent afin de réaliser une réaction. Elles sont également biodégradables et spécifiques à leur substrat. Les cellulases sont des enzymes ayant une grande valeur pour

diverses industries. Par exemple, l'utilisation de cellulases dans l'industrie des pâtes et papiers est souvent associée à une économie d'énergie lors des traitements mécaniques et d'un drainage de l'eau de la pâte plus efficace. Les enzymes cellulolytiques ont montré qu'elles facilitent l'extraction de la lignine des pâtes Kraft, ce qui réduit la quantité nécessaire de produits de blanchiment. Les cellulases pourraient également faciliter le désencrage des fibres de papiers recyclés. Les cellulases ont également montré leur potentiel dans d'autres industries, par exemple (Bhat, 2000) :

- Alimentaire : Extraction et clarification des jus de légumes et fruits.
- Alimentation animale : Augmenter la valeur nutritionnelle en brisant la coquille des graines et en hydrolysant partiellement les parties lignocellulosiques.
- Textile : Adoucir la texture du coton du denim. Effet du « Stone-wash jeans ».

Les enzymes produites par les organismes thermophiles ont des propriétés recherchées par le milieu industriel. Souvent, ces protéines sont thermostables, sont capables de résister plus longtemps à l'entreposage et le fait de travailler sous haute température réduit les chances de contamination microbienne (Turner et al., 2007). Un bon exemple de l'utilisation d'une enzyme thermostable est celle de la *Taq*-polymérase pour l'amplification de l'ADN.

La bactérie *C. thermocellum* a montré sa capacité à produire deux sources d'énergie, l'hydrogène et l'éthanol, ainsi qu'un assemblage d'enzymes thermostables qui serait utile pour l'industrie, le cellulosome. Il a été démontré qu'il est possible de cultiver le *C. thermocellum* dans les boues de papetière (Chinn et al., 2006). Cependant, il existe plusieurs types de boues qui dépendent de plusieurs types de production, ayant toutes des caractéristiques différentes en concentration et composition de nutriments. Cela peut influencer la production d'enzyme et d'hydrogène. Aussi, il y a très peu d'information sur le rendement de production d'hydrogène par le *C. thermocellum* ainsi que sur l'activité enzymatique générée par cette bactérie dans ces substrats. Il serait donc intéressant d'évaluer la capacité de réaliser ces produits dans les boues de papetières et d'apporter une nouvelle voie de valorisation de ces déchets.

## CHAPITRE II

### OBJECTIFS DU PROJET

#### 2.1 But du projet

Les papetières du Québec doivent obligatoirement traiter leurs eaux usées, afin de réduire leur empreinte écologique. Ces traitements génèrent des boues dont les coûts de gestion sont importants. De plus en plus, des stratégies de réutilisation et de transformation des boues de papetières sont mises à profit : celles-ci deviennent des sources d'énergie, servent à l'épandage dans les champs ou au compostage.

Le projet, dans son ensemble, a pour but d'offrir une nouvelle approche biologique de traitement et de valorisation des boues, dont les produits de fermentation seront utiles. La partie de ce projet présentée ici consiste à démontrer la possibilité d'utiliser certains types de boue d'épuration de l'industrie papetière en tant que substrat de fermentation, de mesurer les métabolites produits et l'activité cellulolytique du surnageant de culture. Puisqu'il y a plusieurs types de boues de papetières, un criblage de certaines de celles-ci permettra de sélectionner un milieu de culture alternatif pour la culture du *C. thermocellum*. La production d'enzymes cellulolytiques et d'hydrogène avec cette culture offrira une voie de valorisation innovatrice de ces déchets et surtout attrayante pour les papetières.

#### 2.2 Hypothèses

Selon la revue de littérature présentée en introduction, des hypothèses ont été posées. Elles sont décrites dans les prochaines sections.

### 2.2.1 Les boues en tant que milieu de culture

*Hypothèse 1 : Certains types de boue de papetière utilisés en tant que milieu de culture alternatif permettent la croissance de la bactérie C. thermocellum.*

Les boues de papetières sont une source importante de cellulose, ce qui fournira à la bactérie *C. thermocellum* une source de carbone. Cependant, la croissance de cette bactérie nécessite la présence de vitamines, dont l'acide para-aminobenzoïque, la biotine, la vitamine B12 et la pyridoxamine, qui ne sont peut-être pas présentes dans les boues. Il est également possible que des éléments toxiques présents dans les boues nuisent à la croissance de la bactérie, ou que la cellulose ne soit pas accessible par les cellulases. Il existe également plusieurs types de boues qui devront être testés, soit : les boues primaires, secondaires et mixtes. Les milieux contenant les boues devront être comparés avec un milieu synthétique afin d'évaluer la croissance de *C. thermocellum* entre les milieux. Le milieu supportant le mieux la croissance du microorganisme sera choisi pour la suite des expériences.

### 2.2.2 La production d'hydrogène

*Hypothèse 2 : Le ratio de production d'hydrogène par glucose consommé sera équivalent à la littérature s'il y a croissance de la bactérie en utilisant les boues de papetières comme substrat.*

Le *C. thermocellum* possède plus d'une voies métaboliques du cellobiose et celles-ci ne résultent pas toutes par la production d'hydrogène. Certaines voies cataboliques seront peut-être favorisées selon les conditions de culture et les éléments présents dans les boues. Le ratio de production de mole d'hydrogène par mole de glucose devrait être équivalent à celui d'un milieu synthétique contenant de la cellulose et à ceux trouvés dans la littérature, soit donc de 0,8 à 2,0.

### 2.2.3 L'activité cellulolytique

*Hypothèse 3 : Dans une culture en mode discontinu, il y aura une plus grande activité cellulolytique dans le surnageant vers la fin de la phase exponentielle de croissance.*

Les cellulosomes s'accumulent dans le surnageant à mesure que la bactérie entre vers la fin du cycle de croissance cellulaire, soit en fin de phase exponentielle et après. Une culture discontinuée par alimentation unique permettra de voir toutes les phases de croissance de la bactérie par la quantité finie de carbone, donc d'amener la culture en fin de phase exponentielle. L'activité enzymatique du surnageant sera plus grande lorsque la culture entrera en fin de la phase exponentielle.

*Hypothèse 4 : Il y aura diminution de la concentration en M.E.S. dans les boues de papeteries inoculées avec la bactérie *C. thermocellum*.*

Puisque la cellulose résiduelle représente une grande partie des M.E.S. présentes dans les boues d'épuration de papeteries, celles-ci seront dépolymérisées par les cellulases de *C. thermocellum*. Ce qui fera diminuer la concentration en M.E.S.

### 2.2.4 Production simultanée d'hydrogène et de cellulase

*Hypothèse 5 : Une culture en mode discontinu permettra l'obtention d'hydrogène et de cellulases en utilisant les boues de papeteries comme milieu de culture.*

La vérification de cette hypothèse permettra d'établir s'il y a un moment où la production d'hydrogène et l'activité cellulolytique dans le surnageant atteignent un sommet durant la période de fermentation. Une stratégie de production de type discontinu pourra alors être élaborée en soutirant une partie du bouillon fermenté riche en cellulases en plus de pouvoir bénéficier de la production d'hydrogène.

### 2.3 Objectifs

Afin d'atteindre le but du projet et de vérifier les hypothèses, les objectifs de travail suivants ont été fixés :

1. Mesurer la croissance de la bactérie *C. thermocellum* en tube et en bouteille dans le milieu synthétique.
2. Identifier un type de boue permettant la croissance de la bactérie *C. thermocellum*.
3. Mesurer la production d'hydrogène par rapport aux autres produits de fermentation par la bactérie dans les différents types de milieu.
4. Mesurer l'activité cellulolytique du surnageant avec les différents types de boues.
5. Mesurer l'évolution des matières en suspension provenant des boues en présence de la bactérie *C. thermocellum*.
6. Évaluer le rendement de production d'hydrogène et l'activité des cellulases du *C. thermocellum* en utilisant les boues de papetières comme milieu de culture.

## CHAPITRE III

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

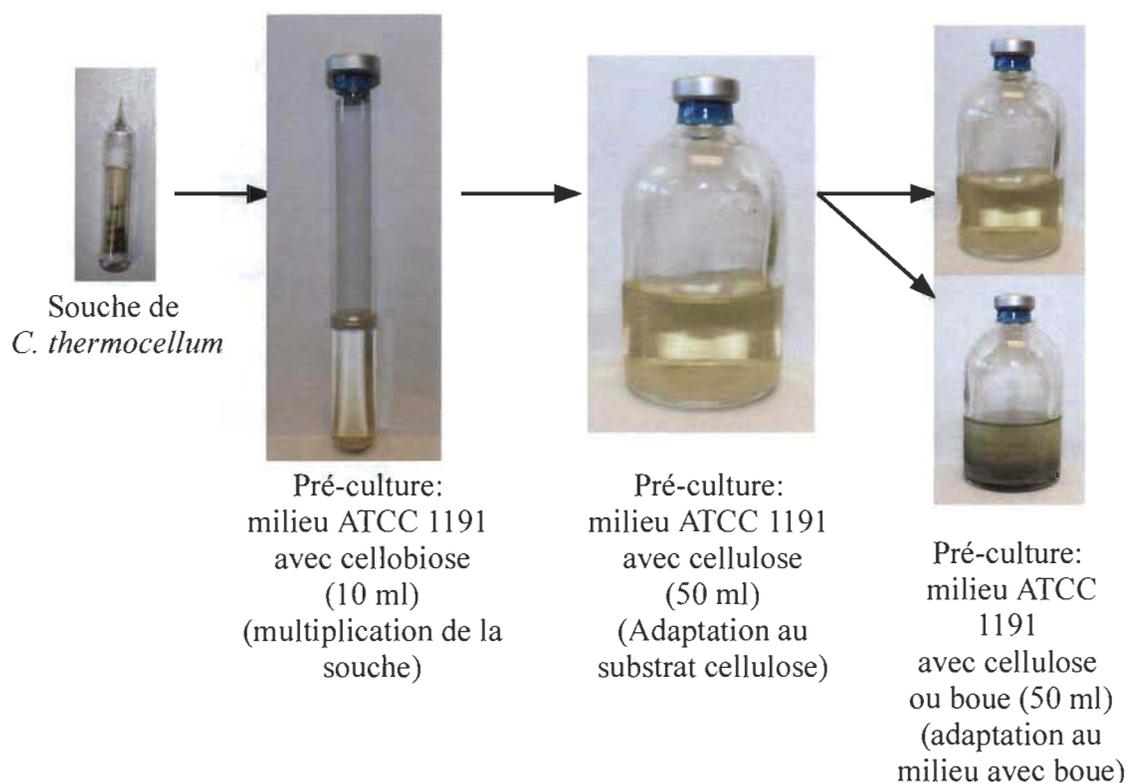
#### 3.1 Plan expérimental

Le choix du *C. thermocellum* a été fait parce que ce microorganisme est un des plus efficaces pour dépolymériser la cellulose dans ces formes amorphes et cristallines. Aussi, son code génétique étant connu, il est un bon organisme modèle. Ses voies métaboliques ont été étudiées, il est donc plus facile de faire des bilans stœchiométriques avec les métabolites produits afin de vérifier les résultats.

Le plan expérimental choisi devait respecter certaines conditions afin de vérifier les hypothèses. Premièrement, le milieu de culture doit contenir tous les éléments nécessaires à la croissance de *C. thermocellum*. C'est pourquoi le milieu de culture synthétique ATCC 1191 a été choisi. Les constituants de ce milieu sont présentés en annexe. Les boues seront mélangées au milieu de culture synthétique ATCC 1191 ne contenant pas de source de carbone. Les résultats obtenus avec ce milieu semi-synthétique sont comparés avec le milieu ATCC 1191 contenant de la cellulose, qui servira comme milieu témoin. Il est également possible, avec cette comparaison, d'identifier s'il y a influence des boues sur la production des métabolites de la bactérie.

Afin de garder le milieu en anaérobie et de pouvoir mesurer la production de gaz de fermentation, le contenant du milieu de culture devait être étanche, mais le milieu devait tout de même être accessible. C'est pourquoi les bouteilles à sérum fermées avec un septum de caoutchouc butyle ont été utilisées. L'expérience a débuté par la culture de la bactérie souche dans le milieu ATCC 1191 contenant du cellobiose. Ce milieu contient un sucre utilisable immédiatement par la bactérie afin de faciliter la croissance de la souche. De cette culture, 10 % (volume transféré/volume du milieu récepteur) a ensuite été transférée dans le milieu ATCC contenant de la cellulose. Ce milieu permet à la

bactérie de s'adapter à son nouveau substrat : la cellulose. Cette cellulose n'étant pas directement utilisable par la bactérie, elle doit produire des cellulosomes afin de l'hydrolyser. Lorsque la bactérie s'est adaptée et a débuté sa croissance, elle a ensuite été transférée au milieu dans lequel l'expérience a été réalisée : soit le milieu synthétique ou le milieu avec boue. Ces étapes sont illustrées à la figure 3.1.



**Figure 3.1 :** Étapes avant l'inoculation des milieux synthétiques et semi-synthétiques avec boues.

L'expérience s'est étalée ensuite sur 5 jours. Lors de l'inoculation, la préculture contenant un type de source de cellulose a été transférée, toujours à 10 % v/v, dans les bouteilles contenant le même type de substrat. Ainsi, il a été possible de prendre des bouteilles échantillons tous les jours pour chaque type de substrat, soit donc tout de suite après l'inoculation et aux 24 heures, jusqu'à 5 jours. Avec chaque bouteille ainsi sacrifiée, ces manipulations pouvaient être effectuées :

1. Mesure des gaz produits (chromatographe gazeux)
2. 1 ml du milieu pour la centrifugation :
  - a) Surnagent : mesure de l'activité cellulolytique.
  - b) Culot : mesure de la concentration en protéines particulières.
3. 1 ml du milieu pour la mesure des concentrations d'acétate, de lactate et de formate (chromatographe ionique).
4. 1 ml du milieu pour la mesure de la concentration de l'éthanol.
5. 20 ml pour les essais de solides totaux, matières volatiles totales, matières inorganiques totales.
6. 20 ml pour les essais de matières en suspension, matières volatiles en suspension et matières inorganiques en suspension.

Il faut également ajouter d'autres bouteilles pour chaque substrat, afin d'effectuer les manipulations mentionnées avant l'inoculation et d'autres qui ne seront pas inoculées, mais qui auront passé les 5 jours dans l'incubateur. Ces bouteilles ont été également testées afin d'évaluer si la température d'incubation et l'agitation ont modifié les paramètres du milieu. Elles agissent donc comme blanc.

### **3.2 Provenance des produits chimiques**

Sauf si une autre source est décrite dans ce travail, les produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Ontario) et Fisher Scientific (Ottawa, Ontario). Les gaz ont été achetés chez Praxair (Trois-Rivières, Québec).

### **3.3 Échantillonnage des boues**

Les boues ont été échantillonnées à l'usine Kruger Crabtree inc. Cette usine utilise le procédé de désencrage de papier recyclé afin de produire des papiers hygiéniques. Le choix de cette usine a été fait puisque la production y est constante, elle ne fait que ce type de production et obtient la fibre de cellulose à partir de fibres recyclées. De plus, ce type d'usine sera fonctionnelle pendant plusieurs années, car le marché des papiers hygiéniques sera présent encore longtemps. Le traitement des eaux usées se fait

premièrement par décantation primaire et ensuite le traitement continu dans un réacteur biologique. Cette usine accepte les eaux usées de la municipalité de Crabtree, qui sont ajoutées au traitement biologique (secondaire). Les boues générées sont donc de catégorie primaire, secondaire, mixte (primaire et biologique) et de désencrage.

L'échantillonnage des boues primaires a été fait directement à la sortie du décanteur primaire. Celui-ci fonctionne en soutirant en continu le fond du bassin de décantation. Il n'y a donc pas de temps de résidence des boues dans le bassin. Il n'y a également pas d'ajout de coagulant avant le point d'échantillonnage. Les boues secondaires ont été échantillonnées à l'endroit où les boues sont recyclées, c'est-à-dire la partie des boues qui sont retournées au bassin de traitement biologique afin de garder une quantité de bactéries actives. Les boues mixtes ont été collectées après la coagulation et l'essorage. Les échantillons ont été conservés en chambre froide à 4 °C dans des contenants de type bidon d'essence pour un maximum de 2 semaines.

### 3.4 Source du *C. thermocellum* et caractéristiques

La bactérie *C. thermocellum* provient d'une lignée cellulaire type. Cette lignée est fournie par « German Collection of Microorganisms and Cell Cultures » et est identifiée *C. thermocellum* DSMZ 1237. Les critères qui détermineront la pureté de la culture sont (De Vos et al., 2009; Islam et al., 2006) :

- Croissance avec la cellulose comme substrat.
- Dépolymérisation de la cellulose.
- Pas de croissance à 37 °C.
- La description microscopique est un bâtonnet légèrement incurvé, de 0,5-0,7 µm de large et 2,5-5,0 µm de long. La présence d'un spore ovale et terminal est possible.
- Présence d'un pigment jaunâtre lorsqu'elle croît en présence de cellulose.
- Aucune croissance en aérobie à 60 °C.
- Production des gaz H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> uniquement. Absence de CH<sub>4</sub> et CO.

- Production d'acétate, formate, lactate et éthanol. Absence de pyruvate et butyrate ou autres métabolites d'organisme anaérobie.

