

Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand-Frappier

# **CREATION D'UNE BIORAFFINERIE MULTITROPHIQUE POUR LA VALORISATION DES DÉCHETS SERRICOLES EN CHAMPIGNONS COMESTIBLES ET EN BIOGAZ**

Par  
Paul Morel

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître en microbiologie appliquée

## **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

ADJALLE Kokou  
INRS

Examineur externe

HIJRI Mohamed  
Université de Montréal

Directeur de recherche

GUERTIN Claude  
INRS

Codirecteur de recherche

CONSTANT Philippe  
INRS

## REMERCIEMENTS

---

Je souhaiterais remercier mon directeur Claude Guertin pour m'avoir fourni l'opportunité de travailler sur un projet de recherche passionnant et pour son soutien tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais au même titre remercier mon co-directeur Philippe Constant pour son investissement sur ce projet, mais également pour sa patience et les enseignements qu'il m'a apporté.

Je remercie grandement Narin Srei, pour son aide apportée quotidiennement sur les techniques de laboratoire et le bon déroulement du projet de recherche.



## RÉSUMÉ

---

La production mondiale de légumes et de fruits est en constante augmentation depuis de nombreuses années et avec elle, la quantité de déchets agricoles. La gestion et la valorisation des résidus lignocellulosiques représentent une réelle priorité dans le cadre de la transition vers une économie circulaire. La digestion anaérobie, un processus de valorisation de cette matière organique sous forme de biogaz suscite de plus en plus d'intérêt. Par ailleurs, l'utilisation de ces résidus comme substrat de croissance pour la production de champignon comestible permet non seulement d'augmenter les rendements de production de biogaz, mais également de produire une source alimentaire riche en protéines possédant une valeur commerciale non négligeable. Les recherches effectuées durant cette maîtrise se sont intéressées au potentiel de valorisation des résidus de fibre de coco d'origine serriole en biogaz suite à l'activité de prétraitement apportée par les champignons *Pleurotus oestreatus* et *Hericium erinaceus*. Ainsi, il a été possible de confirmer que la fibre de coco à elle seule ne constitue pas un substrat de croissance optimal pour la production de champignon sans certains amendements. Les faibles rendements de production du champignon *H. erinaceus* ne permettent pas de rendre le procédé rentable. En revanche, des rendements de biogaz supérieurs d'un facteur de 2,5 ont pu être observés à suite la production du champignon *P. oestreatus* sur de la sciure de bois.



## ABSTRACT

---

Worldwide production of vegetables and fruits has been steadily increasing for many years and with it the amount of agricultural waste. The management and recovery of lignocellulosic residues is now a priority for the transition towards a circular economy. Biomethanization, a process of recovery of the organic matter through anaerobic digestion in the form of biogas, is attracting more and more interest. In addition, the use of these residues as a growth substrate for the production of edible mushrooms not only increases the yields of biogas production but also produces a food source rich in proteins with significant commercial value. The research carried out as part of this master's degree focused on the potential for the recovery of coconut fiber into biogas following the pre-treatment activity provided by the fungi *Pleurotus oestreatus* and *Hericium erinaceus*. Thus, it was possible to confirm that coconut fiber alone does not constitute an optimal growth substrate for mushroom production without certain amendments. The low production yields of the *H. erinaceus* fungus do not make the process profitable. On the other hand, higher biogas yields by a factor of 2.5 could be observed following the production of the fungus *P. oestreatus* on sawdust.







# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XIX</b>
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 MISE EN CONTEXTE .....	1
1.2 HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	3
<b>2 REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>5</b>
2.1 DIGESTION ANAEROBIE DES RESIDUS LIGNOCELLULOSIQUES.....	5
2.1.1 <i>Principes généraux de la digestion anaérobie</i> .....	5
2.1.2 <i>Boues granulaires</i> .....	7
2.1.3 <i>Résistance à l'hydrolyse</i> .....	9
2.2 PRETRAITEMENTS DES RESIDUS LIGNOCELLULOSIQUES .....	11
2.2.1 <i>Prétraitements « classiques »</i> .....	12
2.2.2 <i>Prétraitements « biologiques »</i> .....	13
2.3 UTILISATION DE CHAMPIGNONS COMESTIBLES .....	14
<b>3 MÉTHODOLOGIE .....</b>	<b>17</b>
3.1 PRODUCTION DE CHAMPIGNONS COMESTIBLES .....	17
3.1.1 <i>Production de culture liquide</i> .....	17
3.1.2 <i>Production d'inoculum solide sur céréales</i> .....	18
3.1.3 <i>Préparation des substrats de production de champignons</i> .....	18
3.1.4 <i>Ensemencement</i> .....	20
3.1.5 <i>Colonisation</i> .....	20

3.1.6	<i>Fructification</i> .....	21
3.1.7	<i>Récolte et calculs des rendements de production</i> .....	22
3.1.8	<i>Analyses statistiques</i> .....	23
3.2	DIGESTION ANAEROBIE .....	23
3.2.1	<i>Préparation du milieu minimum</i> .....	23
3.2.2	<i>Préparation des bioréacteurs</i> .....	24
3.2.3	<i>Préparation des substrats de production</i> .....	24
3.2.4	<i>Préparation des boues granulaires</i> .....	25
3.2.5	<i>Mesure de la production de biogaz</i> .....	25
3.2.6	<i>Méthode de calcul des rendements de production de biogaz</i> .....	27
3.2.7	<i>Analyses statistiques</i> .....	29
3.3	ANALYSE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE .....	29
3.3.1	<i>Collection de l'échantillon et extraction d'ADN</i> .....	29
3.3.2	<i>PCR et préparation des librairies de séquençage</i> .....	30
3.3.3	<i>Traitements des données issues du séquençage</i> .....	32
3.3.4	<i>Analyses statistiques</i> .....	33
<b>4</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>35</b>
4.1	PRODUCTION DE CHAMPIGNONS .....	35
4.2	PRODUCTION DE BIOGAZ .....	37
4.3	DIVERSITE ALPHA .....	39
4.4	DIVERSITE BETA .....	40
4.5	ÉTUDE DE LA RELATION ENTRE LES COMMUNAUTES MICROBIENNES ET LES RENDEMENTS EN BIOGAZ .....	45
<b>5</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>57</b>
	<b>ANNEXE I ..... VOLUME DES CONSTITUANTS À PRÉLEVER POUR LA PRÉPARATION DU MILIEU MINIMUM ANAÉROBIE</b> .....	<b>69</b>

<b>ANNEXE II ... VOLUME DES CONSTITUANTS À PRÉLEVER POUR LA PRÉPARATION DU MASTER MIX DE LA PCR 16S .....</b>	<b>71</b>
<b>ANNEXE III .....</b>	<b>72</b>
<b>ANNEXE IV ....VOLUMES DES CONSTITUANTS À PRÉLEVER POUR LA RÉALISATION DE LA PCR INDEX .....</b>	<b>72</b>
<b>ANNEXE V .....</b>	<b>73</b>



## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 2-1 : SCHEMA RECAPITULATIF DU PROCESSUS DE DIGESTION ANAEROBIE .....	7
FIGURE 2-2 : SCHEMA SIMPLIFIE DES DIFFERENTES COUCHES COMPOSANT UN GRANULE ANAEROBIE .....	9
FIGURE 2-3 : STRUCTURE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA MATIERE LIGNOCELLULOSIQUE D'APRES (MAITY 2015).....	11
FIGURE 3-1 : SCHEMA RECAPITULATIF DES PRINCIPALES ETAPES DE PRODUCTION DE CHAMPIGNONS COMESTIBLES...	17
FIGURE 3-2 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL UTILISE POUR LA PRODUCTION DE CHAMPIGNONS COMESTIBLES .....	20
FIGURE 3-3 : PHOTOS DE LA CHAMBRE ENVIRONNEMENTALE UTILISEE POUR L'ETAPE DE COLONISATION DU MYCELIUM (A) AINSI QUE DEUX SACS DE PRODUCTION ENTIEREMENT COLONISES PAR <i>H. ERINACEUS</i> (B) ET PAR <i>P. OSTREATUS</i> (C) .....	21
FIGURE 3-4 : SCHEMAS (A) ET PHOTOS DU DISPOSITIF DE PENDERIE (B ET C) UTILISE POUR L'ETAPE DE FRUCTIFICATION DES CHAMPIGNONS COMESTIBLES.....	22
FIGURE 3-5 : EXPOSITION DU MILIEU MINIMAL A UN MILIEU GAZEUX CONSTITUE DE 80 % DE N <sub>2</sub> ET 20 % DE CO <sub>2</sub> ....	24
FIGURE 3-6 SCHEMA D'UN SIGNAL TYPE ISSUS D'UNE ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE REPRESENTANT LA REPONSE DE DETECTION EN FONCTION DU TEMPS DE RETENTION EN MINUTES .....	26
FIGURE 3-7 : COURBE ETALON REPRESENTANT LA CONCENTRATION DE CH <sub>4</sub> EN PPM EN FONCTION DE L'AIRES SOUS LA COURBE DU SIGNAL DE DETECTION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.....	27
FIGURE 4-1 : RENDEMENTS DE PRODUCTION DE CHAMPIGNONS (EFFICACITE BIOLOGIQUE EN POURCENTAGE) COMESTIBLES EN FONCTION DU MELANGE DE SUBSTRAT DE PRODUCTION UTILISE.....	36
FIGURE 4-2 : RENDEMENTS DE CH <sub>4</sub> EN NMOL/G DE SUBSTRAT SEC EN FONCTION DU CHAMPIGNON ET DU MELANGE DE SUBSTRAT DE PRODUCTION UTILISES .....	38
FIGURE 4-3 : REPRESENTATION DE LA DISTRIBUTION DES DIFFERENTS INDICES DE DIVERSITE ALPHA EN FONCTION DU TYPE DE SUBSTRAT UTILISE.....	39
FIGURE 4-4 : REPRESENTATION DE LA DISTRIBUTION DES DIFFERENTS INDICES DE DIVERSITE ALPHA EN FONCTION DU TYPE DE CHAMPIGNON UTILISE .....	40
FIGURE 4-5 : REPRESENTATION DE L'ABONDANCE RELATIVE DES PRINCIPALES CLASSES BACTERIENNES RETROUVEES EN FONCTION DES ECHANTILLONS.....	41
FIGURE 4-6 : ACoP METTANT EN EVIDENCE LA VARIATION DE LA DIVERSITE ENTRE LES ECHANTILLONS.....	42
FIGURE 4-7 : DB-RDA IMAGEANT LA RELATION ENTRE LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES ECHANTILLONS ET LES RENDEMENTS EN BIOGAZ .....	46

FIGURE 4-8 : MATRICE DE CORRELATION RELATANT DE LA RELATION ENTRE LES RENDEMENTS EN BIOGAZ ET LES ASV  
PRECEDEMMENT IDENTIFIES..... 48

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 3-1 : QUANTITE DE SUBSTRATS UTILISES DANS LES TROIS MELANGES PREPARES POUR CHAQUE BLOC EXPERIMENTAL .....	19
TABLEAU 4-1 : RESULTATS DE LA PERMANOVA REALISEE AU NIVEAU DE L'ENSEMBLE DES ECHANTILLONS ET PRENANT EN COMPTE A LA FOIS LE FACTEUR MELANGE DE SUBSTRAT ET LE FACTEUR CHAMPIGNON. ....	42
TABLEAU 4-2 : RESULTATS DES PERMANOVAS REALISEE SUR DES COMPARAISONS DEUX A DEUX ENTRE LES TYPES DE CHAMPIGNON .....	43
TABLEAU 4-3 : RESULTATS DES PERMANOVAS REALISEE SUR DES COMPARAISONS DEUX A DEUX ENTRE LES TYPES DE SUBSTRAT .....	43
TABLEAU 4-4 : RESULTATS D'ANCOM-BC REALISE SUR DES COMPARAISONS DEUX A DEUX ENTRE LES TYPES DE CHAMPIGNON .....	44
TABLEAU 4-5 : RESULTATS D'ANCOM-BC REALISE SUR DES COMPARAISONS DEUX A DEUX EN FONCTION DES TYPES DE SUBSTRAT .....	44
TABLEAU 4-6 : IDENTIFICATION TAXONOMIQUE DES PRINCIPAUX ASV IDENTIFIES .....	47



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ACoP	Analyse en Coordonnées Principales
ANOVA	Analyse de la variance
ASV	Variant de séquence d'amplicon
db-RDA	analyse de redondance basée sur la distance
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PERMANOVA	Analyse Multivariée Permutationnelle de la Variance
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose

# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 Mise en contexte

La consommation de légumes de serre est en progression en Amérique du Nord et particulièrement au Québec, ayant doublé entre 2008 et 2015 (Ouellet 2018). Se classant au troisième rang parmi les provinces canadiennes, derrière l'Ontario et la Colombie-Britannique, le Québec détient 468 exploitations agricoles produisant des légumes en serres sur une superficie de 110 hectares en 2018 (Anonyme 2020). Le secteur de légumes de serre possède un potentiel de développement fort intéressant, ne comblant que 31 % de la consommation totale. De plus, le marché d'exportation offre des opportunités pour l'Amérique du Nord. Ce potentiel se traduit par une augmentation de 35 % de la surface totale destinée à la production lors de ces 10 dernières années.

Au Québec, 95 % des entreprises serricoles produisent de la tomate, 84 % du concombre, 62 % des fines herbes et 50 % de l'aubergine. Considérant les 88 hectares de production de concombres et de tomates en serres du Québec, et leur quantité de résidus secs respective de 18 et 30 tonnes par hectare (Oleszek, Tys et al. 2016), un total de 2334 tonnes de résidus secs est produit annuellement. À titre d'exemple, une production de deux tonnes de résidus par semaine est également générée pour les 1,28 hectare de production de tomates dans les installations de la Ferme Lufa dans la ville de Laval (Hénault-Éthier 2015).

La gestion des déchets est alors une priorité pour les producteurs qui optent souvent pour un compostage sur site puis un épandage sur leurs propres terres. Économique, ce procédé a pour inconvénients d'être long et de contaminer les sols (phosphore). Avec la volonté du ministère de l'Environnement et des Changements climatiques de contrôler ces bilans phosphore, cette pratique devient limitée (MELCC 2020). La deuxième option est d'opter pour un transport de ces résidus vers une plateforme de compostage industriel. Les déchets regroupés en gros volumes sont plus homogènes et efficaces. Le processus est plus contrôlé d'un point de vue de l'hygiène et la contamination des sols est évitée par l'utilisation de plateforme étanche. Cependant, ce procédé a un coût qui s'élève à 10 000 \$/hectare/année (Cheuk, Lo et al. 2003).

Différentes stratégies ont été adoptées dans l'objectif de contrer l'accumulation de la quantité de déchets générée. L'une de celles-ci consiste en la réutilisation des déchets agroalimentaires et la production de biomatériaux et d'énergie sous la forme de biogaz (Morales-Polo, Cledera-Castro et al. 2018).

Depuis quelques années, la gestion et la valorisation des déchets par le processus de digestion anaérobie se développent. En effet, de nombreuses entreprises telles que les serres Demers (Lévis, Québec) ont choisi d'utiliser les déchets organiques et le processus de décomposition naturel générant du biogaz comme source d'énergie pour alimenter les serres de production de légumes (Vézina 2017). Le producteur utilise la chaleur des moteurs d'une centrale thermique de 7,5 mégawatts alimentée à partir des biogaz s'échappant d'un lieu

d'enfouissement. Cette stratégie permet non seulement de diminuer les coûts de production, mais également d'éviter l'utilisation de combustibles fossiles pour chauffer les serres et ainsi diminuer les émissions de gaz à effet de serre (GES) de plus de 26 000 tonnes annuellement (Anonyme 2017).

Puisque les résidus sont générés sur une base régulière, à travers les opérations d'effeuillage hebdomadaires et aux vides sanitaires en fin de cycle de production, le secteur serricole représente un gisement pérenne. Cet attribut revêt un grand intérêt pour la mise en place de stratégies de valorisation et de déploiement d'une économie circulaire. Ce modèle vise à changer de paradigme par rapport à l'économie dite linéaire. Ce changement s'effectuant en limitant le gaspillage des ressources, mais également en optimisant l'efficacité à tous les stades de l'économie des produits (Borrello, Pascucci et al. 2020). Dans le cadre de ce projet de recherche, l'application de ce modèle est réalisée par la valorisation des résidus de production de serre en champignons comestibles en biogaz.

## 1.2 Hypothèse et objectifs de recherche

Le but de cette étude est d'élaborer un milieu de croissance intégrant des résidus lignocellulosiques serricoles pour la production de *P. ostreatus* et de *H. erinaceus* ainsi que de mesurer l'impact de cette production de champignons comestibles sur la production de biogaz. L'hypothèse est la suivante :

*L'utilisation de bioprocédés de prétraitements des résidus permettra d'obtenir des rendements de production de biogaz supérieurs à la digestion anaérobie des résidus bruts.*

Afin de tester cette hypothèse, trois objectifs ont été développés :

1. Identifier le substrat de culture permettant d'obtenir les meilleurs rendements de production de champignons comestibles.
2. Mesurer les rendements en biogaz à la suite de la digestion anaérobie des résidus de production ayant subi ou non un prétraitement biologique.
3. Étudier l'impact des prétraitements des résidus sur la diversité et la composition de la communauté bactérienne du digestat anaérobie.



