



**HAL**  
open science

# Production de P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé ouvert : influence de la source de carbone sur la sélection microbienne et l'accumulation du biopolymère

Mattéo Castiello

## ► To cite this version:

Mattéo Castiello. Production de P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé ouvert : influence de la source de carbone sur la sélection microbienne et l'accumulation du biopolymère. Génie des procédés. INSA de Toulouse, 2023. Français. NNT : 2023ISAT0016 . tel-04268499

**HAL Id: tel-04268499**

**<https://theses.hal.science/tel-04268499>**

Submitted on 2 Nov 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse  
(INSA Toulouse)

---

Présentée et soutenue par

**Mattéo CASTIELLO**

Le 25 Avril 2023

**Production de P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé ouvert :  
influence de la source de carbone sur la sélection microbienne et  
l'accumulation du biopolymère**

---

École doctorale

**MEGEP - Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés**

Spécialité

**Génie des Procédés et de l'Environnement**

Unité de recherche

**TBI – Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering**

Thèse dirigée par

**Etienne PAUL et Claire DUMAS**

Jury

**Patrick DABERT** (OPAAL, Rennes), Rapporteur

**Catherine BEAL** (AgroParisTech, Palaiseau), Rapporteur

**Nicolas BERNET** (LBE, Narbonne), Examineur, Président du Jury

**Estelle GROUSSEAU** (IATE, Montpellier), Examinatrice

**Yoan PECHAUD** (UGE, Champs-sur-Marne), Examineur

**Etienne PAUL** (TBI, Toulouse), Directeur de thèse

**Claire DUMAS** (TBI, Toulouse), Co-directrice de thèse

**Laëtitia CAVAILLE** (SAPOVAL, Albi), Invité



---

# Résumé

---

Les polyhydroxyalcanoates (PHA), une classe de polymères biodégradables et biosourcés, constituent une alternative attractive pour substituer, en partie, les plastiques conventionnels issus des énergies fossiles. Le copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (P(3HB-co-3HV)) pour lequel les caractéristiques thermomécaniques sont étroitement liées à la fraction en 3HV, possède des propriétés qui répondent aux exigences industrielles. Pour limiter les coûts de production et rendre le PHA plus compétitif, l'utilisation de cultures non axéniques fait l'objet d'une attention grandissante. Elles permettent notamment d'avoir recours à des substrats complexes tels que des déchets organiques, qui doivent être au préalable convertis en AGV par fermentation acidogène.

En cultures microbiennes mixtes (CMM), les procédés de production de PHA sont généralement réalisés en deux étapes, avec une étape d'enrichissement en microorganismes accumulateurs de PHA, et une deuxième étape de production de PHA par les consortia sélectionnés. Bien que la majorité des procédés de production de PHA en CMM soit opérée en culture discontinue, les procédés continus présentent un réel intérêt. Il a été précédemment démontré qu'appliquer une double limitation en carbone et phosphore en culture continue assurait un enrichissement robuste en accumulateur de PHA. En revanche, la sélection n'a été expérimentée que sur acétate ou acétate/butyrate, ne permettant de valider cette stratégie de sélection uniquement que pour des producteurs de PHB.

Dans ce contexte, cette thèse a cherché à étudier et développer un procédé de production de P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé à partir de cultures mixtes issues de boues activées.

La reproductibilité de la stratégie de sélection a été éprouvée avec deux mélanges intégrant du propionate (acétate/propionate et butyrate/propionate), mettant en avant une sélection fonctionnelle systématique de stockeurs de PHA. La comparaison des résultats obtenus avec des études antérieures, conduites sur d'autres substrats carbonés a permis d'évaluer l'influence de la nature de la source de carbone sur la direction de la consommation du substrat (entre croissance cellulaire, stockage de PHA et réactions de maintenance).

Une qualification microbiologique des consortia sélectionnés a été réalisée avec l'étude des dynamiques de sélection et de l'identification des genres microbiens dominants (*Acinetobacter*, *Malikia* et *Zoogloea*). Elle a pu rendre compte de l'influence des conditions opératoires (nature du substrat carboné, degré de limitation en phosphore, taux de dilution) sur la sélection microbienne. En particulier, il a été mis en évidence que les abondances relatives des populations majoritaires lors des cultures alimentées avec un mélange incluant du

propionate étaient largement conditionnées par le niveau de limitation en phosphore. Par ailleurs, l'emploi du modèle de Monod a concouru à mieux assimiler les mécanismes qui dictent la compétition microbienne.

Les consortia microbiens ont été également qualifiés cinétiquement, notamment en termes de potentialités de stockage de PHA, au moyen de cultures en réacteur batch en conditions de carence en phosphore. Cette étude en régime dynamique a contribué à spécifier les substrats assimilables et préférentiels. De surcroît, la détermination des vitesses spécifiques maximales de production de PHA, associée à l'utilisation d'un modèle cinétique, a permis de dépeindre l'influence de la nature du substrat carboné, de la composition bactérienne des consortia sélectionnés et de l'état physiologique des cellules (i.e. la teneur intracellulaire en phosphore) sur les capacités d'accumulation de PHA. Deux classes de producteurs de PHA ont pu être essentiellement distinguées : les producteurs médiocres (*Acinetobacter*) et les surproducteurs (*Malikia*, *Zoogloea*).

De plus, les effets de l'application d'une carence nutritionnelle supplémentaire (azote) sur les cinétiques de production de PHA ont été évalués en batch et intégrés au modèle cinétique. Il a été mis en exergue qu'une carence en azote restreignait les vitesses d'accumulation de PHA. La confrontation du modèle aux résultats expérimentaux obtenus dans l'étage de production du réacteur continu bi-étagé a conforté et amélioré la compréhension des processus qui gouvernent les performances de production de PHA en réacteur continu. Le modèle a, par la suite, été exploité comme outil de prédiction pour identifier les conditions optimales du procédé.

Enfin, l'influence de l'ensemble des conditions opératoires a été examinée du point de vue de la composition monomérique du copolymère P(3HB-co-3HV). Il a été établi que la fraction en 3HV a pu être maximisée en augmentant la teneur en propionate dans l'alimentation, en l'associant préférentiellement à l'acétate et en appliquant exclusivement une carence en phosphore.

---

# Abstract

---

Polyhydroxyalkanoates (PHA), biodegradable and biosourced polymers, constitute an attractive alternative to substitute in part conventional plastics derived from fossil fuels. In particular, the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)) copolyester, whose thermomechanical properties are correlated to the 3HV content, has characteristics in line with industrial requirements. To limit production costs and make PHA more competitive, the use of non-axenic cultures is receiving increasing attention. They allow making use of complex substrates such as organic waste, even if they must first be converted into VFA by acidogenic fermentation.

In mixed microbial cultures (MMC), PHA production processes are generally carried out in two steps, with a step of enrichment in PHA-storing microorganisms, and a second step of PHA accumulation by the selected consortia. Although the majority of PHA production processes in MMC are executed in discontinuous mode, continuous processes are of real interest. It was previously demonstrated that applying a double carbon and phosphorus limitation in continuous culture ensured a robust enrichment of PHA producers. Nevertheless, this selection strategy has only been tested on acetate or acetate/butyrate, validating this strategy for PHB producers only.

In this context, this thesis sought to study and develop a process for the production of P(3HB-co-3HV) in a two-stage continuous reactor from mixed cultures from activated sludge.

The reproducibility of the selection was tested with two mixtures integrating propionate (acetate/propionate and butyrate/propionate), emphasizing a systematic functional selection of PHA-producers. By comparing the results with previous studies carried out with other carbon substrates, the influence of the nature of the carbon source on the direction of the consumption of the substrate (between cell growth, PHA storage and reactions of maintenance) was evaluated.

A microbiological qualification of the selected consortia was performed through the study of the dynamics of selection and the identification of the dominant microbial genera (*Acinetobacter*, *Malikia* and *Zoogloea*). The influence of operating parameters (nature of the carbon source, level of phosphorus limitation, dilution rate) on microbial enrichment was assessed. In particular, it was shown that the relative abundances of the majority populations when fed with a mixture including propionate were largely conditioned by the degree of phosphorus limitation. In addition, the use of Monod's model has contributed to a better understanding of the mechanisms that govern microbial competition.

The microbial consortia were also qualified on the kinetic aspect, particularly in terms of PHA accumulation potential, by means of cultures in batch mod under phosphorus-deficient conditions. This study in dynamic regime contributed to define the assimilable and preferential substrates. Based on the determination of the maximum specific rates of PHA production, combined with a kinetic model, the influence of the nature of the carbon substrate, the bacterial composition of the selected consortia and the physiological state of cells (i.e. the intracellular phosphorus content) on PHA accumulation capacity was depicted. Two classes of PHA producers could essentially be distinguished: poor producers (*Acinetobacter*) and overproducers (*Zoogloea*, *Malikia*).

Moreover, the effects of the application of an additional nutritional deficiency (nitrogen) on the kinetics of PHA production were evaluated in batch reactors and integrated into the kinetic model. Nitrogen deficiency has been shown to restrict PHA accumulation rates. The confrontation of the model with the experimental data obtained in the production stage of the two-stage continuous reactor has strengthened and improved the understanding of the mechanisms which govern the performance of PHA storage in continuous cultures. The model was then used as a prediction tool to define the optimal conditions for the process.

Finally, the influence of all the operating conditions was examined from the point of view of the monomeric composition of the P(3HB-co-3HV) copolymer. It was established that the 3HV content could be maximized by increasing the propionate fraction in the feed, rather associating it with acetate (instead of butyrate) and applying phosphorus deficiency exclusively.

---

# SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>9</b>
<b>I. Polyhydroxyalcanoates (PHA).....</b>	<b>11</b>
I. 1. Structure.....	11
I. 2. Propriétés physico-chimiques.....	12
I. 3. Microbiologie et fonctions biologiques.....	14
<b>II. Métabolisme de la production de P(3HB-co-3HV) à partir d'AGV .....</b>	<b>15</b>
II. 1. Voies métaboliques impliquées.....	16
<i>III. 1. a. Assimilation des AGV et effets inhibiteurs .....</i>	<i>16</i>
<i>II. 1. b. Biosynthèse du P(3HB-co-3HV).....</i>	<i>18</i>
II. 2. Induction de la synthèse de P(3HB-co-3HV).....	19
<i>II. 2. a. Mécanismes de régulation de la synthèse du P(3HB-co-3HV).....</i>	<i>19</i>
<i>II. 2. b. Limitation nutritionnelle de la croissance.....</i>	<i>20</i>
<b>III. Production de PHA en cultures microbiennes mixtes.....</b>	<b>22</b>
III. 1. Introduction.....	22
III. 2. Fermentation acidogène.....	23
III. 3. Enrichissement en microorganismes accumulateurs de PHA.....	24
<i>III. 3. a. Procédé AN/AE.....</i>	<i>24</i>
<i>III. 3. b. Procédé ADF.....</i>	<i>25</i>
III. 4. Accumulation de PHA en cultures mixtes.....	25
III. 5. Production de P(3HB-co-3HV) à l'échelle pilote et industrielle.....	26
<b>IV. Procédés continus de production de PHA .....</b>	<b>28</b>
IV. 1. Sélection microbienne en culture continue.....	29
<i>IV. 1. a. Considérations théoriques en culture continue .....</i>	<i>29</i>
<i>IV. 1. b. Orientation de la compétition microbienne.....</i>	<i>31</i>
IV. 2. Sélection de producteurs et accumulation de PHA en chemostat.....	33
<i>IV. 2. a. Notion de double limitation nutritionnelle (DLN).....</i>	<i>33</i>
<i>IV. 2. b. Devenir du carbone dans la zone de DLN.....</i>	<i>35</i>
<i>IV. 2. c. Potentialités de production de PHA selon le taux de phosphore intracellulaire.....</i>	<i>37</i>
<i>IV. 2. d. Procédés continus en deux étages.....</i>	<i>39</i>
<b>PORTEE ET STRUCTURE DE LA THESE.....</b>	<b>41</b>



## **MATERIELS ET METHODES.....45**

<b>I. Conditions expérimentales .....</b>	<b>47</b>
I. 1. Consortia microbiens.....	47
I. 2. Milieux de culture.....	47
I. 3. Réacteurs.....	48
I. 4. Stratégies de conduite de culture .....	50
<b>II. Techniques analytiques .....</b>	<b>51</b>
II. 1. Méthodes de suivi et d'analyse des substrats .....	51
II. 1. a. Dosage des acides gras volatils (AGV) .....	51
II. 1. b. Dosage de l'azote ammoniacal .....	51
II. 1. c. Dosage des orthophosphates .....	52
II. 2. Méthodes de suivi et d'analyse de la biomasse .....	52
II. 2. a. Mesure de la DCO.....	52
II. 2. b. Mesure de l'azote particulaire .....	52
II. 2. c. Mesure du phosphore intracellulaire .....	53
II. 2. d. Dosage des PHA .....	53
II. 2. e. Observations microscopiques.....	54
II. 3. Analyse de la diversité microbienne.....	55
<b>III. Calcul des paramètres cinétiques et stœchiométriques .....</b>	<b>55</b>
III. 1. Facteurs de conversion.....	55
III. 2. Estimation des concentrations en biomasse catalytique et PHA .....	55
III. 3. Calcul des cinétiques de réaction et des bilans de matière .....	56
III. 3. a. Cultures chemostat .....	56
III. 3. b. Cultures batch .....	57
III. 3. c. Vérification des bilans.....	58
III. 3. d. Rendements théoriques limites et rendements observés .....	58
<b>IV. Modèle cinétique .....</b>	<b>58</b>
IV. 1. Matrice stœchiométrique.....	59
IV. 2. Ecriture des équations cinétiques.....	60
IV. 2. a. Assimilation du phosphore extracellulaire .....	60
IV. 2. b. Croissance cellulaire.....	60
IV. 2. c. Production de PHA.....	60
IV. 2. d. Maintenance cellulaire .....	61

**RESULTATS ET DISCUSSION ..... 63**

**CHAPITRE I. REPRODUCTIBILITE DE LA SELECTION DE PRODUCTEURS DE PHA ET ETUDE DU DEVENIR DU CARBONE SELON LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE.....65**

**I. Introduction .....67**

**II. Sélection de producteurs de PHA.....67**

II. 1. Démarche expérimentale : mise en place de la sélection ..... 67

II. 2. Sélection microbienne sur acétate/butyrate ..... 69

II. 3. Sélection microbienne sur acétate/propionate ..... 70

*II. 3. a. Suivi des concentrations ..... 70*

*II. 3. b. Rendements observés..... 71*

II. 4. Sélection microbienne sur butyrate/propionate ..... 72

*II. 4. a. Suivi des concentrations ..... 72*

*II. 4. b. Rendements observés..... 73*

**III. Changement transitoire de la nature de la source de carbone.....75**

III. 1. Stratégie expérimentale ..... 75

III. 2. Alimentation exclusive en acétate..... 76

III. 3. Alimentation exclusive en propionate..... 77

**IV. Influence de la nature du substrat sur le devenir du carbone .....78**

IV. 1. Analyse macro-cinétique des cultures chemostat..... 78

IV. 2. Impact du substrat sur l'orientation du carbone..... 80

*IV. 2. a. Rendements observés en cellules catalytiques et PHA..... 80*

*IV. 2. b. Teneurs intracellulaires en PHA ..... 81*

*IV. 2. c. Maintenance cellulaire..... 83*

**V. Conclusion .....84**

**CHAPITRE II. ETUDE DES FACTEURS GOUVERNANT LA COMPETITION MICROBIENNE EN CULTURE CONTINUE.....87**

**I. Introduction .....89**

**II. Etude de la sélection microbienne.....89**

II. 1. Dynamiques de sélection sur un mélange intégrant du propionate..... 89

*II. 1. a. Acétate/propionate..... 89*

*II. 1. b. Butyrate/propionate..... 91*

*II. 1. c. Modification temporaire de la nature du substrat carboné..... 92*

II. 2. Influence des conditions opératoires sur la sélection microbienne ..... 93

*II. 2. a. Dynamiques de sélection selon les paramètres opératoires ..... 94*

*II. 2. b. Microorganismes dominants à l'issue des différentes conditions opératoires ..... 95*

II. 2. c. <i>Phylogénie des microorganismes majoritairement sélectionnés</i> .....	97
<b>III. Discussion : orientation de la compétition microbienne</b> .....	<b>98</b>
III. 1. Effet du taux de dilution .....	98
III. 2. Effet de la nature de la source de carbone .....	100
III. 3. Effet du degré de limitation en phosphore .....	102
<b>IV. Conclusion</b> .....	<b>104</b>
<b>CHAPITRE III. INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR LES</b>	
<b>POTENTIALITES DE PRODUCTION DE PHA DES CONSORTIA SELECTIONNE</b> .....	<b>107</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>109</b>
<b>II. Cinétiques de production de PHA en régime dynamique</b> .....	<b>109</b>
II. 1. Démarche expérimentale menée en réacteurs batch .....	109
II. 2. Analyse cinétique des cultures batch .....	110
II. 2. a. <i>Capacités de production de PHB d'un consortium sélectionné sur acétate/butyrate</i> ....	110
II. 2. b. <i>Capacités de production de P(3HB-co-3HV) d'un consortium sélectionné sur acétate/butyrate</i> .....	111
II. 2. c. <i>Capacités de production de P(3HB-co-3HV) de consortia sélectionnés sur acétate/propionate</i> .....	112
II. 2. d. <i>Capacités de production de P(3HB-co-3HV) d'un consortium sélectionné sur butyrate/propionate</i> .....	115
II. 2. e. <i>Capacités de production de PHA sur substrats uniques</i> .....	116
<b>III. Evaluation des potentialités de production de PHA des populations sélectionnées ...</b>	<b>118</b>
III. 1. a. <i>Potentialités de production de PHA selon la composition des consortia sélectionnés</i> ..	119
III. 1. b. <i>Potentialités de production de PHA selon le taux de phosphore intracellulaire</i> .....	120
III. 1. c. <i>Evaluation des paramètres cinétiques des populations microbiennes</i> .....	122
<b>IV. Conclusion</b> .....	<b>124</b>
<b>CHAPITRE IV. INFLUENCE DU TYPE DE LIMITATION NUTRITIONNELLE SUR LES</b>	
<b>PERFORMANCES DE PRODUCTION DE PHA</b> .....	<b>127</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>129</b>
<b>II. Analyse des cinétiques selon la carence nutritionnelle</b> .....	<b>130</b>
II. 1. Effets d'une carence en azote .....	130
II. 2. Compléments au modèle cinétique .....	133
II. 2. a. <i>Processus de production de PHA</i> .....	134
II. 2. b. <i>Processus de croissance cellulaire</i> .....	136
II. 2. c. <i>Processus de maintenance cellulaire</i> .....	137
II. 2. d. <i>Fraction en propionate consommé</i> .....	139
II. 3. Représentation des régimes dynamiques .....	140

<b>III. Performances de production de PHA du réacteur continu bi-étagé .....</b>	<b>142</b>
III. 1. Démarche expérimentale menée dans l'étage de production de PHA.....	142
III. 2. Analyse cinétique et stœchiométrique des étages de production.....	143
III. 2. a. Effets d'un excès de propionate.....	144
III. 2. b. Influence de la fraction en propionate dans le mélange carboné.....	146
III. 2. c. Influence du degré de limitation en azote .....	147
III. 3. Optimisation du réacteur continu bi-étagé.....	150
III. 3. a. Levée de la limitation en azote dans l'étage de production.....	150
III. 3. b. Définition des conditions optimales du réacteur bi-étagé.....	151
<b>IV. Conclusion.....</b>	<b>153</b>
<b>CHAPITRE V. EFFETS DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA COMPOSITION DU</b>	
<b>COPOLYMERE P(3HB-co-3HV) .....</b>	<b>155</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>157</b>
<b>II. Effets des paramètres opératoires sur la teneur en 3HV .....</b>	<b>157</b>
II. 1. Influence de la fraction en propionate consommée .....	157
II. 2. Influence de la sélection microbienne .....	160
II. 3. Impact de la nature du substrat carboné associé au propionate .....	162
II. 4. Influence du type de limitation nutritionnelle sur la teneur en 3HV.....	164
II. 5. Conséquences sur la définition des conditions optimales du réacteur bi-étagé .....	166
<b>III. Orientation du profil de fermentation lors de l'acidogénèse .....</b>	<b>169</b>
III. 1. Production d'AGV à partir de pelures de pommes de terre .....	169
III. 2. Discussion : mise en œuvre d'un étage de fermentation acidogène.....	171
<b>IV. Conclusion.....</b>	<b>173</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>175</b>
<b>I. Rappel du contexte et description de l'approche scientifique .....</b>	<b>177</b>
<b>II. Résultats majeurs .....</b>	<b>178</b>
<b>III. Perspectives .....</b>	<b>181</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>183</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>205</b>



---

# LISTE DES FIGURES

---

<i>Figure 1. Production, utilisation et devenir mondial des résines de polymère, des fibres synthétiques et des additifs (entre 1950 et 2015 ; en millions de tonnes) (d'après Geyer et al., (2017)).</i>	3
<i>Figure 2. Missions assurées dans le cadre du projet de recherche ANR LOOP4PACK et connexions entre les partenaires du projet.</i>	6
<i>Figure 3. Structure générale des polyhydroxyalcanoates (Lee, 1996). R désigne la chaîne latérale déterminant le type de monomères (si <math>R \leq 2</math>, scl-PHA ; si <math>R &gt; 2</math>, mcl-PHA), et n, le nombre de répétition (compris entre 100 et 30000).</i>	11
<i>Figure 4. Schémas de PHA de différentes microstructures. Sphères bleues : 3HB ; sphères orange : 3HV. (a) homopolymère PHB ; (b) copolymère P(3HB-co-3HV) avec une distribution aléatoire ; (c) copolymère P(3HB-co-3HV) en blocs (Koller, 2018a).</i>	12
<i>Figure 5. Diagramme d'état d'un thermoplastique semi-cristallin.</i>	12
<i>Figure 6. Modèle d'un granule de PHB in vivo chez R. eutropha H16 (d'après Bresan et al., 2016). Les protéines constitutives de la couche superficielle sont symbolisées par des globules de différentes couleurs. La dimension de la couche en surface est agrandie par rapport au noyau de polymère pour une meilleure visibilité.</i>	15
<i>Figure 7. Voies d'entrée de l'acétate et du propionate dans le métabolisme central carboné (Grousseau, 2012).</i>	16
<i>Figure 8. Représentation schématique des mécanismes de régulation liées à la dissociation des AGV dans le cytoplasme (d'après Russel, 1992).</i>	17
<i>Figure 9. Schéma métabolique de la biosynthèse de P(3HB-co-3HV) à partir de l'acétyl-CoA, du butyryl-CoA et du propionyl-CoA (Grousseau, 2012).</i>	18
<i>Figure 10. Régulation enzymatique du métabolisme de production de PHA chez C. necator (Grousseau, 2012).</i>	20
<i>Figure 11. Procédé de production de PHA en cultures microbiennes mixtes (d'après Serafim et al., 2008a).</i>	23
<i>Figure 12. Relation entre le taux de croissance spécifique (<math>\mu</math>) et la concentration du substrat limitant de la croissance S selon l'équation de Monod.</i>	29
<i>Figure 13. Evolution des concentrations en cellules (<math>X_c</math>) et substrat (S) et du taux de croissance (<math>\mu</math>) durant le régime transitoire, pour un chemostat opéré avec un taux de dilution <math>D = 0,16 \text{ h}^{-1}</math>. Le régime permanent est atteint après cinq temps de séjour (TSH), indépendamment du taux de dilution. Le taux de décès est ici négligé.</i>	30
<i>Figure 14. Evolution des concentrations en substrat (S) et cellules (<math>X_c</math>) en fonction du taux de dilution (D) appliqué, pour un microorganisme ayant un taux de croissance spécifique maximal (<math>\mu_{max}</math>) égal à <math>1,0 \text{ h}^{-1}</math>. <math>D_c</math> représente le taux de dilution critique.</i>	31
<i>Figure 15. Propriétés de croissance de deux microorganismes A (r-strategist) et B (K-strategist), tel que <math>\mu_{max}(A) &gt; \mu_{max}(B)</math> et <math>K_S(A) &lt; K_S(B)</math>.</i>	32
<i>Figure 16. Zone de double limitation nutritionnelle (DLN) pour des cultures mixtes sélectionnées en chemostat. Chaque valeur correspond à l'observation d'un régime pseudo-permanent. Les résultats obtenus par Cavallé</i>	

sont représentés par des cercles noirs, ceux issus de la thèse de Frank (1999) par des cercles blancs et ceux de Hao et Chang (1987) par des cercles gris. Les lignes correspondent aux frontières de la zone DLN. ....	34
<i>Figure 17. Rendements observés en cellules catalytiques (<math>X_c</math>) et PHB par rapport au substrat (<math>R_{(X_c/S)}</math> et <math>R_{(PHB/S)}</math>, respectivement) et de <math>X_c</math> par rapport au phosphore (<math>R_{(X_c/P)}</math>) en fonction du degré de limitation phosphore appliqué (<math>(C/P)_{app}</math>) pour une culture continue conduite à <math>D = 0,045 \text{ h}^{-1}</math> ; la zone de DLN est représentée en gris (Cavaillé et al., 2016). ....</i>	35
<i>Figure 18. Représentation des taux de phosphore intracellulaires minima et maxima en fonction du taux de dilution appliqués ; les traits en pointillés donnent une estimation de la zone de DLN (A). Teneurs en PHB maximales, et taux de phosphore intracellulaires correspondants, atteintes aux différents taux de dilution (B) (Cavaillé, 2015). ....</i>	36
<i>Figure 19. Répartition des principaux pools de molécules phosphorées et effets d'une limitation en phosphore ; représentation de la relation linéaire entre le besoin minimal en phosphore des cellules et le taux de croissance spécifique (Cavaillé, 2015). ....</i>	37
<i>Figure 20. Evolution de la vitesse spécifique maximale de production de PHB (<math>q_{PHBmax}</math>) en fonction du taux de phosphore intracellulaire (<math>P_{in}</math>) en réacteur batch, à partir de populations sélectionnées en chemostat en limitation C&amp;P avec acétate (AA) et un mélange acétate/butyrate (AA/AB). Les traits continus représentent les valeurs obtenues par le modèle, établies à partir d'une fonction d'Haldane modifiée (Cavaillé, 2015). ....</i>	38
<i>Figure 21. Démarche expérimentale, objectifs scientifiques et structure de la thèse. ....</i>	44
<i>Figure 22. Schéma du réacteur bi-étagé, avec à gauche le réacteur dédié à la sélection microbienne, et à droite celui à la production de PHA, en série du 1<sup>er</sup>. ....</i>	49
<i>Figure 23. Schéma d'un respiromètre, dans lequel sont conduites les expérimentations en batch. ....</i>	49
<i>Figure 24. Stratégie de degré de limitation en phosphore imposée dans les étages de sélection microbienne. ....</i>	50
<i>Figure 25. Représentation de la stratégie expérimentale adoptée. ....</i>	50
<i>Figure 26. Représentation des processus établis pour le modèle cinétique. ....</i>	59
<i>Figure 27. Zone de double limitation nutritionnelle (DLN) pour des cultures mixtes sélectionnées en chemostat présentée en bibliographie (Figure 16) et à laquelle ont été ajoutés les résultats obtenus lors de cette étude (symbolisés par des losanges rouges. Chaque valeur correspond à un régime pseudo-permanent. Les lignes en pointillé correspondent aux frontières de la zone DLN. ....</i>	68
<i>Figure 28. Stratégie d'augmentation de la charge organique en entrée de l'étage de sélection lors du démarrage des campagnes avec une alimentation avec un mélange intégrant du propionate. ....</i>	68
<i>Figure 29. Synoptique des conditions expérimentales imposées au cours des cultures dans l'étage de sélection. ....</i>	69
<i>Figure 30. Evolution des concentrations en PHA et cellules catalytiques (<math>X_c</math>) (A), ainsi que celles en acétate (AA), butyrate (AB) et phosphore soluble (B) en fonction du <math>(C/P)_{app}</math> et du nombre de temps séjour hydraulique (TSH). ....</i>	69
<i>Figure 31. Evolution des concentrations en PHA et cellules catalytiques (<math>X_c</math>) en fonction du <math>(C/P)_{app}</math> et du nombre de temps de séjour (TSH) pour des cultures alimentées en acétate/propionate, respectivement lors des campagnes A1 (A) et A2 (B). ....</i>	70
<i>Figure 32. Rendements observés en biomasse catalytique (<math>X_c</math>) et PHA par rapport au substrat carboné (<math>R_{(X_c/S)}</math> et <math>R_{(PHA/S)}</math> respectivement) et de <math>X_c</math> par rapport au phosphore (<math>R_{(X_c/P)}</math>) selon le degré de limitation en phosphore ; évolution de la direction des flux de consommation du carbone entre cellules catalytiques (<math>X_c</math>), PHA et</i>	

<i>maintenance (m) selon le degré de limitation en phosphore, lors d'une alimentation avec un mélange propionate/acétate. Les valeurs indiquées ont été calculées à partir des deux campagnes. ....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 33. Evolution des concentrations en PHA et cellules catalytiques (<math>X_c</math>) en fonction du <math>(C/P)_{app}</math> et du nombre de temps de séjour (TSH) pour des cultures alimentées en butyrate/propionate, respectivement lors des campagnes B1 (A) et B2 (B). ....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 34. Rendements observés en biomasse catalytique (<math>X_c</math>) et PHA par rapport au substrat carboné (<math>R_{(X_c/S)}</math> et <math>R_{(PHA/S)}</math> respectivement) et de <math>X_c</math> par rapport au phosphore (<math>R_{(X_c/P)}</math>) selon le degré de limitation en phosphore ; évolution de la direction des flux de consommation du carbone entre cellules catalytiques, PHA et maintenance (m) selon le degré de limitation en phosphore, lors d'une alimentation avec un mélange propionate/butyrate. Les valeurs à gauche et à droite de la ligne de démarcation correspondent respectivement à celles de la campagne B1 et B2. ....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 35. Taux de cellules lessivées en fonction du temps de séjour hydraulique (TSH) d'une population dont la croissance serait nulle (<math>\mu = 0 \text{ h}^{-1}</math>). ....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 36. Evolution des concentrations en acétate (AA), propionate (AP), PHA, cellules catalytiques et %PHA en fonction de nombre de temps de séjour (TSH) lors d'une alimentation transitoire en acétate (A). Evolution des rendements observés et du coefficient de maintenance (B). ....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 37. Evolution des concentrations en acétate (AA), propionate (AP), PHA, cellules catalytiques et %PHA en fonction de nombre de temps de séjour (TSH) lors d'une alimentation transitoire en propionate (A). Evolution des rendements observés et du coefficient de maintenance (B). ....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 38. Rendements en biomasse catalytique (<math>X_c</math>) et PHA en fonction de la nature de la source de carbone pour des degrés de limitation en phosphore <math>(C/P)_{app}</math> de 250 (A) et 325 <math>\text{Cmol.Pmol}^{-1}</math> (B). La valeur des rendements observés à <math>(C/P)_{app} = 325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}</math> pour le substrat AP/AB est différenciée des autres car il s'agit du seul substrat pour lequel la valeur du degré de limitation a été appliquée directement, sans imposer de <math>(C/P)_{app}</math> inférieurs préalables. ....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 39. Evolution du rendement observé de conversion du phosphore en cellules catalytiques (<math>R_{(X_c/P)}</math>) en fonction du degré de limitation en phosphore appliqué <math>(C/P)_{app}</math> dans la zone de double limitation nutritionnelle (DLN) selon la nature de la source de carbone (A). Evolution de la teneur intracellulaire en PHA (%PHA) en fonction du rendement observé <math>R_{(X_c/P)}</math> selon la nature de la source de carbone (B). ....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 40. Evolution du coefficient de maintenance en fonction du <math>(C/P)_{app}</math> dans la zone de double limitation nutritionnelle (DLN) selon la nature de la source de carbone (A). Evolution du coefficient de maintenance en fonction du rendement observé <math>R_{(X_c/P)}</math> selon la nature de la source de carbone (B). ....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 41. Dynamiques de sélection sur acétate/propionate, respectivement durant la campagne A1 (A) et A2 (B) : abondance relative des populations bactériennes en fonction du nombre de TSH et du <math>(C/P)_{app}</math>. Les genres bactériens représentant moins de 4% de l'ADN 16S total ont été regroupés sous la dénomination « Autres ». ....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 42. Dynamiques de sélection sur butyrate/propionate, respectivement durant la campagne B1 (A) et B2 (B) : abondance relative des populations bactériennes en fonction du nombre de TSH et du <math>(C/P)_{app}</math>. Les genres bactériens représentant moins de 4% de l'ADN 16S total ont été regroupés sous la dénomination « Autres ». ....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 43. Dynamiques de sélection lors d'un changement transitoire de la nature du substrat carboné, respectivement avec une alimentation exclusive en acétate (A) et propionate (B). Le premier prélèvement (0 TSH) correspond à l'état de référence, auquel le mélange acétate/propionate a été remplacé par l'acétate (ou le propionate). Le deuxième prélèvement (après 3 TSH) correspond à la fin de la durée du changement de</i>	



<i>substrat, autrement dit la réintroduction du mélange en entrée. Le dernier prélèvement correspond au prélèvement 3 TSH après la réintroduction du mélange.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 44. Dynamiques de sélection microbienne en culture continue pour un taux de dilution similaire, en fonction de la nature de la source de carbone, du degré de limitation en phosphore <math>(C/P)_{app}</math> et du temps de séjour hydraulique (TSH).....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 45. Souches microbiennes dominantes et leurs abondances relatives obtenues en culture continue en double limitation C&amp;P pour des taux de dilution similaires, en fonction de la nature de la source de carbone et du degré de limitation en phosphore <math>(C/P)_{app}</math>.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 46. Identification taxonomique des genres microbiens sélectionnés.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 47. Propriétés de croissance d'Acinetobacter spp. (<math>\mu_{max} = 0,55 h^{-1}</math> et <math>K_c 0,10 = C_{mmol.L^{-1}}</math>) et de Zoogloea spp. (<math>\mu_{max} = 0,35 h^{-1}</math> et <math>K_c 0,05 = C_{mmol.L^{-1}}</math>) avec une alimentation en acétate, selon la représentation de Monod.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 48. Modélisation de l'évolution des concentrations d'Acinetobacter spp. et de Zoogloea spp. en culture continue alimentée en acétate, selon le nombre de temps de séjour, respectivement avec un taux de dilution <math>D = 0,21 h^{-1}</math> (A) et <math>D = 0,12 h^{-1}</math> (B).....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 49. Propriétés de croissance d'Acinetobacter spp. et de Malikia spp., selon la représentation de Monod, respectivement avec une alimentation en acétate (A) et un mélange acétate/butyrate (B).....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 50. Modélisation de l'évolution des concentrations d'Acinetobacter spp. et de Malikia spp. en culture continue à un taux de dilution <math>D = 0,21 h^{-1}</math>, selon le nombre de temps de séjour, respectivement avec une alimentation en acétate (A) et un mélange acétate/butyrate (B).....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 51. Propriétés de croissance d'Acinetobacter spp. et de Malikia spp. sur acétate, en fonction du degré de limitation P appliqué (A). Modélisation de l'évolution des concentrations d'Acinetobacter spp. et de Malikia spp. en culture continue avec une alimentation en acétate et un taux de dilution <math>D = 0,16 h^{-1}</math>, selon le nombre de temps de séjour, et le degré de limitation P appliqué (B).....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 52. Synoptique des cultures réalisées en réacteur batch à partir des cultures de l'étage de sélection correspondantes. Les valeurs encadrées indiquent le ratio C/P appliqué dans l'étage de sélection. Les lettres A, B, C au début de chaque nom de batch font référence au mélange carboné avec lequel a été opéré la sélection, avec A : acétate/propionate, B : butyrate/propionate et C : acétate/butyrate.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 53. Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques (<math>X_c</math>) et de la teneur en PHB (A), ainsi que celles en acétate (AA) et butyrate (AB) (B) au cours du batch C1a.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 54. Evolution des concentrations en propionate (AP) et butyrate (AB) au cours du batch opéré avec une population microbienne préalablement sélectionnée sur un mélange acétate/butyrate (batch C1b).....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 55. Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques (<math>X_c</math>) et de la teneur en PHA (A), ainsi que celles en propionate (AP) et acétate (AA) (B) au cours du batch opéré avec consortia microbien sélectionné sur un mélange acétate/propionate à un <math>(C/P)_{app}</math> de <math>150 C_{mol.Pmol^{-1}}</math> (batch A2a).....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 56. Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques (<math>X_c</math>) et de la teneur en PHA (A), ainsi que celles en propionate (AP) et acétate (AA) (B) au cours du batch opéré avec consortia microbien sélectionné sur un mélange acétate/propionate à un <math>(C/P)_{app}</math> de <math>325 C_{mol.Pmol^{-1}}</math> (batch A2f).....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 57. Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques (<math>X_c</math>) et de la teneur en PHA (A), ainsi que celles en propionate (AP) et butyrate (AB) (B) au cours du batch B2b.....</i>	<i>115</i>

<i>Figure 58. Vitesses spécifiques moyennes de consommation des substrats selon la nature de la source de carbone durant la phase d'accumulation (A). Vitesses spécifiques moyennes de croissance, stockage et maintenance selon la nature de la source de carbone (B).</i> .....	117
<i>Figure 59. <math>q_{PHAmax}</math> obtenus en régime dynamique et compositions des consortia microbiens correspondantes en fonction de la nature de la source de carbone et du degré de limitation en phosphore <math>(C/P)_{app}</math> imposé durant la phase de sélection (e.g. AA-154 : acétate et <math>(C/P)_{app} = 154 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}</math>).</i> .....	119
<i>Figure 60. Vitesses spécifiques moyennes (A) et rendements observés moyens (B) selon la nature de la source de carbone et le genre bactérien dominant correspondant, pour des teneurs intracellulaires en phosphore initiales <math>(P_{in,ini})</math> équivalentes.</i> .....	120
<i>Figure 61. Evolution de la vitesse spécifique maximale de production de PHA (<math>q_{PHAmax}</math>) en fonction du taux de phosphore intracellulaire <math>(P_{in})</math> en réacteur batch, selon la nature de la source de carbone and l'identité du genre microbien dominant. Le genre <i>Acinetobacter</i> est symbolisé par des carrés, <i>Malikia</i> par des cercles et <i>Zoogloea</i> par des triangles. Les traits pleins représentent les valeurs modélisées, établies par une fonction d'Haldane modifiée (Cavaillé, 2015). Les traits pointillés représentent les valeurs prédictives, basées sur le modèle.</i> .....	121
<i>Figure 62. Estimation de l'évolution de la vitesse spécifique maximale de production de PHA (<math>q_{PHAmax}</math>) en fonction du taux de phosphore intracellulaire <math>(P_{in})</math> en réacteur batch, selon la nature de la source de carbone pour <i>Malikia</i> (A), <i>Acinetobacter</i> (B), <i>Zoogloea</i> (C) et <i>Azonexus</i> (D).</i> .....	123
<i>Figure 63. Organisation et enjeux du chapitre</i> .....	129
<i>Figure 64. Evolution des concentrations en cellules catalytiques (<math>X_c</math>), PHA et azote ammoniacal (<math>N-NH_4^+</math>) en fonction du temps au cours du batch A2a (A) et A2f (B) ; Evolution du taux intracellulaire en phosphore <math>(P_{in})</math> et de la teneur en PHA au cours du batch A2a (C) et A2f (D).</i> .....	131
<i>Figure 65. Vitesses spécifiques moyennes de consommation du substrat carboné (<math>q_s</math>), de croissance cellulaire (<math>\mu</math>) et de production de PHA (<math>q_{PHA}</math>) durant les phases d'excès et de carence en azote pour les batch A2a (inoculé avec un consortium composé à 78% par <i>Acinetobacter</i>) (A) et A2f (inoculé avec un consortium composé à 57% par <i>Malikia</i>) (B). Rendements observés moyens en biomasse totale (<math>R_{(X_{tot}/S)}</math>), cellules catalytiques (<math>R_{(X_c/S)}</math>) et PHA (<math>R_{(PHA/S)}</math>) durant les phases d'excès et de carence en azote pour les batch A2a (C) et A2f (D).</i> .....	132
<i>Figure 66. Ensemble des flux considérés dans le modèle cinétique.</i> .....	134
<i>Figure 67. Relation entre la vitesse spécifique de production de PHA (<math>q_{PHA}</math>) et la teneur intracellulaire en phosphore <math>(P_{in})</math> établie par une fonction de Monod à partir des résultats obtenus avec acétate/propionate en conditions de carence en azote (A). Relation entre le <math>q_{PHA}</math> et le <math>P_{in}</math> individualisée pour chaque consortium sélectionnée (B). Consortium A : sélectionné à <math>325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}</math> ; Consortium B : sélectionné à <math>250 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}</math> ; Consortium C : sélectionné à <math>150 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}</math>.</i> .....	136
<i>Figure 68. Relation entre le taux de croissance spécifique (<math>\mu</math>) et la teneur intracellulaire en phosphore <math>(P_{in})</math> établie par une fonction linéaire à partir des résultats obtenus avec une alimentation en acétate/propionate.</i> .....	137
<i>Figure 69. Relation entre le coefficient de maintenance (<math>m</math>) et la teneur intracellulaire en phosphore <math>(P_{in})</math> établie par une fonction linéaire à partir des résultats obtenus avec une alimentation en acétate/propionate, en conditions d'excès et de carence en azote.</i> .....	138
<i>Figure 70. Relation entre la fraction en propionate consommé (<math>\%AP_{cons}</math>) et la teneur intracellulaire en phosphore <math>(P_{in})</math> établie par une fonction linéaire à partir des résultats obtenus avec une alimentation en acétate/propionate, en conditions d'excès et de carence en azote (A). Evolution de la fraction en propionate consommé en fonction du <math>\%PHA</math> instantané (<math>q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)</math>) (B).</i> .....	139

<i>Figure 71. Evolution des concentrations Xc, PHA, AA (acétate) et AP (propionate) au cours des batch A1a (A), A2a (B), A2b (C), A2c (D) et A2f (E). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.....</i>	<i>141</i>
<i>Figure 72. Synoptique des cultures réalisées dans l'étage de production du réacteur bi-étagé à partir des cultures de l'étage de sélection correspondantes. Les valeurs encadrées en orange indiquent le ratio C/P appliqué dans l'étage de sélection. Les lettres A, B, C au début de chaque nom de 2<sup>ème</sup> étage (en bleu) font référence au mélange carboné avec lequel a été opéré la sélection, avec A : acétate/propionate et B : butyrate/propionate.....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 73. Vitesses spécifiques moyennes et coefficient de maintenance moyen au cours des étages de production A1A (AP-résiduel) et A1A' (excès-AP) (A). Rendements observés moyens en fonction de la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate au sein des chemostat B1A et B1A' (B).....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 74. Evolution des concentrations Xc, PHA, AA (acétate) et AP (propionate) en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours des étages de production en continu A2A (A) et A2A (B). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.....</i>	<i>146</i>
<i>Figure 75. Vitesses spécifiques moyennes et coefficient de maintenance moyen en fonction de la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate au cours des étages de production en continu A2A (33 mol% AP) et A2B (66 mol% AP) (A). Rendements observés moyens en fonction de la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate au sein des chemostat A2A et A2B (B).....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 76. Evolution des concentrations Xc, PHA, AA (butyrate) et AP (propionate) en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours des étages de production en continu B1B (A), B1C (B) et B1D (C). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 77. Evolution du taux de croissance spécifique (<math>\mu</math>) en fonction du degré de limitation <math>(C/N)_{app}</math> dans l'étage de production (A). Evolution de la vitesse spécifique de production de PHA en fonction du taux de croissance spécifique (<math>\mu</math>) dans l'étage de production (B). Le trait continu représente la relation établie par Aragao (1996) en conditions de limitation N. Le trait discontinu représente la projection pour les résultats obtenus, selon cette même relation.....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 78. Evolution des concentrations Xc, PHA et de la teneur en PHA en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours de l'étage de production B1D avec le ratio C/N appliqué (<math>35 \text{ Cmol.Nmol}^{-1}</math>) (A) et en l'absence de limitation azote (B).....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 79. Evolution des concentrations Xc, PHA et de la teneur en PHA en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours de d'un étage de production au sein d'un procédé continu bi-étagé optimisé, respectivement lors d'une alimentation en acétate/propionate (A) et en butyrate/propionate (B).....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 80. Teneur en 3HV et rendement observé en 3HV par rapport au propionate (<math>R_{(3HV/AP)}</math>) selon la fraction en propionate consommé dans un mélange acétate/propionate durant la phase d'accumulation avec un consortia caractérisé par la dominance du genre Acinetobacter.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 81. Teneurs intracellulaires en PHA et teneurs en HV dans le polymère selon l'identité du genre microbien dominant à l'issue de cultures batch opérées sur un mélange acétate/propionate (A). Fraction en propionate consommé (<math>\%AP_{cons}</math>) et rendement observé en 3HV par rapport au propionate (<math>R_{(3HV/AP)}</math>) selon l'identité du genre microbien dominant (B).....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 82. Evolution de la teneur en PHA au sein des cellules (<math>\%PHA</math>) et de la teneur en 3HV au sein du polymère produit (<math>\%HV</math>) en fonction de nombre de temps de séjour (TSH) lors d'une alimentation transitoire en acétate (A) et en propionate (B) dans l'étage de sélection.....</i>	<i>162</i>
<i>Figure 83. Teneurs intracellulaires en PHA et teneurs en HV dans le polymère selon la nature de la source de carbone (acétate/propionate ou butyrate/propionate) lors de cultures batch opérées à partir de consortia avec</i>	

<i>une dominance de Malikia (A). Fraction en propionate consommé (%AP<sub>cons</sub>) et rendement observé en 3HV par rapport au propionate (<math>R_{(3HV/AP)}</math>) selon la nature de la source de carbone (B).</i>	163
<i>Figure 84. Evolution du taux de croissance spécifique (<math>\mu</math>), de la vitesse spécifique de production de 3HB (<math>q_{PHB}</math>), de la vitesse spécifique de production de 3HV (<math>q_{PHV}</math>) et de la teneur en 3HV dans le polymère (%3HV) au cours du batch A2c, opéré sur un mélange acétate/propionate, à partir d'un consortium microbien sélectionné à un ratio C/P de 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>.</i>	164
<i>Figure 85. Evolution du rendement (<math>R_{(3HV/AP)}</math>) en fonction du pourcentage en PHA instantané (<math>q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)</math>) au cours du batch A2c, en conditions d'excès et de carence en azote (A). Evolution du pourcentage en 3HV instantané (<math>q_{PHV}/q_{PHA}</math>) en fonction du pourcentage en PHA instantané (<math>q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)</math>) au cours du batch A2c, en conditions d'excès et de carence en azote (B).</i>	165
<i>Figure 86. Fractions respectives des différents AGV (acétate, propionate, butyrate et valérate) produits par fermentation acidogène à partir de pelures de pommes de terre, selon le pH de culture. Nomenclature : nC = non contrôlé.</i>	170
<i>Figure 87. Schéma général des paramètres opératoires gouvernant la production de PHA en procédé continu bi-étagé.</i>	182
<i>Figure 88. Observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif x100 de cultures microbiennes dans l'étage de sélection, alimentés avec un mélange acétate/propionate (A) ou butyrate/propionate (B), respectivement à 150, 250 et 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>. Les cellules sont colorées en rose, et les PHA en noir.</i>	209
<i>Figure 89. Observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif x100 de cultures microbiennes dans l'étage de production, préalablement sélectionnées avec un mélange acétate/propionate (conditions A2A et A2B). Les cellules sont colorées en rose, et les PHA en noir.</i>	210
<i>Figure 90. Observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif x100 de cultures microbiennes dans l'étage de production, préalablement sélectionnées avec un mélange butyrate/propionate (conditions B1A, B1C, B1E et B2A). Les cellules sont colorées en rose, et les PHA en noir.</i>	210
<i>Figure 91. Dynamiques de sélection dans l'étage de production, avec une alimentation en butyrate/propionate : abondance relative des populations bactériennes en fonction de la condition opératoire (et du taux de croissance résiduel associé). Les histogrammes « grisés » renseignent sur la distribution microbienne dans les étages de sélection à partir desquels ont été opérés les différents étages de production correspondants). Les genres bactériens représentant moins de 4% de l'ADN 16S total ont été regroupés sous la dénomination « Autres ».</i>	211
<i>Figure 92. Evolution des concentrations Xc, PHA, AA (acétate) et AP (propionate) au cours des batch A1a (A), A2a (B), A2b (C), A2c (D) et A2f (E). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.</i>	216
<i>Figure 93. Evolution des concentrations Xc, PHA, AB (butyrate) et AP (propionate) au cours du batch B2b. Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.</i>	217
<i>Figure 94. Evolution du pourcentage de 3HV instantané (<math>q_{PHV}/q_{PHA}</math>) en fonction du pourcentage en PHA instantané (<math>q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)</math>) en conditions de carence en phosphore et avec une alimentation exclusive en propionate. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par Grousseau (2012) (A). Evolution du pourcentage de 3HV instantané en fonction du pourcentage en PHA instantané avec une alimentation exclusive en propionate, en conditions d'excès et de carence en azote (B).</i>	218



---

# LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1. Comparaison des propriétés thermomécaniques de polymères (d'après Lee et al., (1995), Pereira et al., (2008), Koller et al., (2010), Laycock et al., (2013)).	14
Tableau 2. Production de P(3HB-co-3HV) en cultures pures ou génétiquement modifiées à l'échelle industrielle (d'après Koller and Mukherjee, 2022).	27
Tableau 3. Unités pilotes de production de P(3HB-co-3HV) en cultures microbiennes mixtes (Kourmentza et al., 2017).	28
Tableau 4. Composition du milieu d'alimentation de l'étage de sélection microbienne.	48
Tableau 5. Facteurs de conversion appliqués.	55
Tableau 6. Equations cinétiques en régime permanent dans le 1 <sup>er</sup> étage du réacteur bi-étagé.	57
Tableau 7. Equations cinétiques en régime permanent dans le 2 <sup>ème</sup> étage du réacteur bi-étagé.	57
Tableau 8. Valeur des rendements théoriques limites (Y) et expression des rendements observés (R).	58
Tableau 9. Matrice stœchiométrique du modèle cinétique.	59
Tableau 10. Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables selon la nature de la source de carbone, le taux de dilution et le degré de limitation en phosphore appliqués. Nomenclature : propionate (AP), acétate (AA), butyrate (AB), glucose (Glu), fructose (Fru).	79
Tableau 11. Caractéristiques métaboliques des populations microbiennes dominantes et paramètres opératoires favorisant leur sélection.	96
Tableau 12. Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables dans l'étage de production, selon le substrat utilisé, le degré de limitation P appliqué lors de la sélection et le degré de limitation N.	144
Tableau 13. Teneurs en 3HV au sein du copolymère P(3HB-co-3HV) dans l'étage de production du réacteur continu bi-étagé, selon les paramètres opératoires appliqués. Nomenclature : %AP : fraction en propionate dans l'alimentation de l'étage de production ; C/P : degré de limitation en P appliqué dans l'étage de sélection ; C/N : niveau de limitation en N imposé dans l'étage de production.	167
Tableau 14. Objectifs, paramètres opératoires et perspectives d'amélioration associés à chaque étage du procédé continu bi-étagé de production de PHA en cultures mixtes.	168
Tableau 15. Distribution des AGV selon la nature du substrat et le type d'inoculum utilisé. Toutes les études ont été réalisées en réacteur batch en conditions mésophiles (30 à 37°C). Le pH a été contrôlé à une même valeur 6,5 durant toute la durée de la fermentation, à l'exception de l'étude de Paillet (2017). Nomenclature : %MS : pourcentage de matières sèches ; %AGV : pourcentage de chaque AGV ; H-Ac : acide acétique ; H-pro : acide propionique ; n-But : acide butyrique et isobutyrique ; n-Val : acide valérique et isovalérique.	172
Tableau 16. Conditions opératoires et objectifs des différentes cultures batch. Nomenclature : - Pas de limitation en azote ; + Epuisement tardif de l'azote soluble ; ++ Epuisement rapide de l'azote soluble.	212
Tableau 17. Conditions opératoires et objectifs des différents étages de production.	213
Tableau 18. Vitesses spécifiques maximales obtenues en réacteurs batch selon les conditions expérimentales.	214

*Tableau 19. Paramètres cinétiques des différentes catégories de populations microbiennes selon la nature de la source de carbone.....215*

---

# NOMENCLATURE ET ABREVIATIONS

---

AA	Acide Acétique
AB	Acide Butyrique
ADF	Aerobic Dynamic Feeding, aussi désigné « feast and famine »
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AGV	Acides Gras Volatils
AN/AE	Anaérobie/Aérobie
AP	Acide Propionique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ARN	Acide RiboNucléique
BMP	Biological Methane Potential
C	Carbone
CI	Chromatographie Ionique
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de Carbone
CMM	Cultures Microbiennes Mixtes
(C/P) <sub>app</sub>	Ratio entre le substrat carboné et le phosphore appliqué
(C/P) <sub>cons</sub>	Ratio entre le substrat carboné et le phosphore consommé
CPG	Chromatographie en Phase Gaz
D	Taux de dilution
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DLN	Double Limitation Nutritionnelle
EPS	ExoPolySaccharides
GAO	Glycogen Accumulating Organisms
HB	3-hydroxybutyrate
HV	3-hydroxyvalerate



$k_{La}$	Coefficient volumique de transfert
$K_i$	Constante de demi-saturation du composé i
$K_i$	Constante d'inhibition
m	Coefficient de maintenance cellulaire
$m_{min,(N)}$	Coefficient de maintenance cellulaire minimal en conditions d'excès de azote
$m_{min,no(N)}$	Coefficient de maintenance cellulaire minimal en conditions de carence en azote
MES	Matière En Suspension
MS	Masse Sèche
MVS	Matière Volatile en Suspension
n	Constante liée aux phénomènes d'encombrement stérique
N	Azote
$N_t$	Azote Total
$N_p$	Azote particulaire
$NH_4^+$	Azote Ammoniacal
$O_2$	Dioxygène
P	Phosphore
PAO	Polyphosphate Accumulating Organisms
pb	Paire de bases
PHA	PolyHydroxyAlcanoate
PHB	PolyHydroxyButyrate
$PHA_{in}$	Taux de PHA intracellulaire
PHV	PolyHydroxyValérate
$P_{in}$	Taux de phosphore intracellulaire
$P_{in,crit}$	$P_{in}$ lorsque $\mu = 0$ en limitation phosphore
$P_{in,exp}$	$P_{in}$ lorsque $\mu = \mu_{max}$
$P_{in,lim}$	$P_{in}$ lorsque $\mu = 0$ sans limitation phosphore
$P_{in,max}$	$P_{in}$ maximal pour un $\mu$ donné sans limitation phosphore
$P_{in,min}$	$P_{in}$ minimal pour un $\mu$ donné en limitation phosphore
PolyP	Polyphosphate
Q	Débit volumique
$q_i$	Vitesse spécifique de production ou de consommation du composé i

$q_{i\_max}$	Vitesse spécifique maximale de production ou de consommation du composé i
$R_{(i/j)}$	Rendement observé de conversion du composé j en composé i
$r_i$	Vitesse de production ou de consommation du composé i
SBR	Sequencing Batch Reactor
$S_i$	Concentration du substrat i
$S_{i,e}$	Concentration du substrat en entrée
STEP	Station d'Épuration
T	Température
TSH	Temps de Séjour Hydraulique
V	Volume de liquide dans le réacteur
$X_c$	Biomasse Catalytique
$X_t$	Biomasse Totale
XP	Concentration en Phosphore intracellulaire
$X_{PHA}$	Concentration en PHA intracellulaire
$Y_{(i/j)}$	Rendement théorique limite de conversion du composé j en composé i
$\alpha$	Paramètre cinétique de la fonction Haldane
$\varepsilon$	Constante de Michaelis-Maenten
$\lambda$	Facteur d'amplification en limitation P dans les processus de maintenance (carence en N)
$\mu$	Taux de croissance
$\mu_{max}$	Taux de croissance maximale
$\sigma$	Facteur d'amplification en limitation P dans les processus de maintenance (excès de N)
$\psi$	Facteur d'amplification de la consommation spécifique de propionate

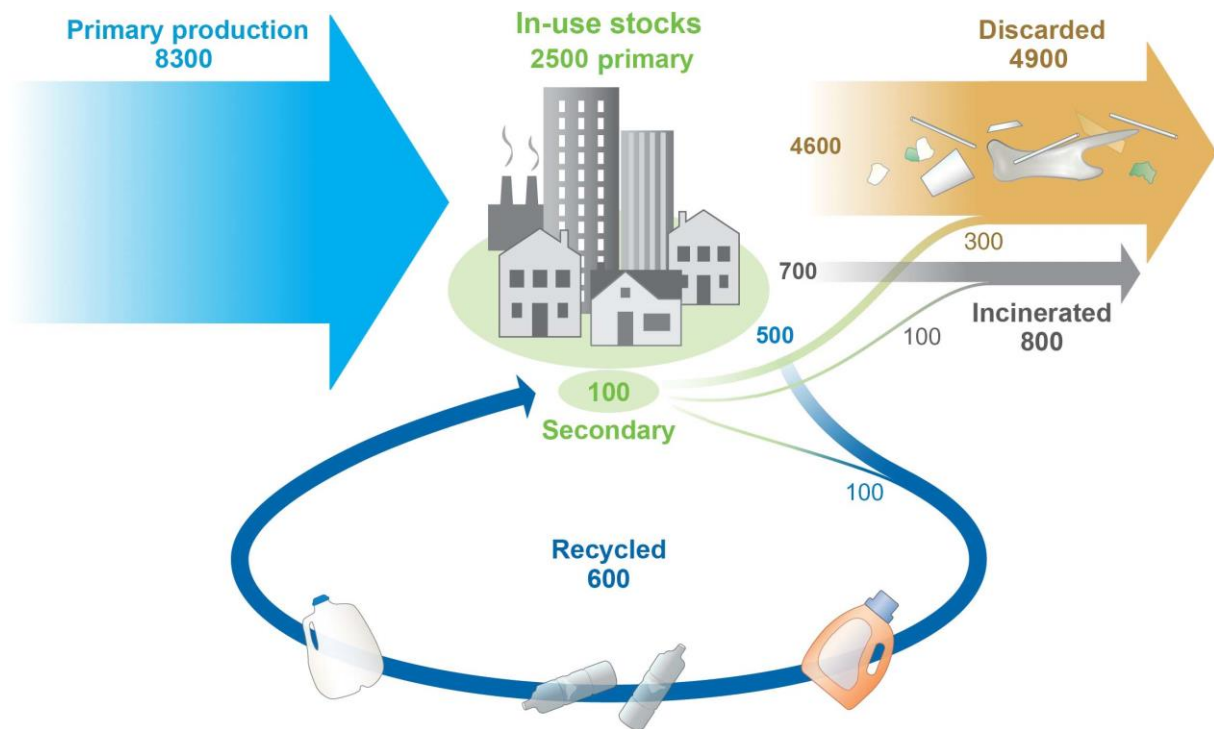


# **INTRODUCTION GENERALE**

---



Depuis le milieu du XXe, les plastiques se sont imposés comme un matériau omniprésent dans les sociétés modernes et leur utilisation connaît un essor qui ne cesse de croître. Avec une augmentation annuelle de 4%, la production mondiale de plastiques connaît une croissance exponentielle et s'élevait à 390,7 millions de tonnes en 2021 (Plastics Europe, 2022). Selon les prévisions, elle devrait tripler d'ici 2050 (Geyer, 2020). En 70 ans, ce sont plus de 9,5 milliards de tonnes de plastiques ont été produites, soit plus d'une tonne de plastiques pour chaque personne vivante aujourd'hui (Lebreton and Andrady, 2019). Le plus grand marché du plastique est celui de l'emballage qui représente 44% de la production. Sa croissance s'est notamment accélérée avec l'émergence progressive des contenants à usage unique en remplacement des contenants réutilisables à des contenants à usage unique (Plastics Europe, 2022). En conséquence, la part des plastiques dans les déchets solides municipaux est passée de moins de 1% en 1960 à plus de 10 % en 2005 (en masse) dans les pays à revenu intermédiaire et élevé (Jambeck et al., 2015).



**Figure 1.** Production, utilisation et devenir mondial des résines de polymère, des fibres synthétiques et des additifs (entre 1950 et 2015 ; en millions de tonnes) (d'après Geyer et al., (2017)).

L'utilisation croissante des plastiques génère des quantités considérables de déchets, qui finissent pour la plupart par atteindre le milieu marin. En effet, à ce jour, seuls 9% des plastiques produits sont recyclés, 12% incinérés et 79% d'entre eux s'accumulent dans les décharges ou les milieux naturels (Figure 1). En projetant les tendances actuelles de production et de gestion des déchets, environ 12 milliards de tonnes de déchets plastiques se seront accumulés dans les décharges ou l'environnement d'ici 2050 (Geyer et al., 2017). A l'heure actuelle, ce sont plus de 10 millions de déchets plastiques qui sont déversés chaque année dans les grands bassins océaniques (Boucher and Billard, 2019). La contamination des systèmes d'eau douce et des

habitats terrestres est également de plus en plus alertée (Wagner et al., 2014), tout comme la contamination environnementale par des fibres synthétiques (Dris et al., 2017). Les déchets plastiques sont devenus tant omniprésents dans l'environnement qu'ils sont maintenant considérés comme un indicateur géologique de l'ère anthropocène (Zalasiewicz et al., 2016). Enfin, outre les problèmes liés à leur élimination, les plastiques génèrent aussi une pollution par émission de carbone lors de leur phase de production (Meereboer et al., 2020).

En raison de besoins énergétiques de production nettement inférieurs, la substitution des polymères à base de pétrole par des polymères biosourcés et biodégradables font figure de solution potentielle, permettant de lutter à la fois contre le changement climatique et la pollution plastique (Gironi and Piemonte, 2011). Pour le moment, 90,2% des plastiques produits sont d'origine fossile (tels que l'éthylène ou le propylène). Les plastiques recyclés post-consommation et les plastiques biosourcés/bioattribués ne représentent donc respectivement que 8,3% et 1,5% de la production mondiale de plastique (Plastics Europe, 2022). Grâce aux nouvelles approches systémiques de l'économie et à la transition amorcée vers une utilisation de plastiques plus durables, la production de plastiques biosourcés/non biodégradables et biodégradables prévue de 2020 à 2023 devrait toutefois augmenter de 13 % par an (European Bioplastics, 2020). De plus, les principaux producteurs d'emballages en plastique ont pour but d'atteindre 100% de plastiques recyclés, réutilisables ou biodégradables dans leurs produits d'ici 2025 (New Plastic Economy, 2019).

Malgré une recherche dynamique à leur sujet, les bioemballages disponibles dans le commerce ne sont pas encore en mesure de répondre à la demande sociétale (Guillard et al., 2018). Les biopolymères commerciaux sont soit issus de ressources alimentaires (e.g. PLA, PBS, mélanges constitués d'amidon ou PHB), soit non totalement biodégradables en milieux naturels (PLA), soit non résistants à l'eau (mélanges à base d'amidon) (Koller, 2014). Parmi eux, les PHA (polyhydroxyalcanoates) apparaissent comme des candidats prometteurs grâce à leur complète biodégradabilité, leur nature biosourcée (synthétisables par une grande diversité de microorganismes) et leur caractère biocompatible (Koller et al., 2010). Néanmoins, les PHA disponibles sur le marché connaissent encore une faible diffusion, du fait de propriétés fonctionnelles limitées, d'un coût élevé et d'un impact environnemental conséquent.

Le PHA le plus largement produit, le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), est fragile et cassant (Li et al., 2016). Incorporer des monomères à chaînes latérales plus longues, telles que le 3HV (3-hydroxyvalérate), permet, cependant, d'améliorer les propriétés thermomécaniques des matériaux et par extension, d'augmenter le potentiel d'application. En revanche, ces améliorations ne se vérifient qu'à condition que la teneur en 3HV au sein du copolymère P(3HB-co-3HV) soit significative (à minima supérieure à 10 mol%, d'après Savenkova et al., (2000)).

En plus des problématiques liées à leurs caractéristiques fonctionnelles, le prix de PHA commerciaux, estimé entre 4,5 et 12 €/kg (Kourmentza et al., 2017), est loin de rivaliser avec celui des polymères conventionnels dont le prix est jusqu'à 15 fois plus faible. Ce coût élevé s'explique, en partie, par l'utilisation de substrats hautement purifiés (Nielsen et al., 2017). Ce problème pourrait être résolu en exploitant les capacités des souches microbiennes à synthétiser des PHA à partir d'une large gamme de matières premières, y compris des résidus issus de l'agriculture ou de l'industrie agro-alimentaire (Pagliano et al., 2017). En France, les co-produits d'origine végétale représentent, par exemple, plus de 11 millions de tonnes de matière sèche en 2016 (RESEDA, 2017). Cette approche a, par conséquent, également pour vocation à répondre aux velléités de développement de nouvelles voies de valorisation des co-produits (e.g. moûts de fermentation, drêches, tourteaux, résidus de culture ou encore mélasses) par les acteurs du secteur.

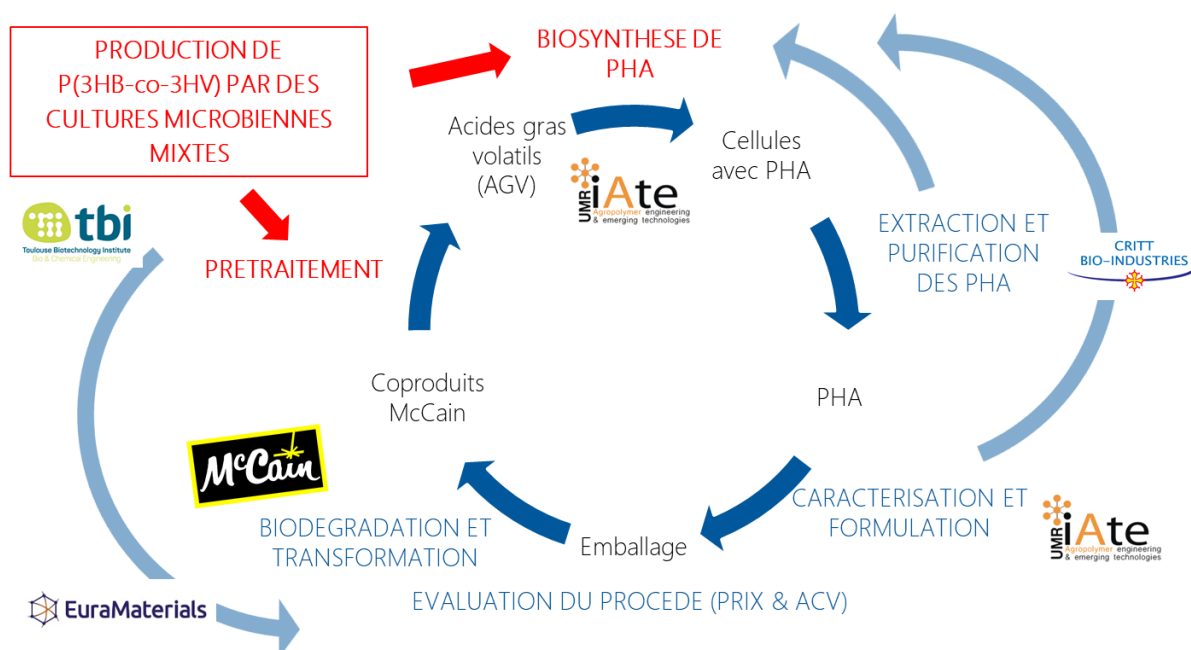
Par ailleurs, la production actuelle de PHA à échelle industrielle est exclusivement réalisée en cultures pures, à partir de souches bactériennes sélectionnées pour leurs capacités d'accumulation de PHA (Koller and Mukherjee, 2022). Cependant, les contraintes techniques imposées par les cultures pures (stérilité, substrat purifié...) participent à l'élévation du coût de production. Effectivement, les opérations de stérilisation et de maintenance des réacteurs représentent, à elles seules, près de 11% des coûts totaux (Venkateswar Reddy and Venkata Mohan, 2012). Pour réduire les CAPEX et les OPEX, un intérêt croissant s'est porté sur le recours aux cultures microbiennes mixtes (CMM), qui ne nécessitent pas de stérilisation et qui pourraient profiter d'infrastructures déjà existantes (Salehizadeh et Van Loosdrecht, 2004). En tenant compte du fait que les organismes stockant les PHA sont naturellement présents dans les boues activées, une grande partie de la recherche et du développement de la production de PHA en CMM s'est concentrée sur l'utilisation des déchets issus des procédés de traitement des eaux usées (Valentino et al., 2017). En outre, la production de PHA en CMM représente un moyen pour récupérer le carbone organique brut des eaux usées et une opportunité de bio-raffinage de résidus (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007). Cette démarche s'inscrit ainsi plus globalement dans le paradigme d'économie circulaire et la restructuration actuelle des stations d'épuration en usine de valorisation des eaux usées (Arcos-Hernández et al., 2015).

La faisabilité de la production de PHA en MMC à partir de déchets a été éprouvée par plusieurs projets européens à l'échelle pilote (Mannina et al., 2020). A titre d'exemple, le projet PHARIO, projet de l'autorité de l'eau hollandaise, est parvenu à opérer une production de PHA à partir de consortia microbiens issus de boues activées et de flux riches en acides gras volatils (AGV) fermentés, à un prix compétitif par rapport aux prix actuels du marché des PHA (Bengtsson et al., 2017 ; Werker et al., 2018). De plus, en réponse aux nouvelles directives européennes, plusieurs projets au sein du programme H2020 ont vu le jour. Le projet SMART-Plant (2019), développé par le groupe de recherche GENOCOV, a cherché à démontrer la possibilité de récupérer des PHA et de la struvite à partir des procédés biologiques d'élimination du phosphore. Enfin, les projets YPACK (2019) et VOLATILE (2019) visent, respectivement, à optimiser les applications d'emballage



alimentaire du PHA et à développer une plate-forme de production d'AGV intégrée aux usines de digestion anaérobie existantes.

Dans ce contexte et en synergie avec les différentes initiatives européennes, le **projet LOOP4PACK, auquel est affilié ces travaux de thèse, a pour objectif de contribuer au développement d'une filière de valorisation de résidus de l'agro-industrie (pelures de pommes de terre) en PHA spécifiques, et plus particulièrement, en P(3HB-co-3HV) avec une teneur élevée en 3HV**. Le projet englobe toutes les étapes de la filière, à savoir successivement la transformation des co-produits en AGV, la biosynthèse des PHA à partir des AGV produits, leur récupération, leur caractérisation et formulation et enfin l'évaluation globale du coût couplée à l'analyse de cycle de vie (Figure 2). Il implique les partenaires suivants : l'Unité Mixte de Recherche IATE de l'Université de Montpellier (UMR IATE), l'Institut de Biotechnologie de Toulouse affilié à l'Institut Nationale des Sciences Appliquées de Toulouse (TBI, INSA), le Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie de l'INSA de Toulouse (CRITT BioIndustries - INSA), le pôle de compétitivité EuraMaterials et l'entreprise McCain Fo. La production de PHA est évaluée, en parallèle, selon deux modèles études : la culture pure avec la souche *Cupriavidus necator* (prise en charge par IATE) et les cultures mixtes. La culture pure permet un système de production maîtrisé et une meilleure compréhension des mécanismes de biosynthèse mis en jeu en fonction des paramètres opératoires.



**Figure 2.** Missions assurées dans le cadre du projet de recherche ANR LOOP4PACK et connexions entre les partenaires du projet.

En cultures mixtes, la phase de production de PHA est précédée d'une phase d'enrichissement en bactéries accumulatrices de PHA au sein des boues activées. Cette dernière est généralement conduite en appliquant des conditions dynamiques, telles que des régimes d'alimentation discontinus (système ADF ou « feast and

famine ») ou des conditions redox alternées (procédé AN/AE), qui favorisent une dominance en bactéries capables de stocker transitoirement le carbone (sous forme de PHA) (Majone et al., 1999). L'efficacité de ces stratégies de sélection a été largement démontrée (De Donno Novelli et al., 2021), toutefois elles présentent certains inconvénients, intrinsèques au mode de culture en discontinu (temps d'arrêt lié à la préparation des réacteurs, fluctuation de la qualité des lots...) (Koller and Braunegg, 2015). C'est pourquoi il a été décidé d'explorer une méthode alternative consistant à réaliser la sélection microbienne et la production de PHA en cultures continues. Cette stratégie a déjà été expérimentée par Cavaillé et al., (2016), qui ont opéré une sélection efficace de producteurs de PHB en imposant une limitation en phosphore. Le principe de sélection repose sur des observations effectuées en milieux naturels, qui font état d'un lien supposé entre la capacité des organismes à stocker des PHA et leur forte affinité pour le phosphore. En effet, l'étude de mésocosmes d'eau de mer a permis de mettre en évidence que dans un milieu riche en carbone et pauvre en phosphore, la capacité à accumuler du carbone sous forme de réserves intracellulaires procurait un avantage compétitif aux bactéries (Øvreås et al., 2003). De plus, il a été rapporté par (Godwin and Cotner, 2015) que des bactéries issues de lacs et cultivées sur des milieux pauvres en phosphore possédaient la capacité à stocker les composés riches en carbone.

Dans ces conditions, les deux enjeux majeurs de cette thèse sont les suivants :

- **enjeu technologique : développer un procédé de production en P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé à partir de cultures microbiennes mixtes.**
- **enjeu scientifique : évaluer l'influence de la source de carbone sur la sélection microbienne et l'accumulation de PHA.**



# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

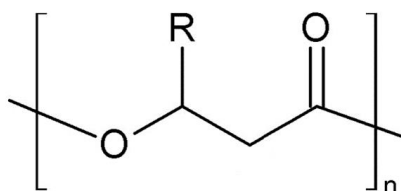
---



# **I. Polyhydroxyalcanoates (PHA)**

## **I. 1. Structure**

Les PHA sont des polyesters d'hydroxyalcanoates naturellement produits par de multiples microorganismes à partir de ressources renouvelables comme les carbohydrates, les lipides, les alcools, les acides organiques. La Figure 3 représente leur structure générale. À ce jour, plus de 150 monomères de PHA différents ont été décrits dans la littérature (Amstutz et al., 2019). En fonction du nombre de monomères distincts, il est possible de distinguer les homopolyesters (un seul type de monomère) des hétéropolyesters (plusieurs monomères). Le PHA le plus abondant est l'homopolyester poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) (Anderson et al., 1990). Au sein des hétéropolyesters, le copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (P(3HB-co-3HV)) est le plus largement étudié (Koller, 2018a).



**Figure 3.** Structure générale des polyhydroxyalcanoates (Lee, 1996). R désigne la chaîne latérale déterminant le type de monomères (si  $R \leq 2$ , *scl*-PHA ; si  $R > 2$ , *mc**l*-PHA), et n, le nombre de répétition (compris entre 100 et 30000).

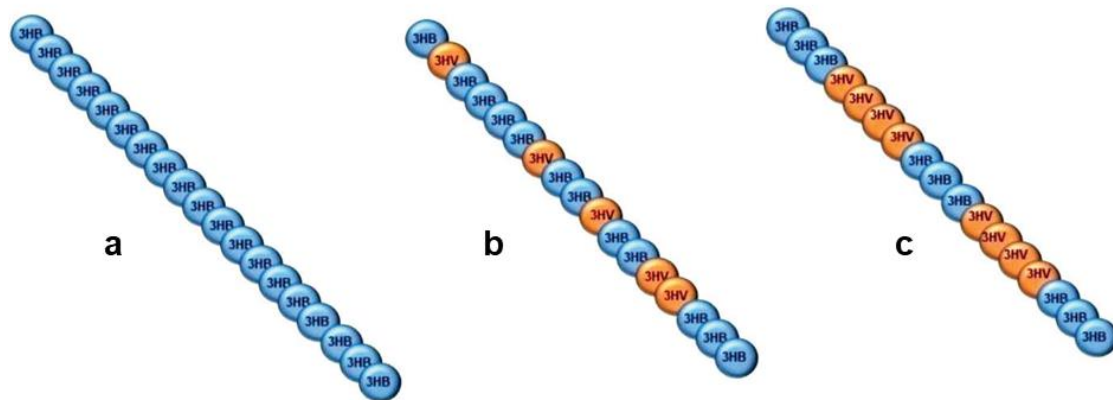
Selon le nombre d'atomes de carbone des monomères, les PHA sont généralement classés en trois groupes :

- les PHA à courtes chaînes (*scl*-PHA), constitués de monomères de 3 à 5 atomes de carbones, avec le (R)-3-hydroxybutyrate (3HB) ou le (R)-3-hydroxyvalérate (3HV).
- les PHA à moyennes chaînes (*mc**l*-PHA), constitués de monomères de 6 à 14 atomes de carbones.
- les PHA à longues chaînes (*lc**l*-PHA), constitués de monomères de plus de 14 atomes de carbones.

Tous les centres de chiralité des différents monomères présentent une configuration (R), essentielle à leur biodégradabilité (Lageveen et al., 1988), et garantie par la stéréospécificité des enzymes impliquées dans les voies de synthèse (Choi and Lee, 1999). Les monomères peuvent avoir des chaînes latérales droites, ramifiées, saturées ou insaturées (Koller, 2021). Globalement, ces chaînes sont aliphatiques, même si certaines espèces microbiennes sont capables de synthétiser des PHA avec des fonctions aromatiques, halogénées, pseudo-halogénées ou alcools.

Outre le type de monomères présents dans le PHA, il est également possible de différencier les PHA à partir de leur microstructure. Dans une même cellule, homo- et hétéropolymères peuvent coexister. Les mélanges peuvent être constitués d'hétéropolymères avec différentes fractions d'un monomère donné (par exemple, plusieurs teneurs en 3HV pour des copolymères P(3HB-co-3HV)), mais aussi de polymères avec des masses moléculaires très hétérogènes (Koller, 2021). De surcroît, l'agencement des monomères au sein des hétéro-

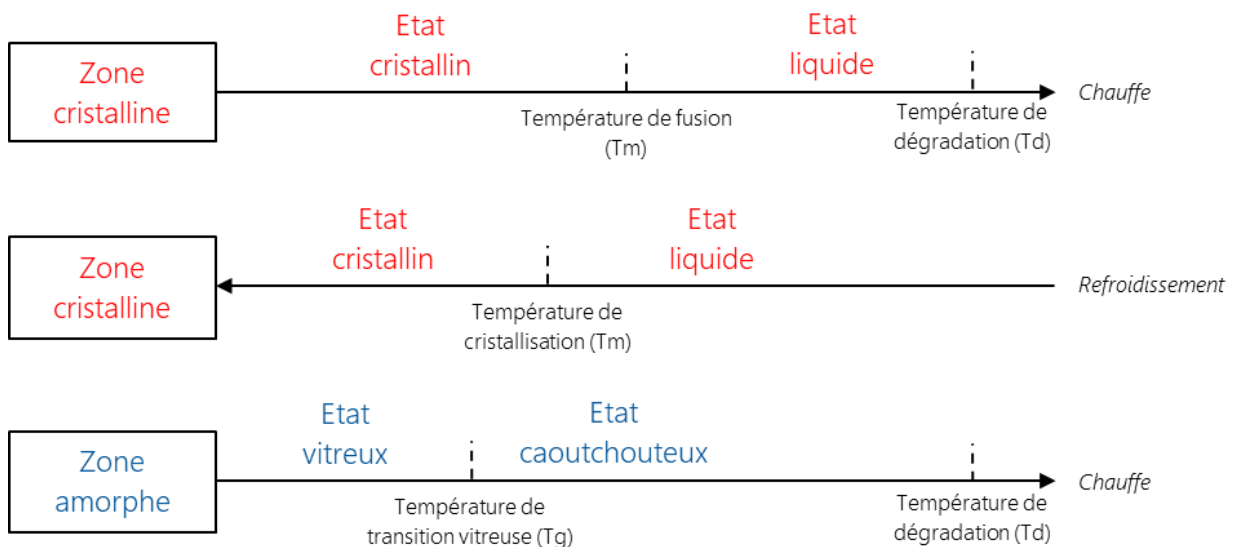
polyesters est variable : ils peuvent avoir une disposition aléatoire ou se structurer en blocs (Figure 4) (Koller, 2018a).



**Figure 4.** Schémas de PHA de différentes microstructures. Sphères bleues : 3HB ; sphères orange : 3HV. (a) homopolymère PHB ; (b) copolymère P(3HB-co-3HV) avec une distribution aléatoire ; (c) copolymère P(3HB-co-3HV) en blocs (Koller, 2018a).

## I. 2. Propriétés physico-chimiques

Les PHA sont des polymères thermoplastiques et semi-cristallins. Leur propriété thermoplastique manifeste leur capacité à pouvoir s'écouler de manière réversible avec une augmentation de la température (Laycock et al., 2013). Leur caractère semi-cristallin indique qu'ils sont constitués de zones ordonnées (cristallines) et de zones désordonnées (amorphes). Selon la température, les zones cristallines varient d'un état cristallin à un état liquide, tandis que les zones amorphes peuvent fluctuer d'un état vitreux (dur et cassant) à un état caoutchoutique (souple et ductile) (Figure 5). Une fois fondus, les PHA se comportent comme des polymères cristallins liquides, permettant de mouler des structures à parois minces ou complexes (Rodríguez-Contreras et al., 2019).



**Figure 5.** Diagramme d'état d'un thermoplastique semi-cristallin.

Les propriétés fonctionnelles d'un polymère de PHA dépendent, de manière significative, de sa composition monomérique (Zinn et al., 2003). La grande variété d'unités monomériques occasionne ainsi un large spectre de polymères avec des caractéristiques physiques et thermiques très différentes. Le PHB présente un degré de cristallinité élevé, ce qui le rend rigide et cassant (Strong et al., 2016). Il est composé d'agrégats de cristaux lamellaires multi-orientés (sphérulites) (Barham et al., 1992). L'incorporation de motifs 3HV dans le polymère permet la défection des cristaux de lamelles de PHB, induisant une perturbation de la cristallinité. Le P(3HB-co-3HV) est donc un matériau nettement plus flexible (Laycock et al., 2013). Il est caractérisé par une viscosité à l'état fondu plus faible, autrement dit un indice de fluidité à chaud (IFC) plus élevé, qui facilite la réalisation de films et son intégration avec des fibres (Chan et al., 2019). Par exemple, l'IFC d'un copolymère P(3HB-co-3HV) avec 15 mol% de 3HV est supérieur à celui du PHB d'un facteur 3 (Gatenholm et al., 1992). En revanche, des teneurs en 3HV trop élevées empêchent la cristallisation, malgré l'ajout d'agents nucléants (Laycock et al., 2013).

Par ailleurs, la mise en œuvre du PHB est restreinte. La faible différence entre la température de dégradation (environ 270°C) et la température de fusion (environ 180°C) limite la fenêtre du procédé d'extrusion (Koller, 2021). La température de fusion diminue avec l'intégration de monomères 3HV. Lorsque la fraction en 3HV passe de 0 à 25 mol%, la température de fusion décroît de 180°C à 132°C (Holmes, 1988). Toutefois, au-delà de 50% en 3HV, elle s'élève avec l'augmentation du pourcentage en 3HV (Serafim et al., 2008b). Le point de fusion le plus faible est ainsi obtenu pour des teneurs comprises entre 40 et 50 mol%. En plus de faciliter les opérations de mise en œuvre, cela permet aussi d'abaisser les coûts de fabrication (Policastro et al., 2021 ; Wang et al., 2001).