### 3.5 Milieux de culture synthétique et semi-synthétique

Le milieu de culture synthétique utilisé est celui proposé par « American Type Culture Collection » (ATCC) pour la culture de *C. thermocellum* : le milieu ATCC 1191 auquel est ajoutée de la cellulose plutôt que du glucose (Annexe A). La concentration de cellulose est de 5 g/l. Cette concentration est choisie afin de comparer les résultats avec ceux d'autres expériences. Pour les milieux semi-synthétiques avec boue, le milieu ATCC 1191 est utilisé, mais le glucose est remplacé par 5 g/l de boue sèche. De ces milieux, 50 ml sont versés dans des bouteilles à sérum Wheaton de 100 ml. La bouteille est fermée étanche avec un bouchon en caoutchouc butyle maintenu en place par une bague en aluminium. Le milieu est dégazé par vide et gazé à l'azote quatre fois, en terminant par l'azote avec une surpression d'entre 5 et 10 psi. Le milieu est ensuite réduit avec 0,5 ml d'une solution  $\text{Na}_2\text{S}$  200 mmol. Les bouteilles sont finalement stérilisées à l'autoclave 15 minutes à 121,5 °C (Daniels et al., 1986). Cette méthode est déjà utilisée pour la culture de *C. thermocellum* (Islam et al., 2006).

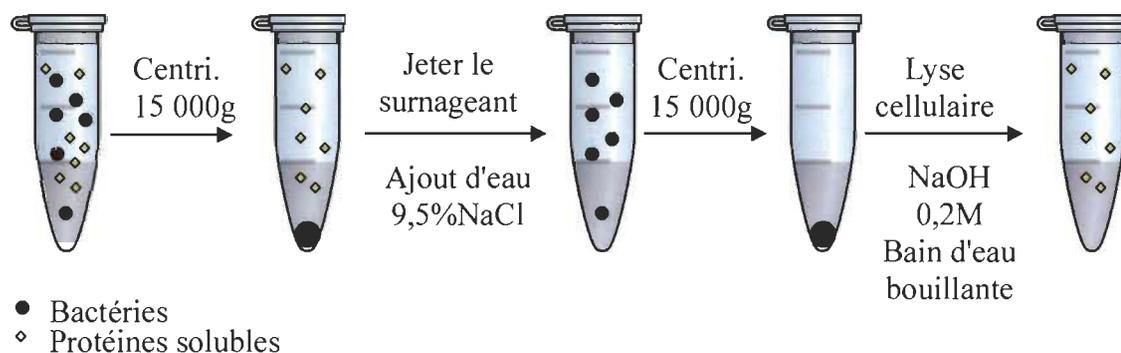
### 3.6 Solides totaux et en suspension

Les tests de solides totaux (S.T.), matières volatiles totales, matières minérales totales, matières en suspension (M.E.S.), matières volatiles en suspension (M.V.E.S.) et matières minérales en suspension (M.M.E.S.) sont effectués selon la méthode standard (APHA, 2005). Par contre, puisque le volume de bouillon fermenté est limité dans les bouteilles, 20 ml sont utilisés pour le test de S.T. et 20 ml pour les M.E.S.

### 3.7 Évaluation de la croissance bactérienne

Puisque la bactérie *C. thermocellum* a tendance à s'attacher à la cellulose, le décompte sur boîte de Pétri aurait pu être faussé. C'est pourquoi l'évaluation de la concentration de protéines particulières est utilisée. Pour ce faire (voir figure 3.2), un

échantillon de 1 ml du bouillon fermenté est d'abord centrifugé à 15 000 g pour 10 min dans des tubes à centrifugation 1,5 ml pour précipiter les bactéries, le surnageant étant séparé. Le culot est resuspendu dans une solution 9,5 % NaCl puis centrifugé à nouveau à 15 000 g pour 10 min dans des tubes à centrifugation 1,5 ml pour rejeter le surnageant. Ce lavage est répété une deuxième fois, afin de bien retirer toutes protéines solubles qui pourraient être présentes dans le milieu. Le culot est finalement resuspendu dans une solution NaOH 0,2 M et placé dans un bain d'eau bouillante pour 10 min. Ceci fait la lyse des cellules, libérant les protéines cellulaires (Sparling et al., 2006). Suite à une dernière centrifugation à 15 000 g pour 10 min dans des tubes à centrifugation 1,5 ml, la concentration de protéines est ensuite mesurée par colorimétrie avec le réactif de Bradford (Sigma-Aldrich, article no. B6916). Le protocole afin d'utiliser le réactif de Bradford est fourni par le fabricant. La mesure de l'absorbance est prise avec un spectrophotomètre UV-visible Varian Cary 50 bio. Ces manipulations libèreront également d'autres protéines insolubles qui seront mesurées avec le réactif de Bradford. Il ne sera donc pas uniquement question de protéines cellulaires avec cette analyse, c'est pourquoi dans ce texte, il sera question de protéines particulières.



**Figure 3.2 :** Concentration de protéines particulières : séparation des protéines solubles du milieu et lyse cellulaire.

### **3.8 Analyse des gaz**

Les concentrations de gaz produits par la fermentation sont déterminées par chromatographie gazeuse. Les gaz mesurés sont l'hydrogène, l'oxygène, le méthane, le monoxyde de carbone et le dioxyde de carbone se trouvant dans l'espace gazeux au-dessus du milieu de culture. L'appareil utilisé est un chromatographe en phase gazeuse SRI ayant deux colonnes : un tamis moléculaire 13× de 6 pieds de longueur et un gel de silice de 6 pieds de longueur. Les détecteurs sont à conductivité thermique (TCD) et à ionisation d'hélium (HID). Le gaz de transport est l'hélium.

### **3.9 Analyse des métabolites : acétate, formate, lactate**

Les concentrations d'acétate, de formate et de lactate sont déterminées par chromatographie ionique avec l'appareil ICS-5000 de Dionex. La colonne utilisée est l'IonPack AS11-HC. L'échantillon de 1 ml du surnageant utilisé est d'abord centrifugé à 15 000 g durant 10 min dans des tubes à centrifugation 1,5 ml afin de retirer les matières en suspension et les bactéries (Dionex, 2007).

### **3.10 Analyse des métabolites : éthanol**

La concentration en éthanol est mesurée avec le kit enzymatique : Ethanol UV-Test Enzymatic Bioanalysis, fournit par R-Biopharm section Amérique nord-ouest, États-Unis. Ici aussi, l'échantillon utilisé est centrifugé à 15 000 g durant 10 min dans des tubes à centrifugation 1,5 ml pour retirer les M.E.S. et les bactéries. Tel que décrit dans le protocole fourni avec le kit, l'échantillon est placé dans un bain d'eau bouillante avant l'analyse afin de désactiver les enzymes présentes dans le milieu de culture qui pourraient nuire aux enzymes du kit.

### **3.11 Activité enzymatique du surnageant**

Le protocole utilisé pour évaluer l'activité enzymatique du surnageant est celui de la compagnie Genencor avec des modifications mineures. Il s'agit de prendre un

échantillon du surnageant et de faire une centrifugation à 15 000 g pour 10 min dans des tubes à centrifugation 1,5 ml afin de retirer les bactéries et les fibres de cellulose qui sont déjà présentes dans le milieu. Cet échantillon (0,5 ml) est mélangé à une solution (4,5 ml) contenant 2 % de carboxy-métyl cellulose (CMC) et un tampon acétate ajusté à pH 5 (König et al., 2002). Les enzymes présentes dans le milieu hydrolyseront la CMC, ce qui générera des extrémités réductrices de glucose libres. Du mélange surnageant-CMC est retiré toutes les 10 min un échantillon (1 ml) testé avec une solution à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3 ml) pour évaluer la concentration en extrémités réductrices (Miller, 1959). Le blanc correspond à la mesure obtenue pour le temps 0. La courbe de calibration pour l'acide 3,5-dinitrosalicylique a été faite avec du glucose. Le spectrophotomètre utilisé est un UV-visible Varian Cary 50 bio. Les unités de l'activité CMC-ase du surnageant sont :

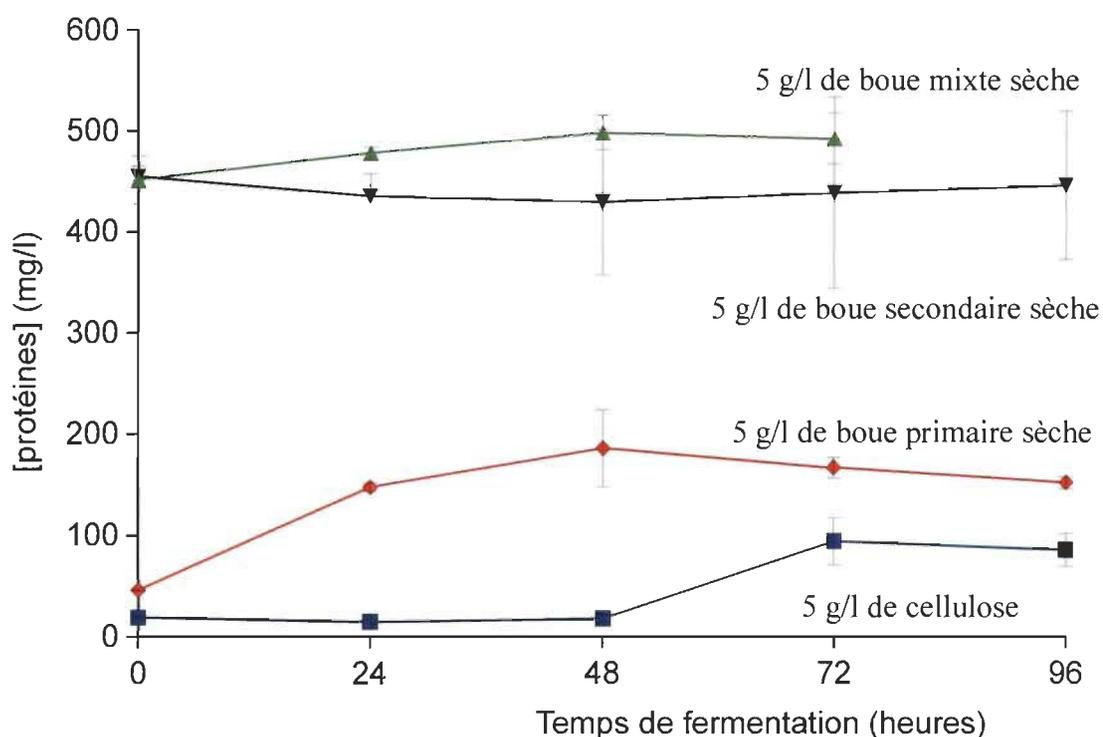
$$\frac{\mu \text{ moles d'extrémités réductrices générées}}{\text{ml de surnageant} \cdot \text{minutes}}$$

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS

#### 4.1 Croissance de *C. thermocellum* avec les boues de papetières comme substrat

Le premier objectif des travaux consistait à mesurer la croissance de *C. thermocellum* dans le milieu contenant 5 g/l des différents types de boues de papetière. Trois types de boues provenant de l'industrie papetière ont été testés : les boues primaires, les boues secondaires et les boues mélangées auxquelles des coagulants avaient été ajoutés. La figure 4.1 montre l'évolution de la concentration de protéines particulières dans le milieu ATCC 1191 avec 5 g/l de boue comparée au milieu



**Figure 4.1 :** Croissance de *C. thermocellum* en utilisant les boues primaires comme substrat. Concentration en protéines particulières dans le milieu ATCC 1191 contenant les différents substrats après le temps de fermentation à 60 °C. Le temps 0 heure correspond au temps tout de suite après l'inoculation. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type.

synthétique ATCC 1191 contenant 5 g/l de cellulose. Une certaine concentration de protéine était toujours présente dans les milieux lorsque le test de Bradford était fait, cette concentration de base au temps 0 heure après inoculation était située à environ 20 mg/l pour le milieu avec cellulose, à 50 mg/l avec les boues primaires, à 450 mg/l avec les boues secondaires et à 445 mg/l avec les boues mixtes. Ces lectures peuvent être dues à la présence de protéines s'étant adsorbées à la cellulose ou encore aux floccs présents dans les boues. À l'étape de la lyse cellulaire, l'action du NaOH et de l'eau bouillante ont possiblement défait ces floccs, ce qui libère les composants de ceux-ci.

La croissance de *C. thermocellum* dans le milieu synthétique a débuté après une période de 48 heures, la concentration passant d'autour de 20 mg/l à 94 mg/l après 72 heures de fermentation, une augmentation de 74 mg/l. Après cette période d'adaptation de 48 heures, la culture a atteint sa concentration maximale en protéines particulières après une journée de croissance.

Avec les boues primaires, il ne semble pas y avoir de période d'adaptation, une croissance de la bactérie est observée dès la première journée. La concentration de protéines particulières a montré une forte augmentation dans le milieu avec les boues primaires, passant d'une base autour de 50 mg/l à un maximum de 185 mg/l après 48 heures, soit une augmentation de 135 mg/l.

Les boues secondaires inoculées n'ont pas montré d'augmentation en concentration de protéine au cours de la culture. La concentration de protéines particulières a même légèrement diminuée avec le temps.

Finalement, les boues mixtes ont montré une légère augmentation de la concentration en protéines particulières, le maximum de 503 mg/l ayant été atteint la deuxième journée, comme avec les boues primaires. Par rapport à la base de 445 mg/l, une augmentation de 58 mg/l a donc été observée. La courbe ne montre pas de période d'adaptation.

Suite à ces observations, les boues primaires ont été choisies en tant que milieu alternatif pouvant supporter le mieux la croissance de *C. thermocellum*.

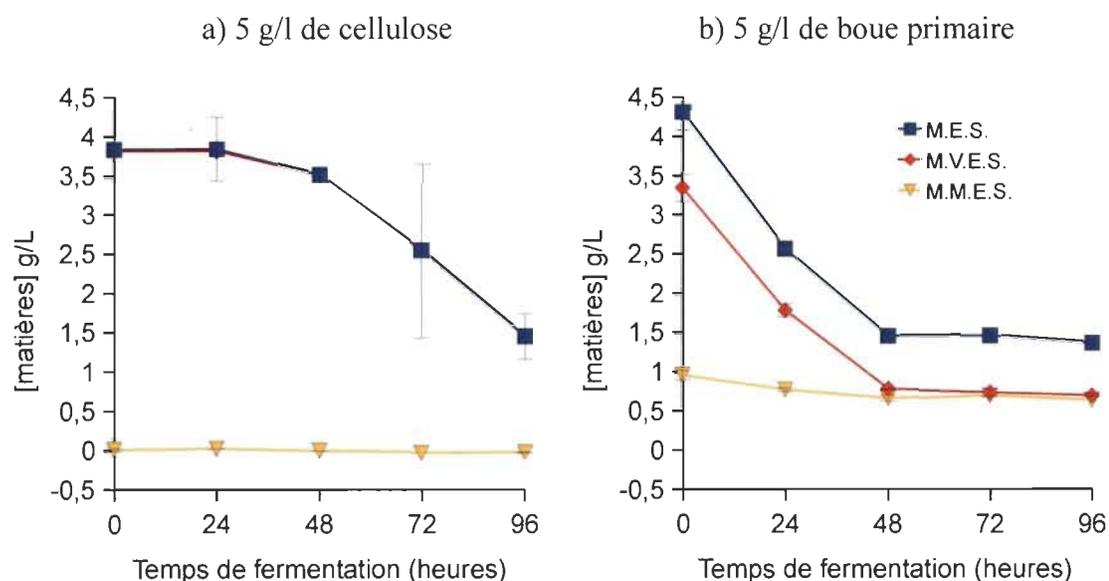
#### 4.2 Diminution des matières en suspension dans le milieu avec boue primaire

Les fibres de cellulose font partie des M.E.S. et plus spécifiquement des matières volatiles en suspension (M.V.E.S.). C'est pourquoi ce paramètre des eaux usées a été mesuré pour évaluer l'action de la bactérie *C. thermocellum* sur les boues. Aussi, la mesure des M.E.S. est un paramètre observé régulièrement dans l'analyse des effluents au traitement d'épuration, ce qui permettra la mise à l'échelle du procédé à l'usine. La figure 4.2 montre l'évolution des M.E.S., des M.V.E.S. et des matières minérales en suspension (M.M.E.S.) dans le milieu ATCC 1191 contenant les boues primaires comparé à celui contenant de la cellulose. Ces données proviennent des mêmes échantillons que ceux utilisés pour la concentration en protéines particulières.

À la figure 4.2a, pour le milieu avec cellulose, la courbe des M.E.S est superposée à celle des M.V.E.S. Le milieu contenant de la cellulose est un milieu synthétique, où seule la cellulose contribue aux M.E.S. Cette cellulose est également une composante des M.V.E.S. Aucune matière minérale sous forme pouvant être captée par le filtre n'a été ajoutée au milieu, il n'y a donc pas de M.M.E.S. Par contre, avec les boues primaires (figure 4.2b), plusieurs contaminants en suspension de nature minérale peuvent être rencontrés, comme du sable très fin. Aussi, d'autres contaminants présents dans les boues font partie des M.V.E.S. en plus de la cellulose, comme l'hémicellulose, les plastiques et les colles.