## 2 REVUE DE LITTÉRATURE

---

### 2.1 Digestion anaérobie des résidus lignocellulosiques

#### 2.1.1 Principes généraux de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie ou biométhanisation est un bioprocédé de dégradation de la matière organique en éléments simples comme le méthane ( $\text{CH}_4$ ) ou le gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) via la digestion microbienne des résidus dans des conditions anaérobies. Le produit final est le biogaz, un mélange constitué majoritairement de  $\text{CH}_4$  (50-75 %), de  $\text{CO}_2$  (25-50 %), de  $\text{N}_2$  (0-10 %), de  $\text{H}_2\text{S}$  (0-3 %) et d' $\text{H}_2$  (0-1 %) (Goswami, Chattopadhyay et al. 2016). Ce biogaz peut être utilisé pour produire de l'énergie sous forme d'électricité, de chauffage, mais d'autres filières de valorisation des biogaz pourraient être explorées, notamment leur « effet fertilisant ». En effet, un gain de 15-45 % de biomasse végétale fut observé en injectant de l' $\text{H}_2$  à une concentration de 0,05 % dans le sol (Dong et al. 2003). Cette augmentation est due à l'activation de bactéries oxydant l' $\text{H}_2$  intervenant dans le cycle des nutriments et des phytohormones de croissance des plantes (Maimaiti, Zhang et al. 2007, Khdhiri, Piché-Choquette et al. 2017, Piché-Choquette, Constant et al. 2019). Le reste de la matière organique, appelé digestat, peut être traité comme un nouveau déchet ou alors est utilisé comme un produit secondaire sous la forme de fertilisant des sols (Walsh, Jones et al. 2012, Koszel and Lorencowicz 2015). La digestion anaérobie est donc un moyen efficace pour recycler, valoriser (sous la forme de biogaz et de fertilisant), réduire la quantité de déchets à éliminer : partiellement, si le digestat est éliminé ; complètement si celui-ci est utilisé (Chiu and Lo 2016).

Le processus de digestion anaérobie se découpe en quatre étapes successives : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (figure 2-1). Toute cette chaîne de réactions est réalisée par de nombreux microorganismes, notamment des bactéries acidogènes, acétogènes ou des archées méthanogènes, les deux travaillant ensemble dans une relation syntrophique (le développement d'un des deux partenaires est amélioré ou dépend des nutriments, facteurs de croissance ou autres produits apportés par l'autre partenaire). L'équilibre des populations bactériennes est ainsi directement corrélé au bon développement du processus. Certaines bactéries dites « facultatives » sont associées à l'étape de l'hydrolyse et sont capables de dégrader la matière organique soit en conditions anaérobies ou aérobies, d'où leur nom. Le reste des bactéries responsables des autres réactions sont strictement anaérobies (Huete 2007).

L'étape d'hydrolyse a pour objectif de rendre biodisponible la matière organique utilisable pour la suite des étapes. Les polymères tels que les glucides, les protéines, les lipides vont être fragmentés en monomères (acides aminés, acides gras, sucres) par les bactéries hydrolytiques qui produisent d'exo-enzymes

(glycosidases, protéases et estérases). Cette étape est fondamentale pour la suite de la réaction, car elle permet de fractionner la matière organique et de réduire la taille des molécules pour qu'elles puissent être transportées à l'intérieur des cellules par des perméases et donc de supporter une succession de métabolismes intervenant par la suite.

Les bactéries hydrolytiques permettent la formation de précurseurs de l'étape suivante et fournissent les substrats aux bactéries acidogènes (*Acetobacterium* spp., *Enterobacterium* spp.). En effet, les molécules simples créées lors de l'étape d'hydrolyse sont converties lors de l'étape d'acidogénèse en acides gras volatiles et en alcool et en acétate principalement. Contrairement à l'hydrolyse, cette étape, réalisée par des bactéries acidogènes, est une réaction intracellulaire tout comme les deux étapes suivantes. Les produits de l'acidogénèse, sont alors être utilisés par les bactéries acétogènes pour produire l'acétate, de dihydrogène et le dioxyde de carbone. Toutes les bactéries acétogènes produisent de dihydrogène. Thermodynamiquement, la dégradation des acides gras volatiles en acétate n'est possible qu'à de faibles pressions partielles en H<sub>2</sub>. Il faut donc une syntrophie très étroite entre les bactéries acétogènes et d'autres microorganismes capables de consommer l'H<sub>2</sub> produit, incluant notamment les archées méthanogènes les bactéries hydrogénotrophes et les bactéries sulfato-réductrices (Stams 1994, Harmsen, Akkermans et al. 1996).

La dernière étape de méthanogénèse est assurée par des microorganismes anaérobies stricts qui appartiennent au domaine des *Archaea* (Chynoweth and Pullammanappallil 1996). Si la production de dihydrogène est trop forte, ces concentrations peuvent inhiber le métabolisme des archéobactéries méthanogènes. La méthanogénèse aboutit à la production de méthane. On distingue principalement deux groupes d'archées méthanogènes, les hydrogénotrophes (*Methanobacterium* spp., *Methanococcus* spp.) qui utilisent l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> et les Acétoclastes (*Methanosaeta* spp.) qui utilisent l'acide acétique. Dans les deux cas, ces microorganismes réduisent leur substrat en méthane (CH<sub>4</sub>). La digestion anaérobie est donc un processus complexe qui requiert un environnement stable pour le développement des différents microorganismes. Il existe également un groupe de méthanogènes plus rare, les méthylotrophes, capables d'utiliser les molécules à un seul carbone ou des molécules sans liaisons carbone-carbone afin de produire du méthane (*Methanococcoides* spp., *Methanosarcina* spp.).

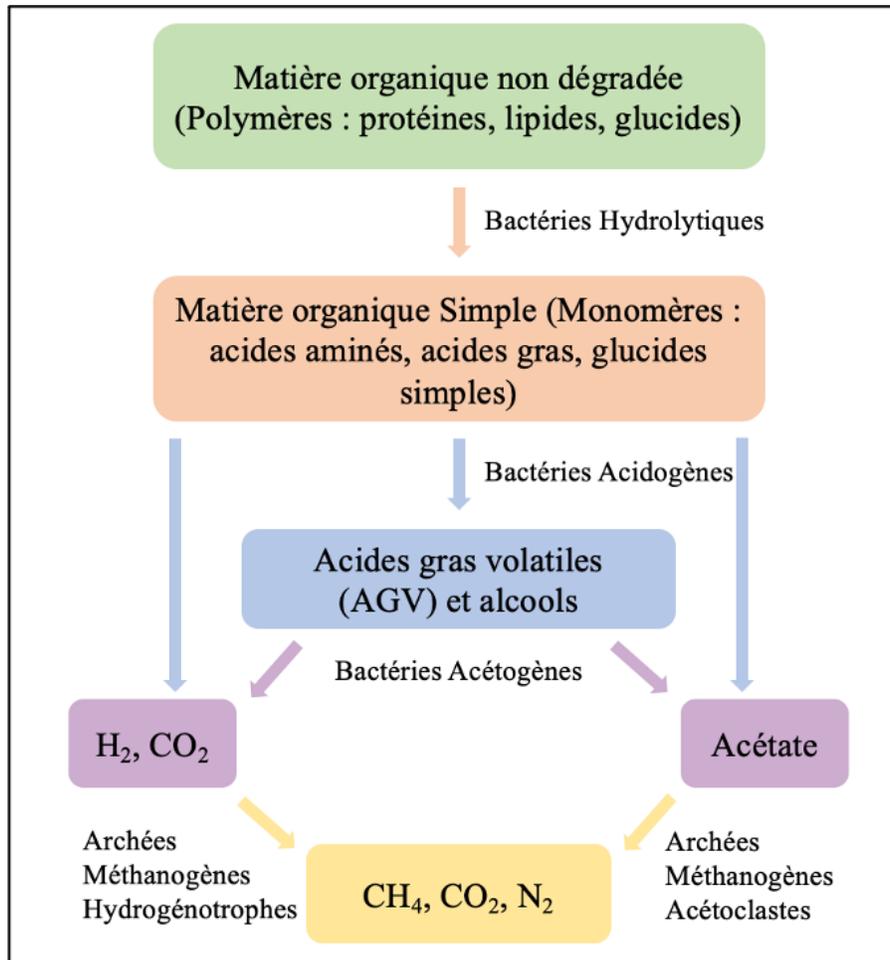


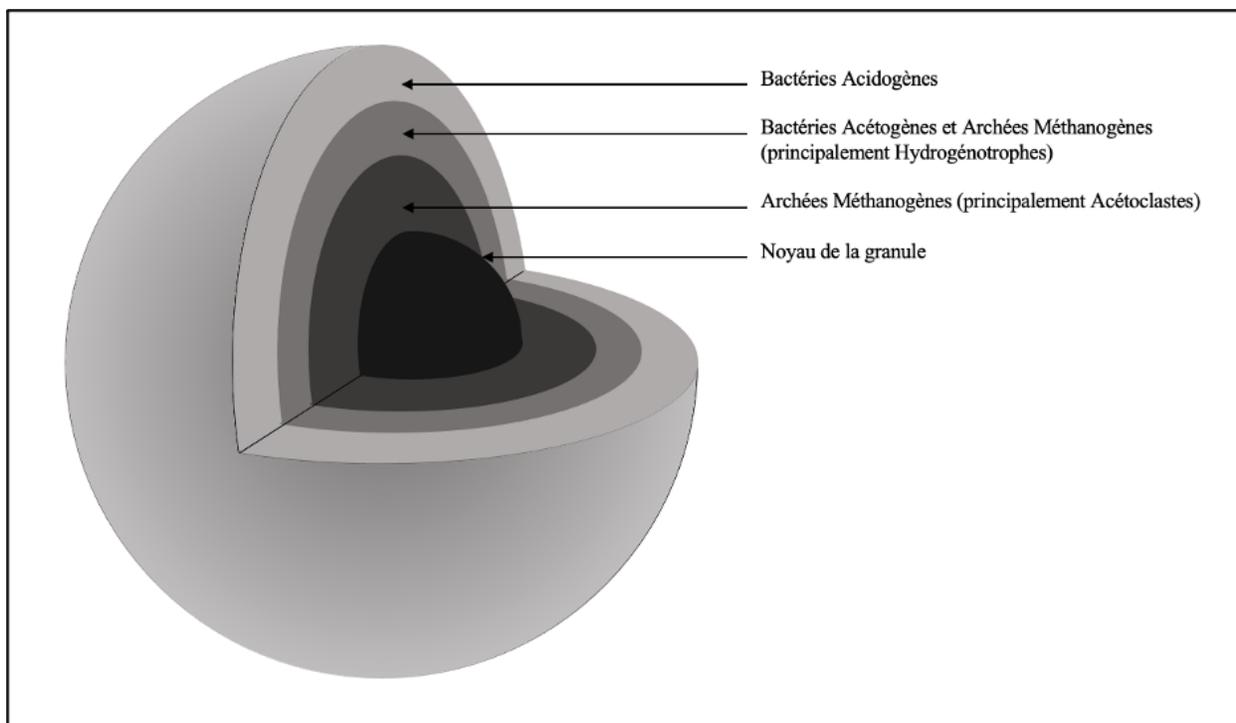
Figure 2-1 : Schéma récapitulatif du processus de digestion anaérobie

### 2.1.2 Boues granulaires

Depuis la première observation des boues granulaires anaérobies en 1973 (Lettinga, Van Velsen et al. 1980, De Zeeuw 1988), la reconnaissance du concept a permis de franchir un cap significatif dans le traitement anaérobie des déchets en améliorant l'efficacité et les applications technologiques (Yan and Tay 1997). Les boues granulaires, agglomération de manière spontanée par l'auto-immobilisation de bactéries anaérobies en l'absence de support, sont une forme de biofilm (Lettinga 1995). Constituées d'un mélange entrelacé de microorganismes anaérobies syntrophiques qui travaillent de concert dans la fermentation en méthane, ces denses particules forment l'élément essentiel au succès d'un digesteur anaérobie à boues granulaires (McCarty 2001). Chaque granule contient plusieurs millions de microorganismes par gramme et constitue une unité fonctionnelle possédant tous les microorganismes nécessaires à la digestion anaérobie de la

matière organique (Sekiguchi, Kamagata et al. 1998). Individuellement, aucun microorganisme présent dans une granule n'est capable de réaliser une dégradation complète de la matière organique (Liu and Tay 2002), c'est pourquoi des associations coopératives entre ces différents microorganismes sont nécessaires formant ainsi un microécosystème unique dans chacune d'entre elles (Sekiguchi, Kamagata et al. 1998, McHugh, Carton et al. 2003). Une orientation spatiale précise des différents microorganismes est essentielle car la distance entre ceux-ci doit être suffisamment faible pour permettre non seulement d'effectuer des échanges entre eux, mais aussi de maintenir une faible pression partielle d'hydrogène entre les acétogènes et les méthanogènes (Stams 1994, Harmsen, Akkermans et al. 1996). La structure d'un granule sphérique (0,1 à 5mm) est donc constituée de plusieurs couches suivant une hiérarchie d'espèces bactériennes permettant de transformer successivement la matière organique du plus complexe à la surface du granule (hydrate de carbone) au plus simple à l'intérieur (acétate) pour la production de méthane par des archées méthanogènes (Visser, van Lier et al. 1991, Guiot, Arcand et al. 1992, Lens, De Beer et al. 1993, Harmsen, Akkermans et al. 1996). La figure 2-2 schématise la succession des différentes populations microbiennes présentes dans une granule type.

Les populations microbiennes travaillent de concert pour la dégradation des polymères et se disposent de manière à effectuer une dégradation optimale. Depuis le développement des boues granulaires dans les bioréacteurs, celles-ci ont été capables de se former dans de nombreux environnements (Morgenroth, Sherden et al. 1997, Wilderer 1997, Dangcong, Bernet et al. 1999, Etterer and Wilderer 2001, Tay, Liu et al. 2001). Des conditions difficiles sont souvent présentes dans ces bioréacteurs, mais les granules se développant sont de grande taille, de structure compacte, de haute densité et fonctionnelle. L'un des avantages des boues granulaires se trouve dans la vitesse d'adaptation d'un réacteur à un autre, à la formation d'une structure compacte résistante au stress (Iza, Colleran et al. 1991, Wei, Li et al. 2011) causé par les changements d'affluent (Costa, Abreu et al. 2007, Jiang, Yang et al. 2019) ou l'exposition à l'oxygène des microorganismes (Kato, Field et al. 1993, Mosquera-Corral, De Kreuk et al. 2005, Yuan and Gao 2010). De plus, les boues granulaires permettent de traiter de nombreuses variétés de déchets, à de hautes températures (50-70°C), mais aussi à de basses températures (<10°C), et également de déchets contenant des substances toxiques ou récalcitrantes (McHugh, O'reilly et al. 2003). Les boues granulaires sont également capables de maintenir une structure compacte sous des conditions salines (Li, Wang et al. 2017). Toutes ces caractéristiques font des réacteurs à lit de boues granulaires la technologie la plus utilisée pour le traitement anaérobie de déchets des effluents industriels (Frankin 2001).



**Figure 2-2 : Schéma simplifié des différentes couches composant un granule anaérobie**

### **2.1.3 Résistance à l'hydrolyse**

L'étape d'hydrolyse est primordiale, étant la première à être effectuée, elle permet de rendre biodisponible la matière organique et assure le bon fonctionnement du processus de digestion anaérobie. Cependant l'efficacité de cette réaction d'hydrolyse dépend principalement de quatre facteurs : (a) la structure du substrat; (b) la taille des particules; (c) la température; et (d) le pH. Cette dépendance fait que l'hydrolyse est considérée comme étant une étape limitante de la digestion anaérobie (Lettinga, Field et al. 1997). En effet, un déroulement efficace de l'étape d'hydrolyse résulte en une hausse d'activité pour les réactions suivantes (acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse) et par conséquent, en une plus grande production de biogaz (Sanders 2001, Izumi, Okishio et al. 2010). Ces résultats soutiennent le concept de l'étape d'hydrolyse comme étant limitante au processus de digestion anaérobie, car elle est responsable du bon développement des réactions subséquentes et de l'augmentation des rendements de production de biogaz (Vavilin, Rytov et al. 1996, Sanders, Geerink et al. 2000).

En effet, de nombreux facteurs structurels et compositionnels propres aux matériaux lignocellulosiques entravent cette hydrolyse. Le premier obstacle qui s'oppose à la dégradation des résidus lignocellulosiques est la paroi des végétaux. Celle-ci est formée de trois groupes de composants majeurs (Fan, Lee et al. 1982)

: Les fibres de cellulose (35-50 %) qui sont enchevêtrées ensemble par le biais de ponts d'hémicellulose (30-45 %), le tout stabilisé par la lignine (15-25 %). Cette structure complexe confère à la biomasse une forte résistance à la dégradation (Mosier, Wyman et al. 2005, Hendriks and Zeeman 2009). La cellulose est le principal constituant de la paroi végétale. Ce biopolymère est constitué d'une chaîne linéaire de molécule de glucose. Les momomères de glucose sont liés par des liaisons  $\beta$ -(1-4), formant des polymères linéaires (figure 2-3). De nombreuses enzymes cellulolytiques (cellulases) permettent de dégrader la cellulose par le processus de cellulolyse. L'hémicellulose est également un biopolymère de glucide. À la différence de la cellulose, les monomères constituant l'hémicellulose ne sont pas uniquement du glucose. En effet, ceux-ci peuvent être du xylose, mannose, galactose ou arabinose formant par le biais de liaisons  $\beta$ -(1-4) les polysides de xylane, glucomannane, xyloglucane ou arabinoxylane. Les différentes enzymes hémicellulolytiques capables d'hydrolyser les liaisons de l'hémicellulose sont de la famille des hémicellulases. La lignine est un polymère aromatique qui confère de la rigidité et de la résistance mécanique aux parois cellulaires. Elle apporte également une imperméabilité à l'eau et une forte résistance à la décomposition. Insoluble, sans lien hydrolysable et chimiquement complexe, la lignine est difficilement dégradable. Seuls certains champignons saprotrophes, principalement des Basydiomycètes (agent de « pourriture blanche ») possèdent l'arsenal enzymatique nécessaire à la dégradation de manière significative de la lignine (activité ligninolytique). La cellulose est facilement biodégradable, cependant couplée avec la lignine, son taux de dégradation peut être diminué de 25 % ; la lignine agissant comme une barrière physique restreignant l'accès des cellulases à leur substrat (Tong, Smith et al. 1990). Cette barrière physique est accompagnée de la capacité de la lignine d'absorber de manière irréversible les cellulases. De plus, les hémicelluloses peuvent jouer un rôle de barrière physique limitant l'accessibilité de la cellulase, mais par rapport à l'effet de la lignine, la limitation par les hémicelluloses semble moins importante. L'élimination des hémicelluloses peut en revanche augmenter significativement la porosité de la matière première.