L'augmentation de la flexibilité du matériau est également à l'origine d'une amélioration générale de toutes les propriétés mécaniques (Vu et al., 2020). Le **Tableau 1.** donne une comparaison des principales propriétés du PHB, du P(3HB-co-3HV) (avec différentes teneurs en 3HV) et du polyéthylène à basse densité (le plastique traditionnel le plus diffusé). Le PHB présente une élongation avant rupture quasi nulle ainsi qu'une résistance au choc modérée. L'ajout de motifs 3HV (jusqu'à 28 mol%) améliore ces paramètres mais génère, à l'inverse, une diminution du module de Young et de la résistance à la traction (Mitomo et al., 1987 ; Savenkova et al., 2000). Toutefois, pour des fractions en 3HV supérieures à 60%, les performances d'élongation avant rupture et de résistance au choc, sont réduites car la composition du copolymère dépasse le point eutectique (Doi, 1990 ; Laycock, 2013). Il convient enfin de relever que le P(3HB-co-3HV), indépendamment du taux de 3HV, possède des propriétés fonctionnelles similaires voire même supérieures à celles du plastique conventionnel (Bugnicourt et al., 2014).

Outre la composition monomérique, la microstructure du PHA est un autre paramètre déterminant pour les propriétés du biopolymère. Les films constitués de copolymères avec une structure en blocs conservent une meilleure élasticité dans le temps que ceux avec une disposition aléatoire (McChalicher and Srienc, 2007) et



sont ainsi moins sujets au vieillissement par cristallisation progressive (Koller, 2021). L'agencement en blocs permet une cristallisation plus homogène et induit un degré de cristallinité globalement plus faible (Bates and Fredrickson, 1990). Les films générés présentent donc de meilleures propriétés et sont également plus reproductibles (Koller, 2018a).

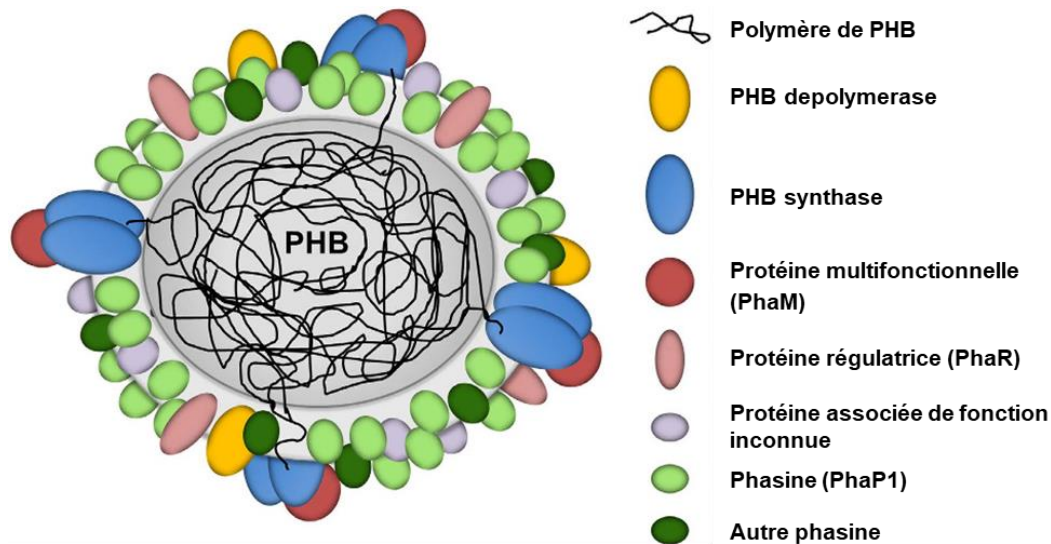
**Tableau 1.** Comparaison des propriétés thermomécaniques de polymères (d'après Lee et al., (1995), Pereira et al., (2008), Koller et al., (2010), Laycock et al., (2013)).

Polymère	Temp. de fusion (°C)	Temp. de transition vitreuse (°C)	Temp. de cristallisation (°C)	Resistance à la traction (MPa)	Module de Young (GPa)	Elongation avant rupture (%)	Resistance au choc Izod (J/m)
PHB	179/177	10	104	40	3,5	6	50
P(3HB-co-3HV)							
3 mol% 3HV	170	8	-	38	2,9	-	60
9 mol% 3HV	162	6	-	37	1,9	-	95
14 mol% 3HV	150	4	70	35	1,5	-	120
20 mol% 3HV	145	-1	-	32	1,2/0,8	50	200
25 mol% 3HV	137	-6	-	30	0,7	-	400
PHV	110	-19	41	-	-	-	-
Polypropylène	170	-	-	34,5	1,7	400	45

### I. 3. Microbiologie et fonctions biologiques

Les PHA sont produits sous formes d'inclusions sphériques au sein des cellules (granules ou carbonosomes), réfractaires à la lumière et visibles au microscope à contraste de phase (Lenz and Marchessault, 2005). Ces granules ont un diamètre de 0,2 à 0,7  $\mu\text{m}$  et sont constituées de 97,7% de PHA, 1,8% de protéines et 0,5% de lipides (Koller, 2021). Un manteau protéique et lipidique entoure un cœur hydrophobe amorphe mobile (Barnard and Sanders, 1989). La membrane est composée de phasines, de polymérases (ou PHA synthases), de dépolymérases et de protéines régulatrices (Grage et al., 2009) (Figure 6).

Pour les microorganismes, les PHA consistent en une réserve carbonée et énergétique (Wältermann et al., 2005). Dans des conditions de limitation en carbone exogène, ils peuvent être mobilisés, procurant ainsi un avantage pour la survie des cellules en périodes de famine (Koller, 2021). Ils constituent un puit d'électrons permettant la régénération d'équivalents réducteurs dans le cas où les voies du métabolisme central (cycle de Krebs ou synthèse des acides nucléiques) sont bloquées (Braunegg et al., 1998). Ils peuvent être associés à d'autres fonctions telles que leur rôle protecteur contre les facteurs de stress (Obruca et al., 2018) comme les températures élevées (Obruca et al., 2016), les cycles de congélation/décongélation (Obruca et al., 2016), l'irradiation UV (Slaninova et al., 2018), le stress oxydatif (Obruca et al., 2010) ou les chocs osmotiques et les milieux avec une salinité élevée (Obruca et al., 2017 ; Sedlacek et al., 2019).



**Figure 6.** Modèle d'un granule de PHB in vivo chez *R. eutropha* H16 (d'après Bresan et al., 2016). Les protéines constitutives de la couche superficielle sont symbolisées par des globules de différentes couleurs. La dimension de la couche en surface est agrandie par rapport au noyau de polymère pour une meilleure visibilité.

A l'heure actuelle, plus de 300 microorganismes ont été recensés comme producteurs de PHA (Koller, 2021). Les souches productrices de PHA les plus étudiées sont des eubactéries Gram-négative isolées du sol (par exemple *Cupriavidus necator*, *Burkholderia sacchari*, *Pseudomonas putida*, *Azohydromonas australica*) ou de milieux aquatiques (*Halomonas* sp., *Bacillus megaterium* uyuni S29) (Koller, 2021). Néanmoins, même si elles font l'objet d'une recherche moins dynamique, certaines bactéries Gram-positive sont également capables d'accumuler des PHA, tel que *Bacillus megaterium*, le premier microorganisme décrit comme producteur de PHA par Maurice Lemoigne (1923). Aussi, les halobactéries, une classe d'archaebactéries extrêmophiles qui prospèrent dans des milieux hostiles caractérisés par des salinités comprises entre 100 et 300 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, ont le potentiel de surpasser les autres souches et d'accumuler des PHA (Jendrossek and Pfeiffer, 2014).

La production de PHA, le plus souvent induite par un stress nutritif, constitue ainsi un avantage sélectif dans un environnement instable. Dans les procédés de boues activées, les fluctuations du milieu en lien avec les variations des régimes d'alimentation favorisent le développement de microorganismes capables de stocker du carbone sous forme de PHA (Oshiki et al., 2010 ; Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004), parmi lesquels se trouvent les organismes accumulateurs de polyphosphates (polyphosphate-accumulating organisms ou PAO) et les organismes accumulateurs de glycogène (glycogen-accumulating organisms ou GAO).

## **II. Métabolisme de la production de P(3HB-co-3HV) à partir d'AGV**

L'obtention d'un bioplastique de qualité, en phase avec les exigences industrielles, nécessite un contrôle fin de la composition du PHA. De manière à maîtriser la nature des unités monomériques incorporées, et plus

précisément à moduler la teneur en 3HV au sein du polymère P(3HB-co-3HV), il est préférable de privilégier les acides gras volatils (AGV) aux carbohydrates (Follonier et al., 2014 ; Follonier et al., 2015 ; Zinn and Hany, 2005 ; Hartmann et al., 2006). Les motifs 3HV peuvent être synthétisés à partir d'AGV avec un nombre impair de carbones tels que les acides propionique, valérique ou nonanoïque (Kunioka et al., 1988 ; Du et al., 2001).

## II. 1. Voies métaboliques impliquées

### III. 1. a. Assimilation des AGV et effets inhibiteurs

Les AGV sont assimilés par la cellule par transport actif primaire. L'acide acétique est phosphorylé en acétyl-phosphate par une acétokinase puis converti en acétyl-coA par une phosphotransacétylase (Shi et al., 1997). Pour pouvoir être catabolisé, l'acide propionique est préalablement activé en propionyl-coA selon plusieurs modes. Le propionyl-coA est ensuite intégré au métabolisme central par différentes voies, que sont le cycle du méthyl-citrate, la  $\beta$ -oxydation ou à partir du succinyl-coA (Brämer and Steinbüchel, 2001). Elles génèrent chacune des intermédiaires métaboliques distincts, mais aboutissent toutes à la formation d'acétyl-coA. Et enfin, l'acide butyrique est assimilé via la  $\beta$ -oxydation après activation en butyryl-CoA (Figure 7).

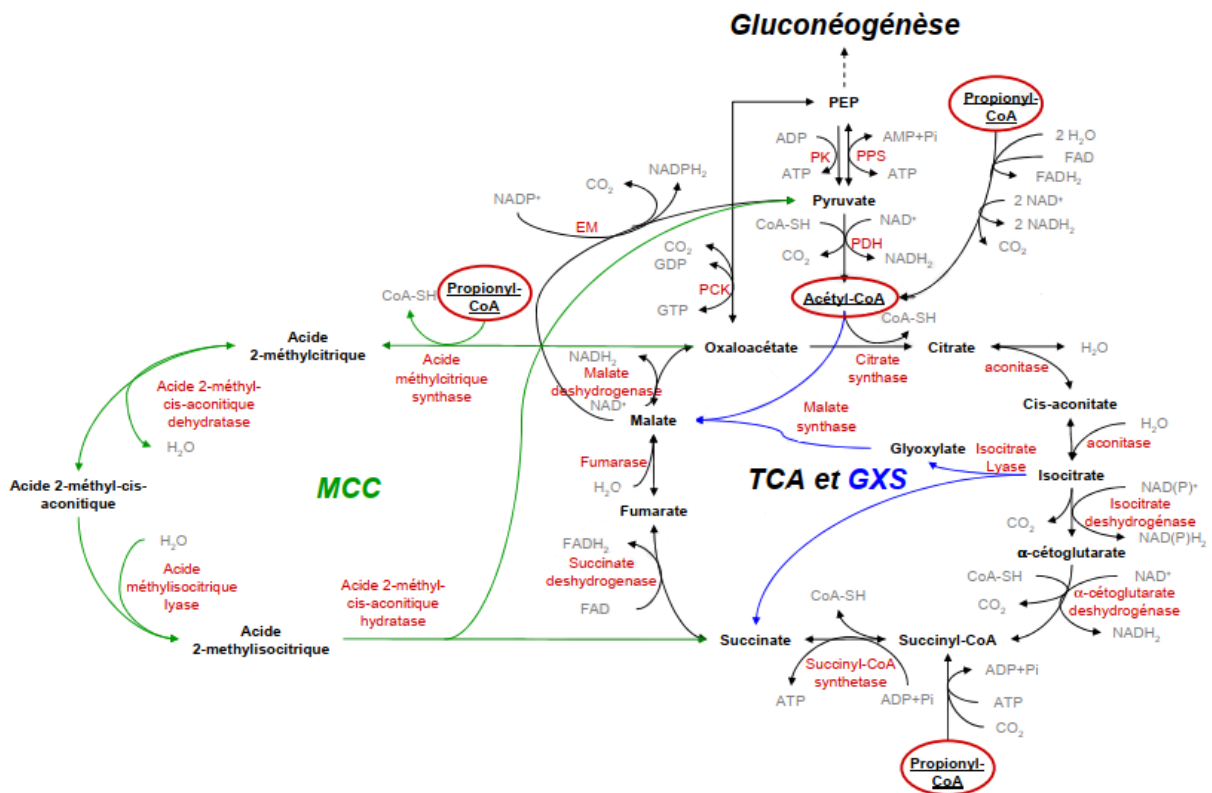
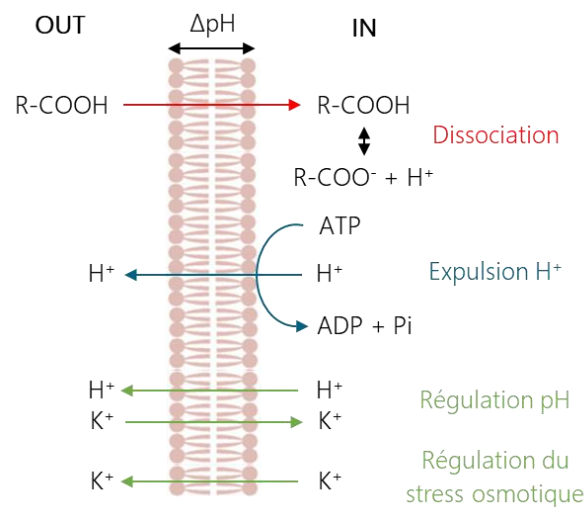


Figure 7. Voies d'entrée de l'acétate et du propionate dans le métabolisme central carboné (Grousseau, 2012).

Les AGV présentent des effets toxiques. Plusieurs mécanismes d'inhibition sur le métabolisme cellulaire ont été suggérés. Ils peuvent, par exemple, être liés à leur fonction acide. Les AGV sont des molécules lipophiles

qui, lorsqu'elles sont non dissociées, diffusent librement au travers des membranes, puis se dissocient dans le cytoplasme (Salmond et al., 1984). Le gradient de protons  $H^+$  de part et d'autre de la membrane est alors perturbé, ce qui induit un découplage de la production d'énergie et du système de transport (Lawford and Rousseau, 1993). La cellule doit alors mobiliser de l'énergie via l'ATPase pour expulser les protons et assurer le maintien du gradient (Figure 8). Cette dissipation d'énergie provoque un ralentissement global de l'activité microbienne (Axe and Bailey, 1995). La libération des protons  $H^+$  peut également engendrer une diminution du pH intracellulaire (Russell and Diez-Gonzalez, 1998 ; van Maris et al., 2004). L'acidification du cytoplasme entraîne une inhibition de la croissance et du métabolisme (Lawford and Rousseau, 1993). La régulation des perturbations du pH peut alors être à l'origine de stress osmotique et de l'augmentation de la pression de turgescence (Roe et al. 1998), facteurs de déclin de l'activité cellulaire (Gokarn et al., 2007 ; McLaggan et al., 1994 ; Fleit, 1995). D'autre part, les anions relargués lors de la dissociation des acides peuvent interférer avec certaines enzymes dans des voies spécifiques (Chun et al., 2014). Il a été démontré que l'accumulation des anions était responsable des effets toxiques des AGV à faible pH (Jankowska et al., 2015 ; Warnecke and Gill, 2005). Enfin, la forme non dissociée des AGV peut s'insérer dans la membrane cellulaire, affecter leur fluidité et par conséquent, endommager l'intégrité cellulaire (Royce et al., 2013).



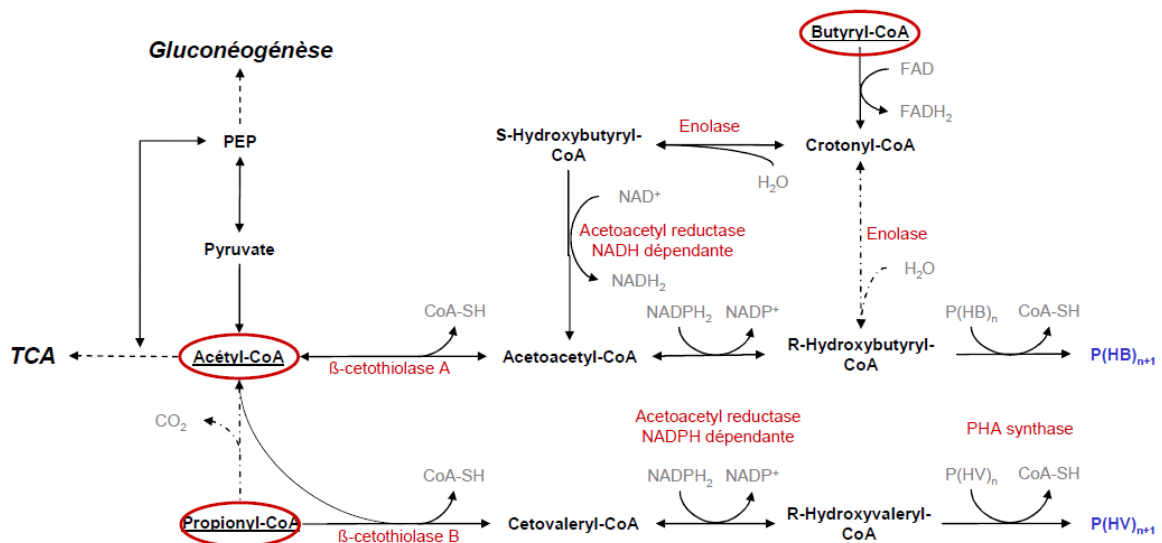
**Figure 8.** Représentation schématique des mécanismes de régulation liés à la dissociation des AGV dans le cytoplasme (d'après Russel, 1992).

En dépit de  $pK_a$  relativement similaires, le pouvoir inhibiteur des différents acides reste très hétérogène. En particulier, le propionate est nettement plus toxique que les autres AGV. Le niveau d'inhibition auquel il est associé ne peut s'expliquer simplement par sa fonction acide et la perturbation du pH cytoplasmique, mais reflète une inhibition spécifique des fonctions métaboliques. Par exemple, le taux de croissance spécifique de *C. necator* diminue dès lors que la concentration en propionate est supérieure à  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  (Kim et al., 1992) ou  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  (Grousseau, 2012), et devient nul à partir de  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  (Kim et al., 1992) ou  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  (Ramsay et al., 1990). De même, (Byrom, 1987) rapporte que la synthèse de PHA chez *Alcaligenes eutrophus* est totalement inhibée pour une concentration au-delà de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

Les mécanismes par lesquels l'acide propionique exerce une action inhibitrice sur le métabolisme demeurent encore incertains. Le propionyl-coA issu du propionate pourrait inhiber l'activité microbienne et bloquer les réactions de synthèse de PHA (Sealy-Lewis and Fairhurst, 1998). Plus précisément, des études suggèrent la possibilité que l'assimilation du propionate par le cycle du méthyl-citrate pourrait générer des intermédiaires toxiques, devant être éliminés par l'enzyme isocitrate lyase du cycle du glyoxylate (Brock and Buckel, 2004 ; Brock et al., 2000 ; Upton and McKinney, 2007 ; Horswill et al., 2001).

### II. 1. b. Biosynthèse du P(3HB-co-3HV)

L'accumulation de PHA est contrôlée par de nombreux gènes qui codent pour plusieurs enzymes impliquées directement ou indirectement dans la synthèse de PHA (Anderson et al., 1990 ; Verlinden et al., 2007 ; Rehm, 2010). De manière générale, la biosynthèse de PHA peut emprunter huit différentes voies (Chen, 2010). La voie utilisée par le microorganisme modèle *C. necator*, et qui est celle permettant la synthèse du P(3HB-co-3HV), implique trois enzymes clés : la  $\beta$ -cétotiolase, l'acétoacétyl-CoA réductase dépendante du NADPH<sub>2</sub> et la PHA synthase, codées respectivement par les gènes *phaA*, *phaB* et *phaC*. Ces trois gènes sont regroupés sur un unique opéron (Peoples and Sinskey, 1989 ; Lawrence et al., 2005). En premier lieu, la  $\beta$ -cétotiolase catalyse la condensation de deux thioester-coA (un acétyl-coA et un propionyl-coA pour la synthèse d'une unité 3HV). La seconde étape consiste en une réduction (R)-spécifique pour former un (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA (ou (R)-3-hydroxybutyryl-CoA pour un motif 3HB). Ce dernier est enfin converti en monomère de PHA par la PHA synthase et lié au polymère (Figure 9). Plus de 88 PHA synthases ont jusqu'alors été répertoriées, et divisées en quatre classes majeures en fonction leurs structures et leur spécificité de substrats (Grage et al., 2009).



**Figure 9.** Schéma métabolique de la biosynthèse de P(3HB-co-3HV) à partir de l'acétyl-CoA, du butyryl-CoA et du propionyl-CoA (Grousseau, 2012).

La composition des PHA peut être manipulée à partir de la nature des sources de carbone supplémentées. Plus particulièrement, la fraction d'unités monomériques 3HV dans le copolymère P(3HB-co-3HV) peut être modulée en ajustant la proportion d'AGV à chaînes impaires (Serafim et al., 2008b ; Albuquerque et al., 2011). Le propionate est le substrat le plus généralement utilisé, notamment lors d'études antérieures réalisées en cultures mixtes (Chang et al., 2012 ; Hu et al., 2005). En alimentant uniquement avec du propionate, Dionisi et al., (2004) ont obtenu un homopolymère de PHV. Toutefois, lors de la production de PHV à partir d'acide propionique seul, la perte d'un carbone est inévitable pour générer un acétyl-CoA, qui est ensuite condensé avec un propionyl-CoA pour aboutir à la formation d'un monomère 3HV. Afin d'éviter cette décarboxylation et de maximiser les rendements de conversion du propionate en 3HV, il est alors préférable de le combiner avec un autre substrat carboné qui puisse fournir l'acétyl-CoA, tel que l'acétate ou le butyrate. A partir d'un mélange acétate/propionate, des copolymères de P(3HB-co-3HV) avec une teneur en HV pouvant atteindre 85 mol% ont ainsi été répertoriés (Takabatake et al., 2000 ; Lemos et al., 2006). Toutefois, le ratio 3HB/3HV ne résulte pas exclusivement de la fraction en propionate, mais dépend aussi des populations microbiennes considérées et de leur activité métabolique (Arcos-Hernández et al., 2013).

Outre la composition, il est également possible de contrôler la distribution des séquences des monomères en appliquant des stratégies d'alimentation en acétate et propionate appropriées (Arcos-Hernández et al., 2013 ; Ivanova et al., 2009). Une alimentation constante avec un mélange acétate/propionate chaperonne la formation d'un polymère avec disposition des monomères aléatoire. Au contraire, une alimentation alternée en acétate et propionate, par pulses successifs, permet l'obtention d'une microstructure en blocs, avec une répétition de motifs.

## **II. 2. Induction de la synthèse de P(3HB-co-3HV)**

L'accumulation de PHA par des microorganismes est observée pour des cultures exposées à des conditions de croissance déséquilibrées (Stal, 1992). La synthèse de PHA est généralement déclenchée par la limitation d'un élément nutritif essentiel, tel que l'azote, le phosphate ou l'oxygène, ou de certains microcomposants (comme le soufre, fer, potassium, étain ou magnésium), conjuguée à la présence d'une source de carbone exogène en excès (Koller, 2021).

### ***II. 2. a. Mécanismes de régulation de la synthèse du P(3HB-co-3HV)***

La régulation de l'accumulation de PHA fait appel à une grande diversité de mécanismes, comprenant des systèmes de régulation à l'échelle transcriptionnel et enzymatique (Kessler and Witholt, 2001). Elle implique



la croissance sont réduites. Le NADPH libéré ne peut plus être utilisé par les voies anaboliques telles que la synthèse d'acides aminés. Il s'accumule et inhibe la citrate synthase du cycle de Krebs. L'acétyl-CoA est ainsi disponible pour  $\beta$ -cétotiolase et la synthèse de PHA (Babel et al., 2001). De plus, en condition de limitation phosphore, l'activité de l'ATP synthase décroît, induisant la conversion du carbone en excès en PHA (Marzan and Shimizu, 2011).

Quels sont les effets du maintien d'une croissance résiduelle ?

La plupart des études de production de PHA en cultures microbiennes mixtes ont été réalisées en condition de carence nutritionnelle pour complètement inhiber la croissance et rediriger la totalité du carbone vers la synthèse de PHA (Johnson et al., 2010 ; Pardelha et al., 2012 ; Serafim et al., 2004). En revanche, il a été plus récemment démontré que l'accumulation de PHA pouvait être stimulée avec le maintien d'une croissance résiduelle, en fournissant un ratio C:N:P optimal (Janarthanan et al., 2016 ; Valentino et al., 2015 ; Montano-Herrera et al., 2017). Entretenir la croissance peut influencer les flux de carbone au travers des intermédiaires acyl-CoA et affecter la disponibilité des équivalents réducteurs pour la production de PHA. En culture pure, Aragao (1996) a établi pour *C. necator* que la vitesse spécifique de production de PHB augmentait de façon linéaire avec la diminution du taux de croissance ( $\mu$ ), jusqu'à un maximum obtenu pour une valeur de  $\mu$  de  $0,03 \text{ h}^{-1}$ . Dans la même idée, Grousseau et al., (2013) ont montré que maintenir la biomasse active permettait d'améliorer les cinétiques et les rendements de production de PHB, en réorientant les voies de régénération du NADPH. En l'absence de croissance résiduelle, le NADPH ne peut être produit qu'à partir de l'isocitrate déshydrogénase, tandis qu'en condition de croissance, il peut être également obtenu par la voie d'Entner-Doudoroff via la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), ce qui minimise la dissipation d'ATP.

En affectant directement la composition du réservoir intracellulaire d'acyl-CoA, le maintien d'une croissance résiduelle influence en outre la composition du copolymère P(3HB-co-3HV) (Arcos-Hernández et al., 2013).

Quelle est l'influence de la nature de la limitation (azote ou phosphore) sur la production de PHA ?

L'azote est mobilisé pour la synthèse des protéines et nécessaire à toutes les voies anaboliques. La limitation azote impacte alors la croissance cellulaire en réduisant l'activité enzymatique, induisant une redirection du carbone vers la synthèse de PHA. Comme l'azote, le phosphore est un élément structural essentiel, mais il joue un rôle plus global sur les mécanismes de régulation enzymatique (phosphorylation) et sur le potentiel énergétique de la cellule. Contrairement à l'azote, il peut être davantage transféré d'un composant cellulaire à un autre, grâce à la capacité de réorganisation des cellules (Paul et al., 2012). Les pools majeurs de P dans les cellules sont l'ARN, l'ADN et les phospholipides, qui sont soumis à un renouvellement élevé (Ehlers et al., 2010). En condition de limitation, certaines bactéries ont, par exemple, la faculté de remplacer partiellement



les phospholipides par des lipides dépourvus de phosphore (Zavaleta-Pastor et al., 2010). En conséquence, la production de PHA semble être plus élevée en limitation phosphore qu'en limitation azote (Aragao, 1996 ; Rhu et al., 2003). Toutefois, un pool intracellulaire de P doit être mobilisable pour pouvoir assurer une activité de stockage optimale des PHA (Cavaillé et al., 2013 ; Venkateswar Reddy and Venkata Mohan, 2012).

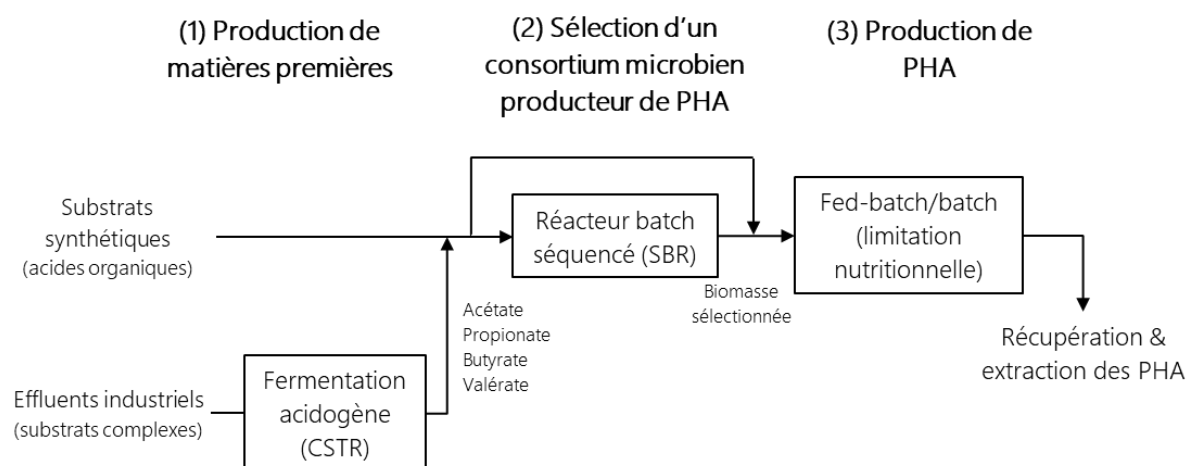
Par ailleurs, la nature de la limitation nutritionnelle paraît influencer sur la composition du copolymère P(3HB-co-3HV). En condition de limitation azote, la réduction du potentiel enzymatique affecte indistinctement la biosynthèse des unités 3HB et 3HV, empêchant la maximisation de la teneur en 3HV dans l'hétéropolymère (Aragao, 1996). Plus la limitation est élevée, plus la fraction en 3HV est faible (Shimizu et al., 1999). A l'inverse, l'absence de croissance induite par une carence en phosphore permet d'optimiser le pourcentage en 3HV, en favorisant le maintien du taux spécifique de production de 3HV concomitamment à la diminution du taux spécifique de production de 3HB (Grousseau et al., 2014). Les mécanismes métaboliques qui définissent la composition des PHA diffèrent donc selon le type de limitation.

### **III. Production de PHA en cultures microbiennes mixtes**

#### **III. 1. Introduction**

La production industrielle de PHA est actuellement réalisée à partir de cultures microbiennes pures d'isolats producteurs de PHA ou de bactéries génétiquement modifiées (Jiang et al., 2011a). Néanmoins, les coûts de production associés à l'utilisation de cultures axéniques, liés aux besoins de conditions stériles et de substrats purifiés, ont encouragé le recours à des cultures microbiennes mixtes comme approche alternative (Gurieff and Lant, 2007 ; Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007). Les cultures mixtes présentent plusieurs avantages, parmi lesquels : aucune exigence de stérilité, une forte adaptabilité en raison de la diversité microbienne, la possibilité d'utiliser une large gamme de substrats à faible valeur et des méthodes d'extraction et purification sûres et rentables (Pakalapati et al., 2018 ; Terkaj and Tolio, 2019).

Les procédés de production de PHA impliquant des cultures microbiennes mixtes sont généralement opérés en deux ou trois étapes, selon le type de substrat (récemment décrits par De Donno Novelli et al., (2021) et Kourmentza et al., (2017)). Les procédés bi-étagés comprennent une étape de sélection et d'enrichissement en microorganismes ayant une capacité élevée de production de PHA, communément réalisée en réacteurs batch séquencés (SBR), suivie d'une étape d'accumulation de PHA, au cours de laquelle le stockage de PHA par les consortia sélectionnés est maximisé (Figure 11). Le découplage de l'étape de sélection de la phase de production permet l'application de conditions opératoires distinctes, qui contribuent à optimiser le procédé (Serafim et al., 2008a ; Albuquerque et al., 2007). Les PHA produits sont ensuite extraits et purifiés.



**Figure 11.** Procédé de production de PHA en cultures microbiennes mixtes (d'après Serafim et al., 2008a).

Contrairement aux cultures pures pour lesquelles le glucose est le substrat le plus utilisé pour la production de PHA, l'approche en cultures mixtes a été principalement appliquée avec des AGV (van Loosdrecht et al., 1997a). La raison de cette différence tient dans le fait que les cultures mixtes sélectionnées avec les procédés conventionnels sont incapables de stocker des PHA à partir de carbohydrates (Carta et al., 2001). Ces derniers sont, à l'instar d'autres substrats tels que le glycérol, davantage convertis en glycogène (Moralejo-Gárate et al., 2011 ; Dircks et al., 2001). Cependant, du fait de l'aptitude des cultures microbiennes mixtes à utiliser des substrats complexes, l'un des objectifs relatif à la production de PHA est de substituer les AGV synthétiques par des matières premières à base de déchets. Les eaux usées provenant des industries du papier (Bengtsson et al., 2008), des agro-industries (Amulya et al., 2015), des industries d'huile de palme (Mumtaz et al., 2010), et d'huile d'olive (Ntaikou et al., 2014 ; Beccari et al., 2009 ; Dionisi et al., 2005b), les déchets animaux, le son de riz et de blé, les résidus d'amidon (De Grazia et al., 2017), le lactosérum de fromage (Duque et al., 2014), la molasse (Albuquerque et al., 2007) et de nombreux autres déchets sont considérés comme des substrats à haut potentiel. Une étape préalable de traitement de la matière première par fermentation acidogène est souvent nécessaire pour la convertir en AGV, à partir desquels sont réalisés les étapes d'enrichissement et d'accumulation de PHA. Elle a généralement lieu en réacteur continu (CSTR).

### III. 2. Fermentation acidogène

La composition des PHA dépend fortement du profil des AGV produit lors de l'étape de digestion anaérobie. Malgré le fait que les paramètres déterminant précisément la distribution des produits de fermentation ne soient pas encore bien compris (Hoelzle et al., 2014), il a été démontré par Albuquerque et al., (2007) que le spectre des AGV générés durant l'acidogénèse pouvait être orienté en manipulant les conditions opératoires telles que le pH. A pH neutre, la concentration d'un AGV donné est d'autant plus faible que sa longueur de chaîne est grande (Vidal-Antich et al., 2021). Une diminution du pH favorise la production des AGV à chaîne longue en raison de l'augmentation de la disponibilité en équivalents réducteurs pouvant être incorporés

dans les chaînes (Zoetemeyer et al., 1982). Dès lors que le pH est inférieur à 6,5, la proportion de propionate diminue significativement, notamment en faveur du butyrate (Fang et al., 2020 ; Wang et al., 2014). Il existe ainsi une bascule manifeste dans les voies de fermentation avec l'acidification du milieu. En réacteur continu, la variation du profil des produits de fermentation en lien avec la diminution du pH semble d'avantage être attribuée à un changement des espèces microbiennes dominantes, plutôt qu'à une modification de l'activité métabolique d'une même population bactérienne (Horiuchi et al., 2002). L'ajustement du pH permet donc de maximiser la fraction en propionate, et par extension, la teneur en 3HV au sein du copolymère de P(3HB-co-3HV).

Outre le pH, la distribution des AGV est largement conditionnée par la composition du substrat (Lin and Li, 2018). Un effluent riche en carbone contribue à l'accumulation de butyrate et d'éthanol, alors qu'un substrat riche en protéines oriente la production d'AGV vers le propionate et le valérate (Ma et al., 2017). Néanmoins, les effets du pH demeurent effectifs, indépendamment de la composition du substrat (Horiuchi et al., 2002; Fang and Yu, 2002).

### **III. 3. Enrichissement en microorganismes accumulateurs de PHA**

La sélection d'un consortium avec une capacité d'accumulation de PHA élevée est l'un des principaux défis des procédés opérés en cultures microbiennes mixtes. L'objectif de cette étape est d'enrichir la culture avec des populations strictement (ou presque) surproductrices de PHA. En effet, la présence de microorganismes avec une faible potentialité de stockage de PHA contribue à réduire la teneur moyenne en PHA, augmentant alors les coûts d'extraction. Le panorama de la recherche liée à la production de PHA en cultures mixtes est dominé par deux types d'enrichissement : le procédé anaérobie-aérobie (AN/AE) et le procédé de « feast & famine », également appelé « Aerobic Dynamic Feeding » (ADF).

#### **III. 3. a. Procédé AN/AE**

Le procédé AN/AE repose sur l'alternance de conditions anaérobie/aérobie. La production de PHA par des cultures microbiennes mixtes a été observée pour la première fois en utilisant cette technique, au cours des procédés d'élimination biologique du phosphore par des boues activées dans les STEP (van Loosdrecht et al., 1997b). L'accumulation de PHA se produit pendant la phase anaérobie par les organismes accumulateurs de phosphore (PAO) ou de glycogène (GAO), grâce à une limitation externe liée à l'absence d'un accepteur d'électrons (oxygène, nitrate) (Dias et al., 2006). Durant la phase aérobie, PAO et GAO consomment les PHA stockés en utilisant l'oxygène disponible, générant de l'ATP avec un rendement plus élevé par rapport aux

substrats métabolisés pendant la phase anaérobie, et permettant ainsi leur enrichissement progressif (Reis et al., 2011). Toutefois, les capacités de production de PHA par ces cultures restent limitées, avec des teneurs maximales en PHA de l'ordre de 20% (Sato et al., 1996), notamment du fait qu'une partie du carbone soit stocké sous forme de glycogène (Smolders et al., 1994). Malgré des efforts d'optimisation (Bengtsson, 2009), cette méthode d'enrichissement n'a pas fait l'objet de travaux récents, étant donné que d'autres techniques telles que le procédé ADF permettent l'obtention de fractions en PHA plus élevées.

### **III. 3. b. Procédé ADF**

Le système ADF est le procédé de sélection le plus étudié. Il s'agit d'un procédé strictement aérobie au cours duquel l'élément limitant est le carbone. Les boues sont soumises successivement à des périodes d'excès de source de carbone (« feast ») puis de carence (« famine »). Les bactéries capables de convertir le carbone en PHA pendant la phase de festin ont un avantage concurrentiel par rapport au reste des populations, car elles utilisent le PHA comme réserve de carbone et d'énergie durant la phase de famine, ce qui leur permet de se développer aux dépens des microorganismes ne stockant pas de PHA (Oliveira et al., 2017). L'activité simultanée de la PHA synthase et de la PHA dépolymérase contribue à une meilleure adaptation des cellules à un changement des conditions environnementales (Frigon et al., 2006 ; Prieto et al., 2016). Des teneurs en PHA allant jusqu'à 90 % (en masse sèche) ont été rapportées en utilisant cette stratégie (Jiang et al., 2011b ; Johnson et al., 2009).

La plupart des études réalisées durant les dix dernières années ont été portées sur l'optimisation du procédé d'enrichissement. L'influence des différents paramètres opératoires sur la production de PHA a été évaluée, comme le temps de séjour des boues (SRT) (Jiang et al., 2011c), le flux de charge organique (OLR) (Dionisi et al., 2006), le ratio carbone/azote, la concentration en oxygène dissous, le pH, la température ou les durées des cycles (décrit par Valentino et al., 2015). Plus particulièrement, il a été démontré par (Marang et al., 2014) qu'imposer une limitation en azote permettait de maximiser l'enrichissement en populations accumulatrices de PHA, et par conséquent la teneur finale en polymères, en restreignant la croissance des microorganismes non producteurs de PHA pendant la phase de festin. Bien que la quasi-totalité des études aient été opérées en SBR, des stratégies alternatives de conduite de culture en continu ont été testées, sans que cela n'affecte significativement les taux d'enrichissement (Albuquerque et al., 2011 ; Chen et al., 2015).

### **III. 4. Accumulation de PHA en cultures mixtes**

La phase d'accumulation de PHA, consécutive à la phase de sélection, a pour objectif de maximiser la teneur en PHA, mais aussi les rendements et les productivités spécifiques et volumétriques. Plusieurs stratégies de

culture (batch, fed-batch avec pulses éventuels, alimentation continue) ont été investiguées (Kourmentza et al., 2017 ; Basset et al., 2016). L'utilisation du batch demeure limitée par les propriétés inhibitrices des AGV à fortes concentrations, qui restreignent la productivité (Albuquerque et al., 2007). La conduite de culture en fed-batch permet de remédier à ce problème et s'est imposée comme la stratégie la plus usuelle, même si elle demande une alimentation en substrat très concentrée (Serafim et al., 2004 ; Pardelha et al., 2012). Des procédés d'alimentation en continu ont apporté de meilleurs résultats, notamment parce qu'ils assurent une productivité en continu, en évinçant les risques de déplétion du substrat dans le milieu réactionnel (Jiang et al., 2012 ; Villano et al., 2010).

Comme pour l'étape de sélection, l'impact des paramètres opératoires sur les performances de production a été largement examiné. Il a notamment été démontré qu'une limitation ou une carence en azote induisait une amélioration des rendements et teneurs en PHA (Johnson et al., 2010 ; Venkateswar Reddy and Venkata Mohan, 2012). Toutefois, plusieurs études ont nuancé l'importance de l'azote durant l'étape d'accumulation dans la mesure où la synthèse de PHA est préférée à la croissance, indépendamment de la présence d'azote (Moralejo-Gárate et al., 2013 ; Jiang et al., 2012). Dans certains cas, il a même été rapporté qu'une limitation en azote pouvait ne pas bénéficier à l'accumulation de PHA (Dionisi et al., 2006). Limiter la quantité d'azote permet avant tout d'empêcher la croissance de populations non productrices de PHA au sein du consortium sélectionné (Marang et al., 2014 ; Janarthanan et al., 2016). Ces différentes observations mettent en avant le fait que le besoin d'une limitation en azote pour maximiser les teneurs en PHA reste conditionné par le type de microorganismes sélectionnés et la nature du substrat carboné (Kourmentza et al., 2017). Outre l'azote, des études plus récentes se sont portées sur les effets d'une application d'une limitation en phosphore (Tu et al., 2019), avec pour conclusion que de faibles concentrations en phosphore permettaient une meilleure efficacité de conversion de l'acétate en PHA, à l'inverse de l'ajout d'une limitation azote qui n'apportait pas d'amélioration du rendement en PHA. Enfin, il a été démontré que les productivités les plus élevées étaient obtenues en conditions de double limitation azote et phosphore (Kourmentza et al., 2017).

D'autre part, d'autres auteurs ont investigué les potentialités d'accumulation de PHA directement par des boues activées, sans étape préalable d'enrichissement. Des fractions en PHA pouvant aller jusqu'à 57% ont été obtenues en réacteur fed-batch en condition de limitation d'azote (Mengmeng et al., 2009). En imposant une limitation en phosphore, Cavaillé et al., (2013) ont pu atteindre, en fed-batch également, des teneurs en PHA de 70%, avec des rendements globaux similaires à ceux des procédés en deux étages sur la globalité.

### **III. 5. Production de P(3HB-co-3HV) à l'échelle pilote et industrielle**

Les études sur la production de PHA à l'échelle pilote par des cultures microbiennes mixtes à partir de flux de déchets industriels ont émergé de manière significative depuis le début des années 2010, sans pour autant

qu'il n'existe encore de précédés de production de PHA à grande échelle par des cultures mixtes (De Donno Novelli et al., 2021). A l'heure actuelle, il y a plusieurs fabricants de PHA à l'échelle industrielle, exclusivement à partir des cultures pures ou génétiquement modifiées et utilisant des substrats purifiés. Décrits par Koller and Mukherjee (2022), les différents procédés de production industrielle de P(3HB-co-3HV) sont présentés dans le Tableau 2.

**Tableau 2.** Production de P(3HB-co-3HV) en cultures pures ou génétiquement modifiées à l'échelle industrielle (d'après Koller and Mukherjee, 2022).

Souche productrice (origine)	Substrat	Fabricant	Marque du PHA	Capacité (t/an)
<i>Cupriavidus necator</i> (bactérie du sol)	Glucose et précurseur de 3HV	ICI, Londres, Royaume-Uni (technologie transférée à Metabolix)	BIOPOL	600-800 en 1996, arrêté depuis
	Glucose et précurseur de 3HV	Telles (opération conjointe avec Metabolix et ADM de 2009 à 2012)	Mirel	50000 en 2009, arrêté depuis 2012
	Glucose et précurseur de 3HV (glucose dérivé de féculé de manioc)	Tianan Biologic Materials Co., Ningbo, Chine	ENMAT	200
	Sucre de canne hydrolysé et propionate (précurseur de 3HV)	PHB Industrial S.A. (PHB/ISA), Serrana, Brésil	BIOCYCLE	Environ 100
	Sucre de betterave, molasses et précurseurs de 3HV	Bio-On, Bologne, Italie	Minerv-PHA	2000 (situation actuelle imprécise)
<i>Halomonas bluephagenesis</i> ssp. (OGM)	Glucose présumé et précurseur de 3HV	PhaBuilder, Beijing, Chine	-	Non renseigné
<i>Haloferax mediterranei</i> (saumure maritime)	Sucres, amidon, glycérol	Pas encore commercialisé, mais fort potentiel industriel	-	Non renseigné

La plupart des efforts sur la production de PHA en cultures mixtes à l'échelle pilote se concentrent sur son intégration avec les procédés existants dans les STEP afin de réduire les coûts en exploitant des installations déjà disponibles et en cherchant à valoriser les boues ou les eaux usées. Plusieurs exemples ont été recensés par Kourmentza et al. (2017) et sont compilés dans le Tableau 3. La plus haute teneur en PHA signalée à ce jour (80,5 g%) a été récemment obtenue par Matos et al. (2021). Toutefois, les performances concernant les études à l'échelle pilote demeurent difficilement comparables à celles des études en laboratoire. La variation des matières premières, conjuguée aux limitations de transfert d'oxygène, peut en partie être à l'origine des valeurs de rendements et de teneurs en PHA généralement plus faibles à l'échelle pilote que celles décrites à l'échelle du laboratoire.

**Tableau 3.** Unités pilotes de production de P(3HB-co-3HV) en cultures microbiennes mixtes (Kourmentza et al., 2017).

Unité pilote, localisation	Matières premières	Origine des CMM	Stratégie d'enrichissement	%PHA (%HB:%HV)	Référence
Nagpur, Inde	Eaux usées de traitement de lait et de crème glacée	Boues activées	-	39-43	Chakravarty et al., (2010)
STEP Lucun à Wuxi, Chine	Boues brutes acidifiées et fermentées	Boues activées / mélange synthétique d'AGV	Système ADF avec inhibition de la nitrification	-	Jia et al., (2014)
Eslöv, Suède	Eau de traitement de betteraves (38% AGV)	CMM productrices de PHA issues d'effluents de Procordia Foods	-	60 (85:15 HB:HV)	Anterrieu et al., (2014)
Step Bruxelles Nord (Belgique)	Boues de STEP hydrolysées et fermentées	Boues alimentées avec les eaux usées municipales	Système ADF	27-38 (70:30 HB:HV)	Morgan-Sagastume et al., (2015)
STEP Leeuwarden (Pays-bas)	Residus de tomates fermentés	Boues alimentées avec les eaux usées municipales	Système ADF	34/42 (55:45 HB:HV)	Bengtsson et al., (2017)
Usine Mars (Veghel, Pays-bas)	Eaux usées fermentées d'une usine de confiseries	Boues activées alimentées avec les eaux usées fermentées	Système ADF avec inhibition de la nitrification	70-76 (84:16 HB:HV)	Tamis et al., (2014)
Step Mutela (Almada, Portugal)	Résidus alimentaires de Sumol+Compal	Boues activées alimentées avec les résidus fermentés	Système ADF	81 (77:23 HB:HV)	Matos et al., (2021)

## **IV. Procédés continus de production de PHA**

Les procédés de production de PHA en cultures microbiennes mixtes jusqu'alors présentés sont opérés en culture discontinue. Cependant, les procédés discontinus présentent une productivité restreinte par le mode opératoire, principalement en raison du temps d'arrêt nécessaire à la préparation et au post-traitement des réacteurs (Koller and Braunegg, 2015). La productivité est également limitée par le besoin de maintenir une faible concentration en AGV, en raison de leurs propriétés toxiques. De plus, les fortes demandes en oxygène transitoires, inhérentes aux procédés de sélection, impliquent des coûts de fonctionnement élevés. Et enfin, la qualité des PHA produits peut fluctuer entre différents lots, notamment du point de vue de la distribution de masse molaire (Braunegg et al., 1995).

Les procédés de production en continu constituent une alternative intéressante. Les procédés continus sont généralement opérés en régime dit permanent, au cours duquel les concentrations de produit et de substrat, mais aussi les paramètres opératoires tels que le pH, ou la  $pO_2$ , le volume de culture, le flux d'alimentation, sont maintenus constants. De tels procédés permettent d'entretenir un flux en production constant, tant en termes de quantité que de qualité du produit, durant de longues périodes, favorisant une forte productivité (Koller, 2018b). Par ailleurs, la récolte en continu du milieu de culture facilite la mise en place des opérations

en aval de récupération du produit, comme par exemple des centrifugeuses fonctionnant en continu (Koller and Muhr, 2014). Dans le contexte de production de PHA par des cultures mixtes, ils offrent la possibilité de conserver la concentration résiduelle en AGV en deçà du seuil d'inhibition, tout en alimentant avec de fortes concentrations. En outre, ils permettent un meilleur contrôle de la composition monomérique du polymère (Albuquerque et al., 2011). Dans l'optique d'un déploiement à échelle industrielle, ils s'insèrent plus aisément avec les procédés des STEP.

Avant de décrire les procédés de sélection en microorganismes accumulateurs de PHA en culture continue, cette partie comporte une introduction consacrée aux mécanismes qui régissent la compétition microbienne en chemostat.

## IV. 1. Sélection microbienne en culture continue

### IV. 1. a. Considérations théoriques en culture continue

En l'absence de limitation nutritionnelle, un microorganisme se développe à sa vitesse maximale, et poursuit sa croissance jusqu'à l'épuisement de l'un des substrats essentiels. Si tous les autres nutriments sont en excès, ce substrat est dit le substrat limitant de la croissance. Le taux de croissance spécifique d'un microorganisme dépend alors de la concentration du substrat limitant selon le formalisme de Monod (Figure 12) :

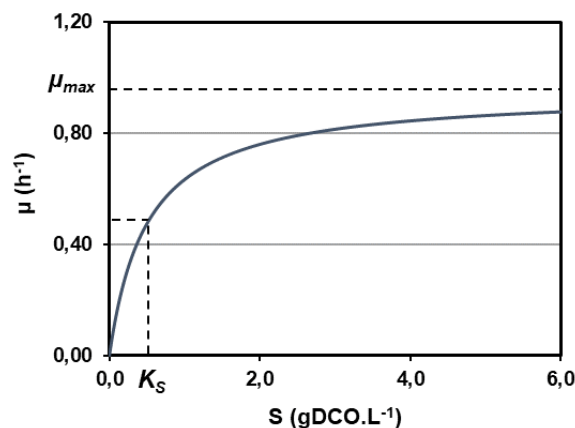
$$\mu = \mu_{max} \times \frac{S}{S + K_S}$$

avec  $\mu$ , le taux de croissance spécifique

$\mu_{max}$ , le taux de croissance spécifique maximal

$S$ , la concentration du substrat limitant de la croissance

$K_S$ , la constante d'affinité, qui correspond à la concentration  $S$  pour laquelle  $\mu = 0,5\mu_{max}$



**Figure 12.** Relation entre le taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) et la concentration du substrat limitant de la croissance  $S$  selon l'équation de Monod.



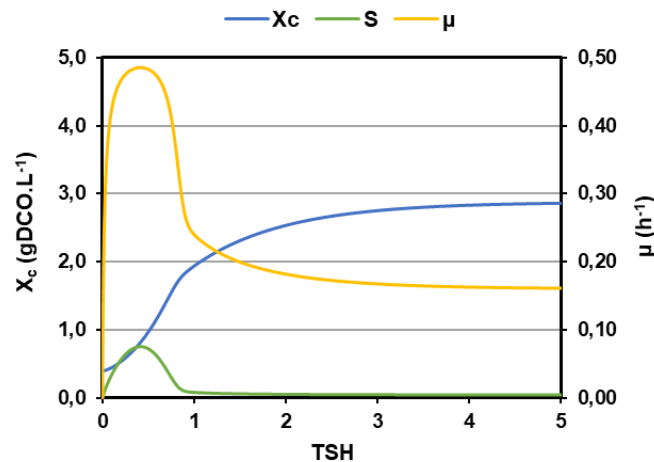
En cultures discontinues, pour lesquelles les concentrations en substrat utilisées sont nettement supérieures au  $K_S$ , la sélection dépend des valeurs de  $\mu_{max}$  des différents microorganismes. En revanche, en chemostat, le taux de croissance des microorganismes est imposé par le taux de dilution ( $D$ ) de la culture, où  $D = Q/V$  (avec  $Q$ , le débit volumique et  $V$ , le volume de culture). La variation de la concentration en microorganismes s'écrit :

Variation = croissance – sortie

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx = x(\mu - D)$$

Par conséquent, si  $\mu > D$ , la concentration en cellules augmente, et la consommation de substrat est alors supérieure à celle dans l'alimentation. La concentration de substrat dans le milieu diminue progressivement, induisant une diminution du taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) jusqu'à ce que  $\mu = D$ , qui caractérise le régime permanent (Figure 13). Le chemostat est donc un système qui s'ajuste de lui-même, à condition que le taux de dilution n'excède pas le taux de croissance spécifique maximal ( $\mu_{max}$ ) du microorganisme, autrement dit le taux de dilution critique ( $D_c$ ) :

$$D = \mu_{max} \times \frac{S}{S + K_S}$$



**Figure 13.** Evolution des concentrations en cellules ( $X_c$ ) et substrat ( $S$ ) et du taux de croissance ( $\mu$ ) durant le régime transitoire, pour un chemostat opéré avec un taux de dilution  $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ . Le régime permanent est atteint après cinq temps de séjour (TSH), indépendamment du taux de dilution. Le taux de décès est ici négligé.

Le flux de substrat consommé conditionne ( $q_S$ ) ainsi le taux de croissance spécifique. De la même manière, la concentration en biomasse est proportionnelle à la concentration de substrat consommé, selon la valeur du rendement de croissance observé :

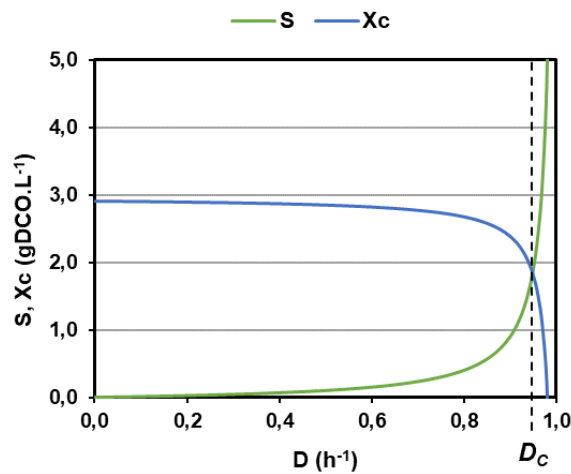
$$X_C = Y_{(X_C/S)_{obs}}(S_{in} - S)$$

En régime permanent, les concentrations résiduelles en biomasse et substrat dépendent directement de  $D$  :

$$S = K_S \times \frac{D}{\mu_{\max} - D}$$

$$X_C = Y_{\left(\frac{X_C}{S}\right)_{\text{obs}}} \left( S_{\text{in}} - \left( K_S \times \frac{D}{\mu_{\max} - D} \right) \right)$$

A des faibles taux de dilution (c'est à dire largement inférieurs au taux de croissance spécifique maximal du microorganisme), la concentration résiduelle en substrat est très faible et essentiellement fixée par la valeur du  $K_S$  (Figure 14). Le chemostat présente un réel intérêt dans le cadre des cultures avec un substrat inhibiteur comme le propionate. La concentration en biomasse, quant à elle, ne diminue que lorsque le taux de dilution appliqué est proche de la valeur du taux de croissance spécifique maximal.



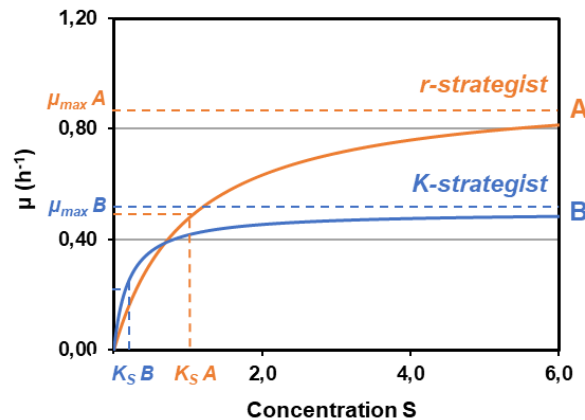
**Figure 14.** Evolution des concentrations en substrat (S) et cellules (Xc) en fonction du taux de dilution (D) appliqué, pour un microorganisme ayant un taux de croissance spécifique maximal ( $\mu_{\max}$ ) égal à  $1,0 \text{ h}^{-1}$ .  $D_c$  représente le taux de dilution critique.

#### **IV. 1. b. Orientation de la compétition microbienne**

La concentration résiduelle de substrat en régime permanent est ainsi entièrement conditionnée par le taux de dilution et les caractéristiques de croissance des microorganismes ( $\mu_{\max}$  et  $K_S$ ). Dès lors, une forte sélection devrait théoriquement se produire si un facteur limitant est appliqué (Hansen and Hubbell, 1980). En effet, lorsque plusieurs microorganismes se disputent le même nutriment limitant en culture continue, les modèles de compétition microbienne prédisent la survie d'un seul microorganisme dans le réacteur et la disparition de tous les autres. Celui qui s'implante est celui qui impose la plus faible concentration résiduelle en substrat au taux de croissance dicté par le taux de dilution (Harder and Kuenen, 1977).

Considérons deux microorganismes A et B avec des paramètres de croissance tels que décrits dans la Figure 15. L'implantation de la population A ou de B en régime permanent dépend du taux de dilution appliqué. A un taux de dilution compris entre les valeurs de  $\mu_{\max}$  respectives de A et B, B est progressivement lessivé du

réacteur, laissant A s'établir. Pour un taux de dilution supérieur à  $0,4 \text{ h}^{-1}$  et inférieur à  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , les deux souches sont capables de se développer, mais c'est A qui s'impose car il s'agit du microorganisme qui maintient la plus faible concentration résiduelle en substrat (concentration à laquelle le taux de croissance spécifique de B est inférieur au taux de dilution). A l'inverse, à des taux de dilution inférieurs à  $0,4 \text{ h}^{-1}$ , B s'implante pour la même raison. En théorie, la coexistence de A et B n'est donc possible qu'au taux de dilution pour lequel les deux courbes se croisent, ici  $0,4 \text{ h}^{-1}$  (Veldkamp and Jannasch, 1972).



**Figure 15.** Propriétés de croissance de deux microorganismes A (r-strategist) et B (K-strategist), tel que  $\mu_{\max}(A) > \mu_{\max}(B)$  et  $K_S(A) < K_S(B)$ .

Jannasch (1967) a été le pionnier dans l'utilisation du chemostat comme outil de sélection de consortia issus de l'eau de mer. Il a montré que les bactéries sélectionnées diffèrent selon la concentration de la source de carbone limitant la croissance. Andrews and Harris (1986) ont ensuite introduit la théorie de la sélection r/K, qui décrit les deux types de stratégies microbiennes dans la nature ou dans des écosystèmes artificiels. Les « r-strategists » sont capables de s'acclimater à un environnement peu concurrentiel et riche en ressources, alors que les « K-strategists » sont davantage adaptés à un milieu surpeuplé et limité en substrat (Attramadal et al., 2012 ; Rojas-Tirado et al., 2017 ; Juteau et al., 1999). En adéquation avec l'équation cinétique de Monod et la disponibilité en ressource, les « r-strategists » peuvent être définis comme ayant un taux de croissance spécifique élevé et une faible affinité avec les substrats. Au contraire, les « K-strategists » ont une croissance lente, caractérisée par un faible taux de croissance spécifique et une forte affinité pour les ressources (Oshiki et al., 2016 ; Erbilgin et al., 2017).

Il convient de relever que même si le formalisme de Monod permet d'expliquer en général le comportement des cultures en chemostat, il demeure simpliste et ne peut être appliqué dans toutes les situations. A titre d'exemple, il est fondé sur l'hypothèse que le rendement de croissance  $Y_{(x/c/S)}$  est indépendant du taux de croissance spécifique mais ne prend pas en considération d'éventuelles variations liées à un changement de composition cellulaire ou des besoins en énergie (Jannasch, 1967). Il néglige également les effets potentiels liés à la densité de population, susceptible d'être à l'origine de l'excrétion de produits pouvant stimuler ou

inhiber la croissance (Tempest, 1970). Par ailleurs, dans le cas où le substrat limitant présente un caractère toxique pour les microorganismes, le taux de croissance spécifique diminue à partir d'un seuil qui correspond à la concentration optimale du substrat. La compétition microbienne est ainsi, à la fois, dictée par l'affinité des microorganismes pour le substrat et par leur capacité à tolérer de fortes concentrations. La relation entre la concentration de substrat et le taux de croissance spécifique est ici représentée par l'équation d'Haldane (Edwards, 1970 ; Pawlowsky and Howell, 1973) :

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{S}{(S + K_s)(1 + \frac{S}{K_i})}$$

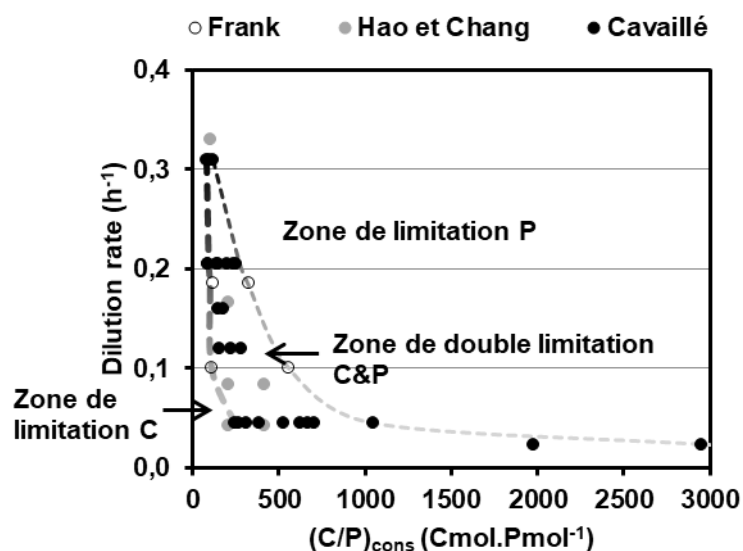
avec  $K_i$ , la constante d'inhibition

## IV. 2. Sélection de producteurs et accumulation de PHA en chemostat

### IV. 2. a. Notion de double limitation nutritionnelle (DLN)

Cavaillé et al., (2016) ont démontré qu'appliquer une double limitation carbone et phosphore entraînait une sélection robuste de producteurs de PHB à partir de boues activées. L'enrichissement en microorganismes avec un fort potentiel de stockage, simultanément à l'accumulation de PHB, a été éprouvé sur acétate et un mélange acétate/butyrate. Une teneur en PHB de 80% (en masse sèche) a pu être atteinte au taux de dilution le plus faible  $D = 0,023 \text{ h}^{-1}$ . En couvrant une large gamme de degrés de limitation en phosphore  $(C/P)_{app}$  à plusieurs taux de dilution donnés ( $D$ ), le domaine d'exploitation de production de PHB, correspondant à la zone de double limitation nutritionnelle (DLN), a pu être déterminé (Figure 16). Plus précisément, trois zones ont pu être mises en évidence :

- (1) la zone de limitation carbone ( $(C/P)_{app} < (C/P)_{cons}$ ) : limitation de la croissance exclusivement par le carbone, présence de phosphore résiduel dans le surnageant de culture. L'absence de limitation phosphore ne permet pas la sélection de microorganismes producteurs de PHB.
- (2) la zone de double limitation nutritionnelle ( $(C/P)_{app} = (C/P)_{cons}$ ) : pas de traces de carbone ni de phosphore dans le surnageant, limitation concomitante de la croissance cellulaire par le phosphore et le carbone. La double limitation induit la sélection systématique de producteurs de PHB.
- (3) la zone de limitation phosphore ( $(C/P)_{app} > (C/P)_{cons}$ ) : limitation de la croissance strictement par le phosphore, présence de carbone résiduel dans le surnageant de culture. L'accumulation d'AGV dans le milieu empêche l'obtention d'un régime stable et la sélection robuste de microorganismes producteurs de PHB. Une accumulation significative peut également conduire à une inhibition de la croissance (du fait des propriétés toxiques des AGV) et donc un lessivage progressif des cellules du réacteur.



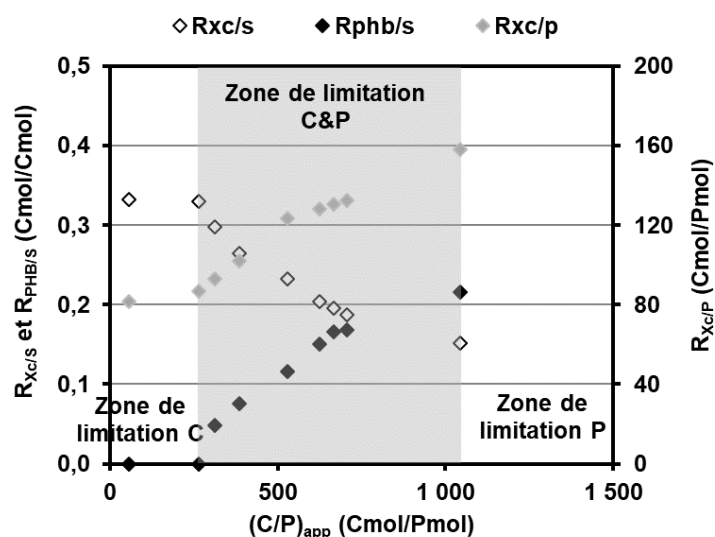
**Figure 16.** Zone de double limitation nutritionnelle (DLN) pour des cultures mixtes sélectionnées en chemostat. Chaque valeur correspond à l'observation d'un régime pseudo-permanent. Les résultats obtenus par Cavallé sont représentés par des cercles noirs, ceux issus de la thèse de Frank (1999) par des cercles blancs et ceux de Hao et Chang (1987) par des cercles gris. Les lignes correspondent aux frontières de la zone DLN.

L'existence d'une zone de double limitation nutritionnelle avait déjà été observée en cultures pures. Egli and Quayle (1986) ont été les premiers à étudier les effets de la variation du ratio (C/N) dans le flux d'alimentation sur le comportement physiologique de la levure *Hansenula polymorpha* à un unique taux de dilution de 0,10 h<sup>-1</sup>. Les auteurs ont détecté un régime de croissance intermédiaire, qui est caractérisé par la consommation complète de l'azote et du carbone. Egli (1991), en testant plusieurs taux de dilution, a ensuite mis en exergue que la plage de double limitation en azote et carbone était fonction du ratio (C/N) et du taux de croissance spécifique. Le lien entre la zone de DLN et la production de PHA a été établi par Durner et al., (2000), avec l'observation d'une accumulation efficace de *mcl*-PHA par *Pseudomonas oleovorans* lors d'une alimentation en octanoate. D'autres études ont, par la suite, poursuivi l'investigation de l'accumulation de PHA en culture continue en condition de double limitation azote et carbone, confirmant le potentiel de cette stratégie (Zinn et al., 2011 ; Zinn et al., 2004 ; Egli and Zinn, 2003). En raison du fait que toutes les sources de carbone sont complètement converties lors d'une culture conduite en double limitation, cette méthode semble également bien adaptée pour manipuler la composition des copolymères. En modifiant le rapport entre les sources de carbone dans l'alimentation, il est possible d'ajuster la structure du copolyester produit (Durner et al., 2001). Sur la base de ces considérations, Zinn et al., (2003) ont démontré que la teneur en 3HV au sein du polymère P(3HB-co-3HV) pouvait être articulée en changeant les ratios entre propionate et butyrate, pour une culture de *C. necator* en limitation C&N. Le même phénomène de double limitation a été constaté par Hao and Chang (1987) pour une limitation carbone et phosphore, avec *Acinetobacter spp* (Figure 16). Plus tard, Franck (1999) a pu définir les frontières de la zone de DLN avec une limitation C&P.

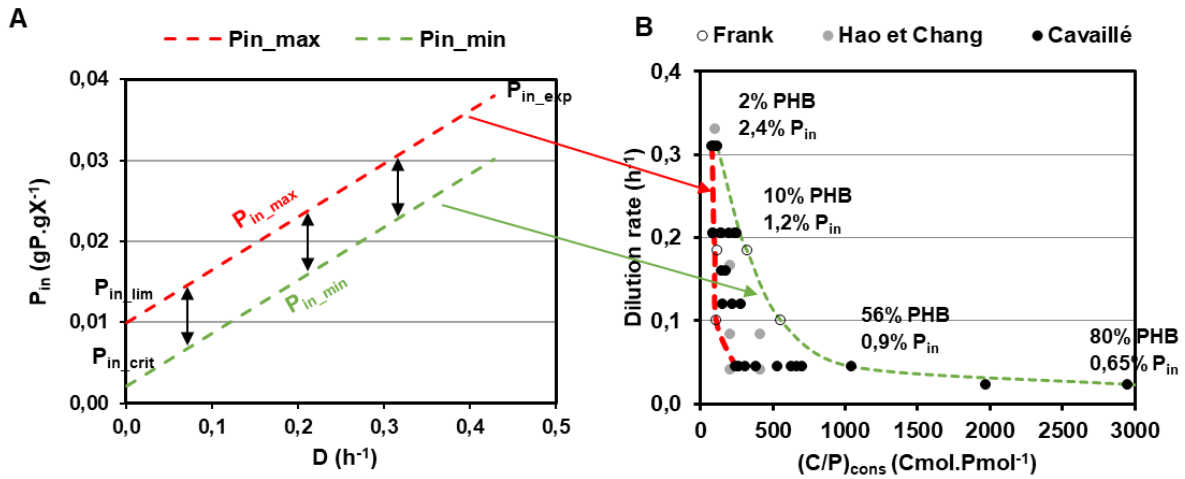
#### IV. 2. b. Devenir du carbone dans la zone de DLN

Par quel mécanisme la double limitation nutritionnelle induit-elle l'accumulation de PHA ?

Une explication à l'existence d'une zone de croissance en double limitation nutritionnelle réside dans le fait que les microorganismes sont capables de moduler leur composition intracellulaire à différents niveaux de limitation exogène (Poblete-Castro et al., 2012). En effet, en conditions de limitation par un élément unique, les cellules présentent une composition globale relativement constante, tandis qu'en double limitation, leur composition dépend fortement des ratios des substrats limitants et s'ajuste à la disponibilité réelle des deux éléments nutritifs (Egli, 1991). La Figure 17 donne un exemple de l'évolution des rendements observés dans la zone de DLN avec une limitation C&P à un unique D de 0,045 h<sup>-1</sup> (Cavaillé et al., 2016). L'augmentation du degré de limitation en phosphore induit une diminution du rendement de biomasse catalytique par rapport au phosphore ( $R_{Xc/P}$ ), soit une diminution du taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ). Les microorganismes sélectionnés présentent ainsi une plasticité vis-à-vis du phosphore, autrement dit une capacité à réorganiser leur contenu intracellulaire afin de maximiser la division cellulaire. En parallèle, l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  a également généré une diminution du rendement de croissance, conjugué à un accroissement du rendement en PHB par rapport au substrat carboné (Figure 17). La dilution du phosphore intracellulaire réoriente donc la consommation du carbone de la croissance vers la production de PHB. En d'autres termes, à un D donné, la disponibilité en phosphore fixe le  $P_{in}$ , qui détermine la capacité de croissance. L'excès de carbone résultant est alors redirigé vers le PHB (Cavaillé et al., 2016).



**Figure 17.** Rendements observés en cellules catalytiques ( $X_c$ ) et PHB par rapport au substrat ( $R_{(Xc/S)}$  et  $R_{(PHB/S)}$ , respectivement) et de  $X_c$  par rapport au phosphore ( $R_{(Xc/P)}$ ) en fonction du degré de limitation phosphore appliqué  $((C/P)_{app})$  pour une culture continue conduite à  $D = 0,045 \text{ h}^{-1}$  ; la zone de DLN est représentée en gris (Cavaillé et al., 2016).

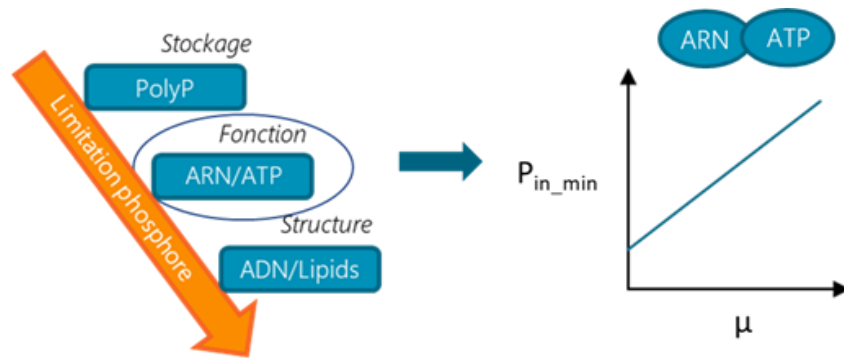


**Figure 18.** Représentation des taux de phosphore intracellulaires minima et maxima en fonction du taux de dilution appliqués ; les traits en pointillés donnent une estimation de la zone de DLN (A). Teneurs en PHB maximales, et taux de phosphore intracellulaires correspondants, atteintes aux différents taux de dilution (B) (Cavaillé, 2015).

Pour quelles raisons de fortes teneurs en PHB ne peuvent-elles être atteintes qu'à de faibles taux de dilution ?

Le potentiel de réorganisation du phosphore dépend du taux de dilution appliqué (Cavaillé et al., 2016). En effet, il est d'autant plus élevé que le taux de dilution est faible, ce qui est à l'origine de l'élargissement de la zone de double limitation nutritionnel avec la diminution du taux de dilution. Au sein de la zone de DLN, le  $P_{in}$  varie entre deux bornes, une valeur maximale ( $P_{in\_max}$ ) et une valeur minimale ( $P_{in\_min}$ ) en fonction du degré de limitation en phosphore. Le  $P_{in\_max}$  correspond à la valeur de  $P_{in}$  en l'absence de limitation phosphore. A l'inverse, le  $P_{in\_min}$ , qui exprime le besoin minimal en phosphore pour qu'une division cellulaire puisse avoir lieu, désigne la valeur de  $P_{in}$  en condition de limitation phosphore stricte. Les valeurs respectives de  $P_{in\_min}$  et  $P_{in\_max}$  augmentent avec le taux de croissance spécifique (Figure 18A). De fait, le phosphore est un composant cellulaire dont les pools peuvent être compartimentés en trois fractions majeurs : les molécules de stockage (polyphosphates), les molécules fonctionnelles nécessaires à la machinerie de synthèse (ARN, intermédiaires phosphorylés) et les molécules structurales permettant le maintien de l'intégrité cellulaire et la viabilité des cellules (ADN, phospholipides membranaires). Une limitation en phosphore affecte alors successivement les composés de stockage, puis ceux dits de fonction et enfin ceux de structure (Fuhs, 1969), tel que représenté sur la Figure 19. Or, il existe une relation linéaire entre la teneur intracellulaire en ARN et le taux de croissance spécifique (Karpinets et al., 2006). Le besoin en phosphore est, par conséquent, d'autant plus grand que le taux de dilution appliqué est élevé (Ehlers et al., 2010 ; Elser et al., 2000 ; Løvdaal et al., 2008). Le  $P_{in\_max}$  varie entre la valeur de  $P_{in}$  à  $\mu_{max}$  ( $P_{in\_exp}$ ), estimée à 3,8% ( $gP^{-1}.gXc^{-1}$ ), et une valeur limite lorsque  $\mu$  est nul ( $P_{in\_lim}$ ), estimée à 1% (Franklin et al., 2011). La valeur de  $P_{in\_min}$  limite tend, quant à elle, vers une valeur critique ( $P_{in\_crit}$ ) estimée à 0,4% (Figure 18A). La relation entre le  $P_{in\_max}$  et le taux de croissance spécifique peut être supposée linéaire et formulée comme suit (Cavaillé, 2015) :

$$P_{in\_max} = (P_{in\_exp} - P_{in\_lim}) \times \frac{\mu}{\mu_{max}} + P_{in\_lim} \quad (1)$$



**Figure 19.** Répartition des principaux pools de molécules phosphorées et effets d'une limitation en phosphore ; représentation de la relation linéaire entre le besoin minimal en phosphore des cellules et le taux de croissance spécifique (Cavaillé, 2015).

La teneur en PHB est directement corrélée au taux de phosphore intracellulaire. Une dilution du phosphore élevée n'étant donc possible qu'à de faibles taux de dilution (pour lesquels le besoin minimal en phosphore est plus faible), de fortes fractions en PHB ne peuvent être nécessairement atteintes qu'à des faibles D. Les teneurs maximales en PHB, et les taux de phosphore intracellulaire correspondants, obtenus pour différents taux de dilution par Cavaillé et al., (2016) sont représentés sur la Figure 18B.

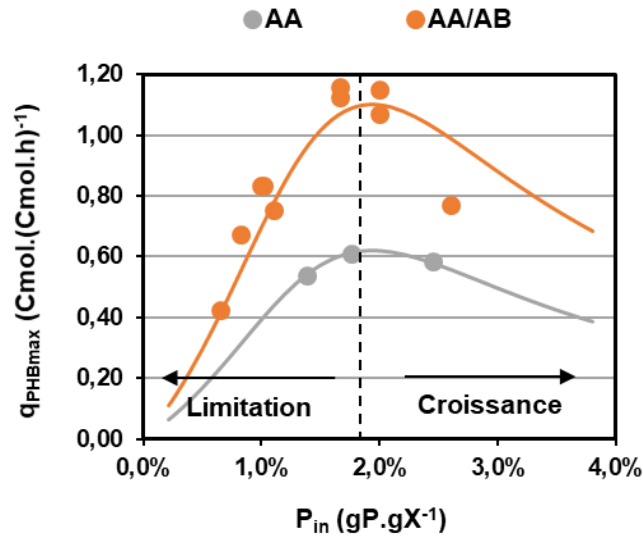
#### **IV. 2. c. Potentialités de production de PHA selon le taux de phosphore intracellulaire**

De manière à établir plus précisément la relation entre le taux de phosphore intracellulaire et la réorientation de la consommation du carbone vers l'accumulation de PHB, les dynamiques de conversion du carbone ont été étudiées en réacteur batch par Cavaillé (2015). La vitesse spécifique maximale de production de PHB des populations microbiennes sélectionnées en culture continue a alors été déterminée en condition de carence en phosphore, sur le même substrat que celui que celui sur lequel a été opéré l'enrichissement (acétate ou acétate/butyrate). La Figure 20 représente l'évolution du  $q_{\text{PHBmax}}$  observé selon le  $P_{\text{in}}$  et la nature de la source de carbone. Il convient de préciser qu'elle ne comporte que les résultats obtenus à partir de consortia pour lesquels le degré de dominance d'une seule population productrice de PHB (i.e. *Zoogloea* spp. ou *Malikia* spp.) était supérieur à 70%, permettant de pouvoir l'appréhender comme une culture pseudo mono-souche productrice de PHB. A l'inverse, l'étude des potentialités d'accumulation de PHB de consortia à l'issue d'une sélection majoritaire du genre microbien *Acinetobacter* spp. (favorisée par l'application des taux de dilution supérieurs à  $0,21 \text{ h}^{-1}$  et une alimentation en acétate) a permis d'identifier la population comme une médiocre productrice de PHB, et ses résultats n'ont donc pas été pris en compte dans l'évaluation de l'influence du  $P_{\text{in}}$  sur le  $q_{\text{PHB}}$ .

Indépendamment de la nature du substrat carboné, la valeur maximale de  $q_{\text{PHB}}$  est atteinte à un  $P_{\text{in}}$  environ égal à 1,8%. En revanche, la valeur obtenue est directement conditionnée la nature de la source de carbone : elle est près de deux fois supérieure avec une alimentation en acétate/butyrate qu'avec une alimentation en



acétate (respectivement 1,2 et 0,6 Cmol.(Cmol.h)<sup>-1</sup>). Au-delà de la valeur optimale de P<sub>in</sub> (en d'autres termes, lorsqu'elle tend vers P<sub>in,max</sub>), la vitesse spécifique de production de PHB diminue car le carbone est orienté privilégialement vers la croissance cellulaire. A l'inverse, en deçà de cette valeur (lorsque P<sub>in</sub> tend vers P<sub>in,min</sub>), la faible teneur en phosphore fragilise et limite la cinétique de production de PHB. Par conséquent, il existe une concentration en phosphore intracellulaire optimale permettant de maximiser les flux de conversion du carbone vers la production de PHB (Cavaillé, 2015). Cette valeur relativement élevée traduit la nécessité d'un fort niveau d'activité métabolique.



**Figure 20.** Evolution de la vitesse spécifique maximale de production de PHB ( $q_{PHB_{max}}$ ) en fonction du taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ) en réacteur batch, à partir de populations sélectionnées en chemostat en limitation C&P avec acétate (AA) et un mélange acétate/butyrate (AA/AB). Les traits continus représentent les valeurs obtenues par le modèle, établies à partir d'une fonction d'Haldane modifiée (Cavaillé, 2015).

La relation entre la vitesse spécifique de production de PHB et le taux de phosphore intracellulaire peut être représentée par une fonction d'Haldane modifiée, dont la structure mathématique est adaptée des travaux de Guo and Vanrolleghem (2014) :

$$q_{PHB} = q_{PHB_{max}} \times \frac{P_{in}}{K_{P_{in}} + \alpha P_{in} + \frac{P_{in}^2}{K I_{P_{in}}}} \quad (2)$$

$$\text{tel que } \alpha = 1 - 2 \times \sqrt{\frac{K_{P_{in}}}{K I_{P_{in}}}}$$

avec  $K_{P_{in}}$  et  $K I_{P_{in}}$ , les constantes cinétiques

Les valeurs des constantes cinétiques ont pu être déterminées à partir des résultats expérimentaux présentés sur la Figure 20 (Cavaillé, 2015).