À la figure 4.2a, du côté de la cellulose, la quantité de M.E.S. ne semble pas être affectée le premier jour, mais leur dégradation s'accélère pendant la deuxième et la troisième journée. Durant la troisième journée, un grand écart par rapport aux M.E.S. s'est formé entre les échantillons des milieux avec cellulose, certains milieux n'avaient presque pas débuté l'hydrolyse de la cellulose, tandis que d'autres étaient à un niveau très avancé. Cet écart a diminué au quatrième jour. Avec la cellulose, les courbes des M.E.S.

et des M.V.E.S. n'ont pas atteint un minimum contrairement au milieu avec boue primaire. En effet, avec les boues primaires, après 48 heures, les courbes M.E.S. et M.V.E.S. atteignent un plateau, qui pourrait indiquer qu'il n'y a plus de M.E.S. dégradables par les enzymes microbiennes. Les courbes de M.V.E.S et M.E.S. évoluent sensiblement de la même façon sur un même graphique autant du côté de la cellulose que celui des boues. Puisque les M.M.E.S. ne montrent pas de changement dans le temps, seule la baisse en M.V.E.S. contribue au changement observé des M.E.S., puisque les M.E.S. correspondent à l'addition des M.V.E.S. et des M.M.E.S. La légère baisse en M.M.E.S. dans le milieu avec boue peut être expliquée par des minéraux adsorbés à la cellulose qui, lorsque celle-ci est hydrolysée, les libère et ne sont plus captés par le filtre. Finalement, la dégradation des M.E.S. a été plus rapide dans le milieu avec boues qu'avec cellulose.



**Figure 4.2 :** Diminution des matières en suspension dans les boues primaires de papetières. Milieu ATCC 1191 contenant le substrat cellulose ou boue primaire, inoculé avec *C. thermocellum*. Le temps 0 correspond à l'instant après l'inoculation. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

Pour ce qui est des boues primaires, à la figure 4.2b, la quantité initiale de M.E.S. après inoculation était de 4,32 g/l et a diminué à 1,46 g/l après 48 heures, soit donc une diminution de 66 %. En tenant compte des M.V.E.S. seulement, la concentration est passée de 3,35 g/l à 0,79 g/l après 48 heures, ce qui donne une diminution de 76 %. Ces pourcentages sont restés inchangés après 48 heures de fermentation.

La figure 4.3 montre l'aspect du milieu avec boue primaire avant et après 96 heures de fermentation. Cette photographie montre les milieux après décantation. Il est possible d'y voir l'affinité des boues avec l'eau, le volume des boues décantées occupe près du tiers du volume total du milieu avant inoculation. Le volume occupé par les boues décantées après fermentation est presque nul, bien qu'il y reste encore 33 % des M.E.S. présentes initialement.



Milieu non-  
inoculé

Milieu après  
96 heures de  
fermentation

**Figure 4.3 :** Décantabilité des M.E.S. dans le milieu 1191 contenant 5 g/l de boue primaire sèche de papetière après l'inoculation de la bactérie *C. thermocellum*.

### 4.3 Activité cellulolytique

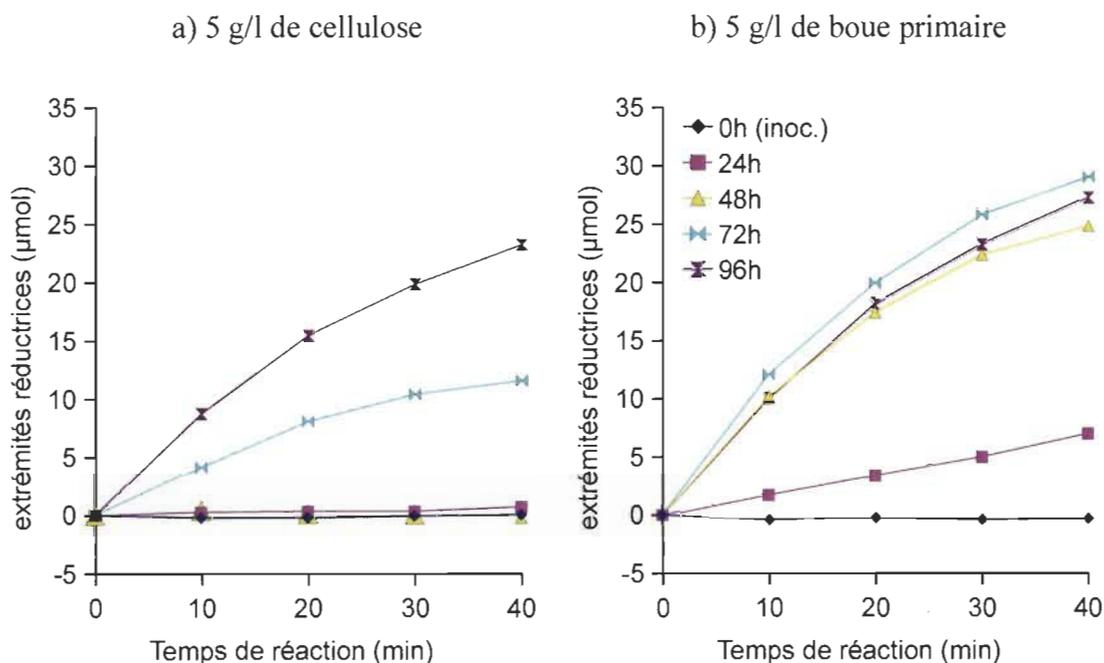
La production de cellulosomes par la bactérie *C. thermocellum* dans le milieu a été évaluée en mesurant l'activité cellulolytique du surnageant du bouillon fermenté. Le test d'activité enzymatique s'est fait en utilisant la CMC comme substrat. Il s'agit donc de l'activité de l'enzyme sur ce substrat soluble, donc qui ne représente pas l'activité de l'enzyme sur la cellulose cristalline ou amorphe. Aussi, la CMC est méthylée, ce qui peut influencer l'interaction de l'enzyme avec le substrat. Il est donc ici question d'activité CMC-ase. Cependant, le cellulosome étant capable d'activité de CMC-ase, l'hydrolyse de la CMC permettra d'évaluer et de comparer l'évolution de la concentration d'enzymes présentes dans le surnageant des différents milieux.

La figure 4.4 montre les résultats obtenus dans le milieu 1191 avec boue primaire en comparaison avec le milieu 1191 contenant de la cellulose. Les données recueillies afin de faire ces courbes proviennent des mêmes échantillons que pour la croissance cellulaire et l'évolution des M.E.S. Il y a cinq courbes par graphique, soit une pour le temps à l'inoculation (0 heures) et une pour chaque test effectué aux 24 heures. Les points aux dix minutes représentent la concentration en extrémités réductrices de sucres générées par l'hydrolyse de la CMC, mesurée avec la méthode à l'acide 3,5-dinitrosalicylique, dans les échantillons du mélange de surnageant de bouillon fermenté et de CMC.

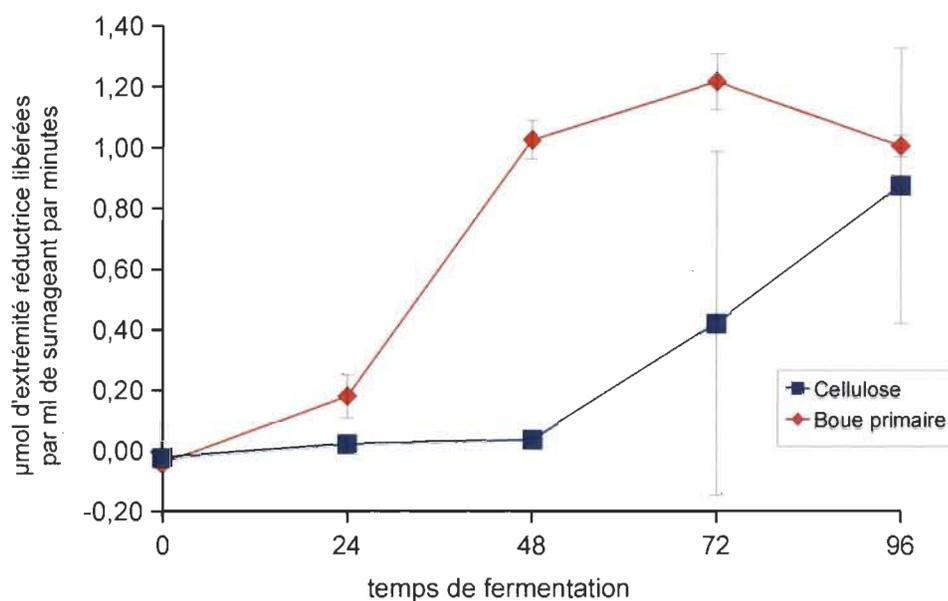
À la figure 4.5, l'activité cellulolytique du surnageant est montrée en fonction du temps de fermentation. Les échantillons du milieu avec boues présentent un faible écart-type, avec une activité maximale après 72 heures. Quant à elle, les échantillons des temps 72 et 96 heures pour la cellulose présentent un très grand écart-type. Comme pour les M.E.S., après 72 heures, certains échantillons avec cellulose n'avaient pas commencé l'hydrolyse des M.E.S. alors que d'autres étaient très avancés.

Avec le milieu ATCC 1191 contenant de la cellulose, aucune activité n'a été détectée avant 72 heures tandis qu'une légère activité avait déjà été détectée après

24 heures dans le milieu avec boue primaire. Le niveau maximal moyen atteint d'activité est plus élevé dans le surnageant des boues primaires avec  $1,22 \mu\text{mole}$  d'extrémités réductrices  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , comparé à  $0,88 \mu\text{mole}$  d'extrémités réductrices  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  du milieu avec cellulose. Le niveau le plus élevé d'un échantillon avec cellulose a été de  $1,03 \mu\text{mole}$  d'extrémités réductrices libérées  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , atteint après 96 heures.



**Figure 4.4 :** Activité CMC-ase du surnageant de culture de *C. thermocellum*. Cultivé dans le milieu ATCC 1191 contenant les substrats cellulose ou boue primaire. Les temps en heures correspondent au temps de fermentation et le temps de réaction correspond à l'hydrolyse de la CMC avec le surnageant de culture. La quantité d'extrémités réductrices libérées par l'hydrolyse de la CMC a été évaluée avec le réactif à l'acide 3,5-dinitrosalicylique. Les données sont présentées pour 1ml de surnageant. Les écarts-types de l'activité sont présentés à la figure 4.5.



**Figure 4.5 :** Activité CMC-ase du surnageant de culture de *C. thermocellum*. Cultivé dans le milieu ATCC 1191 contenant les substrats 5 g/l de cellulose ou boue primaire. L'activité est mesurée entre le temps 0 et 10 minutes de réaction avec la solution 2 % CMC.

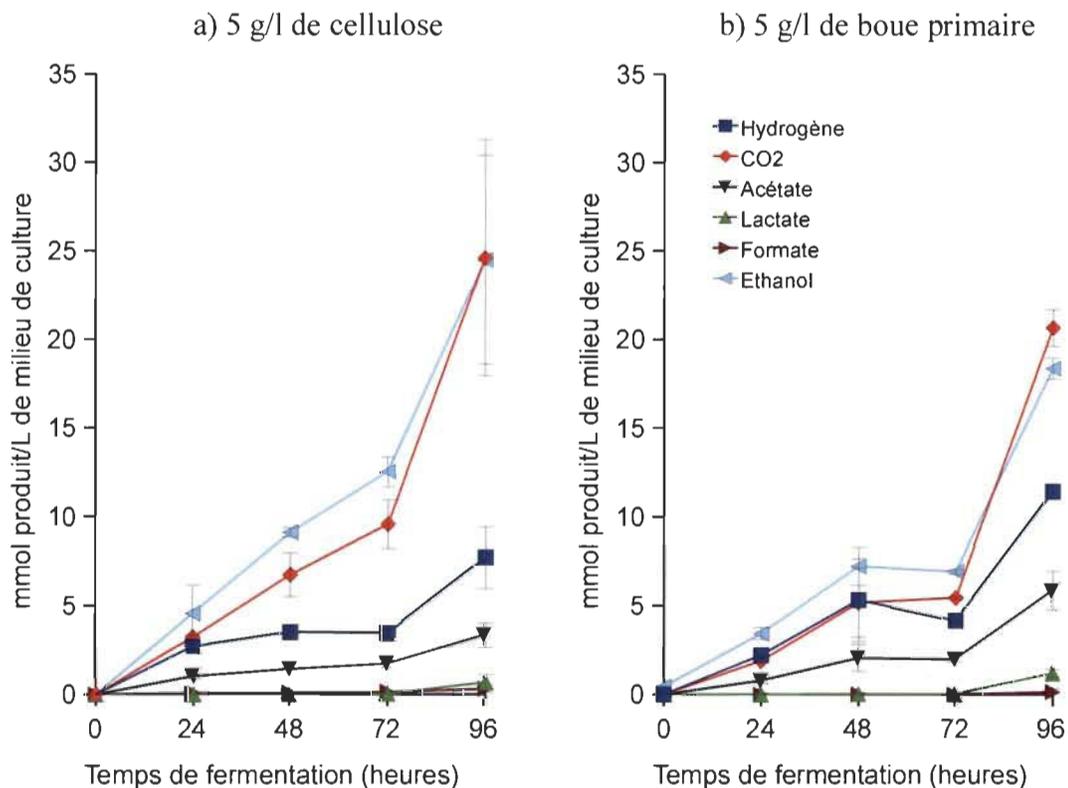
#### 4.4 Métabolites produits lors de la fermentation

Le projet porte sur la production d'hydrogène par la bactérie lors de la fermentation des boues primaires. Par contre, il est essentiel de connaître la production des autres produits de fermentation, soit l'acétate, le formate, le lactate, l'éthanol et le CO<sub>2</sub>. Puisque le génome de *C. thermocellum* et que ses voies métaboliques du glucose sont connues, il est possible de faire un bilan stœchiométrique afin d'évaluer la justesse des résultats obtenus.

À la figure 4.6, la production des métabolites de fermentation par *C. thermocellum* dans le milieu avec boue primaire est comparée au milieu avec cellulose. Les valeurs sont issus d'échantillons en triplicatas. Pour les gaz, soit le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub>, les valeurs obtenues avec le chromatographe gazeux sont celles des gaz présents dans la phase gazeuse uniquement. Il a donc fallu ajouter le gaz dissous en faisant une approximation avec la loi d'Henry. Les résultats de la figure 4.6 sont donc les valeurs de la phase

gazeuse additionnées de l'approximation des gaz dissous avec la loi d'Henry. Les exemples de calculs utilisés pour les données de la figure sont présentés en annexe C.

Les courbes des différents métabolites montrent un patron semblable entre la culture avec les boues et la culture avec la cellulose. Les échantillons ont été pris d'une autre série d'expériences que celles utilisées pour les données présentées à la croissance cellulaire, évolution des M.E.S. et activité cellulolytique. Dans le milieu avec boue, il semble avoir une période où la bactérie a cessé de croître entre 48 et 72 heures. Autant pour les boues qu'avec la cellulose, la production de métabolites par la bactérie a accéléré après 72 heures.



**Figure 4.6 :** Métabolites de fermentation produits par *C. thermocellum*. Concentration obtenue dans le milieu de culture ATCC 1191 contenant 5 g/l de boue primaire ou de cellulose. Les concentrations initiales de métabolites ont été soustraites pour chaque point. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

Dû aux bactéries qui étaient déjà présentes dans les boues, il y avait une certaine concentration de métabolites dans les boues lors de l'inoculation de *C. thermocellum*.

Ces concentrations de métabolites déjà présents ont été soustraites des valeurs obtenues pour chaque échantillon. Ainsi, la figure 4.6 présente les métabolites produits durant la fermentation par *C. thermocellum*. Les concentrations initiales de métabolites sont données au tableau 4.1. Ces données montrent la quantité de métabolites transférés avec l'inoculation additionnée de la quantité de métabolites déjà présents dans le milieu. Les gaz n'y sont pas indiqués, puisque ceux-ci ont été transférés en quantité minimale lors de l'inoculation. La quantité de produits transférés avec l'inoculation équivaut à la quantité présente dans le milieu avec cellulose tout de suite après l'inoculation. Cette quantité équivaut au tiers de la concentration d'acétate initiale dans le milieu avec boue. Pour l'éthanol, environ 75 % de l'éthanol présent au temps 0 heure dans les boues provient de l'inoculation. Ces deux métabolites ont donc débuté avec des concentrations plus fortes au temps 0 heure après inoculation dans le milieu avec boue primaire que dans le milieu avec cellulose, mais leurs niveaux sont de loin inférieurs au niveau de production par la bactérie lors de la fermentation. Les boues primaires montrent initialement une quantité de formate plus importante que ce qu'a produit *C. thermocellum* lors de la fermentation. La quantité de lactate augmente très peu et seulement à la fin de la fermentation. La production d'hydrogène dans les boues a été plus élevée qu'avec la cellulose et a été accompagnée d'une production plus élevée d'acétate. L'éthanol a montré l'effet inverse, étant présent en plus grande concentration dans le milieu avec cellulose que dans le milieu avec boue.

**Tableau 4.1**

Production de métabolites par *C. thermocellum*  
 Concentration de métabolites des échantillons des milieu avec cellulose  
 et avec boue primaire prélevés tout de suite après l'inoculation

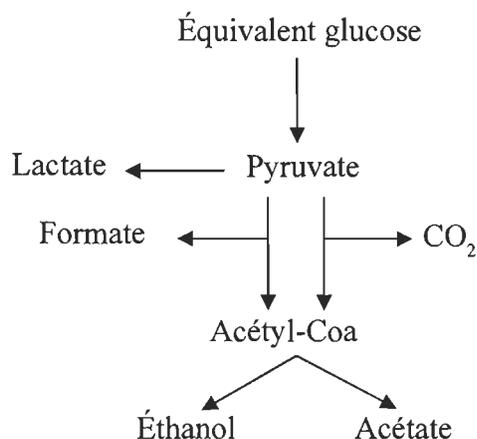
Métabolites	Concentration (mmol/l et écart-type)	
	Milieu avec cellulose	Milieu avec boue primaire
Acétate	0,597 ± 0,050	1,517 ± 0,111
Éthanol	1,445 ± 0,015	1,882 ± 0,061
Lactate	0,315 ± 0,026	0,333 ± 0,028
Formate	0,104 ± 0,009	1,053 ± 0,076

#### 4.5 Équivalent glucose consommé lors de la fermentation

L'étude des métabolites produits par la bactérie permet de vérifier la quantité de substrat utilisée par la bactérie et de faire des bilans stœchiométriques pour évaluer la qualité des données obtenues. Il est également nécessaire de présenter la production d'hydrogène en fonction du glucose consommé pour des fins de comparaison avec la littérature.