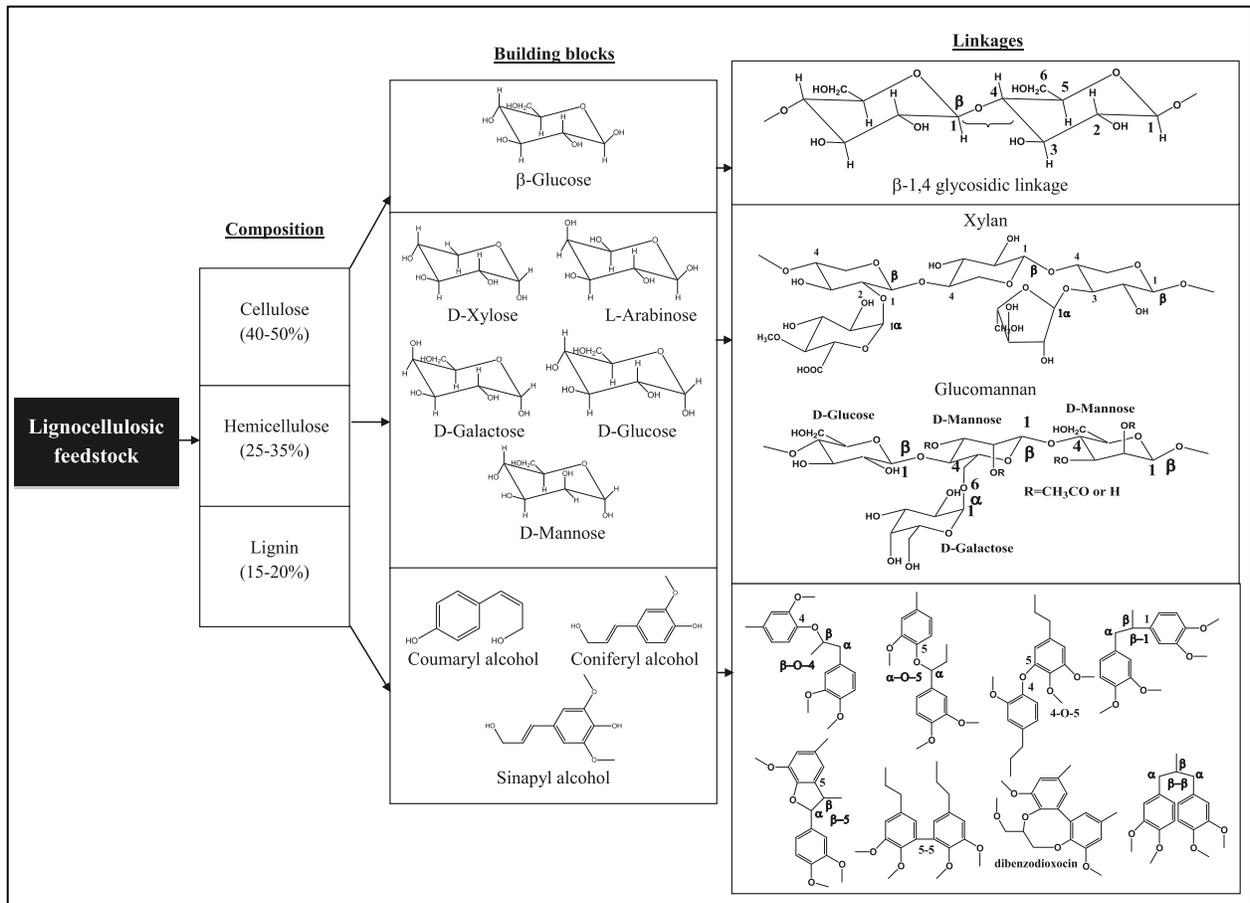


Figure 2-3 : Structure des principaux constituants de la matière lignocellulosique d'après (Maity 2015)

## 2.2 Prétraitements des résidus lignocellulosiques

La récalcitrance des résidus lignocellulosiques étant un facteur important limitant les procédés de digestion anaérobie, toute stratégie visant à la bioconversion de ces résidus nécessite tout d'abord la déstructuration de la lignocellulose afin d'accroître leur biodisponibilité et améliorer les rendements de ces transformations. Depuis plusieurs années de nombreuses études sont menées pour déterminer les impacts des prétraitements physiques, thermiques, chimiques et/ou biologiques sur la production de biogaz (Mosier, Wyman et al. 2005, Hendriks and Zeeman 2009, Alvira, Tomás-Pejó et al. 2010, Monlau, Latrille et al. 2013).

Le but de tout prétraitement de la biomasse est d'altérer la structure du résidu lignocellulosique pour rendre la cellulose et les hémicelluloses plus accessibles aux enzymes. Ce but est atteint lorsque les trois phénomènes suivants sont observés : (a) une dégradation des hémicelluloses et de la lignine avec une certaine extraction ; (b) une réduction de la cristallinité de la cellulose; et (c) une augmentation de la porosité

du matériau lignocellulosiques. Une approche répandue consiste à utiliser un prétraitement chimique de la biomasse. Des agents alcalins solubilisant l'hémicellulose et la lignine en monosaccharides et oligosaccharides sont alors impliqués et qui permettent par la suite à la biomasse d'être hydrolysée et fermentée par les microorganismes impliqués dans la digestion anaérobie (Kim et al. 2016). Cette approche permet d'atteindre une production de CH<sub>4</sub> qui peut être 1,5 à 3 fois supérieure aux rendements obtenus sans prétraitement (Zhu, Wan et al. 2010, Taherdanak and Zilouei 2014, Ikeda, Watari et al. 2019).

### **2.2.1 Prétraitements « classiques »**

De nombreuses stratégies sont utilisées afin d'accroître les rendements de production durant le processus de digestion anaérobie. Parmi ces stratégies, les prétraitements physiques sont répandus. La réduction de taille des particules a pour conséquences d'augmenter le rapport surface/volume (Harmsen, Huijgen et al. 2010). De plus, plusieurs auteurs ont mis en évidence la relation entre l'augmentation du taux d'hydrolyse et la réduction de la taille des particules (Hartmann, Angelidaki et al. 2000). Ainsi, la réduction de la taille des particules implique une augmentation significative du potentiel biométhanogène (Delgenès, Penaud et al. 2003). Cependant, le recours au prétraitement mécanique de la biomasse est problématique du point de vue économique, au regard de la consommation énergétique de telles opérations. De plus, elle ne retire pas la lignine qui limite l'accès des enzymes à la cellulose.

Les prétraitements de type chimique peuvent avoir recours à l'utilisation d'agents alcalins solubilisant l'hémicellulose et la lignine en monosaccharides et oligosaccharides, ces derniers pouvant ensuite être hydrolysés et fermentés par les microorganismes impliqués dans la digestion anaérobie (Kim, Lee et al. 2016). Il existe également des traitements acides, le principe étant d'hydrolyser les hémicelluloses sans dégrader la lignine, qui peut donc être séparée (Mosier, Wyman et al. 2005). Les acides utilisés, même si efficaces, sont toxiques, corrosifs et dangereux. De plus, le coût de récupération après l'hydrolyse afin d'être recyclés et réutilisés dans le procédé est important.

Les prétraitements thermochimiques reposent sur le principe d'hydrolyse et la dégradation des composés à haute température. À titre d'exemple, la pyrolyse est un procédé utilisé afin de convertir 50 - 75 % de la matière lignocellulosique en huile pyrolytique à une température de 400 - 600°C ainsi que du biochar et des gaz non condensables. L'huile pyrolytique est un mélange complexe de composés chimiques tels que des acides, des cétones, des furanes, des phénols, des sucres hydrauliques et d'autres composés oxygénés. Le processus de pyrolyse se compose de deux sections principales, le four, qui convertit la biomasse en bioproduits, et un système de condensation, qui récupère les gaz condensables sous forme de produit liquide. Ils s'avèrent relativement efficaces, mais le coût énergétique élevé et le risque de produire des

sous-produits inhibiteurs (furfural et hydroxyméthylfurfural) laissent penser que ces traitements sont peu applicables à la filière de production de biogaz (Berglund Odhner, Schabbauer et al. 2012).

### **2.2.2 Prétraitements « biologiques »**

Pour éviter les inconvénients toxiques des acides, des traitements biologiques peuvent être appliqués (Christy, Gopinath et al. 2014). En effet, l'utilisation d'un arsenal d'enzymes comme des laccases, des cellulases et des hémicellulases s'est avérée efficace pour améliorer la digestion des résidus organiques (Bruni, Jensen et al. 2010). Cependant l'inconvénient de cette stratégie est le coût supplémentaire engendré par l'achat d'enzymes, comme démontré dans le cas de production de bioéthanol où le coût des enzymes représentait 1,47\$US par gallon (Klein-Marcuschamer, Oleskiewicz-Popiel et al. 2012). Une approche alternative serait l'utilisation de microorganismes pour améliorer la biodégradabilité de la matière organique. En effet, cette stratégie présente de nombreux avantages dont le faible coût en capital et la faible consommation d'énergie (Sindhu, Binod et al. 2016). La cinétique d'hydrolyse est significativement plus lente que celle de l'hydrolyse par voie chimique (Harmsen, Huijgen et al. 2010) mais la biomasse de champignon produite a une valeur commerciale et les rendements de digestion anaérobie observés suite à leur prolifération sur les résidus lignocellulosiques sont 1,5 à 3 fois supérieurs aux rendements obtenus sans prétraitements (Müller and Trösch 1986, Mutschlechner, Illmer et al. 2015). Les champignons présentent une capacité à dégrader l'hémicellulose et la lignine ainsi qu'une petite quantité de cellulose (Berglund Odhner, Schabbauer et al. 2012). Les champignons de pourriture brune et de pourriture molle attaquent principalement les hémicelluloses et la cellulose, tandis que les champignons de pourriture blanche sont capables de dégrader également la lignine. Ces derniers sont considérés comme les plus prometteurs dans le prétraitement de résidus lignocellulosiques (Fan, Gharpuray et al. 1987). En effet, si la cellulose composée de monomères de glucose est facilement dégradable, à l'inverse la lignine, hétéropolymère capable formant des liaisons multiples et diverses avec des pectines, cellulose et expansines, représente un constituant difficilement dégradable naturellement. Peu d'organismes connus possèdent l'arsenal enzymatique nécessaire pour détruire la grande diversité de ces liens chimiques. Certains champignons sont capables de produire des ligninases, permettant de dégrader la lignine. En effet, les champignons de la pourriture blanche sécrètent des enzymes extracellulaires comme les peroxydases de la lignine (oxydation des fractions aromatiques non phénoliques) ou les peroxydases de manganèses et laccases (oxydation des sous-unités phénoliques). Ces enzymes détruisent les multiples et diverses liaisons de la lignine.

### 2.3 Utilisation de champignons comestibles

La production de champignons comestibles est un procédé biotechnologique permettant la valorisation des déchets lignocellulosiques de manière efficace. En effet, il s'agit d'un des rares procédés qui combine la production d'une source nutritive riche en protéines et la réduction de la pollution environnementale (Beetz and Greer 2004). De plus, les champignons comestibles sont associés à une grande richesse en acides aminés par rapport aux végétaux (González, Nobre et al. 2021). Par ailleurs, les protéines issues des champignons possèdent une forte stabilité aux variations de température et de pH. De nombreux champignons comestibles ont démontré leur capacité à dégrader les résidus lignocellulosiques (Cohen, Persky et al. 2002, Lankinen 2004, Philippoussis 2009). Ces dernières années, la production mondiale de champignons comestibles a fortement augmenté, doublant entre 2007 et 2017. Les champignons sont appréciés pour leur goût et leur texture, mais aussi leurs valeurs écologique et économique, ainsi que leurs propriétés nutritives (Manzi, Aguzzi et al. 1999). De plus, par leurs apports en minéraux, fibres, protéines et leurs faibles apports en énergie et calories, les champignons sont considérés comme une source de nourriture saine (Manzi, Gambelli et al. 1999). L'apport énergétique des champignons se situe entre 250 et 350 cal/kg (Olivier and Delmas 1987, Sánchez 2004). De manière générale, les champignons contiennent 90 % d'eau et 10 % de matière sèche (Morais, Ramos et al. 2000, Sánchez 2009). Leur valeur nutritionnelle peut être comparée à celle des œufs, de lait et de la viande (Sánchez 2010). Ils peuvent également être une source de vitamine et d'une abondance d'acides aminés (Sánchez 2004). De ce fait, bien que la teneur en protéines des champignons soit inférieure à celle de la viande et supérieure à celle des légumes, la qualité est souvent considérée comme supérieure (Purkayastha and Nayak 1981).

*Pleurotus ostreatus*, un champignon de pourriture blanche, appartient à la famille des *Pleurotaceae* et se développe naturellement sur le bois (Lee 1990). Parmi les champignons, certaines espèces du genre *Pleurotus* comptent parmi celles les plus produites au côté de *Agaricus bisporus* et *Lentinula edodes* (Rühl, Fischer et al. 2008, Philippoussis 2009). Les espèces de pleurote sont une source riche de protéines, de minéraux (P, Ca, Fe, K et Na) et de vitamines (thiamine, riboflavine, acide folique et niacine) (Hedvigy, Rohal'ová et al. 2013). Elles contiennent un taux élevé de potassium et de sodium, faisant de ces champignons une source nutritive intéressante pour les patients souffrant d'hypertension et maladie cardiaque (Dehariya, Vyas et al. 2013). De nombreux champignons sont étudiés dans le domaine médical et *Pleurotus ostreatus* semble posséder des activités anticancéreuses et des effets hypoglycémiques (Chorvathova, Bobek et al. 1993). Les pleurotes sont des dégradeurs sélectifs, préférant la dégradation de l'hémicellulose et la lignine par rapport à celle de la cellulose. Cette dernière représente alors une source nutritive qui peut être utilisée pour l'alimentation des ruminants (Cohen, Persky et al. 2002). De plus, leur méthode de production est bien connue et relativement simple comparée à d'autres espèces de

champignons. Ils sont capables de se développer et de dégrader une large variété de résidus lignocellulosiques et de déchets issus de l'agriculture, des forêts et de l'industrie de transformation de fruit (Jandaik and Goyal 1995).

*Hericium erinaceus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) se développe sur le bois mort et produit un champignon très utilisé dans la médecine chinoise depuis des siècles. En effet, ce champignon de la famille des *Hericiaceae* très populaire en Asie de l'Est, *H. erinaceus* reçoit de plus en plus d'attention en Europe et Amérique du Nord pour son goût, ses valeurs nutritives et ses potentielles propriétés médicinales. L'extrait de *H. erinaceus* est utilisé dans la prévention de certaines pathologies comme le cancer (Mizuno 1999), la démence (Kawagishi, Zhuang et al. 2008), l'hypercholestérolémie (Liang, Guo et al. 2013), l'hyperglycémie (Hiwatashi, Kosaka et al. 2010). Cependant, contrairement au champignon *P. ostreatus* ou *L. edodes*, peu d'information existe concernant ses besoins de culture, en particulier pour des substrats autres que de la sciure de bois qui est généralement utilisée pour la production de champignon (Ko, Park et al. 2005, Figlas, Matute et al. 2007, Hu, Wang et al. 2008). De même, il existe peu de données sur la composition nutritionnelle de *H. erinaceus* à la suite de son développement naturel ou bien à partir de culture conventionnelle (Heleno, Barros et al. 2015, Rodrigues, Freitas et al. 2015).

*P. ostreatus* se présentait alors comme un candidat idéal afin d'étudier l'impact du prétraitement de la matière lignocellulosique par des champignons sur les rendements de production de biogaz. En effet, ce champignon est déjà grandement étudié et est utilisé fréquemment dans les expériences scientifiques relatives à la culture et la production de champignons comestibles. Inversement, *H. erinaceus* est très peu utilisé dans le domaine scientifique, son étude s'est donc révélée intéressante afin d'apporter une valeur expérimentale à ce projet et ainsi découvrir de nouvelles informations à son sujet.



### 3 MÉTHODOLOGIE

#### 3.1 Production de champignons comestibles

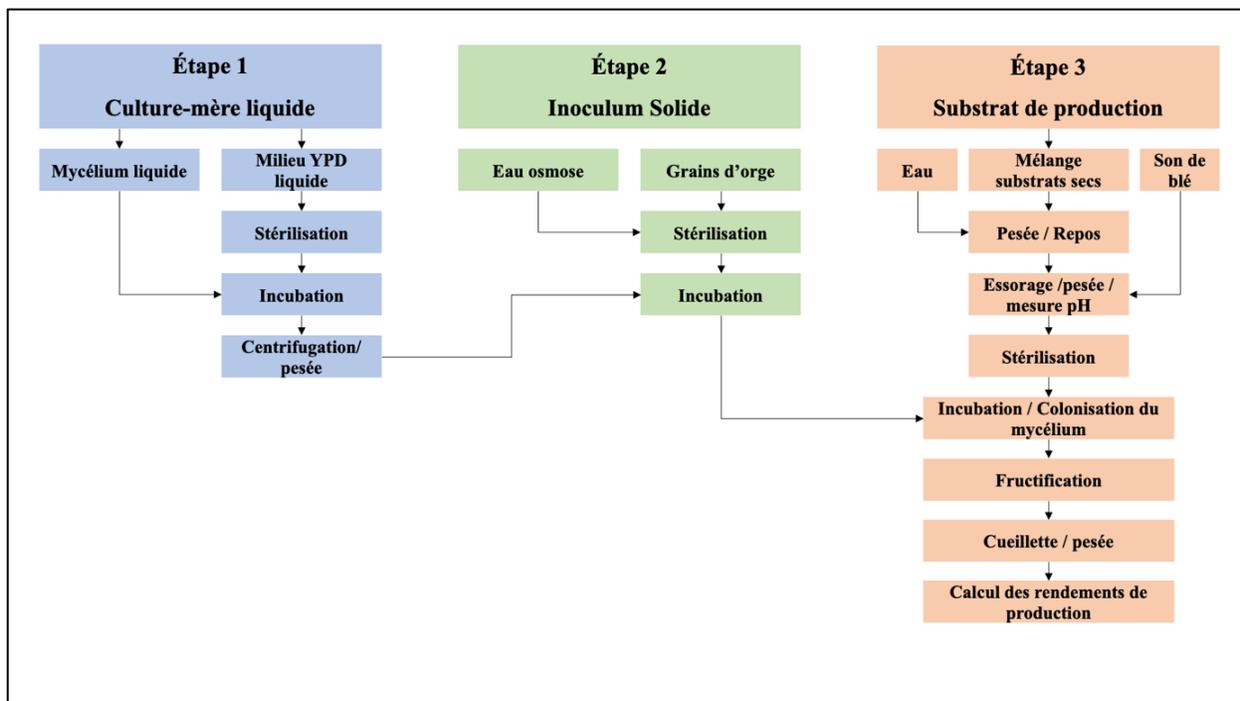


Figure 3-1 : Schéma récapitulatif des principales étapes de production de champignons comestibles

La production de champignons comestibles utilisée comme prétraitement des résidus lignocellulosiques avant la digestion anaérobie comprend trois étapes principales à effectuer de manière successive qui sont la préparation de la culture mère, la production de l'inoculum solide ainsi la préparation et la stérilisation du substrat de production de champignon. Enfin, une fois les sacs de production incubés avec l'inoculum solide, ceux-ci subissent les étapes de colonisation du mycélium ainsi que la fructification du champignon.