#### **IV. 2. d. Procédés continus en deux étages**

Cavaillé et al., (2016) ont démontré la viabilité d'un procédé continu mono-étagé dans lequel l'accumulation de PHB est opérée simultanément à l'enrichissement microbien, atteignant des teneurs en PHB de 80%. En revanche, l'obtention de fortes teneurs en PHB nécessite l'imposition de faibles taux de dilution, restreignant la productivité (ou requérant alors l'utilisation de substrats concentrés). Les limites du chemostat en simple étage sont liées aux particularités cinétiques de la biosynthèse de PHA : en tant que produit du métabolisme secondaire, la croissance cellulaire et le stockage de PHA sont temporairement découplés (Koller, 2018b). Il semble donc intéressant de considérer un système continu à deux étages, avec deux réacteurs en série, l'un dédié à la sélection microbienne et la croissance, et l'autre à l'accumulation de PHA (Koller and Muhr, 2014). Un procédé bi-étagé permet ainsi de pouvoir optimiser séparément chacune des étapes, en appliquant des conditions opératoires différentes. Par exemple, un taux de dilution plus élevé peut être imposé dans l'étage d'enrichissement, dont l'objectif n'est plus que d'assurer une sélection robuste de microorganismes avec de fortes capacités de production de PHA. De même, il est possible d'envisager un faible temps de séjour dans l'étage d'accumulation, si les vitesses spécifiques de production de PHA des populations sélectionnées sont élevées. Par ailleurs, un système à double étage présente l'avantage d'abaisser les coûts liés à l'aération, qui sont généralement le facteur limitant dans les procédés aérobies en cultures mixtes en vue d'un déploiement à grande échelle. Bien que la demande de transfert en oxygène soit identique pour une productivité donnée, indépendamment de la stratégie expérimentale ( $r_{O_2}$  proportionnelle à  $r_{PHA}$ ), le réacteur bi-étagé permet de segmenter le besoin en oxygène. Etant donné que l'augmentation des coûts d'aération avec l'augmentation du transfert en oxygène ( $k_L a$ ) est exponentielle (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009), il paraît donc préférable de découpler croissance cellulaire et production de PHA.

La production de PHA a déjà été éprouvée avec succès en réacteur continu à deux étages, mais uniquement en cultures pures. A titre d'exemple, Du et al., (2001) ont mis en place une production de PHB avec *C. necator*, avec un premier étage en double limitation C&N, et un deuxième étage en limitation N, obtenant une teneur en PHB allant jusqu'à 72% et une productivité en PHB de  $1,43 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . La production de P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé a été opérée pour la première fois par Ramsay et al., (1990) avec *A. latus*, atteignant une teneur en PHA de 58% et une fraction en 3HV de 11 mol%. Les auteurs ont notamment mis en avant les bénéfices d'un procédé à deux étages comparativement à un procédé mono-étagé, en montrant une nette augmentation de la productivité. Koyama and Doi (1995) ont reproduit le même procédé avec *A. eutrophus* en cherchant à maximiser la teneur en 3HV, parvenant à obtenir un copolymère avec 79 mol% de 3HV.



---

# PORTEE ET STRUCTURE DE LA THESE

---

## Qu'est ce qui est déjà connu ?

En raison de leur complète biodégradabilité et de propriétés analogues aux plastiques conventionnels issus des énergies fossiles, les PHA sont considérés comme l'un des bioplastiques les plus prometteurs, avec un marché à fort potentiel. Le PHA le plus étudié, l'homopolymère PHB, est toutefois cristallin, rigide et cassant, ce qui limite son utilisation et entrave sa diffusion. L'incorporation de monomères à des chaînes carbonées plus longues tels que le 3HV permet l'amélioration des propriétés thermomécaniques et une augmentation du domaine d'application. Le copolymère P(3HB-co-3HV), dont les caractéristiques sont intimement liées à la teneur en 3HV, présente ainsi des propriétés en phase avec les exigences industrielles.

La production industrielle de PHA, et de P(3HB-co-3HV) en particulier, est encore exclusivement réalisée en cultures microbiennes pures. Néanmoins, les coûts de production inhérents à l'emploi de cultures axéniques restreignent son déploiement à très grande échelle et incitent le recours aux cultures microbiennes mixtes. Cette alternative est d'autant plus intéressante qu'elle concilie la production de PHA avec la valorisation des boues de stations d'épurations, dont le traitement actuel reste coûteux et énergivore. Au-delà de s'affranchir des exigences de stérilité, les cultures mixtes ont pour avantage de pouvoir utiliser des substrats complexes tels que des déchets organiques. Une étape préalable de fermentation acidogène est alors essentielle pour les convertir en AGV, précurseurs directs de la synthèse des PHA. En manipulant les paramètres opératoires lors de la digestion anaérobie, il est possible d'orienter le spectre des AGV produits vers des acides à chaînes impaires (e. g. propionate ou valérate), nécessaires à l'obtention de motifs 3HV.

Les procédés de production de PHA en cultures mixtes sont généralement opérés en deux étapes, avec une étape d'enrichissement en microorganismes producteurs de PHA, et une deuxième étape d'accumulation de PHA par les consortia sélectionnés. L'étape de sélection microbienne consiste en l'application de conditions transitoires pour lesquelles les capacités de stockage du carbone sous forme de PHA confèrent un avantage concurrentiel. La production de PHA est ensuite déclenchée par une carence ou une limitation nutritionnelle. La limitation la plus fréquemment utilisée est la limitation en azote, mais elle est à l'origine d'une diminution de l'activité métabolique de la cellule. A l'inverse, la limitation en phosphore, un composant plus facilement mobilisable par les cellules, induit une conversion plus efficace du carbone en PHA. L'accumulation de PHA peut alors être stimulée avec le maintien d'une croissance résiduelle. De plus, le type et le degré de limitation affectent la composition du copolymère produit. L'influence de la nature et du niveau de limitation, à la fois

sur le rendement, la productivité, et la teneur en 3HV, reste encore à être précisément définie, et notamment en cultures mixtes.

La majorité des procédés de production de PHA en cultures mixtes sont réalisés en culture discontinue, dont le mode opératoire peut restreindre la productivité. Dans ce contexte, les procédés continus constituent une alternative d'intérêt. En culture continue, la compétition microbienne est remportée par le microorganisme qui impose la plus faible concentration résiduelle en substrat limitant, au taux de croissance spécifique régi par le taux de dilution. Ce dernier induit un lessivage de tous les microorganismes dont le taux de croissance spécifique maximal lui est inférieur. La limitation en un nutriment oriente la compétition vers les populations possédant la plus forte affinité pour l'élément limitant (correspondant à la plus faible valeur de  $K_s$ , en basant le modèle de compétition microbienne sur des cinétiques simples de Monod).

Il a été démontré par Cavaillé et al., (2016) qu'en culture continue, appliquer une double limitation carbone et phosphore assurait un enrichissement systématique en producteurs de PHA. Néanmoins, la sélection n'a été éprouvée que sur acétate ou acétate/butyrate, ne permettant de valider cette stratégie uniquement que pour des producteurs de PHB. Le domaine d'exploitation de la production de PHB correspond à la zone de double limitation nutritionnelle (DLN). Grâce à la plasticité cellulaire pour le phosphore, les microorganismes peuvent ajuster leur taux de phosphore intracellulaire aux niveaux de limitation exogène. Au sein de la zone de DLN, le  $P_{in}$  gouverne la distribution des flux de consommation du carbone entre croissance, stockage et maintenance. Lorsque la croissance cellulaire est limitée par le phosphore, la vitesse spécifique maximale de production de PHB est maximale pour un  $P_{in}$  de 1,8%. Toutefois, les capacités d'accumulation de PHB restent très hétérogènes selon l'identité du microorganisme dominant. Enfin, le découplage des phases de sélection et de production de PHA au sein d'un procédé continu en deux étages pourrait améliorer sensiblement les productivités.

## **Quels sont les enjeux de la thèse ?**

L'objectif de cette thèse est d'étudier et d'optimiser un procédé de production de P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé à partir de cultures microbiennes mixtes issues de boues activées.

Dans ces conditions, la stratégie expérimentale se décompose en un premier étage dédié à l'enrichissement en consortia microbiens avec de fortes capacités d'accumulation de PHA, et un deuxième étage consacré à la production de PHA par les microorganismes sélectionnés. La nécessité d'utiliser des AGV avec un nombre impair de carbones pour l'obtention de monomères 3HV a incité à opérer l'ensemble du procédé avec une alimentation intégrant du propionate. Pour éviter la perte d'un carbone par décarboxylation, il a été associé à un AGV à chaînes paires (acétate ou butyrate).

Par conséquent, le premier enjeu est d'étudier la reproductibilité de la sélection de producteurs de PHA avec le propionate en appliquant la même stratégie de double limitation C&P (**chapitre 1**). En outre, le suivi des cultures dans l'étage de sélection, et notamment du devenir du carbone, a également pour but de pouvoir déterminer l'influence de la nature de la source de carbone sur la direction de la consommation du substrat (entre croissance cellulaire, stockage de PHA et réactions de maintenance).

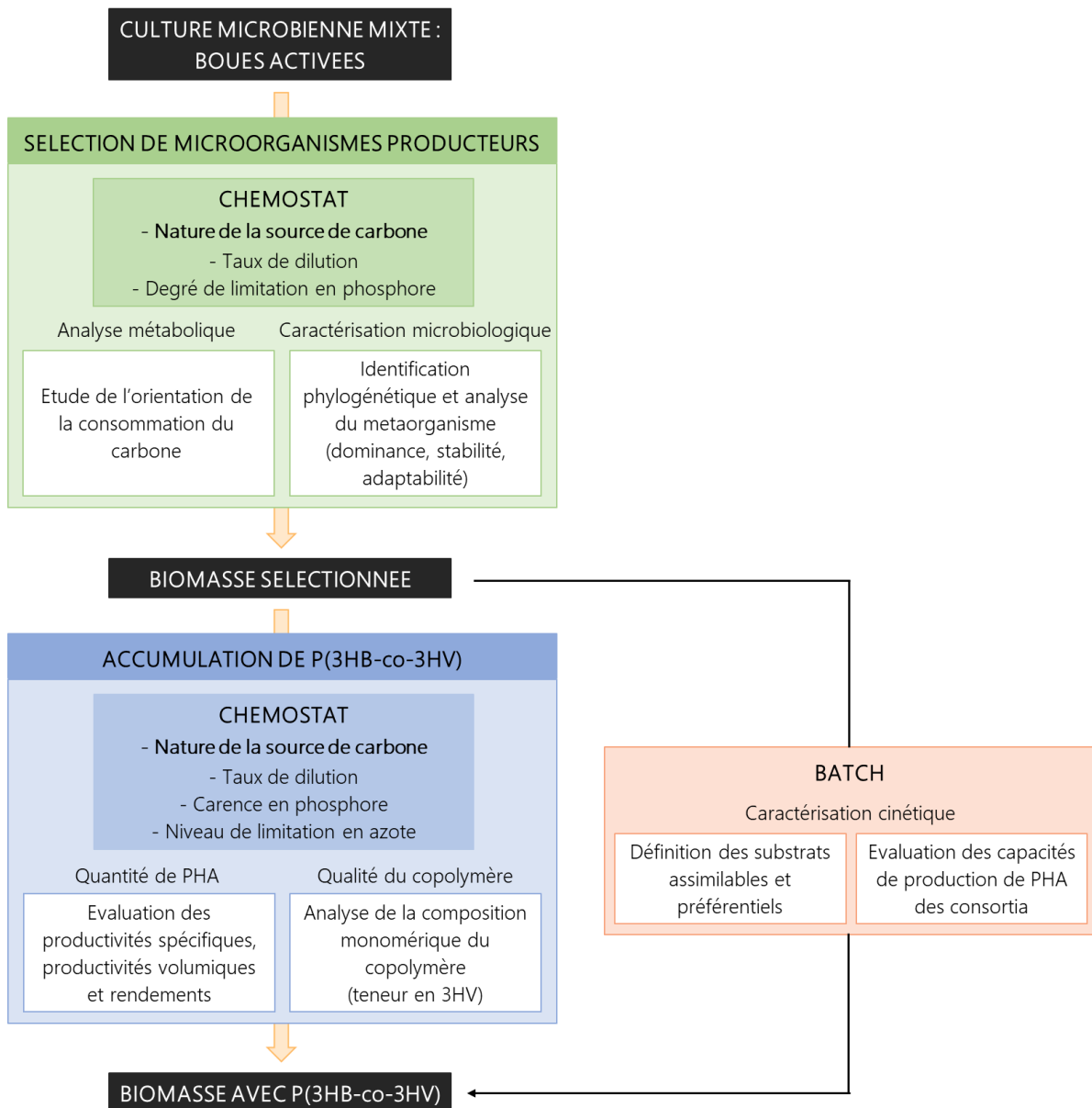
Le deuxième objectif est de qualifier les consortia sélectionnés. La caractérisation intervient à deux niveaux : microbiologique et cinétique. L'analyse phylogénétique renseigne sur la distribution microbienne, l'identité des genres dominants et les dynamiques de sélection. Dès lors, l'idée est de définir l'influence des conditions opératoires (nature du substrat carboné, degré de limitation en phosphore, taux de dilution) sur la sélection microbienne (**chapitre 2**). A partir de cette étude, les facteurs gouvernant la compétition microbienne seront discutés.

Les potentialités d'accumulation de PHA des différentes populations sélectionnées seront ensuite évaluées en réacteur batch. Le mode batch informe sur les dynamiques de production selon l'état physiologique des cellules et les paramètres opératoires. Il permet également de rendre compte des substrats assimilables et préférentiels. Enfin, les capacités de production de PHA de chacun des genres bactériens majoritaires seront spécifiées à l'aide des résultats obtenus en batch, conjuguée à l'analyse de la distribution microbienne et à l'utilisation du modèle cinétique développé par Cavallé (2015) (**chapitre 3**).

Le **chapitre 4** est porté sur l'étude de l'influence des paramètres opératoires, et notamment de la nature et du degré de limitation nutritionnelle (carence en phosphore et limitation en azote) sur les performances de production de PHA. Afin de mieux comprendre l'effet des limitations, les cinétiques observées en batch ainsi que dans l'étage de production du réacteur continu bi-étagé seront utilisées pour alimenter le modèle et y apporter de nouveaux éléments. L'intérêt ultérieur du modèle sera de s'en servir comme outil de prédiction et balayer une large gamme de conditions expérimentales, en vue d'optimiser le procédé.

Enfin, le **chapitre 5** traite de la composition monomérique du copolyester P(3HB-co-3HV) et s'intéresse aux effets de l'ensemble des paramètres opératoires du procédé sur la modulation de la teneur en 3HV (fraction en propionate, nature du mélange carboné, taux de phosphore intracellulaire, carence en azote). De surcroît, est présentée l'étude du potentiel de production d'AGV à partir de pelures de pommes de terre, avec pour objectif de maximiser la fraction en AGV à chaînes impaires et de pouvoir établir un parallèle avec la fraction en 3HV qui pourrait in fine être obtenue.

L'ensemble des enjeux et objectifs scientifiques soulevés dans le cadre de cette thèse sont récapitulés dans la Figure 21.



⇒ Que devient le carbone durant la phase de sélection microbienne ?

Chapitre 1 | Reproductibilité de la sélection de producteurs de PHA et étude du devenir du carbone selon la nature de la source de carbone

⇒ Qui sont les microorganismes sélectionnés ?

Chapitre 2 | Etudes des facteurs gouvernant la compétition microbienne en culture continue

⇒ Quelles sont les capacités de production de PHA des microorganismes ?

Chapitre 3 | Influence de la nature de la source de carbone sur les potentialités de production de PHA des consortia sélectionnés

⇒ Quels sont les paramètres opératoires à appliquer pour maximiser la production

Chapitre 4 | Influence du type de limitation nutritionnelle sur les performances de production de PHA

⇒ Quels sont les paramètres opératoires à appliquer pour maximiser la teneur en

Chapitre 5 | Effets des paramètres opératoires sur la composition du copolymère P(3HB-co-3HV)

**Figure 21.** Démarche expérimentale, objectifs scientifiques et structure de la thèse

# **MATERIELS ET METHODES**

---





## **I. Conditions expérimentales**

### **I. 1. Consortia microbiens**

Les consortia microbiens utilisés pour l'ensemble des expérimentations sont des boues activées issues de la STEP de Villefranche-de-Lauragais, traitant des eaux usées urbaines classiques. De manière à opérer toutes les cultures à partir d'un inoculum identique, différents échantillons d'une même boue ont été préparés de la manière suivante : un volume important de boue a été centrifugé à 7500 g pendant 30 min, puis le culot a été récupéré, par élimination du surnageant, et divisé en aliquots conservés à -20°C. Seule une campagne expérimentale a été réalisée avec une boue fraîche, pour s'assurer de l'absence d'une potentielle influence de la nature de l'inoculum et du mode de conservation sur la sélection microbienne.

Préalablement au lancement d'une culture en chemostat, les boues sont décongelées durant 5 h à 4°C, puis remises en suspension dans un volume minimal d'eau physiologique et réactivées en batch. La culture batch est opérée avec l'ensemble des nutriments en excès. Elle est suspendue pendant la phase exponentielle de croissance (déterminée en ligne à partir des valeurs de  $r_{O_2}$ ), généralement atteinte après 15h de culture. La courbe de  $r_{O_2}$  permet de déterminer le taux de croissance spécifique et par extension, la concentration en cellules catalytiques actives. Le contenu du réacteur est alors soutiré et centrifugé pour éliminer les éléments nutritifs restants. Le culot cellulaire est à nouveau remis en suspension dans de l'eau physiologique.

### **I. 2. Milieux de culture**

L'alimentation du 1<sup>er</sup> étage de sélection microbienne est divisée en trois compartiments pour minimiser les risques de contamination potentiels en amont du réacteur : un flacon (5 L) contenant les sources de carbone et phosphore (pour pouvoir contrôler finement le ratio (C/P) appliqué), un flacon (5 L) contenant la solution d'azote et un tank à lait (150 L) avec le milieu minéral (sels et oligo-éléments). La concentration en azote est ajustée pour limiter la quantité d'azote résiduelle dans le milieu et pouvoir mieux réguler celle en entrée de l'étage de production ou dans les réacteurs batch.

Les solutions de carbone, phosphore et azote dans les flacons sont concentrées, afin de réduire la fréquence de leur renouvellement. Les concentrations finales sont présentées dans le Tableau 4. La charge organique est conservée (en  $C_{mol.L^{-1}}$ ), indépendamment de la nature de la source de carbone. Elle a été fixée à environ  $10 g_{DCO.L^{-1}}$ , nécessitant un  $k_{La}$  théorique de  $100 h^{-1}$ , valeur admissible en réacteur industriel « rustique » ou « low cost » (van 't Riet, 1983). Les sels et oligo-éléments sont apportés en excès de manière à s'assurer que seul le phosphore soit l'élément limitant. La concentration en fer dans l'alimentation a été déterminée pour diminuer la quantité résiduelle dans le réacteur et éviter la formation d'oxydes de fer(III).

**Tableau 4.** Composition du milieu d'alimentation de l'étage de sélection microbienne.

Source	Composé	Concentration
Carbone (g/L)	Propionate	1,94
	Butyrate (ou Acétate)	4,04 (6,89)
Phosphore (g/L)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	0,247
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,016
Azote (g/L)	NH <sub>4</sub> OH	0,45
Sels (mg/L)	Citrate d'Ammonium Ferrique	50
	Sulfate de Magnésium	200
	Chlorure de calcium	120
	Acide Sulfurique 96%	50
Oligo-éléments (mg/L)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,038
	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,027
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,014
	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,004
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,004
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,003
	NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,001

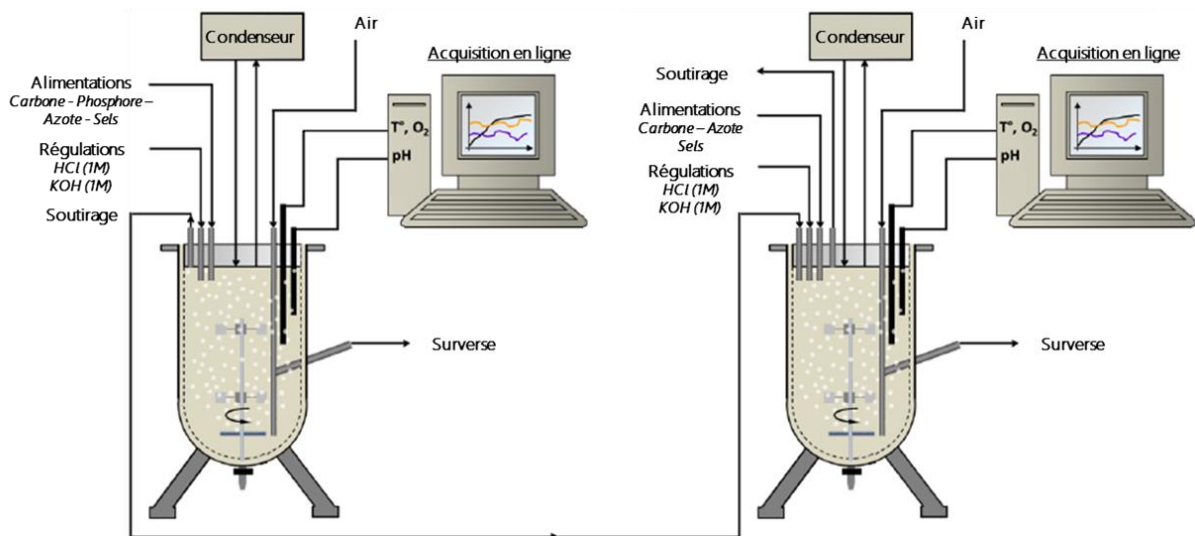
Le milieu de culture en sortie du 1<sup>er</sup> étage est ainsi composé de la biomasse sélectionnée, de traces d'azote résiduel, des sels et oligo-éléments en excès. En revanche, il ne contient ni carbone ni phosphore, tous deux en condition de limitation. Il alimente directement le 2<sup>ème</sup> étage du réacteur bi-étagé, dédié à la production de PHA. Une carence en phosphore est appliquée : il n'y a donc pas d'ajouts de phosphore supplémentaires. Seule une solution contenant une source de carbone, éventuellement d'azote, et de fer (unique minéral qui n'est pas en net excès à l'issue de l'étape de sélection microbienne) compose l'alimentation du réacteur.

Pour les cultures batch, pour lesquelles l'objectif est de déterminer les capacités de production des consortia sélectionnés, le milieu de culture est similaire à celui en entrée du 2<sup>ème</sup> étage.

### I. 3. Réacteurs

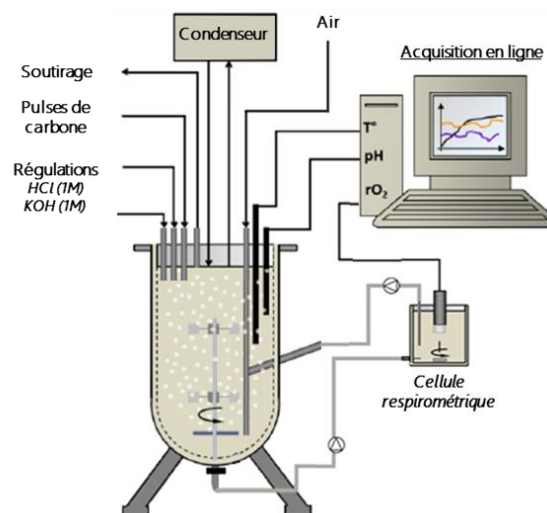
L'ensemble des réacteurs utilisés pour les expérimentations sont ouverts, agités et aérés. Les volumes utiles des réacteurs de sélection microbienne et de production de PHA sont respectivement de 2 et 5 L. Pour les deux réacteurs, l'agitation est assurée par un axe vertical, muni de deux turbines Rushton, placées au 1/3 et 2/3 de la hauteur de l'axe. Les deux réacteurs sont surmontés d'un condenseur pour éviter les pertes liées à l'évaporation. La température est maintenue à 25°C grâce à une double-enveloppe. Le pH est régulé entre 7,25 et 7,8, par ajout de solutions basiques (KOH 1M) et acides (HCl 1M). Un logiciel d'acquisition permet le

sui en ligne de la température, du pH et de l'oxygène dissous. La Figure 22 donne une représentation du réacteur bi-étagé.



**Figure 22.** Schéma du réacteur bi-étagé, avec à gauche le réacteur dédié à la sélection microbienne, et à droite celui à la production de PHA, en série du 1<sup>er</sup>.

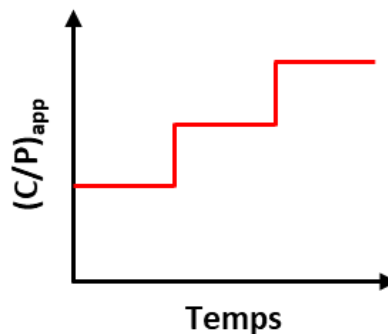
Les cultures en batch sont réalisées dans des réacteurs de 2 L, connectés à une cellule respirométrique dans laquelle est plongée une sonde à oxygène, permettant de déterminer en ligne la vitesse de consommation d'oxygène, tout en conservant un apport continu d'oxygène dans le réacteur. Un système de recirculation assure le renouvellement du milieu dans la cellule, et est interrompu à intervalles de temps réguliers. Entre chaque recirculation, la cellule fonctionne comme un réacteur fermé dans lequel la concentration en oxygène dissous diminue au cours du temps, selon l'activité bactérienne. Après un temps de temporisation, la vitesse de consommation d'oxygène est estimée pendant la phase de décroissance linéaire de la concentration en oxygène dissous dans la cellule. Le dispositif est représenté sur la Figure 23.



**Figure 23.** Schéma d'un respiromètre, dans lequel sont conduites les expérimentations en batch.

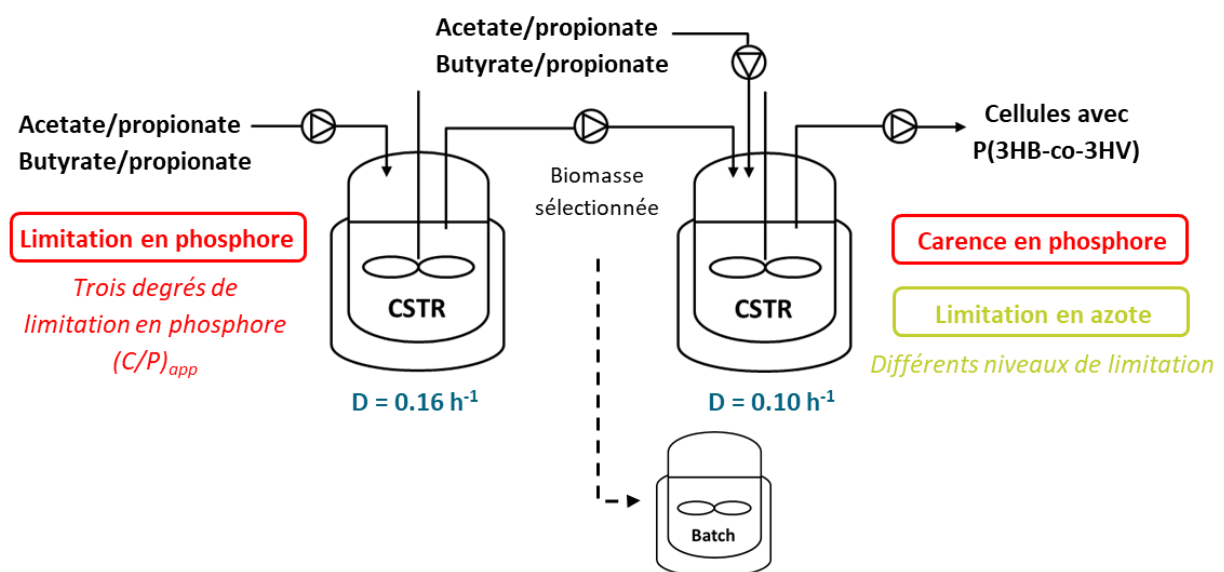
## I. 4. Stratégies de conduite de culture

La stratégie expérimentale adoptée est un procédé continu à deux étages avec un premier étage dédié à la sélection microbienne et la croissance cellulaire, un deuxième consacré à la production de PHA à partir des populations sélectionnées. Les deux étages sont alimentés avec un mélange intégrant du propionate, dont la fraction est égale à 30 Cmol% dans le 1<sup>er</sup> étage et variable dans le 2<sup>nd</sup>. La nature du mélange est conservée d'un étage à l'autre. Les taux de dilution appliqués sont respectivement de  $0,16 \text{ h}^{-1}$  pour l'étage de sélection et  $0,10 \text{ h}^{-1}$  pour l'étage de production. La sélection microbienne a été opérée selon trois degrés de limitation en phosphore, avec une augmentation progressive et séquentielle du  $(C/P)_{app}$  (Figure 24). La production de PHA a été, quant à elle, réalisée en conditions de carence en phosphore, combinée à différents niveaux de limitation en azote  $(C/N)_{app}$ . Le dispositif expérimental dans son ensemble est présenté sur la Figure 25.



**Figure 24.** Stratégie de degré de limitation en phosphore imposée dans les étages de sélection microbienne.

En parallèle des étages de production, l'accumulation de PHA par les consortia sélectionnés a été analysée en réacteur batch, dans des conditions similaires à celles imposées dans les étages de production.



**Figure 25.** Représentation de la stratégie expérimentale adoptée.

## **II. Techniques analytiques**

Le suivi cinétique des cultures est assuré par des prélèvements réguliers dont la fréquence est dépendante du mode de culture (chemostat ou batch) et de la période (régime transitoire ou permanent). Pour chaque prélèvement, des analyses sont effectuées sur l'échantillon total, le surnageant (obtenu après centrifugation à 7000 g pendant 30 min et filtration à 0,45 µm) et sur le culot (après remise en suspension).

### **II. 1. Méthodes de suivi et d'analyse des substrats**

#### ***II. 1. a. Dosage des acides gras volatils (AGV)***

Les AGV sont dosés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'appareil est un GC Varian 3900 équipé d'un injecteur 1177 split/splitless, d'un four programmable, d'une colonne CP-Wax 58 (FFAP) CB (Ø 0,53mm x 15 m) et d'un détecteur par ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est l'azote à un débit de 25 mL/min. Les paramètres de température sont les suivants :

- température de la chambre d'injection : 250°C
- gradient de température du four : 90°C durant 2 minutes, puis augmentation de 20°C par minute jusqu'à 130°C (maintien pendant 12 minutes), puis augmentation de 50°C par minute jusqu'à 210°C (maintien durant 2 minutes).
- température du détecteur : 240°C

Une solution d'acide éthyl-2-butyrique (1 g/L dans de l'acide orthophosphorique à 5%) est utilisée comme étalon interne. La gamme étalon est comprise entre 0 et 1 g/L pour chaque AGV. Les temps de rétention des composés d'intérêt sont respectivement 5,59 min pour l'acide acétique, 6,72 min pour l'acide propionique, 8,36 min pour l'acide butyrique et 12,19 min pour l'étalon interne.

#### ***II. 1. b. Dosage de l'azote ammoniacal***

L'azote ammoniacal des surnageant de culture est dosé, au spectrophotomètre, par la méthode de Nessler (NF T90-015. Août 1975). En milieu alcalin, le réactif de Nessler (mélange de mercure(II) iodure de potassium et hydroxyde de sodium) réagit avec les ions  $\text{NH}_4^+$  conduisant à la formation d'un complexe brun-orangé dont la concentration peut être évaluée par mesure de l'absorbance à 410 nm (détection colorimétrique). Une solution de tartrate double de potassium et de sodium joue le rôle de catalyseur. La gamme étalon est préparée à partir de solutions de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dont la concentration est comprise entre 0 et 8  $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ .

### ***II. 1. c. Dosage des orthophosphates***

Les orthophosphates sont dosés par chromatographie ionique (Dionex ICS 2000, Thermo Scientific), sur une colonne échangeuse d'anions IonPac™ AS19 (Ø 2x250mm). L'éluant utilisé est le KOH 20mM, à un débit de 0,25 mL.min<sup>-1</sup> et 30°C.

## **II. 2. Méthodes de suivi et d'analyse de la biomasse**

### ***II. 2. a. Mesure de la DCO***

La demande chimique en oxygène (DCO) est déterminée par la méthode au dichromate de potassium (T90-101. AFNOR, Novembre 1969). La réduction du dichromate en milieu acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à chaud (150°C) libère de l'oxygène qui est consommé pour oxyder la matière organique. L'excès de dichromate est dosé par une solution de sel de Mohr en présence d'un indicateur coloré (ferroïne). Le dosage de la DCO est effectué par micro-méthode avec des kits LR et MR COD reagents (HANNA Instruments), dont les gammes de DCO sont respectivement comprises entre 0 et 150 mgDCO/L, et 0 et 1500 mgDCO/L : 2 mL de l'échantillon à mesurer sont ajoutés dans un tube de réactif. Une mesure de la DCO est réalisée sur l'échantillon totale (DCO totale) et sur le surnageant de culture après filtration (DCO soluble). La DCO particulaire est obtenue par différence entre ces deux valeurs.

### ***II. 2. b. Mesure de l'azote particulaire***

Le taux d'azote intracellulaire est mesuré à partir de l'azote contenu dans les culots cellulaires par la méthode de Kjeldahl. Une étape préliminaire de minéralisation permet la conversion de l'azote sous forme organique en sels d'ammonium : la matière organique azotée est digérée avec un excès d'acide sulfurique concentré et à haute température, en présence de deux catalyseurs (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et CuSO<sub>4</sub>). Le sulfate de potassium élève la température d'ébullition de l'acide sulfurique et le sulfate de cuivre augmente la cinétique de la réaction. La deuxième étape consiste à isoler les ions ammoniums par distillation pour pouvoir les doser séparément. Pour ce faire, une solution de soude en excès est ajoutée au minéralisat afin de le neutraliser et l'alcaliniser : les ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sont transformés en NH<sub>3</sub>. Le mélange est porté à ébullition puis les vapeurs d'ammoniac sont condensées au contact d'un réfrigérant. Enfin, la dernière étape est celle du dosage. L'ammoniac est recueilli dans un volume connu (50 mL) d'une solution d'acide sulfurique (0,02 N). L'excès d'acide est ensuite dosé à partir d'une solution étalonnée de soude (0,05 N), en présence d'un indicateur coloré (bleu de méthylène).

### **II. 2. c. Mesure du phosphore intracellulaire**

Le taux de phosphore intracellulaire est évalué à partir du phosphore total des culots cellulaires, en utilisant les réactifs HI-93758C-50 Phosphorus, Total Reagent Ascorbic Acid Method (HANNA Instruments), dont la méthode de dosage est adaptée des normes EPA-NERL 365.2 et 4500-P E. Une première étape consiste à oxyder toutes les formes de phosphore avec du persulfate de potassium en milieu acide à 150°C. Dans une seconde étape, les ions orthophosphates réagissent avec une solution de pyrosulfate de potassium générant un composé bleu dont l'intensité de la coloration, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de phosphates.

### **II. 2. d. Dosage des PHA**

L'analyse quantitative des fractions monomériques des PHA est réalisée par chromatographie en phase gaz après butanolise acide selon un protocole adapté de Werker et al., (2008). La butanolise à chaud permet de dépolymériser les PHA et d'obtenir des esters d'acides gras récupérés dans une phase organique après une extraction liquide-liquide.

Un volume suffisant de milieu de culture est centrifugé et remis en suspension dans un faible volume d'eau, puis lyophilisé pendant 72h. La réduction de la teneur en eau dans l'échantillon induit une amélioration du taux de récupération des PHA (Comeau et al., 1988). En effet, la présence d'eau augmente de 40% le temps de traitement nécessaire et diminue de 8% la quantité d'esters détectés durant le dosage (Jan et al., 1995). La lyophilisation permet une plus grande homogénéité du séchage et préserve les PHA d'une dégradation thermique potentielle (Molnar et al., 2021). Le culot lyophilisé est ensuite méticuleusement pesé et transféré dans un tube pyrex, préalablement rincé à l'hexane. Un volume de 2 mL d'une solution de butanol acidifiée (25% d'HCl en v/v) contenant du methyl-hexanoate (standard de référence) à 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Le methyl-hexanoate, mentionné comme standard par Lageveen et al., (1988), a l'avantage d'avoir un coefficient de partage nul et d'être retrouvé uniquement dans la phase organique (Jan et al., 1995). Le butanol semble être l'alcool le plus approprié car les butyl-esters sont peu solubles dans l'eau et génèrent une sensibilité de mesure accrue en raison d'une meilleure détection (grâce à un plus grand nombre de carbone dans l'ester) et d'une extraction plus efficace (la longueur de la chaîne carbonée diminue la polarité de l'ester) (Werker et al., 2008). L'acide chlorhydrique est, enfin, préférable à l'acide sulfurique, dans la mesure où il entraîne une dégradation des monomères de PHA nettement inférieure (Riis and Mai, 1988). Les échantillons sont ensuite introduits dans un minéralisateur sec chauffé à 100°C durant 3h (durée suffisante pour une digestion complète du PHA, sans formation de produits de dégradation tels que l'acide crotonique ou l'acide 3-méthylcrotonique) (Werker et al., 2008). Après refroidissement, des volumes de 2,5 mL d'hexane et 4 mL d'eau ultrapure sont ajoutés. Les tubes sont alors homogénéisés pendant 10s. La phase aqueuse est retirée, et un nouveau volume de 4 mL



d'eau ultrapure est ajouté, suivi de l'étape d'homogénéisation. La phase organique est prélevée et subit une centrifugation (20 min, à 2500 g) afin d'éliminer les éventuels débris cellulaires. Le surnageant est transféré dans un vial dans lequel est ajouté quelques mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pour piéger l'eau résiduelle. La phase, exempte d'eau, est enfin transférée dans un nouveau vial et analysée en CPG.

Deux gammes étalons sont préparées à partir de méthyl-3-hydroxybutyrate (0 à 0,31 mmol<sub>HB</sub>) et de méthyl-3-hydroxyvalérate (0 à 0,054 mmol<sub>HV</sub>), qui subissent une transestérification dans les mêmes conditions que les échantillons.

L'appareil utilisé est identique à celui utilisé pour le dosage des AGV. Les conditions de température sont les suivantes :

- température de la chambre d'injection : 250°C
- gradient de température du four : 70°C durant 3 minutes, puis augmentation jusqu'à 230°C à une vitesse de 5°C/min, et maintient à 230°C pendant 5 minutes.
- température du détecteur : 300°C

Les temps de rétention des composés analysés sont respectivement 6,36 min pour l'étalon interne, 9,41 min pour les monomères HB et 10,49 min pour les monomères HV.

## ***II. 2. e. Observations microscopiques***

La biomasse est visualisée au microscope optique à contraste de phase (Nikon Eclipse H600L) équipé d'une caméra haute performance (Nikon DS-Fi1) et avec l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Visilog V.6.4). Les observations sont effectuées avec l'objectif x100 sous immersion d'huile, à la fois sur des suspensions fraîches et après un protocole de coloration spécifique.

La coloration des granules de PHA est réalisée au noir de Soudan, selon une méthode adaptée du protocole de Pandolfi et al., (2007). Une goutte de suspension bactérienne est déposée sur une lame et soigneusement séchée à l'air ambiant. La lame est immergée dans une solution de noir de Soudan (0,3% dans de l'éthanol à 70% (v/v)) pendant 15 min. Après élimination de l'excès par rinçage avec une solution d'éthanol à 70% et séchage à température ambiante, une solution de safranine (0,5% dans de l'eau déminéralisée) est déposée pendant 10 s. L'échantillon est finalement rincé abondamment avec de l'eau déminéralisée puis séché. Les granules de PHA sont colorés en bleu/noir tandis que le cytoplasme et les membranes cellulaires le sont en rose.

La présence éventuelle d'EPS anioniques, qu'ils soient liés aux cellules ou en suspension dans le surnageant, est révélée avec une coloration au bleu d'alcan (1% dans de l'acide acétique). Une solution de safranine est utilisée pour la contre-coloration.

## II. 3. Analyse de la diversité microbienne

L'évaluation de la diversité microbienne a été réalisée en ciblant le gène universel codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal, par la technique de séquençage Illumina MiSeq et pris en charge par la plateforme GeT-Biopuces de TBI (Toulouse, France).

L'ADN total d'échantillons sélectionnés a été extrait en utilisant les kits Fast DNA Spin Kit for Soil (MPbio), selon les instructions du fabricant. Les régions V4-V5 des ARN 16S extraits, et purifiés, ont été amplifiées à partir des amorces 515F-Y (5'GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) et 926R (5'CCGYCAATTYMTTTRAGTTT) (Walters et al., 2016). La préparation de la bibliothèque d'ADN a été effectuée avec l'instrument Ion Torrent S5. Enfin, les données ont été traitées avec la pipeline DAD2, l'attribution des taxons a été opérée à partir du package rANOMALY avec l'algorithme IDTAXA et les bases de données SILVA 138 16S et GTDB bac120\_arc122 (Theil and Rifa, 2021).

## III. Calcul des paramètres cinétiques et stœchiométriques

### III. 1. Facteurs de conversion

Dans ce travail, les résultats seront principalement présentés avec les unités gDCO/L et Cmol/L. Des facteurs de conversion ont donc été appliqués pour les calculs globaux, et sont répertoriés dans le Tableau 5.

**Tableau 5.** Facteurs de conversion appliqués.

	<b>gDCO/g</b>	<b>g/Cmol</b>
Acétate	1,067	30,03
Propionate	1,514	24,69
Butyrate	1,818	22,03
PHB	1,674	21,52
PHV	1,920	20,02
Biomasse catalytique (Xc)	1,416	25,31

### III. 2. Estimation des concentrations en biomasse catalytique et PHA

Une estimation des concentrations en cellules catalytiques et en PHA peut être réalisée à partir des dosages de la DCO et de l'azote particulaires, sous réserve de certaines hypothèses. La DCO<sub>p</sub>, obtenue par différence entre la DCO totale et la DCO soluble, désigne la biomasse totale qui comprend la concentration en cellules catalytiques et en PHA. L'azote particulaire (N<sub>p</sub>), calculé par différence entre l'azote total dans l'alimentation et l'azote soluble résiduel dans le milieu de culture, représente l'azote contenu dans la biomasse, autrement

dit dans les cellules catalytiques (les PHA étant dépourvus d'azote). Une première hypothèse est faite, selon laquelle tout l'azote consommé est constitutif des cellules. La valeur de l'azote particulaire fournit alors une estimation de la concentration en biomasse catalytique, en considérant que la teneur intracellulaire en azote est égale à 11% ( $\text{gN.gXc}^{-1}$ ) (Mouginot et al., 2014 ; Mulvaney, 2008 ; Zimmerman et al., 2014). La concentration en PHA peut alors être estimée à son tour, à partir des valeurs de DCO particulaire et de cellules catalytiques. La teneur intracellulaire en PHA est alors calculée comme suit :

$$PHA_{in} = \frac{PHA}{PHA + Xc} \quad (3)$$

Les valeurs estimées d'azote particulaire et de PHA sont ultérieurement comparées avec les dosages directs (dosage de l'azote Kjeldahl et dosage des PHA en CPG, respectivement). Le recoupement des valeurs permet ainsi de s'assurer de leur validité.

### III. 3. Calcul des cinétiques de réaction et des bilans de matière

Le bilan matière pour une variable d'état A est calculé comme suit :

$$V \frac{dA}{dt} + A \frac{dV}{dt} = Q_{entrée} \times A_{entrée} - Q_{sortie} \times A_{srtie} + r_A \times V \quad (4)$$

avec A, la concentration de la variable d'état A dans le réacteur

V, le volume de liquide dans le réacteur

$Q_{entrée}$ , le débit d'alimentation

$Q_{sortie}$ , le débit de soutirage

$r_A$ , la vitesse de conversion de A (< 0 si A est consommé, > 0 si A est produit)

#### III. 3. a. Cultures chemostat

En chemostat, le volume reste constant. Le bilan matière s'écrit :

$$V \frac{dA}{dt} = Q_{entrée} \times A_{entrée} - Q_{sortie} \times A_{srtie} + r_A \times V \quad (5)$$

Le régime permanent est caractérisé par la constante des paramètres opératoires ; le terme d'accumulation devient nul. La vitesse de réaction s'écrit alors :

$$r_A = \frac{1}{V} (Q_{sortie} \times A - Q_{entrée} \times A_{entrée}) \quad (6)$$

avec  $Q_{entrée} = Q_{sortie}$  et  $D = Q/V$

Pour le 1<sup>er</sup> étage du réacteur continu bi-étagé, les concentrations en biomasse catalytique et PHA en entrée du réacteur sont nulles (pas d'alimentation continue avec une boue). Les concentrations en substrat carboné et en azote en entrée du réacteur correspondent à celle dans le flux d'alimentation. Les vitesses de réaction (nettes et spécifiques) sont exprimées dans le Tableau 6.

**Tableau 6.** Equations cinétiques en régime permanent dans le 1<sup>er</sup> étage du réacteur bi-étagé.

Variables d'état	Vitesses nettes de réaction	Vitesses spécifiques de réaction
S	$r_S = D \times (S_{entrée} - S)$	$q_S = \frac{r_S}{X_C}$
N	$r_N = D \times (N_{entrée} - N)$	$q_N = \frac{r_N}{X_C}$
PHA	$r_{PHA} = D \times PHA$	$q_{PHA} = \frac{r_{PHA}}{X_C}$
X <sub>C</sub>	$r_{X_C} = D \times X_C$	$\mu = \frac{r_{X_C}}{X_C}$

Le 2<sup>ème</sup> étage du réacteur bi-étagé est alimenté en continu par le 1<sup>er</sup> étage. De ce fait, les concentrations en cellules catalytiques et PHA en entrée du réacteur sont celles en sortie du 1<sup>er</sup> étage (ajustées à partir du ratio débit en sortie du 1<sup>er</sup> étage sur la somme des débits en entrée du 2<sup>ème</sup> étage). De même, les concentrations résiduelles potentielles en substrat carboné et azote en sortie du 1<sup>er</sup> étage doivent être ajoutées à celles du flux d'alimentation du 2<sup>ème</sup> étage. Les vitesses de réaction sont ainsi exprimées dans le Tableau 7.

**Tableau 7.** Equations cinétiques en régime permanent dans le 2<sup>ème</sup> étage du réacteur bi-étagé.

Variables d'état	Vitesses nettes de réaction	Vitesses spécifiques de réaction
S	$r_S = D \times (S_{entrée} - S)$	$q_S = \frac{r_S}{X_C}$
N	$r_N = D \times (N_{entrée} - N)$	$q_N = \frac{r_N}{X_C}$
PHA	$r_{PHA} = D \times (PHA - PHA_{entrée})$	$q_{PHA} = \frac{r_{PHA}}{X_C}$
X <sub>C</sub>	$r_{X_C} = D \times (X_C - X_{C_{entrée}})$	$\mu = \frac{r_{X_C}}{X_C}$

### III. 3. b. Cultures batch

Le réacteur batch est un réacteur fermé homogène à volume constant. Il s'agit d'un système discontinu où les concentrations des composants du milieu varient dans le temps. Dès lors, les vitesses nettes de réaction s'écrivent :

$$r_A = \frac{dA}{dt} \quad (7)$$

La vitesse est négative pour une variable consommée et positive pour une variable produite.

### III. 3. c. Vérification des bilans

Pour l'ensemble des prélèvements, deux bilans sont réalisés :

- Bilan DCO, effectué à partir des dosages des substrats dans l'alimentation, des substrats résiduels dans les surnageants de culture, de la DCO particulaire et du calcul de la vitesse de consommation de l'oxygène ( $r_{O_2}$ ).
- Bilan N, réalisé à partir des dosages de l'azote dans l'alimentation, de l'azote dans les surnageants de culture (Nessler) et de l'azote particulaire (Kjeldahl).

### III. 3. d. Rendements théoriques limites et rendements observés

Les rendements théoriques limites, notés Y, sont issus des travaux de thèse de Grousseau (2012), déterminés à partir d'un modèle métabolique développé avec la souche *C. necator*. Les valeurs de ces rendements ainsi que l'expression des rendements observés, notés R, sont présentés dans le Tableau 8.

**Tableau 8.** Valeur des rendements théoriques limites (Y) et expression des rendements observés (R).

		Croissance cellulaire	Production de PHA
Rendements théoriques limites	Acétate	$Y_{(Xc/S)} = 0,50 \text{ Cmol}_{Xc} \cdot \text{Cmol}_S^{-1}$	$Y_{(PHB/S)} = 0,66 \text{ Cmol}_{PHB} \cdot \text{Cmol}_S^{-1}$
	Propionate	$Y_{(Xc/S)} = 0,61 \text{ Cmol}_{Xc} \cdot \text{Cmol}_S^{-1}$	$Y_{(PHV/S)} = 0,76 \text{ Cmol}_{PHV} \cdot \text{Cmol}_S^{-1}$
	Butyrate	$Y_{(Xc/S)} = 0,65 \text{ Cmol}_{Xc} \cdot \text{Cmol}_S^{-1}$	$Y_{(PHB/S)} = 0,88 \text{ Cmol}_{PHB} \cdot \text{Cmol}_S^{-1}$
Rendements observés	Acétate		
	Propionate	$R_{(Xc/S)} = \frac{r_{Xc}}{r_S}$	$R_{(PHA/S)} = \frac{r_{PHA}}{r_S}$
	Butyrate		

Les vitesses spécifiques ainsi que les rendements théoriques limites permettent de calculer le coefficient de maintenance cellulaire ( $m$ ) :

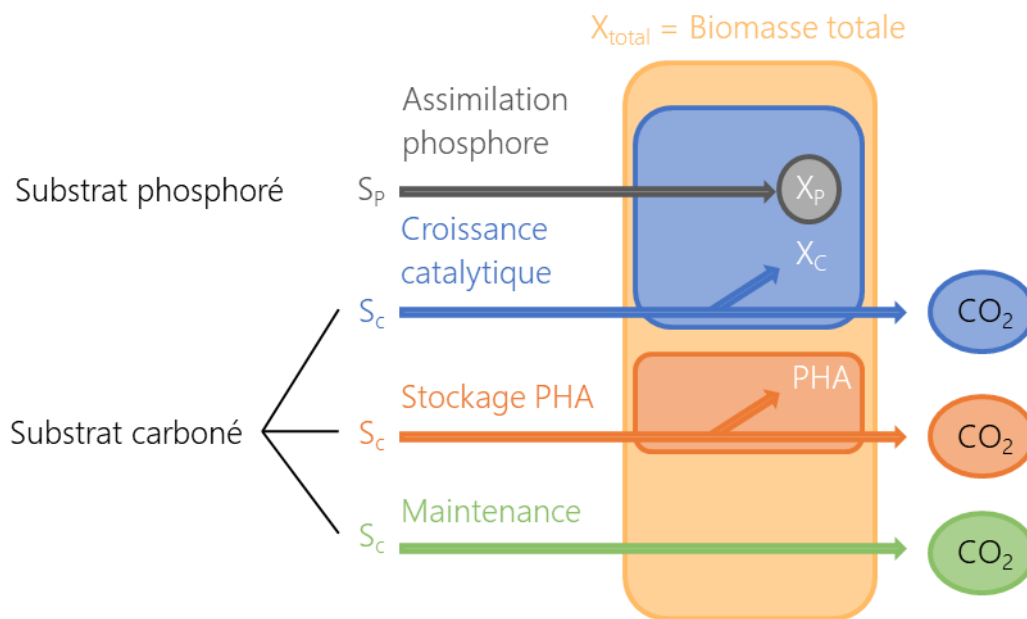
$$m = q_S - \left( \frac{\mu}{Y_{\left(\frac{Xc}{S}\right)}} + \frac{q_{PHA}}{Y_{\left(\frac{Xc}{S}\right)}} \right) \quad (8)$$

## IV. Modèle cinétique

Le modèle cinétique utilisé est inspiré de celui établi par Cavallé (2015), auxquels deux éléments ont, par la suite, été intégrés (azote et vitesses respectives de consommation de chacune des sources de carbone). Le travail de modélisation a été effectué sur AQUASIM, un logiciel d'identification et de simulation des systèmes aquatiques, développé par l'EAWAG (Reichert, 1998).

## IV. 1. Matrice stœchiométrique

Le modèle cinétique cherche à représenter la bascule entre la croissance cellulaire et la production de PHA, gouvernée par le taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ). Il comprend quatre processus cellulaires différents : l'assimilation du phosphore, la croissance microbienne, l'accumulation de PHB et la maintenance cellulaire. La biomasse totale est divisée en deux compartiments : la biomasse catalytique ( $X_c$ ) et le PHB. Le phosphore particulaire correspond à la variable  $X_p$ , à partir de laquelle est exprimé le taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ), qui est égal au rapport de  $X_p$  sur  $X_c$ . L'ensemble des processus cellulaires sont inventoriés sur la Figure 26.



**Figure 26.** Représentation des processus établis pour le modèle cinétique.

La matrice stœchiométrique du modèle est représentée dans le Tableau 9. Elle renseigne sur les coefficients qui régissent la relation entre les variables d'état et les différents processus.

**Tableau 9.** Matrice stœchiométrique du modèle cinétique.

Processus	Variables d'état					
	S <sub>p</sub>	S <sub>c</sub>	X <sub>p</sub>	X <sub>c</sub>	PHA	CO <sub>2</sub>
Assimilation du phosphore	-1		1			
Croissance catalytique		$-\frac{1}{Y_{(X_c/S_c)}}$		1		$\frac{1-Y_{(X_c/S_c)}}{Y_{(X_c/S_c)}}$
Stockage de PHA		$-\frac{1}{Y_{(PHA/S_c)}}$			1	$\frac{1-Y_{(PHA/S_c)}}{Y_{(PHA/S_c)}}$
Maintenance cellulaire		-1				1

## IV. 2. Ecriture des équations cinétiques

### IV. 2. a. Assimilation du phosphore extracellulaire

Comme évoqué dans la partie bibliographique, le taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ) fluctue entre deux bornes maximales ( $P_{in\_max}$ ) et minimales ( $P_{in\_min}$ ), selon le degré de limitation en phosphore appliqué. Il existe une corrélation linéaire entre le taux de croissance et le  $P_{in\_max}$ , qui varie alors entre  $P_{in\_lim}$  et  $P_{in\_exp}$  :

$$P_{in\_max} = (P_{in\_exp} - P_{in\_lim}) \times \frac{\mu}{\mu_{max}} + P_{in\_lim} \quad (9)$$

avec  $P_{in\_exp}$  :  $P_{in\_max}$  lorsque  $\mu = \mu_{max}$

$P_{in\_lim}$  :  $P_{in\_max}$  lorsque  $\mu = 0$

La vitesse d'assimilation du phosphore est limitée par la concentration extracellulaire en phosphore (relation de Monod) et dépend directement du taux de phosphore intracellulaire des cellules. Elle tend vers 0 lorsque le  $P_{in}$  tend vers  $P_{in\_max}$ . A l'inverse, elle est maximale quand le  $P_{in}$  tend vers la valeur minimale  $P_{in\_crit}$  :

$$r_P = q_{Pmax} \times \frac{S_P}{S_P + K_P} \times \frac{P_{in\_max} - P_{in}}{P_{in\_max} - P_{in\_crit}} \times X_C \quad (10)$$

avec  $P_{in\_crit}$  :  $P_{in\_min}$  lorsque  $\mu = 0$

$K_P$  : constante d'affinité pour le phosphore

### IV. 2. b. Croissance cellulaire

La vitesse de la croissance cellulaire est limitée par la concentration extracellulaire en substrat carboné (selon le formalisme de Monod) et par le taux de phosphore intracellulaire. La représentation de la limitation de la croissance par le  $P_{in}$  est un modèle linéaire :

$$r_X = \mu_{max} \times \frac{S_C}{S_C + K_C} \times \frac{P_{in} - P_{in\_crit}}{P_{in\_exp} - P_{in\_crit}} \times X_C \quad (11)$$

### IV. 2. c. Production de PHA

Déjà mentionnée en bibliographie, la vitesse de production de PHA est liée au  $P_{in}$  par une fonction d'Haldane modifiée. Elle dépend également de la concentration extracellulaire en carbone (équation de Monod) et est inhibée par une forte concentration extracellulaire en phosphore. De plus, elle est limitée par le phénomène d'encombrement stérique en lien avec l'accumulation de PHA :

$$r_{PHA} = q_{PHA\_max} \times \frac{S_c}{S_c + K_c} \times \frac{K_{PHA}}{K_{PHA} + S_P} \times \frac{P_{in}}{K_{P_{in}} + \alpha P_{in} + \frac{P_{in}^2}{K I_{P_{in}}}} \times \left(1 - \left(\frac{PHA_{in}}{PHA_{in\_max}}\right)^n\right) \times X_c \quad (12)$$

$$\text{tel que } \alpha = 1 - 2 \times \sqrt{\frac{K_{P_{in}}}{K I_{P_{in}}}}$$

avec  $K_c$  : constante d'affinité pour le substrat carboné

$K_{P_{in}}$  et  $K I_{P_{in}}$  : constantes cinétiques

$K_{PHA}$  : constante d'inhibition par le phosphore extracellulaire

#### **IV. 2. d. Maintenance cellulaire**

Le processus de maintenance cellulaire est stimulé par de faibles taux de phosphore intracellulaire, inférieurs au taux maximal ( $P_{in\_max}$ ). La vitesse de consommation du substrat carboné en rapport à la maintenance est également limitée par le substrat carboné (Michaelis-Menten) :

$$r_m = m \times \frac{S_c}{S_c + \varepsilon} \times \left(1 + \delta(P_{in\_max} - P_{in})\right) \times X_c \quad (13)$$

avec  $m$  : coefficient de maintenance

$\delta$  : facteur d'amplification

$\varepsilon$  : constante d'affinité





# **RESULTATS ET DISCUSSION**

---



**CHAPITRE I. REPRODUCTIBILITE DE LA SELECTION DE  
PRODUCTEURS DE PHA ET ETUDE DU DEVENIR DU  
CARBONE SELON LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE**

---



## **I. Introduction**

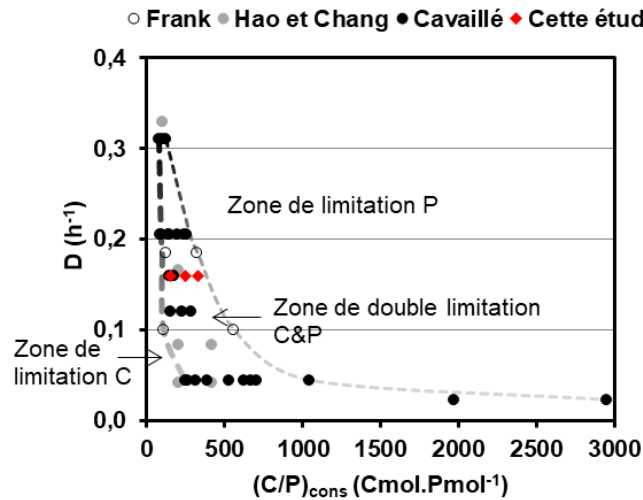
La sélection de producteurs de PHB en culture continue ouverte a été éprouvée avec succès par Cavaillé et al., (2016), avec une alimentation en acétate ou acétate/butyrate. Dès lors, le premier objectif est de s'assurer de la répétabilité de cette stratégie d'enrichissement avec un substrat identique, mais un inoculum différent. Cependant, la synthèse de motifs 3HV nécessitant une alimentation avec un AGV à chaînes impaires tel que le propionate, le deuxième objectif est d'expérimenter cette méthode de sélection avec un mélange incluant du propionate et de valider sa reproductibilité avec des substrats mixtes.

La culture en chemostat est un excellent outil pour étudier le métabolisme cellulaire dans un environnement contrôlé. Dans cette idée, l'objectif est ainsi d'évaluer l'influence de la nature de la source de carbone sur la direction des flux de consommation du substrat carboné entre croissance, stockage de PHA et maintenance cellulaire, selon le degré de limitation en phosphore imposé. En outre, les effets de l'application instantanée du niveau de limitation P le plus restrictif, comparativement à une augmentation progressive usuelle, seront examinés. Enfin, de manière à investiguer plus en profondeur l'assimilation et le métabolisme du propionate, les consortia ont été exposés à une modification transitoire de la nature de la source de carbone, avec pour objectif d'étudier ses conséquences sur l'évolution des paramètres macro-cinétiques des cultures.

## **II. Sélection de producteurs de PHA**

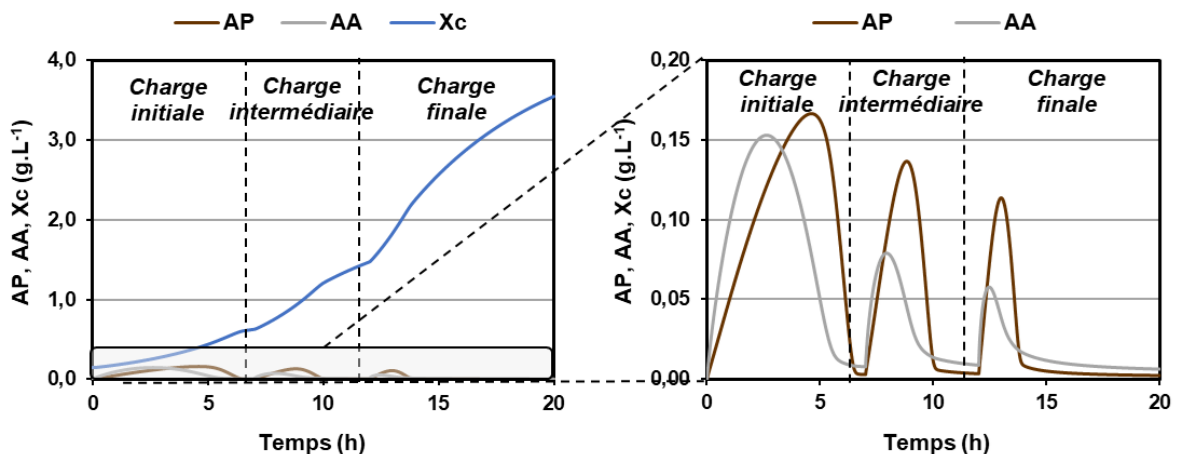
### **II. 1. Démarche expérimentale : mise en place de la sélection**

Indépendamment de la nature du substrat, les cultures ont été conduites à un taux de dilution unique ( $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ ). Il s'agit d'un taux intermédiaire au sein de la plage testée par Cavaillé (2015), et plus généralement, d'une valeur située en milieu de gamme, dans le cadre d'une étude de production de PHA par des bactéries hydrogénotrophes. Le choix de ce taux de dilution peut s'expliquer selon trois manières supplémentaires : il garantit une pression de sélection présumée suffisante pour favoriser la dominance restrictive d'une ou deux espèces microbiennes ; il permet de pouvoir balayer une large gamme de degrés de limitation en phosphore tout en restant dans la zone de double limitation (DLN) ; et enfin, il a pour but de tenter de se prémunir de l'émergence d'*Acinetobacter*, un genre microbien aux faibles capacités d'accumulation de PHA, qui été avait observée par Cavaillé (2015) à des taux de dilution supérieurs (e.g.  $0,21$  ou  $0,31 \text{ h}^{-1}$ ). Trois degrés de limitation P ( $150, 250$  et  $325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ ) ont été successivement imposés, avec une augmentation progressive induite par la diminution de la quantité de phosphore apportée (quantité de carbone maintenue constante), et donc une répression du potentiel de croissance. Ces différents niveaux de limitation en P assurent une couverture supposée de l'ensemble de la zone de DLN pour le taux de dilution en question (Figure 27).

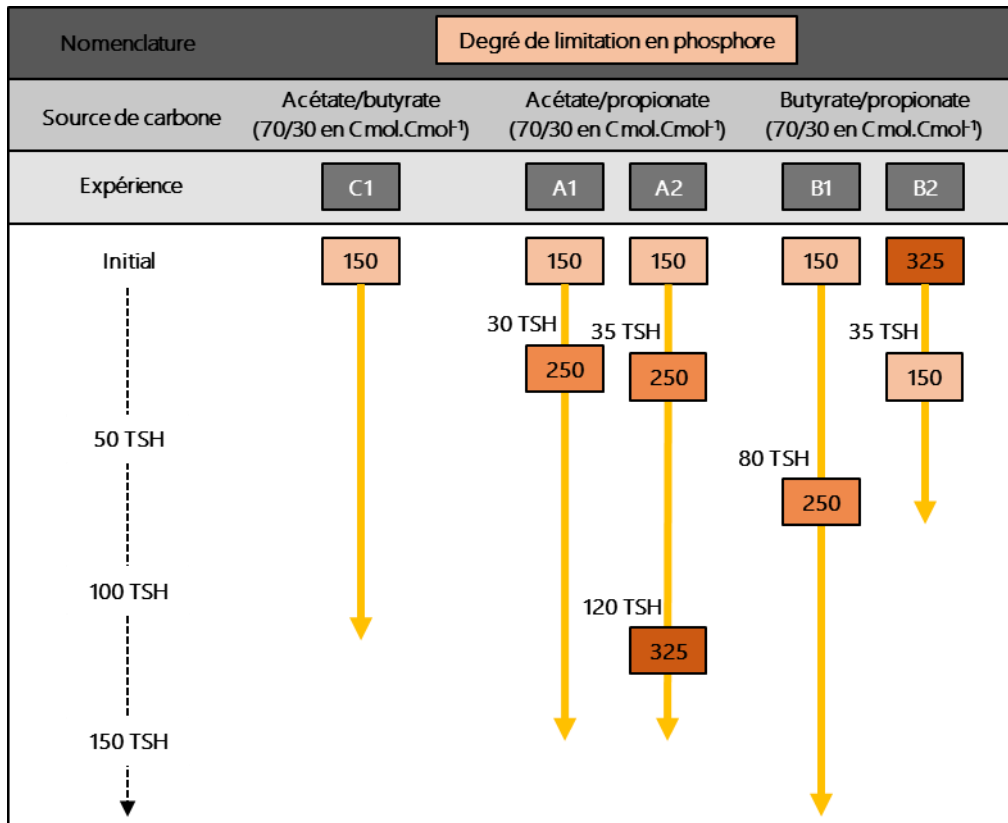


**Figure 27.** Zone de double limitation nutritionnelle (DLN) pour des cultures mixtes sélectionnées en chemostat présentée en bibliographie (Figure 16) et à laquelle ont été ajoutés les résultats obtenus lors de cette étude (symbolisés par des losanges rouges). Chaque valeur correspond à un régime pseudo-permanent. Les lignes en pointillé correspondent aux frontières de la zone DLN.

L'ensemble des cultures sont présentées sur la Figure 29. La sélection a été expérimentée sur trois substrats distincts : acétate/butyrate, acétate/propionate et butyrate/propionate. La campagne expérimentale opérée avec le mélange acétate/propionate a, dans un premier temps, été menée à partir d'un inoculum stocké et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  (A1), puis reproduite avec un inoculum « frais » (A2), de manière à identifier de potentielles différences en lien avec la nature de l'inoculum. Par ailleurs, deux campagnes ont également été conduites sur butyrate/propionate. La seconde d'entre elles (B2) a pour singularité d'avoir été initiée directement avec le degré de limitation en phosphore le plus élevé ( $325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ ). A la différence des cultures opérées sur acétate/butyrate, les cultures conduites sur un mélange comprenant du propionate doivent nécessairement observer une augmentation progressive de la charge organique dans le flux d'alimentation, pour éviter une accumulation transitoire de propionate qui serait inhibitrice et générerait un lessivage des microorganismes. De ce fait, deux paliers intermédiaires ont été appliqués de façon à maintenir la concentration résiduelle en propionate en deçà de  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  durant les régimes transitoires (Figure 28).



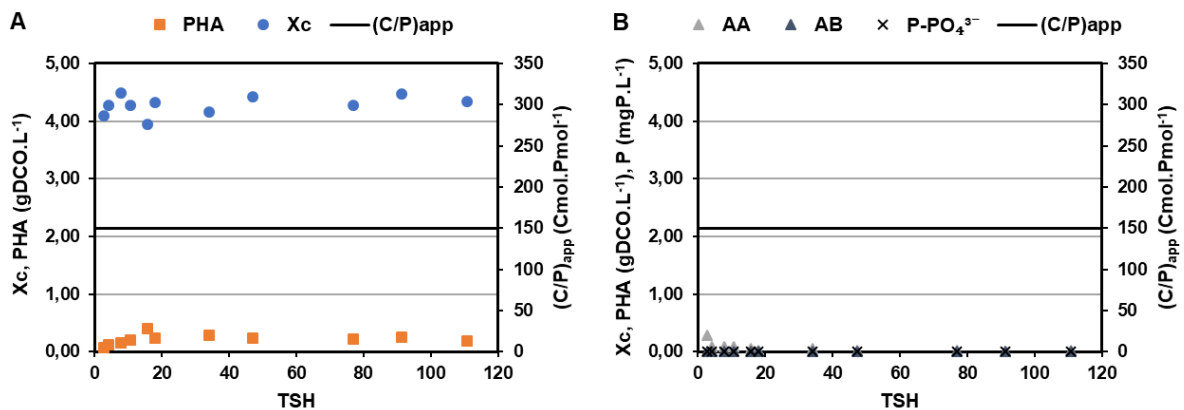
**Figure 28.** Stratégie d'augmentation de la charge organique en entrée de l'étage de sélection lors du démarrage des campagnes avec une alimentation avec un mélange intégrant du propionate.



**Figure 29.** Synoptique des conditions expérimentales imposées au cours des cultures dans l'étage de sélection.

## II. 2. Sélection microbienne sur acétate/butyrate

Pour examiner la répétabilité de la sélection de producteurs de PHA en condition de double limitation C&P, une culture a été conduite sur acétate/butyrate. La Figure 30 renseigne sur les paramètres macro-cinétiques obtenus en régime stabilisé. Le suivi des concentrations en biomasse catalytique et PHA est représentée en fonction du nombre de temps de séjour hydraulique (TSH) (Fig. A). Les concentrations résiduelles en acétate, butyrate et phosphore soluble sont présentées sur la Figure B.



**Figure 30.** Evolution des concentrations en PHA et cellules catalytiques ( $X_c$ ) (**A**), ainsi que celles en acétate (AA), butyrate (AB) et phosphore soluble (**B**) en fonction du  $(C/P)_{app}$  et du nombre de temps séjour hydraulique (TSH).



L'absence de phosphore et d'AGV dans le surnageant de culture durant la totalité de la culture indique que le système a bien été conduit avec une double limitation carbone et phosphore. Le niveau de limitation en phosphore appliqué ( $(C/P)_{app}$ ) est, en conséquence, équivalent au rapport carbone/phosphore consommé ( $(C/P)_{cons}$ ). Les concentrations en biomasse catalytique et PHA se sont maintenues à des valeurs relativement stables, avec une fraction intracellulaire en PHA moyenne égale à 5,5% ( $Cmol_{PHA} \cdot Cmol_{xtot}^{-1}$ ). Les rendements observés en cellules catalytiques et PHA sont conformes à ceux précédemment obtenus par Cavailé et al., (2016).

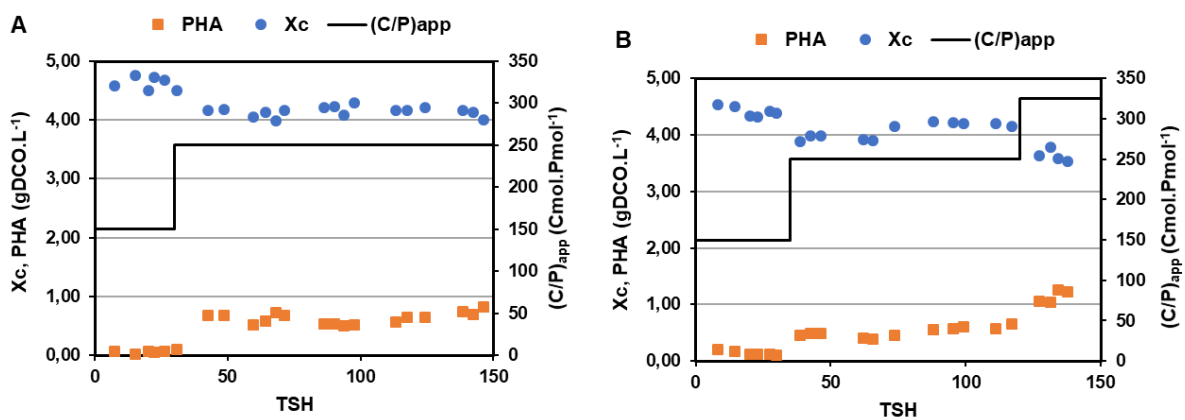
La capacité de sélection de producteurs de PHA et la réponse microbienne sont donc conservées, en dépit de la variabilité de l'inoculum.

## II. 3. Sélection microbienne sur acétate/propionate

La validation de la méthode de sélection sur des substrats carbonés déjà expérimentés a permis d'envisager l'étude de sa reproductibilité sur des mélanges intégrant du propionate. En parallèle, le devenir du carbone aux différents niveaux de limitation P appliqués a été analysé, pour pouvoir être par la suite comparé à ceux obtenus sur les substrats de référence, et ainsi définir l'influence de la nature de la source de carbone sur la direction de la consommation du substrat.

### II. 3. a. Suivi des concentrations

Les concentrations en biomasse catalytique et PHA, respectivement à l'issue des campagnes A1 (A) et A2 (B), sont représentées sur la Figure 31.



**Figure 31.** Evolution des concentrations en PHA et cellules catalytiques ( $X_c$ ) en fonction du  $(C/P)_{app}$  et du nombre de temps de séjour (TSH) pour des cultures alimentées en acétate/propionate, respectivement lors des campagnes A1 (A) et A2 (B).

Aucune trace de substrats carbonés ou phosphorés n'a été détectée dans les surnageants de culture, quelle que soit la campagne ou le degré de limitation en phosphore appliqué. L'ensemble des cultures a ainsi bien été opérée en condition de double limitation nutritionnelle. Pour un degré  $(C/P)_{app}$  donné, les concentrations respectives en biomasse catalytique et PHA ont été relativement stables, et conservées d'une campagne à l'autre. L'état de l'inoculum ne semble donc pas avoir d'effets notables sur les paramètres macro-cinétiques. Indépendamment de la campagne, l'augmentation du niveau de limitation en phosphore  $(C/P)_{app}$  a conduit à une augmentation de la concentration en PHA, conjuguée à une diminution de la concentration en cellules catalytiques. La teneur moyenne en PHA dans la biomasse est alors graduellement passée de 2,1 à 11,0 puis 23,7% ( $Cmol_{PHA} \cdot Cmol_{X_{tot}}^{-1}$ ). Les observations microscopiques, après coloration spécifique au noir de Soudan, font apparaître l'augmentation de la quantité de cellules ayant accumulé des PHA (Annexe A).

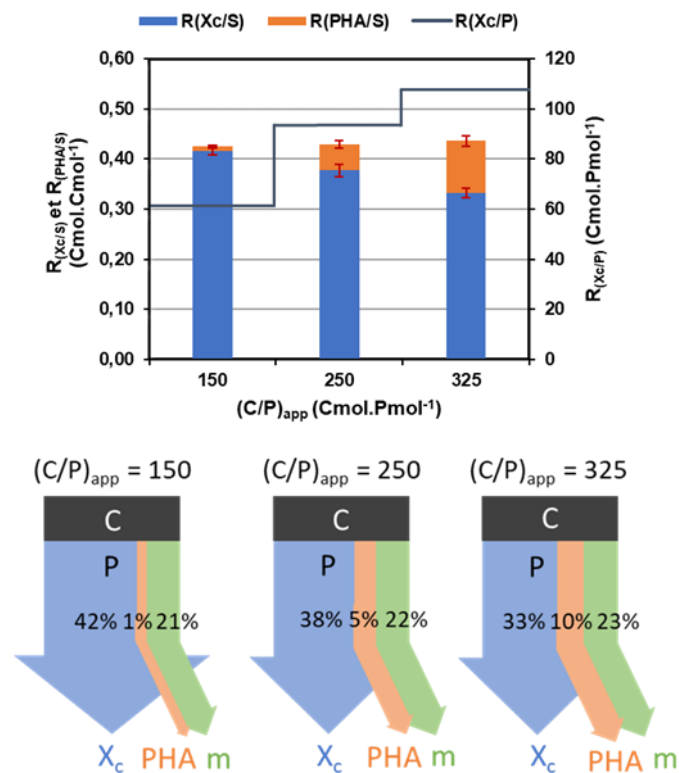
Les consortia sélectionnés sur un mélange acétate/propionate s'avèrent donc être des producteurs de PHA, au même titre que ceux sélectionnés sur acétate ou acétate/butyrate (Cavaillé et al., 2016). La capacité d'une culture continue ouverte conduite sous double limitation C&P à sélectionner des producteurs de PHA paraît alors reproductible, en dépit de l'incorporation de propionate dans le mélange carboné. Néanmoins, il reste encore à définir les capacités de production de PHA de ces consortia sélectionnés.

### **II. 3. b. Rendements observés**

La Figure 32 renseigne sur l'évolution des rendements observés selon le degré de limitation en phosphore appliqué. L'augmentation du rendement en PHA et la diminution du rendement de croissance, induites par l'augmentation du  $(C/P)_{app}$ , sont concordantes à une augmentation du rendement en biomasse par rapport au phosphore ( $R_{(X_C/P)}$ ), autrement dit à une diminution de la teneur intracellulaire en phosphore ( $P_{in}$ ). C'est donc bien la diminution du  $P_{in}$  qui est à l'origine de la redirection des flux de consommation du carbone vers le stockage de PHA au détriment de la croissance. Ce résultat s'inscrit dans la lignée de ceux observés parmi Cavaillé et al., (2016).

En outre, malgré une augmentation très mesurée du rendement en biomasse totale, l'efficacité de conversion globale du carbone en biomasse et substances de réserve peut être considérée comme invariable, quel que soit le degré de limitation en phosphore  $(C/P)_{app}$ , comme déjà relevés par Cavaillé et al., (2016) ou Egli (1991). Par extension, le coefficient de maintenance demeure relativement constant. Toutefois, près d'un quart du potentiel carboné est perdu dans les réactions de maintenance. Il est envisageable que cette déperdition de carbone soit corrélée avec la diminution du taux de phosphore intracellulaire. En effet, la diminution du  $P_{in}$  se manifeste par la réorganisation de la composition élémentaire en phosphore de la biomasse catalytique. Plus précisément, la maximisation de la croissance en condition de limitation en phosphore amène la cellule à puiser dans son stock, et par exemple à mobiliser les phospholipides constitutifs de la membrane. Altérée,

la membrane ne peut plus assurer la complète étanchéité de la cellule et conserver le gradient de protons. L'expulsion hors de la cellule des protons  $H^+$  associés à l'assimilation de la forme non dissociée des acides requiert de l'énergie, qui ne peut être utilisée pour la croissance ou le stockage. En revanche, il convient de relever qu'au pH de culture (compris entre 7 et 7,25), la concentration de la forme non dissociée est 500 fois inférieure à celle de la forme dissociée. Par conséquent, le besoin en ATP nécessaire au maintien du gradient reste faible, ce qui peut expliquer que l'augmentation demeure relativement faible.

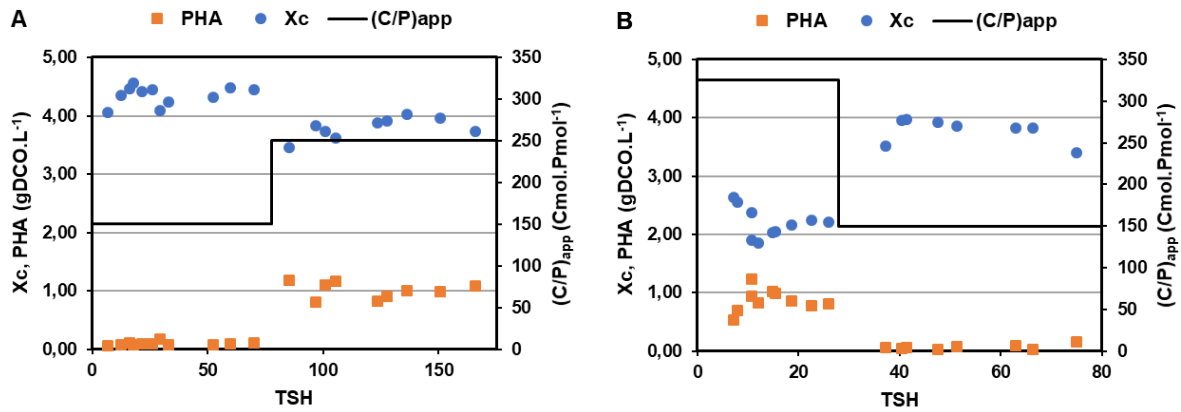


**Figure 32.** Rendements observés en biomasse catalytique ( $X_c$ ) et PHA par rapport au substrat carboné ( $R_{(Xc/S)}$  et  $R_{(PHA/S)}$  respectivement) et de  $X_c$  par rapport au phosphore ( $R_{(Xc/P)}$ ) selon le degré de limitation en phosphore ; évolution de la direction des flux de consommation du carbone entre cellules catalytiques ( $X_c$ ), PHA et maintenance ( $m$ ) selon le degré de limitation en phosphore, lors d'une alimentation avec un mélange propionate/acétate. Les valeurs indiquées ont été calculées à partir des deux campagnes.

## II. 4. Sélection microbienne sur butyrate/propionate

### II. 4. a. Suivi des concentrations

L'évolution des concentrations en biomasse catalytique et PHA au cours des campagnes B1 (A) et B2 (B) est représentée sur la Figure 33. A nouveau, la totalité du substrat carboné et du phosphore a été consommée, quel qu'ait été le niveau de limitation en phosphore appliqué. La zone de DLN semble ainsi être sensiblement la même, indifféremment de la nature de la source carbonée et du degré d'oxydation du substrat. Toutefois, l'absence de cultures opérées en conditions de limitation stricte en carbone et phosphore ne permet pas de conclure avec exactitude quant aux frontières précises de la zone de DLN.



**Figure 33.** Evolution des concentrations en PHA et cellules catalytiques ( $X_c$ ) en fonction du  $(C/P)_{app}$  et du nombre de temps de séjour (TSH) pour des cultures alimentées en butyrate/propionate, respectivement lors des campagnes B1 (A) et B2 (B).

Pour la campagne B1, débutée avec le même degré de limitation en phosphore que les campagnes menées sur acétate/propionate, l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  génère une réorientation du carbone comparable à celle précédemment observée : le substrat est redistribué vers le stockage de PHA au détriment de la croissance. Néanmoins, pour un degré de limitation en phosphore donné, la teneur intracellulaire en PHA est supérieure à celle obtenue avec acétate/propionate. A titre d'exemple, elle atteint 20,8% ( $Cmol_{PHA} \cdot Cmol_{X_{tot}}^{-1}$ ) quand le  $(C/P)_{app}$  est de 250  $Cmol.Pmol^{-1}$  alors qu'elle ne s'élève qu'à 11,0% pour le même degré de limitation avec le mélange acétate/propionate.