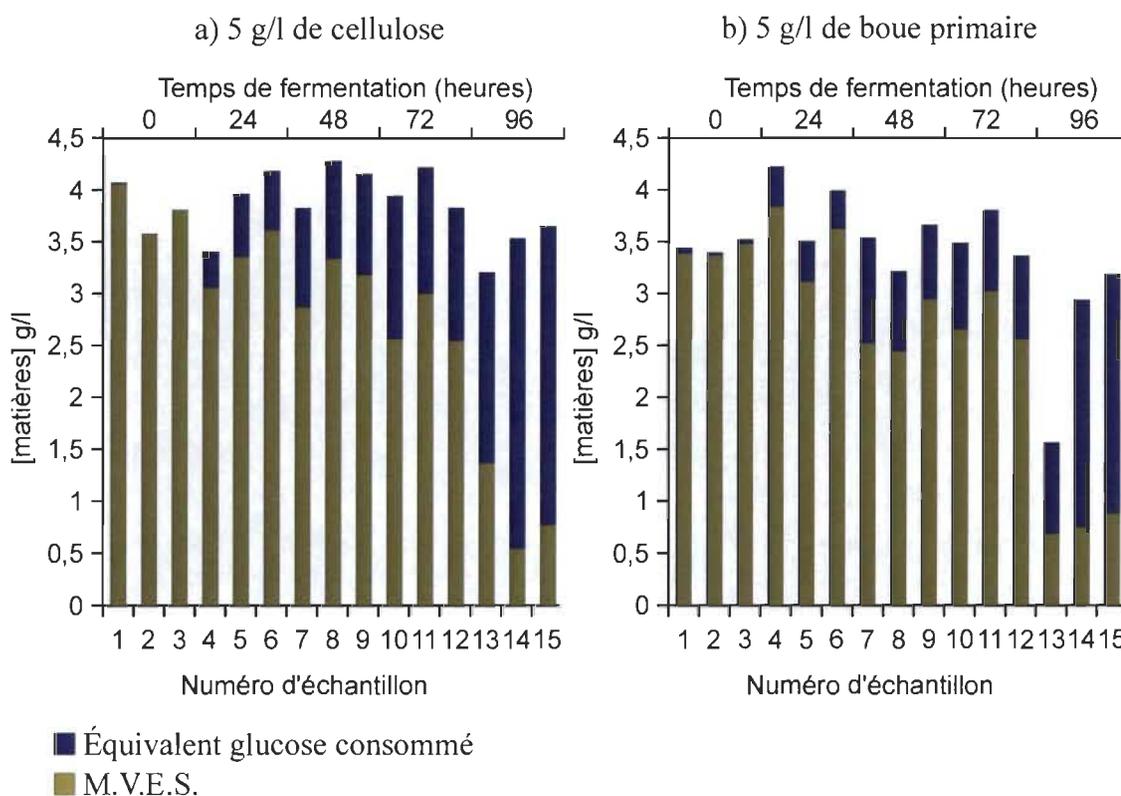
L'avantage d'utiliser un microorganisme ayant un génome connu sera mis à profit ici. Les voies métaboliques de *C. thermocellum* sont en effet connues. Puisque les concentrations de lactate, d'acétate et d'éthanol produites par la bactérie lors de nos expériences sont connues, il est possible de remonter le chemin métabolique jusqu'au glucose. Puisque *C. thermocellum* ne consomme pas le glucose, mais plutôt le cellobiose, celotriose et le cellotetrose, il sera ici question d'équivalent glucose. Par exemple, le cellobiose, étant un disaccharide de glucose, est égal à deux équivalents glucoses. Afin de connaître la quantité théorique d'équivalents glucose consommés par la bactérie, il faut :

1. Additionner la quantité molaire d'acétate, de lactate et d'éthanol pour avoir une quantité de pyruvate.
2. Diviser cette quantité de pyruvate par deux, puisque deux pyruvates sont issus de la glycolyse.



**Figure 4.7 :** Voies métaboliques de *C. thermocellum*, schéma simplifié impliquant le carbone.

La figure 4.8 montre le bilan en équivalent glucose consommé en utilisant ce calcul. Sur cette figure, la quantité de M.V.E.S. a été rapportée pour chaque bouteille ayant été utilisée pour l'expérience des métabolites produits (section 4.4). La bande bleue correspond à la quantité d'équivalents glucose théorique calculée avec l'acétate, le lactate et l'éthanol. Elle est ajoutée à la quantité de M.V.E.S., correspondant à la ligne verte. Le total de ces deux composantes tourne autour d'une moyenne, qui équivaut à la valeur des M.V.E.S. du temps 0h, soit les valeurs des échantillons 1, 2 et 3 pour les deux substrats. Cette moyenne s'établit à 3,84 g/l pour les bouteilles contenant de la cellulose et 3,52 g/l pour les bouteilles contenant les boues primaires.



**Figure 4.8 :** Bilan de glucose consommé théorique durant la fermentation. Quantité de M.V.E.S. à laquelle est ajoutée la quantité théorique de glucose consommé par *C. thermocellum*. Les numéros représentent les 15 bouteilles utilisées pour chaque série d'expériences utilisant la cellulose ou les boues comme substrat.

Lors de la préparation du milieu, celui-ci est fait une fois en grande quantité et est séparé dans le nombre de bouteilles nécessaire pour l'expérience. Les variations autour

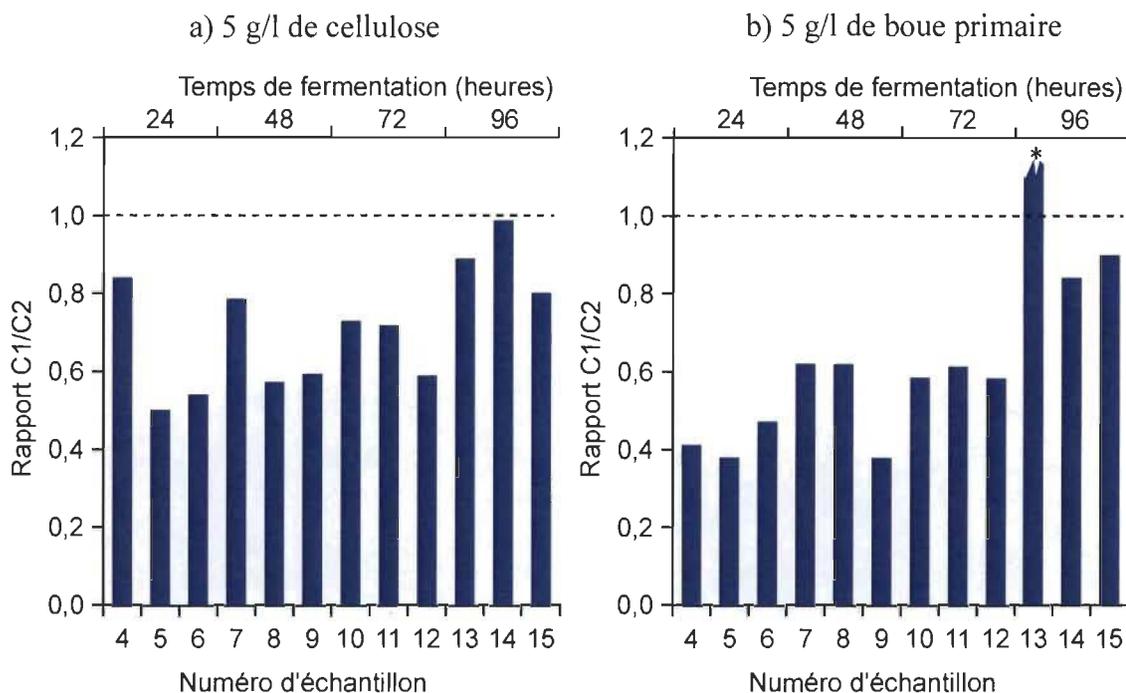
des moyennes sont causées par les M.E.S. qui ne sont pas également distribuées dans le milieu lorsque celui-ci est versé dans chaque bouteille, malgré les précautions prises afin de bien mélanger le milieu avant de le verser. La bouteille numéro 13 du côté des boues primaires n'a pas été incluse dans le calcul de la moyenne, car il y a eu une erreur de manipulation lors de l'analyse de l'éthanol.

#### 4.6 Bilan C1/C2

Un premier bilan a été fait en évaluant la baisse de M.V.E.S. par rapport à la quantité théorique de glucose consommé. Celui-ci n'a cependant qu'évalué la quantité d'acétate, de lactate et d'éthanol, sans tenir compte des gaz. Pour le CO<sub>2</sub>, il est possible de l'évaluer en comparant les quantités de métabolites à un carbone (C1) et ceux à deux carbones (C2) produits lors de la fermentation, ce ratio sera le ratio C1/C2.

Dans la cascade métabolique du glucose de *C. thermocellum*, à partir du pyruvate, une molécule contenant trois carbones (C3), trois voies sont possibles : la chaîne métabolique qui se termine avec le lactate, une autre avec l'éthanol et une dernière avec l'acétate. Le lactate ayant également 3 carbones, celui-ci ne sera pas compté dans le ratio C1/C2. Il reste donc l'éthanol et l'acétate, toutes deux étant des molécules C2. Lorsqu'une ou l'autre de ces molécules (C2) est formée à partir du pyruvate (C3), il doit y avoir également production d'une molécule à un carbone, afin de respecter le bilan stœchiométrique. Ces molécules C1 sont le gaz carbonique et le formate. Le rapport de C1/C2 doit donc être le plus près possible de 1. Ce rapport C1/C2 est présenté à la figure 4.9 pour toutes les bouteilles utilisées pour l'expérience sur la production de métabolites. Les exemples de calculs sont présentés en annexe C.

Les résultats obtenus pour chacun des échantillons sont inférieurs à 1, sauf pour l'échantillon 13 du milieu avec boue papetière, la même qui a présenté une erreur à la figure 4.8. Ces valeurs montrent qu'il manque de molécules C1.



**Figure 4.9 :** Rapport C1/C2 des métabolites acétate, éthanol, formate et gaz carbonique produit par *C. thermocellum* dans les différents substrats. Les lignes pointillées représentent la valeur qui devrait être atteinte, soit de 1. Les échantillons 1, 2 et 3 ne sont pas présentés, car elles correspondent au moment de l'inoculation, il n'y avait donc pas de métabolites produits à ce moment.

\* La valeur pour cet échantillon est de 2,49.

#### 4.7 Bilan oxydo-réduction

Les bilans de glucose consommé théorique et de rapport C1/C2 permettent d'évaluer la justesse des quantités de lactate, formate, acétate et CO<sub>2</sub> analysées. Il reste maintenant l'hydrogène, qui lui peut être évalué avec le rapport des molécules oxydées sur les molécules réduites (O/R) (Johnson et al., 1931). Ce rapport permet de s'assurer qu'il n'y a pas eu de perte de molécules d'oxygènes n'y d'hydrogènes avec les valeurs obtenues pour les métabolites produits par la bactérie.

Ce rapport est fondé autour d'une molécule neutre, soit l'eau (H<sub>2</sub>O). Celle-ci contient une molécule d'oxygène pour deux molécules d'hydrogènes, un rapport également respecté par la molécule de glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). Les molécules issues du

catabolisme du glucose doivent donc respecter ce ratio lorsqu'elles sont additionnées ensemble. Pour effectuer le calcul, il faut d'abord donner une valeur soit réduite ou oxydée aux métabolites, en fonction de la molécule neutre, l'eau. Par exemple, le gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) contient deux oxygènes de trop afin de respecter le rapport de deux molécules d'hydrogène pour une molécule d'oxygène, il aura donc une valeur de +2. L'éthanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) est en déficit de deux oxygènes et aura une valeur de -2. L'addition des molécules oxydées divisées par les molécules réduites donnera le rapport O/R. Un rapport de 1 est souhaitable, ce qui signifie qu'une molécule oxydée a été formée pour chaque molécule réduite. Par exemple, pour une bactérie qui produirait uniquement de l'éthanol et du gaz carbonique, si une mole d'éthanol a été formée, il doit également y avoir une mole de gaz carbonique afin d'équilibrer le ratio à 1. L'avantage d'utiliser ce ratio est que ni le glucose ni l'eau n'influencent ce rapport, ce qui peut être bien lorsque la quantité de glucose consommé n'est pas connue. Le rapport O/R a été calculé pour les bouteilles utilisées et les résultats sont donnés à la figure 4.10. Les exemples de calculs sont présentés en annexe 3.10. Les résultats de la figure 4.10 révèlent qu'il y a un manque de molécules oxydées pour tous les échantillons, sauf pour l'échantillon 13, qui présente une fois de plus l'effet de l'erreur dans la mesure de l'éthanol.

Équ. 1 : Ratio O/R pour les métabolites produits par *C. thermocellum*.

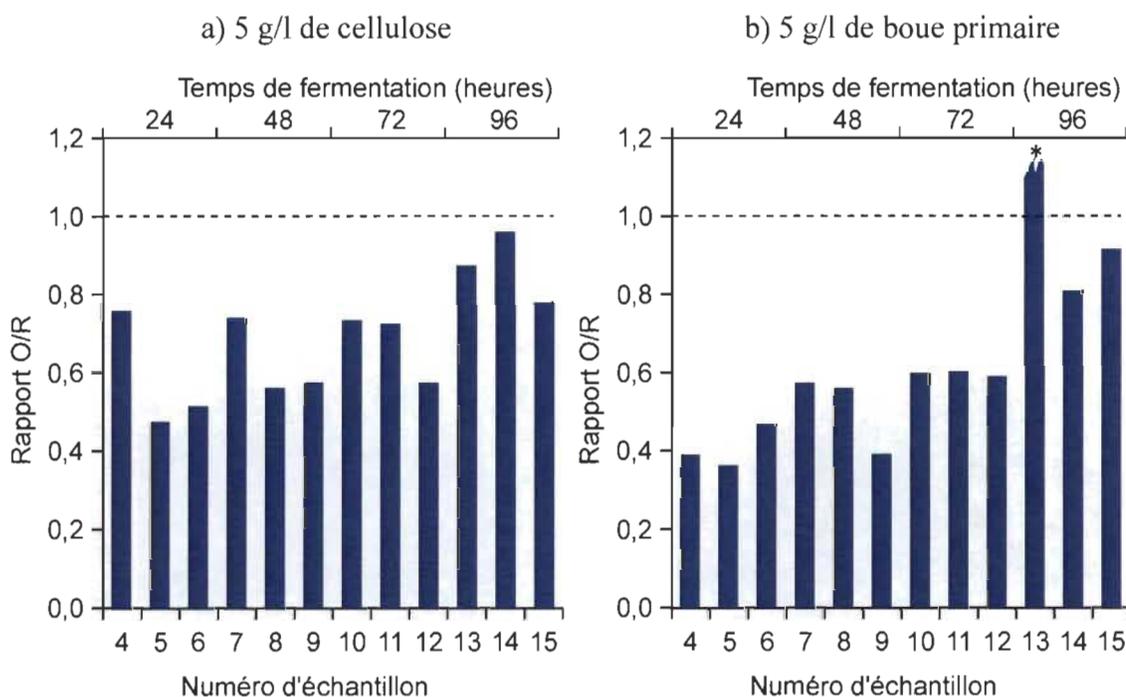
$$\text{Ratio O/R} = \frac{\sum \{(\text{molécules oxydées}) \cdot (\text{valeur d'oxydation})\}}{\sum \{(\text{molécules réduites}) \cdot (\text{valeur de réduction})\}}$$

$$\text{Ratio O/R} = \frac{(n \text{ CO}_2 \cdot 2) + (n \text{ Formate} \cdot 1)}{(n \text{ Éthanol} \cdot 2) + (n \text{ H}_2 \cdot 1)}$$

Tableau 4.2

Valeurs d'oxydation des produits de fermentation de *C. thermocellum*

Molécules	Formules	Valeur réduction (-) ou oxydation (+)
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	0
Hydrogène	$H_2$	-1
Dioxyde de carbone	$CO_2$	+2
Éthanol	$C_2H_6O$	-2
Formate	$CH_2O_2$	+1
Acétate	$C_2H_4O_2$	0
Lactate	$C_3H_6O_3$	0



**Figure 4.10 :** Rapport O/R des métabolites produits par *C. thermocellum*. Les lignes pointillées représentent la valeur qui devrait être atteinte, soit de 1. Les échantillons 1, 2 et 3 ne sont pas présentés, car elles correspondent au moment de l'inoculation, il n'y avait donc pas de métabolites produits à ce moment.

\* La valeur pour cet échantillon est de 2,70.