##### 3.1.1 Production de culture liquide

Les cultures liquides de référence utilisées dans le cadre de cette étude proviennent de l'entreprise *Grow mushrooms Canada* (Sayward, Colombie-Britannique, Canada). Deux champignons, *P. ostreatus* et de *H. erinaceus*, ont été choisis pour cette recherche en raison de leur facilité de production à grande échelle, leurs propriétés nutritives et leur valeur commerciale. Durant toute la durée des expériences, les mycéliums des deux champignons ont été conservés à 4 °C. Afin de répondre aux besoins récurrents de matériel biologique pour les différentes expériences, des suspensions des deux champignons *P. ostreatus* et de *H.*

*erinaceus* ont été réalisées. Cette production consiste en une culture liquide dans un milieu Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD), ce dernier ayant préalablement été stérilisé à l'autoclave. Une fois le milieu refroidi, 1 mL de mycélium issu de la production liquide a été utilisé pour ensemercer le milieu YPD sous un environnement stérile. Par la suite, les erlenmeyers ont été incubés dans un agitateur à 150 rpm et 30 °C pendant 120 h.

### **3.1.2 Production d'inoculum solide sur céréales**

La production d'inoculum sur milieu solide est une méthode très répandue et facilement contrôlable en laboratoire. Pour cette expérience, 25 mL d'eau filtrée par osmose inverse ont été ajoutés à 25 g de grain d'orge placés dans un erlenmeyer, puis stérilisés à 121 °C pendant 1 h. Une fois refroidie, l'agglomération de grain d'orge formée au fond du récipient a été brisée de façon aseptique à l'aide d'une spatule. En parallèle, afin de préparer le mycélium liquide devant être utilisé pour ensemercer les grains d'orge, les solutions mères liquides ont été transférées dans un tube Falcon puis centrifugées à 5000 rpm pendant 2 min et le surnageant éliminé. L'ensemencement des grains d'orge a été réalisé en ajoutant 1 g de mycélium à la préparation stérile. Enfin, les inoculums solides ont été placés dans une étuve à 25 °C jusqu'à la colonisation totale du milieu par le champignon. Sur la base d'observations réalisées au laboratoire, la période d'incubation est de cinq jours pour *P. ostreatus* et de huit jours pour *H. erinaceus*.

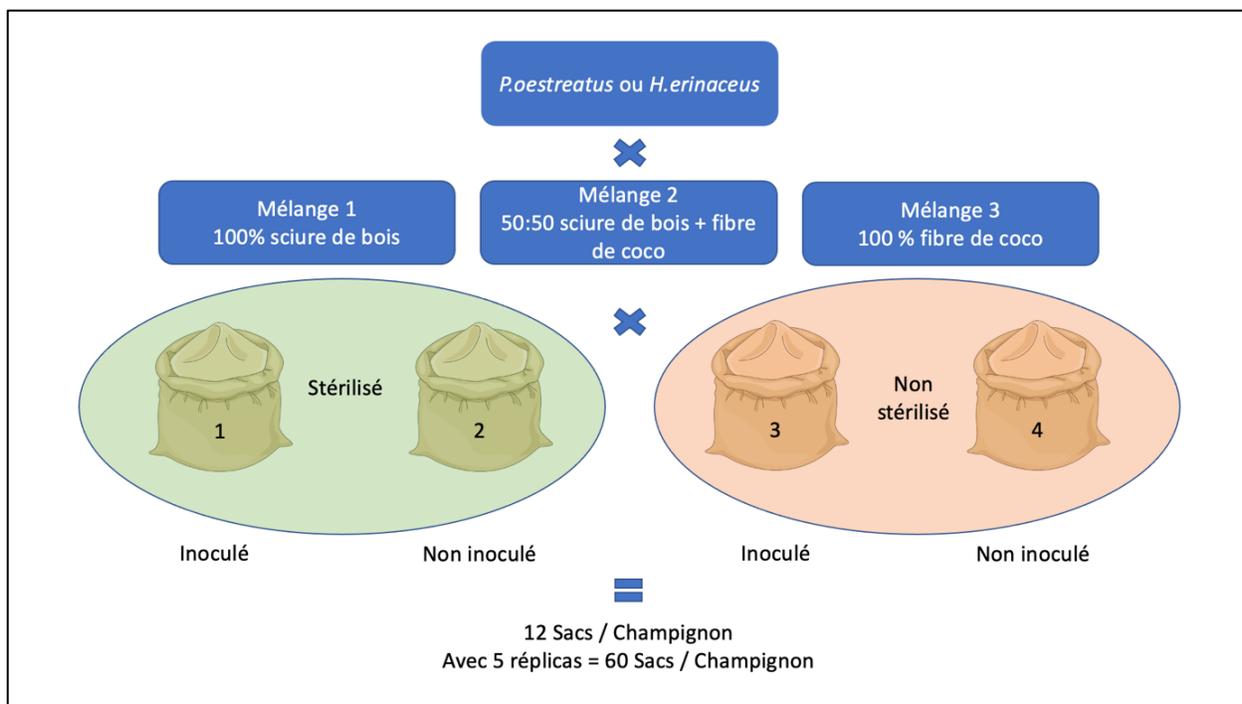
### **3.1.3 Préparation des substrats de production de champignons**

Dans cette étude, trois mélanges différents de substrat de production de champignons ont été préparés. Ces mélanges étaient constitués de proportions variées de sciure de bois provenant de l'entreprise *Husky Plywood* (St-Thérèse, Qc, Canada) et de fibre de coco préalablement utilisée par les *Fermes Lufa* (Montréal, Qc, Canada) comme substrat de culture de légumes de serre. Afin d'éliminer l'eau résiduelle dans ces matériaux ainsi que le développement de moisissures et d'insectes, la sciure de bois et la fibre de coco ont été placées dans une étuve à 60 °C pendant 12 h. Par la suite, un total de 4 500 g de sciure de bois ainsi que 4 500 g de fibre de coco et 180 g de chaux (2 % de substrats totaux) ont été pesés. Les différents composants ont été répartis dans trois bacs en quantité détaillée dans le tableau 1. Une fois cette étape effectuée, les mélanges ont été saturés en ajoutant 4 L d'eau filtrée par osmose inverse. Les mélanges ont été homogénéisés en les brassant pendant cinq minutes pour ensuite leur accorder un temps de repos d'une durée de 12 h. Afin de connaître le taux d'humidité, les mélanges ont été pesés (poids initial) avant d'être essorés à l'aide d'un carré de 50 cm sur 50 cm d'étamine de coton et pesés à nouveau (poids final). La différence de poids entre le poids initial et le poids final a été calculée. L'objectif étant d'atteindre un taux d'humidité de 60 %, la quantité d'eau nécessaire a été ajustée en fonction de chaque mélange. Finalement,

300 g de son de blé ont été ajoutés à chacun des mélanges. Ce composant était une supplémentation du substrat en protéines et en azote, éléments essentiels au développement du mycélium et du corps fruitier des champignons. Les mélanges ont été homogénéisés de nouveau, puis 500 g ont été transférés dans des sacs résistants à l'autoclave Bel-Art no. 18156 (Fisher Scientific, Qc, Canada). Pour chaque mélange, le pH a été déterminé à l'aide de bandelettes de papier pH (Whatman, Cytiva, Maidstone, Royaume-Uni). Pour chaque mélange de substrat, quatre sacs de production de champignon ont été préparés (Figure 3-2). Dans le but de faciliter l'accès aux mélanges, l'ouverture des sacs ont été insérés dans un collet en plastique préalablement scié à partir d'un tube Falcon 15 mL, puis l'extrémité des sacs a été repliée autour des collets et le tout a été maintenu à l'aide d'une bande élastique. L'ouverture des collets a alors été comblée par bouchon en mousse et recouverte d'aluminium afin de limiter l'abimement de l'eau (Figure 3-3). Pour les essais préliminaires, un indicateur de stérilisation (Fisher Scientific, # cat. : 15903) a été déposé à l'intérieur de chaque sac avant qu'ils ne soient stérilisés à 121 °C pendant 120 min. Après le retrait de l'autoclave, une période de repos de 12 h permettait au substrat de refroidir avant de procéder aux différentes expériences.

**Tableau 3-1 : Quantité de substrats utilisés dans les trois mélanges préparés pour chaque bloc expérimental**

	Sciure de bois	Fibre de coco	Chaux
Mélange 1	3 000 g	0 g	60 g
Mélange 2	1 500 g	1 500 g	60 g
Mélange 3	0 g	3 000 g	60 g



**Figure 3-2 : Dispositif expérimental utilisé pour la production de champignons comestibles**

Pour chaque champignon étudié, trois mélanges de substrat de production ont été utilisés. Chacun de ces mélanges permettait de préparer quatre sacs de production chacun recevant un traitement de stérilisation et d'ensemencement différent. Le nombre total de blocs du dispositif est de cinq élevant le nombre de sacs à soixante par champignon, soit un total de cent-vingt sacs de production pour l'ensemble de l'étude.

### 3.1.4 Ensemencement

Une fois les sacs refroidis, l'étape d'ensemencement a été réalisée sous hotte laminaire afin d'assurer une condition aseptique. À l'aide d'une spatule et d'une pince stériles, l'inoculum solide a été légèrement brisé avant son dépôt dans les sacs par l'ouverture du collet. La quantité d'inoculum transféré dans les sacs représentait 5 % du poids total soit 25 g. Les sacs ont finalement été refermés à l'aide d'un bouchon de mousse de polystyrène recouvert de papier d'aluminium.

### 3.1.5 Colonisation

Après l'ensemencement des sacs de production, ces derniers ont été placés dans une chambre environnementale pour l'étape de colonisation du mycélium. Cette étape s'effectuait sous environnement

contrôlé à l'obscurité à 25 °C et à 90 % d'humidité (Figure 3-3 A). La durée de colonisation du mycélium était de 15 jours pour *P. ostreatus* (Figure 3-3 C) et de 20 jours pour *H. erinaceus* (Figure 3-3 B).

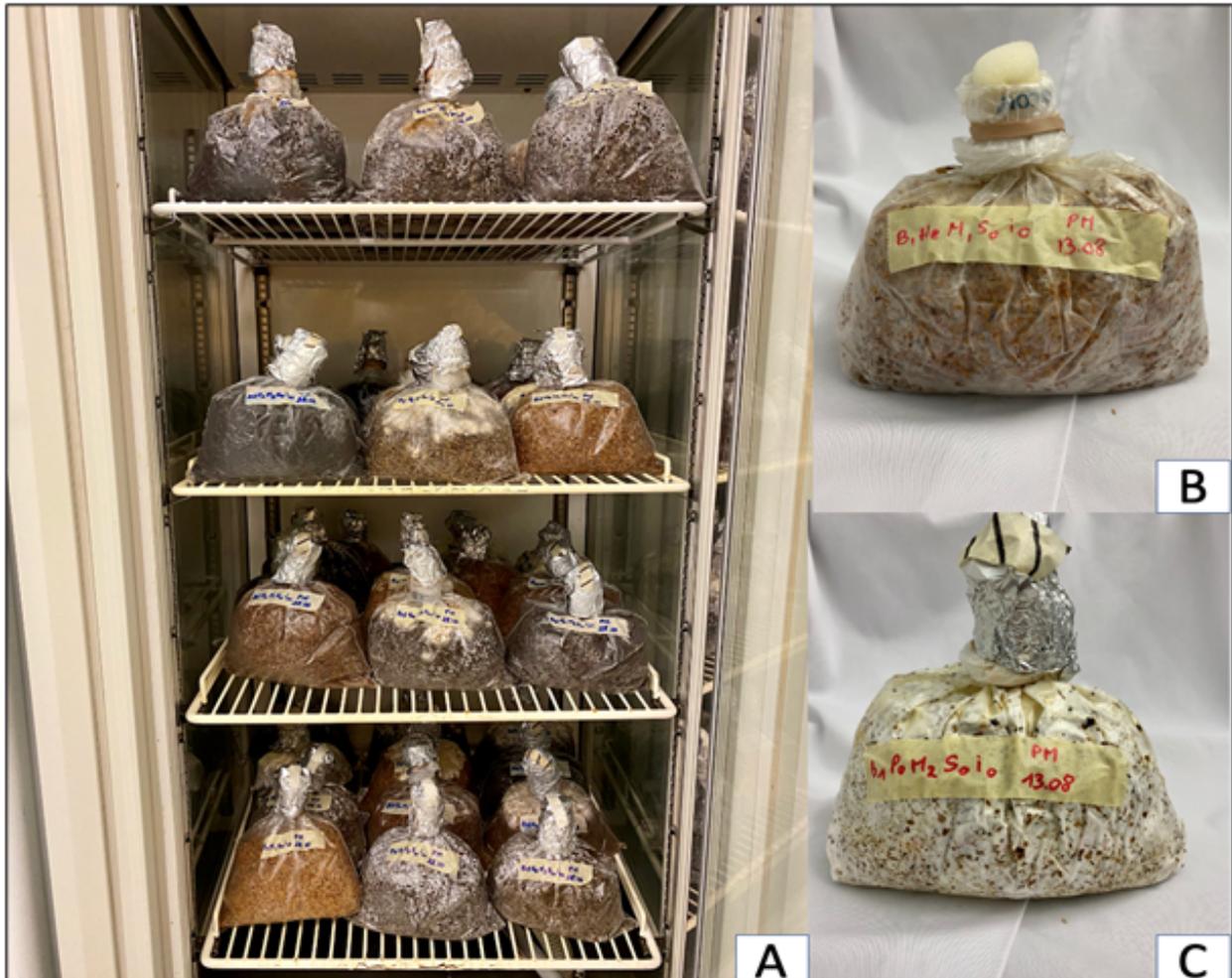


Figure 3-3 : Photos de la chambre environnementale utilisée pour l'étape de colonisation du mycélium (A) ainsi que deux sacs de production entièrement colonisés par *H. erinaceus* (B) et par *P. ostreatus* (C)

### 3.1.6 Fructification

Une fois que l'étape de colonisation arrivée à terme, les sacs de production de champignons ont été ouverts par le biais de quatre entailles en forme de X d'une taille de 4 cm par sac. Un dispositif de penderie a été développé afin d'optimiser l'espace et de standardiser l'étape de fructification des champignons (Figure 3-4 A). Ce dernier avait pour avantage de maximiser tout le volet touchant l'humectage des cultures, automatisant l'arrosage et évitant ainsi l'assèchement des corps fruitiers. Ce système permet d'accrocher les sacs verticalement et de les arroser deux fois par jour par injection d'eau sous pression à l'aide de tubes préalablement percés. Une minuterie liée au dispositif d'arrosage assurait l'automatisation. La quantité

totale d'eau injectée était de 1,8 L/d. Le dispositif de penderie a été placé dans une chambre environnementale à 18 °C et à 80 % d'humidité (Figure 3-4 B, C). Contrairement à l'étape de colonisation, la fructification nécessite une photopériode de huit heures d'exposition à la lumière et seize heures d'obscurité. La chambre était équipée d'un système de ventilation.



**Figure 3-4 : Schémas (A) et photos du dispositif de penderie (B et C) utilisé pour l'étape de fructification des champignons comestibles**

### **3.1.7 Récolte et calculs des rendements de production**

Quotidiennement, la récolte des champignons a été réalisée pendant trente jours. À l'aide d'un scalpel, les corps fruitiers ont été découpés à leur base en prenant soin de ne pas arracher de mycélium ou de substrat. Une fois prélevés, ces derniers ont été pesés puis les rendements de production ont été évalués en calculant l'efficacité biologique pour chacune des espèces et des traitements en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Efficacité biologique}(\%) = \frac{\text{Poids humide total des champignons récoltés}(g)}{\text{Poids sec substrat}(g)} \quad (1)$$

### 3.1.8 Analyses statistiques

Dans le but de comparer l'efficacité biologique des espèces de champignons soumis à différents substrats, les données ont au préalable été examinées, afin de s'assurer qu'elles suivaient une distribution normale en effectuant un test de Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk 1965). Dans un second temps, une analyse de la variance à trois critères de classification (3-way ANOVA), (Miller Jr 1997) a été réalisée afin de comparer les rendements de production observés en fonction des facteurs suivants, soit : 1) le bloc expérimental ; 2) le substrat de production ; et 3) l'espèce de champignon. Afin d'identifier les échantillons à l'origine de différences significatives, un test « post hoc » de type DSH de Tukey (différence significativement honnête) a été réalisé (Abdi and Williams 2010). Cette analyse permet d'effectuer une comparaison multiple en une seule étape. En effet, le test de Tukey permet une comparaison multiple de toutes les paires de moyennes possibles en se basant sur une loi des étendues studentisées (cette loi est similaire à la loi de Student utilisée dans le t-test).

## 3.2 Digestion anaérobie

### 3.2.1 Préparation du milieu minimum

Le processus de digestion anaérobie se déroulant dans des conditions anaérobies, de nombreux nutriments, des micronutriments et des vitamines sont nécessaires pour le fonctionnement optimal de microorganismes. Ceci est particulièrement important pour certains substrats solides de culture qui peuvent être déficients en certains micronutriments (Lindorfer, Pérez López et al. 2007). Afin de produire un milieu minimal anaérobie, différentes solutions doivent être préparées (Annexe 1) en se basant sur les expériences de (Angelidaki, Alves et al. 2009). Par la suite, 975 mL d'eau distillée ont été transférés dans une bouteille en verre préalablement stérilisée dans laquelle les quantités suivantes des différentes solutions ont été ajoutées (Annexe 1) : (A), 10 mL ; (B), 2 mL ; (C), 1 mL ; (D), 1 mL ; (E), 1 mL et (F), 10 mL. Le milieu est ensuite placé à 4 °C.