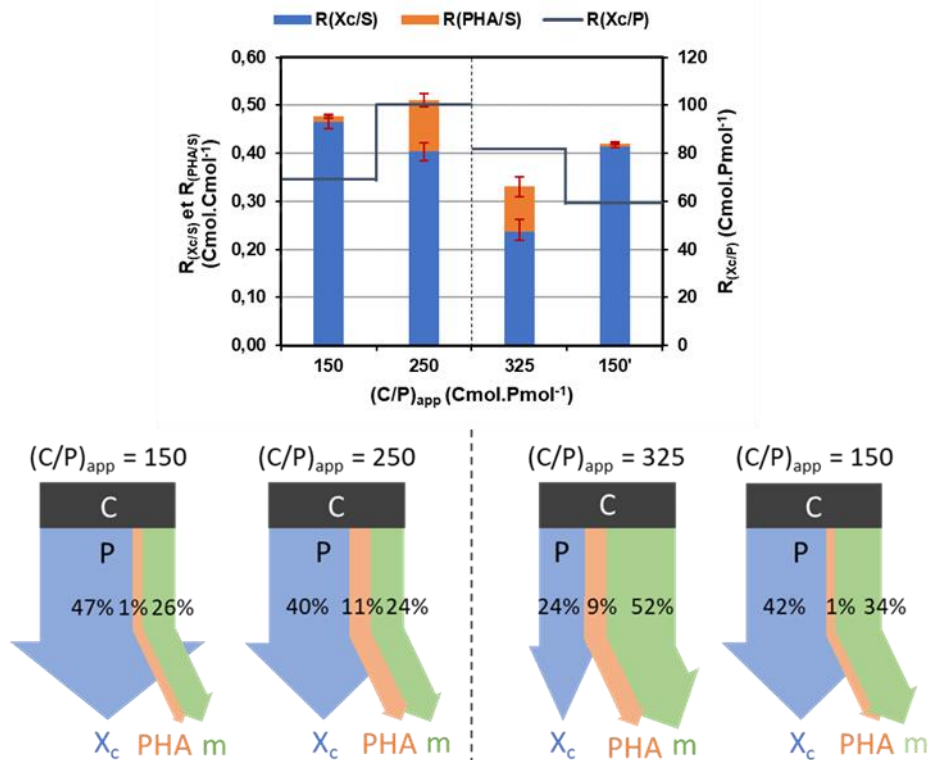
Concernant la campagne B2, opérée directement au plus fort degré de limitation en phosphore, les résultats sont singulièrement différents de ceux jusqu'alors présentés. Initier la culture microbienne avec un  $(C/P)_{app}$  de 325  $Cmol.Pmol^{-1}$  a entraîné une chute de la quantité de cellules catalytiques ( $X_c$ ), en comparaison de celle observée au  $(C/P)_{app}$  intermédiaire pendant la campagne B1, ou au même  $(C/P)_{app}$  avec une alimentation en acétate/propionate (mais qui avait été précédé de deux  $(C/P)_{app}$  plus faibles). La quantité de PHA est quant à elle relativement similaire à celle obtenue au  $(C/P)_{app}$  de 250  $Cmol.Pmol^{-1}$  lors de B1. La teneur intracellulaire en PHA atteint alors 28,0% ( $Cmol_{PHA} \cdot Cmol_{X_{tot}}^{-1}$ ).

#### II. 4. b. Rendements observés

Pour la campagne B1, l'augmentation de la teneur en PHA peut être corrélée à l'augmentation du rendement observé en cellules catalytiques par rapport au phosphore ( $R_{(X_c/P)}$ ) (Figure 34). En d'autres termes, à un même niveau de limitation en phosphore, la dilution du phosphore intracellulaire est plus élevée lorsque l'acétate est substitué par le butyrate dans le mélange carboné. En effet, à un  $(C/P)_{app}$  donné, les rendements observés de conversion du substrat en biomasse catalytique sont supérieurs avec du butyrate. Pour une quantité de phosphore identique, une plus grande concentration en cellules est ainsi produite. La teneur en P est alors

plus faible, permettant de rediriger une plus large partie des flux de carbone vers l'accumulation de PHA. Il apparaît donc que la valeur de  $P_{in}$  n'est pas seulement dictée par le degré de limitation en phosphore, mais qu'elle est également conditionnée par la nature de la source de carbone, et plus précisément par son degré d'oxydation. Plus un substrat est réduit, plus le rendement théorique de conversion en biomasse est élevé (une plus faible quantité est nécessaire pour produire une même quantité d'énergie), et plus la quantité de cellules produites à un  $(C/P)_{app}$  donné sera grande.

Par ailleurs, contrairement à ce qui avait été observé sur acétate, pour lequel les rendements de conversion en biomasse totale sont restés équivalents avec l'augmentation du  $(C/P)_{app}$ , une légère amélioration est ici constatée. La nette augmentation du rendement observé de production de PHA (liée à la diminution du  $P_{in}$ ) pourrait être à l'origine de cette différence. Toutefois, en dépit de rendements observés supérieurs pour un même  $(C/P)_{app}$ , la part de carbone utilisée pour la maintenance est plus élevée avec butyrate/propionate.



**Figure 34.** Rendements observés en biomasse catalytique ( $X_c$ ) et PHA par rapport au substrat carboné ( $R_{(Xc/S)}$  et  $R_{(PHA/S)}$  respectivement) et de  $X_c$  par rapport au phosphore ( $R_{(Xc/P)}$ ) selon le degré de limitation en phosphore ; évolution de la direction des flux de consommation du carbone entre cellules catalytiques, PHA et maintenance (m) selon le degré de limitation en phosphore, lors d'une alimentation avec un mélange propionate/butyrate. Les valeurs à gauche et à droite de la ligne de démarcation correspondent respectivement à celles de la campagne B1 et B2.

A propos de la campagne B2, à 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>, la teneur intracellulaire en PHA est supérieure à celle par exemple observée à 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>, alors que le  $P_{in}$  est paradoxalement inférieur (en raison de la chute de la concentration en biomasse catalytique). La relation entre  $P_{in}$  et croissance cellulaire (et en résultante, entre  $P_{in}$  et %PHA<sub>in</sub>) semble donc perturbée dès lors qu'une très forte limitation en phosphore est imposée dès le début de la culture. En conditions défavorables, la cellule n'est plus capable de diluer autant son phosphore.

L'amplification des activités de maintenance est le témoignage d'un stress cellulaire accru : plus de la moitié du carbone consommé est consacré aux énergies de maintenance. Si le retour à un niveau de limitation en phosphore plus faible ( $150 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ ) entraîne une diminution significative de la maintenance (de 52 à 34% en  $\text{Cmol.Cmol}^{-1}$ ), la valeur reste toutefois nettement supérieure à celle observée au même  $(\text{C/P})_{\text{app}}$  lors de la campagne B1. Il existe potentiellement un effet « historique » sur le métabolisme cellulaire et l'efficacité de conversion du carbone.

D'autre part, dans le cas du plus fort degré de limitation P, il est également envisageable de postuler qu'une faible quantité du substrat ait été consommée pour produire d'autres composants cellulaires (par exemple, des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui n'ont pas été pris en compte dans le calcul des bilans matières, et notamment de la maintenance. En effet, les observations microscopiques après une coloration au bleu d'alcan, a permis d'identifier une matrice extracellulaire dense et visqueuse, similaire aux EPS, autour des microorganismes. La production d'EPS est généralement induite en conditions de stress et constitue un moyen de protection dans un environnement oppressif (Poli et al., 2011). Plus particulièrement, elle favorise l'adhésion des cellules aux parois et la formation de biofilms, pouvant générer un découplage du temps de séjour des microorganismes avec le temps de séjour hydraulique et par conséquent, modifier les conditions de sélection (Weiner, 1997). Par ailleurs, l'augmentation de la viscosité du milieu entraîne une expansion du volume d'eau liée, empêchant la sédimentation des cultures lors de la centrifugation et contrariant ainsi les procédés d'extraction (Zhao et al., 2013). Une sécrétion comparable d'EPS avec l'imposition d'un fort rapport  $(\text{C/P})_{\text{app}}$  a déjà été rapporté par Wen et al., (2010) ou Chinwetkitvanich et al., (2004), qui ont également relaté le problème de foisonnement des boues activées non filamentaires (incident bien connu dans le traitement eaux usées).

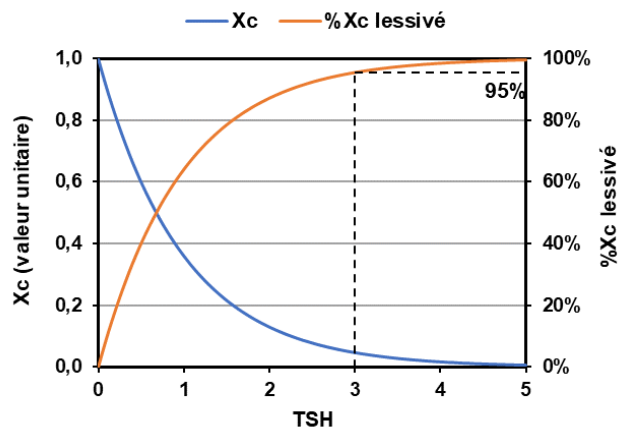
### **III. Changement transitoire de la nature de la source de carbone**

#### **III. 1. Stratégie expérimentale**

La culture de consortia microbiens sur co-substrats soulève certaines interrogations qui demandent à être investiguées (notamment dans la perspective de la mise en place d'un étage de production de PHA en aval), parmi lesquelles :

- Existe-t-il une spécialisation de certaines populations au sein du consortium pour un substrat donné ? En d'autres termes, le propionate est-il consommé exclusivement par une population ?
- Y-a-t-il une orientation préférentielle (entre croissance, stockage de PHA et maintenance) pour chacun des substrats ?
- Les substrats peuvent-ils être consommés individuellement ?

Pour répondre à ces questions, le régime stabilisé du réacteur opéré à un degré de limitation en phosphore de  $250 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  et alimenté avec un mélange acétate/propionate, a été soumis à une perturbation : le cosubstrat en entrée a été substitué, de manière transitoire, par un substrat unique (successivement acétate, puis propionate seul). La concentration de l'unique substrat dans le débit d'alimentation était équivalente à celle du mélange (en gDCO). Pour ne pas induire de modification irréversible de la distribution microbienne au sein du consortium, et notamment dans l'hypothèse où l'une des populations en culture serait incapable de métaboliser l'un des deux AGV pris séparément, le changement de la nature du substrat n'a été appliqué que pendant trois temps de séjours hydrauliques (Figure 35). Limiter la durée de la perturbation à trois TSH permet de conserver à minima 5% des populations qui seraient potentiellement lessivées, et par conséquent laisser l'opportunité de s'implanter à nouveau avec le retour à une alimentation avec le mélange. Cependant, la durée est suffisante pour pouvoir observer une variation mesurable de la nature des cellules.



**Figure 35.** Taux de cellules lessivées en fonction du temps de séjour hydraulique (TSH) d'une population dont la croissance serait nulle ( $\mu = 0 \text{ h}^{-1}$ ).

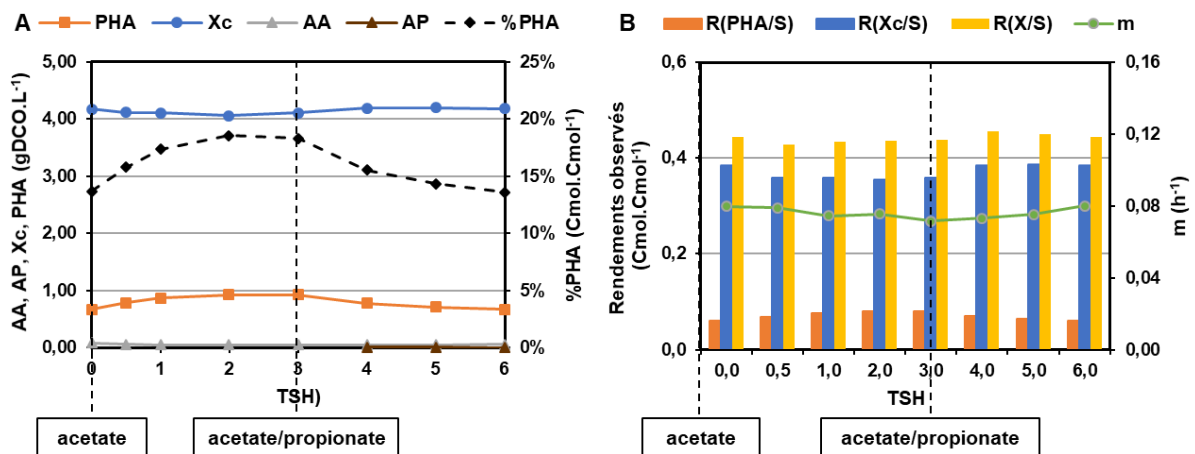
### III. 2. Alimentation exclusive en acétate

Un suivi des concentrations en substrat, PHA et cellules catalytiques a été effectué durant six TSH, à intervalles réguliers (à l'issue de chaque TSH) (Figure 36). Le temps  $T_0$  correspond à l'état de référence, alimenté avec le mélange acétate/propionate, et au moment auquel le cosubstrat a été remplacé par l'acétate. Après trois TSH, l'alimentation a de nouveau été basculée sur le mélange.

La concentration en acétate résiduel est restée nulle pendant la phase d'alimentation exclusive en acétate. L'absence d'une accumulation transitoire d'acétate, malgré l'augmentation de sa concentration dans le flux d'alimentation, indique que l'ensemble des populations au sein du consortium sélectionné avec le mélange acétate/propionate est capable de consommer spécifiquement l'acétate. La concentration en PHA augmente légèrement, tandis que celle en biomasse catalytique diminue : la teneur intracellulaire en PHA augmente alors progressivement, et se stabilise après deux TSH ( $18\% \text{ en Cmol}_{\text{PHA}}.\text{Cmol}_{\text{Xtot}}^{-1}$ ). La maintenance diminue,

quant à elle, jusqu'à atteindre un minimum après trois TSH. Supplanter le mélange acétate/propionate par l'acétate redirige donc la consommation du carbone vers le stockage de PHA au détriment de la croissance, et plus encore, de la maintenance. La teneur en PHA est donc maximisée, en dépit d'une augmentation du de la teneur intracellulaire en phosphore  $P_{in}$  (liée à une diminution de la quantité de la biomasse catalytique). Il semble donc que le  $P_{in}$  ne soit pas le seul élément qui gouverne la répartition du carbone entre croissance, stockage et maintenance, mais que la nature de la source de carbone ait également une influence. En tant que précurseur métabolique, chaque substrat peut favoriser spécifiquement certaines voies, et ainsi orienter préférentiellement le devenir du carbone consommé.

A la suite du rétablissement de l'alimentation avec le mélange, l'ensemble des grandeurs macro-cinétiques (coefficient de maintenance, concentrations en PHA et cellules catalytiques) reviennent peu à peu à la valeur qui était la leur avant la perturbation. Après trois TSH, la culture finit par retrouver l'état de référence (T0), antérieur au changement de la nature de la source de carbone, preuve de la versatilité et de la robustesse de la sélection.



**Figure 36.** Evolution des concentrations en acétate (AA), propionate (AP), PHA, cellules catalytiques et %PHA en fonction de nombre de temps de séjour (TSH) lors d'une alimentation transitoire en acétate (A). Evolution des rendements observés et du coefficient de maintenance (B).

### III. 3. Alimentation exclusive en propionate

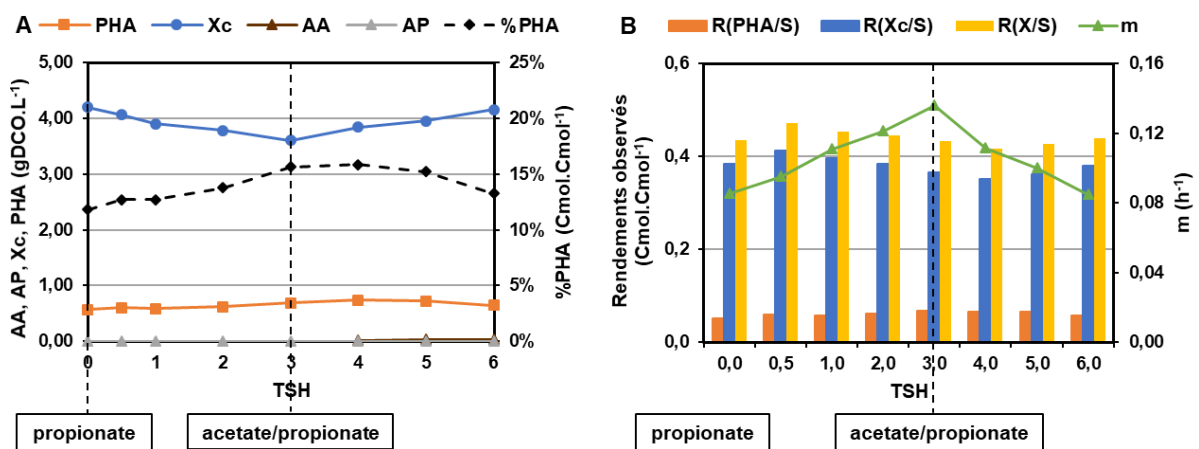
Le processus de modification transitoire du substrat a été reproduit, en supplantant cette fois le mélange par du propionate. Les grandeurs cinétiques sont représentées sur la Figure 37.

L'absence de détection de propionate dans les surnageants de culture pendant la phase d'alimentation en monosubstrat, témoigne de la faculté d'assimilation du propionate partagée par l'ensemble des populations constitutives du consortium microbien. Les deux substrats carbonés du mélange, qu'il s'agisse du propionate



ou de l'acétate, peuvent donc bien être consommés individuellement : il n'existe pas de spécificité manifeste d'une population pour l'un des deux AGV.

La teneur en PHA augmente à nouveau progressivement, mais fait suite en revanche, à une diminution plus nette de la concentration en cellules catalytiques, conjuguée à un maintien de la quantité de PHA. En outre, la maintenance augmente de manière significative. Par conséquent, il apparaît une fois encore que la culture sur substrat unique induit un faible accroissement de la teneur en PHA, en dépit de l'augmentation du  $P_{in}$ . La nature de la source de carbone exerce ainsi bien une influence notable sur le devenir du carbone. De plus, l'augmentation du coefficient de maintenance peut être potentiellement mis en relation avec le caractère toxique du propionate.



**Figure 37.** Evolution des concentrations en acétate (AA), propionate (AP), PHA, cellules catalytiques et %PHA en fonction de nombre de temps de séjour (TSH) lors d'une alimentation transitoire en propionate (A). Evolution des rendements observés et du coefficient de maintenance (B).

## IV. Influence de la nature du substrat sur le devenir du carbone

### IV. 1. Analyse macro-cinétique des cultures chemostat

L'ensemble des paramètres cinétiques et stœchiométriques des régimes pseudo-stabilisés observés durant les différentes campagnes expérimentales est inscrit dans le Tableau 10. Il rassemble également les résultats obtenus par Cavaillé (2015) et Morgado-Ferreira (2017), pour des cultures continues opérées à des taux de dilution similaires (0,12 ou 0,16 h<sup>-1</sup>), et alimentés respectivement avec acétate ou un mélange acétate/butyrate et glucose/fructose.

Indifféremment du substrat, l'ensemble des cultures présente une capacité à stocker le carbone sous forme de PHA, en témoignent les teneurs intracellulaires atteintes aux niveaux de limitation en phosphore les plus élevés. La sélection fonctionnelle de producteurs de PHA en chemostat en conditions de double limitation

carbone et phosphore est donc robuste, reproductible et systématique. Brison et al. (2022) ont proposé une hypothèse pour expliquer le lien supposé entre affinité pour le phosphore et capacité à accumuler des PHA : en conditions de limitation en phosphore, l'augmentation de la taille des cellules (notamment de la surface) corrélée au stockage de carbone exogène (sous forme de PHA) permet aux microorganismes de maintenir un transport par diffusion élevé au travers de la membrane cellulaire et par extension, de maximiser l'affinité pour le phosphore (Øvreås et al., 2003 ; Thingstad et al., 2005). Cette hypothèse sera discutée plus en détails dans le chapitre suivant.

**Tableau 10.** Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables selon la nature de la source de carbone, le taux de dilution et le degré de limitation en phosphore appliqués. Nomenclature : propionate (AP), acétate (AA), butyrate (AB), glucose (Glu), fructose (Fru).

Auteur	Conditions opératoires			Rendements observés				Teneurs	
	D h <sup>-1</sup>	(C/P) <sub>app</sub> Cmol.Pmol <sup>-1</sup>	Substrat	R <sub>(Xc/S)</sub> Cmol.Cmol <sup>-1</sup>	R <sub>(PHA/S)</sub> Cmol.Cmol <sup>-1</sup>	R <sub>(X/S)</sub> Cmol.Cmol <sup>-1</sup>	m h <sup>-1</sup>	R <sub>(Xc/P)</sub> Cmol.Pmol <sup>-1</sup>	%PHA Cmol.Cmol <sup>-1</sup>
Cette étude	0,16	150	AP/AA	0,42 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,42 ± 0,01	0,08 ± 0,01	62 ± 1	2,1 ± 0,6
		250		0,38 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,09 ± 0,02	94 ± 3	11,0 ± 1,1
		325		0,33 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,11 ± 0,01	108 ± 3	23,7 ± 2,0
	0,16	150	AP/AB	0,47 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,09 ± 0,01	70 ± 2	2,2 ± 0,6
		250		0,40 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,10 ± 0,01	101 ± 5	20,8 ± 2,6
		325		0,24 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,05	84 ± 9	28,0 ± 3,9
	0,16	150	AA/AB	0,41 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,13 ± 0,00	60 ± 3	1,3 ± 0,6
		150		0,46 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,08 ± 0,01	69 ± 2	4,8 ± 2,0
		147		AA	0,38 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,39 ± 0,02	0,14 ± 0,01	56 ± 3
177	0,36 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,40 ± 0,03		0,15 ± 0,02	64 ± 3	8,3 ± 0,8		
154	0,37 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,39 ± 0,01		0,11 ± 0,01	61 ± 1	4,1 ± 0,1		
Cavaillé (2015)	0,12	222	AA	0,36 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,39 ± 0,01	0,12 ± 0,01	84 ± 4	6,6 ± 0,5
		282		0,33 ± 0,03	0,05 ± 0,00	0,38 ± 0,03	0,13 ± 0,02	97 ± 8	13,4 ± 0,5
	0,16	133	AA/AB	0,53 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,54 ± 0,02	0,05 ± 0,00	69 ± 0	2,1 ± 0,2
		157		0,51 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,56 ± 0,02	0,06 ± 0,01	80 ± 6	8,6 ± 1,0
		195		0,46 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,56 ± 0,02	0,06 ± 0,01	90 ± 7	18,2 ± 0,5
	0,12	149	AA/AB	0,53 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,55 ± 0,02	0,05 ± 0,01	79 ± 3	3,2 ± 0,1
		330		0,44 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,61 ± 0,02	0,04 ± 0,00	146 ± 1	30,3 ± 0,1
339	0,46 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,05 ± 0,01	151 ± 3	24,8 ± 0,8			
Morgado Ferreira (2017)	0,12	250	Glu/Fru	0,39 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,46 ± 0,01	-	97 ± 2	15,4 ± 1,2
		300		0,39 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,51 ± 0,02	-	115 ± 3	23,9 ± 1,9
		350		0,36 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,56 ± 0,02	-	126 ± 3	35,2 ± 2,8

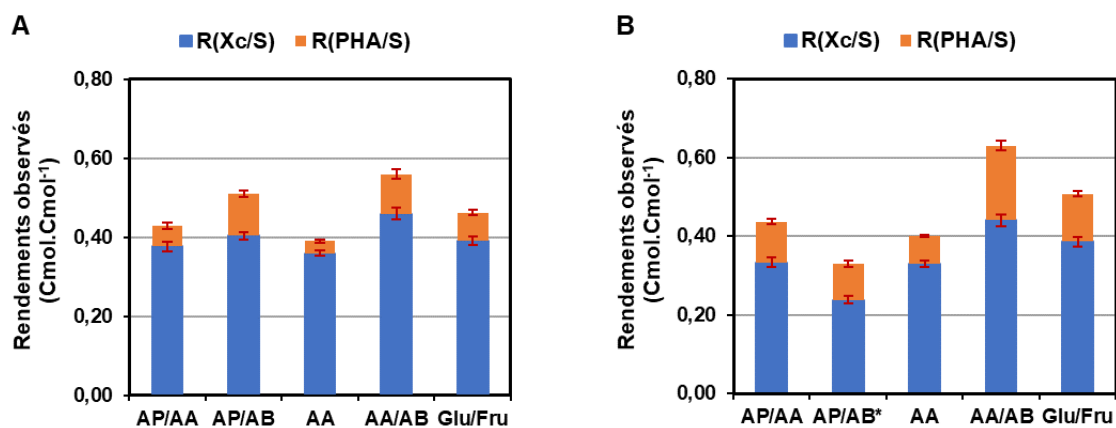
De manière générale, le comportement des cultures en réponse à une augmentation du degré de limitation en phosphore est conservé d'un substrat à l'autre. L'augmentation du (C/P)<sub>app</sub> induit une augmentation du rendement observé en cellules catalytiques par rapport au phosphore (R<sub>(Xc/P)</sub>), indépendamment de la nature de la source de carbone. La dilution du phosphore intracellulaire conduit alors à une redistribution des flux de consommation du carbone, de la croissance vers la production de PHA (et dans une moindre mesure, la maintenance). Le P<sub>in</sub> gouverne donc de manière universelle le devenir du carbone. Toutefois, il subsiste des

différences selon la nature du substrat carboné et dont il sera question dans cette partie. Plus précisément, l'objectif est d'analyser l'influence de la nature de la source de carbone, successivement, sur les rendements observés, la teneur intracellulaire en PHA et les réactions de maintenance.

## IV. 2. Impact du substrat sur l'orientation du carbone

### IV. 2. a. Rendements observés en cellules catalytiques et PHA

La Figure 38 présente les rendements observés de croissance et de production de PHA selon la nature de la source de carbone, respectivement pour un degré de limitation en phosphore approximativement égal à 250 (A) et 325  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$  (B).



**Figure 38.** Rendements en biomasse catalytique (Xc) et PHA en fonction de la nature de la source de carbone pour des degrés de limitation en phosphore  $(C/P)_{app}$  de 250 (A) et 325  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$  (B). La valeur des rendements observés à  $(C/P)_{app} = 325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  pour le substrat AP/AB est différenciée des autres car il s'agit du seul substrat pour lequel la valeur du degré de limitation a été appliquée directement, sans imposer de  $(C/P)_{app}$  inférieurs préalables.

A un degré de limitation en phosphore donné, les valeurs des rendements observés en cellules catalytiques et PHA sont spécifiques de chaque source de carbone. Le substrat pour lequel le rendement  $R_{(Xc/S)}$  est le plus élevé est successivement : les mélanges comportant du butyrate, le mélange glucose/fructose, le mélange propionate/acétate et enfin, l'acétate seul. Cette hiérarchisation est concordante avec le niveau de réduction des substrats considérés. Et plus encore, les écarts obtenus entre les rendements de croissance sont similaires à ceux des rendements théoriques limites respectifs des différents substrats. En effet, pour un  $(C/P)_{app}$  donné, la valeur du rendement observé par rapport au rendement théorique est relativement conservée pour tous les substrats. Plus précisément, elle est comprise entre 62 et 75% à un  $(C/P)_{app}$  de 250  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$ , et entre 61 et 73% à un  $(C/P)_{app}$  de 325  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$ . En condition de double limitation nutritionnelle, le potentiel de croissance n'est donc pas seulement régi par la disponibilité en phosphore, mais est également conditionné par la nature de la source de carbone, et son degré d'oxydation. Plus un substrat est réduit, plus la quantité

d'énergie fournie à la cellule est importante. Les équivalents réducteurs supplémentaires sont alors utilisés pour maximiser la croissance.

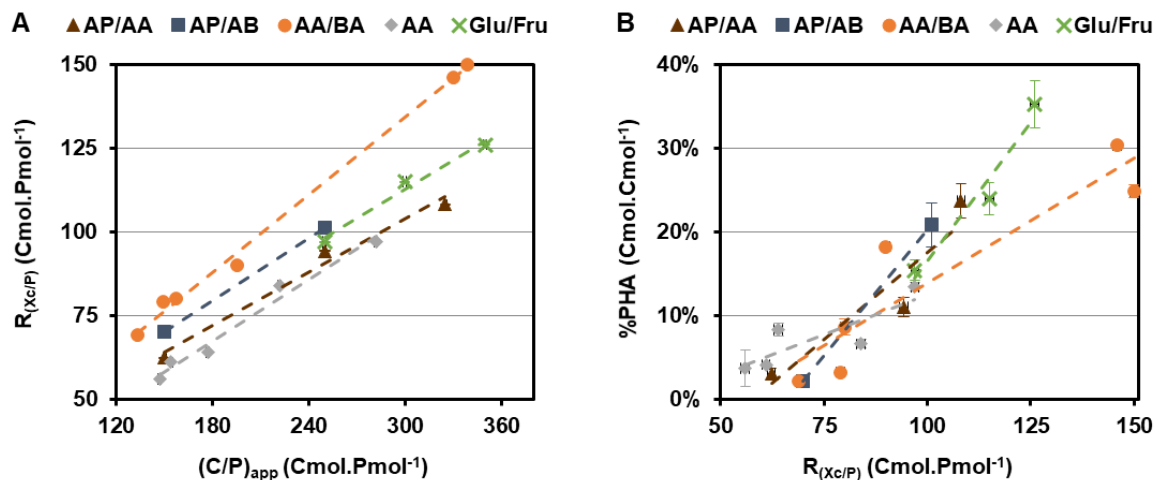
De la même façon, les rendements observés de production de PHA, à un  $(C/P)_{app}$  donné, semblent respecter la logique dictée par les rendements théoriques limites.  $R_{(PHA/S)}$  est d'autant plus grand que  $Y_{(PHA/S)}$  est élevé. L'augmentation du rendement en PHA avec l'augmentation de la restriction en phosphore est sensiblement comparable pour les divers substrats. A titre d'exemple, elle oscille entre 1,7 et 2,3 lorsque le  $(C/P)_{app}$  évolue de 250 à 325  $Cmol.Pmol^{-1}$ .

#### IV. 2. b. Teneurs intracellulaires en PHA

Au travers de l'étude des paramètres cinétiques des cultures alimentées avec du propionate, il a été observé que les mécanismes de distribution du carbone ne sont pas uniquement liés au  $P_{in}$  mais qu'ils dépendent également de la nature du substrat carboné, dont l'influence peut s'exprimer de manière :

- **indirecte** : à un  $(C/P)_{app}$  donné, l'efficacité de conversion du carbone en cellules catalytiques (et donc, la dilution du  $P_{in}$ ) est liée à la nature de la source de carbone ;
- **directe** : à un  $P_{in}$  donné, l'orientation de la consommation du carbone est substrat-dépendante.

La comparaison des résultats de cette étude avec ceux de Cavaillé (2015) et Morgado Ferreira (2017) a pour objectif de pouvoir généraliser ces conclusions à d'autres substrats. Les évolutions du rendement observé de conversion du phosphore en biomasse catalytique  $R_{(Xc/P)}$  en fonction du degré de limitation en phosphore appliqué d'une part, et de la teneur en PHA selon le rendement  $R_{(Xc/P)}$  d'autre part, ont été alors représentées pour chaque substrat carboné (Figure 39).



**Figure 39.** Evolution du rendement observé de conversion du phosphore en cellules catalytiques ( $R_{(Xc/P)}$ ) en fonction du degré de limitation en phosphore appliqué  $(C/P)_{app}$  dans la zone de double limitation nutritionnelle (DLN) selon la nature de la source de carbone (A). Evolution de la teneur intracellulaire en PHA (%PHA) en fonction du rendement observé  $R_{(Xc/P)}$  selon la nature de la source de carbone (B).

Indépendamment de la source de carbone, le rendement observé ( $R_{(X_c/P)}$ ) augmente de manière linéaire avec l'augmentation du degré de limitation en phosphore  $(C/P)_{app}$ . De plus, le coefficient de linéarité est conservé d'un substrat à l'autre. La dilution intracellulaire du phosphore en conditions de limitation de la croissance est ainsi directement corrélée au ratio des substrats limitants et s'ajuste à la disponibilité réelle en phosphore. Toutefois, le degré de plasticité du  $P_{in}$  à un  $(C/P)_{app}$  diffère selon la nature du substrat carboné, corroborant les conclusions préliminaires qui avaient été faites à la suite à la confrontation des résultats obtenus sur les mélanges acétate/propionate et butyrate/propionate. La dilution du  $P_{in}$  est plus importante avec le butyrate qu'elle ne l'est avec le propionate, et plus encore, l'acétate. En d'autres termes, elle est d'autant plus élevée que le substrat carboné est réduit (ou que le rendement théorique de croissance associé est grand). Cette observation rejoint l'idée que la position des frontières de la zone de double limitation nutritionnelle (DLN) est gouvernée par le degré d'oxydation du substrat (Zinn et al., 2004 ; Egli, 1991) : plus la source de carbone est oxydée, plus la zone de DLN est déplacée vers des rapports  $(C/N)_{app}$  (dans le cas d'une double limitation carbone/azote) élevés. En effet, les limites de la zone de DLN correspondent aux besoins minimums ( $P_{in\_min}$ ) et maximums ( $P_{in\_max}$ ) en phosphore. En alimentant le chemostat avec un substrat plus réduit qu'un autre, la valeur de  $P_{in\_min}$  est alors atteinte à un ratio  $(C/P)_{app}$  plus faible.

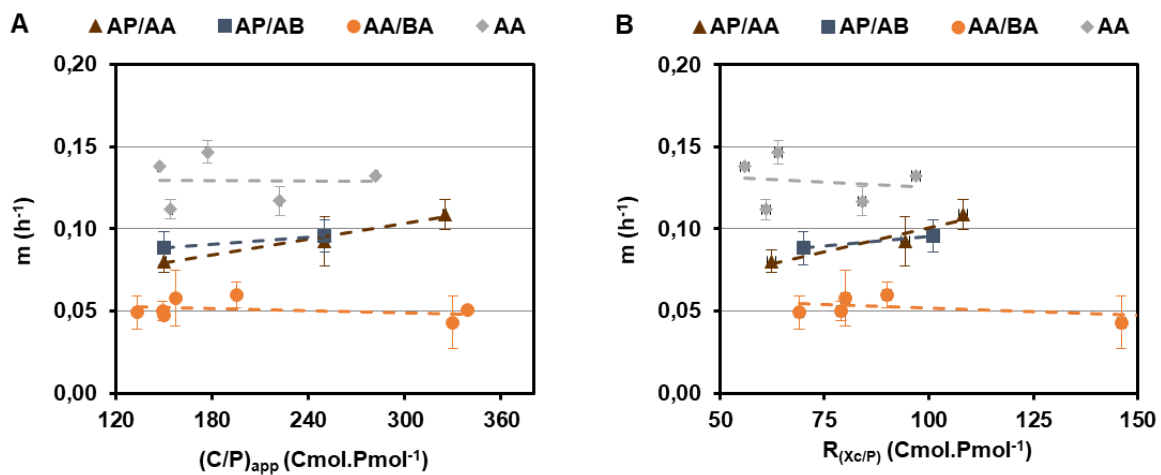
Par ailleurs, la nature de la source carbonée est à l'origine de différences notables dans la relation entre les teneurs intracellulaires en phosphore et PHA (Figure B). Bien que l'augmentation du %PHA soit généralisée avec la dilution du  $P_{in}$ , l'amplitude de cette augmentation est nettement conditionnée par la nature du flux d'alimentation en carbone. Pour une valeur de  $P_{in}$  donnée, la direction de la consommation du carbone est spécifique à chaque substrat : la croissance ou, au contraire, l'accumulation de PHA peut être favorisée selon les propriétés métaboliques de la source de carbone. L'acétate, en tant que précurseur direct de l'acétyl-CoA, la molécule carrefour du métabolisme central carboné chez de nombreuses bactéries hétérotrophes, pourrait ainsi être utilisé préférentiellement pour la croissance. Et inversement, le propionate, à partir duquel la formation d'acétyl-CoA nécessite plusieurs étapes intermédiaires, pourrait potentiellement privilégier une redirection du carbone vers la synthèse de PHA. A cela, il faut également ajouter que la nature du substrat carboné possède une influence manifeste sur la sélection et il est envisageable qu'elle puisse l'orienter vers des souches aux paramètres cinétiques hypothétiquement divergents (notamment, en termes des capacités de production de PHA) qui utilisent le carbone différemment. La question de la sélection sera abordée dans le chapitre 2, au travers de l'analyse phylogénétique.

En cultures pures, Durner et al., (2001) avaient déjà investigué l'influence de la nature de la source de carbone (hexanoate, heptanoate, octanoate, et nonanoate) sur la teneur intracellulaire en *mcl*-PHA pour des cultures continues de *Pseudomonas oleovorans* en double limitation C&N. Le changement de substrat carboné dans l'alimentation avait induit des variations du %PHA<sub>in</sub> similaires à celles ici observées. La fraction maximale en *mcl*-PHA avait été obtenue avec l'octanoate (42%), une valeur supérieure à celle atteinte avec l'heptanoate

ou le nonanoate (environ 30%). En revanche, avec l'hexanoate, la fraction en PHA était négligeable, la totalité du carbone étant orienté vers la  $\beta$ -oxydation. Ces résultats abondent dans le sens de l'existence de chemins métaboliques préférentiels selon la nature de la source de carbone.

#### IV. 2. c. Maintenance cellulaire

Au sujet de la maintenance cellulaire, l'objectif est de définir l'influence de la nature de la source de carbone, à la fois sur les valeurs du coefficient de maintenance, et sur la dynamique d'augmentation de ce coefficient en fonction du degré de limitation en phosphore d'autre part. Dans cette idée, l'évolution du coefficient  $m$  en fonction du  $(C/P)_{app}$  et du rendement  $R_{(Xc/P)}$  est représenté pour les divers substrats carbonés sur la Figure 40.



**Figure 40.** Evolution du coefficient de maintenance en fonction du  $(C/P)_{app}$  dans la zone de double limitation nutritionnelle (DLN) selon la nature de la source de carbone (A). Evolution du coefficient de maintenance en fonction du rendement observé  $R_{(Xc/P)}$  selon la nature de la source de carbone (B).

Dans la zone de double limitation nutritionnelle, le coefficient de maintenance augmente légèrement avec la diminution de la disponibilité en phosphore (ou du  $P_{in}$ ) pour les cultures opérées sur un mélange intégrant du propionate. Même s'il reste pseudo-stable pour les chémostats alimentés en acétate ou avec le mélange acétate/butyrate (au taux de dilution considéré), la même augmentation linéaire est constatée lorsqu'un D plus faible est appliqué (Cavaillé, 2015). Pour un D de 0,045 h<sup>-1</sup> (pour lequel la plage de la zone de DLN est nettement plus grande), la valeur de la maintenance au  $(C/P)_{app}$  le plus élevé est accrue d'un facteur 2,5 par rapport à celle au  $(C/P)_{app}$  le plus faible. Le changement dans la composition élémentaires des cellules induit par la dilution du  $P_{in}$  génère une augmentation des besoins énergétiques pour les fonctions de maintenance telles que le maintien des gradients de solutés et de l'homéostasie cellulaire (Tempest and Neijssel, 1984), le renouvellement de macromolécules (Chesbro, 1988), la défense contre le stress oxydatif (Mason et al., 1986) ou les réactions de dissipation d'énergie (Russell and Cook, 1995).

Indépendamment de la source de carbone ou du degré de limitation en phosphore appliqué, le coefficient de maintenance n'est ici jamais nul : une partie du carbone oxydé est inévitablement dévié de la croissance ou de l'accumulation de PHA. Cette perte de carbone trouve potentiellement son explication au travers de deux facteurs. Le premier d'entre eux est qu'en condition de limitation en carbone, le potentiel respiratoire de la cellule ne peut être exprimé pleinement qu'au taux de croissance spécifique maximal (Tempest, 1978 ; Pirt, 1987). A des taux de croissance inférieurs, la modification du contenu cellulaire, et notamment du pool enzymatique, ne permettrait pas d'utiliser aussi efficacement le substrat (Neijssel and Tempest 1975). Le taux de dilution appliqué ( $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ ) est trop faible par rapport aux  $\mu_{\max}$  des microorganismes sélectionnés, et empêche donc une conversion optimale du substrat carboné. Dans la même idée, Cavaillé (2015) a observé une diminution du rendement  $R_{(X/C/S)}$  à de faibles valeurs de  $(C/P)_{\text{app}}$  avec la diminution du taux de dilution, autrement dit un accroissement des réactions de maintenance. Des résultats similaires ont été rapportés par Franck (1999) et Durner (2000), respectivement avec des cultures sur acétate et octanoate.

Le deuxième élément d'explication est possiblement lié à la limitation en phosphore. Effectivement, Neijssel and Tempest (1976) ont constaté qu'une culture limitée avec un substrat autre que le carbone (ammoniaque, phosphate ou sulfate) consommait 5 à 10 fois plus d'oxygène que lorsqu'elle était limitée en carbone. Cette différence résulte du découplage entre la respiration et la croissance. La cellule dont la croissance est limitée par le phosphore, oxyde inutilement une partie du substrat carboné, plutôt que de le stocker sous forme de PHA.

Par ailleurs, des disparités significatives peuvent être relevées selon la nature de la source de carbone. Pour les cultures sélectionnées sur acétate, le carbone comptabilisé pour les réactions de maintenance représente 33% du carbone total consommé, contre seulement 15% dans le cas d'une alimentation avec le mélange acétate/butyrate. La dissipation d'énergie supplémentaire enregistrée avec l'acétate pourrait possiblement être la conséquence d'une redirection de l'acétate vers la production de PHA moins efficace. Elle pourrait également trouver son origine dans les inégalités éventuelles de sélection : le consortium sélectionné avec l'acétate pourrait ainsi utiliser moins efficacement le substrat que ne le fait la population sélectionnée avec le mélange acétate/butyrate.

## **V. Conclusion**

La capacité d'une culture continue ouverte opérée sous double limitation C&P à sélectionner des consortia producteurs de PHA a été éprouvée sur différents substrats carbonés. Elle a été confirmée, une fois encore, sur acétate/butyrate, avec une conservation de la réponse microbienne. Elle a été également reproduite et vérifiée sur des mélanges intégrant du propionate (acétate/propionate et butyrate/propionate). De plus, la

modification transitoire des cosubstrats par un substrat unique dans le flux d'alimentation a mis en exergue les facultés d'adaptation des populations microbiennes et leurs capacités d'assimilation de chacun des deux substrats composant les mélanges. La double limitation nutritionnelle assure donc une sélection robuste et systématique de producteurs de PHA.

En revanche, l'application instantanée d'un fort degré de limitation en phosphore a induit une déstabilisation des microorganismes, caractérisée par un effet d'engorgement métabolique avec une fuite du carbone vers la maintenance cellulaire ou la production d'EPS. Elle renseigne ainsi sur le mode de conduite à adopter : la montée en limitation en phosphore doit être progressive pour laisser un temps d'adaptation aux cellules et la possibilité de diluer leur phosphore intracellulaire.

Par ailleurs, la culture en chemostat a permis une investigation du métabolisme cellulaire. En comparant les résultats respectivement obtenus sur un mélange incluant du propionate et sur d'autres substrats, l'influence de la nature de la source de carbone sur la direction de la consommation du substrat a pu être étudiée. La réponse microbienne suite à une augmentation du niveau de limitation en phosphore reste invariablement conservée, définie par la diminution du  $P_{in}$  et la réorientation du carbone vers le stockage de PHA. Toutefois, la dilution du  $P_{in}$  à un  $(C/P)_{app}$  donné est caractéristique du substrat. En effet, le degré d'oxydation du substrat conditionne le potentiel de croissance et la quantité de cellules catalytiques. De plus, pour une même valeur de  $P_{in}$ , le devenir du carbone est spécifique à chaque source de carbone. De par ses propriétés métaboliques, le substrat peut orienter préférentiellement le carbone vers la croissance cellulaire, la voie de synthèse des PHA, ou alors être à l'origine d'une augmentation de la maintenance (notamment le propionate).

Jusqu'ici, seule la capacité à produire des PHA a été vérifiée pour l'ensemble des cultures sélectionnées, quel que soit le substrat à partir duquel a été opéré l'enrichissement. Les prochains chapitres chercheront alors à différencier les consortia, au travers d'une caractérisation microbiologique (chapitre 2) et cinétique (chapitre 3), et ainsi pouvoir évaluer l'influence de la nature de la source de carbone sur l'identité des microorganismes sélectionnés et leurs potentialités de production de PHA.





## **CHAPITRE II. ETUDE DES FACTEURS GOUVERNANT LA COMPETITION MICROBIENNE EN CULTURE CONTINUE**

---



## **I. Introduction**

L'analyse macro-cinétique des régimes stabilisés a permis de mettre en évidence le caractère systématique de la fonction « production de PHA » au sein des consortia microbiens sélectionnés en condition de double limitation nutritionnelle. Cette stratégie assure donc un enrichissement en communautés accumulatrices de PHA, à partir de boues activées traitant les eaux résiduaires urbaines. Ce chapitre s'attache dès lors à qualifier la sélection microbienne au moyen de l'analyse phylogénétique. L'objectif est de déterminer l'influence des paramètres opératoires sur les dynamiques de sélection et d'identifier les genres microbiens dominants. La stabilité et l'adaptabilité des consortia seront également étudiées, notamment durant les phases transitoires de changement du substrat carboné.

En comparant les résultats de l'analyse microbiologique avec ceux obtenus par Cavallé (2015) et Morgado-Ferreira (2017), l'impact des différentes conditions opératoires en chemostat (nature de la source de carbone mais aussi degré de limitation en phosphore et taux de dilution) sur la sélection microbienne sera examiné. A partir de là, les facteurs et les mécanismes qui gouvernent l'orientation de la compétition microbienne en culture continue feront l'objet d'une discussion.

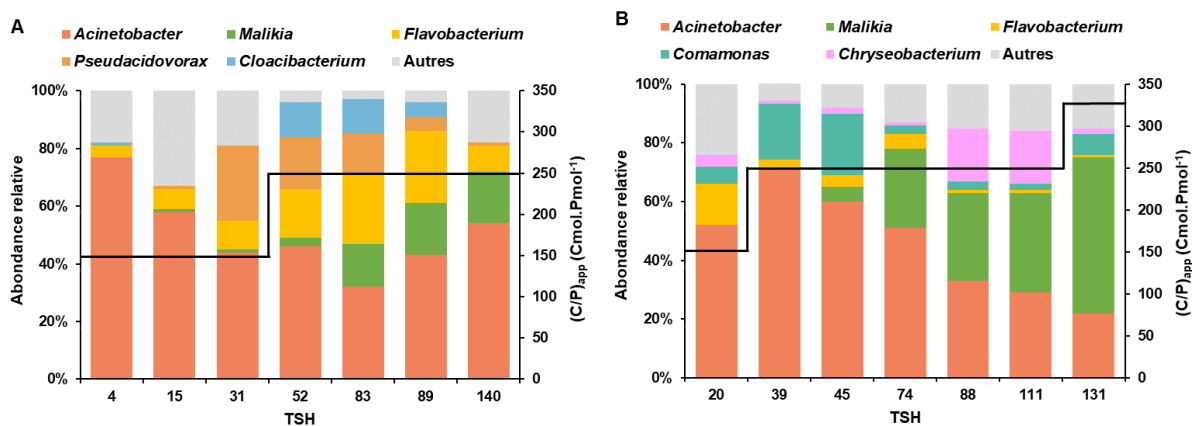
## **II. Etude de la sélection microbienne**

Cette partie présente premièrement les dynamiques de sélection durant les différentes campagnes opérées sur des mélanges incluant du propionate (acétate/propionate, butyrate/propionate et lors de la modification temporaire du substrat). Dans un deuxième temps, ces observations seront confrontées à celles de Cavallé (2015) et Morgado-Ferreira (2017).

### **II. 1. Dynamiques de sélection sur un mélange intégrant du propionate**

#### ***II. 1. a. Acétate/propionate***

Les dynamiques de sélection sont analysées par l'étude de la diversité et des dominances microbiennes au cours des cultures continues. La Figure 41 représente les abondances relatives des populations majoritaires durant les campagnes expérimentales conduites sur le mélange acétate/propionate, en fonction du temps de séjour hydraulique et du degré de limitation en phosphore correspondant. Les populations minoritaires sont regroupées sous la mention « autres ».



**Figure 41.** Dynamiques de sélection sur acétate/propionate, respectivement durant la campagne A1 (A) et A2 (B) : abondance relative des populations bactériennes en fonction du nombre de TSH et du  $(C/P)_{app}$ . Les genres bactériens représentant moins de 4% de l'ADN 16S total ont été regroupés sous la dénomination « Autres ».

La comparaison de la distribution microbienne pour chacune des deux campagnes expérimentales, à l'issue de conditions opératoires identiques, fait état de quelques dissemblances. Toutefois, ces différences restent relatives dans la mesure où les dynamiques majeures sont conservées. En effet, quelle que soit la campagne, les communautés microbiennes sont caractérisées par :

- la dominance initiale du genre *Acinetobacter*, à hauteur de 80% ;
- l'émergence progressive du genre *Malikia* avec l'augmentation de la limitation en phosphore, et dont l'abondance s'intensifie graduellement jusqu'à atteindre plus de 50% pour un  $(C/P)_{app}$  de 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>. Une investigation à l'échelle de l'espèce révèle, de surcroît, qu'il s'agit uniquement de l'espèce *Malikia spinosa* ;
- la présence de populations dites secondaires, telles que *Pseudacidovorax* spp., *Flavobacterium* spp. (A1), *Comamonas* spp. (A2), pour lesquelles la fraction au sein des consortia dépasse rarement 20%.

En culture continue avec une double limitation C&P, l'implantation d'*Acinetobacter* spp. a déjà été rapportée par Cavaillé (2015), plus particulièrement avec une alimentation en acétate et l'application de taux de dilution supérieurs à 0,21 h<sup>-1</sup>. Sa présence a également été constatée avec les procédés d'enrichissement en cultures discontinues. Par exemple, Liu et al., (2013) l'ont relevé comme l'une des souches prédominantes lors d'une sélection avec le procédé AN/AE en condition de limitation azote. Dalal et al., (2010) l'ont identifié dans des sols contaminés par du pétrole brut, et l'ont répertorié comme producteur de PHA.

Le genre *Malikia* et plus précisément l'espèce *Malikia spinosa*, a été largement sélectionné par Cavaillé (2015) en culture continue en conditions de double limitation C&P avec une alimentation en acétate/butyrate et à des taux de dilution supérieurs à 0,21 h<sup>-1</sup>. La reproduction de cette stratégie de sélection microbienne avec un mélange glucose/fructose à un taux de dilution de 0,12 h<sup>-1</sup> a conduit à la codominance de *Malikia spinosa* et *Malikia granosa* (Morgado-Ferreira, 2017). Les populations appartenant au genre *Malikia* sont reconnues

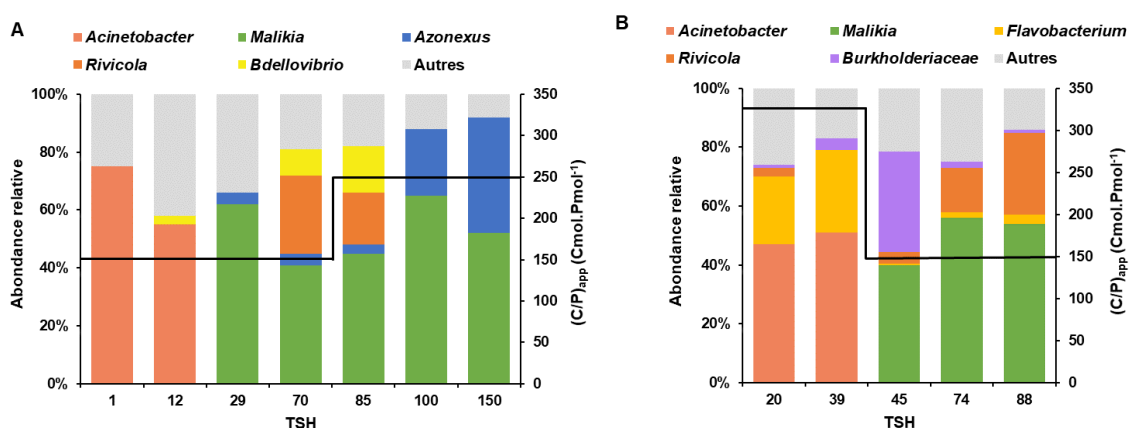
comme surproductrices de PHA, pouvant accumuler jusqu'à 80% de PHA (Cavaillé et al., 2016 ; Spring et al., 2005).

Enfin, les autres populations précédemment citées ont aussi été mentionnées dans la littérature spécialisée de la production de PHA. Le genre *Flavobacterium* est généralement retrouvé en faible abondance dans les consortia sélectionnés avec le système ADF (Zeng et al., 2018 ; Wang et al., 2017 ; Dionisi et al., 2005a) mais son potentiel d'accumulation de PHA n'a été signalé qu'une seule fois (Tezuka, 1969). Le genre *Comamonas* a, pour sa part, été identifié comme capable de synthétiser des PHA, notamment à partir d'acides organiques concentrés issus d'effluents de moulins d'huile de palme (POME) (Mumtaz et al., 2010 ; Yee et al., 2012), et plus spécifiquement, de convertir le propionate en P(3HB-co-3HV) (Zakaria et al., 2010).

Malgré l'utilisation d'inoculum différents, prélevés sur des stations d'épuration et à des temps différents (plus de 10 ans séparent les expériences de Cavaillé et celles réalisées durant ce travail), la présence systématique de certaines espèces microbiennes et la conservation relative de la distribution microbienne observées avec les cultures continues ouvertes mettent en évidence une forte convergence microbiologique, en plus de la stabilité fonctionnelle relatée dans le chapitre précédent. Ce résultat confirme le lien supposé entre limitation phosphore et sélection de microorganismes producteurs de PHA, même si l'origine de cette relation n'a pas été clairement identifiée à l'heure actuelle.

### II. 1. b. Butyrate/propionate

La même analyse des dynamiques microbiennes a été réalisée pour les cultures alimentées avec le mélange butyrate/propionate et est présentée sur la Figure 42.



**Figure 42.** Dynamiques de sélection sur butyrate/propionate, respectivement durant la campagne B1 (A) et B2 (B) : abondance relative des populations bactériennes en fonction du nombre de TSH et du  $(C/P)_{app}$ . Les genres bactériens représentant moins de 4% de l'ADN 16S total ont été regroupés sous la dénomination « Autres ».

Quel que soit le niveau de limitation en phosphore initialement appliqué, le genre *Acinetobacter* s'implante, une nouvelle fois, à l'issue des premiers temps de séjour. Cela fait état du caractère résilient de la dominance d'*Acinetobacter* spp. lors du lancement d'une culture, puisqu'elle est vérifiée indifféremment de la nature du substrat carboné ou de l'intensité de la limitation P.

Pour la campagne B1, à la différence des cultures opérées sur acétate/propionate, les populations du genre *Acinetobacter* disparaissent totalement après plusieurs temps de séjour, sans même la modification du degré de limitation P. Elles sont essentiellement supplantées par des bactéries du genre *Malikia*, dont l'abondance relative peut atteindre près de 65%, à 150 ou 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>. Ce constat souligne le rôle prépondérant de l'acétate dans le maintien d'*Acinetobacter* spp au sein des consortia. De plus, l'implantation de *Malikia* spp. s'accompagne de l'émergence de populations annexes, non identifiées durant les campagnes conduites sur acétate/propionate, en particulier *Rivicola* spp. et *Azonexus* spp. (respectivement à 150 et 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>). Le genre *Rivicola* n'a jusqu'à présent jamais été évoqué dans le cadre d'une étude sur la production de PHA, tandis que le genre *Azonexus* a été répertorié comme étant capable d'accumuler des PHA uniquement par Kutralam-Muniasamy et al., (2018).

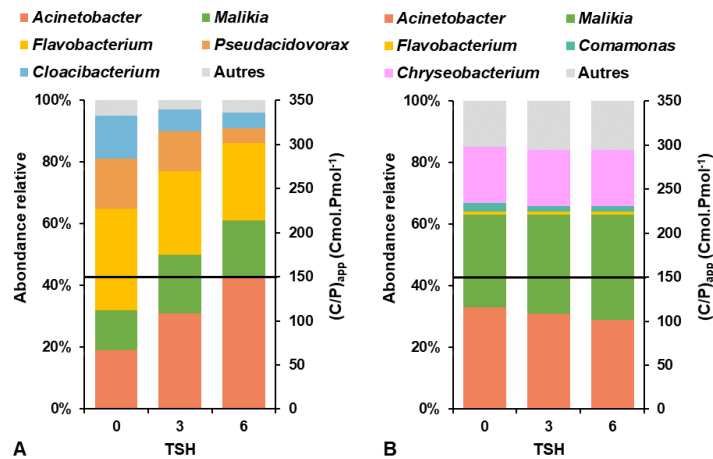
Concernant la campagne B2, les consortia microbiens sélectionnés à un  $(C/P)_{app}$  de 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>, auquel une production d'EPS a été relevée, sont majoritairement composés de populations appartenant aux genres *Acinetobacter* et *Flavobacterium*. Le potentiel de formation d'EPS par chacune des deux populations a déjà été mentionné dans la littérature. Par exemple, Davenport et al., (2014) ont investigué la sécrétion d'EPS par des biofilms d'*Acinetobacter baumannii*, constituant un mécanisme de protection suite à une exposition à la tobramycine. D'autres auteurs se sont intéressés à l'étude de la structure et de la composition d'EPS produits par des bactéries du genre *Flavobacterium*, isolées à partir de poissons tropicaux du Brésil (Sebastião et al., 2013) ou de sols de glaciers arctiques (Sathiyarayanan et al., 2015). Le fait que les populations majoritaires dans les conditions induisant une production d'EPS soient les mêmes que celles ayant été identifiées durant l'accumulation de PHA démontre que la réorientation partielle du substrat carboné vers la production d'EPS est consécutive à une bascule métabolique et non à un changement d'identité des populations majoritaires.

Enfin, la diminution du  $(C/P)_{app}$  à 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> est marquée par un retour de la distribution microbienne similaire à celle observée au même degré de limitation P lorsque celui-ci est imposé directement. Ce résultat illustre la robustesse de la sélection imposée en réacteur continu ouvert à D fixé.

### **II. 1. c. Modification temporaire de la nature du substrat carboné**

L'absence d'accumulation transitoire de carbone dans les surnageants de culture lors de la substitution du cosubstrat acétate/propionate par l'un des deux substrats a permis de mettre en évidence les capacités de l'ensemble des populations au sein des consortia à consommer chaque AGV, et d'exclure l'hypothèse d'une

spécialisation. En revanche, l'étude des paramètres macro-cinétiques ne renseigne pas sur une potentielle préférence d'un genre microbien pour l'un des substrats. Dans cette idée, les modifications éventuelles de la distribution microbienne, induites par le changement transitoire de la nature du substrat carboné ont été analysées et représentées sur la Figure 43.



**Figure 43.** Dynamiques de sélection lors d'un changement transitoire de la nature du substrat carboné, respectivement avec une alimentation exclusive en acétate (**A**) et propionate (**B**). Le premier prélèvement (0 TSH) correspond à l'état de référence, auquel le mélange acétate/propionate a été remplacé par l'acétate (ou le propionate). Le deuxième prélèvement (après 3 TSH) correspond à la fin de la durée du changement de substrat, autrement dit la réintroduction du mélange en entrée. Le dernier prélèvement correspond au prélèvement 3 TSH après la réintroduction du mélange.

Après trois TSH avec une alimentation en acétate, la proportion d'*Acinetobacter spp.* a augmenté aux dépens de populations telles que *Pseudacidovorax spp.*, *Flavobacterium spp.*, ou encore *Cloacibacterium spp.* (Figure A). A l'inverse, l'alimentation transitoire en propionate a induit une diminution de la fraction d'*Acinetobacter spp.* en faveur de *Malikia spp.* (Figure B). L'implantation du genre *Acinetobacter* semble donc être fortement favorisé par l'acétate, substrat pour lequel il possède une affinité supérieure, comme précédemment évoqué par Cavaillé (2015). Dans les deux cas, en dépit de la réinstauration du mélange acétate/propionate dans le flux d'alimentation, les dynamiques de distribution microbienne observées avec le changement temporaire de la nature du substrat sont maintenues. Néanmoins, les différences constatées entre les états antérieur et postérieur (soit trois TSH après la réintroduction du mélange) à la perturbation ne se traduisent pas par une modification des paramètres macro-cinétiques. Il apparaît, en revanche, prématuré de pouvoir affirmer que l'orientation de la consommation du carbone est davantage gouvernée par la nature de la source de carbone plutôt qu'à l'abondance relative de chaque population.

## II. 2. Influence des conditions opératoires sur la sélection microbienne

Afin de définir l'influence de la nature du substrat carboné sur les dynamiques de sélection microbienne et l'identité des populations dominantes, les résultats obtenus à l'issue des campagnes expérimentales opérées





précipitamment et elle disparaît du milieu de culture. Intégrer du butyrate ou des sucres dans l'alimentation contribue à l'émergence de *Malikia* spp., preuve de sa forte affinité pour cesdits substrats.

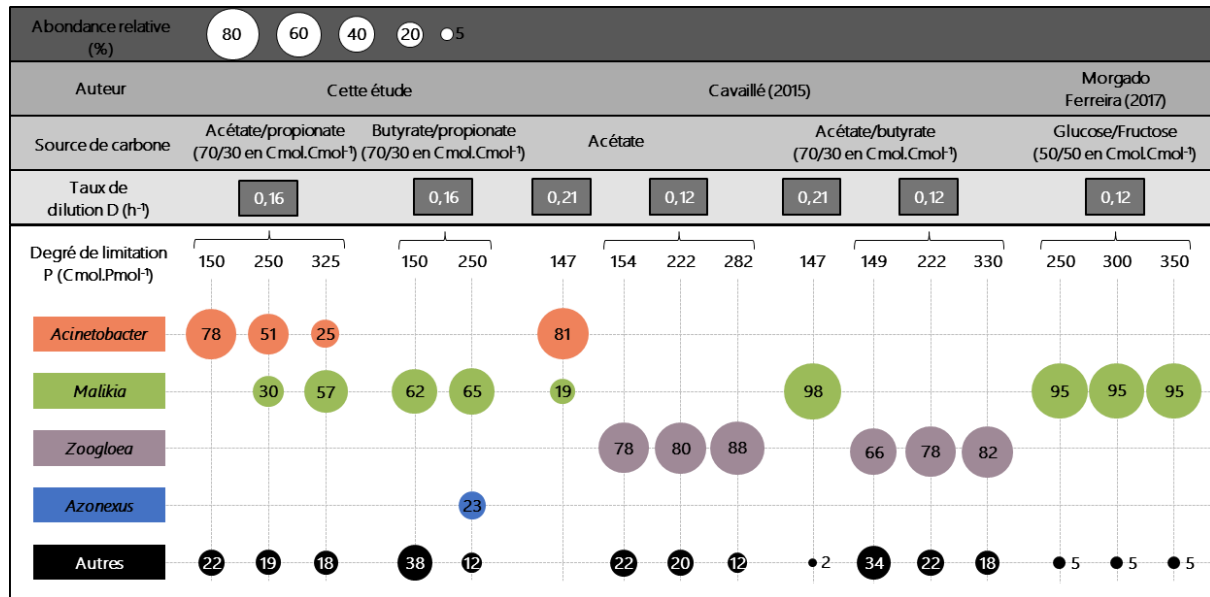
L'imposition de faibles taux de dilution est caractérisée par l'apparition de *Zoogloea* spp. Le genre *Zoogloea* est largement cité dans la littérature sur la production de PHA en cultures mixtes. Il est couramment retrouvé dans des boues activées ou les eaux usées, et sa capacité d'accumulation de PHA a été démontrée maintes fois (Fang et al., 2019 ; Oshiki et al., 2008). Il a été également sélectionné en SBR avec le procédé ADF (Wang et al., 2017 ; Marang et al., 2018 ; Jiang et al., 2011c). Son absence lors des campagnes opérées sur propionate semble davantage être due au taux de dilution ( $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ ) qu'à la nature de la source de carbone puisqu'il a été répertorié comme étant capable de s'implanter lors de cultures conduites sur propionate (Coats et al., 2016).

L'augmentation de la limitation P n'induit de différences majeures sur les dynamiques de sélection que pour les campagnes conduites sur acétate/propionate. Il s'agit, en effet, de l'unique culture pour laquelle l'identité de la population dominante est dépendante du  $(C/P)_{app}$ . La compétition microbienne sur acétate/propionate apparaît donc comme la plus sensible aux variations de la disponibilité exogène en phosphore. Le lessivage progressif d'*Acinetobacter* spp. au profit de *Malikia* spp. avec l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  traduit la meilleure adaptabilité de *Malikia* à une diminution de la concentration en phosphore, en d'autres termes une capacité de dilution du phosphore intracellulaire plus forte. Par ailleurs, le fait que les populations majoritaires soient conservées en dépit de l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  pour les autres cultures, atteste que la diminution du  $P_{in}$  résulte d'un ajustement à la disponibilité réelle en phosphore (lié à la plasticité cellulaire pour le phosphore), et non de la sélection de microorganismes avec de plus faibles besoins en phosphore, comme suggéré par (Brison et al., 2022).

### **II. 2. b. Microorganismes dominants à l'issue des différentes conditions opératoires**

Les genres microbiens dominants et leurs abondances relatives correspondantes sont indiqués pour chaque condition opératoire dans la Figure 45.

De manière générale, les pressions de sélection imposées par les différents paramètres opératoires assurent une dominance prononcée d'une seule population, exception faite pour certaines conditions et notamment pour les cultures réalisées sur acétate/propionate. Ces dernières sont caractérisées par la codominance de deux genres microbiens dont l'abondance relative respective dépend directement du degré de limitation P. Pour les autres cultures, l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  n'induit pas de variations sur l'identité de la population qui s'implante préférentiellement, mais uniquement sur son degré de dominance (par exemple, dominance accrue de *Zoogloea* spp. avec l'élévation du ratio  $(C/P)_{app}$  pour les cultures opérées sur acétate/butyrate ou acétate à  $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ).



**Figure 45.** Souches microbiennes dominantes et leurs abondances relatives obtenues en culture continue en double limitation C&P pour des taux de dilution similaires, en fonction de la nature de la source de carbone et du degré de limitation en phosphore  $(C/P)_{app}$ .

En résumé, la compétition microbienne entre les genres *Acinetobacter*, *Malikia*, *Zoogloea* et *Azonexus* dans une moindre mesure, est finement dictée par la combinaison des différents paramètres opératoires (nature de la source de carbone, degré de limitation en phosphore et taux de dilution). Le Tableau 11 récapitule les caractéristiques métaboliques majeures des populations et les conditions expérimentales favorables à leurs sélections respectives.

**Tableau 11.** Caractéristiques métaboliques des populations microbiennes dominantes et paramètres opératoires favorisant leur sélection.

Genre microbien	Caractéristiques métaboliques	Paramètres opératoires favorables
<i>Acinetobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte affinité pour l'acétate</li> <li>- <math>\mu_{max}</math> élevé</li> <li>- Adaptation mesurée à l'augmentation du <math>(C/P)_{app}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alimentation en acétate</li> <li>- D élevé</li> <li>- <math>(C/P)_{app}</math> faible</li> </ul>
<i>Malikia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte affinité pour le butyrate, le propionate et les sucres</li> <li>- Adaptation rapide et durable à l'augmentation du <math>(C/P)_{app}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alimentation en butyrate, propionate ou sucres</li> <li>- <math>(C/P)_{app}</math> élevé</li> </ul>
<i>Zoogloea</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte affinité pour les AGV</li> <li>- Faible affinité pour les sucres</li> <li>- <math>\mu_{max}</math> faible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- D faible (<math>D = 0,12 \text{ h}^{-1}</math>)</li> </ul>
<i>Azonexus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte affinité pour le butyrate</li> <li>- Adaptation rapide à l'augmentation du <math>(C/P)_{app}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alimentation en butyrate</li> <li>- <math>(C/P)_{app}</math> élevé</li> </ul>

### II. 2. c. Phylogénie des microorganismes majoritairement sélectionnés

Pour mieux comprendre les relations de parenté qui lient les divers microorganismes sélectionnés, un arbre phylogénétique comprenant les populations majoritaires a été reconstitué sur la Figure 46.

*Acinetobacter* spp. se distingue des autres genres microbiens sélectionnés dans la mesure où il s'agit du seul genre appartenant à la classe des  $\gamma$ -protéobactéries, par opposition aux  $\beta$ -protéobactéries. Cette distinction peut en partie expliquer certaines dissimilitudes métaboliques, et notamment des éventuelles inégalités en termes de potentialités d'accumulation de PHA (dont il sera question dans le prochain chapitre). L'ensemble des bactéries dominantes présentent, toutefois, pour point commun d'être gram-négatives.

La majorité des microorganismes identifiés dans le cadre d'études sur la production de PHA par des cultures mixtes appartiennent à la classe des  $\beta$ -protéobactéries, ce qui est également vérifié ici. Parmi les genres les plus récurrents, peuvent être mentionnés *Thauera*, de la même famille que *Zoogloea* (Valentino et al., 2014 ; Lemos et al., 2008 ; Jiang, 2011b ; Dionisi et al., 2005a), *Azoarcus*, du même ordre que *Zoogloea* et *Azonexus* (Albuquerque et al., 2010 ; Carvalho et al., 2014) et *Lampropedia*, de la même famille que *Malikia* (Beccari et al., 2009 ; Valentino et al., 2014). Malgré des stratégies d'enrichissement distinctes (système ADF, chemostat en double limitation C&P), il existe, par conséquent, une relative homogénéité de l'identité des populations microbiennes sélectionnées. Toutefois, d'autres auteurs ont aussi relevé la dominance de  $\Gamma$ -protéobactéries telles que *Pseudomonas* (Dalal et al., 2010) et surtout *Plasticumulans acidivorans*, espèce qui est caractérisée par des cinétiques de production de PHA très élevées (Jiang, 2011b ; Tamis et al., 2014).

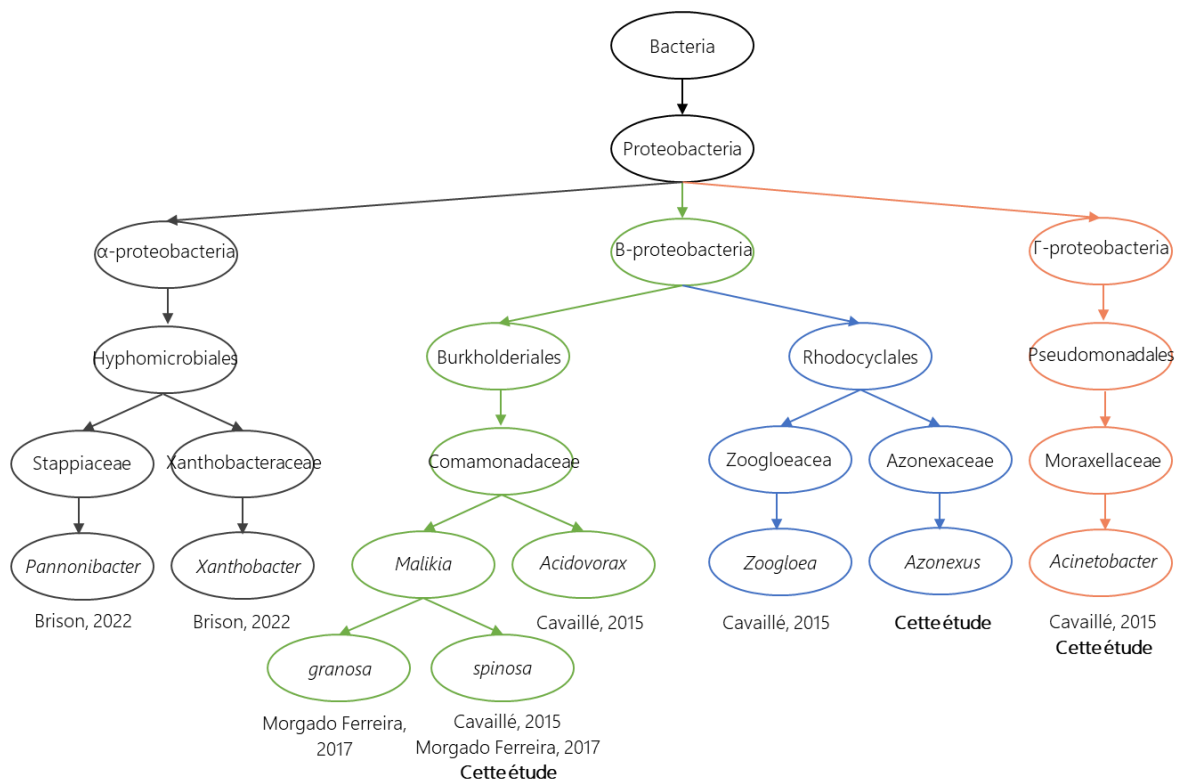


Figure 46. Identification taxonomique des genres microbiens sélectionnés.

Le fait que les microorganismes sélectionnés avec le système continu en limitation C&P soient relativement proches, du point de vue phylogénétique, des populations communément dominantes à l'issue du procédé d'enrichissement ADF et identifiées comme producteurs de PHA, fournit une nouvelle preuve de l'existence du lien supposé entre limitation phosphore et sélection de microorganismes stockeurs de PHA. Par ailleurs, la conservation du profil d'accumulation de PHA dans l'étage de sélection du procédé continu, en dépit de la diversité des microorganismes dominants, démontre une certaine robustesse fonctionnelle.

### **III. Discussion : orientation de la compétition microbienne**

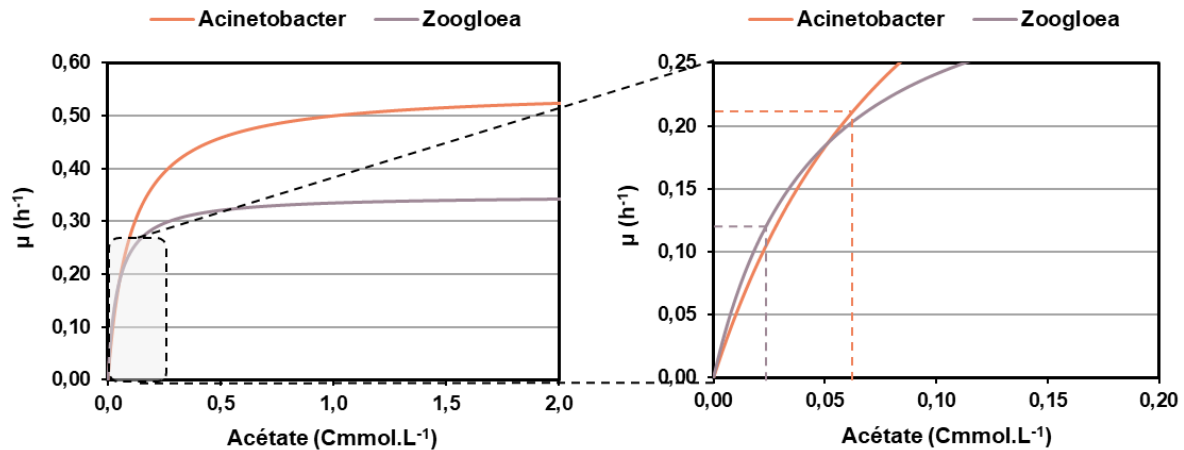
L'analyse phylogénétique de la composition des consortia a mis en évidence un effet notable des différentes conditions opératoires sur les dynamiques de sélection et les dominances microbiennes. Cette partie vise à mieux comprendre la façon dont les paramètres opératoires régissent la compétition microbienne en culture continue. En s'appuyant sur le formalisme de Monod et les grandeurs caractéristiques des microorganismes fournies dans la littérature, l'orientation de la compétition sera étudiée au travers de modèles. Précisément, l'influence (1) du taux de dilution, (2) de la nature de la source de carbone et (3) du niveau de limitation en phosphore sera successivement discutée. Les effets de chacun des paramètres opératoires seront examinés séparément, à partir de cas d'étude représentatif.

Il convient de rappeler que le modèle de Monod ne donne qu'une représentation simpliste des mécanismes de compétition microbienne. Comme évoqué en bibliographie, il ne prédit, par exemple, la survie que d'un seul microorganisme et la disparition de tous les autres. Par conséquent, il ne permet pas de rendre compte de la présence de populations secondaires.

#### **III. 1. Effet du taux de dilution**

L'effet du taux de dilution est illustré à partir des résultats de sélection microbienne obtenus pour la culture conduite avec une alimentation en acétate, pour laquelle la modification du taux de dilution a entraîné une redirection de la distribution microbienne, entre *Acinetobacter* et *Zoogloea* (Figure 45).

En chemostat, à un taux de dilution donné, la compétition microbienne est gouvernée par les caractéristiques cinétiques des microorganismes, et notamment leur affinité pour l'élément nutritif limitant. Dans mesure où une double limitation est ici appliquée, il est alors possible d'aborder la modélisation de la compétition à la fois selon l'affinité pour le phosphore, mais aussi selon celle pour la source de carbone. Dans le cas présent, c'est l'affinité pour l'acétate qui a été retenue mais il aurait également été envisageable de réaliser le modèle en question en prenant compte de l'affinité pour le phosphore.

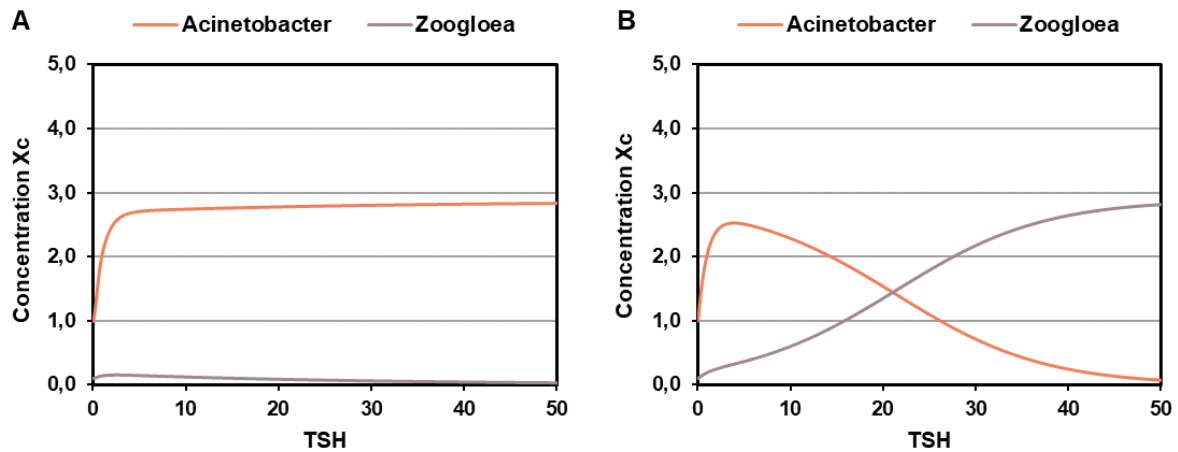


**Figure 47.** Propriétés de croissance d'*Acinetobacter* spp. ( $\mu_{\max} = 0,55 \text{ h}^{-1}$  et  $K_c = 0,10 \text{ Cmmol.L}^{-1}$ ) et de *Zoogloea* spp. ( $\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$  et  $K_c = 0,05 \text{ Cmmol.L}^{-1}$ ) avec une alimentation en acétate, selon la représentation de Monod.

La Figure 47 représente les propriétés de croissance de chacune des deux populations. Le taux de croissance spécifique maximal de la population *Acinetobacter* sur acétate a été estimé à  $0,55 \text{ h}^{-1}$  par Cavallé (2015), en accord avec les travaux de Franck (1999) qui avait déterminé le  $\mu_{\max}$  de la souche *Acinetobacter johnsonii* à  $0,65 \text{ h}^{-1}$ . La valeur réelle du  $\mu_{\max}$  reste, quoi qu'il en soit, largement supérieure aux différents taux de dilution appliqués dans la mesure où la concentration résiduelle en substrat demeure constamment négligeable. Le  $\mu_{\max}$  de *Zoogloea* sur acétate a été, quant à lui, défini comme étant égal à  $0,35 \text{ h}^{-1}$  (Cavallé, 2015). Il est donc inférieur, ce qui explique en partie la raison pour laquelle *Acinetobacter* s'implante systématiquement durant les premiers temps de séjour, avant l'entrée en limitation nutritionnelle.

Les coefficients d'affinité pour l'acétate des deux genres microbiens peuvent être estimés en se référant aux dominances de chacune des populations aux taux de dilution considérés. En conditions de limitation de la croissance, le microorganisme qui s'impose est celui qui maintient la plus faible concentration résiduelle en substrat au taux de croissance spécifique dicté par le taux de dilution. Au regard des résultats présentés sur la Figure 45, *Acinetobacter* s'établit très nettement à  $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$ , tandis qu'à  $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$ , c'est *Zoogloea* qui s'implante massivement. Dès lors, en prenant en référence un coefficient d'affinité pour l'acétate égal à  $0,1 \text{ Cmmol.L}^{-1}$  pour *Acinetobacter*, il est possible d'estimer celui de *Zoogloea* à environ  $0,05 \text{ Cmmol.L}^{-1}$ . Dans ces circonstances, au taux de croissance spécifique de  $0,21 \text{ h}^{-1}$ , c'est le genre *Acinetobacter* qui fixe la plus faible concentration résiduelle en substrat et remporte la compétition microbienne, et inversement à  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$  (Figure 47). L'évolution des concentrations respectives des deux populations aux différents taux de dilution, obtenue à partir de l'estimation des grandeurs cinétiques, est alors représentée sur la Figure 48 et est fidèle aux dynamiques de sélection observées.

Compte tenu de ces résultats, le genre *Acinetobacter* peut donc être considéré comme « r-strategist », avec un taux de croissance spécifique élevé et une affinité modérée pour le substrat carboné (ou phosphoré). Au contraire, le genre *Zoogloea* peut être assimilé comme « K-strategist ».



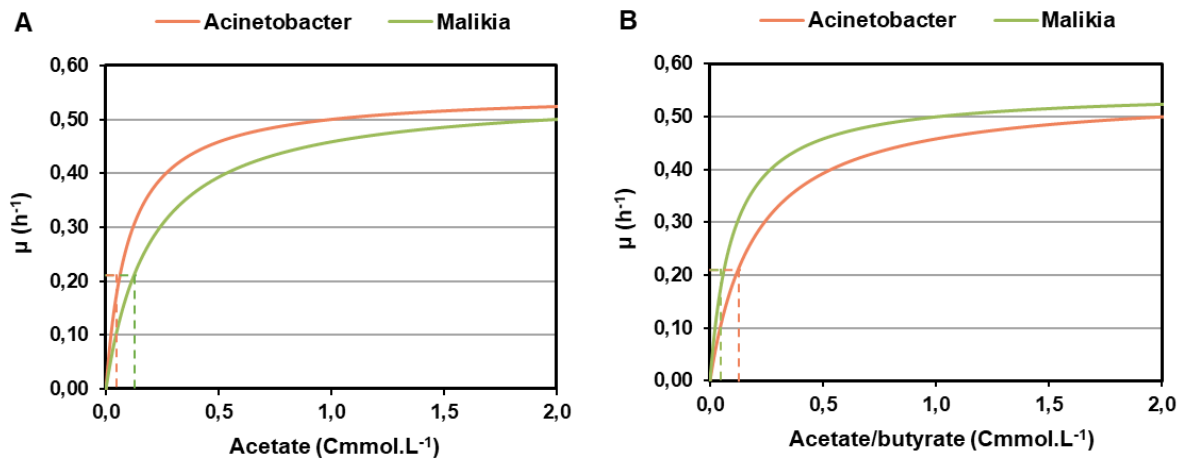
**Figure 48.** Modélisation de l'évolution des concentrations d'*Acinetobacter* spp. et de *Zoogloea* spp. en culture continue alimentée en acétate, selon le nombre de temps de séjour, respectivement avec un taux de dilution  $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$  (A) et  $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$  (B).

L'effet du taux de dilution sur la sélection a été vérifié dans d'autres domaines. Winkler et al., (2017) ont, par exemple, étudié la compétition entre deux bactéries oxydant les nitrites (NOB) et spécifié le taux de dilution maximal à appliquer pour assurer le maintien dans le réacteur de la population avec le plus faible  $\mu_{\max}$ .