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

#### 5.1 Croissance de la bactérie *C. thermocellum*

La mesure de la croissance de *C. thermocellum* dans un milieu contenant des M.E.S. amène son lot de difficultés. La méthode utilisée dans ces travaux afin d'évaluer la croissance de la bactérie, soit la mesure de la concentration des protéines particulières, apporte certains avantages par rapport au comptage sur boîte de Pétri. Premièrement, lorsqu'une bactérie a tendance à s'agglutiner sur des M.E.S., la concentration en protéines particulières reflètera plus fidèlement la quantité de cellules que le comptage sur boîte de Pétri. Ici, puisque la bactérie se lie à la cellulose, un étalement sur boîte de Pétri aurait difficilement permis le compte de colonies distinctes provenant d'un seul individu (Lynd et al., 2002). Aussi, le temps de manipulation pour la concentration de protéines est relativement court, ne nécessitant pas de temps d'incubation comme dans le comptage sur boîte de Pétri. Par contre, il n'est pas possible de faire la différence entre les bactéries actives et inactives. Il n'est également pas possible de détecter une contamination. Un indice de contamination peut tout de même être identifié par la production de métabolites autres que ceux produits par *C. thermocellum*, tel du méthane ou butyrate libre dans le milieu.

Les protéines particulières des bactéries inactives ainsi que les protéines adsorbées à la matière en suspension font partie de la concentration de protéine détectée par la méthode avec le réactif de Bradford utilisée ici. Tous ces composants se retrouveront en effet dans le culot lors de la centrifugation pour séparer les protéines en solution des protéines particulières. Dans un milieu telles les boues d'épuration, il y aura forcément une concentration de bactéries inactivées par l'autoclavage. Les différents milieux auront donc une quantité initiale de protéine qu'il faut tenir compte à la lecture des résultats. Par exemple, la boue d'épuration secondaire, ou boue biologique, est constituée en grande

partie de débris cellulaires de bactéries épuratrices. Ceci explique le niveau élevé de protéines particulières présentes dans le milieu avant même l'inoculation. Puisque les boues secondaires sont mélangées aux boues primaires pour former les boues mixtes, ces boues présentent également une grande concentration de protéines particulières avant inoculation.

Les milieux testés sont ceux avec la cellulose, boue primaire, boue secondaire et boue mixte. La croissance immédiate de la bactérie avec les boues primaires comme substrat montre que des nutriments sont accessibles pour la bactérie. Aussi, l'expérience montre qu'il n'y a pas de contaminant nuisible à la croissance de *C. thermocellum* dans les boues primaires, malgré la présence possible de composés réfractaires comme : les hydrocarbures ou tout autre agent chimique utilisé sur le papier tels des encres ou des additifs.

Les boues secondaires contiennent peu de celluloses résiduelles, qui sont normalement retirées des eaux usées lors du traitement primaire. Ceci pourrait expliquer l'absence de croissance avec ce type de substrat. Il est possible qu'il y est eu une faible croissance de *C. thermocellum*, mais que l'augmentation de la concentration en protéines particulières est été trop faible pour être distinguée de la concentration déjà contenue dans les boues. Une analyse des métabolites telle que celle faite avec le milieu synthétique avec cellulose et celui avec boue primaire aurait pu le démontrer mais n'a pas été faite ici, puisque les boues secondaires n'ont pas été choisies pour la suite des expériences. Les bactéries épuratrices du traitement biologique ont pour rôle de diminuer la D.B.O. des eaux usées, ce qui signifie, pour ces bactéries, de consommer les nutriments contenus dans cette eau. Ce milieu ne contient donc possiblement pas les sources de nutriments carbonés nécessaires pour la croissance de *C. thermocellum*. Par contre, ce milieu a été enrichi d'azote et de phosphore afin de permettre la croissance des microorganismes épurateurs. Tel que présenté en annexe B (GQ, 1996), le ratio carbone azote des boues primaires est très élevé, soit en moyenne de plus de 145. Ce ratio est beaucoup plus bas avec les boues secondaires, en excluant le cas du procédé semichimique, ce ratio se trouve entre 7,3 et 39. Il faut également noter la quantité de

phosphore présent dans les boues secondaires. Ce milieu enrichi pourrait donc être réutilisé afin d'ajuster le ratio carbone : azote des boues primaires en plus d'être une source de phosphore à grande échelle. Cela permettrait une économie et un recyclage de produits chimiques.

Ce n'est pourtant pas ce qui a été observé avec les boues mixtes. Malgré la présence de cellulose, elles n'ont pas supporté la croissance de *C. thermocellum* au niveau observé avec les boues primaires. La présence de boues secondaires dans le mélange a possiblement diminué la proportion de nutriments carbonés utilisables par *C. thermocellum*. De plus, la présence de flocculant et de coagulant dans les boues mixtes a possiblement nui à l'accessibilité des nutriments, autant pour la bactérie que pour les enzymes. Ce phénomène a d'ailleurs été noté pour la production de méthane à partir de boue coagulée à l'alun ou au chlorure de fer (Kindzierski et Hrudey, 1986). Dans cette étude, la présence de ces coagulants a diminué la production de méthane par quantité de solide volatile, sans toutefois être toxique pour les microorganismes.

À la lumière de ces résultats, il faut toutefois tenir compte que les boues ont subi un type de prétraitement, qui serait coûteux à réaliser à grande échelle, soit l'autoclavage des milieux. Ce traitement a peut-être libéré la cellulose ou dégradé des polluants. Pour les expériences futures, il serait intéressant d'évaluer la stabilité de la culture de *C. thermocellum* dans un milieu non aseptique. Magnusson (Magnusson et al., 2009) n'avait pas rencontré de contamination lors de la fermentation en continu de cellulose avec *C. thermocellum* durant plus de 3000 heures. Par contre, le fermenteur ainsi que le réservoir d'alimentation de cellulose avaient été autoclavés avant de démarrer l'expérience. Les boues primaires de papetière sont fort possiblement déjà colonisées par les microorganismes, ce qui pourrait grandement influencer la stabilité de la culture de *C. thermocellum* s'il y a alimentation en boue non stérile. Ces microorganismes pourraient tout de même favoriser la désoxygénation du milieu, en consommant l'oxygène présent dans le milieu pour leurs fonctions métaboliques avant d'alimenter la fermentation avec *C. thermocellum*. D'ailleurs, lors de la préparation des milieux dans les bouteilles à sérum durant les expériences réalisées ici, après le dégazage, la

rézasurine tournait rapidement au rose et jusqu'à la décoloration avant même l'ajout de  $\text{Na}_2\text{S}$  et de l'autoclavage. La rézasurine étant un indicateur de réduction du milieu, celle-ci a montré que l'oxygène résiduel présent dans le milieu après le dégazage a été consommé. Les bactéries initialement présentes dans les boues en sont possiblement la cause.

Le milieu ATCC 1191 contient des vitamines, des minéraux, une source d'azote et de phosphore essentiels à la croissance de la bactérie *C. thermocellum*. L'ajout de ces éléments serait coûteux à grande échelle et n'est peut-être pas nécessaire, car ces éléments se retrouvent peut-être déjà dans les boues. Un élément du milieu ATCC 1191 qui devrait être enlevé dans un milieu industriel est le tampon phosphate, puisque ce tampon pourrait être remplacé par un contrôle du pH avec l'ajout d'acide et de base dans le réacteur. Il est fort possible que l'ajout de minéraux au milieu contenant les boues primaires ne soit pas nécessaire, puisque ce milieu contient déjà une quantité non négligeable de ces minéraux (voir annexe B) (GQ, 1996). Par exemple, le cellulosome nécessite la présence de calcium dans le milieu. Le milieu ATCC 1191 contient 0,5 mg/l de calcium. Selon les données du gouvernement, en moyen, pour une usine qui produit du papier, les boues primaires contiennent 6975 mg de calcium/kg de boue sec. À raison de 5 g/l de boues sèches dans le milieu, tel qu'utilisé pour les expériences présentées ici, il y en aurait près de 35 mg/l.

Il serait donc intéressant pour les travaux futurs de sélectionner les éléments qui sont réellement nécessaires d'ajouter aux boues primaires afin de supporter la croissance de *C. thermocellum*. Néanmoins, la présente étude montre que : les boues primaires sont une source de nutriments accessible pour la bactérie *C. thermocellum*; ce milieu n'est pas toxique pour cette bactérie lorsque autoclavé; la culture de cette bactérie y est possible.

## 5.2 Diminution des matières en suspension

La croissance de la bactérie dans les boues primaires ayant été démontrée, l'étude de l'évolution des matières en suspension dans les différents milieux a été entreprise. La

cellulose fait partie d'une classe des M.E.S., soit celle des M.V.E.S. À la figure 4.2a, la cellulose pure ajoutée au milieu ATCC 1191, seul élément pouvant faire partie des M.V.E.S. dans ce milieu, semble être dégradée lentement dans les premières 48 heures et cette dégradation lente n'est pas accompagnée d'une croissance cellulaire. Dans les boues, la dégradation des M.V.E.S. a débuté dès l'inoculation.

La cellulose peut se trouver soit cristalline ou amorphe. Une cellulose cristalline est plus difficile à attaquer pour les micro-organismes que celle amorphe. C'est probablement le phénomène montré à la figure 4.2. La cellulose présente dans les boues provient de fibres usées de cellulose, elle présente probablement plusieurs sections amorphes facilement hydrolysables par le cellulosome de *C. thermocellum*. La présence rapide de sucre provenant de l'hydrolyse de la cellulose dans le milieu expliquerait la croissance immédiate de la bactérie dans le milieu contenant les boues primaires. L'hydrolyse de la cellulose est en effet une étape limitante de la croissance des bactéries qui utilisent ce substrat (Lynd et al., 2002). Elles doivent en effet attendre que les sucres soient libérés par l'hydrolyse de la cellulose avant de pouvoir l'utiliser. Les taux de croissance bactérienne sont donc ralentis lors d'une croissance sur cellulose comparée à la même bactérie sur un substrat soluble et facilement accessible, tel le cellobiose pour le cas de *C. thermocellum*. La nature cristalline de la cellulose, par exemple la forme Avicel® et le coton, rend celle-ci plus récalcitrante que sa forme amorphe, ce qui fait encore diminuer le taux de croissance. La cellulose amorphe est en effet dégradée de 5 à 10 fois plus rapidement par les cellulases de champignons et de bactéries du système digestif de ruminants (revue dans Lynd et al., 2002).

Une autre hypothèse qui devra être vérifiée est que le milieu avec boues primaires contient des éléments solubles pouvant stimuler la croissance de la bactérie *C. thermocellum*. Par exemple, la lyse des bactéries présentes dans les boues lors de l'autoclavage du milieu a pu libérer des vitamines et des acides aminés bénéfiques pour la bactérie. Aussi, puisque ce milieu n'est pas strictement composé de cellulose en tant que source de carbone, la présence d'autres types de sucre aurait également pu influencer la croissance de la bactérie. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de

comparer la croissance de *C. thermocellum*, issue d'une même pré-culture, dans un milieu ATCC 1191 avec cellulose seulement à ce même milieu auquel serait ajoutée une quantité du surnageant du milieu avec boue.

À la figure 4.2, la courbe des M.V.E.S. arrête brusquement sa descente après 48 heures de fermentation dans le milieu avec boue primaire. Pourtant, les cellulases présentes dans ce milieu sont toujours actives après les 48 heures, tel que montré à la figure 4.4 et 4.5. La cellulose résiduelle des boues a possiblement été entièrement hydrolysée. Puisque les M.V.E.S. n'ont pas atteint la concentration de 0 g/l, ceci indique qu'il n'y a pas que de la cellulose dans les M.V.E.S. des boues. Par exemple, les matières plastiques et les colles entrent également dans les M.V.E.S. Ces matières ne sont pas dégradables par la bactérie, mais ne semblent pas poser problème à sa croissance. Par contre, 5 g/l de boue primaire sèche ne contient pas 5 g/l de cellulose. Il sera donc important, dans les travaux futurs, de connaître la quantité de cellulose dans les boues afin de bien cerner la capacité de la bactérie à utiliser la cellulose présente dans ce milieu. Aussi, il est possible qu'il y ait présence, dans les boues, de sucres simples faciles à utiliser pour la bactérie, ce qui aurait également pu supporter la croissance rapide en début de fermentation. Il serait donc important d'analyser la présence de ces sucres dans les travaux futurs. Cependant, l'hypothèse est qu'il n'y aura pas de ces sucres, ou très peu, car ceux-ci auraient déjà été utilisés par les bactéries présentes initialement dans les boues.

Une diminution des M.E.S. présente certains avantages pour la station d'épuration d'une usine à papier. Les M.E.S. retirées au traitement des eaux usées correspondent aux boues primaires, dans lesquelles se trouve la majorité de la cellulose résiduelle. Ces boues primaires contiennent beaucoup d'eau. Par exemple, à la sortie du décanteur primaire de l'usine de Kruger de Crabtree au Québec, la boue contient 20 à 50 g/l de matières solides, ce qui signifie entre 96 et 98 % d'eau. Les boues doivent être déshydratées avant d'être acheminées au site d'enfouissement ou valorisées par combustion pour de l'énergie. Une diminution de la quantité de M.E.S. dans les boues primaires correspondrait à diminuer la quantité de boues à gérer. De plus, tel que

présenté à la figure 4.3, les M.E.S. présentes à la fin de la fermentation du milieu contenant les boues semblent décanter plus facilement, ayant une moins grande affinité avec l'eau. Ce fait pourrait faciliter la déshydratation des boues primaires et peut-être des boues mixtes dans lesquelles les boues primaires sont normalement acheminées avant le processus de déshydratation. Il a d'ailleurs été démontré qu'un traitement enzymatique sur des boues municipales améliorerait la décantation de celles-ci (Parmar et al., 2001). Malgré le fait qu'il s'agit de boues municipales, un mélange d'enzymes commerciales de type protéase, lipase, cellulase et hémicellulase a permis de diminuer la quantité de composés organiques présents dans ces boues. Par contre, l'utilisation d'enzymes dans une usine d'épuration nécessiterait un approvisionnement continu de celles-ci. Nos expériences montrent que la culture de la bactérie *C. thermocellum* dans les boues permettrait la diminution des M.E.S. sans avoir besoin d'un tel approvisionnement. En plus, il serait possible d'y faire la production et la récupération de ces enzymes.

### 5.3 Activité cellulolytique du surnageant

Afin de dégrader la cellulose résiduelle, la bactérie *C. thermocellum* produit un complexe enzymatique constitué, entre autres, de cellulases : le cellulosome. Le bouillon fermenté contenant les cellulosomes pourrait être récupéré dans un contexte de revalorisation. Comme le montre les résultats, le surnageant a une activité cellulolytique appréciable, en tenant compte que les enzymes n'ont pas été concentrées, n'y isolées.

Ici, l'activité cellulolytique a été évaluée en utilisant la CMC comme substrat pour les cellulosomes présents dans un échantillon de surnageant de culture. Cette technique utilisée par la compagnie Genencor – A Danisco division (Palo Alto, Californie) a été modifiée dans les présents travaux. Le protocole initial mesurait l'activité enzymatique aussitôt le surnageant et la solution de CMC mélangés et après 10 minutes de réaction. Ici, les mesures ont été prises chaque 10 minutes pendant 40 minutes. Ceci a été fait afin de s'assurer que la courbe était proche de la linéarité. En prenant qu'une seule mesure à 10 minutes, il est impossible de savoir si la courbe avait, par exemple, atteint un maximum après un temps plus court que 10 minutes. Ce phénomène aurait pu être

visible si, par exemple, l'enzyme était très sensible à l'oxygène et avait été inactivée après quelques minutes.

À la figure 4.5, du côté du milieu contenant les boues primaires, l'activité cellulolytique maximale a été atteinte après 72 heures de fermentation, mais un niveau assez élevé avait déjà été atteint après 48 heures et est resté au dessus de ce niveau les journées suivantes. Après 48 heures correspond également au temps où les M.V.E.S. ont atteint le minimum. Sur le cellulosome, il y a une section de la protéine CipA qui sert de site d'attache à la cellulose. La présence de ce site a probablement retenu l'enzyme sur son substrat, la cellulose, jusqu'à ce que la quantité de cellulose soit assez basse pour que des cellulases se retrouvent libres dans le milieu et soit ainsi détectable dans le surnageant. Le même phénomène est observable avec le milieu contenant de la cellulose. La première détection d'activité des cellulases arrive à 72 heures et pourtant, les M.V.E.S. dans ce milieu avaient légèrement commencé à diminuer avant ce temps. Ce qui indique que les cellulases étaient actives avant qu'elles commencent à être détectées dans le surnageant, mais qu'elles étaient liées au substrat. Des résultats semblables ont été observés dans d'autres travaux, à noter ceux de Ng (Ng et al., 1977), où l'activité cellulolytique du surnageant d'une culture de la souche de *C. thermocellum* LQ8 a été testée avec une méthode semblable à celle utilisée ici, soit avec de la CMC. Les travaux de Zhang (Zhang et al., 2005) donnent une autre façon de décrire le phénomène. En détectant les cellulases présentes autant dans le surnageant que dans le culot, soit donc avec les cellules et la cellulose résiduelle, il a noté que près de 100 % des cellulases se trouvèrent dans le culot, et ce, jusqu'à ce que la concentration de cellulose dans le milieu ait atteint la moitié de sa concentration initiale.