### 3.2.2 Préparation des bioréacteurs

Les bioréacteurs utilisés étaient des bouteilles de verre Wheaton de 125 mL fermées hermétiquement avec un bouchon muni d'un septum permettant le prélèvement d'échantillons de gaz. Une fois les bouteilles stérilisées, 50 mL du milieu minimal ont alors été transférés dans chacune d'elles, puis les bouteilles ont été barbotées avec un mélange de gaz synthétique constitué de 80 % de N<sub>2</sub> et 20 % de CO<sub>2</sub> pendant 20 min. Un suivi du pH avant et après cette opération a confirmé qu'un pH neutre avait été maintenu (Figure 3-5).



Figure 3-5 : Exposition du milieu minimal à un milieu gazeux constitué de 80 % de N<sub>2</sub> et 20 % de CO<sub>2</sub>

### 3.2.3 Préparation des substrats de production

À partir de chacun des sacs de production de champignons, 50 g de matériel ont été prélevés puis séchés toute une nuit dans une étuve à 60 °C. Par la suite, 5 g de chaque substrat sec ont été transférés dans des

bioréacteurs distincts. Le poids sec a de nouveau été pesé. Le poids nécessaire pour prélever 5 g de substrat sec dans le sac humide a été calculé par relation de proportionnalité.

Dans ce volet de production de biogaz, différents types de substrats ont été utilisés. En effet, pour chaque champignon et chaque mélange, le sac 1 ayant servi à la production de champignon a été utilisé, tout comme les sacs 2, 3 et 4 permettant d'analyser l'impact du facteur de stérilisation sur la production de biogaz (Figure 3-2). Cent-vingt-cinq bioréacteurs ont été préparés lors de cette étude correspondant aux cent-vingt sacs de production de champignon en plus de cinq contrôles d'activité des boues granulaires.

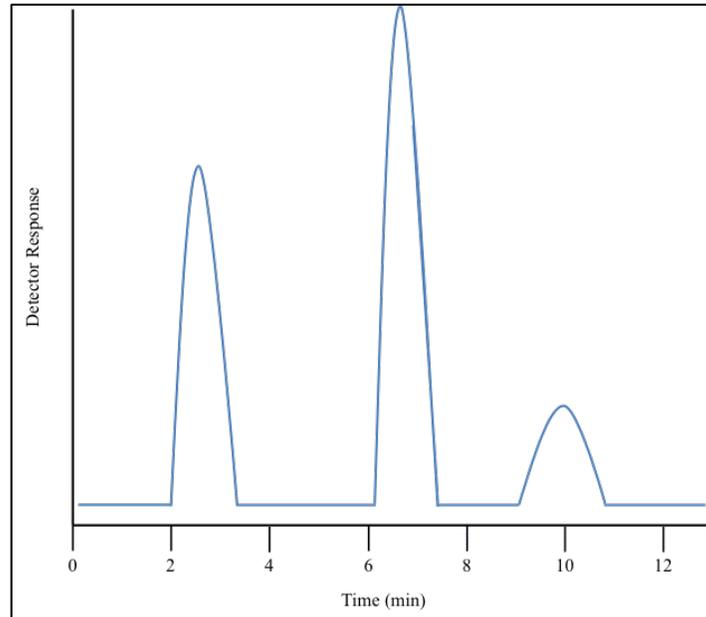
### **3.2.4 Préparation des boues granulaires**

En parallèle de la préparation des substrats de production de champignons à transférer dans les bioréacteurs, les étapes de préparation de l'inoculum ont eu lieu. Les bioréacteurs ont étéensemencés avec des boues granulaires anaérobies provenant d'un réacteur à lit de boues anaérobies à flux ascendant traitant l'effluent d'une usine de transformation de fruit (Lassonde Inc, Rougemont, QC, Canada). L'inoculum, sous forme de boues granulaires, reposant dans un milieu liquide, il est alors nécessaire de drainer ce liquide afin de pouvoir mesurer une quantité précise de boues granulaires avant de les transférer dans les bioréacteurs. Pour se faire, le liquide a été éliminé dans un premier temps en utilisant un tamis puis les boues ont été placées dans des tubes Falcon et centrifugées 10 min à 5000 g. Le surnageant a été éliminé puis 5 g de boues ont été transférés dans les bioréacteurs. Les bioréacteurs ont été placés dans une chambre à l'obscurité à 25 °C.

### **3.2.5 Mesure de la production de biogaz**

La production de gaz a été suivie à la fois par une mesure du volume de gaz à l'intérieur des bioréacteurs (pression barométrique) mais également un dosage de la concentration du CH<sub>4</sub> et du CO<sub>2</sub> par chromatographie en phase gazeuse. La pression barométrique (en psi) a été mesurée à l'aide d'un manomètre relié à une aiguille qui permet de réaliser des mesures à travers le septum des bioréacteurs. La chromatographie en phase gazeuse a été réalisée à l'aide d'un appareil provenant de l'entreprise *Agilent Technologies* (Santa Clara, Californie, États-Unis). Le CO<sub>2</sub> et le CH<sub>4</sub> étaient détectés par un détecteur à ionisation à la flamme. Pour chacun des échantillons, 10 mL de gaz étaient injectés dans l'appareil avant d'être vaporisés dans une colonne dans laquelle repose une substance active appelée *phase stationnaire*. Ce processus permet de séparer les différentes molécules du mélange qui vont sortir de la colonne les unes après les autres après un temps de rétention propre à chaque molécule en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. À la suite de cette analyse, les signaux de détection de chacune des molécules sont représentés dans une figure en fonction du temps de rétention (Figure 3-6). Afin de convertir ces signaux

de détection en une concentration, ceux-ci ont été comparés par une relation de proportionnalité à des signaux de détection obtenus avec des concentrations connues de CH<sub>4</sub> ou de CO<sub>2</sub> (Figure 3-7). L'étalonnage de l'appareil a été réalisé en injectant à trois reprises des mélanges de CH<sub>4</sub> à des concentrations de 1000ppm, 10 000ppm, 100 000ppm et 200 000ppm. La même étape de calibration a été réalisée pour le CO<sub>2</sub>. Les mesures de volume de gaz et le dosage de concentration ont été effectués pour tous les échantillons tous les 7 jours à partir de T0 jusqu'à T35 et une randomisation de l'ordre d'injection des échantillons a été appliquée pour chaque routine de séries de mesures.



**Figure 3-6 Schéma d'un signal type issu d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse représentant la réponse de détection en fonction du temps de rétention en minutes**

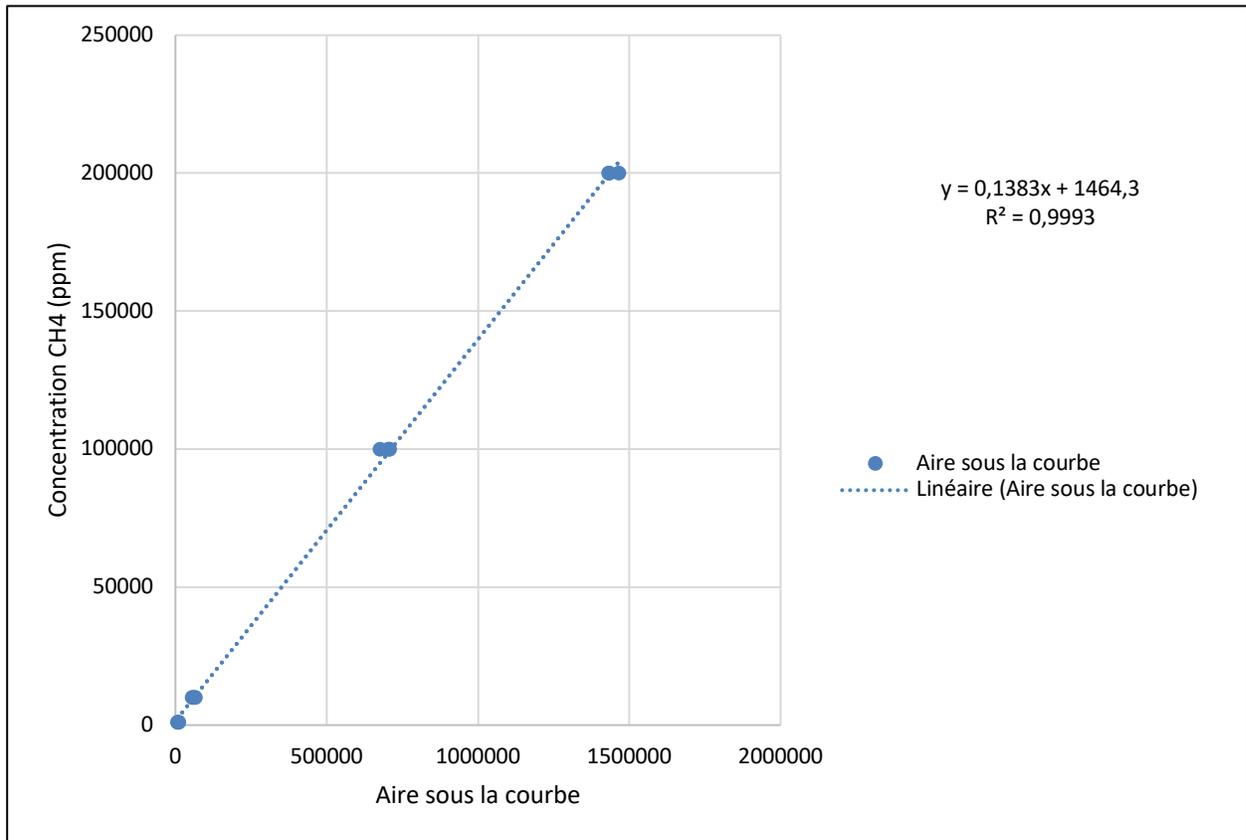


Figure 3-7 : Courbe étalon représentant la concentration de CH4 en ppm en fonction de l'aire sous la courbe du signal de détection par chromatographie en phase gazeuse

### 3.2.6 Méthode de calcul des rendements de production de biogaz

Une fois les mesures effectuées, la pression dans les bioréacteurs, exprimée en psi, est convertie en kPa en utilisant la relation suivante :

$$p(kPa) = p(psi) \times 6,89475729 + 1atm \quad (2)$$

où atm représente la pression atmosphérique soit 101,325 kPa

Par la suite, la pression partielle des gaz d'intérêt est déterminée :

$$P = \frac{p(kPa) \times c}{1000000} \quad (3)$$

où  $c$  représente la concentration d'un gaz d'intérêt dans le bioréacteur (en ppm)

La quantité de  $\text{CH}_4$  ou de  $\text{CO}_2$  est déterminée par la loi des gaz parfaits :

$$PV = nRT \quad (4)$$

où  $P$  représente la pression partielle du gaz déterminée précédemment (en kPa)

$V$  représente le volume total occupé par les gaz dans les bioréacteurs, soit  $V = 0,102\text{L}$

$n$  représente la quantité de gaz (en mole)

$R$  est la constante universelle des gaz parfaits, soit  $R = 8,314 \text{ kPa}\cdot\text{L}/\text{mol}\cdot\text{K}$

$T$  représente la température absolue, soit  $T = 298 \text{ K}$

Ainsi

$$n(\text{mole}) = \frac{P \times V}{R \times T} \quad (5)$$

Enfin, le rendement final de production de biogaz exprime la quantité de  $\text{CH}_4$  ou de  $\text{CO}_2$  en fonction de la quantité de substrat utilisée :

$$R = \frac{n}{m} \quad (6)$$

où  $R$  représente le rendement de production de gaz (en mol/g)

$n$  représente la quantité de gaz (en mol)

$m$  représente la masse de substrat sec utilisée, soit  $m = 5 \text{ g}$

### **3.2.7 Analyses statistiques**

Le dispositif expérimental proposé dans cette étude, conçu principalement pour optimiser le nombre de résultats obtenus à l'issue de l'étape de production de champignon en un temps restreint a pour inconvénient de créer des répétitions non souhaitées pour certains bioréacteurs contenant les substrats de production issus des sacs de production non ensemencés (Figure 3-2). Pour pallier ce défaut, un seul bioréacteur par répétition a été choisi aléatoirement pour la suite des analyses. Tout comme pour le volet de production de champignon, une analyse de la variance à quatre critères de classification a été réalisée. Les facteurs identifiés pour cette analyse sont les suivants, soit : 1) le bloc expérimental ; 2) le substrat de production ; 3) l'espèce de champignon ; et 4) la condition de stérilisation. Par la suite, de multiples comparaisons de toutes les combinaisons de facteurs possibles ont été effectuées grâce au test de Tukey dans l'objectif d'identifier les facteurs permettant d'obtenir les rendements de biogaz les plus élevés.

## **3.3 Analyse de la diversité microbienne**

### **3.3.1 Collection de l'échantillon et extraction d'ADN**

Le mélange liquide présent dans les bioréacteurs a été utilisé afin de réaliser des analyses de la diversité microbienne. Pour cela, 1 mL de ce mélange est prélevé après l'avoir bien agité. Par la suite, le culot a été collecté après centrifugation à 4 °C, 12,000 rpm pendant 10 min (Xiao, Lin et al. 2018). Une fois les collectes d'échantillons réalisées, un protocole d'extrait d'extraction d'ADN a été effectué en utilisant le DNeasy Powerlyser PowerSoil Kit (Numéro Catalogue 12855-50, Qiagen). Lors de la réalisation de ce protocole, toutes les centrifugations ont été réalisées à température ambiante. Tout d'abord 0,25 g d'échantillons ont été placés dans le PowerBead tube puis 750µL de la solution PowerBead et 60 µL dans la solution C1 ont été ajoutés puis les tubes ont été légèrement agités en utilisant un vortex à l'aide du Fast Prep (2x24 40 s 5 m/s). Les tubes ont été placés dans une centrifugeuse à 10 000 g pendant 30 s. Le surnageant a par la suite été transféré dans un tube de collecte de 2 mL, auquel 250 µL de la solution C2 ont été ajoutés avant une agitation au vortex pendant 5 s, avant de placer les tubes dans de la glace pendant 5 min. La solution C2 contient des réactifs qui peuvent précipiter les matériaux organiques et inorganiques autres que l'ADN incluant les débris cellulaires, les protéines et les substances humiques. Il est important d'éliminer toute contamination organique ou inorganique qui peut altérer la pureté de l'ADN et inhiber les futures applications. Une nouvelle fois, les tubes ont été centrifugés à 10 000 g pendant 1 min et en évitant le culot, jusqu'à 600 µL de surnageant ont été transférés dans un tube de collecte. Ensuite, 200 µL de la solution C3 ont été ajoutés, puis les tubes ont subi une agitation au vortex et ont été placés dans la glace pendant 5 min. La solution C3 détient des propriétés similaires à la solution C2, l'objectif de cette étape est

encore une fois d'éliminer toute contamination organique ou inorganique pouvant altérer la pureté de l'ADN. Après une nouvelle centrifugation à 10 000 g pendant 1 min, 750 µL de surnageant ont été transférés dans un type de collecte. Ensuite, 1200 µL de la solution C4 ont été ajoutés au surnageant avant une agitation au vortex pendant 5 s. La solution C4 est une solution fortement concentrée en sel. Puisque l'ADN se lie étroitement à la silice à de hautes concentrations saline, cette étape permet d'ajuster la concentration saline de l'ADN pour permettre son accroche à la colonne MB Spin. Tout élément organique ou inorganique autre que l'ADN qui peut encore être présent à très faible concentration ne se liera pas à la silice. Ainsi, 675 µL de surnageant ont été transférés dans les colonnes MB spin et ces dernières ont été centrifugées à 10 000g pendant 1 min. Le liquide passant à travers la colonne est alors éliminé et 675 µL de surnageant ont alors été ajoutés à la colonne avant de réaliser une nouvelle centrifugation à 10 000g pendant 1 min. Une dernière centrifugation respectant les mêmes paramètres est nécessaire pour traiter la quantité du surnageant restant. Un total de trois centrifugations ont été réalisées pour cette étape, l'ADN se lie sélectivement à la silice de la membrane de la colonne à haute concentration saline. Tout autre contaminant passe alors à travers le filtre laissant uniquement l'ADN lié à la membrane. Par la suite 500 µL de la solution C5 ont été ajoutés et les colonnes sont centrifugées à 10 000g pendant 30 sec. La solution C5 est une solution à base d'éthanol utilisée pour nettoyer davantage l'ADN lié à la silice de la colonne. Cette solution permet d'éliminer tous les résidus de sel d'acide unique et autres contaminants tout en permettant à l'ADN de rester accroché à la membrane. Une deuxième centrifugation a 10 000 g pendant 1 min a alors été réalisée afin d'éliminer toute trace de la solution C5 pour que l'éthanol ne puisse pas interférer avec les futures applications de l'ADN comme des PCR des clivages aux sites de restriction ou alors la réalisation de gel électrophorèse. La colonne a été placée dans un tube de collecte puis 100 µL de la solution C6 ont été transférés au centre de la membrane filtrante. Placer la solution de C6 au centre de la membrane permet de s'assurer que toute la membrane est humidifiée. Ceci se traduit par un décrochage plus efficace et plus complet de l'ADN à la membrane de la colonne. Tandis que la solution C6 passe à travers la membrane de silice, l'ADN qui était préalablement accroché à haute concentration saline est sélectivement relâché par la solution C6, cette dernière manquant de sel. Enfin une dernière centrifugation à 10 000 g pendant 30 sec a été effectuée puis la colonne MB spin peut être éliminée. L'ADN, alors prêt pour les futures applications a été conservé à une température de -20 °C.

### **3.3.2 PCR et préparation des bibliothèques de séquençage**

Après les extractions d'ADN, les échantillons ont été soumis à des PCR afin d'amplifier un fragment du gène de l'ARNr 16S des bactéries et des archées. La région V4 de ce gène a été amplifiée à l'aide d'amorces universelles :

- Illumina F : CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

- Illumina R : GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCT

La partie des amorces soulignée correspond à l'amorce spécifique de la région V4 de l'ARN 16S (Caporaso, Lauber et al. 2011).