### III. 2. Effet de la nature de la source de carbone

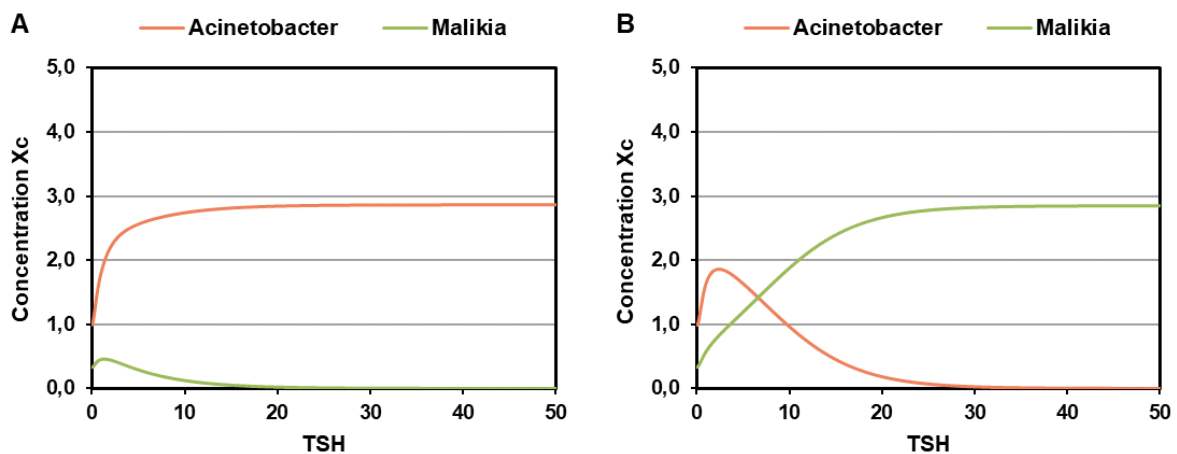
L'influence de la nature de la source de carbone est évaluée par comparaison de la dominance microbienne à l'issue de cultures conduites à un même taux de dilution ( $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$ ), mais alimentées en acétate ou avec un mélange acétate/butyrate.

La nature de la source de carbone conditionne les cinétiques de croissance des microorganismes. Elle a naturellement une incidence sur le coefficient d'affinité mais aussi le taux de croissance spécifique maximal. L'utilisation de mélanges de substrats en cultures mixtes soulèvent alors plusieurs questions et interroge par exemple sur une éventuelle spécialisation des consortia pour l'un des substrats. En effet, diversifier la source de carbone peut favoriser l'implantation de plusieurs populations microbiennes (Yoon et al., 1977). Dans ce cas de figure, il faudrait considérer un couple de constantes cinétiques ( $\mu_{\max}$  et  $K_c$ ) pour chacun des substrats. Toutefois, Egli et al., (1993) ont démontré que lorsqu'une culture continue est alimentée simultanément avec deux substrats carbonés distincts, la sélection est généralement orientée vers des microorganismes capables de métaboliser les deux substrats. Plus particulièrement, concernant les populations dont il est ici question, la substitution transitoire du mélange acétate/propionate par l'un des deux substrats a permis de mettre en avant la capacité des populations à consommer les deux substrats. Il a alors été fait l'hypothèse que cette propriété était partagée par l'ensemble des consortia sélectionnés sur un mélange carboné, et notamment par celui sélectionné sur acétate/butyrate. De ce fait, dans le cadre de cette modélisation, le mélange a été appréhendé comme un substrat unique (et donc associé à un seul  $K_c$ ).



**Figure 49.** Propriétés de croissance d'*Acinetobacter* spp. et de *Malikia* spp., selon la représentation de Monod, respectivement avec une alimentation en acétate (A) et un mélange acétate/butyrate (B).

Outre les caractéristiques cinétiques d'*Acinetobacter* sur acétate, Cavaillé (2015) a déterminé les valeurs de  $\mu_{\max}$  et  $K_s$  de *Malikia* avec un mélange acétate/butyrate, respectivement égales à  $0,55 \text{ h}^{-1}$  et  $0,1 \text{ Cmmol.L}^{-1}$ . En revanche, l'absence de conditions conduisant à la sélection d'*Acinetobacter* sur acétate/propionate et de *Malikia* sur acétate n'a pas permis d'estimer leurs grandeurs cinétiques sur lesdits substrats. Dès lors, il a été choisi de conserver les valeurs des taux de croissance spécifiques maximaux (à savoir  $0,55 \text{ h}^{-1}$  pour les deux populations, quel que soit le substrat considéré) et de n'appliquer un effet de la source de carbone que sur les valeurs des constantes d'affinité. A taux de croissance spécifique maximal similaires, la compétition n'est alors plus que gouvernée par l'affinité pour la source de carbone. La sélection d'*Acinetobacter* sur acétate a donc conduit à, nécessairement, fixer le coefficient d'affinité pour l'acétate de *Malikia* à une valeur inférieure à celui d'*Acinetobacter*, et a été fixé comme égal à  $0,2 \text{ Cmmol.L}^{-1}$ . Dans la même idée, le coefficient d'affinité d'*Acinetobacter* pour le mélange acétate/butyrate a également été défini à  $0,2 \text{ Cmmol.L}^{-1}$ . Les propriétés de croissance des microorganismes, respectivement sur acétate (A) et sur le mélange acétate/butyrate (B), sont représentées sur la Figure 49 à partir de ces estimations.



**Figure 50.** Modélisation de l'évolution des concentrations d'*Acinetobacter* spp. et de *Malikia* spp. en culture continue à un taux de dilution  $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$ , selon le nombre de temps de séjour, respectivement avec une alimentation en acétate (A) et un mélange acétate/butyrate (B).



La représentation de la croissance démontre que, sur acétate, quel que soit le taux de croissance spécifique, *Acinetobacter* impose systématiquement une concentration résiduelle en substrat inférieure à celle imposée par *Malikia*. Par conséquent, *Acinetobacter* s'établit préférentiellement, indépendamment le taux de dilution appliqué. A l'inverse, la compétition microbienne sur le mélange acétate/butyrate est remportée, de manière inconditionnelle, par *Malika*. La Figure 50 simule l'évolution des concentrations modélisées des deux genres à un taux de dilution de  $0,21 \text{ h}^{-1}$ , selon la nature de la source carbonée et le nombre de temps de séjour. La distribution respective de chacune des populations sur les différents substrats correspond ainsi aux résultats obtenus.

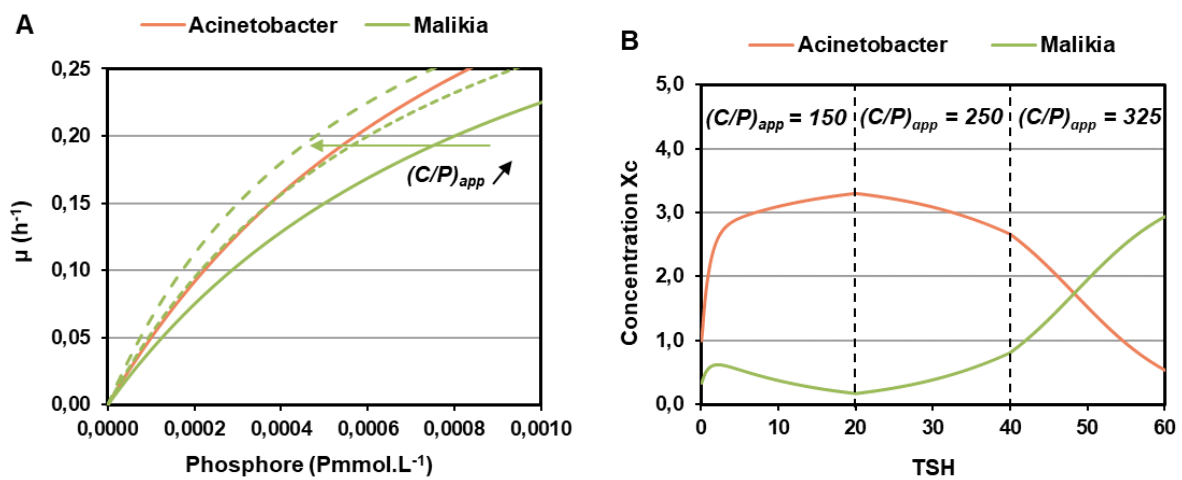
L'influence de la nature du substrat carboné sur la compétition microbienne a également été éprouvée dans d'autres systèmes. A titre d'exemple, Guerrero et al., (2011) ont signalé que la nature de la source de carbone régit la compétition entre les PAO et les dénitrifiants dans les procédés d'élimination biologique simultanée de l'azote et du phosphore. Par ailleurs, Werker, (2006) a rapporté que dans les procédés de boues activées, les fluctuations de la qualité de l'eau induit des modifications sur le profil des communautés microbiennes. Concernant les procédés de sélection de producteurs de PHA, et plus particulièrement le système ADF, il a été suggéré par Janarthanan et al., (2016) que la composition du substrat carboné influence les dynamiques de sélection. En substituant une alimentation en acétate par du propionate, Lemos et al., (2008) ont observé un changement de populations, en dépit de la conservation des conditions opératoires telles que le flux de charge organique ou la durée des cycles de « feast and famine ».

### III. 3. Effet du degré de limitation en phosphore

L'effet du degré de limitation en phosphore est abordé au travers de l'étude de la compétition microbienne au sein des cultures conduites avec le mélange acétate/propionate, puisqu'il s'agit de l'unique culture pour laquelle l'intensification de la limitation en phosphore a induit une profonde redistribution de la dominance microbienne. Plus précisément, ces cultures sont caractérisées par la dominance de deux genres microbiens (*Acinetobacter* et *Malikia*), dont l'abondance relative respective dépend directement du  $(C/P)_{app}$ . Le fait qu'il puisse y avoir une codominance ne peut s'expliquer, selon le modèle de Monod, que par une similarité des constantes cinétiques, conduisant à de très lentes dynamiques de lessivage du microorganisme perdant la compétition.

Comme suggéré précédemment, l'émergence progressive du genre *Malikia* avec l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  met en avant des mécanismes de dilution du phosphore intracellulaire plus performants, qui se manifestent notamment par l'augmentation du rendement de croissance par rapport au phosphore ( $R_{(X_C/P)}$ ). Néanmoins, en ne tenant compte que de l'équation de Monod, ils ne peuvent justifier un changement de la dominance microbienne que s'il se matérialisent par une modification des caractéristiques cinétiques, à savoir le  $K_s$  ou

le  $\mu_{\max}$ . En conséquence, dans le cadre de la modélisation, il a été fait l'hypothèse que le taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ) impacte directement le coefficient d'affinité pour le phosphore ( $K_p$ ), et en particulier celui de *Malikia*. Dans la même idée, il a été démontré par Weusthuis et al., (1994) que dans des cultures continues limitées en sucre, les levures sont capables d'adapter leurs systèmes de transport du sucre face à des faibles concentrations résiduelles en sucre. Dans ces conditions, les levures équipées de protéines symport à haute affinité présentent un avantage concurrentiel vis-à-vis des levures ne disposant qu'uniquement de systèmes de transport à diffusion facilitée, favorisant donc leur sélection. Dès lors, il a été décidé de fixer pour *Malikia* trois valeurs différentes de  $K_p$ , selon les trois degrés de limitation en phosphore appliqué.



**Figure 51.** Propriétés de croissance d'*Acinetobacter* spp. et de *Malikia* spp. sur acétate, en fonction du degré de limitation P appliqué (A). Modélisation de l'évolution des concentrations d'*Acinetobacter* spp. et de *Malikia* spp. en culture continue avec une alimentation en acétate et un taux de dilution  $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ , selon le nombre de temps de séjour, et le degré de limitation P appliqué (B).

Les taux de croissance spécifiques maximaux d'*Acinetobacter* et *Malikia* sur le mélange acétate/propionate ont été respectivement estimés à  $0,55$  et  $0,45 \text{ h}^{-1}$ . Le coefficient d'affinité pour le phosphore d'*Acinetobacter* ( $K_p = 0,001 \text{ Pmmol.L}^{-1}$ ) a été pris en référence et est issu des travaux de Cavallé (2015). Il est conservé, quel que soit le  $(C/P)_{app}$ . Les différentes valeurs de  $K_p$  de *Malikia* à chaque  $(C/P)_{app}$  ont alors été déterminées en s'appuyant sur les abondances relatives d'*Acinetobacter* et de *Malikia* aux  $(C/P)_{app}$  correspondants. Ainsi, les coefficients d'affinité pour le phosphore de *Malikia* ont été estimés à  $0,00085$ ,  $0,00065$  et  $0,0006 \text{ Pmmol.L}^{-1}$ , pour un degré de limitation P respectivement égal à  $150$ ,  $250$  et  $325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ .

La Figure 51 présente, d'une part, les variations des propriétés de croissance de *Malikia* avec l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  (A) et d'autre part, l'évolution des concentrations modélisées d'*Acinetobacter* et de *Malikia* selon le nombre de temps de séjour, aux différents  $(C/P)_{app}$  (B). À  $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ , le degré de limitation en phosphore gouverne ainsi la sélection microbienne de la façon qui suit :

- Pour  $(C/P)_{app} = 150 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ , *Acinetobacter* impose la concentration résiduelle en P et remporte donc la compétition microbienne ;

- Pour  $(C/P)_{app} = 250 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ , les propriétés de croissance des deux genres sont comparables, entraînant une codominance ;
- Pour  $(C/P)_{app} = 325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ , *Malikia* fixe la concentration résiduelle en phosphore et s'établit dans le réacteur.

Un changement comparable de la distribution microbienne a été rapporté par Brison et al. (2022), avec une alimentation en acétate/propionate mais à un taux de dilution nettement plus faible ( $0,04 \text{ h}^{-1}$ ). En appliquant le même procédé de sélection en conditions de double limitation C&P en culture continue, les auteurs ont, en effet, relevé une compétition similaire entre deux genres microbiens (*Pannonibacter spp.* et *Xanthobacter spp.*), avec ses abondances relatives respectives dictées par le degré de limitation en phosphore.

Par ailleurs, l'hétérogénéité des capacités de dilution du phosphore intracellulaire peut être potentiellement mis en relation avec la taille, la forme et la morphologie des cellules. La taille des cellules peut, effectivement, affecter l'efficacité d'utilisation des ressources et par extension, impacter leur stratégie de survie (Yin et al., 2022). De plus, la morphologie de la cellule est également régulée par les concentrations en substrat (Gallet et al., 2017). Les microorganismes peuvent alors moduler leur forme et leur taille pour maximiser leur survie, notamment dans des conditions de stress telles que la limitation nutritionnelle (Shen and Chou, 2016 ; Chien et al., 2012). En outre, les propriétés r/K des bactéries sont partiellement corrélées à la taille des cellules. Les genres microbiens « K-strategists » tels que *Malikia* possèdent généralement une surface cellulaire élevée, à l'inverse des genres « r-strategists » comme *Acinetobacter* (Yin et al., 2022). Dans ces conditions, il semble concevable que les fortes capacités de dilution du  $P_{in}$  de *Malikia* soient, en partie, liées à la forme ou la taille des cellules.

## **IV. Conclusion**

La qualification microbiologique des consortia microbiens a été opérée à partir de l'analyse phylogénétique. Plus particulièrement, l'étude des dynamiques de sélection et de l'identité des genres microbiens dominants a permis de rendre compte de l'influence des différents paramètres opératoires (nature du substrat carboné, degré de limitation P, taux de dilution).

Il a été démontré que la double limitation C&P assure, de manière systématique, la dominance significative d'une seule ou deux populations, productrices de PHA. Les paramètres expérimentaux impriment donc des pressions de sélection contraignantes, qui restreignent la diversité microbienne et l'abondance massive de populations minoritaires. De plus, la relative conservation de la distribution microbienne avec des conditions opératoires similaires a mis en exergue la reproductibilité de la sélection, malgré la variabilité de l'inoculum. Par ailleurs, l'obtention d'une distribution microbienne équivalente, à la suite de l'application de paramètres

identiques et ce en dépit d'un historique différent, atteste de la robustesse de la stratégie de sélection basée sur une limitation en P en réacteur continu ouvert. A la stabilité fonctionnelle mise en avant avec la continuité des paramètres macro-cinétiques s'ajoute donc une stabilité microbiologique. Le lien entre limitation en P et sélection de producteurs de PHA a, par conséquent, pu ainsi être largement éprouvé.

Selon les paramètres opératoires, trois genres microbiens se disputent essentiellement l'implantation dans le réacteur :

- ***Acinetobacter*** spp., avantage par des taux de dilution élevés et une alimentation en acétate
- ***Malikia*** spp., favorisé par la présence de butyrate ou de sucres dans le mélange carboné et dans une moindre mesure, par un fort niveau de limitation P
- ***Zoogloea*** spp., dominant à de faibles taux de dilution, quel que soit la nature du substrat carboné ou le degré limitation P

Par ailleurs, les cultures alimentées avec un mélange acétate/propionate se distinguent des autres cultures dans la mesure où il s'agit de l'unique culture pour laquelle l'identité du genre microbien dominant est sujet aux variations du degré de limitation en P imposé. En effet, il a été relevé que l'augmentation du ratio C/P induisait une émergence progressive de *Malikia*. au détriment d'*Acinetobacter*. A l'inverse, la substitution de l'acétate par le butyrate (lors de l'association avec le propionate), assure la dominance de *Malikia*, quel que soit le  $(C/P)_{app}$  appliqué.

Enfin, l'analyse de la compétition microbienne au travers du modèle de Monod a apporté une caractérisation plus fine des genres en question. Elle a, en outre, permis d'estimer leurs constantes cinétiques de croissance respectives et de déterminer les propriétés r/K. Le chemostat est donc un outil particulièrement intéressant pour comprendre les mécanismes qui régissent les phénomènes de compétition microbienne.



**CHAPITRE III. INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE DE  
CARBONE SUR LES POTENTIALITES DE PRODUCTION DE  
PHA DES CONSORTIA SELECTIONNE**

---



## **I. Introduction**

L'analyse des paramètres macro-cinétiques dans le réacteur de sélection a mis en évidence la réorientation généralisée du carbone consommé vers le stockage de PHA avec l'augmentation du degré de limitation en phosphore, preuve de la sélection systématique de producteurs de PHA. En revanche, elle ne renseigne pas sur les potentialités et cinétiques d'accumulation de PHA de chacun des consortia sélectionnés. Dans cette idée, ce chapitre cherche ainsi à qualifier cinétiquement la sélection microbienne. Plus exactement, il a pour but de déterminer les vitesses spécifiques maximales de production de PHA des différentes communautés, selon l'identité des genres microbiens dominants, leur état physiologique (en d'autres termes, leur taux de phosphore intracellulaire) et la nature de la source de carbone.

L'objectif de production de P(3HB-co-3HV) a incité à investiguer spécifiquement les capacités d'assimilation du propionate des consortia sélectionnés. Dès lors, la nécessité d'intégrer du propionate durant la phase de sélection sera discutée. De plus, l'analyse des vitesses spécifiques de consommation des substrats carbonés constituera un moyen de définir, d'une part, les substrats préférentiels, et d'autre part, d'évaluer la stratégie d'alimentation la plus efficace.

## **II. Cinétiques de production de PHA en régime dynamique**

### **II. 1. Démarche expérimentale menée en réacteurs batch**

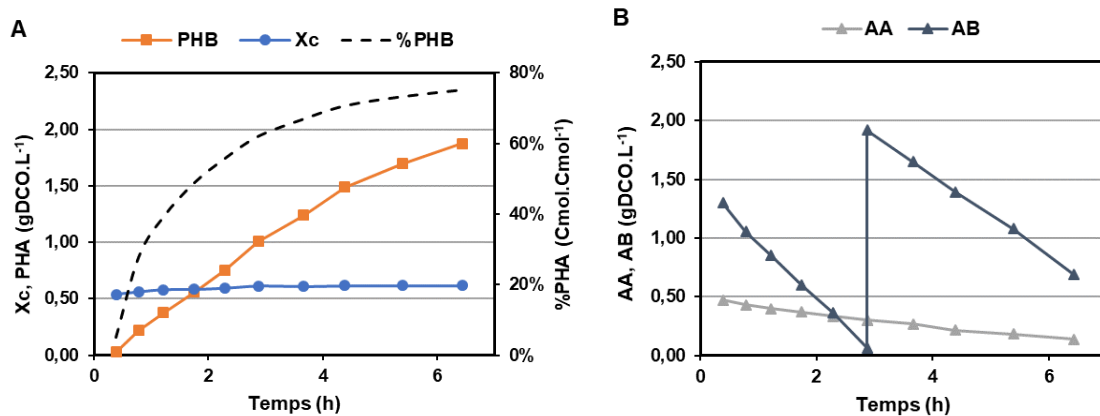
Les potentialités d'accumulation de PHA des différentes populations sélectionnées sont examinées par leur mise en culture en réacteur batch. Le mode batch informe sur les dynamiques de conversion du carbone. Il permet de suivre l'évolution au cours du temps des vitesses spécifiques de consommation des substrats, de production de PHA et de croissance bactérienne. Il renseigne ainsi à la fois sur la vitesse spécifique maximale de production de PHA ( $q_{\text{PHAmax}}$ ), relevées pendant les premières heures de culture, et sur la teneur maximale en PHA pouvant être atteinte. L'objectif est alors d'étudier le lien entre les conditions opératoires appliquées lors de la sélection et les capacités de production de PHA des communautés.

La totalité des cultures batch, ainsi que les paramètres opératoires à partir desquels a été opérée la sélection des inoculums, sont représentés sur la Figure 52. Le descriptif des conditions expérimentales et des objectifs de chacun des batch est détaillé en Annexe C. L'ensemble des batch a été réalisée en condition de carence en phosphore afin de restreindre la croissance cellulaire et favoriser la réorientation de la consommation du carbone vers la production de PHA. Le taux de phosphore intracellulaire initial des consortia ( $P_{\text{in,ini}}$ ) est dicté par le niveau de limitation P appliqué dans l'étage de sélection. Par ailleurs, les cultures ont été initiées avec différents niveaux d'azote, pour pouvoir évaluer les effets d'une entrée en carence prématurée en azote sur





culture en réacteur batch a été opérée avec des pulses simultanés d'acétate et de butyrate. Le suivi cinétique des concentrations en acétate et butyrate d'une part, PHA et Xc d'autre part, est présenté sur la Figure 53.



**Figure 53.** Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques (Xc) et de la teneur en PHB (A), ainsi que celles en acétate (AA) et butyrate (AB) (B) au cours du batch C1a.

Les deux sources de carbone sont consommées. En revanche, le butyrate est assimilé de manière nettement préférentielle : la vitesse spécifique maximale de consommation du butyrate ( $0,98 \text{ Cmol} \cdot (\text{Cmol} \cdot \text{h}^{-1})$ ) est près de cinq fois supérieure à celle de l'acétate ( $0,21 \text{ Cmol} \cdot (\text{Cmol} \cdot \text{h}^{-1})$ ). Le carbone est presque entièrement converti en PHB, la concentration en biomasse catalytique n'augmentant que très peu. Le maintien d'une croissance relative, en dépit de la carence en phosphore, s'explique par la plasticité de la biomasse pour le phosphore. La vitesse spécifique maximale de production de PHB atteint  $0,84 \text{ Cmol} \cdot (\text{Cmol} \cdot \text{h}^{-1})$ , obtenue au  $P_{in}$  initial de  $1,8 \text{ gP} \cdot \text{gXc}^{-1}$ , et la teneur intracellulaire en PHB est de plus de 75 Cmol% après de 7h de culture.

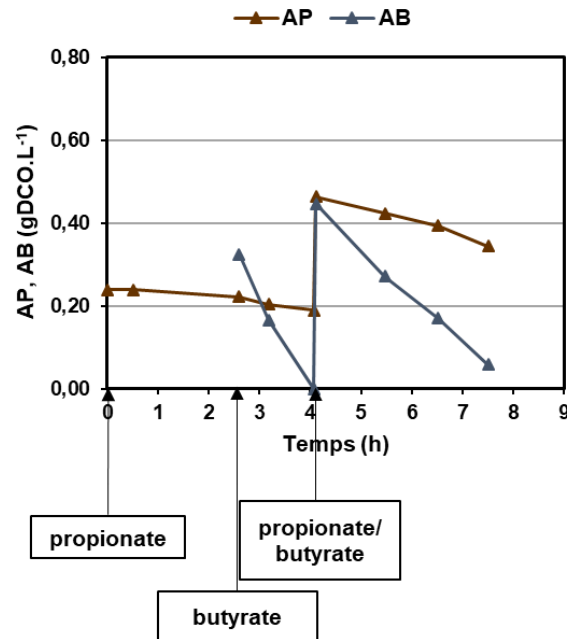
La capacité et la cinétique d'accumulation de PHB par le consortium sont analogues à celles observées par Cavaillé (2015). La stratégie de double limitation C&P en culture continue, conjuguée à une alimentation en acétate/butyrate, permet donc bien de sélectionner des populations surproductrices de PHB.

### **II. 2. b. Capacités de production de P(3HB-co-3HV) d'un consortium sélectionné sur acétate/butyrate**

Les aptitudes de production de P(3HB-co-3HV) du même consortium, sélectionné sur acétate/butyrate, ont ensuite été examinées, à partir de pulses de propionate, d'abord seuls, puis associés à du butyrate. Dans ce chapitre, la capacité à synthétiser des monomères de 3HV est résumée à l'assimilation du propionate. Cette affirmation sera vérifiée à l'issue du chapitre 5, dont le sujet d'étude porte sur la composition du copolymère P(3HB-co-3HV), et notamment sur la teneur en 3HV.

La Figure 54 expose l'évolution des concentrations résiduelles en propionate et butyrate au cours du temps. A l'issue du pulse initial uniquement constitué de propionate, la consommation est nulle. Suite à l'ajout de

butyrate, le propionate commence à être légèrement consommé, mais à une vitesse très faible, notamment en comparaison de celle du butyrate. A la suite d'un nouveau pulse de propionate et de butyrate (en raison de l'épuisement du butyrate), la vitesse de consommation du propionate augmente de façon modérée avec le temps et finit par atteindre  $0,09 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h}^{-1})$ . Elle reste néanmoins encore largement inférieure à celle du butyrate ( $0,63 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h}^{-1})$ ).

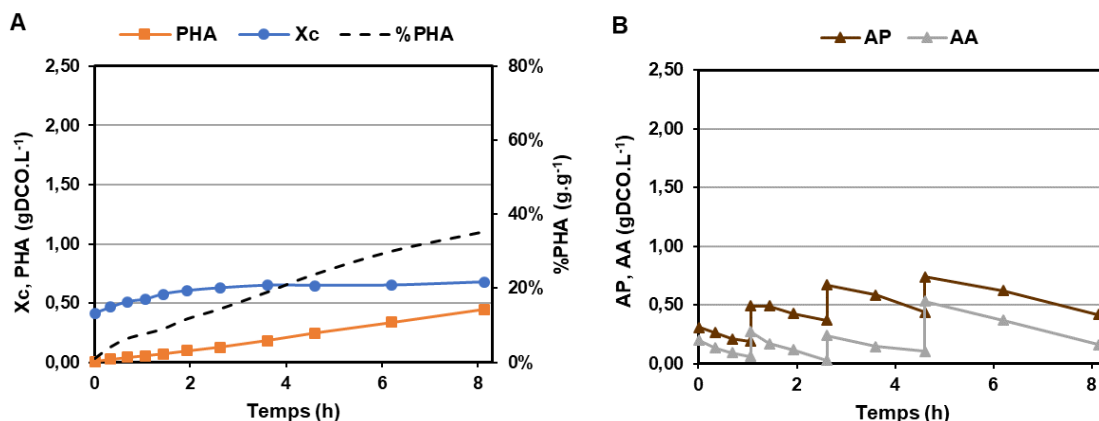


**Figure 54.** Evolution des concentrations en propionate (AP) et butyrate (AB) au cours du batch opéré avec une population microbienne préalablement sélectionnée sur un mélange acétate/butyrate (batch C1b).

Les consortia sélectionnés sur acétate/butyrate ne peuvent donc métaboliser efficacement le propionate. Il ne peut être consommé que s'il est combiné à l'un des deux AGV à partir desquels la sélection a été réalisée. Toutefois, il semble exister un phénomène d'acclimatation de la culture pour le propionate, en considération de l'accélération de la consommation du substrat en question après plusieurs heures.

### ***II. 2. c. Capacités de production de P(3HB-co-3HV) de consortia sélectionnés sur acétate/propionate***

Pour investiguer plus en profondeur les propriétés d'assimilation du propionate, l'expérience précédente a été reproduite avec des consortia préalablement sélectionnés sur un mélange incluant du propionate. A ce titre, les populations sélectionnées sur un mélange acétate/propionate ont été mises en culture en réacteur batch et alimentées avec des pulses conjugués d'acétate et de propionate. Le suivi cinétique du batch A2a, inoculé avec une culture sélectionnée à un  $(C/P)_{app}$  de  $150 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ , est représenté sur la Figure 55, avec l'évolution au cours du temps des concentrations en PHA, Xc (A), acétate et propionate (B).



**Figure 55.** Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques ( $X_c$ ) et de la teneur en PHA (**A**), ainsi que celles en propionate (AP) et acétate (AA) (**B**) au cours du batch opéré avec consortia microbien sélectionné sur un mélange acétate/propionate à un  $(C/P)_{app}$  de  $150 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  (batch A2a).

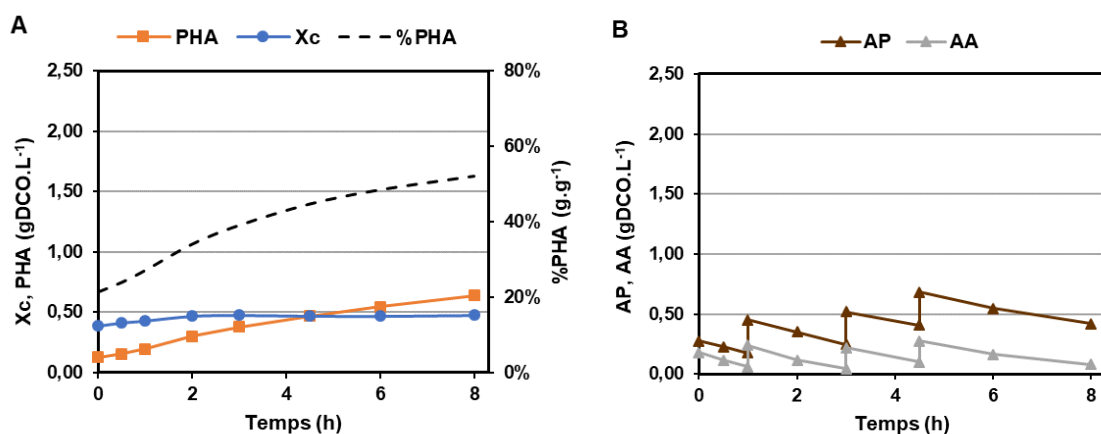
Dans le cas présent, le propionate est consommé instantanément, sans phase de latence, et nettement plus rapidement ( $q_{Smax}$  de  $0,30 \text{ Cmol. (Cmol.h}^{-1})$ ) qu'il ne l'était par le consortium sélectionné sur acétate/butyrate. Ces différences mettent en exergue l'effet mémoire qui peut s'établir vis-à-vis d'une source de carbone. Il est, en effet, concevable que le substrat avec lequel a été conduit la phase d'enrichissement prédispose les voies métaboliques des cellules dans une configuration préférentielle pour le substrat en question. De cette manière, l'historique de consommation dans l'étage de sélection conditionne les potentialités d'assimilation des substrats pendant la phase de production. Cet effet mémoire a été précédemment rapporté par Chang et al., (2012). Les auteurs ont comparé le potentiel de production de PHA de deux boues sélectionnées avec le procédé ADF, l'une avec propionate et l'autre avec l'acétate. Les tests en batch ont révélé que les consortia sélectionnés sur propionate présentaient de meilleures performances de production de PHA, en termes de cinétiques et de stœchiométrie, avec une alimentation en propionate qu'avec une alimentation en acétate. A l'inverse, les populations enrichies sur acétate possédaient une capacité de production de PHA supérieure avec l'acétate plutôt que le propionate. De la même façon, Lemos et al., (2006) ont constaté une diminution de la vitesse spécifique de consommation du propionate de populations sélectionnées en SBR avec acétate par rapport à celles sélectionnées avec propionate ( $0,19$  vs  $0,24 \text{ Cmol. (Cmol.h}^{-1})$ ).

Le choix de la source carbonée dans l'étage de sélection détermine ainsi les dynamiques de consommation des substrats sur l'ensemble du procédé. La sélection doit donc être nécessairement opérée sur un mélange contenant du propionate pour qu'il puisse être rapidement consommé pendant la phase de production de PHA, et par extension, pour pouvoir maximiser l'incorporation de motifs HV au sein du copolymère P(3HB-co-3HV).

En revanche, la majorité du carbone est orientée vers la croissance cellulaire et non vers l'accumulation de PHA, malgré la carence en phosphore (Figure 55A). La vitesse spécifique maximale d'accumulation de PHA demeure limitée à  $0,12 \text{ Cmol. (Cmol.h}^{-1})$ , et ce alors même que le  $P_{in}$  initial ( $1,9\% \text{ gP.gXc}^{-1}$ ) est proche de celui

décrit par Cavaillé (2015) comme le  $P_{in}$  optimal, auquel la production de PHA est maximisée. Par ailleurs, la teneur en PHA atteint seulement 35 Cmol% après 8h de culture. Ces différentes considérations peuvent être mises en relation avec l'identité du genre bactérien dominant. Effectivement, à l'inverse de la culture opérée sur acétate/butyrate pour laquelle la quasi-totalité des microorganismes appartiennent au genre *Malikia*, le consortium sélectionné sur acétate/propionate à un ratio C/P de 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> est presque exclusivement constitué de microorganismes du genre *Acinetobacter* (Figure 45).

A titre comparatif, les cinétiques obtenues avec le consortium sélectionné sur acétate/propionate à un (C/P) de 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>, davantage constitué de populations du genre *Malikia* (57%) que du genre *Acinetobacter* (25%), ont été tracées sur la Figure 56. En premier lieu, la vitesse spécifique maximale de consommation du propionate ( $q_{Smax}$  égal à 0,25 Cmol.(Cmol.h<sup>-1</sup>)) avoisine celle observée avec le consortium sélectionné à 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> (Figure 56B), ce qui permet d'exclure une influence significative de l'identité du genre bactérien sur les capacités d'assimilation du propionate, et renforce l'idée de l'existence présumée de l'effet mémoire. Par contre, la consommation du carbone est ici largement redirigée vers la production de PHA, au détriment de la croissance microbienne (Figure 56A). Le très faible  $P_{in}$  initial (0,9% gP.gXc<sup>-1</sup>) restreint certes le potentiel de croissance, expliquant en partie l'absence d'une croissance comparable. Toutefois, à cette valeur de  $P_{in}$ , la fragilisation des cellules empêche également, en théorie, une accumulation de PHA efficiente. Et pourtant, la vitesse spécifique maximale de production de PHA est deux fois supérieure (0,24 Cmol.(Cmol.h<sup>-1</sup>)) à celle obtenue avec le consortium sélectionné à 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>, pour lequel le  $P_{in}$  est considéré comme optimum pour le stockage de PHA. De surcroît, la teneur finale en PHA, après 8h de culture, est nettement supérieure et s'élève à 52%.



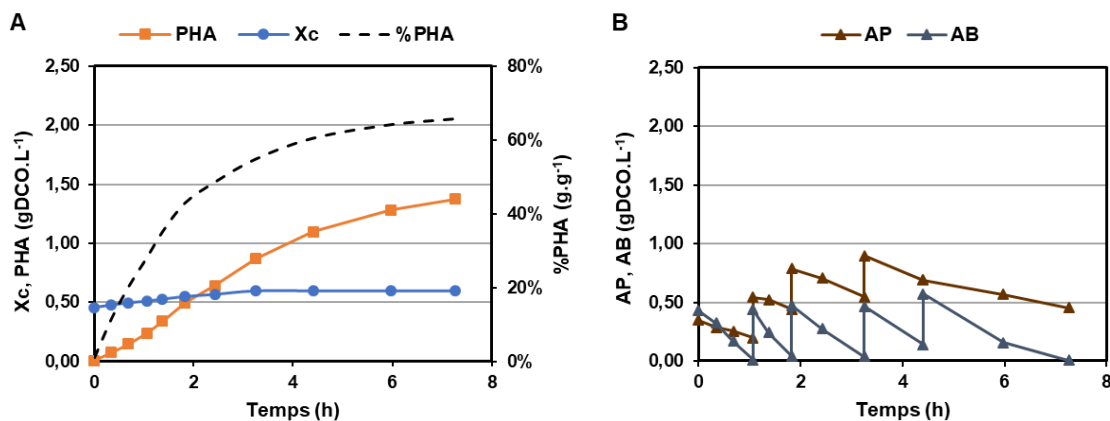
**Figure 56.** Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques ( $X_c$ ) et de la teneur en PHA (**A**), ainsi que celles en propionate (AP) et acétate (AA) (**B**) au cours du batch opéré avec consortia microbien sélectionné sur un mélange acétate/propionate à un  $(C/P)_{app}$  de 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> (batch A2f).

Ces observations mettent donc en évidence une forte influence de l'identité du genre microbien dominant sur les cinétiques de production de PHA. En particulier, *Acinetobacter* semble être un faible producteur, au contraire de *Malikia*, qui paraît significativement plus performant. Les rôles respectifs de la composition des

consortia microbiens, de la nature de la source de carbone et du  $P_{in}$  sur les capacités de production de PHA seront discutés plus en détails dans la suite du chapitre.

### II. 2. d. Capacités de production de P(3HB-co-3HV) d'un consortium sélectionné sur butyrate/propionate

Pour évaluer si les vitesses d'assimilation du propionate sont dépendantes de l'AGV auquel il est associé, le test d'accumulation de PHA en batch a été réitéré avec un consortium sélectionné sur butyrate/propionate. Il s'agit plus précisément d'un consortium sélectionné à un ratio C/P de 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>, caractérisé par la dominance de *Malikia* (62%). La Figure 57 présente les évolutions au cours du temps des concentrations en PHA, Xc (A), propionate et butyrate (B).



**Figure 57.** Evolution des concentrations en PHB, cellules catalytiques (Xc) et de la teneur en PHA (A), ainsi que celles en propionate (AP) et butyrate (AB) (B) au cours du batch B2b.

Les vitesses spécifiques maximales d'assimilation du propionate et du butyrate s'élèvent respectivement à 0,33 et 1,01 Cmol.(Cmol.h<sup>-1</sup>). Elles sont équivalentes à celles mentionnées durant les cultures sur les mélanges acétate/propionate et acétate/butyrate. A une valeur de  $P_{in}$  considérée, les vitesses maximales d'assimilation des substrats semblent donc indépendantes de la nature des AGV auxquels ils sont associés. Outre l'identité du microorganisme dominant, elles sont essentiellement corrélées au substrat lui-même et à ses propriétés intrinsèques. Pour l'ensemble des cultures batch réalisées dans cette étude, la vitesse de consommation du butyrate est amplement supérieure à celles de l'acétate et plus encore du propionate. En présence d'acétate ou de propionate, la consommation préférentielle du butyrate par des cultures mixtes a déjà été rapportée dans de nombreux travaux (De Donno Novelli et al., 2021 ; Wang et al., 2018). La préférence pour le butyrate a même été signalée pour des cultures qui n'y ont pas été exposées lors de l'étape de sélection (Dionisi et al., 2005b). De plus, Jiang et al., (2012) ont reporté que lors d'une alimentation avec un effluent de papeterie fermenté, la consommation en acétate et propionate ne commençait à s'accroître qu'après la déplétion du butyrate. Dans la même idée, Marang et al., (2013) ont relevé que si l'acétate et le butyrate étaient tous deux

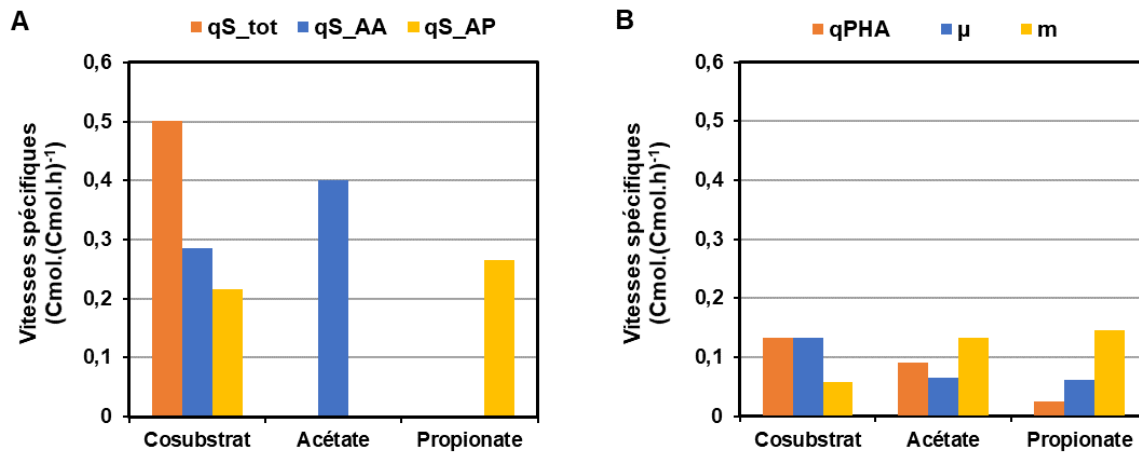
disponibles, la consommation de l'acétate observait une phase de latence et n'augmentait significativement qu'après l'épuisement du butyrate. Le total des vitesses spécifiques de consommation des substrats (acétate et butyrate) ayant été conservé, les auteurs ont suggéré que l'assimilation du substrat était l'étape limitante. En revanche, dans notre étude, ce constat n'est pas vérifié puisque le ratio entre les vitesses spécifiques de consommation du butyrate et du propionate reste inchangé et sans rapport avec la concentration résiduelle en butyrate.

Par ailleurs, la vitesse spécifique maximale de production de PHA atteint  $0,62 \text{ Cmol} \cdot (\text{Cmol} \cdot \text{h}^{-1})$ , ce qui atteste une fois de plus des capacités de production de PHA de *Malikia*, par opposition à *Acinetobacter*. Au contraire des cultures antérieures, le  $q_{\text{PHAmax}}$  n'a pas été relevé au  $P_{\text{in}}$  initial 2,0% ( $\text{gP} \cdot \text{gXc}^{-1}$ ) mais seulement après une phase de croissance qui a entraîné une diminution du  $P_{\text{in}}$  jusqu'à 1,8%, la valeur même qui avait été identifiée par Cavaillé (2015) comme le  $P_{\text{in}}$  optimal. Cette constatation conforte l'idée qu'à des teneurs intracellulaires en phosphore supérieures à 1,8%  $\text{gP} \cdot \text{gXc}^{-1}$ , une partie significative du carbone est orientée vers la croissance microbienne. La valeur de  $q_{\text{PHAmax}}$  demeure, néanmoins, inférieure à celle obtenue sur acétate/butyrate, en dépit de la conservation de la population microbienne dominante et de la similitude des vitesses spécifiques de consommation des substrats. Elle s'explique, par conséquent, par une diminution du rendement en PHA ( $0,58$  vs  $0,70 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ ). En effet, à  $q_s$  identiques, l'augmentation du rendement  $R_{(\text{PHA/S})}$  permet alors de maximiser la vitesse spécifique de production de PHA. L'efficacité de conversion du carbone est donc liée à la nature de la source de carbone. Le propionate génère ainsi davantage de réactions de maintenance que n'en induit l'acétate. De manière générale, les meilleurs rendements ont été successivement observés avec le mélange acétate/butyrate, butyrate/propionate puis enfin acétate/propionate. Valentino et al., (2015) ont également rapporté que la composition de l'alimentation avait un impact sur les cinétiques d'accumulation de PHA, et que ces dernières étaient d'autant plus élevées que les substrats contenaient des hautes fractions en butyrate. Le butyrate a été répertorié comme l'AGV présentant les rendements observés en PHA les plus élevés (jusqu'à  $0,94 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ ) (Kourmentza and Kornaros, 2016). L'augmentation du rendement en PHA à partir de butyrate résulte d'un besoin réduit en ATP pour convertir le substrat en PHA. Là où la conversion de l'acétate en PHA nécessite du pouvoir réducteur sous forme de NADH, la conversion du butyrate en PHA en génère. La génération de NADH lors de la production de PHA à partir de butyrate est presque suffisante pour synthétiser l'ATP requis, ce qui induit une diminution des besoins respiratoires des cellules par rapport à l'acétate (Marang et al., 2013).

### **II. 2. e. Capacités de production de PHA sur substrats uniques**

Jusqu'à présent, les potentialités de production de PHA ont été évaluées uniquement sur des mélanges de deux sources de carbone. Afin de déterminer les capacités de stockage de PHA sur substrats uniques et de

définir plus précisément les caractéristiques respectives des divers substrats, l'accumulation de PHA par les cultures sélectionnées sur acétate/propionate à un  $(C/P)_{app}$  de  $250 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  a été investiguée sur acétate et propionate seuls. Les cinétiques observées ont alors été mises en comparaison avec celles obtenues avec le cosubstrat acétate/propionate. Les vitesses spécifiques moyennes selon la nature de la source de carbone sont indiquées sur la Figure 58.



**Figure 58.** Vitesses spécifiques moyennes de consommation des substrats selon la nature de la source de carbone durant la phase d'accumulation (A). Vitesses spécifiques moyennes de croissance, stockage et maintenance selon la nature de la source de carbone (B).

Les vitesses spécifiques de consommation ( $q_s$ ) de l'acétate et du propionate sont plus élevées quand chaque substrat est le seul disponible (Figure 58A). Cette observation s'inscrit dans la lignée des résultats de Marang et al., (2013) ou Jiang et al., (2012), qui comme précédemment évoqué, ont fait état d'une augmentation de la vitesse spécifique de consommation de l'acétate en l'absence de butyrate. Toutefois, la vitesse spécifique de consommation cumulée des deux substrats lorsqu'ils sont simultanément présents est supérieure à celles de l'acétate ou du propionate lorsque ces derniers sont ajoutés séparément. Deux approches peuvent alors être considérées pour justifier ces différences :

- **microbiologique** : la diversité des microorganismes dans les consortia permet une spécialisation relative des populations pour un substrat donné, autrement dit certaines populations assimilent préférentiellement et plus rapidement l'un des deux substrats, et inversement. Lors d'une alimentation avec un substrat unique, les communautés microbiennes qui métabolisent en priorité le substrat manquant du mélange se reportent sur le seul substrat présent, mais sans maintenir une vitesse de consommation similaire.
- **métabolique** : l'acétate et le propionate étant assimilés de manière différente, les deux substrats peuvent être consommés séparément sans induire de modifications significatives de leurs vitesses de consommation respectives. Néanmoins, la diminution de la vitesse de consommation de l'acétate ou du propionate quand ils sont tous deux disponibles semble témoigner d'un effet potentiel d'engorgement métabolique.



Après une étape de sélection avec le procédé ADF réalisée avec une alimentation en acétate ou propionate, Lemos et al., (2006) ont également relevé que la vitesse spécifique de consommation du propionate durant la phase de production de PHA en batch était nettement plus élevée lorsqu'il est en présence d'acétate que lorsqu'il est le seul substrat disponible.

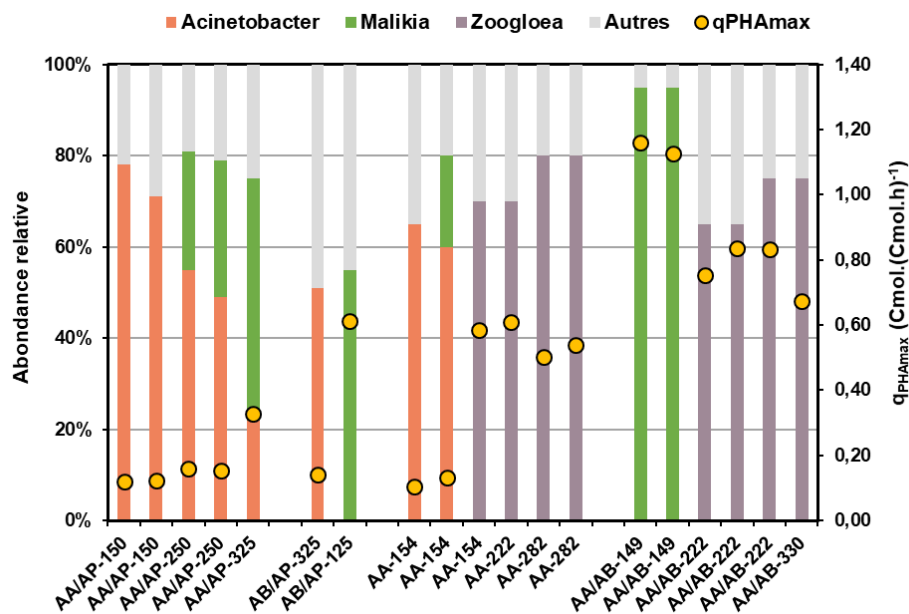
En outre, la diminution de la vitesse spécifique totale de consommation des substrats lors d'une alimentation avec un substrat unique entraîne une réduction de la vitesse spécifique d'accumulation de PHA, notamment avec le propionate seul (Figure 58B). En revanche, quel que soit le substrat utilisé, la diminution de la vitesse spécifique de production de PHA et du taux spécifique de croissance n'est pas proportionnelle à celle de la vitesse spécifique de consommation des substrats, mais est associée à une augmentation de la maintenance cellulaire. L'augmentation de la génération de  $\text{CO}_2$  lorsque le propionate est l'unique substrat s'explique en partie du fait que la production de PHA s'accompagne inévitablement d'une décarboxylation du propionyl-CoA pour synthétiser l'acétyl-CoA, précurseur direct des monomères 3HB et 3HV. Concernant l'alimentation en acétate seul, l'augmentation des réactions de maintenance est liée, selon Montano-Herrera et al., (2017), à l'intensification de l'activité de cycle de Krebs, dans la mesure où le métabolisme de l'acétate nécessite plus d'énergie (1 mol d'ATP est requis pour produire 1 Cmol d'acétyl-coA, tandis qu'activer 1 Cmol de propionate ne consomme que 0,67 mol d'ATP). Les auteurs ont ajouté que l'étude de la stœchiométrie de réaction de synthèse de la biomasse catalytique indique que le propionyl-CoA conduit à des rendements de croissance supérieurs à ceux de l'acétyl-CoA (1,06 mol de propionyl-CoA génère 1 mol de Xc alors que 1,27 mol d'acétyl-CoA sont nécessaires pour produire 1 mol de Xc).

### **III. Evaluation des potentialités de production de PHA des populations sélectionnées**

La détermination des cinétiques maximales de production de PHA a donné un premier aperçu de l'effet des différentes conditions opératoires sur les potentialités d'accumulation de PHA. De manière à définir plus en profondeur l'influence respective de chaque paramètre (composition des consortia, teneur intracellulaire en phosphore et nature de la source de carbone), les résultats de cette étude ont été mis en comparaison avec ceux obtenus par Cavaillé (2015) sur acétate et acétate/butyrate. Pour s'affranchir des différences éventuelles en lien avec l'effet mémoire, seuls les batch opérés sur le même substrat que celui avec lequel a été conduit la sélection ont été pris en considération.

### III. 1. a. Potentialités de production de PHA selon la composition des consortia sélectionnés

La Figure 59 présente les vitesses spécifiques maximales de production de PHA ( $q_{\text{PHAMax}}$ ) et les compositions des consortia microbiens correspondantes en fonction de la nature de la source de carbone et du degré de limitation en phosphore ( $(C/P)_{\text{app}}$ ) imposé dans l'étage de sélection. Les résultats détaillés de l'ensemble des batch figure en Annexe D.

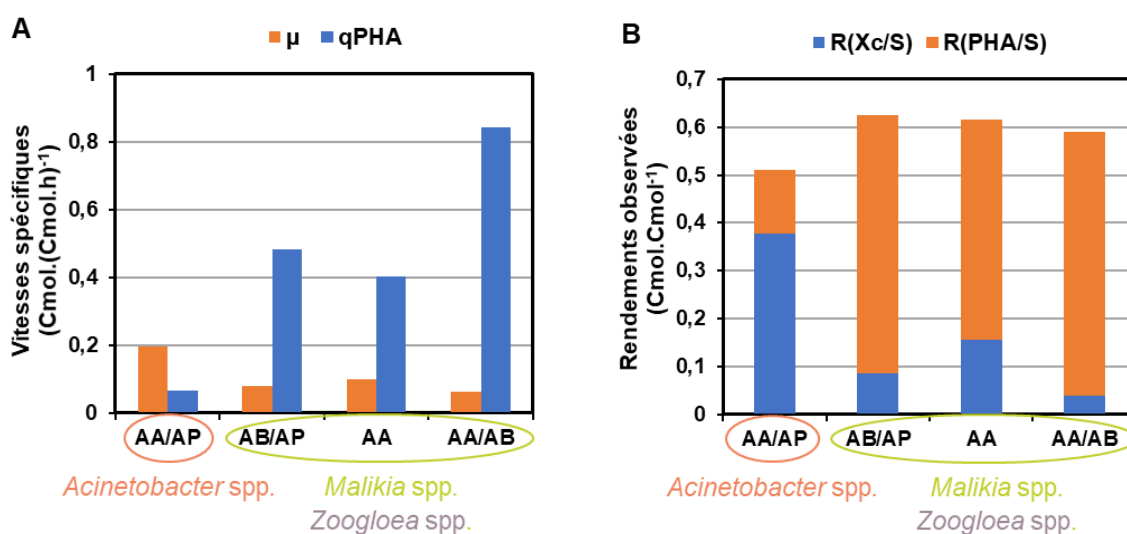


**Figure 59.**  $q_{\text{PHAMax}}$  obtenus en régime dynamique et compositions des consortia microbiens correspondantes en fonction de la nature de la source de carbone et du degré de limitation en phosphore ( $(C/P)_{\text{app}}$ ) imposé durant la phase de sélection (e.g. AA-154 : acétate et  $(C/P)_{\text{app}} = 154 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ ).

Quel que soit les substrats utilisés ou le ratio C/P appliqué durant la sélection, la vitesse spécifique maximale d'accumulation de PHA apparaît comme intimement corrélée à l'identité du genre microbien dominant. En particulier, les capacités de production de PHA d'*Acinetobacter* se distinguent fortement de celles de *Malikia* ou *Zoogloea*. Lorsqu'*Acinetobacter* est le genre dominant, la vitesse spécifique maximale d'accumulation de PHA reste inférieure à  $0,2 \text{ Cmol.}(Cmol.h)^{-1}$ . Rees et al., (1993) ont également signalé de faibles performances de production de PHA avec deux souches d'*Acinetobacter* isolées à partir de boues activées, pour lesquelles la teneur en PHB s'est limitée à  $10\% (g.g^{-1})$ . Au contraire, les genres *Malikia* et *Zoogloea* se caractérisent par des cinétiques de production de PHA élevées, avec des  $q_{\text{PHAMax}}$  qui oscillent entre  $0,5$  et  $0,9 \text{ Cmol.}(Cmol.h)^{-1}$  pour *Zoogloea*, et peuvent atteindre près de  $1,2 \text{ Cmol.}(Cmol.h)^{-1}$  avec *Malikia*, selon la nature du substrat et la teneur intracellulaire en phosphore. Des résultats similaires ont été obtenus par Reis et al., (2011), qui ont notamment reporté des teneurs en PHA s'élevant à  $89\%$  avec les mêmes genres microbiens.

Cette dichotomie entre le genre *Acinetobacter* d'une part et les genres *Malikia* ou *Zoogloea* d'autre part est illustrée sur la Figure 60. Cette dernière représente les vitesses spécifiques moyennes (A) et les rendements observés moyens (B) selon la nature de la source de carbone et le genre bactérien dominant associé, pour

des consortia sélectionnés avec le même ratio C/P de 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> (soit avec un P<sub>in</sub> initial équivalent et environ égal à 1,8% gP.gXc<sup>-1</sup>). Il apparaît très distinctement que la vitesse spécifique de production de PHA est nettement inférieure lorsqu'*Acinetobacter* est prédominant. En raison de leur faible disposition à stocker des PHA, les bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* oriente préférentiellement le carbone consommé vers la croissance cellulaire. En revanche, les conditions expérimentales (carence en phosphore) restreignent considérablement le potentiel de croissance (et donc, le taux spécifique de croissance), ce qui explique que la somme du q<sub>PHA</sub> et de μ soit largement inférieure à celle des populations surproductrices de PHA. Au-delà de conditionner la vitesse de consommation des substrats, le genre microbien dominant définit donc avant tout le devenir du carbone.



**Figure 60.** Vitesses spécifiques moyennes (A) et rendements observés moyens (B) selon la nature de la source de carbone et le genre bactérien dominant correspondant, pour des teneurs intracellulaires en phosphore initiales (P<sub>in,ini</sub>) équivalentes.

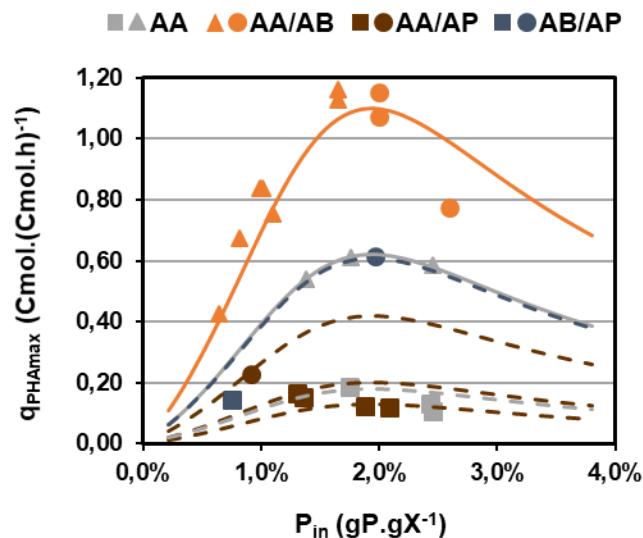
Toutefois, les potentialités de production de PHA ne se résument à l'identité du genre microbien dominant. Effectivement, pour un même consortium, des disparités significatives (en termes de q<sub>PHAMax</sub>) subsistent en fonction de la nature de la source carbonée et la teneur intracellulaire en phosphore. La suite de ce chapitre s'attache alors à définir précisément l'influence respective de ces deux paramètres.

### III. 1. b. Potentialités de production de PHA selon le taux de phosphore intracellulaire

Comme abordé en bibliographie, la relation entre la vitesse spécifique maximale d'accumulation de PHA et la teneur intracellulaire en phosphore a déjà été étudiée par Cavaillé (2015) avec une alimentation en acétate ou acétate/butyrate. Indépendamment de la nature de la source de carbone, l'influence du P<sub>in</sub> sur le q<sub>PHAMax</sub> a pu être modélisée par une fonction d'Haldane, qui fait état de l'existence d'un P<sub>in</sub> optimal (1,8% gP.gXc<sup>-1</sup>) pour lequel la valeur de q<sub>PHAMax</sub> est maximale. Toutefois, cette relation n'a été établie qu'à partir de consortia

caractérisés par la nette dominance (> 70%) de *Malikia* ou *Zoogloea*, ce qui a amené à les considérer comme une culture mono-souche productrice de PHA. Cependant, elle n'a pas été vérifiée pour *Acinetobacter*, pour lequel l'effet du  $P_{in}$  sur le  $q_{PHAmax}$  demeure de toute façon négligeable, dans la mesure où les cinétiques de d'accumulation de PHA restent faibles, indifféremment du  $P_{in}$  considéré.

Dans cette étude, l'absence de sélection de *Malikia* ou de *Zoogloea* avec un très fort taux de dominance, à différents degrés de limitation en phosphore (soit avec différents  $P_{in}$  initiaux) n'a pas permis de confirmer la relation définie par Cavallé (2015). Dès lors, il a été fait l'hypothèse que l'influence du  $P_{in}$  sur le  $q_{PHAmax}$  était conservée pour ces deux populations, quel que soit le substrat utilisé. L'évolution du  $q_{PHAmax}$  en fonction du  $P_{in}$  est ainsi représentée selon la nature de la source carbonée sur la Figure 61. Les cinétiques obtenues sur le mélange butyrate/propionate (substrat pour lequel le genre *Malikia* est dominant) sont analogues à celles obtenues avec l'acétate, avec une valeur maximale de  $q_{PHAmax}$  de l'ordre de  $0,6 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$ . Néanmoins, elles sont près de deux fois inférieures à celles observées avec le mélange acétate/butyrate. Il apparaît donc que la substitution de l'acétate par le propionate génère un effet délétère sur les cinétiques d'accumulation de PHA.



**Figure 61.** Evolution de la vitesse spécifique maximale de production de PHA ( $q_{PHAmax}$ ) en fonction du taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ) en réacteur batch, selon la nature de la source de carbone and l'identité du genre microbien dominant. Le genre *Acinetobacter* est symbolisé par des carrés, *Malikia* par des cercles et *Zoogloea* par des triangles. Les traits pleins représentent les valeurs modélisées, établies par une fonction d'Haldane modifiée (Cavallé, 2015). Les traits pointillés représentent les valeurs prédictives, basées sur le modèle.

Concernant les cultures ave acétate/propionate, la détermination des  $q_{PHAmax}$  selon le  $P_{in}$  initial a révélé une augmentation du  $q_{PHAmax}$  avec la diminution du  $P_{in}$ , ce qui tranche avec les résultats de Cavallé (2015). Cette dissimilitude trouve son explication dans le fait que, pour ce substrat en particulier, l'augmentation du ratio C/P appliqué pendant la sélection a, non seulement, entraîné une diminution de la teneur intracellulaire en phosphore, mais également une profonde restructuration de la composition des consortia microbiens, avec

notamment l'émergence de *Malikia* aux dépens d'*Acinetobacter*. Dans ce cas de figure, il est par conséquent difficilement envisageable de représenter la relation entre la vitesse spécifique maximale d'accumulation de PHA et la teneur intracellulaire en phosphore par une seule fonction d'Haldane pour la totalité des consortia sélectionnés, au vu de l'hétérogénéité des capacités de production de PHA des différents genres dominants. Une représentation spécifique a ainsi été adoptée pour chaque consortium sélectionné, toutes définies par une fonction d'Haldane, avec cependant un  $q_{\text{PHAmax}}$  dépendant de la composition du consortium (Figure 61). Pour le consortium sélectionné à  $325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ , le seul avec la dominance de *Malikia*, la vitesse spécifique maximale atteint alors  $0,4 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$ , ce qui demeure inférieur aux autres substrats utilisés, confirmant ainsi les limitations cinétiques induites par la présence de propionate.

### III. 1. c. Evaluation des paramètres cinétiques des populations microbiennes

Jusqu'alors, l'étude de l'influence de la nature du substrat sur la relation entre le  $q_{\text{PHAmax}}$  et le  $P_{\text{in}}$  n'a pas pris en considération les différences liées au taux de dominance des populations majoritaires. Ainsi, pour évaluer strictement l'effet de la nature de la source de carbone sur les cinétiques de production de PHA, les  $q_{\text{PHAmax}}$  déterminés en batch ont été recoupés avec la composition exacte des consortia. De cette manière, la vitesse spécifique maximale de production de PHA des différents genres microbiens dominants identifiés a pu être estimée selon la nature du substrat carboné.

La méthodologie employée est détaillée avec l'exemple de la sélection sur **acétate/propionate** :

Les résultats obtenus permettent de constituer un système de trois équations linéaires, avec la composition des consortia sélectionnés d'une part et le  $q_{\text{PHAmax}}$  correspondant d'autre part :

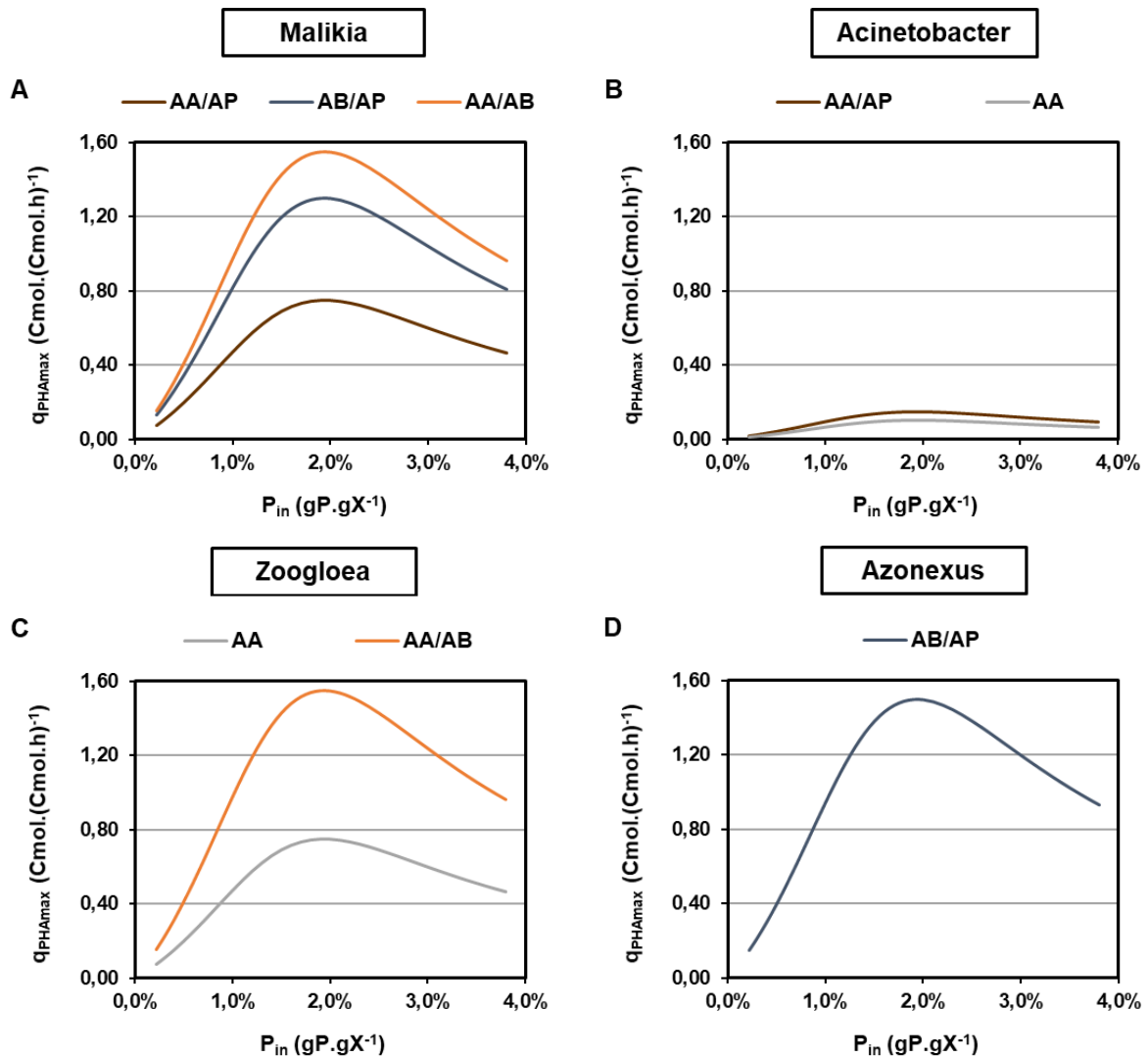
- 75% *Acinetobacter* + 25% Autres :  $q_{\text{PHAmax}} = 0,13 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$
- 50% *Acinetobacter* + 30% *Malikia* + 20% Autres :  $q_{\text{PHAmax}} = 0,20 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$
- 25% *Acinetobacter* + 50% *Malikia* + 25% Autres :  $q_{\text{PHAmax}} = 0,42 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$
- Autres :  $q_{\text{PHAmax}} = 0,03 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$

Comme Cavaillé (2015), il a été fait l'hypothèse que les populations minoritaires, regroupées sous la mention « autres », sont non productrices ou faiblement productrices de PHA. Pour cette raison, le  $q_{\text{PHAmax}}$  a été fixé à une valeur quasi nulle.

La résolution du système donne :

- ***Acinetobacter*** :  $q_{\text{PHAmax}} = \mathbf{0,15} \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$
- ***Malikia*** :  $q_{\text{PHAmax}} = \mathbf{0,75} \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$

L'ensemble des estimations réalisées pour chaque genre microbien et la nature source de carbone associée est présenté sur la Figure 62. Les paramètres cinétiques déterminés sont compilés en Annexe E.



**Figure 62.** Estimation de l'évolution de la vitesse spécifique maximale de production de PHA ( $q_{PHAmax}$ ) en fonction du taux de phosphore intracellulaire ( $P_{in}$ ) en réacteur batch, selon la nature de la source de carbone pour *Malikia* (A), *Acinetobacter* (B), *Zoogloea* (C) et *Azonexus* (D).

L'estimation des  $q_{PHAmax}$  spécifiques des différents genres bactériens met encore davantage en évidence la distinction qui a été évoquée entre *Acinetobacter* et les autres populations majoritaires, du point de vue des capacités de stockage de PHA. Quel que soit le substrat carboné utilisé, *Acinetobacter* peut être considérée comme un producteur médiocre, avec un  $q_{PHAmax}$  qui n'excède jamais  $0,15 Cmol.(Cmol.h)^{-1}$ . Au contraire, les genres microbiens *Malikia* et *Zoogloea* (ainsi qu'*Azonexus*) peuvent être unanimement considérées comme surproducteurs, au vu de  $q_{PHAmax}$  pouvant atteindre  $1,60 Cmol.(Cmol.h)^{-1}$ . A titre de précision, les cinétiques d'accumulation de PHA affiliées au genre *Azonexus* ont été déterminées à partir des résultats obtenus dans l'étage de production du réacteur bi-étage (chapitre 4).

Par ailleurs, la diminution des vitesses spécifiques de production de PHA relevée lorsque du propionate est inclut dans le flux d'alimentation, et mise en évidence dans la partie précédente, semble être à nuancer. En effet, pour une population donnée, les différences entre les cinétiques obtenues avec un mélange intégrant

du propionate et avec les substrats de référence (acétate et acétate/butyrate) sont ici nettement atténuées. En s'attardant sur le cas de *Malikia*, il est possible de constater que combiner le butyrate avec du propionate ou de l'acétate conduit à des  $q_{\text{PHAmax}}$  significativement plus proches que ceux réellement définis. De la même façon, le  $q_{\text{PHAmax}}$  de *Malikia* avec une alimentation en acétate/propionate est équivalent à celui de *Zoogloea* sur acétate. Par conséquent, les écarts établis lors de la détermination des  $q_{\text{PHAmax}}$  des consortia sélectionnés paraissent davantage dus à des disparités au niveau de la composition microbiologique qu'au catabolisme du propionate. Plus précisément, la présence de propionate semble induire une diversité microbienne plus importante, du moins une dominance moins marquée d'une unique population surproductrice de PHA. Par exemple, en alimentant avec un mélange butyrate/propionate, l'abondance relative de *Malikia* est restreinte à 62%, tandis qu'elle s'élève à plus de 95% avec le mélange acétate/butyrate. Pareillement, l'émergence de *Malikia* avec l'augmentation du  $(\text{C/P})_{\text{app}}$  lors des campagnes opérées sur acétate/propionate se limite à 57%, avec une implantation encore importante d'*Acinetobacter* (25%).

Enfin, il convient de relever que quel que soit le substrat utilisé ou le microorganisme considéré, les vitesses spécifiques maximales de production de PHA restent inférieures à celles qui peuvent être obtenues avec le procédé d'enrichissement ADF. En sélectionnant majoritairement *Plasticicumulans acidivorans*, Jiang et al., (2012) ont, par exemple, relevé un  $q_{\text{PHA}}$  d'une valeur de  $2,77 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$  lors de la phase d'accumulation de PHA en réacteur fed-batch. Cette différence réside assurément dans le mode d'enrichissement. Lors du procédé de « feast and famine », le principe de sélection est fondé sur la capacité des bactéries à stocker le carbone sous forme de PHA. Il existe un lien direct entre la méthode de sélection et la fonction « production de PHA ». De surcroît, parmi les bactéries productrices de PHA, celles qui possèdent les vitesses spécifiques d'assimilation du carbone les plus élevées ont un avantage concurrentiel, dans le sens où elles métabolisent plus rapidement le carbone pendant les phases de festin, leur permettant ainsi de remporter la compétition microbienne. Il s'agit donc d'un procédé de sélection basé sur le  $q_s$  et, par extension, sur le  $q_{\text{PHA}}$ . La stratégie d'enrichissement en culture continue en conditions de limitation C&P repose, quant à elle, en grande partie sur l'affinité des microorganismes pour le phosphore. Dans ces conditions, la compétition entre les bactéries est alors essentiellement gouvernée par le  $K_s$  et non directement sur les capacités de stockage de PHA.

## **IV. Conclusion**

L'évaluation des cinétiques d'accumulation de PHA en réacteur batch a permis de déterminer l'influence de la nature de la source de carbone sur les potentialités de production de PHA.

En premier lieu, le substrat sur lequel est réalisé l'enrichissement microbien régit les capacités d'assimilation des substrats pendant la phase de production. En effet, il a été démontré qu'en raison de l'effet mémoire, il

est nécessaire d'intégrer le propionate dès l'étape de sélection pour qu'il puisse être consommé rapidement lors de l'accumulation de PHA. Durant la phase de production, la nature de la source de carbone conditionne l'efficacité de conversion du carbone et les cinétiques de stockage de PHA. De manière générale, le butyrate se définit comme le substrat préférentiel, pour lequel sont associés les cinétiques de consommation les plus élevées et les meilleurs rendements de production. A l'inverse, le propionate est le substrat qui induit le plus de réactions de maintenance. De plus, il a été mis en exergue qu'il est préférable de combiner le propionate à un autre acide pour maximiser les cinétiques d'accumulation, étant donné que les vitesses spécifiques de consommation des substrats carbonés sont supérieures en alimentant avec un cosubstrat à celles observées avec un substrat unique. Deux approches (microbiologique et métabolique) ont été suggérées pour justifier ces observations.

En outre, la comparaison des vitesses spécifiques maximales d'accumulation de PHA déterminées avec des mélanges intégrant du propionate avec celles obtenues par Cavaillé (2015) avec acétate ou acétate/butyrate a permis d'évaluer précisément l'influence respective de chacun des paramètres opératoires (substrat utilisé, teneur intracellulaire en P et composition du consortium microbien) sur les potentialités d'accumulation de PHA.

Il a été mis en évidence une divergence des capacités d'accumulation selon le genre microbien dominant : *Acinetobacter*, un producteur médiocre, se distingue des populations *Malikia* ou *Zoogloea*, qui peuvent être qualifiées de surproductrices. Néanmoins, les potentialités de production de PHA ne se résument à l'identité de la population majoritaire. Le  $P_{in}$ , qui définit l'état physiologique des cellules, joue un rôle déterminant. Il a été fait l'hypothèse que l'effet du  $P_{in}$  sur le  $q_{PHA}$  était conservé quel que soit la population microbienne ou le substrat utilisé. La relation entre le  $P_{in}$  et le  $q_{PHA}$  peut être modélisée par une fonction d'Haldane, qui rend compte de l'existence d'un  $P_{in}$  optimal d'une valeur de  $1,8 \text{ gP.gXc}^{-1}$ . Dans ces conditions, il a été mis en avant que les taux de réaction obtenus avec le propionate sont inférieures à ceux lorsqu'il est absent du mélange. En prenant en considération les différences liées au degré de dominance des populations majoritaires, il a été possible d'évaluer strictement l'impact de la source de carbone sur les cinétiques de production de PHA. Il a pu être établi que la diminution du  $q_{PHA}$  avec l'intégration de propionate dans le mélange carboné n'est pas seulement liée au catabolisme propre du propionate, mais relève également de disparités au niveau de la composition microbiologique. En effet, le propionate génère une plus grande diversité microbienne, avec une dominance moins marquée d'une unique population surproductrice de PHA.

Dans des travaux ultérieurs, il pourrait être intéressant de déterminer quelle devrait être la fraction minimale de propionate dans le mélange carboné en entrée du réacteur de sélection pour qu'il puisse être consommé rapidement lors de la production. De plus, les résultats obtenus encouragent à poursuivre les investigations sur le propionate pour mieux comprendre son métabolisme et son rôle sur la diversité microbienne.





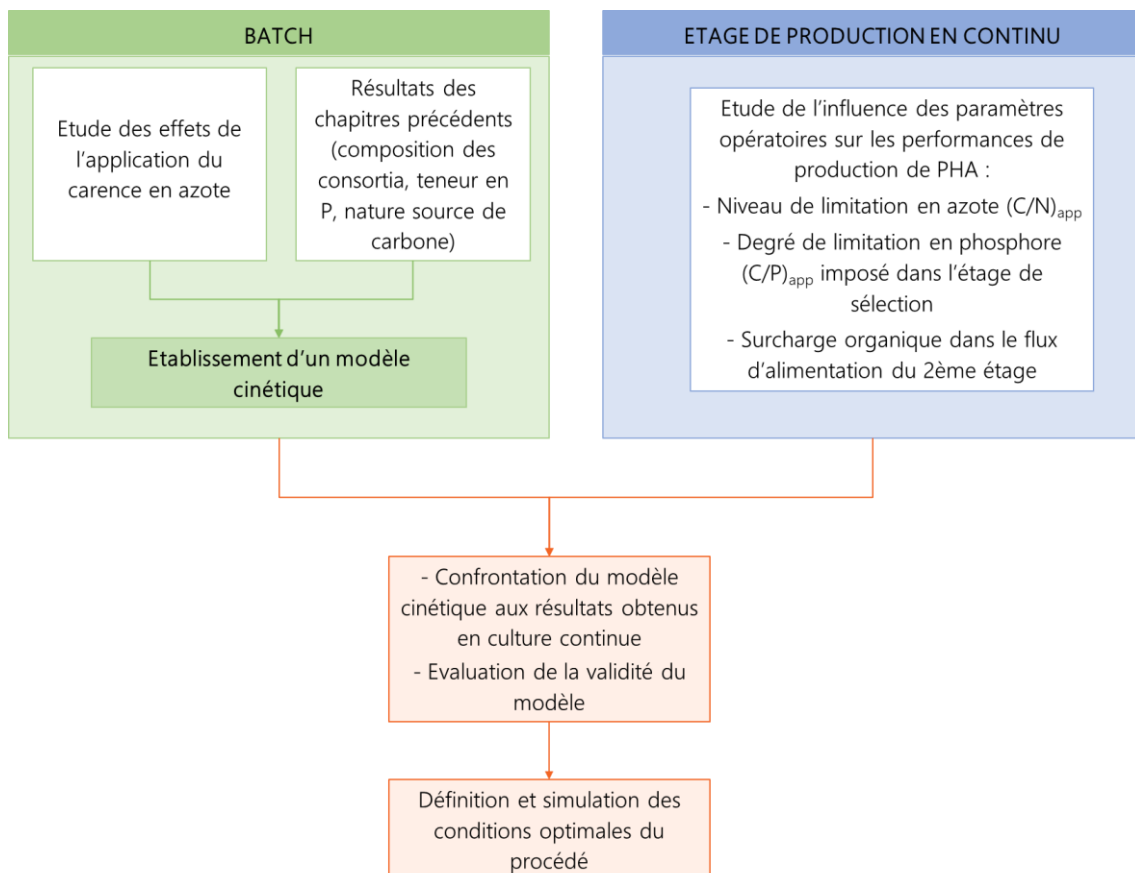
**CHAPITRE IV. INFLUENCE DU TYPE DE LIMITATION  
NUTRITIONNELLE SUR LES PERFORMANCES DE  
PRODUCTION DE PHA**

---



## I. Introduction

Jusqu'à présent, l'étude du réacteur bi-étagé s'est essentiellement concentrée sur la phase de sélection et, l'influence des paramètres opératoires sur les potentialités d'accumulation de PHA des consortia microbiens sélectionnés. Ce chapitre se focalise davantage sur l'étagé de production et l'optimisation des performances d'accumulation de PHA. Plus précisément, l'objectif est de définir les effets de l'application d'une limitation ou carence en azote, en plus de la carence en phosphore, sur les cinétiques et les rendements de production de PHA, d'abord en réacteur batch, puis en culture continue. De façon à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, les valeurs expérimentales seront couplées à la modélisation et confrontées au modèle cinétique précédemment établi par Cavaillé (2015), permettant de statuer sur sa validité avec des mélanges intégrant du propionate. De surcroît, les résultats obtenus seront utilisés pour étoffer le modèle existant et y intégrer l'influence d'une carence en azote sur les processus de croissance microbienne, d'accumulation de PHA et de maintenance cellulaire. Après s'être assuré des capacités prédictives sur les différents modes de culture, le modèle sera enfin exploité pour balayer une large gamme de conditions non testées expérimentalement et déterminer ainsi les paramètres optimaux du procédé continu bi-étagé. La Figure 63 présente le plan du chapitre et les enjeux associés.