Il est difficile de comparer les niveaux d'activités obtenus ici avec ceux de la littérature. Un groupe ayant également utilisé l'hydrolyse de la CMC afin de mesurer l'activité dans le surnageant est celui de Freier (Freier et al., 1988). Bien qu'il s'agissait d'une autre souche de *C. thermocellum* que celle utilisée ici, le niveau qu'ils ont enregistré était entre 2,5 et 4,5  $\mu\text{moles d'extrémités réductrices min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ , soit plus élevé que les travaux présentés ici : 1,22  $\mu\text{mole d'extrémités réductrices min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  avec le

milieu boue primaire et  $1,03 \mu\text{mole d'extrémités réductrices min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  avec le milieu cellulose. Il faut noter que les conditions d'analyses des cellulases ne sont pas indiquées dans l'article de Freier. Les conditions de pH, température et concentration initiale de substrat CMC utilisée pour effectuer le test sont probablement différentes de celles utilisées ici.

Ces résultats permettent tout de même de dire que les boues de papetières permettent la formation de cellulosomes par la bactérie *C. thermocellum*. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le substrat, la cellulose, dans les boues. Ce qui montre que ce substrat est accessible pour les enzymes, malgré les impuretés qui peuvent être rencontrées dans ce milieu.

#### 5.4 Équivalent glucose théorique consommé et ratio hydrogène/glucose

Les voies métaboliques connues de *C. thermocellum* ont permis de connaître la quantité d'équivalent glucose consommé par la bactérie durant la fermentation. La figure 4.8 met en relation cette quantité d'équivalents glucose consommés avec la baisse de M.V.E.S., catégorie dans laquelle se place la cellulose. Autant avec la cellulose qu'avec les boues primaires, les M.V.E.S. perdues semblent bien avoir été utilisées comme substrat, puisque l'addition avec le glucose consommé théorique porte le tout à une valeur moyenne, qui correspond à la quantité totale de M.V.E.S. présentes au début de la fermentation. Ce bilan indique que les niveaux d'acétate, d'éthanol et de lactate n'ont pas été surévalués. Par contre, cette figure ne tient pas compte qu'il est possible que la bactérie devienne inactive. En effet, le cellulosome n'a pas besoin que la cellule soit active pour hydrolyser la cellulose, ce qui entraînerait tout de même une diminution des M.V.E.S., sans que les sucres produits soient utilisés par la bactérie. Dans ce cas, le calcul des glucoses consommés ne remplacerait pas les M.V.E.S. dépolymérisées. Il serait donc nécessaire, dans les travaux futurs, d'évaluer la quantité de sucres solubles dans le milieu. Cette donnée pourra être ajoutée à la figure, en tant que glucose non consommé. Ce bilan montre tout de même que les quantités des métabolites lactate, acétate et éthanol semblent bien provenir de la dégradation et de l'utilisation des

M.V.E.S. par la bactérie. Aussi, les quantités obtenues de lactate, acétate et éthanol sont réalistes, puisque l'addition du glucose consommé théorique au M.V.E.S. donne des valeurs qui tournent autour d'une moyenne qui correspond aux M.V.E.S. initiales. Il n'y a donc pas de sur ou sous-évaluation de ces métabolites. Un autre point qui devra être évalué est que les boues primaires contiennent de l'hémicellulose et de la lignine. L'hémicellulose peut être dépolymérisée par le cellulosome, mais les pentoses ainsi produits ne peuvent être utilisés par *C. thermocellum* (Demain et al., 2005). Il y aurait donc une diminution des M.V.E.S. qui ne sera pas accompagnée d'une augmentation de métabolites produits dans ce cas.

Maintenant que la quantité de glucose consommé théorique est évaluée, il est possible de connaître le rendement en hydrogène formé par glucose utilisé lors de la fermentation. Pour le milieu contenant de la cellulose, ce rapport est de 0,55 et pour le milieu avec boue primaire, de 0,90. Ces rapports peuvent être comparés aux travaux d'autres laboratoires (Tableau 1.2). Les résultats obtenus ici sont parmi les plus bas selon la revue de littérature. Afin d'expliquer cette différence, il est possible que la pression de gaz dans les bouteilles soit plus élevée que les travaux répertoriés dans la littérature. Aussi, le volume de l'espace gazeux au-dessus de la culture peut influencer la pression partielle d'hydrogène dans cet espace, ayant moins de volume d'azote pour diluer l'hydrogène. Cette pression partielle, lorsque trop élevée, rend thermodynamiquement défavorable la production d'hydrogène par *C. thermocellum*. Il est aussi possible que la préculture ait été contaminée, ce qui aurait amené cette différence avec la littérature. Cependant, cette différence avec la littérature n'est pas due à la nature des boues primaires, puisque les courbes de tous les métabolites suivent un patron semblable entre le milieu contenant de la cellulose et le milieu avec boue primaire.

La concentration initiale de métabolites présents après l'inoculation aurait pu influencer la production de métabolites par la bactérie au cours de la fermentation. Il y avait dans le milieu contenant les boues primaires des quantités initiales d'acétate et de formate plus élevées que dans le milieu avec cellulose. Une concentration initiale plus élevée en formate n'a pas d'effet marquant sur la croissance et la population finale de

*C. thermocellum* ainsi que sur la production des autres métabolites et ce, même à une concentration de formate ajoutée de 27 mM (Rydzak et al., 2011). Pour ce qui est de l'acétate, une forte concentration de ce métabolite, soit 55 mM dans les travaux de Rydzak (Rydzak et al., 2011), n'influence pas la croissance cellulaire, mais fait augmenter la production d'éthanol par la bactérie. Par contre, ici, la concentration initiale n'était que d'environ 1,5 mM dans les boues primaires par rapport à 0,6 mM dans le milieu avec cellulose. Ces faibles concentrations ne peuvent donc pas expliquer la production élevée d'éthanol rencontrée ici.

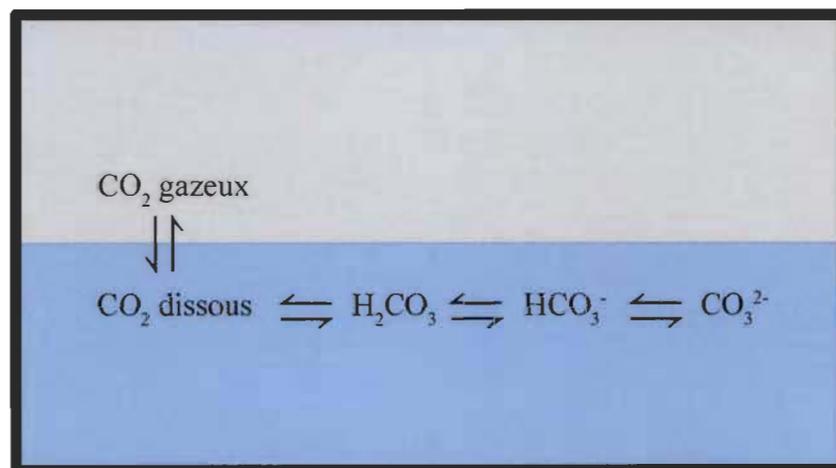
Les boues primaires utilisées pour l'expérience montrent donc une capacité à fournir une source de carbone sous forme de cellulose pour la bactérie *C. thermocellum*. Même si ce milieu contient des matières inutilisables pour la bactérie, comme les matières plastiques, ces éléments n'interfèrent pas avec son métabolisme. Il serait donc possible pour l'industrie de profiter de la production d'hydrogène lors du traitement de ces boues.

Avec ces résultats, il est maintenant possible d'élaborer sur le type de production qui permettrait de récupérer les produits d'intérêts de la fermentation de boues primaires avec *C. thermocellum*. La production simultanée d'hydrogène et de cellulosomes pour des fins de revalorisation serait difficile, puisque l'hydrogène est produit durant la phase active de la bactérie, soit lors de la consommation des sucres libérés par l'hydrolyse de la cellulose. Les cellulosomes se retrouvent libres dans le surnageant lorsqu'il n'y a plus de cellulose dans le milieu, ce qui veut dire lorsqu'il n'y a plus de substrat afin de supporter l'activité bactérienne. Au lieu de la production simultanée, il serait faisable de capter les gaz de fermentation tout au long de la fermentation et de récolter les enzymes libres à la fin de la fermentation. Il faudrait, dans ce cas, que la fermentation soit faite en mode « batch ». Un mode de fermentation discontinu avec alimentation par séquence « fed-batch » serait également possible afin de garder une production d'hydrogène plus constante. Par contre, puisqu'il y aurait toujours une quantité de cellulose résiduelle dans le fermenteur, il faudrait s'attendre à avoir une activité cellulolytique du surnageant plus faible. La récupération du surnageant contenant les enzymes devrait se faire, dans ces

conditions, juste avant une nouvelle alimentation en boue, qui serait le moment où la concentration de cellulose serait le plus bas. Retirer le surnageant aurait également la fonction de réduire la quantité de métabolites de *C. thermocellum* dans le réacteur, qui en ferait diminuer la concentration lors de l'admission de nouvelles boues. Un processus en continu permettrait une production constante d'hydrogène. Par contre, puisqu'il y aurait toujours un apport en cellulose, l'activité des cellulases dans le surnageant serait très basse.

### 5.5 Ratio C1/C2 et O/R

La figure 4.9 présente le ratio C1/C2 des métabolites éthanol, acétate, formate et gaz carbonique. Les valeurs obtenues pour chaque bouteille ne sont pas équivalentes à 1. Puisque le rapport C1/C2 est plus petit que 1 dans tous les cas, ces résultats montrent qu'il manque de molécules C1, ou encore qu'il y a trop de molécules C2. Par contre, la quantité calculée plus tôt de glucose consommé théorique semble indiquer que les valeurs trouvées pour l'éthanol et l'acétate ne sont pas surestimées. La molécule de  $\text{CO}_2$  est celle qui contribue le plus à la quantité de molécules à C1 dans la fermentation avec *C. thermocellum* dans ces conditions, elle serait donc sous-estimée. En fait, la concentration mesurée de  $\text{CO}_2$  était celle de l'espace gazeux additionnée du  $\text{CO}_2$  dissous estimée avec la loi d'Henry. Mais il y a une autre forme sous laquelle il peut s'accumuler du  $\text{CO}_2$  dans le milieu, soit le carbonate. Celui-ci vient de l'équilibre entre le  $\text{CO}_2$  dissous



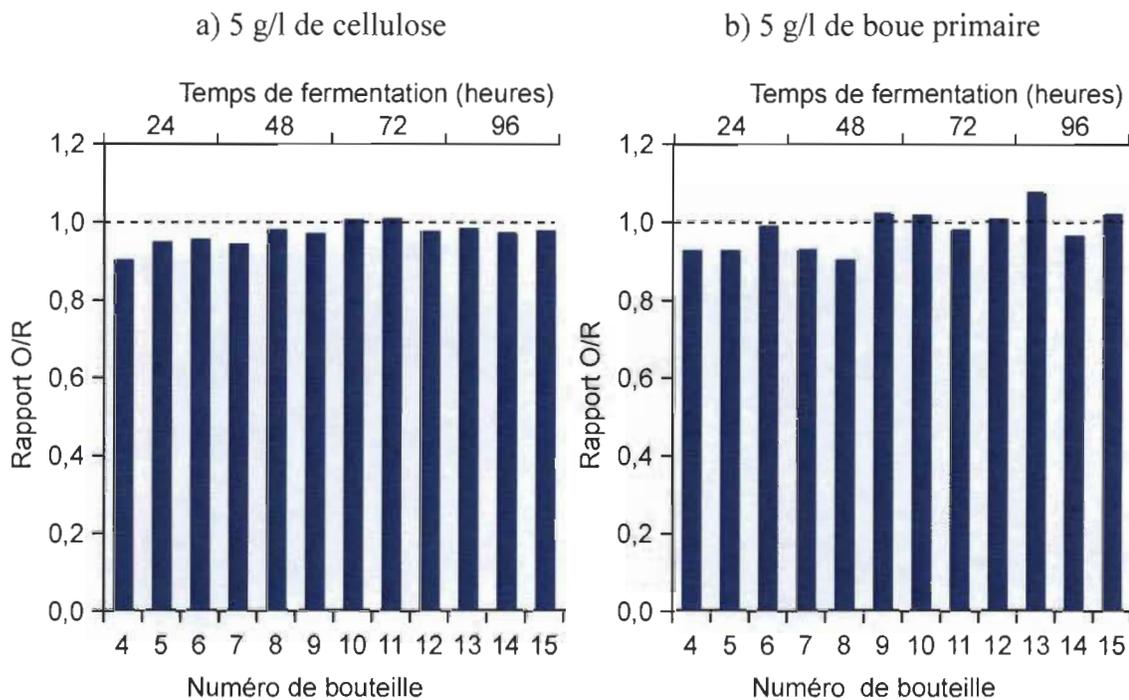
**Figure 5.1 :** Équilibre entre le gaz carbonique gazeux et le carbonate.

et l'eau, qui forme du  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , qui lui est en équilibre avec le  $\text{HCO}_3^-$  et le  $\text{CO}_3^{2-}$ . La figure 5.1 illustre cet équilibre. Il aurait été possible d'évaluer la quantité de  $\text{CO}_2$  présent sous la forme de carbonate en utilisant l'équation d'Henderson-Hasselbalch. Pour ce faire, il aurait fallu connaître le pH du milieu lorsque la mesure des gaz a été prise. Encore une fois, puisqu'il ne s'agit pas d'eau pure, la concentration de carbonate dans l'eau calculée de cette manière serait une approximation.

Équ. 2 : Équation d'Henderson-Hasselbalch pour la concentration de  $\text{HCO}_3^-$  et de  $\text{CO}_2$  dissous.

$$\text{pH} = \text{pK} + \log_{10} \left[ \frac{\text{HCO}_3^-}{\text{CO}_2 \text{ (dissous)}} \right]$$

Le rapport O/R pour chaque bouteille présenté à la figure 4.10 montre qu'il manque de molécules oxydées afin d'arriver à un ratio de 1. Encore une fois, le manque en gaz carbonique pourrait expliquer ce déséquilibre. La figure 5.2 montre à nouveau le rapport O/R, cependant, la valeur manquante de  $\text{CO}_2$  nécessaire pour équilibrer le rapport C1/C2 a été ajoutée. Puisque le rapport O/R est près de 1 pour toutes les bouteilles lorsque la quantité de gaz carbonique est ajustée, cela démontre qu'il y a bien une erreur dans l'évaluation de ce gaz. Quant à l'hydrogène, les mesures enregistrées seraient réalistes.



**Figure 5.2 :** Rapport O/R des métabolites produits par *C. thermocellum* tenant compte des molécules de gaz carbonique manquantes évalué avec le rapport C1/C2. Les bouteilles 1, 2 et 3 ne sont pas présentées, car elles correspondent au moment de l'inoculation, il n'y avait donc pas de métabolites produits à ce moment.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSION

Les présents travaux avaient pour but de proposer l'utilisation d'une bactérie modèle : le *C. thermocellum*, afin de valoriser les boues d'épuration issues des usines de pâtes et papiers. Tout d'abord, les boues primaires ont démontré leur capacité à supporter la croissance de la bactérie, ce qui répond à la première hypothèse posée ici. Ce type de boue a donc été sélectionnée parmi les types de boues présentes à l'usine Kruger de Crabtree, une usine s'alimentant de papier recyclé, pour la suite des expériences.

Ensuite, les résultats ont permis de démontrer la possibilité de réduire la quantité de M.V.E.S. contenues dans les boues primaires de l'usine avec la bactérie *C. thermocellum*, tel que proposé à l'hypothèse 4. La partie cellulosique des M.V.E.S. a effectivement été hydrolysée par les enzymes cellulolytiques présentent dans le milieu. Une activité de 1,22  $\mu\text{mol}$  de glucose libéré  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  a été mesurée dans le surnageant du milieu ATCC 1191 contenant des boues primaires après 48 heures de fermentation, qui correspond également au temps où les M.V.E.S. ont cessé de diminuer. À l'hypothèse 3, il avait été pensé que cette activité cellulolytique dans le surnageant serait en lien avec la phase de croissance de la bactérie. C'est plutôt la concentration de cellulose dans le milieu qui a affecté l'activité cellulolytique dans le surnageant. L'activité cellulolytique a été détectable que lorsque la concentration de cellulose était basse. L'activité était présente avant la détection dans le surnageant, puisque la concentration de cellulose diminuait dans le milieu.

Les sucres ainsi produits ont été consommés par la bactérie, ce qui en a résulté une production d'hydrogène. Ceci vérifie l'hypothèse 2. Dans le milieu ATCC 1191 contenant 5 g/l de boues primaires, cette production d'hydrogène a été évaluée à 0,9 mol de  $\text{H}_2$  par mole de glucose consommé. D'autres métabolites ont été produits, montrant un

patron de production semblable à celui obtenu dans le milieu synthétique, ce qui indique que les boues n'ont pas influencé le métabolisme de la bactérie.

Finalement, le mode de fermentation en discontinu a permis d'obtenir les deux produits, ce qui vérifie l'hypothèse 5.

Afin de supporter les résultats obtenus, une meilleure évaluation de la production de gaz carbonique devra être faite. L'erreur obtenue ici est possiblement due à la formation de carbonate dans le milieu qui n'a pas été prise en compte dans ce travail. Les travaux futurs devront en tenir compte afin de fournir des bilans stœchiométriques qui valideront les résultats. Aussi, la production d'acides organiques fait diminuer le pH du milieu de culture. Le pH influence l'équilibre entre le  $\text{CO}_2$ , le carbonate et le bicarbonate. Plus le milieu est acide, plus la formation de  $\text{CO}_2$  est favorisée par rapport aux autres.