Le mélange réactif utilisé est constitué d'eau milli-Q filtrée (0.22 µm) et stérile suite à un passage à l'autoclave, des amorces F et R (10 µM), des dNTPs, du MgCl<sub>2</sub> (25 µM), du BSA (20 µg/mL), du tampon Buffer II (10 X). Par la suite, la Taq polymérase Haute-Fidélité (AccuPrime Taq DNA Polymerase, Polymerase System, High Fidelity, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA) a été ajoutée afin de limiter le nombre d'erreurs survenant lors de la réplication de l'ADN. L'annexe I présente les différents volumes utilisés pour chaque constituant lors de la préparation du mélange de réactions. Pour chaque échantillon, 2 µL d'ADN ont été ajoutés à 48 µL du mélange réactif. Au total, la réaction PCR a été réalisée sur cent-vingt-cinq échantillons selon la programmation du thermocycleur disponible en annexe II. La qualité des amplicons PCR a été validée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %. Ainsi 100 % des échantillons utilisés ont démontré une amplification positive et ont été entreposés à -20 °C.

Des bibliothèques de séquençage ont été préparées afin de réaliser un séquençage Illumina MiSeq PE-250 de l'ensemble des amplicons PCR. Cette étape consiste en plusieurs lavages des amplicons, une PCR index afin de répliquer l'ADN avec des adaptateurs permettant par la suite d'identifier les séquences d'ADN puis une quantification pour la création d'un composite d'amplicons à séquencer. Le premier lavage a pour objectif d'éliminer les dimères d'amorces et les amorces résiduelles issues de la PCR. Ainsi, 16 µL de billes (AMPure XP beads) ont été mélangés à 20 µL d'amplicons afin de fixer ces derniers avant d'être incubés à température pièce pour 5 min puis de placer la plaque sur un support magnétique à température pièce pendant 2 min dans le but de fixer les billes magnétiques et les amplicons aux parois de la plaque. Après élimination du surnageant, deux lavages successifs à l'éthanol ont été effectués par l'ajout de 200 µL d'éthanol 80 % fraîchement préparé, incubation de 30 sec sur le support magnétique à température pièce puis élimination du surnageant. Par la suite, les puits ont ensuite été séchés à l'air libre pendant 10 min avant d'enlever la plaque du support magnétique et de resuspendre les billes et les amplicons dans 52,5 mL de Tris-HCl (10 mM, pH = 8,5). Cette étape permet de décrocher les amplicons des billes afin de les mélanger au tampon. De nouveau, la plaque a ensuite été déposée sur le support magnétique afin de fixer à nouveau les billes non liées aux amplicons sur les parois. Finalement, 50 µL du surnageant composé de Tris-HCl et des amplicons ont été transférés sur une autre plaque 96 puits.

Afin d'ajouter les adaptateurs Illumina et un code barre unique à chaque échantillon afin de permettre leur identification après le séquençage, une PCR index a été réalisée (annexe III) avant de transférer 16 µL de chaque échantillon dans une nouvelle plaque 96 puits. Pour chaque échantillon, 2 µL d'une combinaison

unique d'amorces (5  $\mu$ M) ont été ajoutés. Par la suite, 5  $\mu$ L des amplicons purifiés ont été ajoutés puis la réaction de PCR a été effectuée selon les cycles indiqués en annexe IV.

Une fois l'amplification PCR terminée, un lavage similaire aux précédents a été réalisé en utilisant 28  $\mu$ L de billes (AMPure XP beads) ainsi que 27,5  $\mu$ L de Tris (10 mM, pH = 8,5) par échantillon. Enfin, le surnageant contenant le tampon Tris ainsi que les amplicons ont été transférés dans une nouvelle plaque 96 puits en prélevant 25  $\mu$ L par échantillon.

À la suite des lavages, une quantification des amplicons a été effectuée à l'aide d'une trousse commerciale Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Invitrogen-P7589) sur une plaque 96 puits opaque (Corning-Costar-3792) afin d'évaluer les volumes à prélever de chaque échantillon dans l'objectif de constituer un composite d'amplicons équilibré avec une concentration d'ADN de 1,5 ng/ $\mu$ L par échantillon avant de l'envoyer à Génome Québec pour le séquençage. Lors de l'assemblage du composite dans un microtube de 1,5 mL, les échantillons ont été combinés selon leur volume respectif, puis 75  $\mu$ L de ce mélange a été déposé dans le premier puits d'une plaque de 96 puits (Microtube twin.tec jupe complète (no. 951020401). Finalement, la plaque a été envoyée dans une glacière remplie de glace sèche à Génome Québec afin d'effectuer le séquençage.

### **3.3.3 Traitements des données issues du séquençage**

Une fois le séquençage réalisé, les séquences d'ADN ont été obtenues dans des fichiers en format fastq disponibles sur la plateforme Nanuq. Les fichiers ont subi une série de traitements bio-informatiques à l'aide du logiciel R utilisé sur le serveur Graham de Calcul Canada.

Tout d'abord, l'outil cutadapt a été utilisé pour éliminer les séquences d'amorces (Martin 2011) présentes sur les séquences brutes. Par la suite, les séquences dépourvues d'amorces ont subi une succession de traitements à l'aide du module dada2 (Callahan, McMurdie et al. 2016) permettant une analyse précise des séquences à la base près. Le premier de ces traitements consiste en l'application d'un contrôle qualité selon des critères de qualité des bases et de longueur des séquences. Les séquences ont ensuite été dérépliquées en tenant compte du taux d'erreurs introduit par le séquençage pour alléger les tâches suivantes. Afin de reconstituer les fragments PCR amplifiés, les séquences pairées ont été assemblées avant d'éliminer les chimères en utilisant l'approche « de novo ». Finalement, les séquences non chimériques ont été comparées à une base de données de référence "silva\_nr99\_v138.1\_train\_set.fa", permettant ainsi de leur attribuer une affiliation taxonomique (Quast, Pruesse et al. 2012). Dans un fichier Excel, un seuil critique a été appliqué aux ASV afin de conserver seulement ceux dont le nombre de séquences détectées dans l'ensemble des échantillons était supérieur à 0,005 % de la somme totale des séquences pour tous les ASV. Ce seuil a été

établi pour limiter le risque de faire des analyses statistiques subséquentes sur des matrices dont la diversité est artificiellement augmentée par les amplifications PCR successives.

### 3.3.4 Analyses statistiques

Une première série d'analyses s'est attardée à explorer la variation de la diversité Alpha des différentes communautés microbiennes des bioréacteurs. Pour ce faire, trois mesures de diversité ont été calculées ; la richesse spécifique, la diversité de Shannon et la diversité de Simpson. Ces différents indices ont été calculés sur Rstudio version 1.4.1103 à l'aide du module iNext (Hsieh, Ma et al. 2016) en utilisant l'approche d'extrapolation basée sur un modèle dont les paramètres reposent sur le nombre d'ASV observés en fonction du nombre de séquences obtenues dans chaque librairie de séquençage. Un test d'ANOVA suivi d'un test de Tukey a été effectué à l'aide du module x afin de définir s'il y avait une différence significative entre la distribution des différents indices de diversité en fonction du type de substrat utilisé et également en fonction du type de champignon utilisé.

Une deuxième série d'analyses cherchait à explorer la variation de la diversité bêta des communautés microbiennes dans les bioréacteurs. Les données d'abondances des ASV ont d'abord été transformées par la méthode d'Hellinger (Legendre and Gallagher 2001) qui permet de réduire la contribution des abondances nulles dans les calculs subséquents. Une analyse en coordonnées principales (ACoP) a été effectuée sur la base d'une matrice de distance de Bray-Curtis, permettant d'identifier les différences et les similitudes présentes au niveau de l'abondance des espèces microbiennes entre les échantillons. La distance de dissimilarité de Bray-Curtis est comprise entre 0 et 1, ainsi plus les échantillons ayant une distance de proche de 0 auront une composition similaire et au contraire, plus la distance de ces derniers se rapprochera de 1, plus leur composition sera différente. La ACoP permettait d'explorer les profils de communautés microbiennes dans les différents échantillons pour tenter de déduire quels facteurs environnementaux pouvaient expliquer un degré de similarité ou de différence. Cette interprétation était complétée par une PERMANOVA (Analyse Multivariée Permutationnelle de la Variance) ayant pour objectif d'identifier quels facteurs (Mélange de substrat ou type de champignon) expliquaient les variations de diversité entre les échantillons (Anderson 2014). Enfin une analyse de composition de microbiomes avec correction de biais (ANCOM-BC) (Lin and Peddada 2020) a été réalisée afin d'effectuer des comparaisons deux à deux des abondances relatives des différents genres bactériens entre les différents types de substrat utilisés mais également entre les différents types de champignons.

Une troisième série a été réalisée afin d'étudier la relation entre les communautés microbiennes et les rendements en biogaz. Un test de db-RDA (analyse de redondance basée sur la distance) permettant d'appliquer la RDA sans utiliser la distance euclidienne a été effectué afin d'étudier la dynamique des

communautés bactériennes dans les échantillons selon les rendements en biogaz (Legendre and Anderson 1999). Pour ce faire, la table d'ASV des échantillons a été soumise à la transformation Hellinger telle qu'expliquée précédemment, puis cette dernière a été mise en lien avec une matrice constituée des valeurs des rendements en CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub>. Un graphique constitué de deux axes (CAP 1 et CAP 2) a ainsi été obtenu permettant d'expliquer la variation des profils de distribution des communautés microbiennes selon les paramètres de rendements en biogaz. Les ASV les plus fortement corrélés ont été identifiés en examinant leur position dans l'espace réduit de la db-RDA. Une matrice de corrélation (Spearman) a permis de valider ces observations avec le module corplot (Wei, Simko et al. 2017). Le test de db-RDA était accompagné d'une ANOVA afin de s'assurer de l'impact significatif des deux axes du graphique sur la relation des variables étudiées.

## 4 RÉSULTATS

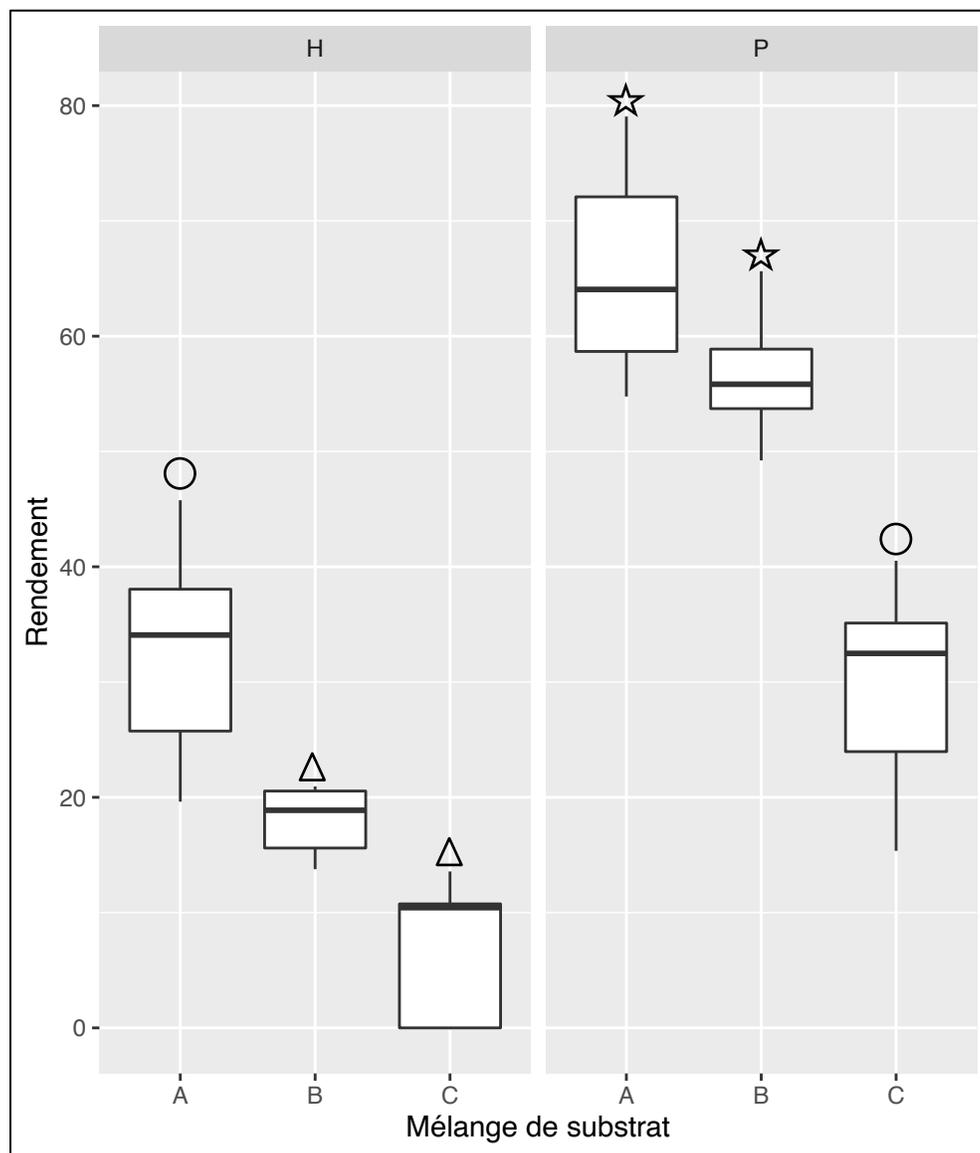
---

Cette partie est consacrée à l'analyse des différents résultats obtenus dans le cadre de ce projet. Tout d'abord, les rendements de production de champignons comestibles ont été étudiés, suivis de l'analyse des rendements de production de biogaz. Ensuite, la diversité des communautés microbiennes a été caractérisée. Finalement, l'ensemble des résultats ont été intégrés afin de mettre en relation les performances des bioprocédés avec la diversité et la composition des communautés microbiennes.

### 4.1 Production de champignons

Les rendements de production de champignons comestibles exprimés par l'efficacité biologique ont été rassemblés dans la figure 4-1. Dans un premier temps, le résultat de l'ANOVA sur les données de l'efficacité biologique a montré une différence significative entre les blocs avec des valeurs de signification ( $p < 0,05$ ) à la limite du seuil de probabilité. De plus, le test de Tukey a identifié des différences significatives entre trois combinaisons de blocs (A-E, B-D, B-E). Malgré ces différences et considérant le seuil de signification, il est difficile de déterminer l'impact des blocs sur les résultats globaux de rendement. Les variations significatives observées sont négligeables. En regardant de plus près les rendements des espèces de champignon, les résultats permettent d'observer que l'espèce *P. ostreatus* est celle donnant la meilleure production en termes de biomasse. En effet, les mélanges de substrat A et B permettent d'obtenir des rendements respectifs de 66 % et 57 % pour le champignon *P. ostreatus*. À titre de comparaison, le mélange A couplé au champignon *H. erinaceus* ne permet d'obtenir un rendement final de seulement 32 %.

Par ailleurs, il faut noter que le rendement obtenu avec le mélange A (*H. erinaceus*) est significativement supérieur aux rendements obtenus avec les mélanges B et C pour le champignon *H. erinaceus*. Finalement, les rendements obtenus avec les mélanges A et B (*P. ostreatus*) sont significativement supérieurs à ceux obtenus avec le mélange C pour le champignon *P. ostreatus*. Ainsi, non seulement les rendements de production du champignon *P. ostreatus* sont meilleurs que ceux du champignon *H. erinaceus* mais le mélange de substrat A permet d'obtenir les meilleurs rendements de production pour les deux champignons.



**Figure 4-1 : Rendements de production de champignons (efficacité biologique en pourcentage) comestibles en fonction du mélange de substrat de production utilisé**

Les lettres H et P correspondent respectivement au champignon *H. erinaceus* et *P. ostreatus*. Les lettres A, B et C correspondent aux mélanges de substrat de production soit A = 100 % sciure de bois, B = 50 %-50 % sciure de bois – fibre de coco et C = 100 % fibre de coco.

## 4.2 Production de biogaz

Cette section a pour objectif d'étudier les rendements de production de biogaz à la suite du processus de digestion anaérobie des résidus de production de champignon et plus particulièrement les rendements en CH<sub>4</sub> présentés à la Figure 4-2.

Tout d'abord, l'ANOVA réalisée sur l'ensemble des échantillons n'a pas identifié de différence significative entre les différents blocs ainsi qu'entre la présence ou l'absence de stérilisation ( $p > 0,05$ ). Ces deux facteurs ne sont alors pas représentés dans la Figure 4-2. Cependant, il est observé une différence significative entre les espèces de champignon utilisées, mais également les mélanges de substrat utilisés ( $p < 0,05$ ). En effet, le test de Tukey suggère l'absence de différences significatives entre les rendements en méthane obtenus suite à la digestion anaérobie des résidus de production du champignon *H. erinaceus* et ceux obtenus suite à la digestion anaérobie des résidus n'ayant pas servi à la production de champignon, quel que soit le mélange de substrat utilisé. À l'inverse, l'analyse révèle la présence de différences significatives entre les rendements obtenus avec le champignon *P. ostreatus* comme prétraitement et ceux obtenus suite à la digestion anaérobie des résidus ayant servis à la production du champignon *H. erinaceus* et les résidus n'ayant pas servis à la production de champignon. Plus précisément, le mélange de substrat A (sciure de bois) couplé au champignon *P. ostreatus* permet d'obtenir des rendements de digestion anaérobie significativement supérieurs à tous les autres mélanges, qu'ils soient couplés aux champignons *H. erinaceus* et *P. ostreatus*, ou en absence de champignon. Les rendements de production de méthane pour le mélange A entre l'absence de production de champignon et la production de *P. ostreatus* subissent une augmentation d'un facteur de 2,5.