**Figure 63.** Organisation et enjeux du chapitre.

## **II. Analyse des cinétiques selon la carence nutritionnelle**

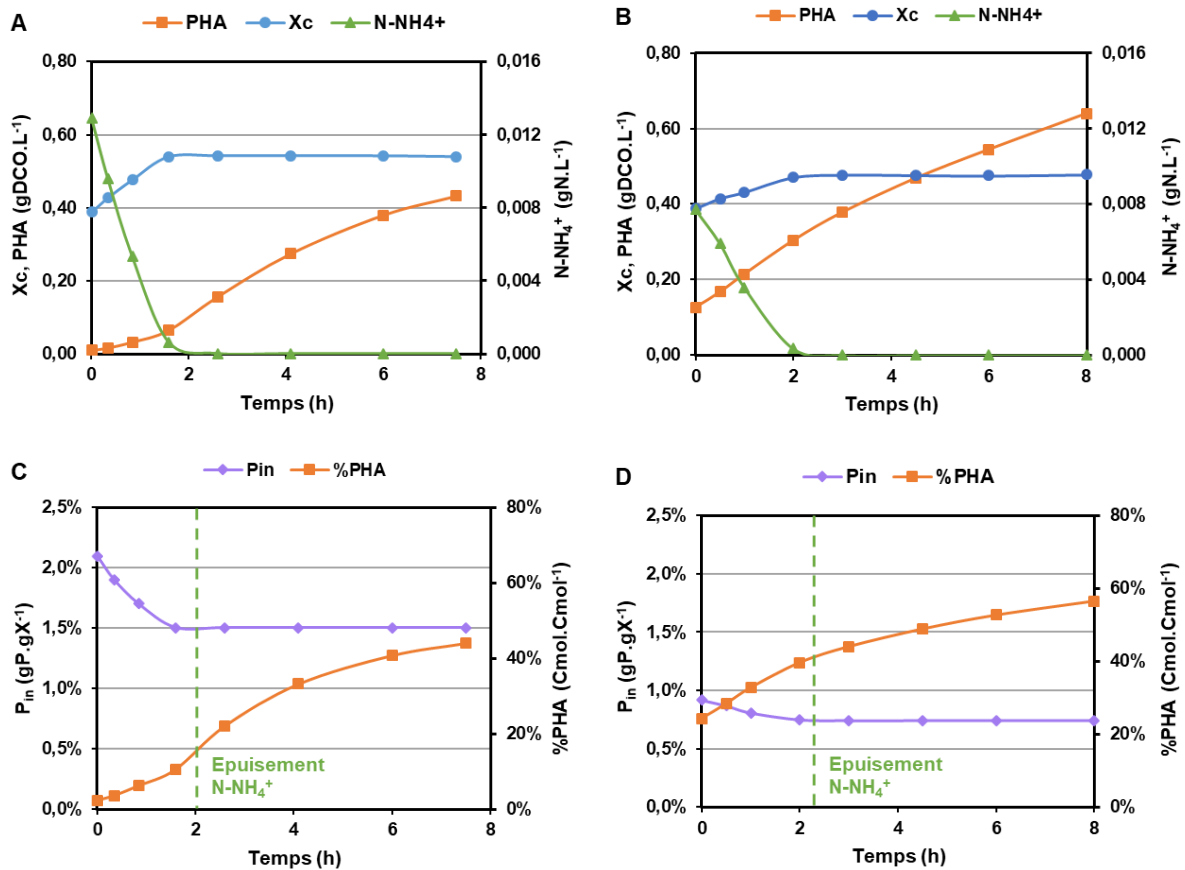
### **II. 1. Effets d'une carence en azote**

L'évaluation des potentialités de production de PHA en conditions de carence en phosphore a mis en avant, dans le cas d'*Acinetobacter*, une utilisation préférentielle des substrats pour la croissance cellulaire et non la production de PHA. Pour limiter le potentiel de croissance et contraindre les cellules à réorienter le carbone vers le stockage PHA, il a été décidé d'investiguer l'application d'une carence nutritionnelle supplémentaire, à savoir une carence en azote. A titre de précision, la carence en azote n'a jamais été imposée dès le début des cultures batch pour plusieurs raisons. Premièrement, une phase de carence unique en phosphore était souhaitée de manière à pouvoir déterminer les vitesses spécifiques maximales d'accumulation de PHA dans les mêmes conditions que Cavailé (2015). De plus, la présence d'azote après l'inoculation des réacteurs avec les cultures issues de la phase d'enrichissement était de toute façon inévitable. En effet, la concentration en azote dans le flux d'alimentation de l'étage de sélection était fixée de manière à ce que la quantité résiduelle d'azote dans le milieu de culture ne soit jamais nulle et éviter une limitation en azote qui aurait pu modifier les dynamiques de compétition microbienne. Néanmoins, des ajustements avaient fréquemment lieu pour limiter la quantité d'azote en sortie du 1<sup>er</sup> étage pour pouvoir ainsi réguler au mieux la concentration initiale dans les batch (ou en entrée des étages de production). Pour deux batch inoculés avec le même consortium microbien, il a été ajouté pour l'un des batch une quantité supplémentaire d'azote pour retarder l'entrée en phase de carence. Dès lors, en batch, il convient de discriminer deux périodes : une période d'excès d'azote, jusqu'à l'épuisement de l'azote assimilable du milieu de culture, et une période de carence, caractérisée par l'absence totale d'azote dans le surnageant de culture. En revanche, en culture continue, il n'est pas possible de réaliser pareille distinction, mais simplement de considérer une seule phase de limitation dont l'intensité dépend du ratio C/N en entrée de l'étage de production.

La Figure 64 reprend les cinétiques des batch A2a (A) et A2f (B) déjà présentées dans le chapitre précédent, en y intégrant l'évolution de la concentration en azote soluble. Pour rappel, les deux batch ont été alimentés avec un mélange acétate/propionate. Le batch A2a correspond à une culture sélectionnée à un  $(C/P)_{app}$  de  $150 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  (et donc un  $P_{in}$  initial de  $1,9\% \text{ gP.gXc}^{-1}$ ) avec une nette dominance d'*Acinetobacter* (78%). A l'inverse, le batch A2f est inoculé avec une population sélectionnée à un ratio C/P de  $325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  (soit un  $P_{in}$  initial de  $1,9\% \text{ gP.gXc}^{-1}$ ), pour lequel *Malikia* est majoritaire (57%).

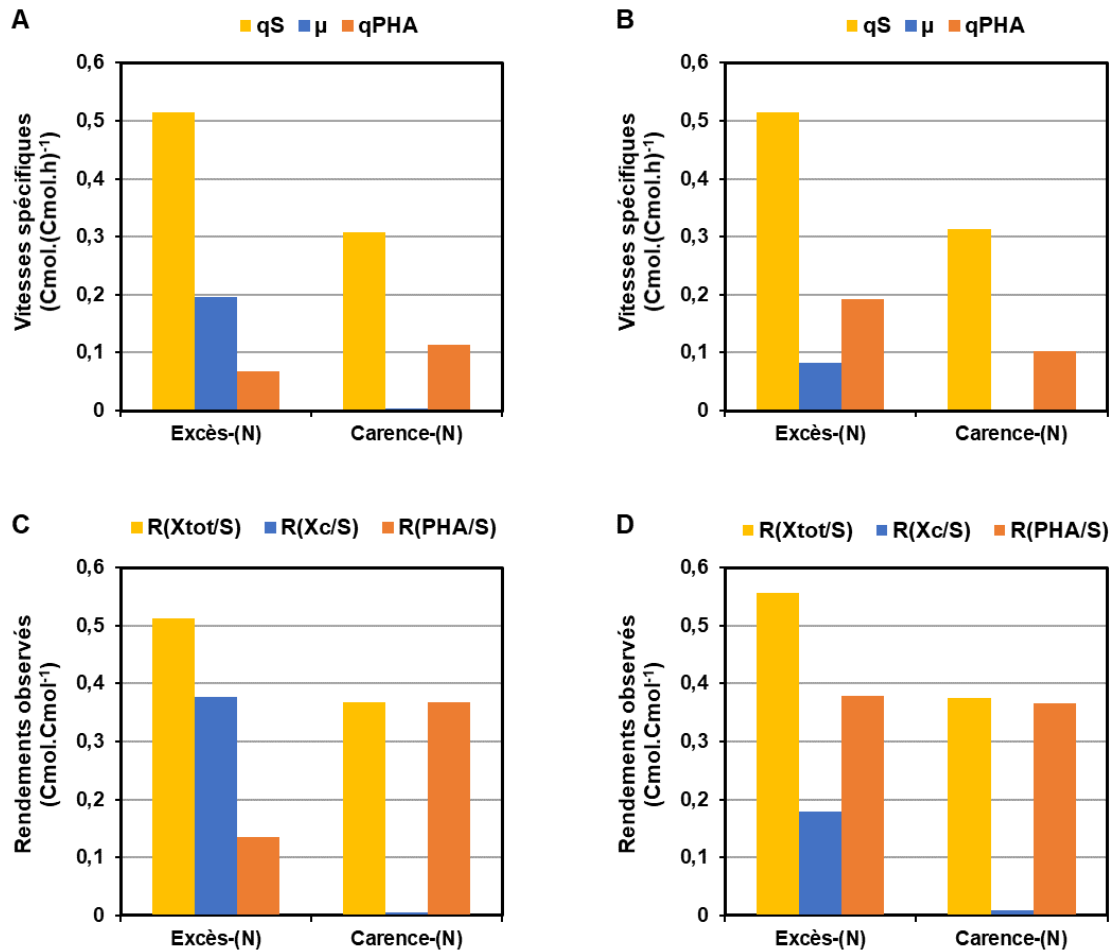
Quel que soit le  $P_{in}$  initial ou la population dominante, la concentration en  $X_c$  augmente jusqu'à l'épuisement de la source d'azote. La carence en phosphore ne suffit pas, à elle-seule, à totalement endiguer la croissance cellulaire. Cette observation témoigne de la formidable capacité des microorganismes sélectionnés à diluer leur phosphore intracellulaire pour maintenir leur croissance. En revanche, l'entrée en phase de carence en azote signe l'arrêt complet de la croissance, indifféremment de la culture. La plasticité des populations vis-

à-vis de l'azote semble être nulle, puisque la teneur en azote dans les cellules est restée relativement stable (et égale à 11%). A la différence à ce qui a été ici observé, Aragao (1996) a rapporté un changement dans la composition élémentaire de souches *Alcaligenes eutrophus* durant une culture carencée en azote, avec une diminution de la teneur en N de 0,14 (avant la carence) à 0,08 gN.gX<sup>-1</sup> en fin de culture. Contrairement au phosphore, l'azote est faiblement transférable d'un composant cellulaire à un autre. Élément constitutif des protéines, il est indispensable à la synthèse protéique et par extension, à la croissance des cellules (Bren et al., 2013).



**Figure 64.** Evolution des concentrations en cellules catalytiques (Xc), PHA et azote ammoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en fonction du temps au cours du batch A2a (A) et A2f (B) ; Evolution du taux intracellulaire en phosphore (P<sub>in</sub>) et de la teneur en PHA au cours du batch A2a (C) et A2f (D).

Au sujet de l'accumulation de PHA, la carence en N a eu des effets hétérogènes selon le batch. Concernant le batch A2a, la production de PHA s'accélère de manière significative après l'entrée en carence, alors même que le P<sub>in</sub> (1,5 gP.gX<sup>-1</sup>) est relativement proche du P<sub>in</sub> considéré comme optimal en termes de cinétiques de production de PHA. A l'inverse, dans le cas du batch A2f, la courbe de concentration en PHA fait apparaître une inflexion au moment de l'épuisement de l'azote, et ce alors que le P<sub>in</sub> a déjà atteint une très faible valeur (0,7 gP.gX<sup>-1</sup>). Pour les deux batch, la vitesse spécifique de production de PHA est maintenue quasi constante pendant la totalité de la phase de carence en azote.



**Figure 65.** Vitesses spécifiques moyennes de consommation du substrat carboné ( $q_S$ ), de croissance cellulaire ( $\mu$ ) et de production de PHA ( $q_{PHA}$ ) durant les phases d'excès et de carence en azote pour les batch A2a (inoculé avec un consortium composé à 78% par *Acinetobacter*) (A) et A2f (inoculé avec un consortium composé à 57% par *Malikia*) (B). Rendements observés moyens en biomasse totale ( $R_{(X_{tot}/S)}$ ), cellules catalytiques ( $R_{(X_c/S)}$ ) et PHA ( $R_{(PHA/S)}$ ) durant les phases d'excès et de carence en azote pour les batch A2a (C) et A2f (D).

De manière à cerner précisément les effets de la carence en azote, les vitesses spécifiques et les rendements observés moyens lors des phases respectives d'excès et de carence en N pour chacune des cultures étudiées sont présentés sur la Figure 65. Pour la culture conduite avec *Acinetobacter*, le  $q_{PHA}$  moyen est près de trois fois supérieur en conditions de carence. Cette dernière entraîne ainsi une redirection du carbone consommé depuis la croissance cellulaire vers le stockage de PHA. Au contraire, pour le batch opéré avec un consortium dominé par *Malikia*, le  $q_{PHA}$  moyen est réduit de moitié. Dans ce cas de figure, la carence limite les capacités d'accumulation de PHA. La comparaison des vitesses spécifiques de production de PHA pendant la période de carence en N pour les deux cultures permet de constater qu'elles sont équivalentes. La carence en azote tend donc à uniformiser les cinétiques de production de PHA. La littérature n'est pas parvenue à établir de consensus quant à l'influence de la carence en azote sur l'accumulation. Certaines études mentionnent des effets bénéfiques. C'est le cas de Wen et al., (2010) qui ont constaté que l'accumulation de PHA augmentait significativement en conditions de carence en N par rapport à une carence en P, un constat plus récemment

partagé par Montiel-Jarillo et al., (2017). Dans la même idée, Johnson et al., (2010) ont signalé que la carence en N semblait être la meilleure stratégie pour maximiser la production de PHB. A contrario, des études telles que celles de Rhu et al., (2003) et Venkateswar Reddy and Venkata Mohan (2012) ont révélé que le stockage de PHA était plus élevé en conditions de carence en P qu'en carence en N. Du et al., (2001) ont ajouté que la limitation en azote stimulait la synthèse de PHB mais qu'une carence totale provoquait une perte d'activité microbienne considérable et néfaste pour l'accumulation du polymère. Peu d'auteurs se sont intéressés à l'imposition simultanée d'une carence en N et P. Tu et al., (2019) ont relevé qu'une restriction supplémentaire en azote ne conduit pas à une amélioration de l'accumulation de PHA au regard d'une limitation stricte en phosphore. De même, il a été relaté par Valentino et al., (2015) que la teneur en PHA obtenue en combinant les limitations N et P était inférieure à celle observée avec une limitation individuelle en N ou P.

Par ailleurs, quel que le soit le batch, la carence en azote a induit une nette réduction de la vitesse spécifique de consommation des substrats en raison de la diminution de l'activité cellulaire. Cette tendance a déjà été reportée par Bengtsson et al., (2008) qui ont relevé que la vitesse spécifique de consommation de l'acétate était d'autant plus élevée que la limitation en N était faible. Enfin, l'analyse des rendements observés révèle que les rendements en biomasse totale sont significativement plus faibles lors de la phase carence en azote comparativement à la période d'excès, en d'autres termes qu'une plus large fraction du carbone consommé est sollicitée pour la maintenance cellulaire. La redirection du substrat vers les réactions de maintenance en conditions de double carence nutritionnelle a également été constatée par Montiel-Jarillo et al., (2017).

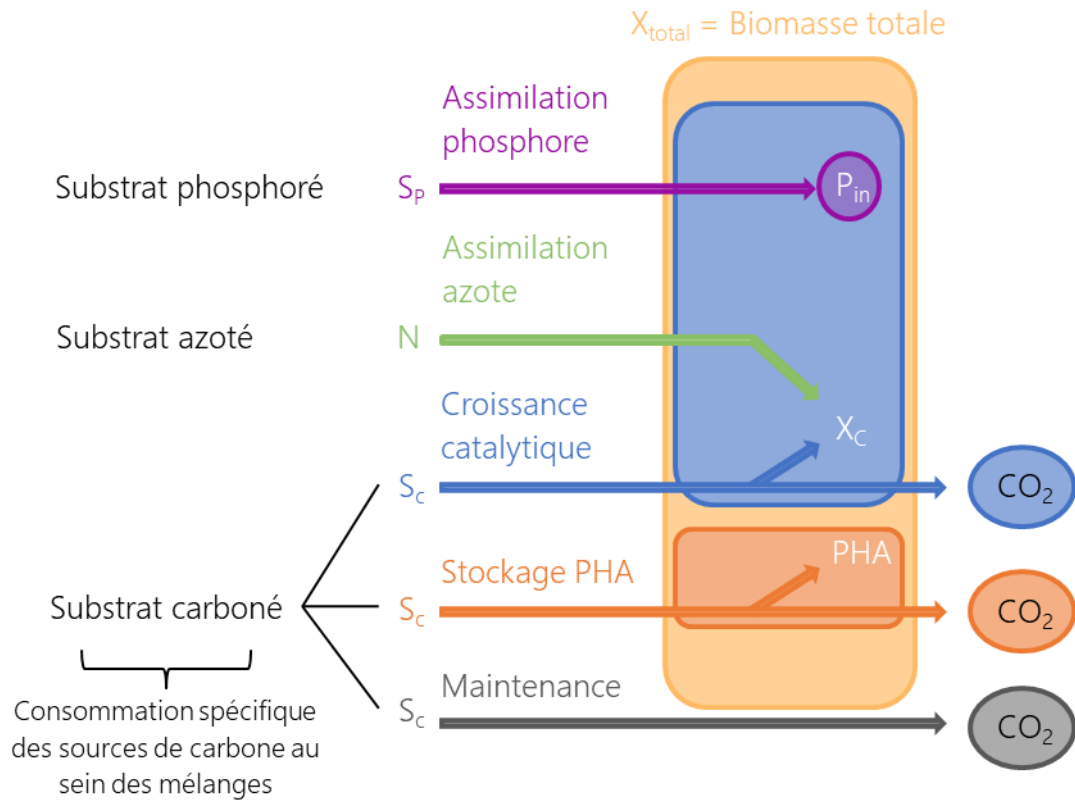
## II. 2. Compléments au modèle cinétique

Cette section vise à déterminer les lois cinétiques qui régissent les comportements cellulaires selon la teneur intracellulaire en phosphore, l'application d'une carence en azote et l'identité du genre microbien dominant. L'objectif est de représenter les tendances dressées par les valeurs expérimentales par un modèle cinétique. Plus exactement, il s'agit de définir les cinétiques de stockage de PHA (1), de croissance microbienne (2), de maintenance (3) et de consommation spécifique en propionate (4). Pour les différents processus cellulaires, les phases d'excès et de carence en N seront traitées séparément. La Figure 66 représente les différents flux considérés dans le modèle.

Dès lors, cette partie cherche à répondre à deux grandes questions :

- En conditions d'excès de N, le modèle développé par Cavaillé (2015) peut-il être appliqué avec un substrat incluant du propionate ?
- Quelles sont les répercussions de la carence en azote sur les cinétiques des différents processus cellulaires ?





**Figure 66.** Ensemble des flux considérés dans le modèle cinétique.

Les données expérimentales considérées sont les vitesses cinétiques moyennes, comme présentées dans la partie précédente. Chaque point expérimental désigne le résultat d'un batch, pour lequel deux valeurs ont été définies, une en conditions d'excès de N, et une autre pendant la phase de carence. Deux batch inoculés avec des consortia possédant un  $P_{in}$  initial équivalent (car sélectionné avec le même ratio C/P) peuvent être, toutefois, indiqués par un  $P_{in}$  différent, dont la valeur dépend alors de la concentration initiale en azote (qui conditionne le potentiel de croissance et ainsi la dilution du  $P_{in}$  pendant la phase d'excès de N). Les résultats ici présentés sont ceux obtenus avec le substrat acétate/propionate, mais les tendances identifiées sont les mêmes avec le mélange butyrate/propionate.

### **II. 2. a. Processus de production de PHA**

Comme évoqué dans le chapitre précédent, en l'absence de carence en azote, la vitesse de production de PHA ( $r_{PHA}$ ) est dictée par le  $P_{in}$  selon une équation d'Haldane. L'équation prend également en considération la concentration en substrat carboné ( $S_c$ ), l'inhibition par le phosphore extracellulaire ( $S_p$ ) et le phénomène d'encombrement stérique lié à l'accumulation de PHA au sein des cellules. Un terme de Monod impliquant la concentration en azote a été ajouté pour spécifier que cette écriture de  $r_{PHA}$  n'est valable qu'en conditions d'excès de N. Le coefficient d'affinité pour l'azote ( $K_N$ ) a été fixé à une très faible valeur, dans la mesure où

aucune diminution de la vitesse d'accumulation de PHA n'a été détectée préalablement à l'épuisement de l'azote lors des expériences en batch. L'écriture complète de l'équation de vitesse s'écrit alors :

$$r_{PHA} = q_{PHAMax} \times \frac{S_c}{S_c + K_c} \times \frac{K_{PHA}}{K_{PHA} + S_P} \times \frac{N}{N + K_N} \times \frac{P_{in}}{K_{P_{in}} + \alpha P_{in} + \frac{P_{in}^2}{K_{I_{P_{in}}}}} \times \left(1 - \left(\frac{PHA_{in}}{PHA_{in\_max}}\right)^n\right) \times X_c \quad (14)$$

$$\text{tel que } \alpha = 1 - 2 \times \sqrt{\frac{K_{P_{in}}}{K_{I_{P_{in}}}}$$

avec  $K_{P_{in}} = 0,025 \text{ gP.gXc}^{-1}$  et  $K_{I_{P_{in}}} = 0,015 \text{ gP.gXc}^{-1}$

$$K_N = 0,01 \text{ Nmmol.L}^{-1}$$

$$K_C = 0,1 \text{ Cmmol.L}^{-1}$$

$$n = 3$$

La constante d'affinité pour le carbone ( $K_C$ ) a été fixée à une unique valeur, sans distinction du substrat ou de la population considérée. En revanche, les vitesses spécifiques maximales de production de PHA ( $q_{PHAMax}$ ) et les teneurs maximales en PHA ( $PHA_{in\_max}$ ) ont été déterminées selon la nature de la source de carbone et la composition du consortium microbien, comme indiqué dans le chapitre 3, et ont été compilées en Annexe E.

L'analyse de l'impact de la carence en N a mis en avant qu'en conditions de carence, les vitesses spécifiques de production de PHA présentent une relative homogénéité, quel que soit le  $P_{in}$  ou le microorganisme pris en compte. Dès lors, la relation entre le  $q_{PHA}$  et le  $P_{in}$  peut être désignée, non plus par une fonction d'Haldane par une équation de Monod, avec une constante cinétique  $K_{P_{in}}$  de faible valeur. Afin de spécifier le fait que cette équation ne s'applique qu'en conditions de carence en azote, un terme de dépendance vis-à-vis de la concentration N a été inséré. L'expression de la vitesse de production de PHA ( $r_{PHA}$ ) devient :

$$r_{PHA} = q_{PHAMax} \times \frac{S_c}{S_c + K_c} \times \frac{K_{PHA}}{K_{PHA} + S_P} \times \left(1 - \left(\frac{N}{N + K_N}\right)\right) \times \frac{P_{in}}{K_{P_{in}} + P_{in}} \times \left(1 - \left(\frac{PHA_{in}}{PHA_{in\_max}}\right)^n\right) \times X_c \quad (15)$$

avec  $K_{P_{in}} = 0,002 \text{ gP.gXc}^{-1}$

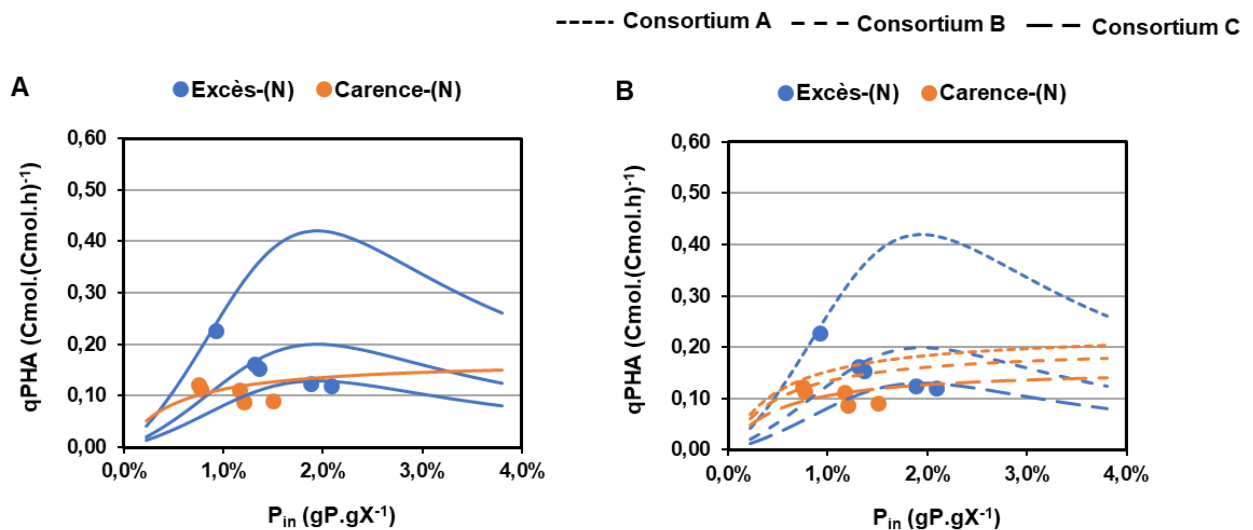
La relation entre la vitesse spécifique d'accumulation de PHA et la teneur intracellulaire en phosphore, selon l'application (ou non) d'une carence en azote, est représentée sur la Figure 67. Pour la modélisation du  $q_{PHA}$  en conditions de carence en N, deux approches peuvent être envisagées :

- $q_{PHAMax}$  unique et commun à tous les microorganismes d'une valeur de  $0,18 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$  (Figure 67A)
- $q_{PHAMax}$  différencié et fonction de la composition du consortium (Figure 67B), qui tient compte d'une légère augmentation de la capacité d'accumulation de PHA avec l'augmentation de la proportion du genre *Malikia* aux dépens de celle du genre *Acinetobacter*. Dans ce cas de figure, la valeur du  $q_{PHAMax}$  a été respectivement estimée à :

- 0,23 Cmol.(Cmol.h)<sup>-1</sup> pour le consortium A, qui désigne celui sélectionné à 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>
- 0,20 Cmol.(Cmol.h)<sup>-1</sup> pour le consortium B, sélectionné à 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>
- 0,16 Cmol.(Cmol.h)<sup>-1</sup> pour le consortium C, sélectionné à 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>

(A noter qu'il aurait été préférable d'avoir davantage de points expérimentaux pour balayer l'ensemble des zones de limitations en N).

Il convient de préciser que les valeurs modélisées lors d'une carence en azote apparaissent supérieures aux valeurs expérimentales dans la mesure où l'évaluation des  $q_{\text{PHA}}$  expérimentaux n'a pu être réalisée qu'après une phase préalable d'excès d'azote au cours de laquelle les microorganismes avaient déjà stocké des PHA (induisant un ralentissement de l'accumulation de PHA lié à l'encombrement stérique). La comparaison des vitesses spécifiques de production de PHA respectives en conditions d'excès et de carence en azote permet de constater que l'impact de la carence sur les cinétiques d'accumulation est largement lié à la composition des consortia microbiens. Par exemple, pour le consortium C, presque exclusivement constitué de bactéries appartenant au genre *Acinetobacter*, le  $q_{\text{PHA}}$  est constamment plus élevé avec une carence en N. A l'inverse, pour le consortium A, majoritairement composé de microorganismes du genre *Malikia*, les potentialités de production sont nettement supérieures en l'absence de carence.

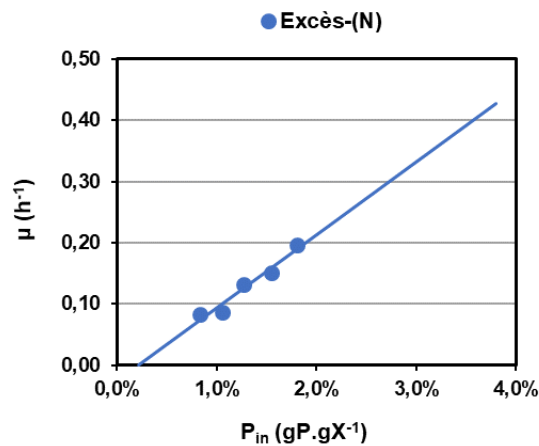


**Figure 67.** Relation entre la vitesse spécifique de production de PHA ( $q_{\text{PHA}}$ ) et la teneur intracellulaire en phosphore ( $P_{\text{in}}$ ) établie par une fonction de Monod à partir des résultats obtenus avec acétate/propionate en conditions de carence en azote (A). Relation entre le  $q_{\text{PHA}}$  et le  $P_{\text{in}}$  individualisée pour chaque consortium sélectionnée (B). Consortium A : sélectionné à 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> ; Consortium B : sélectionné à 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> ; Consortium C : sélectionné à 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>.

### II. 2. b. Processus de croissance cellulaire

Parmi les modèles déjà existants, Cavailé (2015) avait opté pour un modèle linéaire pour décrire la limitation de la vitesse de croissance cellulaire ( $r_x$ ) par le  $P_{\text{in}}$ . Malgré l'utilisation de nouveaux substrats, le choix de ce

type de représentation se justifie ici également (Figure 68). De plus, la linéarité est maintenue en dépit des variations de composition des consortia microbiens, mettant en évidence une relative conservation du taux de croissance spécifique maximal ( $\mu_{max}$ ). Il est donc possible de considérer un  $\mu_{max}$  unique pour l'ensemble des populations. Néanmoins, de manière à s'accorder avec les dynamiques identifiées lors de l'étude de la compétition microbienne, il a alors été choisi d'appliquer de faibles distinctions, en ayant recours à la même méthodologie que celle utilisée pour déterminer les  $q_{PHAm_{max}}$  spécifiques de chaque genre bactérien (chapitre 3, partie III. 1. c). Les taux de croissance spécifique maximal des populations majoritaires selon la source de carbone sont détaillés en annexe E.



**Figure 68.** Relation entre le taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) et la teneur intracellulaire en phosphore ( $P_{in}$ ) établie par une fonction linéaire à partir des résultats obtenus avec une alimentation en acétate/propionate.

La croissance étant totalement inhibée en conditions de carence en azote, un terme de Monod a été ajouté dans l'équation de vitesse. La vitesse de croissance cellulaire s'exprime ainsi comme suit :

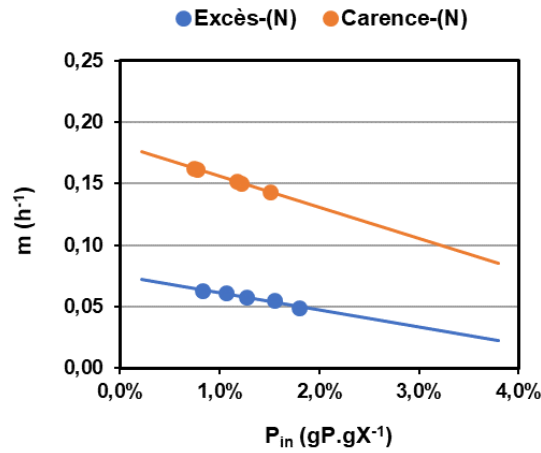
$$r_X = \mu_{max} \times \frac{S_c}{S_c + K_c} \times \frac{N}{N + K_N} \times \frac{P_{in} - P_{in\_crit}}{P_{in\_exp} - P_{in\_crit}} \times X_c \quad (16)$$

avec  $P_{in\_crit} = 0,002 \text{ gP.gXc}^{-1}$  ( $P_{in\_min}$  lorsque  $\mu = 0$ )

$P_{in\_exp} = 0,038 \text{ gP.gXc}^{-1}$  ( $P_{in}$  lorsque  $\mu = \mu_{max}$ )

### II. 2. c. Processus de maintenance cellulaire

Les expériences en chemostat ou en batch ont révélé une augmentation du coefficient de maintenance ( $m$ ) avec la diminution de la teneur intracellulaire en phosphore : la dissipation d'énergie est d'autant plus élevée que la cellule est limitée en phosphore. Par ailleurs, à une valeur de  $P_{in}$  donnée, il a également été démontré que la maintenance était nettement supérieure en conditions de carence en azote qu'elle ne l'était avec un excès de N. La Figure 69 présente alors l'évolution de  $m$  en fonction du  $P_{in}$ , selon la concentration résiduelle en azote.



**Figure 69.** Relation entre le coefficient de maintenance ( $m$ ) et la teneur intracellulaire en phosphore ( $P_{in}$ ) établie par une fonction linéaire à partir des résultats obtenus avec une alimentation en acétate/propionate, en conditions d'excès et de carence en azote.

Que ce soit en conditions d'excès ou de carence en azote, la relation entre le coefficient de maintenance et le  $P_{in}$  peut être caractérisée par un modèle linéaire. Néanmoins, l'expression de cette relation a été dissociée en fonction de la carence ou non en N. En effet, avec un excès d'azote, la formule qui a été considérée est celle établie par Cavallé (2015) et fait intervenir le terme de  $P_{in\_max}$  (présenté en bibliographie), qui varie en fonction du taux de croissance spécifique ( $\mu$ ). Elle prend compte du fait qu'à une valeur de  $P_{in}$  donnée, plus  $\mu$  tend vers  $\mu_{max}$ , plus la maintenance est faible. Dans ces conditions, la vitesse de consommation du substrat carboné liée aux réactions de maintenance s'écrit :

$$r_m = m_{\min(N)} \times \frac{S_c}{S_c + \varepsilon} \times \frac{N}{N + K_N} \times \left(1 + \sigma(P_{in\_max} - P_{in})\right) \times X_c \quad (17)$$

avec  $m_{\min(N)} = 0,023 \text{ h}^{-1}$

$\varepsilon = 1.10^{-16} \text{ Cmmol.L}^{-1}$  (limitation par le substrat carboné)

$\sigma = 280$  (facteur d'amplification)

Lors d'une carence en N, la croissance est nulle, ce qui empêche de raisonner selon le  $P_{in\_max}$ . Dès lors, il est préférable d'utiliser l'équation de Thingstad (1987) qui ne renvoie qu'aux termes de  $P_{in\_exp}$  et  $P_{in\_crit}$ , tous deux indépendants du taux de croissance spécifique :

$$r_m = m_{\min\_no(N)} \times \frac{S_c}{S_c + \varepsilon} \times 1 - \left(\frac{N}{N + K_N}\right) \times \left(1 + \left(\lambda \frac{P_{in\_exp} - P_{in}}{P_{in\_exp} - P_{in\_crit}}\right)\right) \times X_c \quad (18)$$

avec  $m_{\min\_no(N)} = 0,095 \text{ h}^{-1}$

$\lambda = 1,1$  (facteur d'amplification)

La comparaison des dynamiques de maintenance en fonction du  $P_{in}$  met en exergue que la différence entre les valeurs respectives de  $m$  en excès et en carence en azote est d'autant plus élevée que le  $P_{in}$  est faible. Il semble donc que plus une cellule est limitée par le phosphore, plus elle est sensible à la carence en N.

### II. 2. d. Fraction en propionate consommé

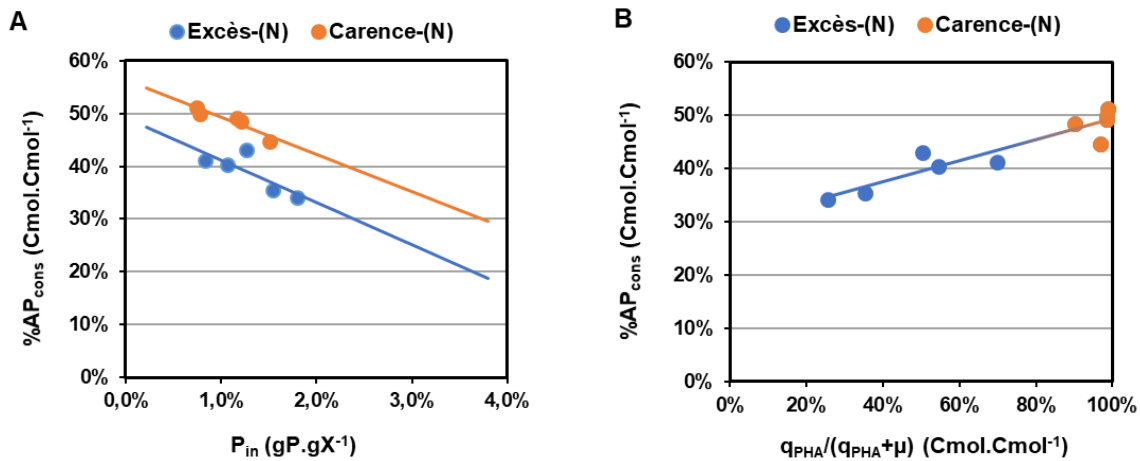
De manière que la modélisation soit davantage conforme à l'expérience, il a été décidé d'intégrer au modèle les cinétiques de consommation spécifique des différents substrats composant les mélanges carbonés. Par ailleurs, évaluer la fraction que représente le propionate parmi les substrats consommés selon les conditions opératoires constitue un intérêt dans l'optique de la modulation de la teneur en 3HV au sein du copolymère P(3HB-co-3HV) (abordée dans le chapitre 5). Pour un mélange acétate/propionate, la fraction en propionate consommé ( $\%AP_{cons}$ ) se définit de la façon suivante :

$$\%AP_{cons} = \frac{q_{S(AP)}}{q_{S(AP)} + q_{S(AA)}} \quad (19)$$

avec  $q_{S(AP)}$  : vitesse spécifique de consommation du propionate

$q_{S(AA)}$  : vitesse spécifique de consommation de l'acétate

L'évolution de la fraction en propionate consommé selon la teneur intracellulaire en P, en conditions d'excès et de carence en N est indiquée sur Figure 70A.



**Figure 70.** Relation entre la fraction en propionate consommé ( $\%AP_{cons}$ ) et la teneur intracellulaire en phosphore ( $P_{in}$ ) établie par une fonction linéaire à partir des résultats obtenus avec une alimentation en acétate/propionate, en conditions d'excès et de carence en azote (A). Evolution de la fraction en propionate consommé en fonction du  $\%PHA$  instantané ( $q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)$ ) (B).

Indépendamment de la disponibilité en azote, le  $\%AP_{cons}$  augmente de façon linéaire avec la diminution du  $P_{in}$ . En outre, à un  $P_{in}$  donné, la valeur du  $\%AP_{cons}$  est constamment supérieure lors d'une carence en N. Or, il a été démontré que la dilution du  $P_{in}$  générerait une redirection des flux de consommation vers la production de PHA. Dans cette idée, la fraction en propionate consommé a été représentée en fonction du pourcentage en PHA instantané. Ce dernier désigne la fraction du carbone consommé orienté vers la production de PHA comparativement à celle utilisée pour la croissance cellulaire (Figure 70B) :

$$\%PHA_{inst} = \frac{q_{PHA}}{q_{PHA} + \mu} \quad (20)$$

L'évolution du %PHA instantané en fonction du %AP<sub>cons</sub> met en exergue l'existence d'une corrélation linéaire entre ces deux valeurs. Par conséquent, plus le P<sub>in</sub> décroît, plus le %PHA augmente et plus la consommation spécifique de propionate par rapport à l'acétate est élevée. Il semblerait que le propionate soit privilégié à l'acétate pour la synthèse des PHA.

La relation entre la fraction en propionate consommé et la teneur intracellulaire en phosphore est modélisée par une même expression en conditions d'excès et de carence en azote, mais avec des grandeurs cinétiques distinctes :

$$\%AP_{cons} = \%AP_{cons_{min}} \left( 1 + \left( \psi \frac{P_{in_{exp}} - P_{in}}{P_{in_{exp}} - P_{in_{crit}}} \right) \right) \quad (19)$$

avec en conditions d'excès d'azote :

$$\%AP_{cons_{min}} = 19 \text{ Cmol\%}$$

$$\psi = 1,5$$

avec en conditions de carence en azote :

$$\%AP_{cons_{min}} = 30 \text{ Cmol\%}$$

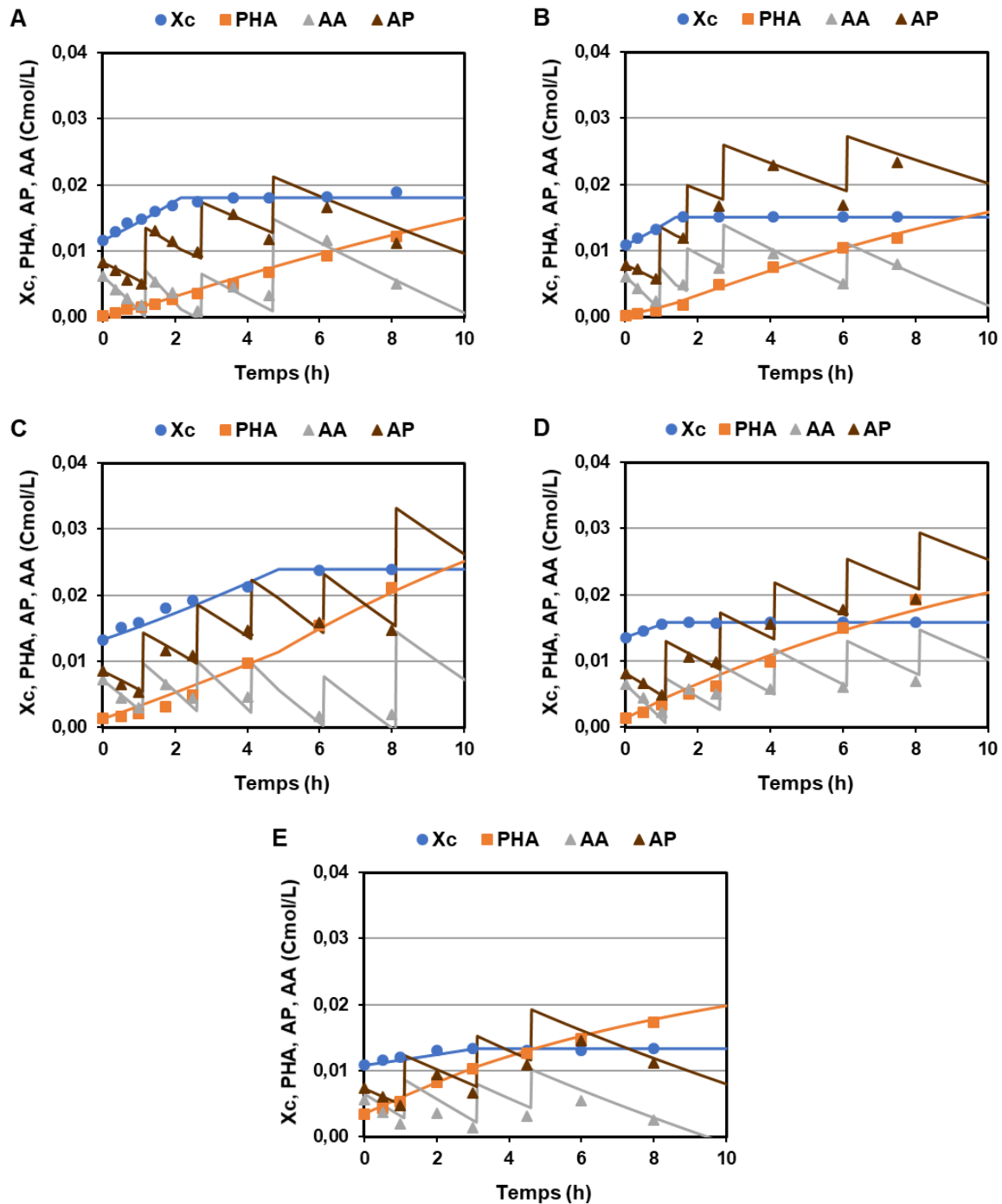
$$\psi = 0,9$$

### II. 3. Représentation des régimes dynamiques

La capacité prédictive du modèle cinétique a été jaugée en confrontant les résultats obtenus avec le modèle aux dynamiques expérimentales observées en réacteur batch. Les cultures batch conduites avec le mélange acétate/propionate sont représentées sur la Figure 71 avec les modélisations tenant compte des distinctions établies pour les valeurs de q<sub>PHAMax</sub> en condition de carence en azote selon la composition des consortia. A titre de comparaison, les simulations des cultures en utilisant un q<sub>PHAMax</sub> commun à tous les microorganismes apparaissent en Annexe F (Figure 92). Par ailleurs, la représentation de la culture batch (B2b) alimentée avec le butyrate/propionate figure dans la même annexe.

Quelle que soit la culture, le modèle donne une représentation fidèle des cinétiques observées pendant les expérimentations. En considérant des q<sub>PHAMax</sub> spécifiques en carence en azote pour chaque genre microbien dominant, la différence entre les teneurs intracellulaires en PHA réelles et celles modélisées n'excède jamais 2 Cmol%. En revanche, en admettant un seul q<sub>PHAMax</sub> moyen pour tous les microorganismes, des écarts plus significatifs peuvent être relevés, notamment pour les cultures pour lesquelles le q<sub>PHA</sub> expérimental présente les plus grandes différences avec le q<sub>PHAMax</sub> moyen défini (Annexe F). Par exemple, pour le batch A1a (inoculé avec une culture sélectionnée à un (C/P) de 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>) dont la teneur réelle en PHA atteint 39 Cmol% après 8h de culture, le modèle avec des q<sub>PHAMax</sub> différenciés fournit une estimation à 40 Cmol%, tandis que

le modèle sans discrimination attribut un %PHA d'une valeur de 48 Cmol% (Figure 71A). Et inversement, la teneur en PHA est sous-évaluée pour le batch A2f (inoculé avec une culture sélectionnée avec un degré de limitation en P de  $325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ ), pour lequel le modèle indique un %PHA de 53 Cmol% en fin de culture, en-deçà des 57 Cmol% observés expérimentalement (Figure 92E). L'absence de distinctions entre les  $q_{\text{PHAmax}}$  des populations en conditions de carence en N conduirait une sous-estimation du  $q_{\text{PHAmax}}$  de *Malikia*, et au contraire une surestimation de celui d'*Acinetobacter*.



**Figure 71.** Evolution des concentrations Xc, PHA, AA (acétate) et AP (propionate) au cours des batch A1a (A), A2a (B), A2b (C), A2c (D) et A2f (E). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.

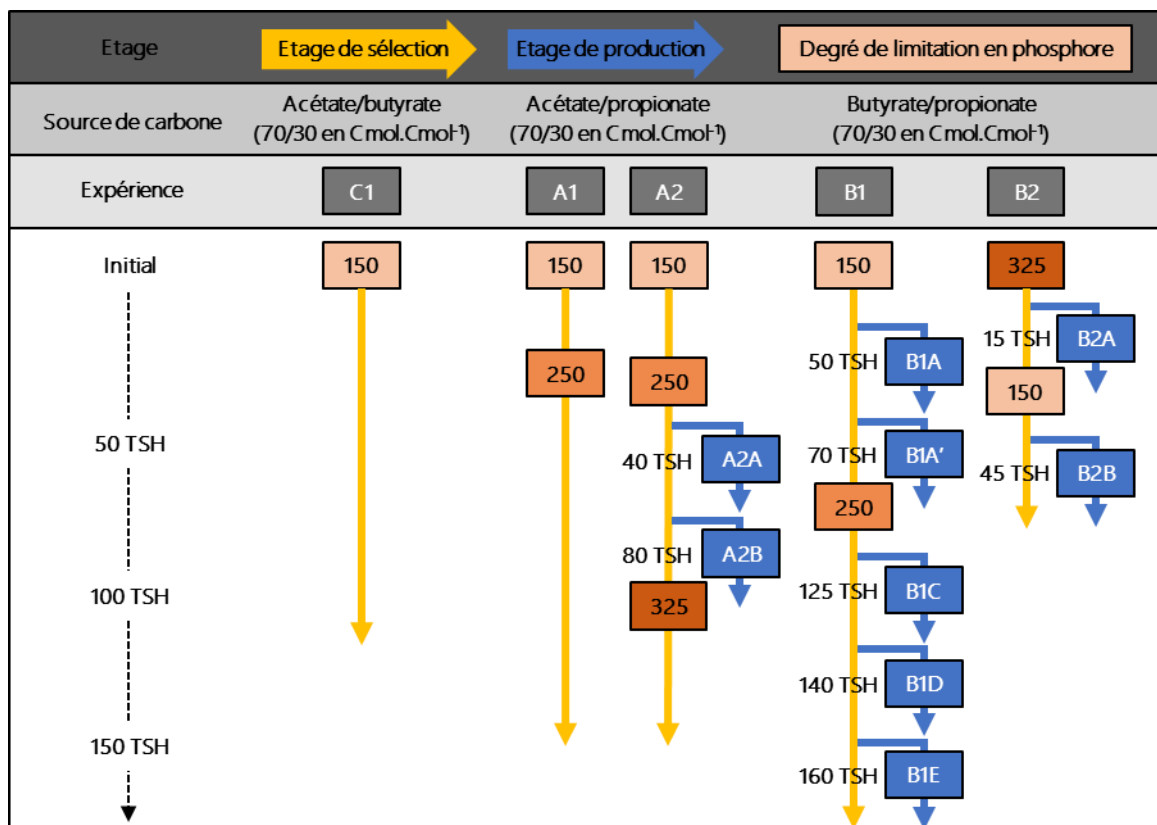


La confrontation du modèle à des cultures avec des conditions opératoires contrastées (i.e. constitution des consortia variable, teneur intracellulaire en phosphore initiale divergente, épuisement de l'azote à des temps différents...), le modèle possède ainsi une bonne aptitude à représenter les processus majeurs ciblés (basculer entre croissance cellulaire et stockage de PHA avec la diminution du  $P_{in}$  et la carence en azote en particulier). De plus, l'estimation des grandeurs cinétiques semble pouvoir être validée.

### III. Performances de production de PHA du réacteur continu bi-étagé

#### III. 1. Démarche expérimentale menée dans l'étagé de production de PHA

Outre la qualification cinétique des populations microbiennes en batch, l'accumulation de PHA a également été éprouvée en chemostat, avec la mise en place du réacteur bi-étagé au sein duquel l'étagé de production est alimenté en continu par le réacteur de sélection. La Figure 72 présente l'ensemble des cultures réalisées dans l'étagé de production et les paramètres opératoires appliqués dans l'étagé de sélection correspondant. Le détail des conditions expérimentales et l'objectif associé sont donnés en Annexe C.



**Figure 72.** Synoptique des cultures réalisées dans l'étagé de production du réacteur bi-étagé à partir des cultures de l'étagé de sélection correspondantes. Les valeurs encadrées en orange indiquent le ratio C/P appliqué dans l'étagé de sélection. Les lettres A, B, C au début de chaque nom de 2<sup>ème</sup> étage (en bleu) font référence au mélange carboné avec lequel a été opéré la sélection, avec A : acétate/propionate et B : butyrate/propionate.

Les étages de production ont été opérés dans des conditions similaires à celles appliquées en batch, à savoir une carence en phosphore et une limitation en azote. En raison de l'effet mémoire vis-à-vis de la source de carbone, ils ont été alimentés avec le même substrat que celui utilisé durant la phase de sélection. Enfin, le taux de dilution a été fixé à  $0,10 \text{ h}^{-1}$  pour l'ensemble des cultures. L'objectif est alors d'évaluer les effets des paramètres opératoires sur les performances d'accumulation de PHA, pour pouvoir finalement définir, avec l'aide du modèle cinétique, les conditions optimales du procédé continu bi-étagé. Plus précisément, l'étude des étages de production s'est portée sur l'influence :

- d'un **excès de propionate** : comparaison des cultures B1A (faible concentration résiduelle en propionate) et B1A' (accumulation de propionate dans le surnageant de culture).
- de la **fraction en propionate dans le mélange carboné** : comparaison des étages A2A et A2B, alimentés avec un mélange acétate/propionate dont la fraction en propionate est respectivement égale à 33 %mol et 66 mol%.
- du **degré de limitation en azote (C/N)<sub>app</sub>** : comparaison des chemostat B1B, B1C, B1D, différenciés selon la valeur du ratio C/N imposé.

Pour un jeu de paramètres donné, la caractérisation des performances maximales de production de PHA n'est possible que si la culture n'est pas limitée en carbone et que la concentration résiduelle en propionate n'excède pas  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ , i.e. le seuil supposé d'inhibition (d'après les observations de Grousseau, 2012). Dès lors, l'acquisition d'un régime stable (ou pseudo-stable) et exploitable exige une augmentation progressive et séquentielle de la charge organique dans le débit d'alimentation. En considération des durées nécessaires à l'obtention du régime permanent (5 TSH, autrement dit 50h), puis à sa qualification (5 nouveaux TSH), la mise en œuvre des étages de production peut alors être chronophage et limite la quantité de données dont l'analyse présente un réel intérêt.

### III. 2. Analyse cinétique et stœchiométrique des étages de production

L'ensemble des paramètres cinétiques et stœchiométriques des régimes pseudo-stabilisés obtenus au sein de l'étage de production, en l'absence de limitation C mais avec une concentration résiduelle de propionate inférieure à  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  (à l'exception de la condition B1A', spécifiée en rouge) est décrit dans le Tableau 12. Quelles que soient les conditions expérimentales, aucune trace d'azote n'a été détectée dans le surnageant de culture. La totalité des expériences a donc été réalisée en conditions de limitation azote. Il convient alors de préciser que les taux de croissance spécifiques observés sont des valeurs apparentes puisqu'il s'agit de valeurs moyennes sur la durée du temps de séjour hydraulique (à la différence des réacteurs batch pendant lesquels il est possible de suivre en temps réel les dynamiques cellulaires et par conséquent, déterminer les valeurs instantanées).

**Tableau 12.** Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables dans l'étage de production, selon le substrat utilisé, le degré de limitation P appliqué lors de la sélection et le degré de limitation N.

Nom	Substrat	Conditions		Vitesses spécifiques				Rendements			Teneurs
		C/P Cmol.Pmol <sup>-1</sup>	C/N Cmol.Nmol <sup>-1</sup>	$\mu$ h <sup>-1</sup>	$q_{\text{PHA}}$ Cmol.(Cmol.h) <sup>-1</sup>	$q_{\text{S}}$ Cmol.(Cmol.h) <sup>-1</sup>	$m$	$R_{(Xc/S)}$ Cmol.Cmol <sup>-1</sup>	$R_{(\text{PHA/S})}$ Cmol.Cmol <sup>-1</sup>	$R_{(X/S)}$ Cmol.Cmol <sup>-1</sup>	%PHA Cmol.Cmol <sup>-1</sup>
B1A	AP/AB	150	180	0,01	0,12	0,30	0,14	0,02	0,41	0,44	56%
B1A'	AP/AB	150	180	0,01	0,09	0,37	0,24	0,02	0,28	0,30	51%
B1B	AP/AB	250	85	0,02	0,13	0,30	0,12	0,06	0,43	0,49	60%
B1C	AP/AB	250	50	0,03	0,20	0,41	0,13	0,06	0,50	0,56	69%
B1D	AP/AB	250	35	0,03	0,26	0,50	0,15	0,06	0,52	0,58	73%
A1A	AP/AA	250	110	0,01	0,11	0,31	0,12	0,05	0,37	0,41	50%
A2A	AP/AA	250	125	0,01	0,07	0,25	0,13	0,04	0,27	0,31	40%

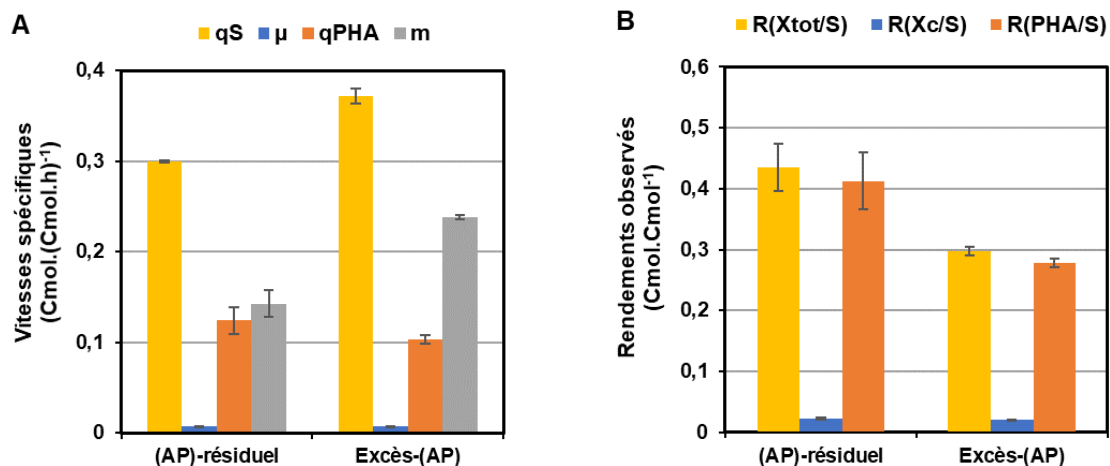
Malgré la variabilité des paramètres opératoires (modification du substrat carboné utilisé, différents degrés de limitation P dans le 1<sup>er</sup> étage, divers niveaux de limitation N dans le 2<sup>ème</sup> étage), une accumulation stable de PHA, avec des teneurs intracellulaires en PHA significatives, a pu être constamment obtenue. Le procédé de production de PHA en réacteur continu bi-étagé s'avère donc être une stratégie fiable et robuste.

A l'issue des conditions expérimentales les plus favorables (condition B1D, caractérisée par une alimentation en butyrate/propionate, un ratio C/P de 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> et un ratio C/N de 35 Cmol.Nmol<sup>-1</sup>), la productivité en PHA s'élève à 1,00 gDCO.(L.h)<sup>-1</sup>. Cette valeur est près de deux fois supérieure à celle dépeinte par Matos et al., (2021) (0,57 gDCO.(L.h)<sup>-1</sup>) et présentée par les auteurs comme la plus haute productivité atteinte avec les procédés conventionnels de production de PHA en cultures mixtes (enrichissement avec le procédé ADF et production en fed-batch). En dépit d'une vitesse spécifique d'accumulation de PHA nettement inférieure (0,26 vs 1,01 Cmol.(Cmol.h)<sup>-1</sup>), le régime continu assure une production soutenue permettant de compenser les plus faibles capacités microbiennes d'accumulation de PHA. Néanmoins, il doit être mentionné que dans le cas présent, la source de carbone est apportée sous forme de substrats synthétiques (et en particulier de butyrate, un substrat très efficace) tandis que dans l'étude de Matos et al., (2021), les AGV sont produits par fermentation acidogène à partir de déchets de fruits (avec une large fraction en acétate), ce qui peut induire un biais. Par ailleurs, lors des procédés aérobie, la productivité demeure avant tout restreinte par le transfert d'oxygène et il serait, par conséquent, plus approprié de comparer les besoins d'aération sur l'ensemble du procédé pour une productivité donnée plutôt que la productivité en tant que telle.

### III. 2. a. Effets d'un excès de propionate

De manière à évaluer les effets liés à un excès de propionate, les performances d'accumulation de PHA lors des conditions B1A et B1A' ont été mises en comparaison. Les deux cultures ont été opérées sur un mélange équimolaire butyrate/propionate mais se distinguent par une augmentation de la charge organique dans le

flux d'alimentation, résultant en une accumulation de propionate dans le surnageant pour B1A' (1,05 g.L<sup>-1</sup>), à l'inverse de B1A pour laquelle la concentration résiduelle en propionate est restée négligeable (0,01 g.L<sup>-1</sup>). Les vitesses spécifiques et les rendements observés moyens à l'issue de chacune des cultures sont présentés sur la Figure 73. Les conditions B1A et B1A' sont respectivement désignées par les mentions « (AP)-résiduel » et « Excès-(AP) ».



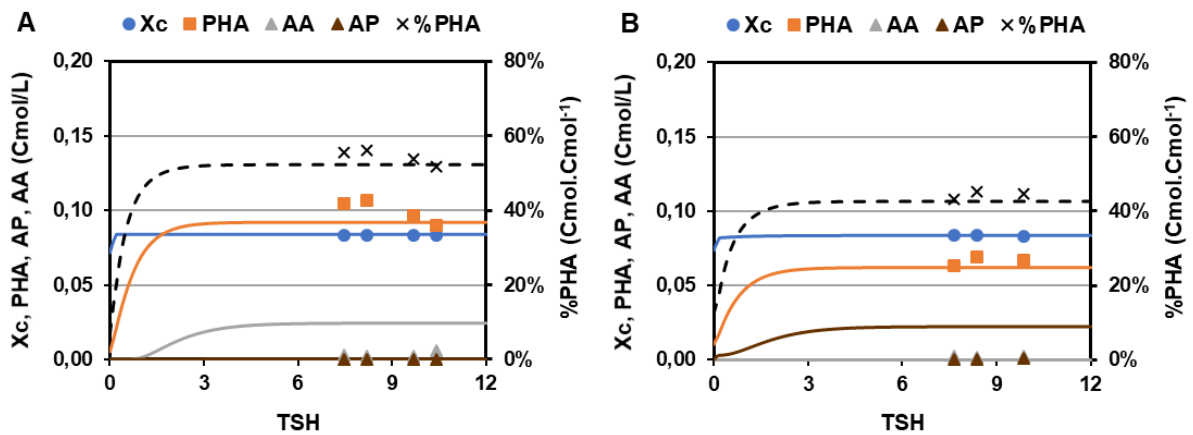
**Figure 73.** Vitesses spécifiques moyennes et coefficient de maintenance moyen au cours des étages de production A1A (AP-résiduel) et A1A' (excès-AP) (A). Rendements observés moyens en fonction de la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate au sein des chemostat B1A et B1A' (B).

L'accroissement de la charge organique induit une augmentation de la vitesse spécifique de consommation des substrats, mais occasionne a contrario une réduction de la vitesse spécifique de production de PHA, qui diminue de 0,12 à 0,09 Cmol.(Cmol.h)<sup>-1</sup> (Figure 73A). Dans le même temps, le coefficient de maintenance est multiplié par 1,7, passant de 0,14 à 0,24 h<sup>-1</sup>. L'intensification de la maintenance cellulaire se traduit alors par une diminution du rendement en biomasse totale, qui chute de 32% (Figure 73B). En conditions d'excès de propionate, le carbone dirigé vers les réactions de maintenance représente près de 65% du substrat assimilé. Il convient toutefois de relever que même en l'absence d'excès, la maintenance draine près de la moitié du carbone assimilé (47%), en raison des conditions opératoires contraignantes pour les organismes (carence en P, limitation N). Outre la perte de potentiel carboné, il faut ajouter que l'accumulation de propionate pose des problèmes de conduite de cultures due à l'amplification de la consommation de base (KOH) pour neutraliser le pH.

Grousseau (2012) a précédemment fait état du caractère toxique du propionate et signalé des mécanismes d'inhibition qui lui sont propres (et non pour l'acétate ou le butyrate). En revanche, l'auteure a rapporté que ces mécanismes se manifestaient davantage par une diminution de la vitesse de consommation des autres substrats disponibles ou par un temps de relaxation nécessaire au rétablissement de l'homéostasie cellulaire, que par une amplification significative de la maintenance cellulaire.

### III. 2. b. Influence de la fraction en propionate dans le mélange carboné

Dans le cadre de la modulation de la teneur en 3HV au sein du copolymère P(3HB-co-3HV) produit (chapitre 5), l'accumulation de PHA dans l'étage de production a été éprouvée en modifiant la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate. Plus précisément, deux fractions différentes (33 et 66 mol%, baptisées A2A et A2B respectivement) ont été testées et comparées. De manière à pouvoir évaluer exclusivement les effets liés à la modification de la composition du substrat carboné, l'accumulation de PHA a été réalisée à partir de consortia sélectionnés avec le même ratio C/P ( $250 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ ) et soumis à un degré de limitation en azote similaire ( $110$  et  $125 \text{ Cmol.Nmol}^{-1}$ ). Le suivi cinétique de deux cultures est présenté sur la Figure 74, qui fait, en plus, apparaître les estimations du modèle. Par ailleurs, les vitesses spécifiques moyennes et les rendements observés moyens sont renseignés sur la Figure 75.

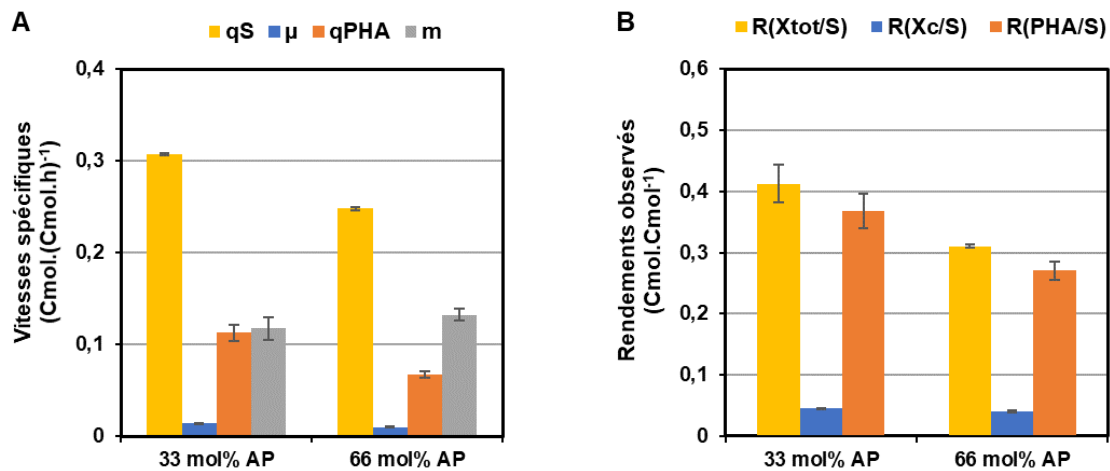


**Figure 74.** Evolution des concentrations Xc, PHA, AA (acétate) et AP (propionate) en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours des étages de production en continu A2A (A) et A2B (B). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.

Quelle que soit la condition, le modèle restitue des valeurs analogues à celles réellement obtenues. Bâti à partir des tendances identifiées en régime dynamique, le modèle est également capable de représenter le comportement des cellules en culture continue. Outre le fait qu'elles attestent de la validité du modèle, ces observations révèlent ainsi que les cinétiques sont conservées indépendamment du mode de culture (batch ou chemostat).

La comparaison des deux conditions montre une réduction de la concentration en PHA avec l'augmentation de la fraction en propionate, ce qui résulte en une diminution de la teneur intracellulaire en PHA (qui décroît de 50 à 40 Cmol%). La diminution de la concentration en PHA est attribuable à une diminution de la vitesse spécifique de consommation des substrats ( $0,25$  contre  $0,31 \text{ Cmol.}(\text{Cmol.h})^{-1}$ ) conjointement à une réduction du rendement observé en PHA ( $0,37$  vs  $0,27 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ ). Dans la lignée de ce qui avait été précédemment démontré en réacteur batch, les capacités d'assimilation du propionate sont inférieures à celles de l'acétate. De surcroît, le catabolisme du propionate nécessite une maintenance cellulaire plus importante, qui restreint

l'efficacité de conversion du substrat en PHA. En doublant la fraction en propionate dans l'alimentation, la productivité de PHA est alors réduite de près d'un tiers (32%).



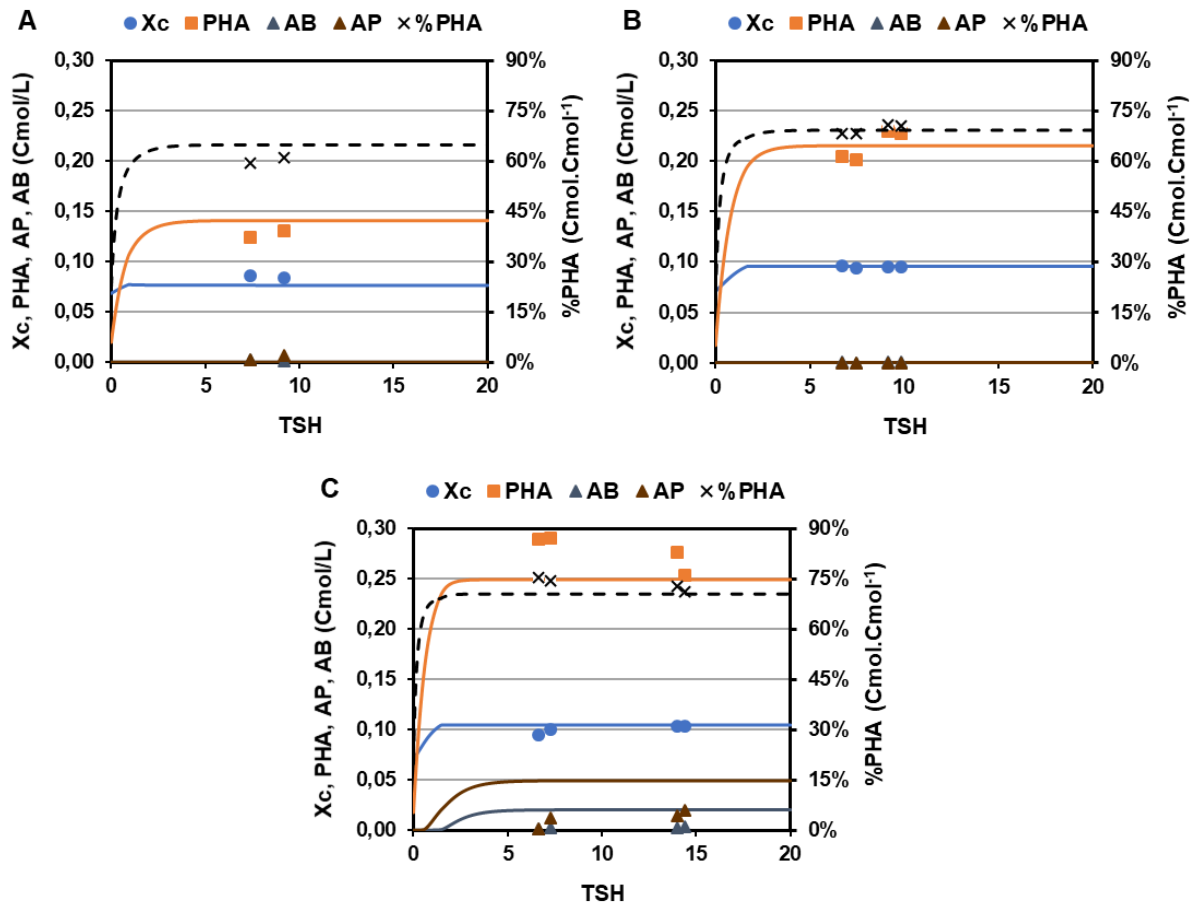
**Figure 75.** Vitesses spécifiques moyennes et coefficient de maintenance moyen en fonction de la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate au cours des étages de production en continu A2A (33 mol% AP) et A2B (66 mol% AP) (A). Rendements observés moyens en fonction de la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate au sein des chemostat A2A et A2B (B).

### III. 2. c. Influence du degré de limitation en azote

Sur le même principe que ce qui a été effectué en batch, l'accumulation de PHA a été réalisée en conditions de limitation en azote (en plus d'une carence en phosphore), dans l'idée de réprimer la croissance cellulaire et réorienter le carbone vers le stockage de PHA. Dès lors, différents ratios C/N ont été appliqués de manière à pouvoir statuer sur l'influence du niveau de limitation N sur les performances de production de PHA. Plus exactement, trois cultures ont été conduites avec des paramètres opératoires identiques, hormis le  $(C/N)_{app}$ . Il s'agit des conditions B1B, B1C et B1D, alimentées avec un mélange équimolaire butyrate/propionate et un consortium sélectionné à un ratio C/P de 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> (caractérisé par une nette dominance de *Malikia*) mais opérées à un  $(C/N)_{app}$  respectivement égal à 85, 50 et 35 Cmol.Nmol<sup>-1</sup>. La diminution du  $(C/N)_{app}$  a été réalisée en diminuant le flux d'azote en entrée du réacteur (le flux de carbone était ensuite ajusté de manière à éviter une limitation en C d'une part et prévenir une accumulation d'AGV dans le surnageant d'autre part). La Figure 76 présente les concentrations en substrats, Xc et PHA à l'issue de chaque condition.

Comme attendu, la diminution du degré de limitation en N induit une augmentation de la concentration en biomasse catalytique : seul l'épuisement de l'azote permet de complètement enrayer la croissance cellulaire. Elle s'accompagne également d'une augmentation nettement plus importante de la concentration en PHA, conduisant à une augmentation de la teneur intracellulaire en PHA, qui atteint 73 Cmol% lors de la condition B1D. L'accroissement de l'accumulation de PHA est à mettre en corrélation avec l'augmentation de la vitesse

spécifique de production de PHA, qui résulte d'une augmentation de la vitesse spécifique de consommation des substrats, conjuguée à de meilleurs rendements (Tableau 12). Réduire l'intensité de la limitation en azote stimule donc la production en PHA. Ce constat corrobore les résultats obtenus en batch, durant lesquels la vitesse spécifique de production de PHA a été rapportée comme étant supérieure en conditions d'excès de N lorsque les populations majoritaires appartenaient au genre *Malikia*.



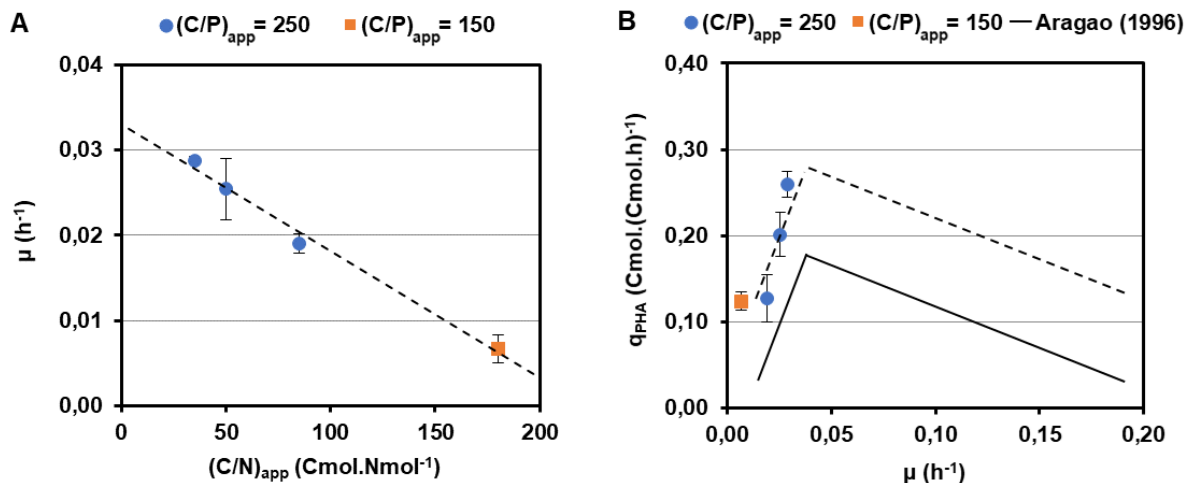
**Figure 76.** Evolution des concentrations  $X_c$ , PHA, AA (butyrate) et AP (propionate) en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours des étages de production en continu B1B (A), B1C (B) et B1D (C). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.

Pour consortium donné (i.e. avec une composition donnée et une teneur en phosphore donnée), le potentiel de croissance des microorganismes et les cinétiques d'accumulation de PHA sont ainsi tous deux régis par le flux d'azote. Ce résultat suggère l'existence d'une corrélation entre la croissance cellulaire et la production de PHA. Pour pouvoir déterminer précisément l'influence du niveau de limitation en N sur les performances de production de PHA, deux questions ont alors été définies :

- quelle est la relation exacte entre le degré de limitation N et le taux de croissance spécifique ?
- quelle est la relation entre le taux de croissance spécifique et la vitesse spécifique de production de PHA ?

Pour répondre à la première interrogation, l'évolution du taux de croissance spécifique en fonction du ratio C/N imposé a été tracée sur la Figure 77A. Il apparaît que le  $\mu$  diminue de façon linéaire avec l'augmentation

du  $(C/N)_{app}$ . Il peut être également constater qu'en raison de la carence en phosphore, le taux de croissance spécifique maximal (obtenu en l'absence de limitation en azote) est à peine plus élevé que  $0,03 \text{ h}^{-1}$ . Compte tenu de ces résultats, le  $q_{PHA}$  a alors été représenté en fonction de  $\mu$  (Figure 77B), mettant en évidence une corrélation linéaire entre ces deux vitesses spécifiques sur la gamme de  $\mu$  considérée (Figure 77B). La vitesse spécifique de production de PHA augmente ainsi avec l'augmentation du taux de croissance (lorsque celui-ci est inférieur à  $0,03 \text{ h}^{-1}$ ). Maintenir une croissance résiduelle permet donc de maximiser les cinétiques de production. Un parallèle a été dressé avec les résultats de la thèse d'Aragao (1996), qui a établi un lien entre le  $\mu$  instantané et le  $q_{PHA}$  instantané à partir de cultures pures conduites en réacteur fed-batch en conditions de limitation stricte en azote. Sur la plage de  $\mu$  correspondante à celle qui a été ici expérimentée, l'évolution de la vitesse spécifique de production de PHA obéit à la même tendance et atteint un  $q_{PHAmax}$  à un  $\mu$  environ égal à  $0,03 \text{ h}^{-1}$ . Au-delà de cette valeur, le  $q_{PHA}$  diminue du fait de la redirection progressive du carbone vers la croissance cellulaire aux dépens du stockage de PHA.



**Figure 77.** Evolution du taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) en fonction du degré de limitation  $(C/N)_{app}$  dans l'étage de production (A). Evolution de la vitesse spécifique de production de PHA en fonction du taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) dans l'étage de production (B). Le trait continu représente la relation établie par Aragao (1996) en conditions de limitation N. Le trait discontinu représente la projection pour les résultats obtenus, selon cette même relation.

En cultures mixtes, il a été signalé, de la même façon, que le maintien d'une croissance résiduelle contribuait à améliorer la productivité en PHA, jusqu'à ce que la croissance ne surpasse la production (Valentino et al., 2015). En outre, il a été démontré que l'application d'une limitation en azote permettait d'obtenir des teneurs PHA plus élevées (Johnson et al., 2010 ; Serafim et al., 2004) ainsi que de meilleurs rendements de conversion du carbone en PHA (Basak et al., 2011 ; Marang et al., 2013), mais que les vitesses spécifiques de production de PHA étaient supérieures avec un faible degré de limitation (Dionisi et al., 2005a ; Wen et al., 2010).

Par ailleurs, l'augmentation de la vitesse spécifique d'accumulation de PHA avec l'accroissement du taux de croissance spécifique témoigne du fait que les populations actives (c'est-à-dire sujettes à la croissance) sont (au moins majoritairement) accumulatrices de PHA. La comparaison de la diversité microbienne dans l'étage



de production avec celle à l'issue de la sélection met, en effet, en avant que la distribution microbienne est relativement conservée d'un étage à l'autre (Figure 91, Annexe B). Les paramètres opératoires (limitation N, carence en P) ne bousculent donc pas la dominance établie lors de la phase de sélection.

Enfin, une attention peut être portée sur l'influence du ratio C/P appliqué durant la sélection. La Figure 77B met en exergue que les vitesses spécifiques d'accumulation de PHA des consortia sélectionnés à 150 et 250  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$  (et alimentés avec le même substrat butyrate/propionate) sont équivalentes lorsque le taux de croissance spécifique du consortium sélectionné à 150  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$  est deux fois moins important. Ce constat suggère qu'à un taux de croissance spécifique donné, la vitesse spécifique d'accumulation de PHA est alors supérieure avec le consortium sélectionné à 150  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$ . Cela peut s'expliquer par le fait que le  $P_{in}$  est le plus optimal pour le stockage de PHA et que les compositions des consortia microbiens sont sensiblement similaires. Ce point sera traité plus en détails lors de l'identification des conditions idéales du procédé.

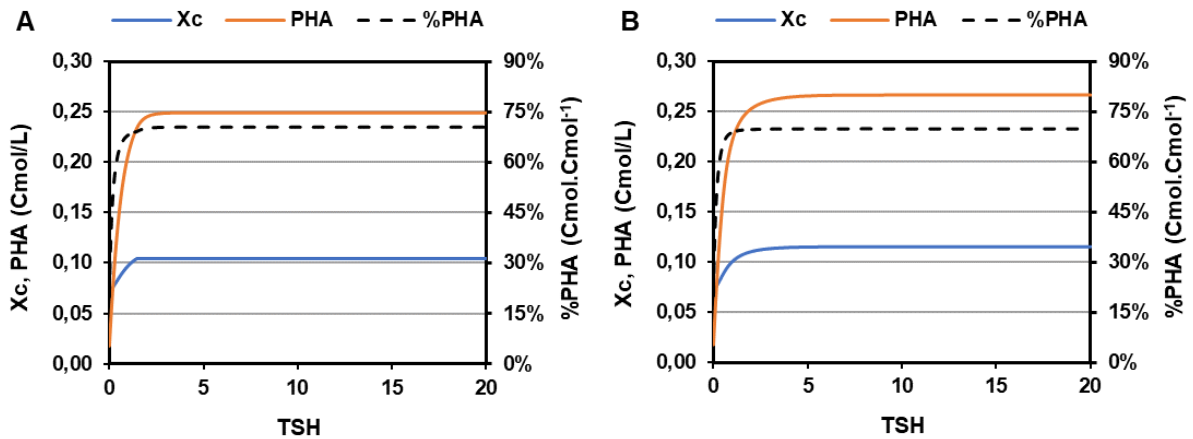
### III. 3. Optimisation du réacteur continu bi-étagé

Sur la base des résultats obtenus expérimentalement, la définition des conditions optimales du réacteur bi-étagé a été investiguée à partir du modèle cinétique.

#### III. 3. a. Levée de la limitation en azote dans l'étage de production

La mise en évidence de l'augmentation de la vitesse spécifique d'accumulation de PHA avec l'augmentation du taux de croissance spécifique encourage à s'interroger sur la pertinence de l'application d'une limitation en azote (en plus de la carence en phosphore). Pour s'en assurer, les cinétiques d'accumulation de PHA du consortium sélectionné à 250  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$  ont été simulées en levant la limitation en N. Elles sont présentées sur la Figure 78B et ont été mis en comparaison avec la condition de référence B1D, à l'issue de laquelle la productivité observée en PHA a été la plus élevée.

L'absence de limitation en N entraîne une augmentation des concentrations en PHA et  $X_c$  (sous réserve de l'augmentation la charge organique dans le flux d'alimentation). Dans ces conditions, la productivité en PHA passe de 1,00 à 1,07  $\text{gDCO} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , ce qui correspond à une augmentation de 7%. Au regard de la productivité, il est donc profitable de pas exercer de limitation en azote. En revanche, l'augmentation en  $X_c$  est à l'origine d'une faible diminution de la vitesse spécifique de stockage, de PHA qui est abaissée à 0,22  $\text{Cmol} \cdot (\text{Cmol} \cdot \text{h})^{-1}$  (comparativement au  $q_{\text{PHA}}$  égal à 0,26  $\text{Cmol} \cdot (\text{Cmol} \cdot \text{h})^{-1}$  lors de la condition B1D). Une tendance similaire est observée pour la teneur intracellulaire en PHA, qui décroît de 73 à 70  $\text{Cmol}\%$ . Dès lors, si le procédé cherche à produire une biomasse avec la teneur en PHA la plus élevée, appliquer une faible limitation N semble être la stratégie la plus adaptée.



**Figure 78.** Evolution des concentrations  $X_c$ , PHA et de la teneur en PHA en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours de l'étage de production B1D avec le ratio C/N appliqué ( $35 \text{ Cmol.Nmol}^{-1}$ ) (A) et en l'absence de limitation azote (B).

### III. 3. b. Définition des conditions optimales du réacteur bi-étagé

En tenant compte de l'ensemble des paramètres opératoires du procédé bi-étagé en continu, les conditions optimales (en termes de productivité) ont pu être estimées à partir des résultats expérimentaux obtenus et du modèle cinétique. Au cours de cette étude, il a été montré que les performances de production de PHA dépendent de :

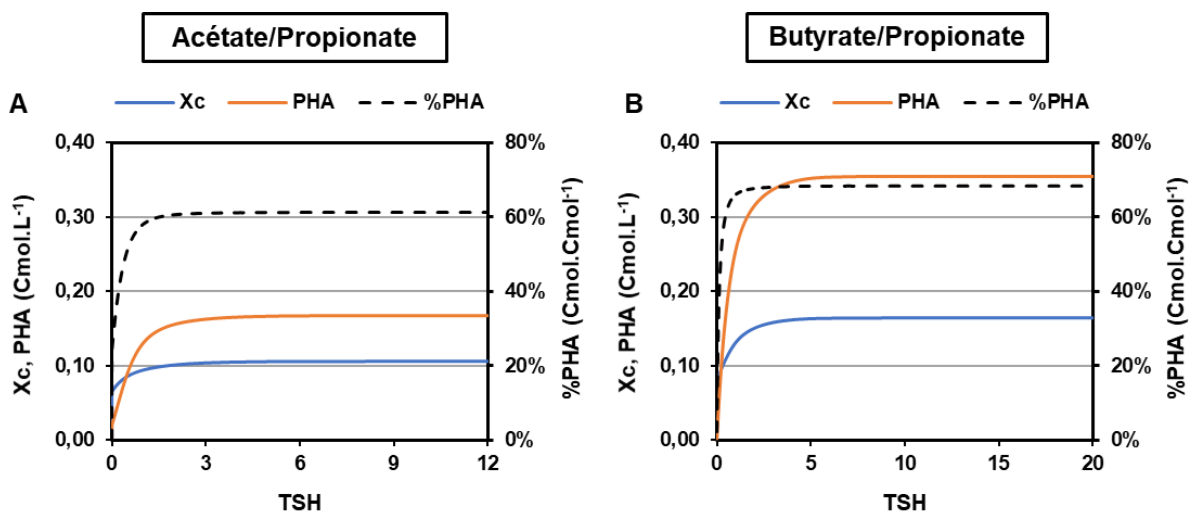
- (1) La nature de la source de carbone
- (2) Le degré de limitation  $(C/P)_{app}$  lors de la phase de sélection
- (3) Le niveau de limitation  $(C/N)_{app}$  dans l'étage de production

Il est également possible de citer le taux de dilution, mais dans la mesure où la totalité des expérimentations ayant été réalisées avec un taux de dilution fixé pour chaque étage, il a été décidé de ne pas le prendre en considération. Les concentrations en  $X_c$  et PHA, ainsi que la teneur en PHA, déterminées lors de la simulation du procédé en conditions optimales, ont été représentées sur la Figure 79, pour un procédé respectivement opéré sur acétate/propionate (A) et butyrate/propionate (B).