Pour l'industrie papetière, le traitement des boues primaires avec cette bactérie permettrait de réduire la quantité de boues à gérer, en plus de profiter d'une nouvelle source énergétique : l'hydrogène. Une réduction de la quantité des M.E.S. dans les boues pourrait probablement faciliter la déshydratation des boues mixtes à la fin du traitement, ce qui permettrait une économie d'énergie. Ces paramètres devront être évalués dans le futur.

La production d'enzymes cellulolytiques qui résulterait du traitement avec *C. thermocellum* ouvrirait un nouveau marché pour cette industrie qui possède déjà les installations permettant de travailler avec de grande quantité de biomasses. Ces enzymes seraient, par exemple, utiles pour une future production d'éthanol à partir de résidus cellulosiques. Afin de bien évaluer les retombées de l'implantation de ce traitement dans une usine de pâtes et papiers, la mise à l'échelle du procédé est nécessaire. L'évolution du marché de l'industrie des pâtes et papiers vers les coproduits issus du travail de la biomasse forestière semble tout à fait naturelle. L'expertise accumulée par cette industrie par rapport au travail de la biomasse lignocellulosique est un tremplin pour le développement d'autres marchés. L'implantation de procédés microbiens pour la

production de bioproduits permettrait à cette industrie d'utiliser le plein potentiel de leur matière première et leurs résidus tout en obtenant des produits et des coproduits utilisables sur place, localement ou exportables.

## RÉFÉRENCES

American Type Culture Collection (ATCC) (2010) ATCC medium : 1191 *Clostridium thermocellum* medium. *American Type Culture Collection*. Disponible à l'adresse : <http://www.atcc.org/Attachments/2455.pdf>.

APHA, AWWA et WEF. (2005) Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21e édition. *American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation*, Washington, United States of America. p. 2-55.

Bayer, E.A., L. J. W. Shimon, Y. Shoham and R. Lamed (1998) Cellulosomes-structure and ultrastructure. *J. Struct. Biol.* 124: 221-234.

Bhat, M. K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18 (5): 355-383.

Bothun, G. D., B. L. Knutson, J. A. Berberich, H. J. Strobel, et S. E. Nokes (2004) Metabolic selectivity and growth of *Clostridium thermocellum* in continuous culture under elevated hydrostatic pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 (2): 149-157.

Carere, C., V. Kalia, R. Sparling, N. Cicek, et D. Levin (2008) Pyruvate catabolism and hydrogen synthesis pathway genes of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 *Indian J. Microbiol.* 48 (2): 252-266.

Chinn, M. S., S. E. Nokes, et H. J. Strobel. (2006) Influence of process conditions on end product formation from *Clostridium thermocellum* 27405 in solid substrate cultivation on paper pulp sludge. *Bioresour. Technol.* 98 (11): 2184-2193.

Daniels, L., N. Belay, et B. S. Rajagopal (1986) Assimilatory reduction of sulfate and sulfite by methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (4): 703-709.

De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer et W. B. Whitman (2009) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2e édition, Volume 3, The Firmicutes. *Springer*, New York, United States of America. p. 824.

Demain, A. L., M. Newcomb, et J. H. D. Wu. (2005) Cellulase, Clostridia, and Ethanol *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69 (1): 124-154.

Department of Energy (DOE) (2008) Lower and Higher Heating Values of Hydrogen and Fuels. *United-States of America*. Disponible à l'adresse : [http://hydrogen.pnl.gov/filedownloads/hydrogen/datasheets/lower\\_and\\_higher\\_heating\\_values.xls](http://hydrogen.pnl.gov/filedownloads/hydrogen/datasheets/lower_and_higher_heating_values.xls).

Dionex Corp. (2007) The Determination of Inorganic Anions and Organic Acids in Fermentation Broths. *Dionex Corp.* Disponible à l'adresse : [http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4082-AN123\\_07May07\\_LPN1030\\_2.pdf](http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4082-AN123_07May07_LPN1030_2.pdf).

Elliott, A. et T. Mahmood (2007) Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues. *Water Res.* 41: 19.

Freier, D., C. P. Mothershed, et J. Wiegel (1988) Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1): 204-211.

Gold, N. D., et V. J. J. Martin. (2007) Global View of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Revealed by Quantitative Proteomic Analysis. *J. Bacteriol.* 189 (19): 6787-6795.

Gouvernement du Québec (GQ) et H.C. Lavallée inc. (1996) Campagne de caractérisation des résidus papétières. *GQ*, Québec, Canada. p.208.

Hallenbeck, P. C. (2009) Fermentative hydrogen production : Principles, progress, and prognosis. *Int. J. Hydrogen Energy.* 34 (17): 7379-7389.

Hodge, D. B, M. N. Karim, D. J. Schell, et J. D. McMillan (2008) Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 99 (18): 8940-8948.

Islam, R., N. Cicek, R. Sparling, et D. Levin (2009) Influence of initial cellulose concentration on the carbon flow distribution during batch fermentation by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (1): 141-148.

Islam, R., N. Cicek, R. Sparling, et D. Levin (2006) Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by *Clostridium thermocellum* 27405. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (3): 576-583.

Johnson, E. A., A. Madia, et A. L. Demain (1981) Chemically Defined Minimal Medium for Growth of the Anaerobic Cellulolytic Thermophile *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (4): 1060-1062.

Johnson, E. A., F. Bouchot et A. L. Demain (1985) Regulation of Cellulase Formation in *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.* 131 (9): 2303-2308.

Johnson, E. A., M. Sakajoh, G. Halliwell, A. Madia, et A. L. Demain. (1982) Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (5): 125-1132.

Johnson, M. J., W. H. Peterson, et E. B. Fred. (1931) Oxidation and reduction relations between substrate and products in the acetonebutyl alcohol fermentation. *J. Biol. Chem.* 91 (2): 569-591.

Kindzierski, W. B., et S. E. Hrudey (1986) Effects of phosphorus removal chemicals upon methane production during anaerobic sludge digestion. *Can. J. Civil. Eng.* 13: 33-38.

König, J., R. Grasser, H. Pikor, et K. Vogel. (2002) Determination of xylanase,  $\beta$ -glucanase, and cellulase activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (1): 80-87.

Lee, J. M. et S. H. Zinder (1988) Hydrogen partial pressure in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (6): 1457-1461.

Levin, D.B., R. Islam, N. Cicek, et R. Sparling. (2006) Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int. J. Hydrogen Energy* 31 (11): 1496-1503.

Linstrom, P.J. et W.G. Mallard (2011) NIST Chemistry WebBook, NIST standard reference database number 69 *National institute of standards and technology*. Disponible à l'adresse: <http://webbook.nist.gov>.

Lynd, L. R., et H. E. Grethlein. (1987) Hydrolysis of dilute acid pretreated mixed hardwood and purified microcrystalline cellulose by cell-free broth from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol. Bioeng.* 29 (1): 92-100.

Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, et I. S. Pretorius. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (3): 506-577.

Magnusson, L., N. Cicek, R. Sparling, et D. Levin (2009) Continuous hydrogen production during fermentation of alpha-cellulose by the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol. Bioeng.* 102 (3): 759-766.

Magnusson, L., R. Islam, R. Sparling, D. Levin et N. Cicek (2008) Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation process. *Int. J. Hydrogen Energy.* 33 (20): 5398-5403.

Mcbee, R.H. (1948) The culture and physiology of a thermophilic cellulose-fermenting bacterium. *J. Bacteriol.* 56: 653-663.

Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31 (3): 426-428.

Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) (2008) Bilan annuel de conformité environnementale, secteur des pâtes et papiers. *Gouvernement du Québec*, Canada. p.212.

Nataf, Y., L. Bahari, H. Kahel-Raifer, I. Borovok, R. Lamed, E. A. Bayer, A. L. Sonenshein, et Y. Shoham. (2010) *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes are

regulated by extracytoplasmic polysaccharides via alternative sigma factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (43): 18646-18651.

Ng, T. K., P. J. Weiner et J. G. Zeikus (1977) Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium Thermocellum*. *Arch. Microbiol.* 114: 1-7.

Parmar, N, A Singh, et O P Ward (2001) Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26: 383-386.

Rydzak, T., D. B. Levin., N. Cicek, et R. Sparling (2011) End-product induced metabolic shifts in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (1): 199-209.

Rydzak, T., D.B. Levin, N. Cicek, et R. Sparling. (2009) Growth phase-dependant enzyme profile of pyruvate catabolism and end-product formation in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *J. Biotechnol.* 140 (3-4): 169-175.

Sparling, R., R. Islam, N. Cicek, C. Carere, H. Chow, et D. B. Levin (2006) Formate synthesis by *Clostridium thermocellum* during anaerobic fermentation. *Can. J. Microbiol.* 52 (7): 681-688.

Tonneau, Jacques (2000) Tables de chimie, Un momento pour le laboratoire, 2e édition. Collection Sciences et Méthodes. *Éditions De Boeck Université*, Bruxelles, Belgique. p.166.

Turner, P., G. Mano et E. Nordberg Karlsson (2007) Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.* 6: 9.

Weimer, P.J. et J. G. Zeikus (1977) Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium Thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium Thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (2): 289-297.

Zhang, Y. H. P., et L. R. Lynd. (2005) Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 187 (1): 99-106.

Zhang, Y., et L. R. Lynd. (2003) Quantification of Cell and Cellulase Mass Concentrations during Anaerobic Cellulose Fermentation: Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based Method with Application to *Clostridium thermocellum* Batch Cultures. *Anal. Chem.* 75 (2): 219-227.

## ANNEXE A

### COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE ATCC 1191 (ATCC, 2010)

**Tableau A.1**

Composition du milieu de culture synthétique ATCC 1191

Ingrédients	Concentrations
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 g/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	4,2 g/l
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,18 g/l
Extrait de levure BD 212750	2,0 g/l
$\alpha$ -cellulose en poudre	5 g/l
Solution résazurine 0,1 %	1,0 ml/l
Solution de vitamines	0,5 ml/l
Élixir modifié de minéraux de Wolfe	5,0 ml/l
Solution réductrice	10,0 ml/l

**Tableau A.2**

Composition de la solution de vitamines

Ingrédients	Concentration
Biotine	40 mg/l
Acide para-aminobenzoïque	100 mg/l
Acide folique	40 mg/l
Acide pantothénique en sel de calcium	100 mg/l
Acide nicotinique	100 mg/l
Vitamine B12	2 mg/l
Thiamine	5 mg/l
Pyridoxine hydrochloride	200 mg/l
Acide thioctique	100 mg/l
Riboflavine	10 mg/l

**Tableau A.3**

Composition de la solution modifiée de minéraux de Wolfe

Ingrédients	Concentrations
Acide nitrilotriacétique	1,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	3 g/l
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	500 mg/l
NaCl	1 g/l
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	100 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	10 mg/l
Acide borique	10 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mg/l
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1 mg/l

**Tableau A.4**

Composition de la solution de réduction

Ingrédients	Concentrations
Na <sub>2</sub> S · 9 H <sub>2</sub> O	0,2 M

## ANNEXE B

### PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES BOUES DE PAPETIÈRES

**Tableau B.1**

Caractéristiques des boues primaires (valeurs moyennes) (GQ, 1996)

Paramètres	Procédé de fabrication				
	<i>Kraft</i>	<i>Mécani- que</i>	<i>Mécanique/ sulfite-bisulfite</i>	<i>Semichimi-que</i>	<i>Cartons/ papier fin/tissu</i>
<b>Paramètres pratiques (mg/kg, poids sec)</b>	N = 9	N = 14	N = 16	N = 1	N = 9
pH	8.3	5.95	5.45	7.4	7.9
Matières organiques totales (%)	69.4	87.1	94.4	90.7	77.2
Humidité rel. initiale (%)	74.5	71	73	53	73.5
Humidité résiduelle (%)	11.6	35.3	21.1	33.5	37.6
<b>Composés généraux (mg/kg, poids sec)</b>					
Azote de Kjeldhal total	556	1427	1095	2302	1314
Azote – NH <sub>3</sub>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Azote – NO <sub>2</sub> et NO <sub>3</sub>	15	5	12.5	5.5	6
Phosphore inorg. total	17	44	10.5	350.5	23.5
Phosphore total	247	256	118.5	529.5	251
Ratio C/N	424	280.5	342	145.5	182
<b>Métaux (mg/kg, poids sec)</b>					
Aluminium (Al)	1400	1600	502.5	1683	4300
Argent (Ag)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Arsenic (As)	0.55	0.35	0.35	0.5	0.7
Baryum (Ba)	89.5	74.5	49	135	25.5
Bore (B)	6.0	5	5.5	17	2
Cadmium (Cd)	N.D.	N.D.	N.D.	2	N.D.
Calcium (Ca)	22500	3250	5600	16166	6975
Chrome (Cr)	13	11.5	6.5	8.5	13.5
Cobalt (Co)	1	1	0.25	1	2
Cuivre (Cu)	16.5	17.5	15	24.5	47
Fer (Fe)	1655	1300	1300	1383	1360
Magnésium (Mg)	857	540	408	780	695
Manganèse (Mn)	277.5	125	170	445	72.5
Mercure (Hg)	0.04	0.05	0.07	0.08	0.025
Molybdène (Mo)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2
Nickel (Ni)	8.5	3.7	3.25	5.5	5
Plomb (Pb)	12.5	7	5	14	10
Potassium (K)	453.5	335	310	813.5	202
Sélénium (Se)	0.08	0.05	0.09	N.D.	N.D.
Silice (SO <sub>2</sub> ) dissoutes	138.5	34.5	122	48.5	48
Sodium (Na)	2750	600	750	1816	635
Vanadium (V)	7	2.55	1.5	0.5	3
Zinc (Zn)	67	39	36.75	170	146

N = Nombre de fabriques N.D.

N.D. = non détectable

**Tableau B.2**  
Caractéristiques des boues secondaires (valeurs moyennes)

Paramètres	Procédé de fabrication				
	<i>Kraft</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Mécanique/ sulfite- bisulfite</i>	<i>Semichimique</i>	<i>Cartons/ papier fin/tissu</i>
<b>Paramètres pratiques (mg/kg, poids sec)</b>	N = 3	N = 1	N = 1	N = 1	
pH	7.6	7.6	8.6	6.9	-
Matières organiques totales (%)	64	56.1	83.3	81.1	-
Humidité relative initiale (%)	94	89	-	94	-
Humidité résiduelle (%)	6.8	89.7	48	6.5	-
<b>Composés généraux (mg/kg, poids sec)</b>					
Azote de Kjeldhal total	7817	23375	63920	35395	-
Azote – NH <sub>3</sub>	80	2534	595	344	-
Azote – NO <sub>2</sub> et NO <sub>3</sub>	8	61	31.35	180	-
Phosphore inorganique total	27	5276	2265	2800	-
Phosphore total	590	11540	24310	4880	-
Ratio C/N	39	10.2	7.3	517	-
<b>Métaux (mg/kg, poids sec)</b>					
Aluminium (Al)	6800	9100	990	420	-
Argent (Ag)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
Arsenic (As)	1.5	1.2	N.D.	0.75	-
Baryum (Ba)	113	270	65	390	-
Bore (B)	4	100	9.5	87	-
Cadmium (Cd)	2.5	N.D.	N.D.	7	-
Calcium (Ca)	45550	16000	10750	21775	-
Chrome (Cr)	20	35	4.5	14	-
Cobalt (Co)	3	10	0.5	3	-
Cuivre (Cu)	30	34	19	69.5	-
Fer (Fe)	4900	15000	520	3480	-
Magnésium (Mg)	1900	6200	1000	2400	-
Manganèse (Mn)	660	2200	135	1705	-
Mercure (Hg)	0.11	N.D.	0.11	0.018	-
Molybdène (Mo)	N.D.	N.D.	20.5	1.5	-
Nickel (Ni)	24	28	7.5	15	-
Plomb (Pb)	15	50	0.05	26	-
Potassium (K)	575	5000	2800	2840	-
Sélénium (Se)	0.13	3.2	0.03	0.095	-
Silice (SO <sub>2</sub> ) dissoutes	158	1100	553.5	180	-
Sodium (Na)	1525	2700	26000	6500	-
Vanadium (V)	49	31	3	6	-
Zinc (Zn)	420	-	78.5	552	-

N Nombre de fabrication

N.D. non détectable

Tableau B.3

Caractéristiques des boues de désencrage (valeurs moyennes)

Paramètres	Procédé de fabrication			
	Boue primaire mécanique	Cartons/papier fin/tissu boue primaire	Boue primaire désencrage	Boue secondaire désencrage
<b>Paramètres pratiques (mg/kg, poids sec)</b>	N= 4	N = 1	N= 3	N = 3
pH	8.35	7.95	7.8	6.1
Matières organiques totales (%)	71.3	64.1	47.2	57.2
Humidité relative initiale (%)	58	65	57.6	88.7
Humidité résiduelle (%)	28.5	28	35	6.8
<b>Composés généraux (mg/kg, poids sec)</b>				
Azote de Kjeldhal total	1479	1118	1305	23500
Azote – NH <sub>3</sub>	N.D.	N.D.	5.5	2165
Azote – NO <sub>2</sub> et NO <sub>3</sub>	5	36.5	15.5	n.d.
Phosphore inorganique total	109.5	65	22.5	1722
Phosphore total	280	300	698	10085
Ratio C/N	205.5	125	82	13
<b>Métaux (mg/kg, poids sec)</b>				
Aluminium (Al)	3300	3300	5985	9700
Argent (Ag)	N.D.	2	N.D.	N.D.
Arsenic (As)	N.D.	0.6	0.3	4
Baryum (Ba)	58.5	33.5	36	88
Bore (B)	2	1	2.5	11
Cadmium (Cd)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Calcium (Ca)	14500	66000	93800	14000
Chrome (Cr)	8	9	10.5	42
Cobalt (Co)	N.D.	2	2.7	4
Cuivre (Cu)	140	27.5	135	200
Fer (Fe)	510	1045	1665	5055
Magnésium (Mg)	535	1250	1070	1525
Manganèse (Mn)	76.5	42	25.5	207
Mercure (Hg)	0.04	0.115	0.065	0.05
Molybdène (Mo)	N.D.	3.5	0.25	3
Nickel (Ni)	2.5	2	1.5	5
Plomb (Pb)	8.5	13	15.5	160
Potassium (K)	135	95	300	1440
Sélénium (Se)	0.08	0.08	N.D.	0.4
Silice (SiO <sub>2</sub> ) dissoutes	45.5	135	55	125
Sodium (Na)	1040	955	1100	3390
Vanadium (V)	4	2.5	5	22
Zinc (Zn)	127	635	330	265

N Nombre de fabrication

N.D. non détectable

## ANNEXE C

### EXEMPLES DE CALCULS

#### C.1 Volume de milieu de culture dans une bouteille

Dans une bouteille contenant l'échantillon inoculé, il y a 50 ml de milieu de culture additionné de 5 ml de pré-culture et 0,5 ml de solution Na<sub>2</sub>S.