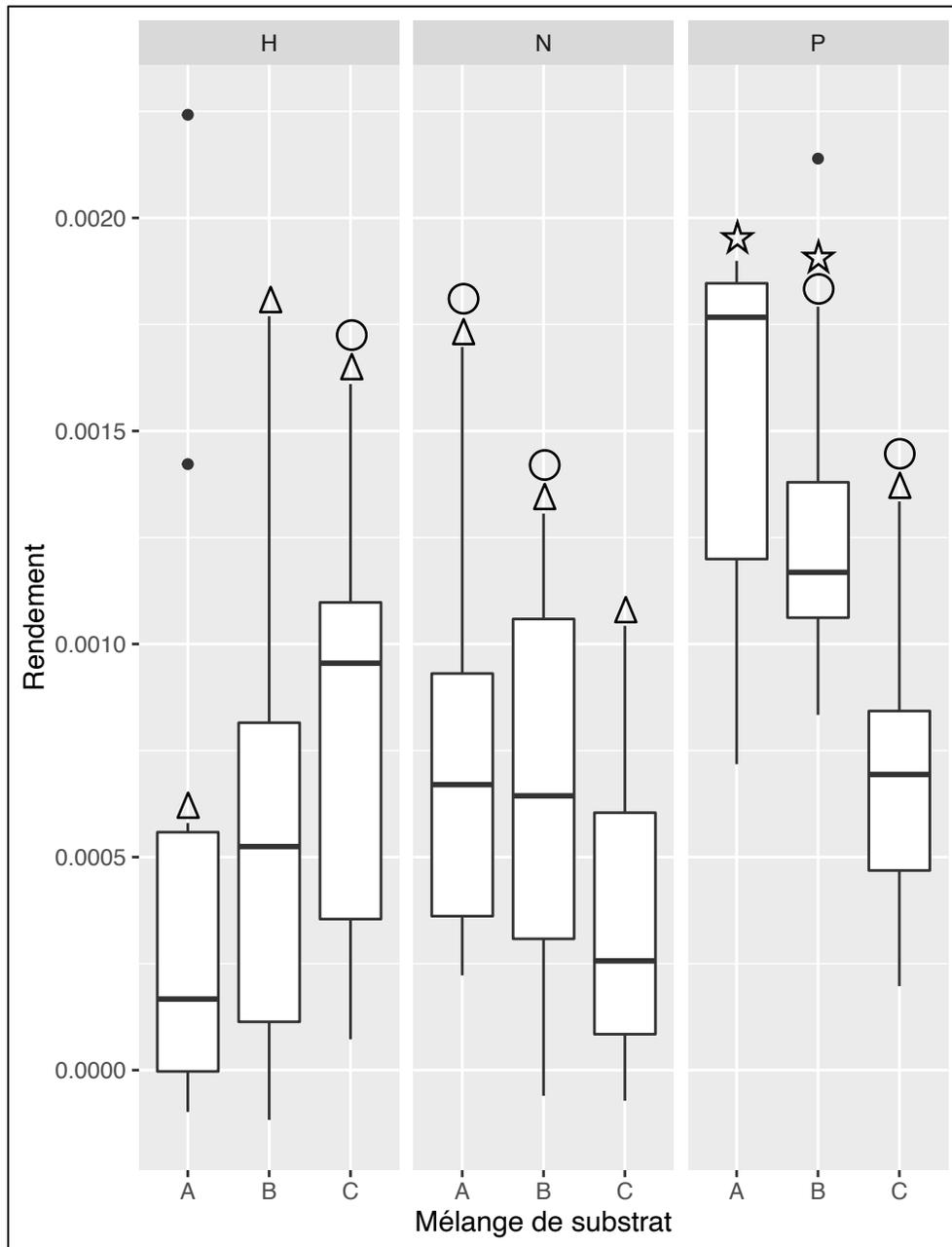


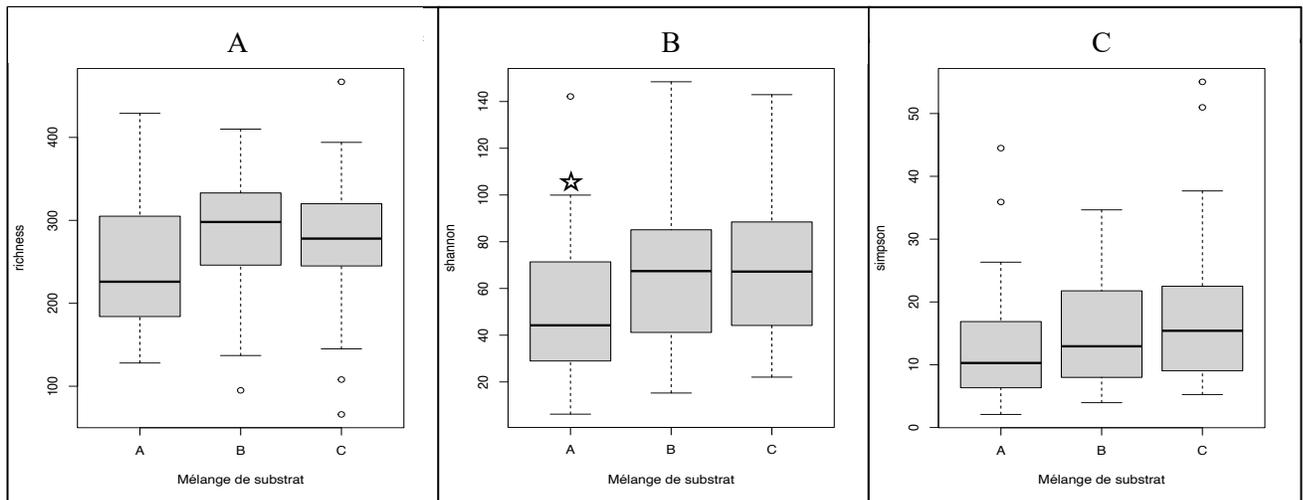
Figure 4-2 : Rendements de CH<sub>4</sub> en nmole/g de substrat sec en fonction du champignon et du mélange de substrat de production utilisés

Les lettres H, P et N correspondent respectivement au champignon *H. erinaceus*, *P. ostreatus* et à l'absence de champignon. Les lettres A, B et C correspondent aux mélanges de substrat de production soit A = 100 % sciure de bois, B = 50 %-50 % sciure de bois – fibre de coco et C = 100 % fibre de coco.

### 4.3 Diversité Alpha

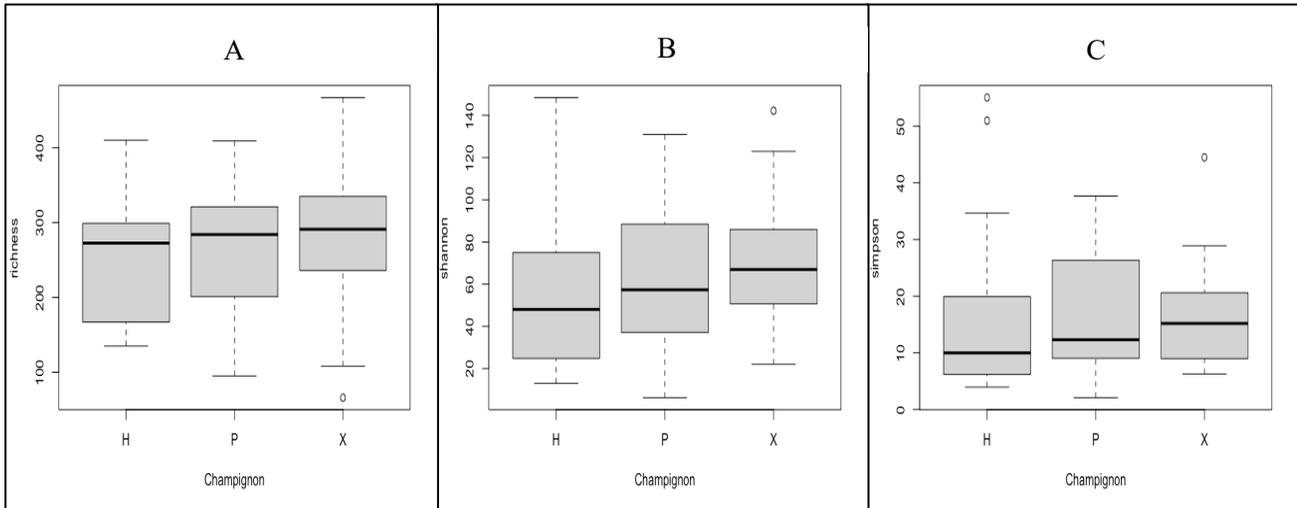
La diversité Alpha vise à documenter le nombre et l'équitabilité des ASV observés dans un échantillon. Trois indices ont été pris en compte pour cette étude ; l'indice de diversité spécifique, l'indice de diversité de Shannon et l'indice de diversité de Simpson dont le calcul accorde une plus grande importance respectivement, aux espèces rares, aux espèces abondantes et aux espèces dominantes présentes dans les échantillons. L'intérêt de cette démarche est, dans un premier temps, de comparer chaque type de substrat de production de champignon utilisé entre eux afin d'identifier un lien au niveau des différents indices de diversité Alpha entre les substrats A, B et C. Dans un second temps, cette analyse permet de visualiser la distribution des indices de diversité en fonction du type de substrat utilisé. Il apparaît alors que la diversité Alpha du mélange de substrat à base de sciure de bois (A) est significativement moins élevée que les deux autres types de substrat pour l'indice de diversité de Shannon (Figure 4-3). En effet, des tests de Tukey ont été réalisés afin d'établir des différences significatives entre les différents substrats pour les trois indices étudiés. L'ensemble de ces tests n'a révélé aucune différence significative entre les substrats utilisés, excepté pour les comparaisons entre le substrat A et B ainsi que les substrats A et C dans le cas de l'indice de Shannon.

La même démarche a été effectuée en comparant cette fois-ci la diversité Alpha pour les différents champignons utilisés comme prétraitements (Figure 4-4). Cette fois, aucune différence significative n'a été identifiée, quel que soit le type d'indice de diversité examiné.



**Figure 4-3 : Représentation de la distribution des différents indices de diversité Alpha en fonction du type de substrat utilisé**

**A : Indice de la diversité spécifique B : Indice de diversité de Shannon C : Indice de diversité de Simpson**



**Figure 4-4 : Représentation de la distribution des différents indices de diversité Alpha en fonction du type de champignon utilisé**

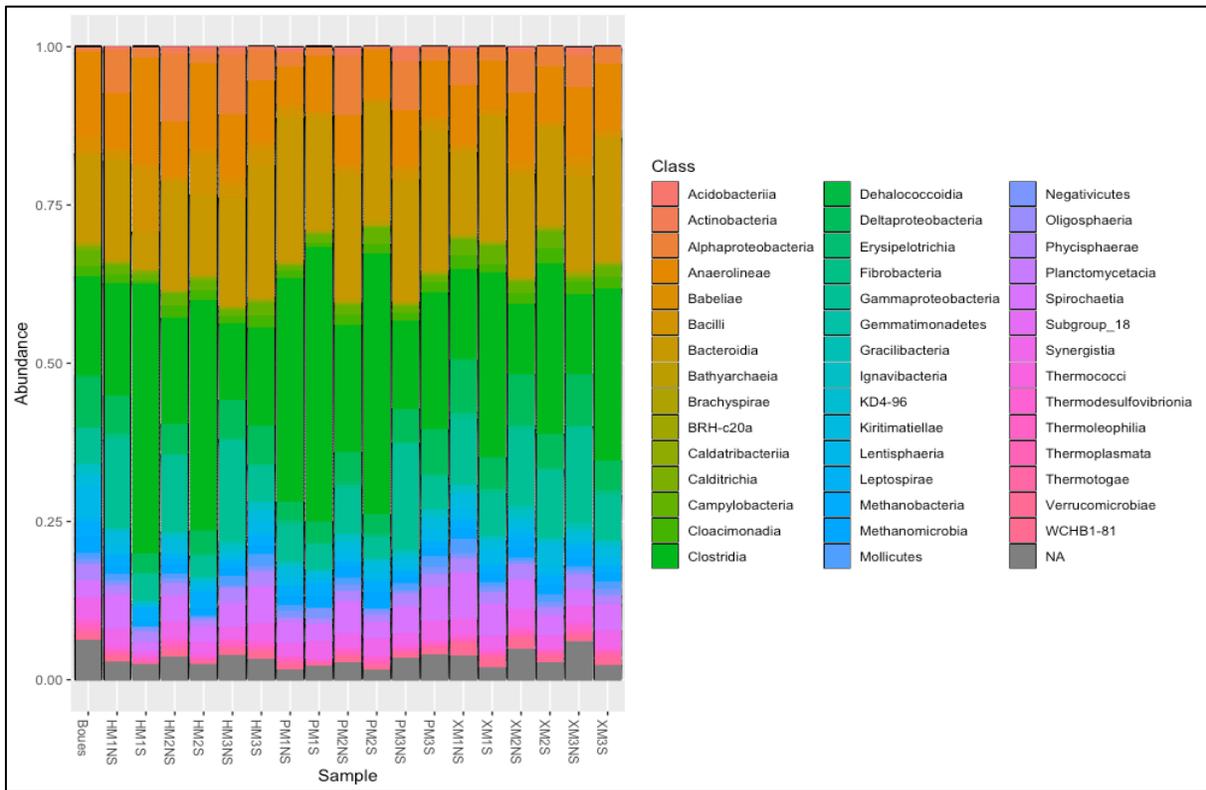
**A : Indice de la diversité spécifique B : Indice de diversité de Shannon C : Indice de diversité de Simpson**

**H : *H.erinaceus* P : *P.ostreatus* X : Absence de champignon**

#### 4.4 Diversité Bêta

Cette section a pour objectif d'identifier les classes microbiennes les plus abondantes présentes dans chaque type d'échantillons puis d'étudier la variation de la diversité entre chacun de ces échantillons et d'identifier les facteurs pouvant expliquer ces variations.

Dans un premier temps, il n'apparaît pas évident d'observer des différences quant à la répartition des principales classes microbiennes entre les différents types d'échantillons (Figure 4-5). Il est à noter une similitude entre tous les profils et le profil des échantillons ne contenant que les boues granulaires. De plus, la présence de certaines classes, notamment celles des *Methanobacteria*, des *Bacteroidia* et des *Clostridiales*, démontre des proportions semblables à travers tous les échantillons observés.



**Figure 4-5 : Représentation de l'abondance relative des principales classes bactériennes retrouvées en fonction des échantillons**

**H : *Hericium erinaceus*    P : *Pleurotus ostreatus*    X : absence de champignon**

**M1 : sciure de bois    M2 : fibre de coco et de sciure de bois    M3 : fibre de coco**

**S : Stérilisé    NS : Non stérilisé**

Par la suite, une ACoP (Figure 4-6), se basant sur les profils de diversité à l'échelle des ASV, a permis d'identifier deux axes étant principalement responsables des variations entre les profils de diversité entre les échantillons. Ces deux facteurs représentent une proportion d'explication de 14,4 % (axe 1) et 9,7 % (axe 2). Ces axes ne permettent pas de distinguer les échantillons en fonction du substrat de production ou du champignon utilisé comme prétraitement.

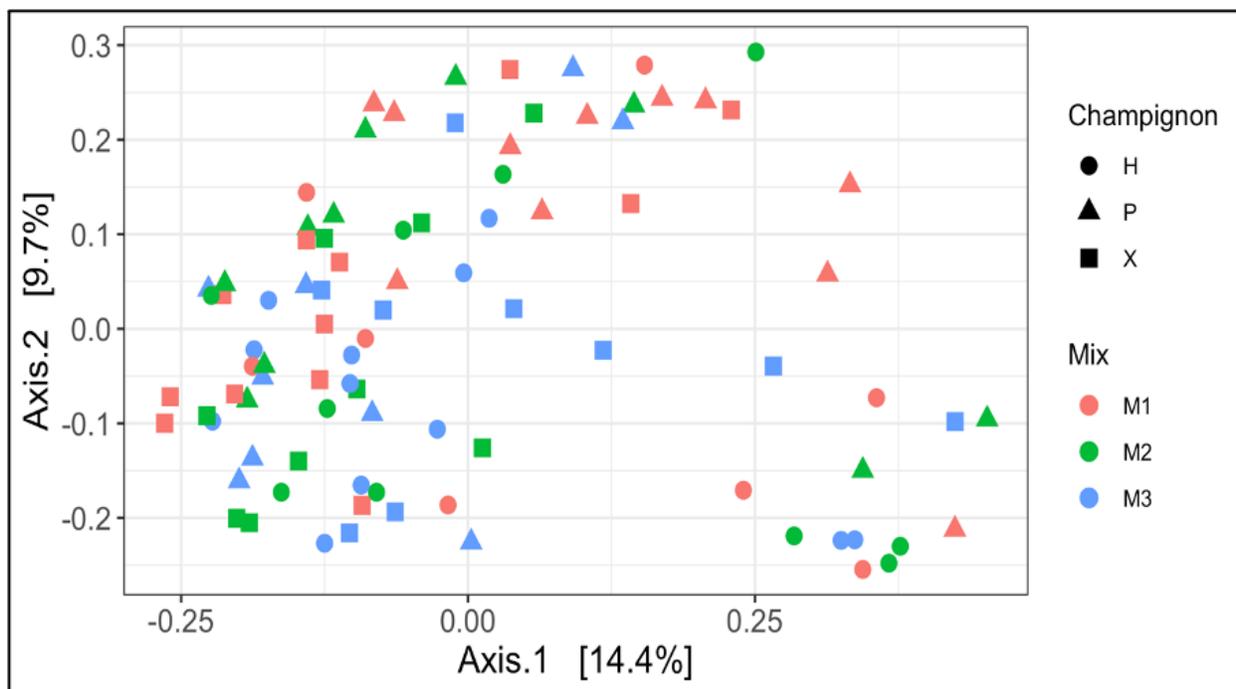


Figure 4-6 : ACoP mettant en évidence la variation de la diversité entre les échantillons

La PERMANOVA réalisée afin d'identifier le pouvoir discriminant des facteurs « champignon » et « substrat » au niveau de la diversité de l'ensemble des échantillons a révélé la présence de différences significatives ( $p < 0,05$ ). Ces différences entre la diversité des échantillons sont expliquées à la fois par le facteur « mélange de substrat » et le facteur « champignon » (tableau 4-1). Il est à noter que le type de mélange de substrat exerce une influence 6 % sur la variation de la diversité entre les échantillons. Il en va de même pour le facteur « champignon » qui explique à hauteur de 6,2 % cette variation. La portion résiduelle, constituée de multiples facteurs, expliquerait à 88 % la différence de diversité. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée pour les facteurs « stérilisation » et « bloc expérimental ».