Pour la culture alimentée avec le mélange acétate/propionate, il a été démontré qu'augmenter le degré de limitation en P générerait une profonde modification de la diversité microbienne et favoriserait l'émergence de microorganismes ayant de plus grandes capacités de stockage de PHA (*Malikia* vs *Acinetobacter*). Dans ces conditions, il est plus préférable d'appliquer une forte limitation, et ce même si cela implique une diminution de la teneur intracellulaire en P, défavorable aux cinétiques d'accumulation. Au sujet de l'étage de sélection, il a été mis en évidence qu'en cas d'une dominance de bactéries surproductrices (telles que *Malikia*), ajouter limitation en azote en plus de la carence en P restreignait la productivité. Dès lors, en l'absence de limitation en N, les performances de production de PHA optimales obtenues avec le consortium sélectionné à un ratio

C/P de 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> se caractérisent par une productivité de 0,66 gDCO.(L.h)<sup>-1</sup> et une teneur en PHA de 66 Cmol%.

Concernant la culture conduite sur le mélange butyrate/propionate, l'acquisition d'une forte dominance de microorganismes surproducteurs a été mise en avant dès le degré de limitation en P le plus faible. Se limiter au plus faible (C/P)<sub>app</sub> est alors profitable dans la mesure où il place les cellules dans de meilleures dispositions en vue de l'accumulation de PHA (P<sub>in</sub> optimal). De plus, de la manière que pour les cultures alimentées avec acétate/propionate, limiter en azote durant la phase de stockage contraint les cellules et freine la production de PHA. En prenant en considération ces paramètres, l'estimation des performances de production optimale donne une productivité de 1,43 gDCO.(L.h)<sup>-1</sup> et une teneur en PHA de 68 Cmol%.



**Figure 79.** Evolution des concentrations Xc, PHA et de la teneur en PHA en fonction du nombre de temps de séjour (TSH) au cours de d'un étage de production au sein d'un procédé continu bi-étagé optimisé, respectivement lors d'une alimentation en acétate/propionate (**A**) et en butyrate/propionate (**B**)

La comparaison des conditions optimales selon la nature de la source de carbone permet de souligner que le degré de limitation en phosphore à imposer durant l'étape de sélection est substrat-dépendant. Au-delà de conditionner l'état physiologique des cellules, la phase de sélection a, avant tout, pour rôle d'assurer un enrichissement en bactéries surproductrices. Le ratio C/P à appliquer doit alors être défini en conséquence. Il convient également de relever que la productivité obtenue lors que le propionate est combiné au butyrate est plus de deux fois plus élevée que celle estimée à partir du mélange acétate/propionate. Les raisons pour lesquelles le butyrate induit de meilleures performances sont liées à :

- la **sélection** : la présence de butyrate dans le mélange carboné évite une implantation d'*Acinetobacter* et permet une dominance de *Malikia* plus importante que celle pouvant être atteinte avec acétate/propionate. Elle autorise également l'application d'un ratio C/P plus faible, favorisant l'activité cellulaire lors de la phase d'accumulation.

- la **production** : le catabolisme du butyrate génère des cinétiques de stockage de PHA plus élevées et de meilleurs rendements de conversion du substrat en PHA.

Dans l'optique de l'utilisation de substrats complexes, la phase d'acidogénèse devra ainsi être envisagée de manière à maximiser la fraction en acide butyrique (en comparaison de celle de l'acide acétique) au sein du profil de fermentation.

En outre, une piste d'optimisation du procédé pourrait être de ne pas appliquer une carence en phosphore dans l'étage de production, mais simplement d'ajuster le flux de P en entrée de façon à maintenir la teneur intracellulaire à une valeur optimale pour la production de PHA. Toutefois, cette stratégie soulève quelques incertitudes, dans le sens où maintenir le  $P_{in}$  à une valeur relativement élevée est également favorable à la croissance cellulaire, ce qui rendrait difficile l'obtention d'une forte teneur intracellulaire en PHA. De surcroît, cela pose la question du développement de populations non productrices au sein des consortia microbiens, qui pourrait aussi contribuer à diminuer la teneur en PHA à l'échelle de la culture.

Enfin, les résultats obtenus permettent de rendre compte de l'intérêt du procédé en deux étages vis-à-vis d'un seul étage dans lequel seraient couplées croissance cellulaire et production de PHA. Dans cette étude, le réacteur bi-étagé a été conduit à des taux de dilution respectivement égaux à 0,16 et 0,10  $h^{-1}$  pour l'étage de sélection et l'étage d'accumulation. L'addition des temps de séjour du 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> étage correspond ainsi à une durée totale de 16,25 heures, ce qui reviendrait à appliquer un taux de dilution de 0,06  $h^{-1}$  dans le cas d'un réacteur mono-étagé. Cependant, il a été fait la démonstration que la vitesse spécifique de production de PHA était optimale à un taux de croissance de 0,03  $h^{-1}$ , et donc deux fois plus faible. De la même manière, Cavaillé et al., (2016) ont rapporté qu'une teneur en PHA supérieure à 70 Cmol% (i.e. la valeur même qui a été atteinte avec le réacteur à deux étages) ne pouvait être obtenue qu'à un taux de dilution de 0,023  $h^{-1}$ . Dès lors, pour assurer une productivité équivalente à celle décrite avec le procédé bi-étagé, il faudrait alors doubler la concentration en PHA au sein du réacteur mono-étagé, et par extension doubler la concentration en AGV dans le flux d'alimentation. En revanche, la production de substrats très concentrés constitue l'une des principales difficultés dans les procédés de fermentation acidogène. En ce sens, le principal intérêt de la stratégie en deux étages, outre le fait de segmenter les besoins en oxygène et minimiser les coûts liés à l'aération, réside donc dans le fait de pouvoir utiliser des substrats dilués.

## **IV. Conclusion**

L'étude de la phase d'accumulation de PHA a permis de rendre compte de l'influence du type de limitation nutritionnelle sur les cinétiques de production de PHA.

L'ajout d'une limitation en azote en plus de la carence en phosphore paralyse la croissance cellulaire et tend à normaliser les cinétiques de production de PHA pour l'ensemble des populations microbiennes. Dès lors, une carence en N est profitable, en termes de production de PHA, uniquement dans le cas où *Acinetobacter* est majoritaire au sein du consortium. Elle contribue alors à réorienter le carbone consommé exclusivement vers le stockage de PHA. A contrario, si *Malikia* est dominant, les contraintes associées à une carence en N entraînent une diminution significative de la vitesse spécifique de production de PHA.

Sur la base des travaux de Cavaillé (2015), un modèle cinétique intégrant les effets liés à la présence d'azote a pu être bâti à partir des tendances relevées lors de l'expérience. Le modèle définit les lois cinétiques qui régissent les processus cellulaires selon la teneur intracellulaire en phosphore, la disponibilité en azote et la source de carbone. Il a été mis en évidence que le modèle était capable de retranscrire avec fidélité à la fois les résultats obtenus en batch que ceux observés en culture continue, et ce quelles que soient les conditions opératoires.

Pour la première fois, la production de PHA à partir de cultures mixtes a été réalisée en réacteur continu bi-étagé. Les productivités obtenues, et notamment avec le mélange butyrate/propionate, rivalisent avec celles décrites dans la littérature à partir de procédés plus conventionnels. L'analyse des performances de stockage de PHA dans le 2<sup>ème</sup> étage de mettre en avant trois éléments majeurs concernant la conduite de culture :

- une accumulation de propionate dans le surnageant déstabilise les cellules et induit une amplification des réactions de maintenance. Dès lors, il est essentiel de dimensionner avec justesse la charge organique dans le flux d'alimentation de manière à éviter à la fois une limitation en carbone et un excès de propionate trop marqué.
- l'augmentation de la fraction en propionate dans le mélange carboné est associée à une diminution de la production de PHA et à une déviation du carbone vers la maintenance cellulaire. C'est un aspect qui ne doit pas être négligé, en particulier en vue de la modulation de la teneur en 3HV dans le copolymère P(3HB-co-3HV).
- la vitesse spécifique de production de PHA est corrélée au taux de croissance spécifique. En effet, maintenir une croissance résiduelle permet de maximiser les cinétiques de production de PHA. Dès lors, en conditions de carence en P, il est préférable ne pas imposer de limitation en N supplémentaire.

En considération de ces éléments, les conditions opératoires idéales, du point de vue de la productivité, ont pu être définies pour chacune des sources de carbone :

- acétate/propionate :  $(C/P)_{app}$  de 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> dans l'étage de sélection, pas de limitation en azote dans l'étage de production
- butyrate/propionate :  $(C/P)_{app}$  de 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> lors de la sélection, pas de limitation en azote durant la phase de production

## **CHAPITRE V. EFFETS DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA COMPOSITION DU COPOLYMERE P(3HB-co-3HV)**

---



## **I. Introduction**

Les performances de production de PHA n'ont jusqu'à alors été abordées que du point de vue de la quantité de PHA accumulée, mais il n'a jamais été fait mention de la qualité du polymère. Ce chapitre porte ainsi son attention sur la composition des PHA produits, en s'intéressant plus précisément à l'influence des différents paramètres opératoires du procédé sur la teneur en 3HV au sein du copolymère P(3HB-co-3HV).

Dans un premier temps, cette étude se focalisera sur la nature de la source de carbone et en particulier sur le rôle du propionate. En ce sens, il sera mis en évidence la relation entre la fraction en propionate dans le mélange carboné et la teneur en 3HV dans le copolyester P(3HB-co-3HV). L'influence de la nature de l'AGV associé au propionate (acétate ou butyrate) sera également examinée. De surcroît, les effets du changement transitoire de la nature du substrat (déjà rapportés dans le chapitre 1 notamment) seront analysés en termes de constitution du polymère produit. Le rôle de la sélection microbienne sera discuté au travers de l'analyse de la distribution des monomères selon l'identité du genre bactérien dominant. Par ailleurs, l'impact du type de limitation nutritionnelle (phosphore ou azote) sur le pourcentage de 3HV instantané sera évalué, à la fois avec une alimentation avec du propionate pur et un mélange acétate/propionate.

Enfin, un aperçu de l'étude d'acidogénèse effectuée à partir de pelures de pommes de terre sera donné, de manière à pouvoir statuer sur la possibilité d'orienter significativement le spectre des AGV produits vers des AGV à chaînes impaires (propionate ou valérate). A partir de la totalité des résultats obtenus, les applications qui peuvent être envisagées pour un procédé continu avec trois étages seront discutées. En outre, les pistes d'amélioration du procédé seront proposées.

## **II. Effets des paramètres opératoires sur la teneur en 3HV**

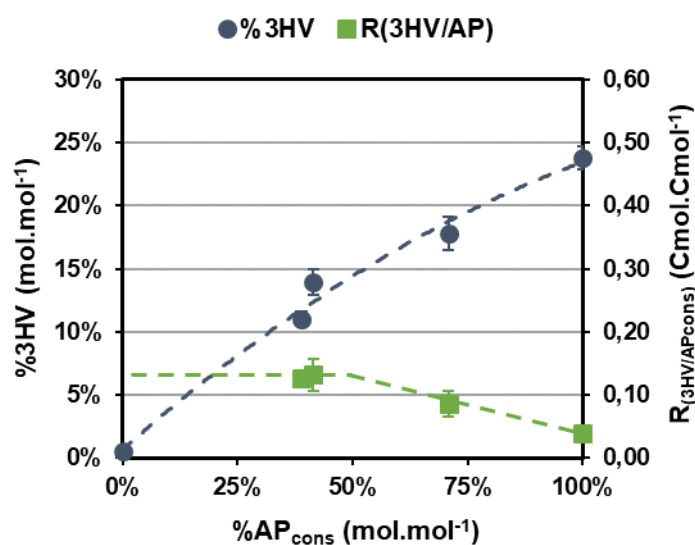
### **II. 1. Influence de la fraction en propionate consommée**

Pour rappel, les monomères 3HV (C5) peuvent être synthétisés directement à partir de valeryl-CoA (C5) ou être issus de la condensation d'un propionyl-CoA (C3) et d'un acétyl-CoA (C2). La formation de valeryl-CoA et de propionyl-CoA nécessitent alors respectivement une alimentation en valérate et propionate. Dans ces travaux, seul le propionate a été utilisé dans la mesure où il représente généralement une fraction nettement plus grande au sein du spectre des produits de fermentation lors de l'acidogénèse de substrats organiques. Dans le copolymère P(3HB-co-3HV), le pourcentage de 3HV se définit comme tel :

$$\%3HV = \frac{3HV}{3HV + 3HB} \quad (21)$$



La composition du P(3HB-co-3HV) peut ainsi être modulée en ajustant la proportion de propionate au sein du mélange carboné. Dans cette idée, l'évolution de la teneur en 3HV, obtenue durant la phase de stockage, en fonction de la fraction en propionate dans le mélange acétate/propionate a été représentée sur la Figure 80. Le graphique présente également l'évolution du rendement en 3HV par rapport au propionate ( $R_{(3HV/AP)}$ ). De façon à pouvoir observer strictement les effets liés à l'augmentation de la proportion de propionate, les expériences qui ont été ici considérées ont été opérées dans des conditions opératoires similaires : sélection conduite avec le même degré de limitation P de  $250 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  (dominance d'*Acinetobacter*) et production de PHA réalisée avec le même niveau de limitation en N.



**Figure 80.** Teneur en 3HV et rendement observé en 3HV par rapport au propionate ( $R_{(3HV/AP)}$ ) selon la fraction en propionate consommé dans un mélange acétate/propionate durant la phase d'accumulation avec un consortia caractérisé par la dominance du genre *Acinetobacter*.

Comme attendu, une alimentation avec uniquement de l'acétate résulte en la synthèse d'un homopolymère de PHB. L'ajout de propionate dans le flux d'alimentation génère une incorporation de motifs 3HV, illustrant la capacité des consortia sélectionnés à produire un copolymère P(3HB-co-3HV). La teneur en 3HV dépend alors directement de la fraction en propionate dans le mélange carboné. Il est, par conséquent, possible de contrôler finement la teneur en 3HV en adaptant la fraction en propionate. Néanmoins, les valeurs obtenues apparaissent comme relativement faibles. Par exemple, avec l'utilisation de propionate pur, un copolymère avec seulement 24 mol% de 3HV a été produit, plutôt qu'un homopolymère de PHV. A titre de comparaison, après un enrichissement avec le procédé ADF, Kourmentza and Kornados (2016) ont reporté une teneur en 3HV de 66 mol% avec une alimentation exclusive en propionate. De la même façon, Lemos et al., (2006) ont rapporté que le copolymère synthétisé était majoritairement composé d'unités 3HV (72 mol%). En réalisant l'accumulation de PHA conjointement à la sélection microbienne avec le procédé AN/AE, Takabatake et al., (2000) ont signalé un teneur en 3HV s'élevant à 84 mol%. Ce constat peut être également élargi à l'utilisation du mélange acétate/propionate. Avec une fraction en propionate de 25 et 50 mol%, Takabatake et al., (2000)

et Hu et al., (2005) ont respectivement reporté une teneur en 3HV de 40 et 55 mol%, des teneurs largement supérieures à celles qui ont été ici obtenues avec une même composition du substrat.

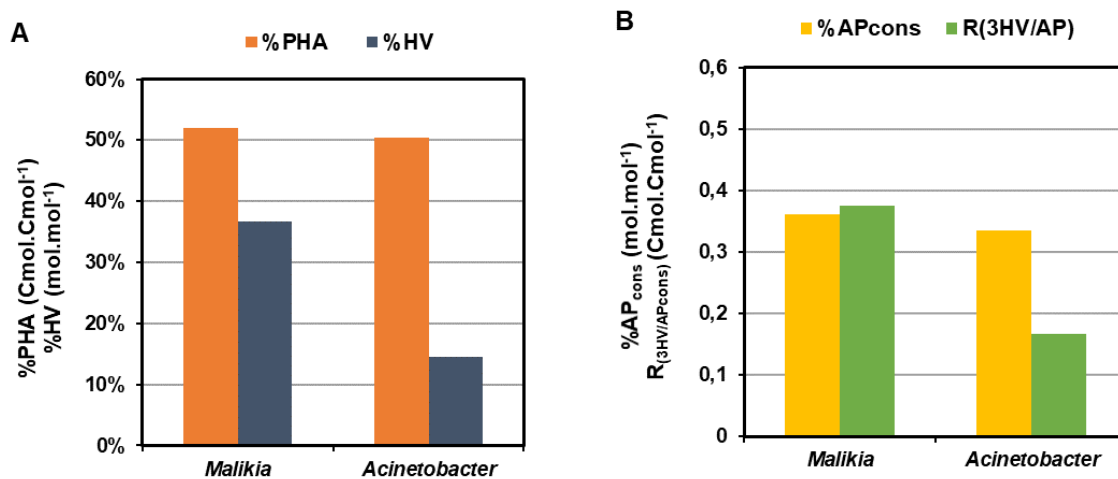
Les faibles teneurs en 3HV traduisent une conversion préférentielle du propionate en monomère 3HB plutôt qu'en 3HV. En d'autres termes, l'utilisation du propionate est essentiellement détournée vers la production d'acétyl-CoA par décarboxylation. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène. En premier lieu, cela peut potentiellement être liée à la notion de flux métaboliques. En considérant que les voies métaboliques impliquées dans la synthèse du P(3HB-co-3HV) sont communes à toutes les populations sélectionnées, il peut être alors envisagé que la formation privilégiée d'unités 3HB soit corrélée à une activité supérieure de la  $\beta$ -cétotiolase A (qui catalyse la réaction de condensation de deux acétyl-CoA) par rapport à celle de la  $\beta$ -cétotiolase B (qui active la réaction de condensation de l'acétyl-CoA et du propionyl-CoA). Dans ces conditions, l'acétyl-CoA est majoritairement dirigé vers la synthèse de motifs 3HB aux dépens de celle de 3HV. De plus, comme mentionné par Kourmentza and Kornados (2016), il ne peut être négligé que l'orientation du propionate en propionyl-CoA ou acétyl-CoA puisse être dépendante de la composition des consortia bactériens. Le rôle éventuel de la sélection microbienne sera traité plus en détails dans la suite du chapitre.

Par ailleurs, il convient de noter que la relation entre la teneur en propionate et la composition du polymère n'est pas linéaire, mais est caractérisée par une diminution du rendement de conversion du propionate en unités 3HV. Sur les bases de la simulation réalisée avec un mélange butyrate/propionate par Grousseau et al., (2014), il doit être pris en compte qu'au-delà de 50% de propionate dans l'alimentation, une fraction du propionate est nécessairement sollicité pour fournir l'acétyl-CoA requis pour la synthèse de 3HV. La réaction de décarboxylation entraîne alors une perte de carbone, à l'origine de la diminution du rendement observé. A l'inverse, en deçà de 50% de propionate, l'acétyl-CoA peut être exclusivement produit à partir de l'acétate, évitant ainsi la décarboxylation du propionate. Néanmoins, plus la fraction en propionate est faible, plus la synthèse de monomères 3HB est favorisée à partir de l'acétate excédentaire. En dépit de ces considérations, le rendement  $R_{(3HV/AP)}$  reste ici inférieur à  $0,15 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ , même à de faibles pourcentages en propionate, en raison notamment d'une utilisation du propionate pour la production préférentielle de motifs 3HB, mais également pour la croissance cellulaire et les réactions de maintenance.

Une diminution similaire du rendement de production de motifs 3HV avec l'augmentation de la fraction en valérate dans un mélange butyrate/valérate a été rapportée par Zinn et al., (2003) lors de cultures continues de *Ralstonia eutropha*. En cultures mixtes, Lemos et al., (2006) et Chang et al., (2012) ont également mis en avant une augmentation du rendement  $R_{(3HV/AP)}$  lorsque le propionate était l'unique source de carbone par rapport au cas où il était associé à un AGV à chaînes latérales paires (tel que l'acétate ou le butyrate).

## II. 2. Influence de la sélection microbienne

De façon à déterminer l'influence de la composition des consortia microbiens sur la teneur en 3HV dans le copolymère, une comparaison des résultats obtenus en réacteur batch avec un mélange acétate/propionate a été réalisée à partir de l'identité du genre microbien dominant. En ce sens, la teneur en HV obtenue avec un consortium sélectionné à 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> (caractérisé par une dominance du genre *Acinetobacter*) a été confrontée avec celle observée avec un consortium sélectionné à 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> (pour lequel *Malikia* est le genre majoritaire). Afin de limiter les effets potentiels des conditions opératoires (et notamment ceux liés à la différence de teneur intracellulaire en P), les deux cultures considérées ont été opérées avec une carence en azote dès la fin de la première heure de culture. La Figure 81 présente les teneurs intracellulaires en PHA et les teneurs en 3HV dans le polymère atteintes après huit heures de culture en fonction du genre dominant (A), mais aussi la fraction en propionate consommé et le rendement  $R_{(3HV/AP)}$  (B).



**Figure 81.** Teneurs intracellulaires en PHA et teneurs en HV dans le polymère selon l'identité du genre microbien dominant à l'issue de cultures batch opérées sur un mélange acétate/propionate (A). Fraction en propionate consommé (%AP<sub>cons</sub>) et rendement observé en 3HV par rapport au propionate ( $R_{(3HV/AP)}$ ) selon l'identité du genre microbien dominant (B).

En raison de la carence en N qui standardise les cinétiques de production de PHA, la teneur en PHA obtenue en fin de culture est équivalente quel que soit le genre microbien dominant. En revanche, la teneur en 3HV dans le polymère est nettement plus importante avec le consortium majoritairement composé de bactéries appartenant au genre *Malikia* (37 mol%) qu'elle ne l'est avec celui principalement constitué d'organismes du genre *Acinetobacter* (15 mol%). L'identité du genre dominant exerce donc une influence significative sur la composition du copolymère. Pour mieux cerner l'origine de ces différences, il est possible de se référer aux fractions en propionate consommé ainsi qu'aux rendements de conversion du propionate en 3HV. En ce qui concerne le premier cité, les valeurs sont similaires pour les deux consortia. Comme évoqué dans le chapitre précédent, la fraction en propionate consommé ne dépend que de la disponibilité en azote et de la teneur intracellulaire en P. Les conditions de culture des deux expériences étant relativement conservées, la fraction

en propionate consommé est, par conséquent, sensiblement la même. A l'inverse, le rendement  $R_{(3HV/AP)}$  est multiplié par 2,3 lorsque le consortium est dominé par *Malikia* par rapport à celui dominé par *Acinetobacter* (0,38 vs 0,16 Cmol.Cmol<sup>-1</sup>). Le devenir du propionate diffère ainsi selon le microorganisme. Pour déterminer dans quelles mesures l'orientation du propionate se distingue, il convient de s'attarder les voies d'utilisation du propionate :

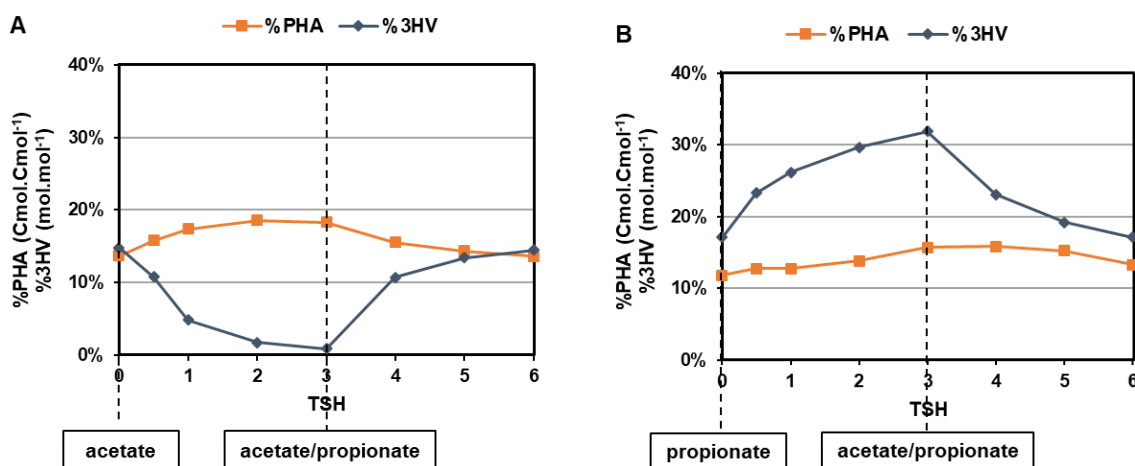
- la **croissance cellulaire** : du fait de la carence en azote, la croissance est ici nulle.
- les réactions de **maintenance** : en conditions de carence en azote, le coefficient de maintenance est défini par le  $P_{in}$ . Cependant, les différences entre les deux valeurs de  $P_{in}$  ne permettent pas de justifier celles entre les deux valeurs de rendement  $R_{(3HV/AP)}$ .
- la **synthèse du P(3HB-co-3HV)** : c'est au niveau de la production du copolymère que le propionate est dirigé différemment en fonction du genre microbien. *Malikia* oriente le propionate davantage vers les motifs 3HV que ne le fait *Acinetobacter*, qui privilégie la redirection du propionate vers la voie de synthèse d'unités 3HB.

L'influence de la composition des consortia microbiens sur l'utilisation du propionate a été précédemment démontré dans plusieurs études de production de PHA en cultures mixtes. Par exemple, Lemos et al., (2006) ont mis en exergue qu'en alimentant pourtant avec le même substrat, la nature du polymère produit pouvait différer selon les populations sélectionnées. Plus précisément, les auteurs ont comparé les PHA stockés en réacteur batch avec un mélange équimolaire acétate/propionate, après une sélection en SBR sur acétate ou propionate, respectivement. Ils ont identifié que la culture enrichie sur propionate produisait un copolymère P(3HB-co-3HV), alors que le consortium sélectionné sur acétate synthétisait un terpolymère P(3HB-co-3HV-co-3H4MV). Dans ce cas-là, la pression de sélection imposée par la nature de la source de carbone a induit l'enrichissement de deux populations différentes, au comportement distinct lors d'une alimentation avec le même substrat.

Afin d'illustrer encore davantage le rôle de la sélection microbienne, un intérêt peut être porté aux résultats liés au changement transitoire de la nature de la source de carbone dans l'étage de sélection, opéré durant la campagne expérimentale menée sur acétate/propionate à un  $(C/P)_{app}$  de 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> (présenté dans le chapitre 1). Dans cette idée, la Figure 82 renseigne sur l'évolution de la teneur en 3HV dans le copolymère pendant les trois temps de séjour au cours desquels le réacteur a été alimenté exclusivement en acétate (A) et propionate (B). Le suivi de la teneur en 3HV a également été effectué lors des trois temps de séjour à la suite du retablisement du mélange acétate/propionate dans le flux d'alimentation.

Au cours de la phase d'alimentation avec seulement de l'acétate, la fraction en 3HV dans le polymère chute progressivement jusqu'à devenir nulle après trois TSH. Comme prévu, alimenter avec 100% d'acétate génère la synthèse d'un homopolymère de PHB. A contrario, avec une alimentation unique en propionate, la teneur

en 3HV grimpe jusqu'à 33 mol% après trois TSH. Il s'agit d'un taux plus élevé que celui obtenu lors du batch (24 mol%) pourtant conduit avec le même consortium et le même substrat. Cette augmentation de la teneur en 3HV peut être mise en corrélation avec une augmentation de l'abondance relative de *Malikia* durant la phase d'alimentation exclusive en propionate. Néanmoins, cette augmentation reste mineure (le taux passe de 30 à 36%) et ne suffit pas à elle-seule à expliquer l'écart constaté. Ce dernier pourrait également être lié aux conditions opératoires. En effet, dans l'étage de sélection, la majeure partie du carbone consommé est orienté vers la croissance cellulaire. Il peut alors être fait l'hypothèse que le pool d'acétyl-CoA soit dirigé en priorité vers la croissance, au détriment de la biosynthèse de motifs 3HB, entraînant ainsi une augmentation de la teneur en 3HV. Enfin, il est possible de relever que, dans les deux cas, après trois TSH consécutifs à la réintroduction du mélange acétate/propionate, la teneur en 3HV retrouve la valeur qui était la sienne avant la perturbation (15 mol%).

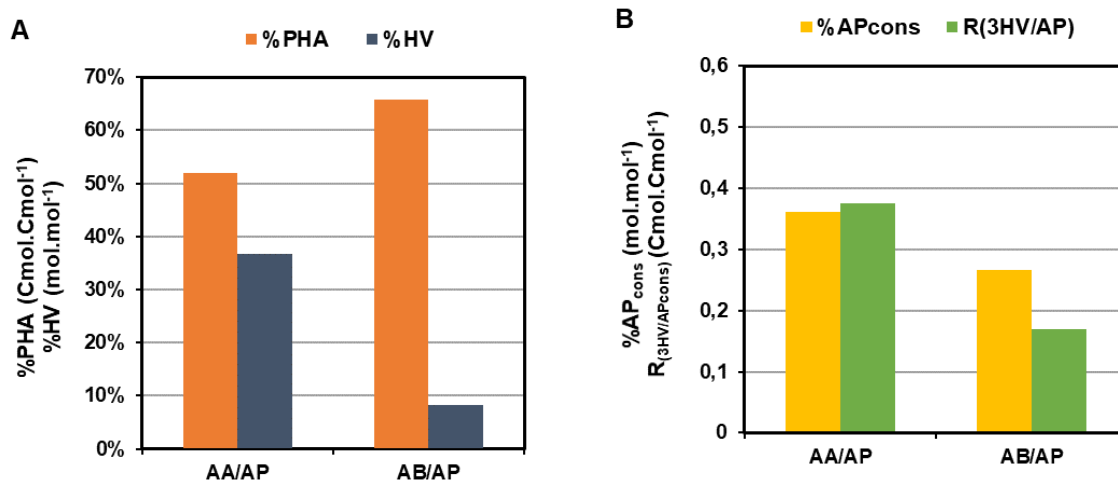


**Figure 82.** Evolution de la teneur en PHA au sein des cellules (%PHA) et de la teneur en 3HV au sein du polymère produit (%HV) en fonction de nombre de temps de séjour (TSH) lors d'une alimentation transitoire en acétate (A) et en propionate (B) dans l'étage de sélection.

### II. 3. Impact de la nature du substrat carboné associé au propionate

Hormis le propionate, la nature de la source de carbone à laquelle il est combiné peut potentiellement avoir une influence sur la composition du copolymère. Pour s'en assurer, la teneur en 3HV obtenue en batch avec un mélange acétate/propionate a été comparée avec celle observée avec un mélange butyrate/propionate. Au vu du rôle déterminant joué par la composition des consortia, il a été préféré de comparer les résultats obtenus avec deux consortia au sein desquels *Malikia* était dominant. Toutefois, il convient de préciser que l'obtention d'une dominance de *Malikia* sur acétate/propionate n'a été constatée qu'avec l'application d'un  $(C/P)_{app}$  de 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>, et que l'unique culture qui a été réalisée en batch avec butyrate/propionate, a été inoculée avec un consortium sélectionné à 150 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>. De fait, la comparaison ne tient pas compte

des différences liées à la teneur intracellulaire en P. La teneur en 3HV (A), ainsi que la fraction en propionate consommé et le rendement  $R_{(3HV/AP)}$  (B) sont représentées pour chacun des deux substrats sur la Figure 83.



**Figure 83.** Teneurs intracellulaires en PHA et teneurs en HV dans le polymère selon la nature de la source de carbone (acétate/propionate ou butyrate/propionate) lors de cultures batch opérées à partir de consortia avec une dominance de *Malikia* (A). Fraction en propionate consommé (%AP<sub>cons</sub>) et rendement en 3HV par rapport au propionate ( $R_{(3HV/AP)}$ ) selon la nature de la source de carbone (B).

En dépit de la dominance commune de *Malikia*, la teneur en 3HV dans le polyester est nettement plus faible avec une alimentation en butyrate/propionate (8 mol%) qu'elle ne l'est avec le mélange acétate/propionate (37 mol%). Ce constat trouve son explication au travers de l'addition de deux facteurs :

- la **diminution de la fraction en propionate consommé** : comme reporté dans le chapitre 3, le butyrate est le substrat pour lequel les cinétiques de consommation associées sont les plus élevées. Dès lors, lorsqu'il est combiné au butyrate, le propionate ne représente qu'une faible partie du substrat consommé. L'assimilation préférentielle du butyrate favorise ainsi la production de motifs 3HB.
- la **diminution du rendement de conversion du propionate en 3HV** : démontré par Grousseau et al., (2014), le catabolisme du propionate permet de générer davantage d'ATP que le butyrate. Afin d'éviter les déperditions d'énergie, le propionate consommé est orienté préférentiellement vers les voies métaboliques impliquées dans la croissance cellulaire, induisant un accroissement de la décarboxylation et par conséquent une diminution du rendement  $R_{(3HV/AP)}$ .

Il a déjà été reporté dans de précédentes études que la composition du polymère pouvait varier en fonction de la combinaison des AGV. Kourmentza and Kornaros (2016) ont également signalé une nette diminution de la teneur en 3HV lorsque le propionate était mélangé au butyrate (17 mol%) par rapport à son association avec l'acétate (67 mol%). En opérant le même procédé (enrichissement en conditions ADF puis accumulation de PHA en réacteur batch), Dionisi et al., (2004) ont fait mention de l'augmentation du pourcentage en 3HV dans le polymère avec la substitution d'un mélange acétate/propionate par un mélange lactate/propionate (66 contre 83 mol%).

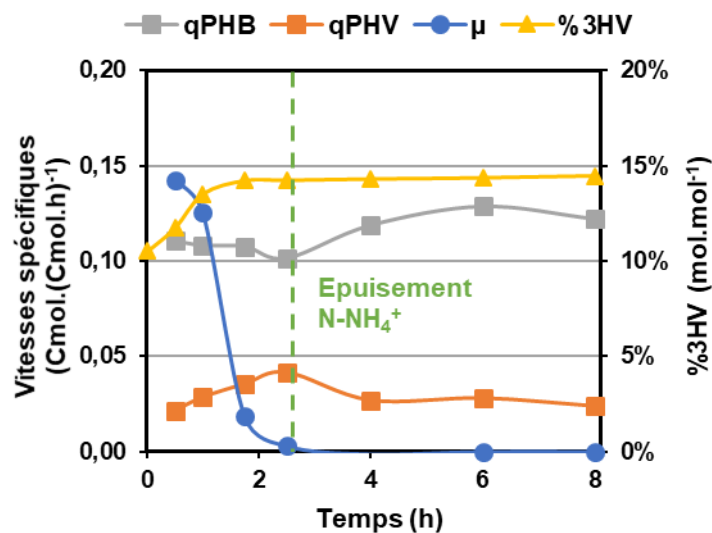
## II. 4. Influence du type de limitation nutritionnelle sur la teneur en 3HV

Outre la nature de la source de carbone ou la sélection microbienne, les cinétiques de production des deux motifs 3HV et 3HB peuvent être également influencées par l'intensité et le type de limitation nutritionnelle. Pour évaluer l'impact respectif de la teneur intracellulaire en P et de la carence en N sur la teneur en 3HV, il a été pris comme cas d'étude le batch A2c, opérée sur un mélange acétate/propionate à partir d'une culture sélectionnée à  $250 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$  (et donc caractérisée par la dominance d'*Acinetobacter*). De surcroît, afin de mieux rendre compte de l'effet des conditions opératoires sur les dynamiques de production des différents motifs, il est préférable de se référer au pourcentage de 3HV instantané ( $\%3HV_{inst}$ ) qui se définit comme la vitesse spécifique de production de monomères 3HV ( $q_{3HV}$ ) par rapport à la vitesse spécifique de production du copolymère :

$$\%3HV_{inst} = \frac{q_{3HV}}{q_{3HV} + q_{3HB}} \quad (22)$$

(A noter qu'en culture continue en régime permanent, le  $\%3HV_{inst}$  est identique au  $\%3HV$  mesuré en temps réel dans le polymère).

L'évolution des vitesses spécifiques et de la teneur en 3HV réelle au cours de la culture est présentée sur la Figure 84. Par ailleurs, les résultats obtenus avec le même consortium mais lors d'une alimentation exclusive en propionate sont donnés en Annexe G.

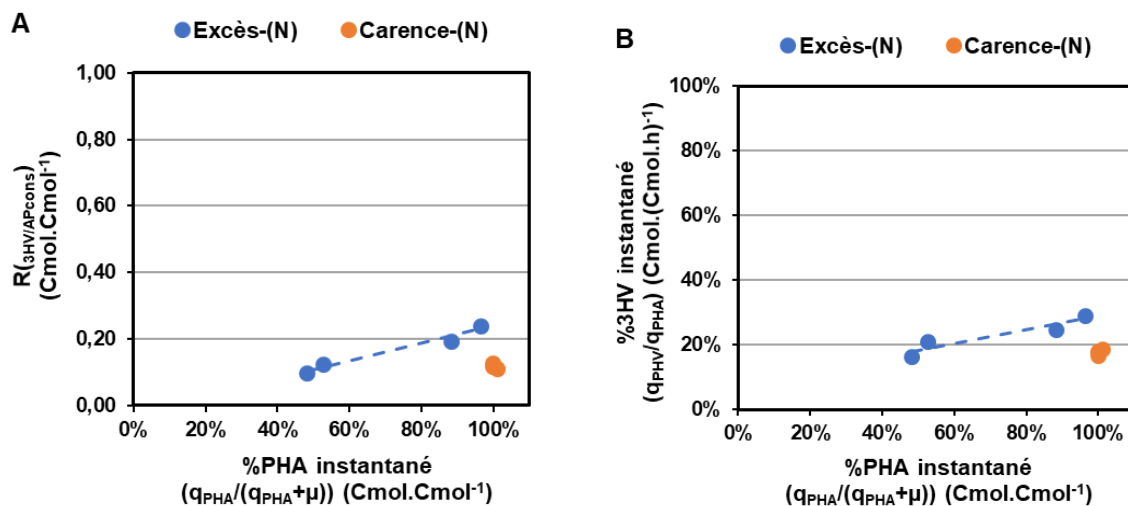


**Figure 84.** Evolution du taux de croissance spécifique ( $\mu$ ), de la vitesse spécifique de production de 3HB ( $q_{PHB}$ ), de la vitesse spécifique de production de 3HV ( $q_{PHV}$ ) et de la teneur en 3HV dans le polymère ( $\%3HV$ ) au cours du batch A2c, opérée sur un mélange acétate/propionate, à partir d'un consortium microbien sélectionné à un ratio C/P de 250  $\text{Cmol.Pmol}^{-1}$ .

En conditions de carence stricte en phosphore (et donc d'excès d'azote), la dilution du  $P_{in}$  liée à la croissance résiduelle s'accompagne d'une augmentation progressive de la vitesse spécifique de production de motifs

3HV, conjointement au maintien de la vitesse spécifique de production de monomères 3HB. En revanche, à la suite de l'épuisement de l'azote, la vitesse spécifique de production d'unités 3HV diminue instantanément et se stabilise à une valeur basse (en comparaison de celles en l'absence de carence en N), à l'inverse de la vitesse spécifique de production de motifs 3HB qui augmente sensiblement. Les dynamiques de production des deux motifs 3HV et 3HB sont donc contrastées selon le type de carence nutritionnelle et semblent être corrélées au maintien ou non d'une croissance résiduelle.

De manière à mieux comprendre les mécanismes impliqués lors des carences en P et N, les rendements de conversion du propionate en 3HV ainsi que les pourcentages en 3HV instantané ont été représentés sur la Figure 85. Pour rappel, il avait déjà été mis en avant dans le chapitre précédent (partie II. 2. d.) que la fraction en propionate consommé au sein du mélange (%AP<sub>cons</sub>) augmente de manière linéaire avec l'augmentation du %PHA instantané (correspondant à une diminution du P<sub>in</sub>). En d'autres termes, plus l'activité de synthèse de PHA est importante par rapport à la croissance cellulaire, plus les organismes priorisent la consommation de propionate. En conditions d'excès d'azote, il existe également une corrélation linéaire entre le rendement  $R_{(3HV/AP_{cons})}$  et le %PHA<sub>inst</sub> (Figure 85A). La diminution de la croissance induit, par conséquent, une redirection préférentielle du propionate consommé vers la production de 3HV. L'augmentation conjuguée du %AP<sub>cons</sub> et du rendement  $R_{(3HV/AP_{cons})}$  avec l'augmentation %PHA<sub>inst</sub> entraîne une augmentation linéaire de la vitesse spécifique de production de monomères 3HV, à l'origine de l'augmentation du %3HV<sub>inst</sub> (Figure 85B).



**Figure 85.** Evolution du rendement ( $R_{(3HV/AP)}$ ) en fonction du pourcentage en PHA instantané ( $q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)$ ) au cours du batch A2c, en conditions d'excès et de carence en azote (A). Evolution du pourcentage en 3HV instantané ( $q_{PHV}/q_{PHA}$ ) en fonction du pourcentage en PHA instantané ( $q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)$ ) au cours du batch A2c, en conditions d'excès et de carence en azote (B).

En revanche, en conditions de carence en N, l'activité de la PHA synthase semble bouleversée. Tout d'abord, la vitesse spécifique de production de 3HB augmente, ce qui témoigne d'une intensification de l'activité de la  $\beta$ -cétotliase A, impliquée dans la voie de synthèse de motifs 3HB. Plusieurs auteurs (Kessler and Witholt, 2001 ; Du et al., 2001) ont proposé une explication à la manière dont est régie l'activité de  $\beta$ -cétotliase A



selon la disponibilité en azote. En l'absence d'azote, la croissance cellulaire est totalement inhibée. Dès lors, le pool d'acétyl-CoA, précurseur de la synthèse d'unités 3HB, n'est plus dirigé vers les voies du métabolisme central. La concentration en coenzyme-A, libérés lors de la réaction catalysée par la citrate synthase du cycle de Krebs, est alors réduite, levant l'inhibition exercée sur la  $\beta$ -cétotiolase A, qui peut ainsi initier la synthèse de PHB par la réaction de condensation de deux acétyl-CoA en acetoacétyl-CoA. Par ailleurs, le rendement  $R_{(3HV/AP_{cons})}$  est au contraire relativement faible, ce qui résulte en une diminution de la vitesse spécifique de production de monomères 3HV et par extension, en une réduction du  $\%3HV_{inst}$ . La réduction du rendement  $R_{(3HV/AP_{cons})}$  traduit une diminution de l'activité de la  $\beta$ -cétotiolase B, qui assure la réaction de condensation d'un acétyl-CoA et d'un propionyl-CoA au cours de la synthèse d'unités 3HV. En conditions de carence en N, le pool d'acétyl-CoA est donc dirigé préférentiellement vers la synthèse de monomères 3HB. Il semblerait ainsi que l'activité de la  $\beta$ -cétotiolase B soit plus sensible à la disponibilité en azote que ne le serait l'activité de la  $\beta$ -cétotiolase A.

L'idée que la composition du copolymère produit soit dépende de l'activité métabolique de la biomasse a été déjà évoquée dans de précédentes études. Montano-Herrera et al., (2017) ont relaté que le potentiel de croissance, en affectant directement le réservoir intracellulaire en acyl-CoA, avait une influence significative sur la teneur en 3HV dans le polymère. Il a également été mis en évidence par Wen et al., (2010) et Silva et al., (2017) que la fraction en 3HV tendait à décroître dès lors que les cultures microbiennes étaient soumises à un fort stress nutritionnel tel que la carence en azote. Dans la même idée, Hong et al., (2000) ont démontré que la composition monomérique du polymère était étroitement corrélée au ratio C/N imposé. De surcroît, Shimizu et al., (1999) et Aragao et al., (1996) ont établi, à partir de cultures de *Cupriavidus necator*, que plus la limitation en azote était élevée, plus le pourcentage de 3HV était faible. Néanmoins, en utilisant le même microorganisme, il a été constaté par Grousseau et al., (2014) que l'arrêt de la croissance cellulaire induit par l'application d'une carence en phosphore permettait de maximiser la teneur en unités 3HV. Les auteurs ont suggéré que l'activité de la  $\beta$ -cétotiolase A était nettement plus altérée par l'absence de P que celle de la  $\beta$ -cétotiolase B. En considération de ces résultats et de ceux mis en exergue dans notre étude, il semblerait ainsi que l'activité respective des deux enzymes puisse dépendre de la nature et de l'intensité de la limitation nutritionnelle.

## **II. 5. Conséquences sur la définition des conditions optimales du réacteur bi-étagé**

Le Tableau 13 fait apparaître les teneurs en 3HV dans le polymère P(3HB-co-3HV) produit à l'issue de l'étagé de production du réacteur continu-étagé, selon les paramètres opératoires sur l'ensemble du procédé.

Tableau 13. Teneurs en 3HV au sein du copolymère P(3HB-co-3HV) dans l'étage de production du réacteur continu bi-étagé, selon les paramètres opératoires appliqués. Nomenclature : %AP : fraction en propionate dans l'alimentation de l'étage de production ; C/P : degré de limitation en P appliqué dans l'étage de sélection ; C/N : niveau de limitation en N imposé dans l'étage de production.

Nom	Substrat	Conditions				Teneur 3HV
		%AP mol.mol <sup>-1</sup>	Genre dominant (abondance relative)	C/P Cmol.Pmol <sup>-1</sup>	C/N Cmol.Nmol <sup>-1</sup>	%3HV mol.mol <sup>-1</sup>
B1A	AP/AB	50%	<i>Malikia</i> (62%)	150	180	9%
B1B	AP/AB	49%	<i>Malikia</i> (65%)	250	85	8%
B1C	AP/AB	50%	<i>Malikia</i> (65%)	250	50	9%
B1D	AP/AB	49%	<i>Malikia</i> (65%)	250	35	9%
A1A	AP/AA	39%	<i>Acinetobacter</i> (51%)	250	110	11%
A1B	AP/AA	71%	<i>Acinetobacter</i> (51%)	250	125	18%

Dans des conditions opératoires données, la teneur en 3HV est restée relativement stable, ce qui atteste de la faisabilité de maintenir une même composition monomérique dans le copolymère au cours du temps. En revanche, seules des teneurs en 3HV inférieures à 20 mol% ont pu être obtenues dans la mesure où aucune condition n'a été opérée en ayant combiné une dominance de *Malikia* et une alimentation avec le mélange acétate/propionate. Ces résultats s'inscrivent donc dans la continuité de ceux obtenus en batch.

Les conditions optimales du réacteur continu bi-étagé formulées dans le chapitre précédent ont été établies en tenant compte seulement de la productivité en PHA. Cependant, la réussite du procédé reste largement conditionnée par la composition du polymère produit (i.e. la teneur en 3HV dans le copolymère P(3HB-co-3HV)), qui détermine les propriétés thermoplastiques du matériau. Pour satisfaire les exigences industrielles, et notamment pouvoir réaliser des films par voie thermomécanique (extrusion, injection, thermoformage...), le polymère doit idéalement comporter une fraction en 3HV comprise entre 35 et 50 mol% (Gogotov et al., 2010).

Au regard des résultats exposés pendant ce chapitre, l'obtention d'une teneur en 3HV située dans la gamme requise (37 mol%) n'a été constatée qu'avec une culture réalisée à partir d'un consortium microbien dominé par le genre *Malikia* et alimenté avec un mélange acétate/propionate (dans lequel la fraction en propionate consommé représentait 36 mol%). Dès lors, bien que les cinétiques de stockage de PHA soient plus élevées en présence de butyrate, son association avec le propionate durant l'étape d'accumulation semble à exclure dans la mesure où elle restreint considérablement la teneur en 3HV. De plus, la sélection de *Malikia* apparaît comme essentielle, en raison non seulement de ses fortes capacités de production de PHA, mais également d'une utilisation plus appropriée du propionate lors de la phase de stockage de PHA. Le dimensionnement de l'étage de sélection doit ainsi répondre à deux besoins :

- Promouvoir une dominance accrue du genre *Malikia* dans le consortium microbien.
- Configurer les cellules dans les meilleures dispositions en vue d'une production rapide de P(3HB-co-3HV) avec une teneur en HV supérieure à 35 mol%.

Compte tenu de l'effet mémoire des microorganismes vis-à-vis d'une source de carbone donnée, le substrat avec lequel est alimenté l'étage de sélection doit nécessairement intégrer de l'acétate et du propionate. En revanche, il pourrait être bénéfique d'inclure du butyrate pour favoriser la dominance de *Malikia* et endiguer l'implantation d'*Acinetobacter*. La présence de butyrate pourrait également autoriser l'application d'un plus faible degré de limitation en phosphore que celui étant requis pour la dominance de *Malikia* lorsque le flux d'alimentation est uniquement constitué d'acétate/propionate ( $325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}$ ). Ce dernier induit en effet une faible teneur intracellulaire en phosphore, qui restreint les cinétiques d'accumulation de PHA. Toutefois, la fraction en butyrate dans le mélange se doit de ne pas être trop grande, au risque de figer le métabolisme des cellules. Au vu des résultats de (Cavaillé, 2015) avec une alimentation en acétate ou en acétate/butyrate, une autre solution envisageable pour accroître la proportion de *Malikia* sans devoir appliquer un très haut  $(C/P)_{app}$ , serait d'abaisser le taux de dilution à  $0,12 \text{ h}^{-1}$ . Enfin, concernant l'étage de production, imposer une carence en azote en plus de celle en phosphore ne paraît pas profitable, que ce soit du point de vue de la productivité ou de la qualité du copolymère. Dans la perspective de la mise en place du procédé optimal, il conviendra, en outre, de définir précisément la fraction en propionate dans le mélange carboné permettant de maximiser les cinétiques d'accumulation de PHA et la teneur en 3HV dans le polymère P(3HB-co-3HV). Le Tableau 14 dresse un récapitulatif des enjeux et objectifs d'un procédé de production de PHA en cultures mixtes en réacteur continu bi-étagé. Il fait aussi apparaître les paramètres opératoires devant être appliqués pour répondre aux objectifs définis, ainsi que les pistes d'amélioration qui peuvent être considérées.

**Tableau 14.** Objectifs, paramètres opératoires et perspectives d'amélioration associés à chaque étage du procédé continu bi-étagé de production de PHA en cultures mixtes.

	<b>Etage de sélection</b>	<b>Etage de production</b>
Objectifs	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promouvoir une dominance significative du genre <i>Malikia</i></li> <li>- Configurer les cellules avec des potentialités métaboliques élevées (<math>P_{in}</math> proche du <math>P_{in}</math> optimal, défini à <math>1,8 \text{ gP.gXc}^{-1}</math>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maximiser les cinétiques et les rendements de production de P(3HB-co-3HV)</li> <li>- Assurer une teneur en 3HV comprise entre 35 et 50 mol%</li> </ul>
Paramètres opératoires requis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alimenter avec un mélange acétate/propionate</li> <li>- Appliquer un fort degré de limitation P (<math>325 \text{ Cmol.Pmol}^{-1}</math>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alimentation avec un mélange acétate/propionate (fraction en propionate supérieure à 35 mol%)</li> <li>- Imposer une carence</li> <li>- Ne pas appliquer de carence en azote afin de maintenir une croissance résiduelle</li> </ul>
Améliorations envisageables	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inclure une faible fraction en butyrate dans le mélange carboné</li> <li>- Abaisser le taux de dilution à <math>0,12 \text{ h}^{-1}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Définir la fraction en propionate optimale permettant de concilier productivité et qualité du copolymère</li> </ul>

### **III. Orientation du profil de fermentation lors de l'acidogènese**

Outre le fait de s'affranchir des exigences de stérilité, les cultures mixtes ont l'avantage de pouvoir dégrader des substrats complexes tels que des déchets organiques. La mise en place d'un procédé de production de PHA à partir d'effluents réels nécessite alors l'instauration d'un étage préalable de fermentation acidogène pour produire les AGV requis durant les étapes de sélection et d'accumulation de PHA. Dans cette idée, le potentiel acidogène de pelures de pommes de terre a été évalué en batch à différents pH (selon la méthode BMP). Dans cette partie, seuls les rendements d'acidogènese et les spectres d'AGV obtenus en fonction des conditions expérimentales seront présentés. L'intégralité de l'étude effectuée est, néanmoins, disponible à l'adresse suivante : <https://projet-loop4pack.fr/documents/>.

Par la suite, il sera discuté de l'ensemble des paramètres opératoires à appliquer dans l'optique d'une mise en œuvre d'un réacteur continu de fermentation acidogène.

#### **III. 1. Production d'AGV à partir de pelures de pommes de terre**

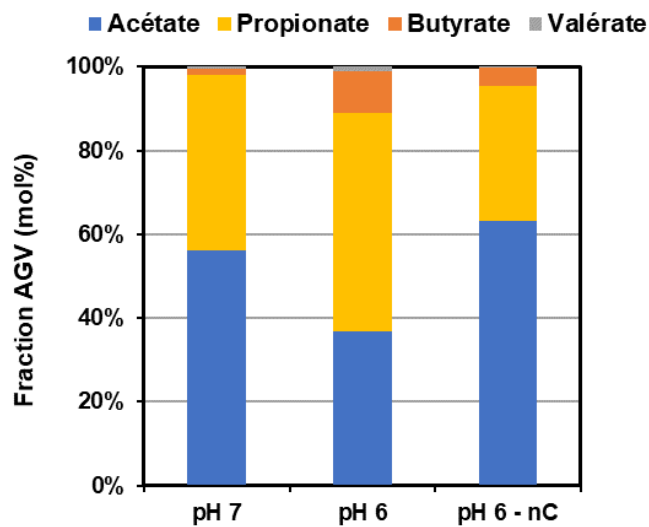
Au cours de la digestion anaérobie, la production d'AGV peut être stimulée en inhibant spécifiquement des populations méthanogènes (Lee et al., 2014). La plupart des méthanogènes étant limités à une plage de pH relativement étroite (i.e. comprise entre 7 et 8), une acidification du milieu permet ainsi d'obtenir de meilleurs rendements de conversion des substrats en AGV, grâce à la diminution de l'activité méthanogène (Temudo et al., 2007). En dépit d fait que les paramètres déterminant la distribution des produits de fermentation ne soient pas encore bien compris, la valeur du pH de culture conditionne largement le spectre d'AGV obtenus (Lin and Li, 2018). Il a notamment été mis en avant par Vidal-Antich et al., (2021) et Fang and Yu (2002) que la proportion de propionate diminuait significativement dès lors que le pH devenait inférieur à 6,5.

Compte tenu de ces résultats, il a été décidé d'évaluer la production d'AGV à trois pH distincts, en conditions mésophiles (température maintenue à 35°C) :

- pH 7 (maintenu constant grâce à une solution de bicarbonate)
- pH 6 (maintenu constant à l'aide d'un tampon phosphate)
- pH 6 non contrôlé (acidification initiale du milieu de culture, absence de tampon)

Les expérimentations ont été conduites dans des fioles d'un volume de 1 L. Elles ont été opérées à partir de boues issues du pilote de méthanisation du projet Biobricks (situé à Toulouse) et de résidus de pommes de terre fournies par McCain Foods. Les fractions respectives des différents AGV selon le pH de culture ont été représentées sur la Figure 86. Plus précisément, il s'agit des spectres déterminés après seulement 24 heures de culture, soit la durée correspondante aux temps de séjour généralement appliqués en réacteurs continus

d'acidogénèse (recensés dans le cadre d'une étude de production de PHA en cultures mixtes) et qui varient entre 10 et 24h (Albuquerque et al, 2007 ; Matos et al., 2021).



**Figure 86.** Fractions respectives des différents AGV (acétate, propionate, butyrate et valérate) produits par fermentation acidogène à partir de pelures de pommes de terre, selon le pH de culture. Nomenclature : nC = non contrôlé.

Le maintien du pH à 6 induit une sensible augmentation de la fraction en propionate, comparativement à un pH neutre (52 contre 41 mol%). En revanche, abaisser le pH initial à cette même valeur, sans le contrôler par la suite, ne permet pas de retrouver une teneur comparable en propionate, mais génère à contrario une augmentation de la fraction en acétate. Ces observations mettent en avant la nécessité de maintenir un pH acide pour pouvoir favoriser la proportion de propionate. En revanche, la diminution du pH a entraîné une réduction du rendement d'acidogénèse, qui passe de 0,37 à 0,31 gDCO.gDCO<sup>-1</sup>. Dans ces conditions, moins d'un tiers de la matière organique est alors hydrolysée en AGV, la majeure partie du potentiel carboné étant galvaudée. L'altération des performances d'hydrolyse avec l'acidification du milieu avait déjà été rapportée par Zhang et al., (2005) avec des déchets ménagers ou par Cysneiros et al., (2011) lors de l'ensilage de plants de maïs.

Par ailleurs, en prolongeant la fermentation lorsque le pH est maintenu à 6, il est possible de maximiser la teneur en propionate. En effet, celle-ci grimpe jusqu'à 83 mol% après 5 jours de culture, mais s'accompagne d'une réduction du rendement d'acidogénèse. Bien que davantage de matière soit hydrolysée en AGV avec l'allongement de la fermentation, une large fraction des AGV produits (et notamment l'acétate) est convertie en méthane. En dépit de l'acidification du milieu, l'inhibition de la méthanogénèse n'est donc que partielle. L'augmentation de la fraction en propionate est alors liée à la conversion préférentielle de l'acétate (vis-à-vis du propionate) en méthane, dans la mesure où la méthanogénèse du propionate est généralement plus lente que celle de l'acétate et du butyrate (Fang and Yu, 2002). De plus, le prolongement de la fermentation à pH 6 a conduit à une conversion complète et indifférenciée des AGV en méthane. Le contrôle du pH à une

valeur acide paraît, par conséquent, être indispensable pour inhiber (au moins partiellement) les populations méthanogènes.

Indépendamment de la durée de fermentation, la fraction en propionate obtenue à pH 6 apparaît suffisante pour pouvoir produire un polymère P(3HB-co-3HV) avec une teneur en 3HV correspondant aux impératifs industriels. De plus, il est possible de modifier la durée de culture pour moduler la fraction en propionate et l'adapter selon les besoins. Il semble donc envisageable d'opérer, à la fois, l'étape de sélection microbienne et l'étape de production de PHA à partir de l'effluent généré par fermentation acidogène, bien qu'il soit naturellement prématuré de pouvoir garantir de la réussite du procédé dans ces conditions.

### **III. 2. Discussion : mise en œuvre d'un étage de fermentation acidogène**

Au cours de l'étude d'acidogène réalisée à partir des pelures de pommes de terre, seul l'impact d'une modification du pH du milieu a été évalué. Toutefois, la modulation de la distribution en AGV produits en réacteur continu ne se résume pas au pH, mais met en jeu de nombreux facteurs supplémentaires parmi lesquels la composition de l'intrant, la nature de l'inoculum, la charge organique, la température ou encore le temps de séjour hydraulique. Dans cette partie, seule la nature du substrat sera évoquée.

La nature de l'intrant (et notamment les fractions respectives en sucres, protéines et lipides) conditionne le profil des produits de fermentation. Par exemple, un substrat riche en sucres contribue à l'accumulation de butyrate et d'éthanol, tandis qu'un substrat riche en protéines dirige la production d'AGV vers le propionate et le valérate (Ma et al., 2017). Dans l'optique d'une production de P(3HB-co-3HV) avec une teneur en 3HV élevée, il semble, dès lors, préférable de prioriser des déchets avec une importante fraction protéique. Pour mieux rendre compte de l'influence de la nature du substrat sur le spectre d'AGV, les résultats obtenus avec les pelures de pommes de terre à pH 6 ont été confrontés à plusieurs études conduites avec divers substrats (Tableau 15). La comparaison a été bornée à des études opérées en réacteur batch en conditions mésophiles et avec des paramètres opératoires analogues (i. e. même pH, pourcentages en matières sèches du substrat similaires, et ratios substrat/inoculum comparables). Outre le type de substrat, seule la nature de l'inoculum diffère d'une étude à l'autre.

La distribution des AGV est singulière et propre à chaque substrat utilisé. Néanmoins, la proportion en AGV à chaînes latérales paires reste généralement largement majoritaire, qu'il s'agisse, en particulier, de l'acétate (Shin et al., 2004) ou du butyrate (Jiang et al., 2013 ; Kim et al., 2003 ; Paillet, 2017). En considération de ces résultats, peu de substrats semblent permettre d'atteindre des fractions en AGV impaires en accord avec les teneurs souhaitées en 3HV dans le polymère P(3HB-co-3HV), et notamment en vue de la réalisation de films plastiques. Dans la perspective de la mise en œuvre d'un procédé de production de PHA à partir de déchets,

le choix des effluents en entrée du réacteur d'acidogénèse apparait primordial. Pour garantir la réussite du procédé, il faudra alors s'assurer que le substrat utilisé puisse fournir des fractions suffisantes en propionate ou valérate.

**Tableau 15.** Distribution des AGV selon la nature du substrat et le type d'inoculum utilisé. Toutes les études ont été réalisées en réacteur batch en conditions mésophiles (30 à 37°C). Le pH a été contrôlé à une même valeur 6,5 durant toute la durée de la fermentation, à l'exception de l'étude de Paillet (2017). Nomenclature : %MS : pourcentage de matières sèches ; %AGV : pourcentage de chaque AGV ; H-Ac : acide acétique ; H-pro : acide propionique ; n-But : acide butyrique et isobutyrique ; n-Val : acide valérique et isovalérique.

Référence	Inoculum	Substrat	%MS	pH	%AGV (mol.mol <sup>-1</sup> )				
					H-Ac	H-Pro	n-But	n-Val	Autres
Jiang et al., (2013)	Boues anaérobies mésophiles	Déchets alimentaires simulés	2%	6	16%	13%	60%	12%	-
Kim et al., (2003)	Granules anaérobies mésophiles	Boues primaires simulées (nourriture animale)	4%	6,5	32%	23%	45%	-	-
Shin et al., (2004)	Boues anaérobies mésophiles	Déchets alimentaires	2,4%	6,5	41%	36%	14%	-	10%
Paillet (2017)	Lixiviat d'enfouissement	Fraction organique des déchets solides municipaux	3%	6,5	35%	-	57%	-	8%
Digan (2019)	Boues de station d'épuration	Fraction organique des déchets solides ménagers	5%	6,5	34%	21%	41%	4%	-
Cette étude	Boues anaérobies mésophiles	Pelures de pommes de terre	7%	6,5	37%	52%	10%	1%	-

De plus, un grand nombre d'applications envisageables pour les PHA (autres que celle de la filière plastique) nécessite de pouvoir garantir une production de polymères avec la même composition monomérique. C'est particulièrement important dans le cadre d'applications médicales (implants) ou pharmaceutiques (supports de médicament), pour lesquelles les propriétés des polymères doivent être parfaitement définies, sans quoi la fonction du PHA ne peut pas être contrôlée de manière reproductible en raison de vitesses de dégradation différentes (Elmowafy et al., 2019 ; Misra et al., 2006). Dès lors, la diversité des spectres d'AGV produits selon le type d'intrant impose de bien contrôler l'étape d'acidogénèse, pour pouvoir ensuite être capable de bien contrôler les propriétés du polymère.

## **IV. Conclusion**

La modulation de la composition du polymère P(3HB-co-3HV) est un facteur déterminant dans l'évaluation des performances de production de PHA. Dans cette idée, l'influence des différents paramètres opératoires du procédé bi-étagé sur la teneur en 3HV au sein du copolymère a été examinée. Il a été mis en avant qu'en manipulant les conditions de culture, il était alors possible d'ajuster la composition du polymère. La culture en chemostat permet ainsi de synthétiser des PHA sur-mesure et d'exercer un contrôle fin sur les propriétés thermomécaniques du polymère.

Plus précisément, il a été mis en évidence une corrélation entre la fraction en propionate au sein du mélange carboné et la teneur en 3HV dans le polymère. Cette relation est notamment caractérisée par une diminution du rendement de conversion du propionate en 3HV dès lors que le pourcentage en propionate excède 50 mol%. Dans ces conditions, la décarboxylation du propionate est inévitable pour produire en partie le pool d'acétyl-CoA requis pour la synthèse de 3HV.

Par ailleurs, la sélection microbienne semble jouer un rôle clé dans la composition du polymère produit. En alimentant avec un même mélange acétate/propionate, les teneurs en 3HV respectivement obtenues avec un consortium caractérisé par la dominance d'*Acinetobacter* et un consortium essentiellement constitué de microorganismes du genre *Malikia*, se distinguent très nettement. Même avec une alimentation unique en propionate, la fraction en 3HV reste limitée à 24 mol% si *Acinetobacter* est majoritaire. Au contraire, lorsque *Malikia* est dominant, la teneur en 3HV s'élève à 37 mol% quand le propionate ne représente pourtant que 36 mol% du carbone consommé. Le devenir du propionate pendant la synthèse de P(3HB-co-3HV) apparaît donc comme intimement lié à l'identité du genre microbien dominant.

De surcroît, il a été démontré que la nature de l'AGV associé au propionate conditionne significativement la structure du polymère. Substituer l'acétate par du butyrate restreint considérablement les teneurs en unités 3HV pouvant être atteintes. Enfin, il a également été évoqué l'influence du type et de l'intensité de limitation nutritionnelle. Bien que les mécanismes de régulation de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de P(3HB-co-3HV) soient complexes, il a toutefois été mis en exergue qu'ils semblent dépendre de la nature de la limitation. Il a été notamment révélé que l'imposition d'une carence en azote n'était pas bénéfique à la production de motifs 3HV.

Ces différents éléments ont incité à redéfinir les conditions optimales du procédé de production de PHA en réacteur continu bi-étagé. Afin de pouvoir maintenir une forte productivité en PHA tout en s'assurant une teneur en 3HV dans le polymère en phase avec les exigences industrielles, il a été recommandé d'appliquer les paramètres opératoires suivant :

- **étage de sélection** : alimentation avec un mélange acétate/propionate, fort degré de limitation en P



- **étage de production** : alimentation avec acétate/propionate (avec une fraction en propionate supérieure à 35 mol%), carence en phosphore, pas de limitation en azote

De plus, plusieurs pistes d'amélioration ont été suggérées, en particulier dans l'idée d'accroître la dominance de *Malikia* sans avoir besoin d'appliquer un très fort ratio C/P.

Finalement, un aperçu des enjeux liés à la mise en place d'un étage préalable de fermentation acidogène a été donné, en vue d'une production de PHA directement à partir d'effluents réels. L'exemple des pelures de pommes de terre a permis de mettre en évidence la possibilité de pouvoir moduler la distribution des AGV produits en acidifiant le pH de culture. La nature de l'intrant paraît également être un facteur déterminant.

# **CONCLUSION GENERALE**

---



## **I. Rappel du contexte et description de l'approche scientifique**

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le paradigme émergent de l'économie circulaire et tentent d'apporter une contribution face à l'urgence environnementale. Précisément, l'objectif était de développer un procédé innovant, capable de concilier trois enjeux majeurs :

- Participer aux efforts liés à la réduction de la pollution plastique
- Contribuer à la nouvelle conception des usines de traitement de eaux usées visant à passer d'une logique d'épuration à une logique de valorisation des effluents
- Proposer une voie de valorisation de résidus de l'industrie agro-alimentaire

Parmi les polymères biosourcés et biodégradables, les polyhydroxyalcanoates (PHA) apparaissent comme l'un des plus prometteurs du fait qu'ils peuvent être synthétisés par une grande diversité d'organismes et à partir d'un large éventail de matières premières. Le but de ces travaux de recherche était alors d'orienter la production vers un PHA ciblé, le copolymère P(3HB-co-3HV) (avec une teneur élevée en unités 3HV) dont les caractéristiques thermomécaniques répondent aux attentes industrielles. Dans la logique de valorisation, le procédé a été opéré avec des consortia microbiens issus de boues activées du traitement des eaux usées. La production de PHA en cultures mixtes nécessite une étape de sélection de microorganismes producteurs de PHA, avant de procéder à l'accumulation. La stratégie d'enrichissement la plus répandue (système ADF) a montré son efficacité et est aujourd'hui déployée à l'échelle pilote. En revanche, elle présente certaines contraintes inhérentes au mode de production en discontinu. De ce fait, il a été choisi d'orienter ces travaux sur la mise en œuvre d'un procédé de sélection microbienne et d'accumulation de PHA en réacteur continu. La faisabilité de l'enrichissement en bactéries productrices de PHA en culture continue a été déjà éprouvée, et est basée sur l'application d'une double limitation en carbone et phosphore. Néanmoins, cette stratégie de sélection n'a été vérifiée qu'en alimentant en acétate ou acétate/butyrate, alors que la synthèse de 3HV nécessitent un apport en AGV avec une chaîne latérale impaire.

Dès lors, l'objectif majeur de cette thèse a été d'étudier un procédé de production de P(3HB-co-3HV) en réacteur continu bi-étagé à partir de cultures mixtes, en s'intéressant notamment à l'influence de la nature de la source de carbone, sur (1) la sélection microbienne, (2) les performances de production de PHA et (3) la teneur en unités 3HV dans le polymère produit.

Dans cette idée, les réacteurs ont été alimentés avec deux mélanges de carbone incorporant du propionate (acétate/propionate et butyrate/propionate). Le réacteur de sélection a été soumis à différents niveaux de limitation en phosphore, alors que le réacteur de production, en série du réacteur de sélection, a été conduit en conditions de carence en P, et avec différents degrés de limitation en azote. En parallèle des étages de production, l'accumulation de PHA à partir des consortia sélectionnés a été testée en réacteur batch, pour

définir les potentialités d'accumulation de PHA des dits consortia. De plus, un modèle cinétique a été établi avec pour ambition de mieux comprendre les mécanismes en lien avec la production de PHA. Enfin, une analyse annexe du potentiel de production d'AGV à partir de pelures de pommes de terre a été réalisée avec l'idée de pouvoir mettre en perspective l'intégration d'une étape préalable de fermentation acidogène.

Cette thèse, réalisée dans le cadre du programme de recherche ANR LOOP4PACK, avait ainsi pour objectif d'apporter des éléments de réponses aux questions suivantes :

- La sélection de surproducteurs de PHA en culture continue avec l'application d'une double limitation C&P est-elle reproductible avec un mélange incluant du propionate ?
- Quelle est l'influence de la nature de la source de carbone sur la sélection microbienne ? Et quelles sont les potentialités de production de PHA des consortia sélectionnés selon le substrat utilisé ?
- Quels sont les effets des différents paramètres opératoires sur les performances de production de PHA et la composition du polymère produit ?

## **II. Résultats majeurs**

L'étude de l'étape de sélection a mis en évidence une redirection de la consommation du carbone vers le stockage de PHA avec l'intensification de la limitation en P, quelle que soit la source de carbone dans le flux d'alimentation. La conservation de la réponse microbienne atteste de la reproductibilité de la stratégie de sélection avec des mélanges intégrant du propionate. De plus, la substitution transitoire du mélange acétate/propionate par l'un des deux substrats a permis de souligner la faculté d'adaptation de populations et leurs capacités d'assimilation de chacun des deux substrats composant le mélange. La capacité d'une culture continue ouverte conduite sous double limitation C&P à sélectionner des stockeurs de PHA est donc robuste et systématique. Concernant la limitation en P, il semble important de mentionner que la montée en limitation doit être progressive, sans quoi une partie du carbone consommé est déviée vers la production d'exopolysaccharides (EPS) ou la maintenance cellulaire.

La culture en chemostat a également permis une investigation du métabolisme cellulaire. En comparant les résultats obtenus lors de cette étude avec ceux définis à partir d'autres substrats carbonés, il a été possible d'étudier l'influence de la source de carbone sur la distribution du carbone consommé. Bien que la réponse microbienne suite à l'augmentation du  $(C/P)_{app}$  soit invariablement conservée, il a été mis en exergue que le devenir du carbone était substrat-dépendant. En particulier, le propionate peut être notamment associé avec une augmentation de la maintenance.

La sélection microbienne a ensuite été qualifiée d'un point de vue microbiologique et cinétique.

L'analyse de la composition des consortia a mis en exergue la présente systématique de certaines espèces microbiennes et la relative conservation de la distribution microbienne, en dépit de l'utilisation d'inoculum différents vis-à-vis de ceux utilisés par Cavaillé (2015) ou Morgado-Ferreira (2017) (prélevés sur des stations d'épuration et à des temps différents). Ces observations attestent d'une forte convergence microbiologique, en plus de la stabilité fonctionnelle et confirment le lien supposé entre limitation P et sélection d'organismes producteurs de PHA.

Trois populations se disputent la dominance au sein des consortia selon les conditions opératoires :

- (1) *Acinetobacter* spp., favorisé à des taux de dilution élevés et par la présence d'acétate
- (2) *Malikia* spp., avantageé avec une alimentation en butyrate et par un fort niveau de limitation P
- (3) *Zoogloea* spp., dominant à de faibles taux de dilution, quel que soit le substrat ou le ratio C/P

Il convient également de stipuler que les cultures opérées avec le mélange acétate/propionate ont présenté une particularité : il s'agit des seules cultures pour lesquelles la variation du degré de limitation en P a induit une modification majeure de la dominance microbienne. En effet, l'augmentation du ratio C/P a conduit à une émergence progressive de *Malikia*, aux dépens d'*Acinetobacter*. Par ailleurs, l'utilisation du modèle de Monod a permis de représenter les dynamiques de sélection et de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la compétition microbienne en chemostat.

La mise en culture en réacteur batch des consortia sélectionnés a renseigné sur l'influence de la source de carbone sur les potentialités de production de PHA. Il a premièrement été mis en exergue le phénomène d'effet mémoire des cellules par rapport à une source de carbone : le propionate doit être nécessairement présent dans le flux d'alimentation de l'étage de sélection pour pouvoir être rapidement consommé durant la phase d'accumulation de PHA. De surcroit, la nature du substrat conditionne les cinétiques de production et l'efficacité de conversion du carbone. D'une manière générale, le butyrate peut être qualifié de substrat préférentiel, à l'inverse du propionate, substrat pour lequel les rendements observés sont les plus faibles.

L'influence respective des conditions opératoires (substrat utilisé, teneur intracellulaire en P et composition du consortium microbien) a été évaluée à partir de la détermination des vitesses spécifiques maximales de production de PHA ( $q_{PHAmax}$ ). Il a été mis en avant que l'identité du genre microbien dominant joue un rôle fondamental sur les potentialités d'accumulation des consortia. Une nette distinction a pu être établie entre les producteurs médiocres (*Acinetobacter*) d'une part, et les surproducteurs (*Malikia* ou *Zoogloea*) d'autre part. La teneur intracellulaire en P est également un facteur déterminant. Concernant la source de carbone, il a été rapporté que la présence de propionate dans l'alimentation induisait une diminution des cinétiques de production. Cette tendance paraît liée aux propriétés métaboliques du substrat, mais s'explique surtout par l'absence d'une très forte dominance de populations surproductrices de PHA.

L'utilisation préférentielle du substrat pour la croissance et non pour le stockage de PHA lors de la sélection d'*Acinetobacter* a incité à expérimenter l'application d'une carence en azote (en plus de la carence en P) durant l'accumulation de PHA. Dès lors, il a été mis en évidence que l'absence d'azote disponible paralysait totalement la croissance et tendait à standardiser les cinétiques d'accumulation de PHA. La carence en N est alors profitable à *Acinetobacter* mais restreint considérablement les capacités de production de PHA de consortia au sein desquels *Malikia* est dominant.

Sur la base des résultats expérimentaux, un modèle cinétique, décrivant les processus cellulaires (croissance, stockage, maintenance) selon les conditions opératoires, a été établi en incluant les effets liés à la présence d'azote. En confrontant la modélisation à l'expérience, il a été possible d'estimer les grandeurs cinétiques des microorganismes. Il a ainsi été montré que le modèle possédait une bonne aptitude à représenter les processus cités.

L'accumulation de PHA a ensuite été étudiée en culture continue, et plus précisément, à partir des résultats obtenus dans l'étage de production du réacteur bi-étagé. Les performances de production ont été évaluées au travers de l'influence de trois facteurs, qui ont permis de définir la stratégie à adopter pour optimiser la productivité en PHA : (1) une surcharge en propionate dans le flux d'alimentation génère une amplification des réactions de maintenance ; (2) l'augmentation de la fraction en propionate dans le mélange de carbone limite la productivité ; (3) l'intensification d'une limitation en azote restreint la production de PHA dans la mesure où il semble préférable de maintenir une croissance résiduelle. Enfin, il a été reporté qu'associer le propionate au butyrate plutôt qu'à l'acétate permettait de maximiser la productivité en PHA. A l'issue des conditions expérimentales les plus favorables (caractérisée par une alimentation en butyrate/propionate, un ratio (C/P) de 250 Cmol.Pmol<sup>-1</sup> et un ratio (C/N) de 35 Cmol.Nmol<sup>-1</sup>), la productivité en PHA a atteint 1,00 gDCO.(L.h)<sup>-1</sup>.

Les performances de production ont ensuite été abordées du point de vue de la qualité du polymère stocké, autrement dit du point de vue de la composition du polymère. Il a été mis en lumière qu'en manipulant les conditions de culture, il était alors possible d'ajuster la composition du polymère. Les effets des paramètres opératoires du procédé sur la teneur en 3HV dans le copolymère P(3HB-co-3HV) ont été passés en revue. Outre la fraction en propionate consommé, la nature de l'AGV associé au propionate joue un rôle essentiel. Il a également été relevé que l'identité du genre microbien dominant avait une influence déterminante sur la composition monomérique. Par exemple, avec un mélange acétate/propionate et une même fraction en propionate consommé (36 mol%), la teneur en 3HV s'élève à 37 et 11 mol% avec dominance de *Malikia* et d'*Acinetobacter*, respectivement.

En conclusion, la production de P(3HB-co-3HV) à partir de cultures microbiennes mixtes a, pour la première fois, été réalisée en réacteur continu bi-étagé. Compte tenu des productivités obtenues, ce procédé peut être considéré comme une alternative crédible aux procédés de production plus conventionnels. Le système étudié a révélé le rôle crucial de l'étape de sélection, qui conditionne la réussite du procédé. En particulier, la sélection de *Malikia* (par rapport à *Acinetobacter*) paraît indispensable, tant du point de vue des cinétiques de production que de la qualité du polymère produit.

La Figure 87 compile l'ensemble des paramètres opératoires gouvernant la production de PHA en procédé continu bi-étagé. Pour pouvoir concilier une forte productivité en PHA et une teneur en 3HV en phase avec les exigences industrielles, il est alors recommandé d'appliquer les paramètres suivants :

- étage de sélection : alimentation avec un mélange acétate/propionate, fort degré de limitation en P
- étage de production : alimentation avec acétate/propionate (avec une fraction en propionate supérieure à 35 mol%), carence en phosphore, pas de limitation en azote

### **III. Perspectives**

Les travaux menés dans cette thèse soulèvent de nombreuses perspectives, tant au niveau de l'optimisation de la conduite du procédé, que de la filière de production dans son ensemble.

Outre les pistes d'amélioration suggérées dans le chapitre 5, il paraît opportun de définir à l'avenir comment systématiser une forte dominance en microorganismes surproducteurs de PHA. Dans cette idée, il pourrait être envisagé d'isoler les souches d'intérêt et de les mettre en culture dans des conditions axéniques afin de pouvoir les caractériser cinétiquement avec précision. De la même façon, une co-culture de *Malikia* et d'*Acinetobacter* pourrait être considérée pour étudier plus finement la compétition microbienne entre ces deux espèces. La détermination de leurs grandeurs cinétiques exactes ( $\mu_{\max}$  et  $K_s$ ) permettrait alors de définir les paramètres opératoires à appliquer en cultures mixtes pour garantir l'implantation majeure de *Malikia*. A ce titre, la collaboration avec des équipes de recherche spécialisées en culture pure, comme cela a été le cas durant cette thèse, est à promouvoir.

Concernant la filière, un travail spécifique pourrait être effectué sur l'étape de fermentation acidogène de déchets organiques en vue de son intégration ultérieure au procédé. Pour prétendre pouvoir maintenir la teneur en 3HV dans le polymère, il paraît essentiel de définir les conditions opératoires permettant d'assurer un maintien de la fraction en propionate (ou valérate) dans le mélange de carbone. Enfin, les étapes en aval de la biosynthèse de PHA ne peuvent être négligées dans la perspective du développement d'une chaîne de production. En ce sens, dans la continuité de ce qui a été initié au cours de cette thèse, le travail d'analyse des lots de PHA produits, leur extraction et leur caractérisation, se devra d'être poursuivi.