Volume total de liquide dans les bouteilles inoculées : 50 ml + 5 ml + 0,5 ml = 55,5 ml

#### C.2 Calcul pour la production des acides organiques

##### C.2.1 Acétate, lactate et formate

Les acides organiques analysés avec le chromatographe ionique Dionnex était l'acétate, le formate et le lactate. Les échantillons ont été dilués par un facteur de 50 avant l'analyse des acides organiques. Les standards utilisés étaient de 20, 10, 5 et 1 mg/l pour chaque acide. Voici le calcul utilisé pour connaître la concentration mmol/l ainsi que la quantité en mole contenue dans chaque bouteille.

Ex : échantillons de la bouteille C15 du 30 mai 2011, valeurs pour l'acétate.

Standard utilisé : Acétate de sodium (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> Na<sup>+</sup>) masse molaire: 82,03 g/mol

Valeur obtenue au Dionex : 6,747 mg/l d'acétate (facteur de dilution 50)

Concentration en mmol/l :

$$\frac{6,747 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ mmol}}{82,03 \text{ mg}} \cdot 50 = 4,11252 \text{ mmol/l d'acétate}$$

Quantité d'acétate en mmol par bouteille de culture :

$$\frac{4,11252 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \cdot 0,0555 \text{ L} = 0,22824 \text{ mmol d'acétate}$$

### C.2.2 Éthanol

Les résultats obtenus pour la concentration d'éthanol à partir du kit de test enzymatique sont en g/l.

Exemple : échantillons de la bouteille C15 du 30 mai 2011

Masse molaire éthanol : 46,07 g/mol

valeur obtenue à partir du kit : 1,33245 g/l d'éthanol

Concentration en mmol/l :

$$\frac{1,33245 \text{ g}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{46,07 \text{ g}} \cdot \frac{1000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} = 28,9224 \text{ mmol/l d'éthanol}$$

Quantité d'éthanol en mmol contenue dans une bouteille de culture :

$$\frac{28,9224 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \cdot 0,0555 \text{ L} = 1,60519 \text{ mmol d'éthanol}$$

## C.3 Quantité de gaz dans l'espace gazeux des bouteilles de culture

### C.3.1 Volume d'espace gazeux dans la bouteille

Volume total dans la bouteille : 118,5 ml

Volume occupé par le milieu de culture :

50 ml de milieu + 0,5 ml de solution  $\text{Na}_2\text{S}$  = 50,5 ml avant inoculation

Volume d'espace gazeux: 118,5 ml – 50,5 ml = 68 ml

### C.3.2 Quantité initial d'azote dans les bouteilles

L'air dans les bouteilles a été remplacé par de l'azote. La pression d'azote avant inoculation a été prise à 23 °C, après l'autoclavage.

Pression mesurée : 7,2 psig

(psig signifie que la pression atmosphérique n'est pas incluse)

1 psi = 6,895 kPa

Pression dans les bouteilles : 101,325 kPa + (7,2 psig \* 6,895 kPa/psi) = 151 kPa

Quantité initiale d'azote dans l'espace gazeux des bouteilles :

$$n_{\text{azote}} = \frac{P_{\text{azote}} \cdot V}{R \cdot T}$$

$$n_{\text{azote}} = \frac{151 \text{ kPa} \cdot 0,068 \text{ L}}{8,314472 \text{ L} \cdot \text{kPa} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 296 \text{ K}}$$

$$n_{\text{azote}} = 0,004172 \text{ mol} = 4,172 \text{ mmol d'azote}$$

### C.4 Calcul de la quantité de gaz après fermentation dans l'espace gazeux

Les standards gazeux utilisés pour la calibration du chromatographe sont en % molaire. Il n'y avait pas de production d'azote durant la fermentation et les deux seuls gaz produits avec *C. thermocellum* sont l'hydrogène et le dioxyde de carbone.

#### C.4.1 Quantité de gaz total après fermentation

Exemple : échantillons de la bouteille C15 du 30 mai 2011

%<sub>molaire</sub> d'H<sub>2</sub> = 8,41 %

%<sub>molaire</sub> de CO<sub>2</sub> = 14,61 %

$$n_{\text{gaz total}} = \frac{n_{\text{azote}}}{x_{\text{azote}}}$$

où :  $n$  = quantité en moles de gaz ( $n_{\text{azote}}$  a été calculé en annexe C.3.2. : 4,172 mmol)  
 $x$  = fraction molaire

$$n_{\text{gaz total}} = \frac{n_{\text{azote}}}{1 - (x_{\text{H}_2} + x_{\text{CO}_2})}$$

$$n_{\text{gaz total}} = \frac{4,172 \text{ mmol}}{1 - (0,0841 + 0,1461)} = 5,4196 \text{ mmol de gaz total dans l'espace gazeux}$$

#### C.4.2 Quantité d'hydrogène

$$n_{\text{H}_2} = n_{\text{gaz total}} \cdot x_{\text{H}_2} = 5,4196 \text{ mmol} \cdot 0,0841 = 0,4558 \text{ mmol de H}_2 \text{ dans l'espace gazeux}$$

#### C.4.3 Quantité de dioxyde de carbone

$$n_{\text{CO}_2} = n_{\text{gaz total}} \cdot x_{\text{CO}_2} = 5,4196 \text{ mmol} \cdot 0,1461 = 0,7918 \text{ mmol de CO}_2 \text{ dans l'espace gazeux}$$

#### C.5 Quantité de gaz dissous dans le milieu de culture des bouteilles

La loi Henry est utilisé pour le calcul des gaz dissous.

$$k_H(T) = \frac{c}{p}$$

où :

$k_H(T)$  : coefficient d'Henry en fonction de la température.

$c$  : concentration du gaz dans le liquide (mol/l)

$p$  : pression partielle du gaz (bar)

$$k_H(T) = k_H(T^\theta) \cdot \exp \left[ K \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T^\theta} \right) \right]$$

$k_H(T^\theta)$  : coefficient d'Henry à température standard (mol · l<sup>-1</sup> · bar<sup>-1</sup>)

$K$  : Constante de dépendance à la température

$T$  : Température (K)

$T^\theta$  : Température standard (298 K)

**Tableau C.1**

Constantes d'Henry pour la solubilité des gaz (Linstrom et Mallard, 2011)

Molécules	$k_H(T^0)$ (mol kg <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	K (K)
H <sub>2</sub>	0,00078	500
CO <sub>2</sub>	0,035	2400

**C.5.1 Coefficient d'Henry pour l'hydrogène**

Exemple : échantillons de la bouteille C15 du 30 mai 2011, les échantillons ont été analysés à la température de la pièce (23 °C)

$$k_H(T) = 0,00078 \cdot \exp \left[ 500 \left( \frac{1}{273 + 23} - \frac{1}{298} \right) \right]$$

$$k_H(T) = 0,000788893 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1} \text{ pour l'hydrogène}$$

**C.5.2 Coefficient d'Henry pour le dioxyde de carbone**

Exemple : échantillon de la bouteille C15 du 30 mai 2011, les échantillons ont été analysés à la température de la pièce (23 °C)

$$k_H(T) = 0,035 \cdot \exp \left[ 2400 \left( \frac{1}{273 + 23} - \frac{1}{298} \right) \right]$$

$$k_H(T) = 0,036957 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1} \text{ pour le dioxyde de carbone}$$

## C.6 Pression partielle des gaz dans l'espace gazeux

### C.6.1 Pression partielle d'hydrogène

$$p_{\text{H}_2} = \frac{n_{\text{H}_2} \cdot R \cdot T}{V}$$

$$p_{\text{H}_2} = \frac{0,0004558 \text{ mol} \cdot 0,08314472 \text{ L} \cdot \text{bar} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot (273 \text{ K} + 23^\circ \text{C})}{0,068 \text{ L}}$$

$$p_{\text{H}_2} = 0,1650 \text{ bar}$$

### C.6.2 Pression partielle de dioxyde de carbone

$$p_{\text{CO}_2} = \frac{0,0007918 \text{ mol} \cdot 0,08314472 \text{ L} \cdot \text{bar} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot (273 \text{ K} + 23^\circ \text{C})}{0,068 \text{ L}}$$

$$p_{\text{CO}_2} = 0,2866 \text{ bar}$$

## C.7 Calcul pour la concentration et quantité de gaz dissous

$$k_H(T) = \frac{c}{p} \quad \text{ou} \quad c = k_H(T) \cdot p$$

où :

c : concentration du gaz dissous

p : pression partielle du gaz

### C.7.1 Concentration d'hydrogène dissous

$$c_{\text{H}_2} = 0,788893 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1} \cdot 0,1650 \text{ bar} = 0,13017 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

### C.7.2 Quantité d'hydrogène dissous dans le milieu en bouteille

$$n_{\text{H}_2 \text{ dissous}} = c_{\text{H}_2} \cdot V_{\text{liquide}}$$

$$n_{\text{H}_2} = 0,13017 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 0,0555 \text{ L} = 0,007224 \text{ mmol de H}_2 \text{ dissous}$$

### C.7.3 Concentration de dioxyde de carbone dissous

$$c_{\text{CO}_2} = 36,957 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1} \cdot 0,2866 \text{ bar} = 10,5919 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

### C.7.4 Quantité de dioxyde de carbone dissous dans le milieu en bouteille

$$n_{\text{CO}_2 \text{ dissous}} = c_{\text{CO}_2} \cdot V_{\text{liquide}}$$

$$n_{\text{CO}_2} = 10,5919 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 0,0555 \text{ L} = 0,5879 \text{ mmol de CO}_2 \text{ dissous}$$

## C.8 Équilibre entre CO<sub>2</sub> dissous et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Une partie du CO<sub>2</sub> produit par la bactérie se dissous dans l'eau, tel que vu au dernier point. Il y a un équilibre qui se forme entre le CO<sub>2</sub> dissous et le H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, qui lui-même est en équilibre avec le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Le H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> beaucoup moins présent à des pH entre 6 et 7 que le CO<sub>2</sub> dissous et le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. L'équation d'Handerson-Hasselbach est utilisé pour déterminer la concentration de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> présent dans le milieu de culture.

$$\text{pH} = \text{pK} + \log_{10} \left[ \frac{\text{HCO}_3^-}{\text{CO}_2 \text{ (dissous)}} \right]$$

$$K_a = K_{\text{acide}} \text{ de la réaction : } \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$$

$$K_b = K_{\text{hyd}} \text{ de la réaction : } \text{CO}_2 \text{ dissous} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$$

$$K = K_a \times K_b$$

$$\text{pK} = -\log(K) = 6,4 \text{ (Tonneau, 2000)}$$

La concentration de  $\text{CO}_2$  dissous étant connue (C.7.4) :

$$\log_{10}[\text{HCO}_3^-] = \text{pH} - \text{pK} + \log_{10}[\text{CO}_2 \text{ dissous}]$$

$$[\text{HCO}_3^-] = 10^{(\text{pH} - \text{pK})} \cdot [\text{CO}_2 \text{ dissous}]$$

Exemple : échantillon de la bouteille C15 du 30 mai 2011. Le pH de cet échantillon n'a pas été enregistré, celui-ci devrait être entre 6 et 7. Voici les valeurs de concentration du  $\text{HCO}_3^-$  qui serait présentes selon le pH.

$$[\text{HCO}_3^-] = 10^{(7 - 6,4)} \cdot 0,0105919 \text{ mol/L}$$

$$[\text{HCO}_3^-] = 0,042167 \text{ mol/L si la solution est a pH 7}$$

ou 2,3403 mmol dans le milieu de culture de la bouteille

$$[\text{HCO}_3^-] = 0,01333 \text{ mol/L si la solution est a pH 6,5}$$

ou 0,7401 mmol dans le milieu de culture de la bouteille

$$[\text{HCO}_3^-] = 0,004217 \text{ mol/L si la solution est a pH 6}$$

ou 0,2340 mmol dans le milieu de culture de la bouteille

### C.9 Balance C1/C2

Selon les voies métaboliques à partir du pyruvate (3 carbones) de *C. thermocellum*, il y a formation de deux produits à 1 carbone, soit le CO<sub>2</sub> et le formate, ainsi que deux produits à 2 carbones, soit l'éthanol et l'acétate. Le rapport entre les produits à 1 carbone et les produits à 2 carbones devrait être de 1.

$$\sum n_{\text{produits à 1 carbone}} / \sum n_{\text{produits à 2 carbone}}$$

Pour *C. thermocellum*, la formule est :

$$\frac{n_{\text{CO}_2} + n_{\text{formate}}}{n_{\text{éthanol}} + n_{\text{acétate}}} = 1$$

exemple : échantillon C15 du 30 mai 2011. Le pH de la solution est inconnu, donc la quantité de HCO<sub>3</sub> n'est pas connue. Ici sont utilisées les valeurs calculées avec les formules démontrées précédemment pour la bouteilles C15 auxquelles ont été soustraites les valeurs obtenues au temps 0, soit tout de suite après l'inoculation.

$$\frac{(1,3620 \text{ mmol}_{\text{CO}_2, \text{total}} + x \text{ mmol}_{\text{HCO}_3}) + 0,01446 \text{ mmol}_{\text{Formate}}}{1,52498 \text{ mmol}_{\text{Éthanol}} + 0,19513 \text{ mmol}_{\text{Acétate}}}$$

si  $n_{\text{HCO}_3} = 0$

Balance C1/C2 = 0,80

Dans ce cas, pour avoir une balance C1/C2 de 1, il aurait fallu 0,34365 mmol de HCO<sub>3</sub>, donc que le pH du milieu soit de 6,167. Ce qui semble être acide pour *C. thermocellum*. Cependant, il y avait assurément présence de HCO<sub>3</sub> dans le milieu, ce qui aurait augmenté le rapport C1/C2 à une valeur plus près de 1.

### C.10 Rapport entre les produits oxydés et réduits

Si nous partons de l'eau en tant que molécule neutre, celle-ci montre un rapport de 1 : 2 entre l'oxygène et l'hydrogène (un oxygène pour deux hydrogènes). Le glucose montre ce même rapport. Il faut que ce rapport entre oxydant/réducteur soit conservé tout au long de la fermentation. Pour le calculer, l'oxygène présent dans une molécule aura la valeur de +1 et l'hydrogène la valeur de -0,5.

Exemple :

Lors de la formation d'éthanol ( $C_2H_6O$ ), il faut qu'une autre molécule reçoivent deux oxygènes afin de garder le rapport oxydant/réducteur constant, ce que fera le  $CO_2$ .

**Tableau C.2**

Valeurs d'oxydation des produits de fermentation de *C. thermocellum*

Molécules	Formules	Valeur réduction (-) ou oxydation (+)
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	0
Hydrogène	$H_2$	-1
Dioxyde de carbone	$CO_2$	+2
Éthanol	$C_2H_6O$	-2
Formate	$CH_2O_2$	+1
Acétate	$C_2H_4O_2$	0
Lactate	$C_3H_6O_3$	0

Pour *C. thermocellum*, le rapport entre les produits oxydés et réduits sera :

$$\frac{(n_{\text{CO}_2} \cdot 2) + (n_{\text{Formate}} \cdot 1)}{(n_{\text{Éthanol}} \cdot 2) + (n_{\text{H}_2} \cdot 1)} = 1$$

Exemple : échantillon C15 du 30 mai 2011. Les valeurs utilisées sont celles dont les valeurs juste après l'inoculation ont été soustraites.

$$\frac{(1,36200 \text{ mmol} \cdot 2) + (0,01446 \text{ mmol} \cdot 1)}{(1,5250 \text{ mmol} \cdot 2) + (0,45270 \text{ mmol} \cdot 1)} = 0,78$$

Pour avoir une valeur de 1, une valeur 0,38212mmol de plus de CO<sub>2</sub> aurait suffi, soit une valeur proche de la valeur manquante en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> calculé avec le rapport C1/C2.

**Tableau C.3**

Valeurs brutes pour la bouteille C15 du 30 mai 2011, ayant servies pour les exemples de calculs. La pression avant inoculation était de 7,2 psig

molécule	Valeurs à la fin de la fermentation
% H <sub>2</sub>	8,41 %
% CO <sub>2</sub>	14,61 %
Acétate	6,74700 mg/l
Lactate	2,67360 mg/l
Formate	0,49580 mg/l
Éthanol	1,33245 g/l