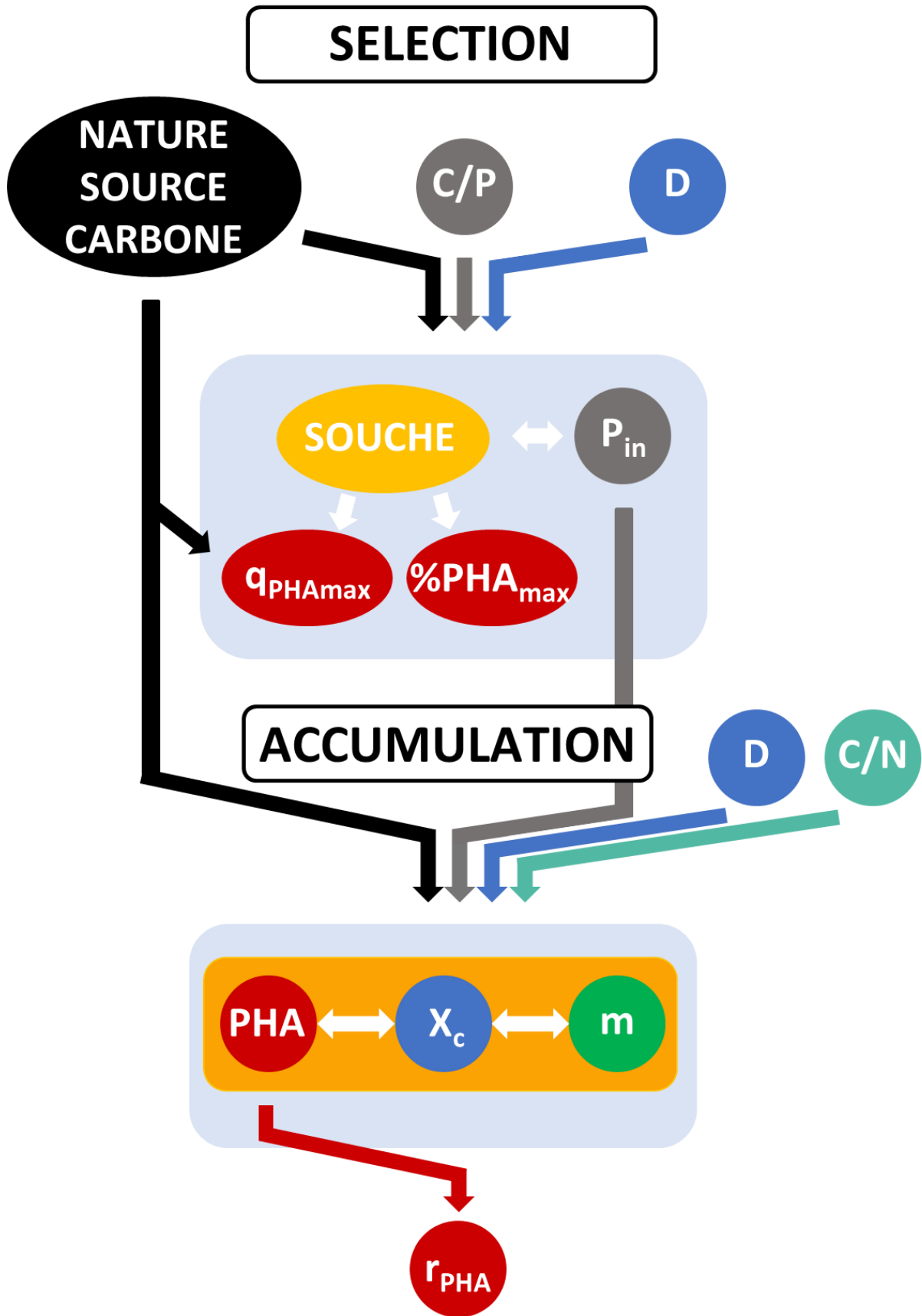


Figure 87. Schéma général des paramètres opératoires gouvernant la production de PHA en procédé continu bi-étagé.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Albuquerque, M.G.E., Concas, S., Bengtsson, S., Reis, M.A.M., 2010. Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: The use of a 2-stage CSTR system for culture selection. *Bioresour. Technol.* 101, 7112–7122.
- Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* 130, 411–421.
- Albuquerque, M.G.E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., Reis, M.A.M., 2011. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *J. Biotechnol.* 151, 66–76.
- Amstutz, V., Hanik, N., Pott, J., Utsunomia, C., Zinn, M., 2019. Tailored biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in chemostat cultures, in: Bruns, N., Loos, K. (Eds.), *Methods in Enzymology, Enzymatic Polymerizations*. Academic Press, pp. 99–123.
- Amulya, K., Jukuri, S., Venkata Mohan, S., 2015. Sustainable multistage process for enhanced productivity of bioplastics from waste remediation through aerobic dynamic feeding strategy: Process integration for up-scaling. *Bioresour. Technol.* 188, 231–239.
- Anderson, A.J., Haywood, G.W., Dawes, E.A., 1990. Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). *Int. J. Biol. Macromol., Special Conference Issue* 12, 102–105.
- Andrews, J.H., Harris, R.F., 1986. r- and K-Selection and Microbial Ecology, in: Marshall, K.C. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology, Advances in Microbial Ecology*. Springer US, Boston, MA, pp. 99–147.
- Anterrieu, S., Quadri, L., Geurkink, B., Dinkla, I., Bengtsson, S., Arcos-Hernandez, M., Alexandersson, T., Morgan-Sagastume, F., Karlsson, A., Hjort, M., Karabegovic, L., Magnusson, P., Johansson, P., Christensson, M., Werker, A., 2014. Integration of biopolymer production with process water treatment at a sugar factory. *New Biotechnol., Polyhydroxyalkanoate (PHA) by Mixed Microbial Cultures: Fermentation, Control and Downstream Processing* 31, 308–323.
- Aragao, G.M.F. de, 1996. Production de poly-beta-hydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures. INSA de Toulouse.
- Arcos-Hernández, M.V., Laycock, B., Donose, B.C., Pratt, S., Halley, P., Al-Luaibi, S., Werker, A., Lant, P.A., 2013. Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV). *Eur. Polym. J., Biobased Polymers and Related Materials* 49, 904–913.
- Attramadal, K.J.K., Øie, G., Størseth, T.R., Alver, M.O., Vadstein, O., Olsen, Y., 2012. The effects of moderate ozonation or high intensity UV-irradiation on the microbial environment in RAS for marine larvae. *Aquaculture* 330–333, 121–129.
- Axe, D.D., Bailey, J.E., 1995. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 8–19.
- Babel, W., Ackermann, J.U., Breuer, U., 2001. Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly(3HB). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 125–157.
- Barham, P.J., Barker, P., Organ, S.J., 1992. Physical properties of poly(hydroxybutyrate) and copolymers of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate. *FEMS Microbiol. Rev.* 9, 289–298.
- Barnard, G.N., Sanders, J.K.M., 1989. The Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Granule in vivo: A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *J. Biol. Chem.* 264, 3286–3291.

- Basak, B., Ince, O., Artan, N., Yagci, N., Ince, B.K., 2011. Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34, 1007–1016.
- Basset, N., Katsou, E., Frison, N., Malamis, S., Dosta, J., Fatone, F., 2016. Integrating the selection of PHA storing biomass and nitrogen removal via nitrite in the main wastewater treatment line. *Bioresour. Technol.* 200, 820–829.
- Bates, F.S., Fredrickson, G.H., 1990. Block copolymer thermodynamics: theory and experiment. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41, 525–557.
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Valentino, F., Vallini, G., Villano, M., 2009. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic–aerobic process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 901–908.
- Bengtsson, S., 2009. The utilization of glycogen accumulating organisms for mixed culture production of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 698–708.
- Bengtsson, S., Karlsson, A., Alexandersson, T., Quadri, L., Hjort, M., Johansson, P., Morgan-Sagastume, F., Anterrieu, S., Arcos-Hernandez, M., Karabegovic, L., Magnusson, P., Werker, A., 2017. A process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from municipal wastewater treatment with biological carbon and nitrogen removal demonstrated at pilot-scale. *New Biotechnol.* 35, 42–53.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T., 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 99, 509–516.
- Boucher, J., Billard, G., 2019. The challenges of measuring plastic pollution. *Field Actions Sci. Rep. J. Field Actions* 68–75.
- Brämer, C.O., Steinbüchel, A., 2001. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. *Microbiology* 147, 2203–2214.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K.F., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65, 127–161.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Renner, G., Zeiser, A., Haage, G., Loidl-Lanthaler, K., 1995. Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization. *Can. J. Microbiol.* 41, 239–248.
- Brison, A., Rossi, P., Derlon, N., 2022. Influent carbon to phosphorus ratio drives the selection of PHA-storing organisms in a single CSTR. *Water Res. X* 16, 100150.
- Brock, M., Buckel, W., 2004. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur. J. Biochem.* 271, 3227–3241.
- Brock, M., Fischer, R., Linder, D., Buckel, W., 2000. Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Mol. Microbiol.* 35, 961–973.
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.* 8, 791–808.
- Byrom, D., 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* 5, 246–250.
- Carta, F., Beun, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 2001. Simultaneous storage and degradation of phb and glycogen in activated sludge cultures. *Water Res.* 35, 2693–2701.
- Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., 2014. The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *New*

- Biotechnol., Polyhydroxyalkanoate (PHA) by Mixed Microbial Cultures: Fermentation, Control and Downstream Processing 31, 257–263.
- Cavaillé, L., 2015. Production de Polyhydroxybutyrates à partir d'acides gras volatils en culture ouverte : influence du degré de limitation en phosphore sur les réponses cinétiques et les sélections microbiennes. INSA de Toulouse.
- Cavaillé, L., Albuquerque, M., Grousseau, E., Lepeuple, A.-S., Uribelarrea, J.-L., Hernandez-Raquet, G., Paul, E., 2016. Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth conditions in non-axenic continuous culture. *Bioresour. Technol.* 201, 65–73.
- Cavaillé, L., Grousseau, E., Pocquet, M., Lepeuple, A.-S., Uribelarrea, J.-L., Hernandez-Raquet, G., Paul, E., 2013. Polyhydroxybutyrate production by direct use of waste activated sludge in phosphorus-limited fed-batch culture. *Bioresour. Technol.* 149, 301–309.
- Chakravarty, P., Mhaisalkar, V., Chakrabarti, T., 2010. Study on poly-hydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system. *Bioresour. Technol.* 101, 2896–2899.
- Chan, C.M., Vandi, L.-J., Pratt, S., Halley, P., Ma, Y., Chen, G.-Q., Richardson, D., Werker, A., Laycock, B., 2019. Understanding the effect of copolymer content on the processability and mechanical properties of polyhydroxyalkanoate (PHA)/wood composites. *Compos. Part Appl. Sci. Manuf.* 124, 105437.
- Chang, H.-F., Chang, W.-C., Tsai, C.-Y., 2012. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) from propionate-fed activated sludge under various carbon sources. *Bioresour. Technol.*, Special issue on the Challenges in Environmental Science and Engineering 113, 51–57.
- Chen, G.-Q., 2010. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates, in: Chen, G.G.-Q. (Ed.), *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology Monographs. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 17–37.
- Chen, Z., Guo, Z., Wen, Q., Huang, L., Bakke, R., Du, M., 2015. A new method for polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria selection under physical selective pressure. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 1329–1334.
- Chesbro, W., 1988. The domains of slow bacterial growth. *Can. J. Microbiol.* 34, 427–435.
- Chien, A.-C., Hill, N.S., Levin, P.A., 2012. Cell Size Control in Bacteria. *Curr. Biol.* 22, R340–R349.
- Chinwetkitvanich, S., Randall, C.W., Panswad, T., 2004. Effects of phosphorus limitation and temperature on PHA production in activated sludge. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 50, 135–143.
- Choi, J., Lee, S.Y., 1999. High-Level Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4363–4368.
- Chun, A.Y., Yunxiao, L., Ashok, S., Seol, E., Park, S., 2014. Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of *Escherichia coli* W. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 858–865.
- Coats, E.R., Watson, B.S., Brinkman, C.K., 2016. Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology. *Water Res.* 106, 26–40.
- Comeau, Y., Hall, K.J., Oldham, W.K., 1988. Determination of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate and Poly- $\beta$ -Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2325–2327.
- Cysneiros, D., Banks, C.J., Heaven, S., Karatzas, K.-A.G., 2011. The role of phase separation and feed cycle length in leach beds coupled to methanogenic reactors for digestion of a solid substrate (Part 2):

- Hydrolysis, acidification and methanogenesis in a two-phase system. *Bioresour. Technol.* 102, 7393–7400.
- Dalal, J., Sarma, P.M., Lavania, M., Mandal, A.K., Lal, B., 2010. Evaluation of bacterial strains isolated from oil-contaminated soil for production of polyhydroxyalkanoic acids (PHA). *Pedobiologia* 54, 25–30.
- Davenport, E.K., Call, D.R., Beyenal, H., 2014. Differential protection from tobramycin by extracellular polymeric substances from *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4755–4761.
- de Alexandre Sebastião, F., Pilarski, F., Lemos, M.V.F., 2013. Composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Flavobacterium columnare* isolated from tropical fish in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 44, 861–864.
- De Donno Novelli, L., Moreno Sayavedra, S., Rene, E.R., 2021. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. *Bioresour. Technol.* 331, 124985.
- De Grazia, G., Quadri, L., Majone, M., Morgan-Sagastume, F., Werker, A., 2017. Influence of temperature on mixed microbial culture polyhydroxyalkanoate production while treating a starch industry wastewater. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 5067–5075.
- Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G.E., Ramos, A.M., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* 6, 885–906.
- Digan, L., 2019. Production de molécules plateformes pour la valorisation des déchets organiques solides : étude de processus physiques et biologiques impactant la qualité du mélange d'acides organiques. INSA de Toulouse.
- Dionisi, D., Beccari, M., Gregorio, S., Majone, M., Papini, M.P., Vallini, G., 2005a. Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 1306–1318.
- Dionisi, D., Carucci, G., Papini, M.P., Riccardi, C., Majone, M., Carrasco, F., 2005b. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Res.* 39, 2076–2084.
- Dionisi, D., Majone, M., Papa, V., Beccari, M., 2004. Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 85, 569–579.
- Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S., Beccari, M., 2006. Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 76–88.
- Dircks, K., Beun, J.J., van Loosdrecht, M., Heijnen, J.J., Henze, M., 2001. Glycogen metabolism in aerobic mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 85–94.
- Doi, Y., 1990. Solid-state Properties of Copolyesters. *Microb. Polyest.* 107–32.
- Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., Tassin, B., 2017. A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environ. Pollut.* 221, 453–458.
- Du, G.C., Chen, J., Yu, J., Lun, S., 2001. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. *Biochem. Eng. J.* 8, 103–110.
- Duque, A.F., Oliveira, C.S.S., Carmo, I.T.D., Gouveia, A.R., Pardelha, F., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock

- shift: impact on polymer composition. *New Biotechnol., Polyhydroxyalkanoate (PHA) by Mixed Microbial Cultures: Fermentation, Control and Downstream Processing* 31, 276–288.
- Durner, R., Witholt, B., Egli, T., 2000. Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during Growth with Octanoate in Continuous Culture at Different Dilution Rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3408–3414.
- Durner, R., Zinn, M., Witholt, B., Egli, T., 2001. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 278–288.
- Edwards, V.H., 1970. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 12, 679–712.
- Egli, T., 1991. On multiple-nutrient-limited growth of microorganisms, with special reference to dual limitation by carbon and nitrogen substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60, 225–234.
- Egli, T., Lendenmann, U., Snozzi, M., 1993. Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63, 289–298.
- Egli, T., Zinn, M., 2003. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnol. Adv., VI International Symposium on Environmental Biotechnology* 22, 35–43.
- Egli, Th., Quayle, J.R., 1986. Influence of the Carbon: Nitrogen Ratio of the Growth Medium on the Cellular Composition and the Ability of the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* to Utilize Mixed Carbon Sources. *Microbiology* 132, 1779–1788.
- Ehlers, K., Bakken, L.R., Frostegård, Å., Frossard, E., Bünemann, E.K., 2010. Phosphorus limitation in a Ferralsol: Impact on microbial activity and cell internal P pools. *Soil Biol. Biochem.* 42, 558–566.
- Elmowafy, E., Abdal-Hay, A., Skouras, A., Tiboni, M., Casettari, L., Guarino, V., 2019. Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* 16, 467–482.
- Elser, J.J., Sterner, R.W., Gorokhova, E., Fagan, W.F., Markow, T.A., Cotner, J.B., Harrison, J.F., Hobbie, S.E., Odell, G.M., Weider, L.W., 2000. Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecol. Lett.* 3, 540–550.
- Erbilgin, O., Bowen, B.P., Kosina, S.M., Jenkins, S., Lau, R.K., Northen, T.R., 2017. Dynamic substrate preferences predict metabolic properties of a simple microbial consortium. *BMC Bioinformatics* 18, 57.
- Escapa, I.F., García, J.L., Bühler, B., Blank, L.M., Prieto, M.A., 2012. The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 14, 1049–1063.
- European Bioplastics, 2020. Nova Institute, European Bioplastics. Available at: <https://www.european-bioplastics.org/>.
- Fang, F., Xu, R.-Z., Huang, Y.-Q., Wang, S.-N., Zhang, L.-L., Dong, J.-Y., Xie, W.-M., Chen, X., Cao, J.-S., 2019. Production of polyhydroxyalkanoates and enrichment of associated microbes in bioreactors fed with rice winery wastewater at various organic loading rates. *Bioresour. Technol.* 292, 121978.
- Fang, H.H.P., Yu, H., 2002. Mesophilic acidification of gelatinaceous wastewater. *J. Biotechnol.* 93, 99–108.
- Fang, W., Zhang, X., Zhang, P., Wan, J., Guo, H., Ghasimi, D.S.M., Morera, X.C., Zhang, T., 2020. Overview of key operation factors and strategies for improving fermentative volatile fatty acid production and product regulation from sewage sludge. *J. Environ. Sci.* 87, 93–111.



- Fleit, E., 1995. Intracellular pH regulation in biological excess phosphorus removal systems. *Water Res.* 29, 1787–1792.
- Follonier, S., Goyder, M.S., Silvestri, A.-C., Crelier, S., Kalman, F., Riesen, R., Zinn, M., 2014. Fruit pomace and waste frying oil as sustainable resources for the bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Int. J. Biol. Macromol., Special Issue: Biodegradable biopolymers* 71, 42–52.
- Follonier, S., Riesen, R., Zinn, M., 2015. Pilot-scale Production of Functionalized mcl-PHA from Grape Pomace Supplemented with Fatty Acids. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 29, 113–121.
- Franck, S.E., 1999. Growth characteristics of *Acinetobacter johnsonii* 210A under single and dual nutrient limitation with special reference to carbon, nitrogen and phosphorus. ETH Zurich.
- Franklin, O., Hall, E.K., Kaiser, C., Battin, T.J., Richter, A., 2011. Optimization of Biomass Composition Explains Microbial Growth-Stoichiometry Relationships. *Am. Nat.*
- Frigon, D., Muyzer, G., van Loosdrecht, M., Raskin, L., 2006. rRNA and poly-beta-hydroxybutyrate dynamics in bioreactors subjected to feast and famine cycles. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2322–2330.
- Fuhs, G.W., 1969. Phosphorus content and rate of growth in the diatoms *Cyclotella Nana* and *Thalassiosira Fluviatilis*. *J. Phycol.* 5, 312–321.
- Gallet, R., Violle, C., Fromin, N., Jabbour-Zahab, R., Enquist, B.J., Lenormand, T., 2017. The evolution of bacterial cell size: the internal diffusion-constraint hypothesis. *ISME J.* 11, 1559–1568.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27, 153–176.
- Gatenholm, P., Kubát, J., Mathiasson, A., 1992. Biodegradable natural composites. I. Processing and properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 45, 1667–1677.
- Geyer, R., 2020. Chapter 2 - Production, use, and fate of synthetic polymers, in: Letcher, T.M. (Ed.), *Plastic Waste and Recycling*. Academic Press, pp. 13–32.
- Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, e1700782.
- Gironi, F., Piemonte, V., 2011. Bioplastics and Petroleum-based Plastics: Strengths and Weaknesses. *Energy Sources Part Recovery Util. Environ. Eff.* 33, 1949–1959.
- Godwin, C.M., Cotner, J.B., 2015. Stoichiometric flexibility in diverse aquatic heterotrophic bacteria is coupled to differences in cellular phosphorus quotas. *Front. Microbiol.* 6.
- Gogotov, I.N., Gerasin, V.A., Knyazev, Ya.V., Antipov, E.M., Barazov, S.Kh., 2010. Composite biodegradable materials based on polyhydroxyalkanoate. *Appl. Biochem. Microbiol.* 46, 607–613.
- Gokarn, R., Selifonova, O., Jessen, H.J., Gort, S.J., Selmer, T., Buckel, W., n.d. 3-hydroxypropionic acid and other organic compounds. US7186541.
- Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., Rehm, B.H.A., 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* 10, 660–669.
- Grousseau, E., 2012. Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez *Cupriavidus necator* sur substrats de type acides gras volatils : études cinétiques et métaboliques. Institut National des Sciences appliquées.

- Grousseau, E., Blanchet, E., Délérís, S., Albuquerque, M.G.E., Paul, E., Uribelarrea, J.-L., 2014. Phosphorus limitation strategy to increase propionic acid flux towards 3-hydroxyvaleric acid monomers in *Cupriavidus necator*. *Bioresour. Technol.* 153, 206–215.
- Grousseau, E., Blanchet, E., Délérís, S., Albuquerque, M.G.E., Paul, E., Uribelarrea, J.-L., 2013. Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. *Bioresour. Technol.* 148, 30–38.
- Guerrero, J., Guisasola, A., Baeza, J.A., 2011. The nature of the carbon source rules the competition between PAO and denitrifiers in systems for simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal. *Water Res.* 45, 4793–4802.
- Guillard, V., Gaucel, S., Fornaciari, C., Angellier-Coussy, H., Buche, P., Gontard, N., 2018. The Next Generation of Sustainable Food Packaging to Preserve Our Environment in a Circular Economy Context. *Front. Nutr.* 5.
- Guo, L., Vanrolleghem, P.A., 2014. Calibration and validation of an activated sludge model for greenhouse gases no. 1 (ASMG1): prediction of temperature-dependent N<sub>2</sub>O emission dynamics. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 151–163.
- Gurieff, N., Lant, P., 2007. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresour. Technol.* 98, 3393–3403.
- Hansen, S.R., Hubbell, S.P., 1980. Single-nutrient microbial competition: qualitative agreement between experimental and theoretically forecast outcomes. *Science* 207, 1491–1493.
- Hao, O.J., Chang, C.H., 1987. Kinetics of growth and phosphate uptake in pure culture studies of *Acinetobacter* species. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 819–831.
- Harder, W., Kuenen, J.G., 1977. A review. Microbial selection in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* 43, 1–24.
- Hartmann, R., Hany, R., Pletscher, E., Ritter, A., Witholt, B., Zinn, M., 2006. Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPO1: batch versus chemostat production. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 737–746.
- Hoelzle, R.D., Viridis, B., Batstone, D.J., 2014. Regulation mechanisms in mixed and pure culture microbial fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 2139–2154.
- Holmes, P.A., 1988. Biologically Produced (R)-3-Hydroxy- Alkanoate Polymers and Copolymers, in: Bassett, D.C. (Ed.), *Developments in Crystalline Polymers*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–65.
- Hong, K., Chen, G.Q., Yu, P.H., Zhang, G., Liu, Y., Chua, H., 2000. Effect of C:N molar ratio on monomer composition of polyhydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas mendocina* 0806 and *Pseudomonas pseudoalkaligenus* YS1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86, 971–980.
- Horiuchi, J.I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T., Kobayashi, M., 2002. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresour. Technol.* 82, 209–213.
- Horswill, A.R., Dudding, A.R., Escalante-Semerena, J.C., 2001. Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 19094–19101.
- Hu, W.F., Sin, S.N., Chua, H., Yu, P.H.F., 2005. Synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from excess activated sludge under various oxidation-reduction potentials (ORP) by using acetate and propionate as carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121–124, 289–301.

- Ivanova, G., Serafim, L.S., Lemos, P.C., Ramos, A.M., Reis, M. a. M., Cabrita, E.J., 2009. Influence of feeding strategies of mixed microbial cultures on the chemical composition and microstructure of copolyesters P(3HB-co-3HV) analyzed by NMR and statistical analysis. *Magn. Reson. Chem. MRC* 47, 497–504.
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347, 768–771.
- Jan, S., Roblot, C., Goethals, G., Courtois, J., Courtois, B., Saucedo, J.E., Séguin, J.P., Barbotin, J.N., 1995. Study of parameters affecting poly(3-hydroxybutyrate) quantification by gas chromatography. *Anal. Biochem.* 225, 258–263.
- Janarthanan, O.M., Laycock, B., Montano-Herrera, L., Lu, Y., Arcos-Hernandez, M.V., Werker, A., Pratt, S., 2016. Fluxes in PHA-storing microbial communities during enrichment and biopolymer accumulation processes. *New Biotechnol.* 33, 61–72.
- Jankowska, E., Chwiłkowska, J., Stodolny, M., Oleskiewicz-Popiel, P., 2015. Effect of pH and retention time on volatile fatty acids production during mixed culture fermentation. *Bioresour. Technol.* 190, 274–280.
- Jannasch, H.W., 1967. Enrichments of aquatic bacteria in continuous culture. *Arch. Für Mikrobiol.* 59, 165–173.
- Jendrossek, D., Pfeiffer, D., 2014. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ. Microbiol.* 16, 2357–2373.
- Jia, Q., Xiong, H., Wang, H., Shi, H., Sheng, X., Sun, R., Chen, G., 2014. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacterial consortium from excess sludge fermentation liquid at laboratory and pilot scales. *Bioresour. Technol.* 171, 159–167.
- Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., Li, M., 2013. Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresour. Technol.* 143, 525–530.
- Jiang, Y., Hebly, M., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2011a. Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Water Res.* 45, 1309–1321.
- Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2011b. Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2022–2035.
- Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2011c. Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor. *ISME J.* 5, 896–907.
- Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., Kleerebezem, R., 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Res.* 46, 5517–5530.
- Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2009. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules* 10, 670–676.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Res.* 44, 2141–2152.
- Juteau, P., Rho, D., Larocque, R., LeDuy, A., 1999. Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 863–868.

- Karpinets, T.V., Greenwood, D.J., Sams, C.E., Ammons, J.T., 2006. RNA:protein ratio of the unicellular organism as a characteristic of phosphorous and nitrogen stoichiometry and of the cellular requirement of ribosomes for protein synthesis. *BMC Biol.* 4, 30.
- Kessler, B., Witholt, B., 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol., Tailored Biopolymers* 86, 97–104.
- Kim, J.H., Kim, B.G., Choi, C.Y., 1992. Effect of propionic acid on poly ( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 14, 903–906.
- Kim, M., Gomec, C.Y., Ahn, Y., Speece, R.E., 2003. Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Environ. Technol.* 24, 1183–1190.
- Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2007. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 207–212.
- Koller, M., 2021. Chapter 1 - Production, properties, and processing of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters, in: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), *Microbial and Natural Macromolecules*. Academic Press, pp. 3–55.
- Koller, M., 2018a. Chemical and Biochemical Engineering Approaches in Manufacturing Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters of Tailored Structure with Focus on the Diversity of Building Blocks. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 32, 413–438.
- Koller, M., 2018b. A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation* 4, 30.
- Koller, M., 2014. Poly(hydroxyalkanoates) for Food Packaging: Application and Attempts towards Implementation. *Appl. Food Biotechnol.* 1, 3–15.
- Koller, M., Braunegg, G., 2015. Potential and Prospects of Continuous Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* 2, 94–121.
- Koller, M., Muhr, A., 2014. Continuous Production Mode as a Viable Process-Engineering Tool for Efficient Poly(hydroxyalkanoate) (PHA) Bio-Production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 28, 65–77.
- Koller, M., Mukherjee, A., 2022. A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters. *Bioengineering* 9, 74.
- Koller, M., Salerno, A., De Sousa Dias, M., Reiterer, A., Braunegg, G., 2010. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 255–269.
- Kourmentza, C., Kornaros, M., 2016. Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source. *Bioresour. Technol.* 222, 388–398.
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., Reis, M.A.M., 2017. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* 4, 55.
- Koyama, N., Doi, Y., 1995. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 17, 281–284.
- Kunioka, M., Soga, K., Doi, Y., Tamaki, A., 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- Kutralam-Muniasamy, G., Marsch, R., Pérez-Guevara, F., 2018. Investigation on the Evolutionary Relation of Diverse Polyhydroxyalkanoate Gene Clusters in Betaproteobacteria. *J. Mol. Evol.* 86, 470–483.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B., 1988. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2924–2932.
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D., 1993. Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39–40, 301–322.
- Lawrence, A.G., Choi, J., Rha, C., Stubbe, J., Sinskey, A.J., 2005. In vitro analysis of the chain termination reaction in the synthesis of poly-(R)-beta-hydroxybutyrate by the class III synthase from *Allochromatium vinosum*. *Biomacromolecules* 6, 2113–2119.
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., Lant, P., 2013. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Prog. Polym. Sci., Topical Issue on Biorelevant Polymers* 38, 536–583.
- Lebreton, L., Andrady, A., 2019. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Commun.* 5, 1–11.
- Lee, E.Y., Kang, S.H., Choi, C.Y., 1995. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by newly isolated *Agrobacterium* sp. SH-1 and GW-014 from structurally unrelated single carbon substrates. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 328–334.
- Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.* 235, 83–99.
- Lemos, P.C., Levantesi, C., Serafim, L.S., Rossetti, S., Reis, M.A.M., Tandoi, V., 2008. Microbial characterisation of polyhydroxyalkanoates storing populations selected under different operating conditions using a cell-sorting RT-PCR approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 351–360.
- Lemos, P.C., Serafim, L.S., Reis, M.A.M., 2006. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *J. Biotechnol.* 122, 226–238.
- Lenz, R.W., Marchessault, R.H., 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6, 1–8.
- Li, Z., Yang, J., Loh, X.J., 2016. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Mater.* 8, e265–e265.
- Lin, L., Li, X., 2018. Effects of pH adjustment on the hydrolysis of Al-enhanced primary sedimentation sludge for volatile fatty acid production. *Chem. Eng. J.* 346, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.005>
- Liu, C., Wang, H., Xing, W., Wei, L., 2013. Composition diversity and nutrition conditions for accumulation of polyhydroxyalkanoate (PHA) in a bacterial community from activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9377–9387.
- Løvdaal, T., Skjoldal, E.F., Heldal, M., Norland, S., Thingstad, T.F., 2008. Changes in morphology and elemental composition of *Vibrio splendidus* along a gradient from carbon-limited to phosphate-limited growth. *Microb. Ecol.* 55, 152–161.
- Ma, H., Liu, He, Zhang, L., Yang, M., Fu, B., Liu, Hongbo, 2017. Novel insight into the relationship between organic substrate composition and volatile fatty acids distribution in acidogenic co-fermentation. *Biotechnol. Biofuels* 10, 137.

- Majone, M., Dircks, K., Beim, J.J., 1999. Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. The state of the art. *Water Sci. Technol., Modelling and microbiology of activated sludge processes* 39, 61–73.
- Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., Suárez-Ojeda, M.E., 2020. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresour. Technol.* 297, 122478.
- Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2014. Impact of non-storing biomass on PHA production: An enrichment culture on acetate and methanol. *Int. J. Biol. Macromol., Special Issue: Biodegradable biopolymers* 71, 74–80.
- Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2013. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresour. Technol.* 142, 232–239.
- Marang, L., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2018. Enrichment of PHA-producing bacteria under continuous substrate supply. *New Biotechnol.* 41, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.001>
- Marzan, L.W., Shimizu, K., 2011. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* and *phoR* genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. *Microb. Cell Factories* 10, 39.
- Mason, C.A., Hamer, G., Bryers, J.D., 1986. The death and lysis of microorganisms in environmental processes. *FEMS Microbiol. Lett.* 39, 373–401. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90024-8)
- Matos, M., Cruz, R.A.P., Cardoso, P., Silva, F., Freitas, E.B., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2021. Combined Strategies to Boost Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit Waste in a Three-Stage Pilot Plant. *ACS Sustain. Chem. Eng.*
- McChalicher, C.W.J., Srienc, F., 2007. Investigating the structure–property relationship of bacterial PHA block copolymers. *J. Biotechnol., International Symposium on Biological Polyesters 2006* 132, 296–302.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., Epstein, W., 1994. Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 1911–1917.
- Meereboer, K.W., Misra, M., Mohanty, A.K., 2020. Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chem.* 22, 5519–5558.
- Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S.N., Jie, R., 2009. Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresour. Technol.* 100, 1399–1405.
- Misra, S.K., Valappil, S.P., Roy, I., Boccaccini, A.R., 2006. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 7, 2249–2258.
- Mitomo, H., Barham, P.J., Keller, A., 1987. Crystallization and Morphology of Poly(p-hydroxybutyrate) and Its Copolymer. *Polym. J.* 19, 1241–1253.
- Molnar, A., Lakat, T., Hosszu, A., Szebeni, B., Balogh, A., Orfi, L., Szabo, A.J., Fekete, A., Hodrea, J., 2021. Lyophilization and homogenization of biological samples improves reproducibility and reduces standard deviation in molecular biology techniques. *Amino Acids* 53, 917–928.
- Montano-Herrera, L., Laycock, B., Werker, A., Pratt, S., 2017. The Evolution of Polymer Composition during PHA Accumulation: The Significance of Reducing Equivalent. *Bioengineering* 4, 20.
- Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., Suárez-Ojeda, M.E., 2017. Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: Effect of pH and N and P concentrations. *Sci. Total Environ.* 583, 300–307.

- Moralejo-Gárate, H., Mar'atusalihat, E., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Microbial community engineering for biopolymer production from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 631–639.
- Moralejo-Gárate, H., Palmeiro-Sánchez, T., Kleerebezem, R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., van Loosdrecht, M.C.M., 2013. Influence of the cycle length on the production of PHA and polyglucose from glycerol by bacterial enrichments in sequencing batch reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 3148–3155.
- Morgado-Ferreira, A.L., 2017. Selection of a microbial consortium for EPS production for applications in water and wastewater treatment. INSA de Toulouse.
- Morgan-Sagastume, F., Hjort, M., Cirne, D., Gérardin, F., Lacroix, S., Gaval, G., Karabegovic, L., Alexandersson, T., Johansson, P., Karlsson, A., Bengtsson, S., Arcos-Hernández, M.V., Magnusson, P., Werker, A., 2015. Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. *Bioresour. Technol.* 181, 78–89.
- Mouginot, C., Kawamura, R., Matulich, K.L., Berlemont, R., Allison, S.D., Amend, A.S., Martiny, A.C., 2014. Elemental stoichiometry of Fungi and Bacteria strains from grassland leaf litter. *Soil Biol. Biochem.* 76, 278–285.
- Mulvaney, R., Schepers, J. s, Raun, W., 2008. Advances in Methodology for Research on Nitrogen Transformations in Soils, in: *Nitrogen in Agricultural Systems*.
- Mumtaz, T., Yahaya, N.A., Abd-Aziz, S., Abdul Rahman, N., Yee, P.L., Shirai, Y., Hassan, M.A., 2010. Turning waste to wealth-biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent – a Malaysian perspective. *J. Clean. Prod.* 18, 1393–1402.
- Neijssel, O.M., Tempest, D.W., 1976. Bioenergetic aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in carbon-limited and carbon-sufficient chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 107, 215–221.
- Neijssel, O.M., Tempest, D.W., 1975. The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms, growing in chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 106, 251–258.
- New Plastic Economy, 2019. *The New Plastic Economy 2019 Progress Report*.
- Nielsen, C., Rahman, A., Rehman, A.U., Walsh, M.K., Miller, C.D., 2017. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microb. Biotechnol.* 10, 1338–1352.
- Ntaikou, I., Valencia Peroni, C., Kourmentza, C., Ilieva, V.I., Morelli, A., Chiellini, E., Lyberatos, G., 2014. Microbial bio-based plastics from olive-mill wastewater: Generation and properties of polyhydroxyalkanoates from mixed cultures in a two-stage pilot scale system. *J. Biotechnol.* 188, 138–147.
- Obruca, S., Marova, I., Stankova, M., Mravcova, L., Svoboda, Z., 2010. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1261–1267.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., Pernicova, I., 2018. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv., Prospects in Biotechnology* 36, 856–870.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Krzyzanek, V., Mravec, F., Hrubanova, K., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., Marova, I., 2016. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. *PLOS One* 11, e0157778.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., Hrubanova, K., Milerova, M., Marova, I., 2017. The presence of PHB granules in cytoplasm protects

- non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol.* 39, 68–80.
- Oliveira, C.S.S., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A., 2017. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *New Biotechnol., Biopolymers Eu Symposium* 37, 69–79.
- Oshiki, M., Onuki, M., Satoh, H., Mino, T., 2008. PHA-accumulating microorganisms in full-scale wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 58, 13–20.
- Oshiki, M., Satoh, H., Mino, T., 2010. Acetate uptake by PHA-accumulating and non-PHA-accumulating organisms in activated sludge from an aerobic sequencing batch reactor fed with acetate. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 62, 8–14.
- Oshiki, M., Satoh, H., Okabe, S., 2016. Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Environ. Microbiol.* 18, 2784–2796.
- Øvreås, L., Bourne, D., Sandaa, R.-A., Casamayor, E.O., Benlloch, S., Goddard, V., Smeardon, G., Haldal, M., Thingstad, T.F., 2003. Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquat. Microb. Ecol.* 31, 109–121.
- Pagliano, G., Ventrino, V., Panico, A., Pepe, O., 2017. Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes. *Biotechnol. Biofuels* 10, 113.
- Paillet, F., 2017. Optimisation d'un procédé à deux étapes pour la production d'un mélange hydrogène/méthane (biohythane) à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères. *Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA)*.
- Pakalapati, H., Chang, C.-K., Show, P.L., Arumugasamy, S.K., Lan, J.C.-W., 2018. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *J. Biosci. Bioeng.* 126, 282–292.
- Pandolfi, D., Pons, M.-N., da Motta, M., 2007. Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis. *Biotechnol. Lett.* 29, 1263–1269.
- Pardelha, F., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., Dias, J.M.L., Oliveira, R., 2012. Flux balance analysis of mixed microbial cultures: Application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. *J. Biotechnol.* 162, 336–345.
- Paul, E., Neuhauser, E., Liu, Y., 2012. Biodegradable Bioplastics from Fermented Sludge, Wastes, and Effluents, in: *Biological Sludge Minimization and Biomaterials/Bioenergy Recovery Technologies*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 465–498.
- Pawlowsky, U., Howell, J.A., 1973. Mixed culture biooxidation of phenol. II. Steady state experiments in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 897–903.
- Peoples, O.P., Sinskey, A.J., 1989. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*)\*. *J. Biol. Chem.* 264, 15298–15303.
- Pereira, S.M.F., Sanchez, R.J., Rieumont, J., Cabrera, J.G., 2008. Synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoate copolymer from a renewable source by alternate feeding. *Polym. Eng. Sci.* 48, 2051–2060.
- Pirt, S.J., 1987. The energetics of microbes at slow growth rates: Maintenance energies and dormant organisms. *J. Ferment. Technol.* 65, 173–177.



- Plastics Europe, 2022. *Plastics – the Facts 2022*.
- Poblete-Castro, I., Escapa, I.F., Jäger, C., Puchalka, J., Chi Lam, C.M., Schomburg, D., Prieto, M.A., Martins dos Santos, V.A., 2012. The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach. *Microb. Cell Factories* 11, 34.
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G.R., Nicolaus, B., 2011. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea* 2011, e693253.
- Policastro, G., Panico, A., Fabbicino, M., 2021. Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 20, 479–513.
- Prieto, A., Escapa, I.F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N., Revelles, O., 2016. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 18, 341–357.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P., Ramsay, J.A., 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2093–2098.
- Rehm, B.H.A., 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 578–592.
- Reichert, P., 1998. *Aquasim 2.0-user manual*.
- Reis, M., Albuquerque, M., Villano, M., Majone, M., 2011. Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks. Elsevier, pp. 669–683.
- RESEDA, 2017. *Gisements et valorisations des coproduits des industries agroalimentaires*.
- Rhu, D.H., Lee, W.H., Kim, J.Y., Choi, E., 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 48, 221–228.
- Riis, V., Mai, W., 1988. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J. Chromatogr.* 445, 285–289.
- Rodríguez-Contreras, A., Guillem-Martí, J., Lopez, O., Manero, J.M., Ruperez, E., 2019. Antimicrobial PHAs coatings for solid and porous tantalum implants. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 182, 110317.
- Rojas-Tirado, P., Pedersen, P.B., Pedersen, L.-F., 2017. Bacterial activity dynamics in the water phase during start-up of recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng., Workshop on Recirculating Aquaculture Systems (III)* 78, 24–31.
- Royce, L.A., Liu, P., Stebbins, M.J., Hanson, B.C., Jarboe, L.R., 2013. The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8317–8327.
- Russell, J.B., Cook, G.M., 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59, 48–62.
- Russell, J.B., Diez-Gonzalez, F., 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 205–234.
- Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 22, 261–279.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G., Booth, I.R., 1984. The Effect of Food Preservatives on pH Homeostasis in *Escherichia coli*. *Microbiology* 130, 2845–2850.

- Sathiyarayanan, G., Yi, D.-H., Bhatia, S.K., Kim, J.-H., Seo, H.M., Kim, Y.-G., Park, S.-H., Jeong, D., Jung, S., Jung, J.-Y., Lee, Y.K., Yang, Y.-H., 2015. Exopolysaccharide from psychrotrophic Arctic glacier soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3 and its potential applications. *RSC Adv.* 5, 84492–84502.
- Satoh, H., Ramey, W.D., Koch, F.A., Oldham, W.K., Mino, T., Matsuo, T., 1996. Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage. *Water Sci. Technol., Water Quality International '96 Part 1: Nutrient Removal* 34, 9–16.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Bibers, I., Kalnin, M., 2000. Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochem.* 36, 445–450.
- Sealy-Lewis, H.M., Fairhurst, V., 1998. Isolation of mutants deficient in acetyl-CoA synthetase and a possible regulator of acetate induction in *Aspergillus niger*. *Microbiology* 144 ( Pt 7), 1895–1900.
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Krzyzaneck, V., Obruca, S., 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnol.* 49, 129–136.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., 2008a. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 615–628.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145–160.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Torres, C., Reis, M.A.M., Ramos, A.M., 2008b. The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures. *Macromol. Biosci.* 8, 355–366.
- Shen, J.-P., Chou, C.-F., 2016. Morphological plasticity of bacteria—Open questions. *Biomicrofluidics* 10, 031501.
- Shi, H., Shiraishi, M., Shimizu, K., 1997. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 579–587.
- Shimizu, H., Kozaki, Y., Kodama, H., Shioya, S., 1999. Maximum production strategy for biodegradable copolymer P(HB-co-HV) in fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 518–525.
- Shin, H.-S., Youn, J.-H., Kim, S.-H., 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrog. Energy* 29, 1355–1363.
- Silva, F., Campanari, S., Matteo, S., Valentino, F., Majone, M., Villano, M., 2017. Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *New Biotechnol.* 37, 90–98.
- Slaninova, E., Sedlacek, P., Mravec, F., Mullerova, L., Samek, O., Koller, M., Hesko, O., Kucera, D., Marova, I., Obruca, S., 2018. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1923–1931.
- Smolders, G.J.F., Meij, J. van der, Loosdrecht, M.C.M. van, Heijnen, J.J., 1994. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 461–470.
- Spring, S., Wagner, M., Schumann, P., Kämpfer, P., 2005. *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated

- sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 621–629.
- Stal, L.J., 1992. Poly(hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. *FEMS Microbiol. Lett.* 103, 169–180.
- Strong, P.J., Laycock, B., Mahamud, S.N.S., Jensen, P.D., Lant, P.A., Tyson, G., Pratt, S., 2016. The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane. *Microorganisms* 4, 11.
- Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T., 2000. Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process. *Water Sci. Technol.* 42, 351–356.
- Tamis, J., Lužkov, K., Jiang, Y., Loosdrecht, M.C.M. van, Kleerebezem, R., 2014. Enrichment of *Plasticumulans acidivorans* at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *J. Biotechnol.* 192, 161–169.
- Tempest, D.W., 1978. The biochemical significance of microbial growth yields: A reassessment. *Trends Biochem. Sci.* 3, 180–184.
- Tempest, D.W., 1970. Chapter XII The Continuous Cultivation of Micro-organisms: I. Theory of the Chemostat, in: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, pp. 259–276.
- Tempest, D.W., Neijssel, O.M., 1984. The status of YATP and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. *Annu. Rev. Microbiol.* 38, 459–486.
- Temudo, M.F., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., 2007. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 69–79.
- Terkaj, W., Tolio, T., 2019. The Italian Flagship Project: Factories of the Future, in: Tolio, T., Copani, G., Terkaj, W. (Eds.), *Factories of the Future: The Italian Flagship Initiative*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–35.
- Tezuka, Y., 1969. Cation-dependent flocculation in a *Flavobacterium* species predominant in activated sludge. *Appl. Microbiol.* 17, 222–226.
- Theil, S., Rifa, E., 2021. rANOMALY: AmplicoN wOrkflow for Microbial community AnaLYsis. *F1000Research* 10, 7.
- Thingstad, T.F., 1987. Utilization of N, P, and organic C by heterotrophic bacteria. I. Outline of a chemostat theory with a consistent concept of “maintenance” metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 35, 99–109.
- Thingstad, T.F., Øvreås, L., Egge, J.K., Løvdal, T., Heldal, M., 2005. Use of non-limiting substrates to increase size; a generic strategy to simultaneously optimize uptake and minimize predation in pelagic osmotrophs? *Ecol. Lett.* 8, 675–682.
- Tu, W., Zhang, D., Wang, H., 2019. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented thermal-hydrolyzed sludge by mixed microbial cultures: The link between phosphorus and PHA yields. *Waste Manag.* 96, 149–157.
- Upton, A.M., McKinney, J.D., 2007. Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 153, 3973–3982.
- Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanolli, G., Majone, M., 2014. Feed frequency in a Sequencing Batch Reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *New Biotechnol., Polyhydroxyalkanoate (PHA) by Mixed Microbial Cultures: Fermentation, Control and Downstream Processing* 31, 264–275.

- Valentino, F., Karabegovic, L., Majone, M., Morgan-Sagastume, F., Werker, A., 2015. Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels. *Water Res.* 77, 49–63.
- Valentino, F., Morgan-Sagastume, F., Campanari, S., Villano, M., Werker, A., Majone, M., 2017. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnol., Biopolymers Eu Symposium* 37, 9–23.
- van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Heijnen, J.J., 1997a. Biological phosphate removal processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 289–296.
- van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A., Heijnen, J.J., 1997b. Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Sci. Technol., Sequencing Batch Reactor Technology: Batch Application of Periodic Unsteady-state Processes* 35, 41–47.
- van Maris, A.J.A., Konings, W.N., Dijken, J.P. van, Pronk, J.T., 2004. Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metab. Eng.* 6, 245–255.
- van 't Riet, K., 1983. Mass transfer in fermentation. *Trends Biotechnol.* 1, 113–119.
- Veldkamp, H., Jannasch, H.W., 1972. Mixed culture studies with the chemostat. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22, 105–123.
- Venkateswar Reddy, M., Venkata Mohan, S., 2012. Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 114, 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.127>
- Verlinden, R. a. j., Hill, D. j., Kenward, M. a., Williams, C. d., Radecka, I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1437–1449.
- Vidal-Antich, C., Perez-Esteban, N., Astals, S., Peces, M., Mata-Alvarez, J., Dosta, J., 2021. Assessing the potential of waste activated sludge and food waste co-fermentation for carboxylic acids production. *Sci. Total Environ.* 757, 143763.
- Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., Majone, M., 2010. Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochem.* 45, 714–723.
- VOLATILE, 2019. VOLATILE Project: Biowaste derived volatile fatty acid platform for biopolymers, bioactive compounds and chemical building blocks. Available at: [http:// www.volatile-h2020.eu/theproject.html](http://www.volatile-h2020.eu/theproject.html).
- Vu, D.H., Åkesson, D., Taherzadeh, M.J., Ferreira, J.A., 2020. Recycling strategies for polyhydroxyalkanoate-based waste materials: An overview. *Bioresour. Technol.* 298, 122393.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeyer, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A.D., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26, 12.
- Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., Galla, H.-J., Kalscheuer, R., Stöveken, T., von Landenberg, P., Steinbüchel, A., 2005. Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Mol. Microbiol.* 55, 750–763.
- Walters, W., Hyde, E.R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J.A., Jansson, J.K., Caporaso, J.G., Fuhrman, J.A., Apprill, A., Knight, R., 2016. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4

- and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* 1, e00009-15.
- Wang, K., Yin, J., Shen, D., Li, N., 2014. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: Effect of pH. *Bioresour. Technol.* 161, 395–401.
- Wang, X., Carvalho, G., Reis, M.A.M., Oehmen, A., 2018. Metabolic modeling of the substrate competition among multiple VFAs for PHA production by mixed microbial cultures. *J. Biotechnol.* 280, 62–69.
- Wang, X., Oehmen, A., Freitas, E.B., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2017. The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. *Water Res.* 112, 269–278.
- Wang, Y., Yamada, S., Asakawa, N., Yamane, T., Yoshie, N., Inoue, Y., 2001. Comonomer compositional distribution and thermal and morphological characteristics of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with high 3-hydroxyvalerate content. *Biomacromolecules* 2, 1315–1323.
- Warnecke, T., Gill, R.T., 2005. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microb. Cell Factories* 4, 25.
- Weiner, R.M., 1997. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol.* 15, 390–394.
- Wen, Q., Chen, Z., Tian, T., Chen, W., 2010. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *J. Environ. Sci.* 22, 1602–1607.
- Werker, A., Bengtsson, S., Korving, L., Hjort, M., Anterrieu, S., Alexandersson, T., Johansson, P., Karlsson, A., Karabegovic, L., Magnusson, P., Morgan-Sagastume, F., Sijstermans, L., Tietema, M., Visser, C., Wypkema, E., van der Kooij, Y., Deeke, A., Uijterlinde, C., 2018. Consistent production of high quality PHA using activated sludge harvested from full scale municipal wastewater treatment - PHARIO. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 78, 2256–2269.
- Werker, A., Lind, P., Bengtsson, S., Nordström, F., 2008. Chlorinated-solvent-free gas chromatographic analysis of biomass containing polyhydroxyalkanoates. *Water Res.* 42, 2517–2526.
- Werker, A.G., 2006. An evaluation of full-scale activated sludge dynamics using microbial fatty acid analysis. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 54, 11–19.
- Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., van den Broek, P.J., van Dijken, J.P., 1994. Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Rev.* 58, 616–630.
- Winkler, M.-K.H., Boets, P., Hahne, B., Goethals, P., Volcke, E.I.P., 2017. Effect of the dilution rate on microbial competition: r-strategist can win over k-strategist at low substrate concentration. *PLoS One* 12, e0172785.
- Yamane, T., 1993. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 165–170.
- Yee, L.-N., Chuah, J.-A., Chong, M.-L., Phang, L.-Y., Raha, A.R., Sudesh, K., Hassan, M.A., 2012. Molecular characterisation of phaCAB from *Comamonas* sp. EB172 for functional expression in *Escherichia coli* JM109. *Microbiol. Res.* 167, 550–557.
- Yin, Q., Sun, Y., Li, B., Feng, Z., Wu, G., 2022. The r/K selection theory and its application in biological wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 824, 153836.
- Yoon, H., Klinzing, G., Blanch, H.W., 1977. Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1193–1210.

- YPACK, 2019. YPACK (High Performance Polyhydroxyalkanoates Based Packaging to Minimise Food Waste) About. Available at: <https://www.ypack.eu/about-ypack/>.
- Yu, J., 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *J. Biotechnol.* 86, 105–112.
- Yu, J., Si, Y., 2004. Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short chain fatty acids. *Biotechnol. Prog.* 20, 1015–1024.
- Zakaria, M.R., Ariffin, H., Mohd Johar, N.A., Abd-Aziz, S., Nishida, H., Shirai, Y., Hassan, M.A., 2010. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer from wild-type *Comamonas* sp. EB172. *Polym. Degrad. Stab., International Conference on Bio-based Polymers (ICBP 2009) "Ensuring A Sustainable Tomorrow"* 95, 1382–1386.
- Zalasiewicz, J., Waters, C.N., Ivar do Sul, J.A., Corcoran, P.L., Barnosky, A.D., Cearreta, A., Edgeworth, M., Gałuszka, A., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J.R., Steffen, W., Summerhayes, C., Wagnreich, M., Williams, M., Wolfe, A.P., Yonan, Y., 2016. The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene* 13, 4–17.
- Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.-L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T.M., Raetz, C.R.H., López-Lara, I.M., Geiger, O., 2010. *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 302–307.
- Zeng, S., Song, F., Lu, P., He, Q., Zhang, D., 2018. Improving PHA production in a SBR of coupling PHA-storing microorganism enrichment and PHA accumulation by feed-on-demand control. *AMB Express* 8, 97.
- Zhang, B., Zhang, L.-L., Zhang, S.-C., Shi, H.-Z., Cai, W.-M., 2005. The Influence of pH on Hydrolysis and Acidogenesis of Kitchen Wastes in Two-phase Anaerobic Digestion. *Environ. Technol.* 26, 329–340.
- Zhao, D., Cai, L., Wu, J., Li, M., Liu, H., Han, J., Zhou, J., Xiang, H., 2013. Improving polyhydroxyalkanoate production by knocking out the genes involved in exopolysaccharide biosynthesis in *Haloferax mediterranei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3027–3036.
- Zimmerman, A.E., Allison, S.D., Martiny, A.C., 2014. Phylogenetic constraints on elemental stoichiometry and resource allocation in heterotrophic marine bacteria. *Environ. Microbiol.* 16, 1398–1410.
- Zinn, M., Durner, R., Zinn, H., Ren, Q., Egli, T., Witholt, B., 2011. Growth and accumulation dynamics of poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) in *Pseudomonas putida* GPo1 cultivated in continuous culture under transient feed conditions. *Biotechnol. J.* 6, 1240–1252.
- Zinn, M., Hany, R., 2005. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Adv. Eng. Mater.* 7, 408–411. h
- Zinn, M., Weilenmann, H.-U., Hany, R., Schmid, M., Egli, T., 2003. Tailored Synthesis of Poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428. *Acta Biotechnol.* 23, 309–316.
- Zinn, M., Witholt, B., Egli, T., 2004. Dual nutrient limited growth: models, experimental observations, and applications. *J. Biotechnol., Highlights from the ECB11: Building Bridges between Biosciences and Bioengineering* 113, 263–279.
- Zoetemeyer, R.J., van den Heuvel, J.C., Cohen, A., 1982. pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. *Water Res.* 16, 303–311.



# **ANNEXES**

---





---

# TABLE DES ANNEXES

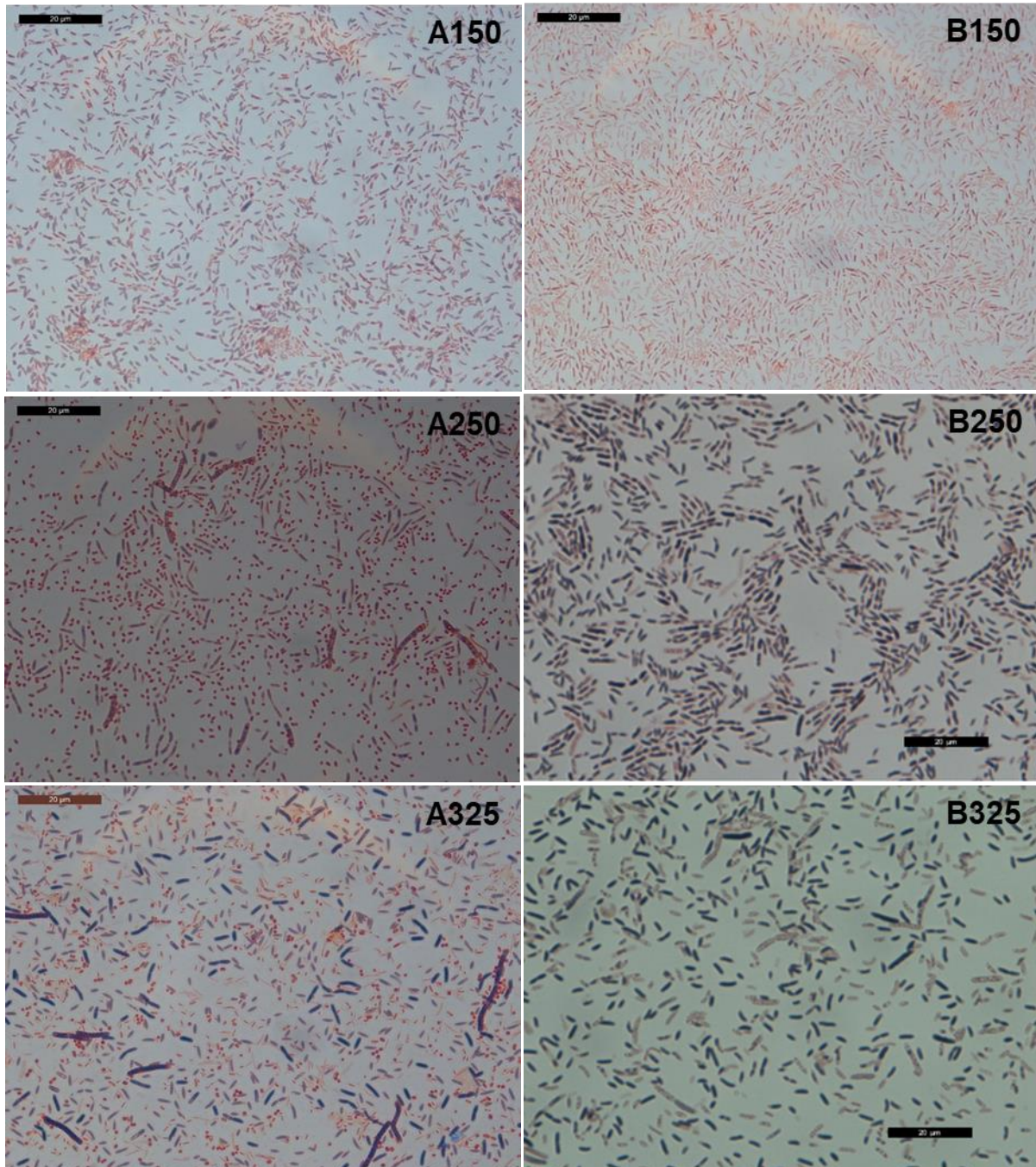
---

<b>Annexe A. Observations microscopiques des cultures microbiennes .....</b>	<b>209</b>
<b>Annexe B. Dynamiques de sélection dans l'étage de production .....</b>	<b>211</b>
<b>Annexe C. Détails de conditions opératoires des batch et 2<sup>èmes</sup> étages.....</b>	<b>212</b>
<b>Annexe D. Résultats détaillés des batch .....</b>	<b>214</b>
<b>Annexe E. Paramètres cinétiques des populations microbiennes.....</b>	<b>215</b>
<b>Annexe F. Investigation sur le modèle cinétique.....</b>	<b>216</b>
<b>Annexe G. Dynamiques de production de 3HV selon le type et l'intensité de limitation nutritionnelle lors d'une alimentation en propionate .....</b>	<b>218</b>



## Annexe A. Observations microscopiques des cultures microbiennes

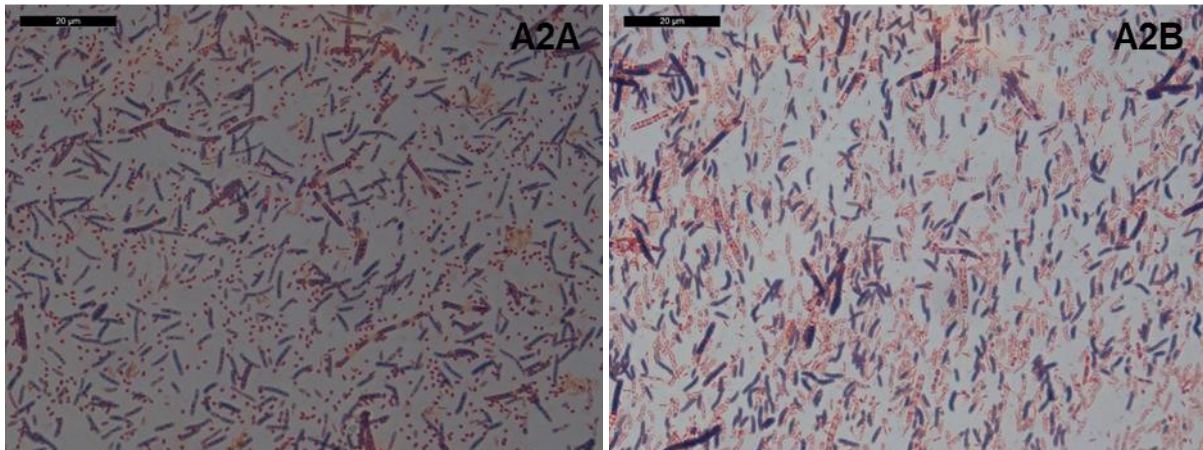
### - Etage de sélection



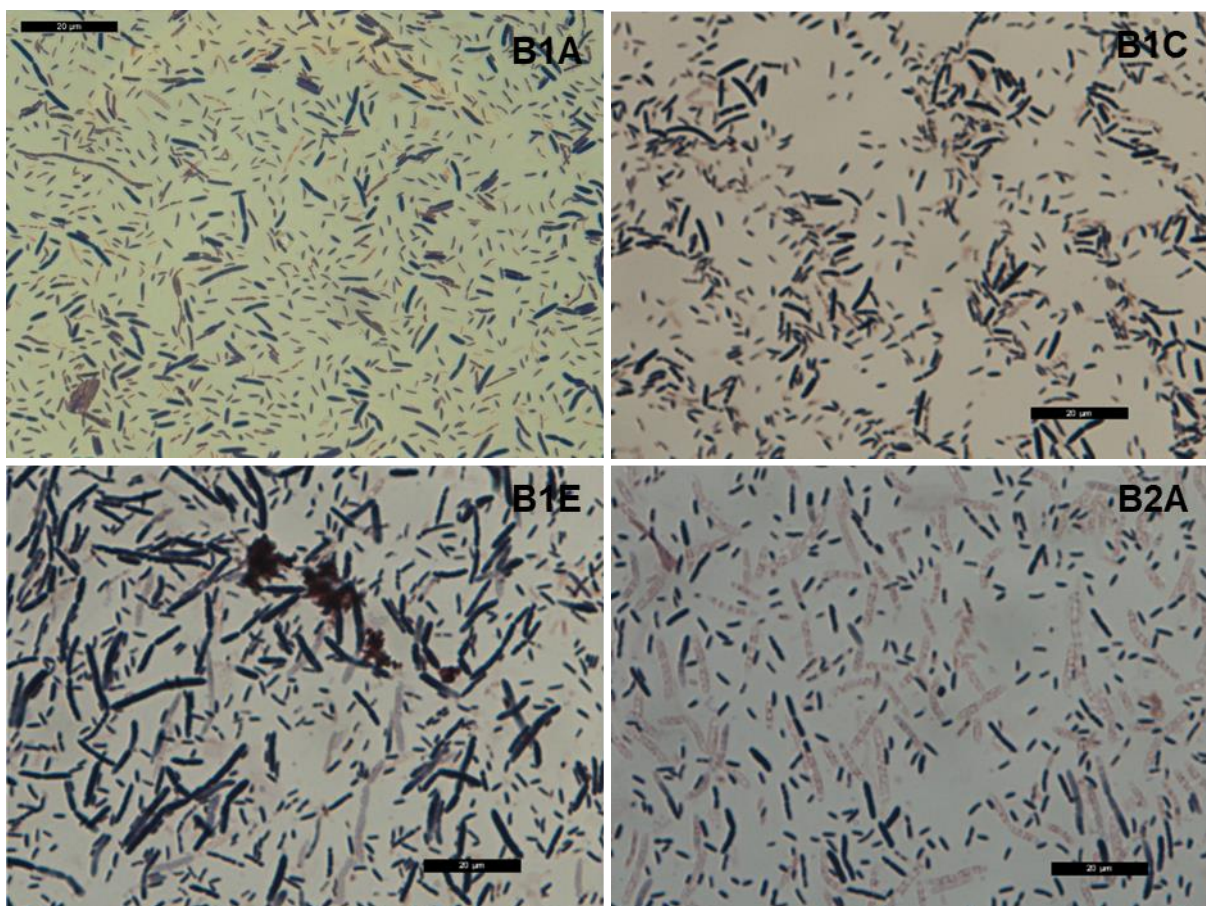
**Figure 88.** Observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif x100 de cultures microbiennes dans l'étage de sélection, alimentés avec un mélange acétate/propionate (A) ou butyrate/propionate (B), respectivement à 150, 250 et 325 Cmol.Pmol<sup>-1</sup>. Les cellules sont colorées en rose, et les PHA en noir.



- **Étage de production**



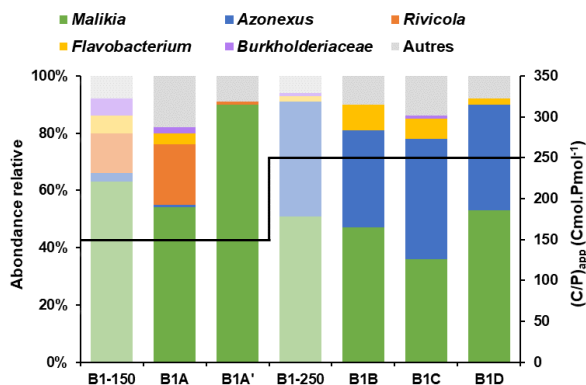
**Figure 89.** Observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif x100 de cultures microbiennes dans l'étage de production, préalablement sélectionnées avec un mélange acétate/propionate (conditions A2A et A2B). Les cellules sont colorées en rose, et les PHA en noir.



**Figure 90.** Observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif x100 de cultures microbiennes dans l'étage de production, préalablement sélectionnées avec un mélange butyrate/propionate (conditions B1A, B1C, B1E et B2A). Les cellules sont colorées en rose, et les PHA en noir.

## **Annexe B. Dynamiques de sélection dans l'étage de production**

La Figure 91 présente la diversité microbienne dans l'étage de production à l'issue de différentes conditions opératoires, ainsi que celle dans les étages de sélection correspondants, à partir desquels ont été opéré la production de PHA.



**Figure 91.** Dynamiques de sélection dans l'étage de production, avec une alimentation en butyrate/propionate : abondance relative des populations bactériennes en fonction de la condition opératoire (et du taux de croissance résiduel associé). Les histogrammes « grisés » renseignent sur la distribution microbienne dans les étages de sélection à partir desquels ont été opérés les différents étages de production correspondants). Les genres bactériens représentant moins de 4% de l'ADN 16S total ont été regroupés sous la dénomination « Autres ».

Les faibles valeurs des taux de croissance résiduels dans les 2<sup>èmes</sup> étages (en raison de la limitation en azote) indiquent seulement que la quantité totale de biomasse catalytique reste sensiblement inchangée. Toutefois, elles n'excluent pas la possibilité d'une modification significative de la distribution microbienne au sein du consortia sélectionné. En effet, les conditions opératoires restrictives (carence en phosphore et limitation en azote) peuvent hypothétiquement entraîner une lyse cellulaire spécifique des populations les plus sensibles, profitant aux autres populations qui pourraient alors croître à partir du matériel libéré. La comparaison de la distribution bactérienne en sortie du 1<sup>er</sup> étage avec celle des 2<sup>èmes</sup> étages correspondants (B1-150 avec B1A et B1A' ; B1-250 avec B1B, B1C et B1D) témoigne de la relative conservation des communautés ainsi que de leurs abondances respectives : il n'y a par conséquent pas (ou peu) de mort cellulaire. Une seule exception peut être faite pour la condition B1A' qui comporte des différences nettes par rapport à B1-150 (disparition de *Rivicola spp.* en faveur de *Malikia spp.*), mais il s'agit là d'une condition singulière (excès de propionate).

## Annexe C. Détails de conditions opératoires des batch et 2<sup>èmes</sup> étages

**Tableau 16.** Conditions opératoires et objectifs des différentes cultures batch. Nomenclature : - Pas de limitation en azote ; + Epuisement tardif de l'azote soluble ; ++ Epuisement rapide de l'azote soluble.

Condition	Sélection		Batch		Objectifs
	Substrat	(C/P) <sub>app</sub> Cmol.Pmol <sup>-1</sup>	Substrat	Carence en azote	
C1a	AA+AB	150	AA+AB	+	Evaluer les potentialités d'accumulation de PHB d'une population sélectionnée avec acétate/butyrate Confirmer la sélection de surproducteurs de PHB observée par Cavaillé (2015)
C1b	AA+AB	150	AP	+	Déterminer les capacités d'assimilation du propionate d'une population sélectionnée avec acétate/butyrate
A1a	AA+AP	150	AA+AP	+	Evaluer les potentialités d'accumulation de P(3HB-co-3HV) d'une population sélectionnée avec acétate/propionate Vérifier la reproductibilité de la sélection de surproducteurs de PHA avec le propionate
A2a	AA+AP	150	AA+AP	++	Confronter les potentialités d'accumulation de PHA d'une population issue d'un inoculum différent mais sélectionnée dans les mêmes conditions que A1a Evaluer l'effet d'une carence en azote prématurée sur la cinétique de production de PHA
A2b	AA+AP	250	AA+AP	+	Evaluer l'effet du degré de limitation en phosphore appliqué (C/P) <sub>app</sub> lors de la sélection sur les cinétiques de production de PHA en régime dynamique
A2c	AA+AP	250	AA+AP	++	S'assurer de la répétabilité de la cinétique de production de PHA avec une même population (A2b) Evaluer l'effet d'une carence en azote prématurée sur la cinétique de production de PHA
A2d	AA+AP	250	AA	++	Déterminer les capacités d'assimilation de l'acétate seul Confronter les cinétiques de production de PHA avec celles obtenues avec un mélange acétate/propionate
A2e	AA+AP	250	AP	++	Déterminer les capacités d'assimilation du propionate seul Confronter les cinétiques de production de PHA avec celles obtenues avec un mélange acétate/propionate
A2f	AA+AP	325	AA+AP	++	Evaluer l'effet du degré de limitation en phosphore appliqué (C/P) <sub>app</sub> lors de la sélection sur les cinétiques de production de PHA en régime dynamique
B2a	AB+AP	325	AB+AP	-	Evaluer les potentialités d'accumulation de P(3HB-co-3HV) d'une population sélectionnée avec butyrate/propionate Comparer les cinétiques de production de PHA avec celles obtenues avec un mélange acétate/propionate
B2b	AB+AP	150	AB+AP	++	Evaluer l'effet du degré de limitation en phosphore appliqué (C/P) <sub>app</sub> lors de la sélection sur les cinétiques de production de PHA en régime dynamique

**Tableau 17.** Conditions opératoires et objectifs des différents étages de production.

Condition	Sélection		Production		Objectif
	Substrat	(C/P) <sub>app</sub> Cmol.Pmol <sup>-1</sup>	Substrat (mol.mol <sup>-1</sup> )	Taux de croissance résiduel (h <sup>-1</sup> )	
A2A	AA+AP	250	AA+AP (67/33)	0,01	Confronter les performances de production de P(3HB-co-3HV) en régime continu avec celles obtenues en régime dynamique dans des conditions similaires (fraction en propionate correspondante à celle consommée en batch)
A2B	AA+AP	250	AA+AP (33/67)	0,01	Comparer les cinétiques de production de PHA en inversant les fractions respectives en acétate et propionate
B1A	AB+AP	150	AB+AP (50/50)	0,01	Evaluer les performances de production de P(3HB-co-3HV) avec un mélange butyrate/propionate
B1A'	AB+AP	150	AB+AP (50/50)	0,01	Déterminer l'effet d'une surcharge organique et de l'accumulation potentielle de propionate dans le surnageant de culture sur les cinétiques de production de PHA
B1B	AB+AP	250	AB+AP (50/50)	0,02	Evaluer l'effet d'une augmentation du (C/P) <sub>app</sub> lors de la sélection sur les performances de production de PHA dans le 2 <sup>ème</sup> étage
B1C	AB+AP	250	AB+AP (50/50)	0,03	Evaluer l'effet d'une augmentation de la croissance résiduelle sur les performances de production de P(3HB-co-3HV)
B1D	AB+AP	250	AB+AP (50/50)	0,03	Evaluer l'effet d'une augmentation supplémentaire de la croissance résiduelle sur les performances de production de P(3HB-co-3HV)
B2A	AB+AP	325	AB+AP (50/50)	0,02	Evaluer l'effet d'une augmentation du (C/P) <sub>app</sub> lors de la sélection sur les performances de production de PHA dans le 2 <sup>ème</sup> étage
B2B	AB+AP	150	AB+AP (50/50)	0,01	Evaluer l'effet historique sur la sélection sur les performances de production de PHA dans le 2 <sup>ème</sup> étage en confrontant les résultats avec ceux de B1A



## Annexe D. Résultats détaillés des batch

**Tableau 18.** Vitesses spécifiques maximales obtenues en réacteurs batch selon les conditions expérimentales.

Auteur	Substrat	Conditions initiales			Vitesses spécifiques maximales					
		D h <sup>-1</sup>	C/P Cmol.Pmol <sup>-1</sup>	P <sub>in</sub> gP.gX <sup>-1</sup>	qS_AA	qS_AP	qS_AB	qS	μ	qPHA
				Cmol.(Cmol.h) <sup>-1</sup>						
Cette étude	AP/AA	0,16	325	0,9%	0,34	0,22		0,55	0,14	0,22
	AA	0,16	250	1,1%	0,65			0,65	0,09	0,16
	AP	0,16	250	1,1%		0,32		0,32	0,08	0,04
	AP/AA	0,16	250	1,4%	0,24	0,20		0,43	0,17	0,09
	AP/AA	0,16	250	1,4%	0,24	0,26		0,48	0,14	0,18
	AP/AA	0,16	150	1,9%	0,55	0,30		0,85	0,33	0,12
	AP/AA	0,16	150	2,1%	0,49	0,23		0,70	0,22	0,16
	AP/AB	0,16	325	1,7%		0,14	0,46	0,51	0,13	0,14
	AP/AB	0,16	150	2,0%		0,33	1,22	1,53	0,12	0,61
	AA/AB	0,16	150	1,8%	0,20		0,98	0,29	0,10	0,84
Cavaillé (2015)	AA/AB	0,12	267	0,8%	0,15		0,99	1,14	0,05	0,67
	AA/AB	0,12	221	1,0%	0,18		0,98	1,16	0,02	0,83
	AA/AB	0,12	216	1,0%	0,45		1,32	1,77	0,34	0,84
	AA/AB	0,12	200	1,1%	0,40		1,20	1,59	0,09	0,70
	AA/AB	0,12	133	1,7%	0,32		1,23	1,55	0,02	1,16
	AA/AB	0,12	133	1,7%	0,24		1,08	1,32	0,01	1,13
	AA	0,12	160	1,4%	0,63			0,63	0,10	0,11
	AA	0,12	158	1,4%	1,02			1,02	0,13	0,54
	AA	0,12	126	1,8%	1,14			1,14	0,11	0,13
	AA	0,12	126	1,8%	0,98			0,98	0,09	0,50
AA	0,12	124	1,8%	1,25			1,25	0,14	0,61	
AA	0,12	90	2,5%	1,12			1,12	0,21	0,59	

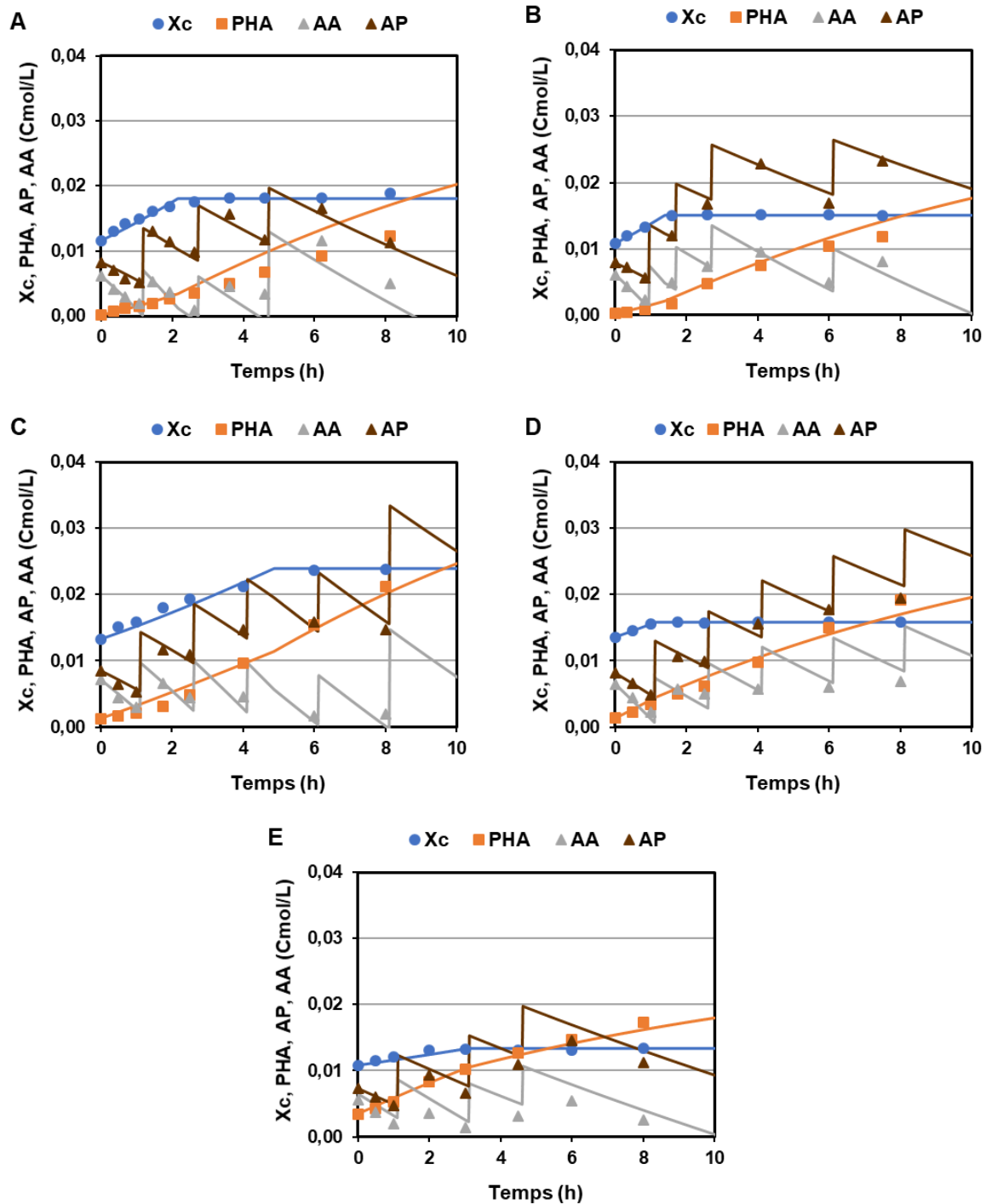
## **Annexe E. Paramètres cinétiques des populations microbiennes**

**Tableau 19.** Paramètres cinétiques des différentes catégories de populations microbiennes selon la nature de la source de carbone.

<b>Auteur</b>	<b>Substrat</b>	<b>Paramètre</b>	<b><i>Acinetobacter</i></b>	<b><i>Malikia</i></b>	<b>Autres</b>
Cette étude	Acétate	$Q_{PHAmax}$	0,15	0,75	0,03
	Propionate	$\mu_{max}$	0,50	0,45	0,25
	<b>Substrat</b>	<b>Paramètre</b>	<b><i>Malikia</i></b>	<b><i>Azonexus</i></b>	<b>Autres</b>
	Butyrate	$Q_{PHAmax}$	1,30	1,50	0,03
	Propionate	$\mu_{max}$	0,35	0,30	0,20
Cavaillé (2015)	<b>Substrat</b>	<b>Paramètre</b>	<b><i>Zoogloea</i></b>	<b><i>Acinetobacter</i></b>	<b>Autres</b>
	Acétate	$Q_{PHAmax}$	0,75	0,10	0,03
		$\mu_{max}$	0,35	0,55	0,30
	<b>Substrat</b>	<b>Paramètre</b>	<b><i>Zoogloea</i></b>	<b><i>Malikia</i></b>	<b>Autres</b>
	Acétate	$Q_{PHAmax}$	1,55	1,55	0,03
	Butyrate	$\mu_{max}$	0,35	0,55	0,30

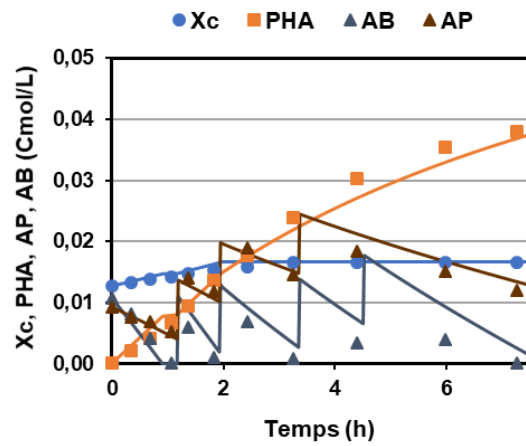
## Annexe F. Investigation sur le modèle cinétique

- Simulations réalisées en réacteur batch avec un mélange acétate/propionate, en prenant compte d'une vitesse spécifique maximale de production de PHA commune à toutes les populations lors d'une carence en N



**Figure 92.** Evolution des concentrations Xc, PHA, AA (acétate) et AP (propionate) au cours des batch A1a (A), A2a (B), A2b (C), A2c (D) et A2f (E). Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.

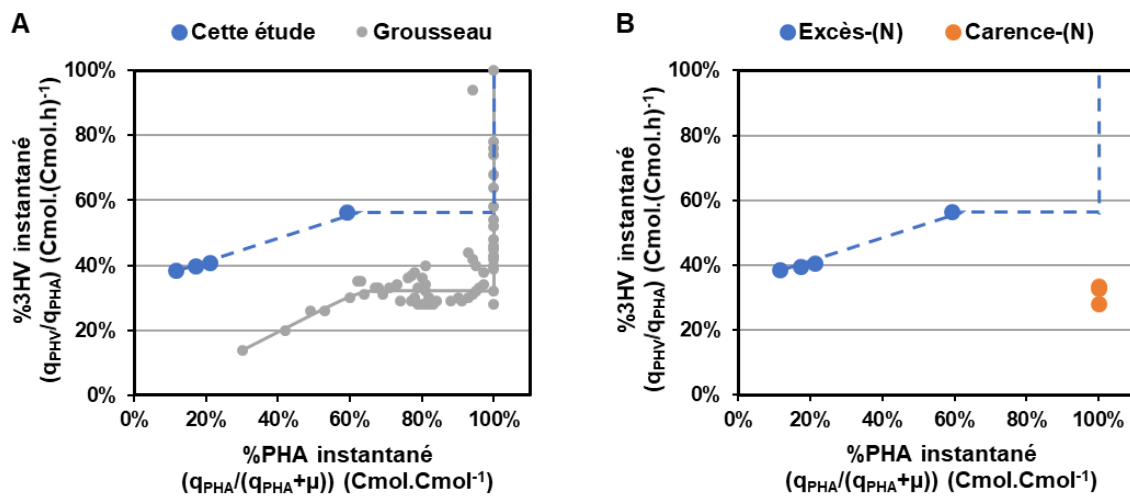
- Simulation réalisée en réacteur batch avec un mélange butyrate/propionate



**Figure 93.** Evolution des concentrations Xc, PHA, AB (butyrate) et AP (propionate) au cours du batch B2b. Symboles : valeurs expérimentales ; traits continus : simulation.

## Annexe G. Dynamiques de production de 3HV selon le type et l'intensité de limitation nutritionnelle lors d'une alimentation en propionate

La Figure 94A présente l'évolution du %3HV instantané en fonction du %PHA instantané en conditions de carence en phosphore et avec une alimentation unique en propionate. Les résultats ont été confrontés avec ceux décrits par Grousseau (2012) en limitation P avec une culture de *C. necator*. La Figure 94B fait apparaître en plus les valeurs observées lors de l'ajout d'une carence en azote.



**Figure 94.** Evolution du pourcentage de 3HV instantané ( $q_{PHV}/q_{PHA}$ ) en fonction du pourcentage en PHA instantané ( $q_{PHA}/(q_{PHA}+\mu)$ ) en conditions de carence en phosphore et avec une alimentation exclusive en propionate. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par Grousseau (2012) (A). Evolution du pourcentage de 3HV instantané en fonction du pourcentage en PHA instantané avec une alimentation exclusive en propionate, en conditions d'excès et de carence en azote (B).