Tableau 4-1 : Résultats de la PERMANOVA réalisée au niveau de l'ensemble des échantillons et prenant en compte à la fois le facteur mélange de substrat et le facteur champignon.

	P-value	Proportion d'explication
Mélange de substrat	0,001	0,060
Champignon	0,001	0,062

Facteur résiduel	/	0,878
------------------	---	-------

Par la suite, une influence significative (PERMANOVA,  $p < 0.05$ ) du type de champignon utilisé sur la variation de la diversité pour toutes les comparaisons deux à deux a été mise en évidence (Tableau 4-2). En effet, les comparaisons entre les échantillons *P. ostreatus* et *H. erinaceus* révèlent une influence de la part du facteur « champignon » à hauteur de 3,6 % contre 96,4 % pour les facteurs résiduels. Ce faible pourcentage d'explication est retrouvé entre les comparaisons des échantillons *P. ostreatus* et absence champignon (3,2 %) ainsi que les échantillons *H. erinaceus* et absence champignon (3,2 %).

Enfin, une observation légèrement différente peut être réalisée dans le cas de l'analyse du facteur « mélange de substrat ». Parmi les trois comparaisons effectuées, seule la comparaison entre les échantillons du mélange A et du mélange C révèle une différence significative expliquée à 4,5 % par ce facteur (Tableau 4-3).

**Tableau 4-2 : Résultats des PERMANOVAs réalisée sur des comparaisons deux à deux entre les types de champignon**

	P-H		P-X		H-X	
	P-Value	Proportion d'explication	P-Value	Proportion d'explication	P-Value	Proportion d'explication
Champignon	0,023	0,036	0,026	0,032	0,023	0,032
Facteurs résiduels	/	0,964	/	0,968	/	0,968

**Tableau 4-3 : Résultats des PERMANOVAs réalisée sur des comparaisons deux à deux entre les types de substrat**

	A-B		A-C		B-C	
	P-Value	Proportion d'explication	P-Value	Proportion d'explication	P-Value	Proportion d'explication
Mélange de substrat	0,213	0,022	0,002	0,045	0,084	0,026
Facteurs résiduels	/	0,978	/	0,955	/	0,974

Enfin, les tests statistiques ANCOM-BC ont permis d'effectuer des comparaisons deux à deux des abondances relatives des différents genres bactériens entre les différents types de substrat utilisés (Tableau

4-4) et les différents types de champignon (Tableau 4-5). Dans le tableau 4-4, tous les log-ratio négatifs signifient une abondance relative plus élevée dans le mélange de substrat A pour le genre en question. Dans le tableau 4-5, les log-ratio positifs signifient une abondance relative plus élevée dans le mélange avec présence de champignon pour le genre en question.

Ainsi quelques différences d'abondances relatives sont observées entre les échantillons en présence de champignon par rapport à l'absence de champignon. En effet, l'abondance relative du genre *Bacillus* spp. apparaît plus élevée dans les échantillons en présence du champignon *H. erinaceus* mais également en présence de *P. ostreatus*. De plus, les genres *Clostridium* spp. et *Methanosarcina* spp. possèdent une abondance relative plus élevée dans les échantillons en présence de *P. ostreatus* que dans les échantillons sans champignon. Les *Methanosarcina* spp. sont des archées méthanogènes dont les espèces sont capables de produire du méthane par les trois modes de méthanogénèse (hydrogénotrophes, acétoclastes et méthylotrophes). De plus, l'abondance relative du genre *Devosia* spp. apparaît comme plus élevée dans les échantillons du mélange B que dans ceux du mélange A. Enfin, les comparaisons entre les échantillons du mélange A et C révèlent la présence de différences significatives pour sept genres bactériens.

**Tableau 4-4 : Résultats d'ANCOM-BC réalisé sur des comparaisons deux à deux entre les types de champignon**

Comparaison	Genre	Log fold-change (erreur standard)	p-value ajustée (Holm)
<i>H. erinaceus</i> - Contrôle	<i>Bacillus</i> spp.	3.15 (0.52)	<0.00001
<i>P. ostreatus</i> - Contrôle	<i>Bacillus</i> spp.	1.88 (0.42)	<0.001
	<i>Methanosarcina</i> spp.	1.57 (0.43)	0.038
	<i>Clostridium</i> spp.	1.38 (0.34)	0.0060

**Tableau 4-5 : Résultats d'ANCOM-BC réalisé sur des comparaisons deux à deux en fonction des types de substrat**

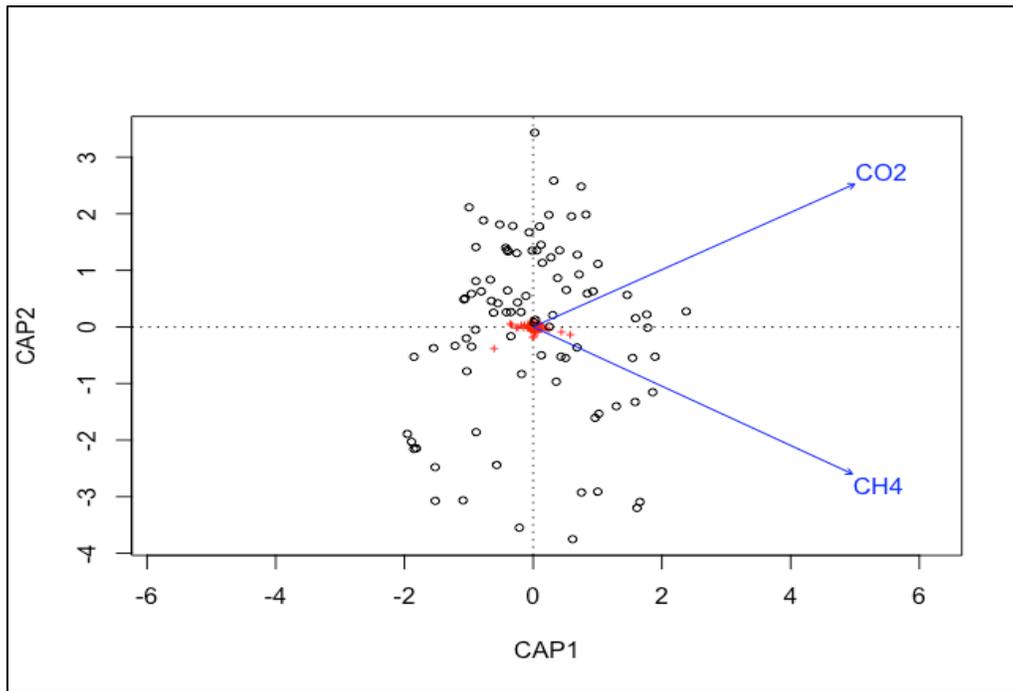
Comparaison	Genre	Log fold-change (erreur standard)	p-value ajustée (Holm)
Mélange B – Mélange A	<i>Devosia</i> spp.	1.48 (0.35)	0.0034
Mélange C – Mélange A	<i>Acetanaerobacterium</i> spp.	-1.66 (0.40)	0.0039

	<i>Sporobacter</i> spp.	-2.94 (0.38)	<0.00001
	<i>Hyphomicrobium</i> spp.	-1.46 (0.32)	<0.001
	<i>Sphingomonas</i> spp.	-1.53 (0.40)	0.019
	<i>Aquabacterium</i> spp.	-1.18 (0.29)	0.0068
	<i>Castellaniella</i> spp.	2.05 (0.51)	0.0076
	<i>Rhodanobacter</i> spp.	2.0 (0.55)	0.031

#### 4.5 Étude de la relation entre les communautés microbiennes et les rendements en biogaz

Cette dernière section est consacrée à l'étude d'un possible lien entre la distribution des communautés bactériennes et les rendements en biogaz. L'examen de cette relation repose sur une ordination des échantillons dans un espace réduit où la différence entre les profils de communautés microbienne exprimée par une distance Bray-Curtis est contrainte par la matrice de distribution des biogaz. Tout d'abord, deux axes présentés dans la figure 4-7 (CAP 1 et CAP 2) permettent d'expliquer au mieux la relation entre les rendements en biogaz et la diversité microbienne des échantillons. Le premier axe est défini par la relation entre les ASV et la production de biogaz. La distinction des biogaz par leur contenu en CH<sub>4</sub> se définit avec l'axe 2. Ces deux derniers axes expliquent respectivement à 4,8 % et 0,9 % la variation des communautés microbiennes. Ainsi, les ASV et les échantillons situés dans les coordonnées négatives de l'axe 1 ont une

abondance relative corrélée inversement avec les rendements en biogaz et le cadran en bas à droite associée aux plus forts enrichissements en CH<sub>4</sub>.



**Figure 4-7 : db-RDA imageant la relation entre les communautés microbienne des échantillons et les rendements en biogaz**

**Cercles : Échantillons      Croix : ASV**

Il a été possible d'identifier six ASV se démarquant des centroïdes et dont les coordonnées sont les plus élevées pour l'axe CAP1. L'affiliation taxonomique de ces ASV est présentée dans le Tableau 4-4. Parmi ces six ASV, cinq d'entre eux appartiennent à l'ordre des *Bacteroidales*. Il est à noter que les ASV 3, 4 et 67 appartiennent au genre *Bacteroides* (bacilles gram négatifs anaérobies) là où les ASV 14 et 21 sont assimilés au genre *Macellibacteroides* (anaérobies). Enfin, le sixième ASV identifié appartient quant à lui à l'ordre des *Clostridiales* (anaérobies). Il est à noter que ces ASV ne correspondent pas aux genres *Clostridium* spp. et *Methanosarcina* spp. dont les abondances relatives sont supérieures en présence du champignon *P. ostreatus*.

**Tableau 4-6 : Identification taxonomique des principaux ASV identifiés**

ASV	Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
ASV_3	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroida</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
ASV_4	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroida</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
ASV_14	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroida</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Tannerallaceae</i>	<i>Macellibacteroides</i>
ASV_21	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroida</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Tannerallaceae</i>	<i>Macellibacteroides</i>
ASV_121	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminoclostridium_1</i>
ASV_67	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroida</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>

Une matrice de corrélation (Figure 4-8) a permis d'identifier les relations significatives entre les six ASV identifiés précédemment et les rendements en biogaz. Tout d'abord, une très forte corrélation positive a été observée entre les ASV 3, 4 et 67, appartenant tous les trois au genre des *Bacteroides*. Une relation positive a notamment été mise en évidence entre l'ASV 121, appartenant au genre *Ruminoclostridium\_1* et ces trois mêmes *Bacteroides*. De plus, il s'est avéré que l'ASV 21 a été associé positivement à l'ASV 14. Ces deux ASV appartiennent au genre *Macellibacteroides*. Enfin, une corrélation positive et similaire a pu être observée entre tous les ASV et les rendements en CH<sub>4</sub>. Cependant, concernant les rendements en CO<sub>2</sub>, une corrélation positive plus importante a été mise en évidence pour l'ASV 121 par rapport aux autres.

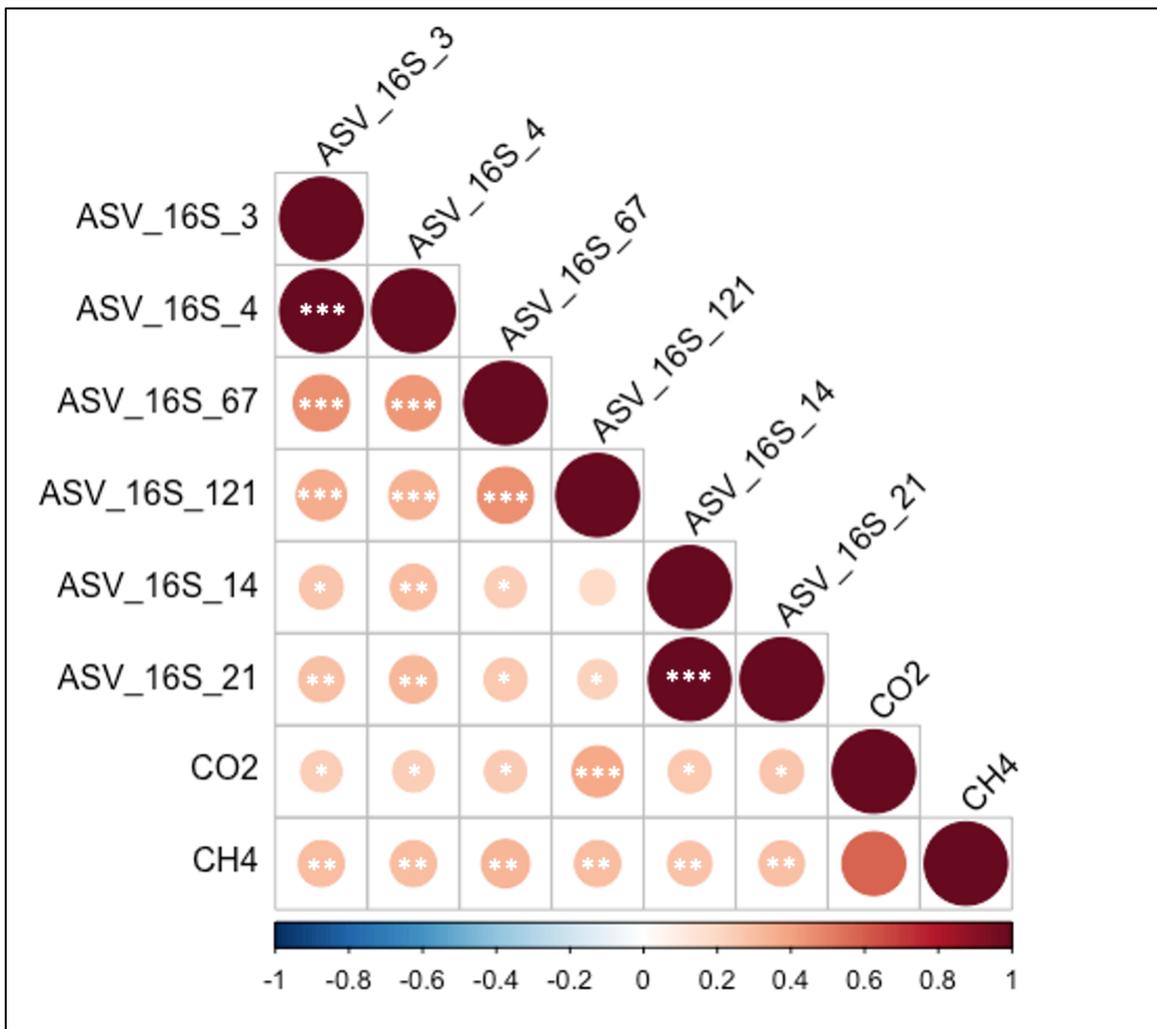


Figure 4-8 : Matrice de corrélation relatant de la relation entre les rendements en biogaz et les ASV précédemment identifiés

\*\*\* = p-value < 0.001

\*\* = p-value < 0.01

\* = P-value < 0.05

## 5 DISCUSSION

---

L'objectif de ce projet consistait à identifier le type de résidus permettant d'obtenir les meilleurs rendements lors de la production de champignons comestibles et de biogaz, mais également d'analyser la diversité de la communauté microbienne présente dans les bioréacteurs afin d'étudier l'impact de la composition du mélange de résidus lignocellulosiques et des prétraitements sur cette dernière.

En premier lieu, les rendements de production des champignons *P. ostreatus* et *H. erinaceus* sur un mélange de substrat composé de sciure de bois sont prometteurs. Pour pouvoir considérer la production de champignons tels que *P. ostreatus* de profitable, les rendements doivent être supérieurs à 50 % (Patra and Pani 1995). Dans cette étude, le mélange réalisé à partir de 100 % de sciure de bois permettait d'obtenir des rendements de 66 %. Les substrats à partir de paille ou de sciure de bois sont largement utilisés pour la production commerciale des pleurotes (Philippoussis 2009). La sciure de bois fournit de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine qui sont utilisées durant la croissance du mycélium et le développement du corps fruitier (Claye, Idouraine et al. 1996, Yildiz, Yildiz et al. 2002). Ce substrat possède un taux de délignification plus faible que la paille, mais les rendements de production sont tout de même très élevés, variant de 34 % à 86 % en fonction du type de bois utilisé pour la production de *P. ostreatus* (Buah, Van der Puije et al. 2010, Koutrotsios, Mountzouris et al. 2014, Hoa, Wang et al. 2015). En fonction du type de bois utilisé, la sciure peut contenir différents composés chimiques, en particulier en ce qui concerne la lignine, la cellulose et l'hémicellulose ainsi que la stœchiométrie C:N, qui est souvent très élevé (150-200), impliquant une faible teneur en azote avoisinant les 0,1 et 0,2 % (Philippoussis 2009). De meilleurs rendements de production sont attendus à partir d'un substrat possédant un rapport C/N plus bas (Hoa, Wang et al. 2015). Ce ratio pourrait atteindre la valeur de 40 - 50 pour la production de champignons, ceci étant dû à leur capacité d'extraire l'azote même si présent en faible quantité (Mansour-Benamar, Savoie et al. 2013). Les champignons sont très riches en protéines, et les contenus riches en protéines sont obtenus à partir de substrats riches en azote (Aguilar-Rivera and Jesús-Merales 2010) ou supplémentés en azote (Gupta, Sharma et al. 2013, Hoa, Wang et al. 2015). Ce facteur est important pour la production de champignons, influençant le développement de ce dernier. Une étude a observé une augmentation significative dans les rendements de production de *P. sajor-caju* lorsque les substrats étaient complémentés avec 1 % d'azote sous forme de farine de pois chiche, d'huile d'arachide ou de son de riz (Mane, Patil et al. 2007). Ces informations démontrent l'importance de l'utilisation de son de blé comme source d'azote dans la préparation des mélanges de production de champignons de cette étude. Des données confirment que la sciure de bois seule fournit de plus mauvais rendements que de la sciure de bois supplémentée avec

de la bagasse de canne à sucre ou de l'épi de maïs pour la production de *P. ostreatus* (Hoa, Wang et al. 2015).

En ce qui concerne les rendements de production du champignon *H. erinaceus* sur la sciure de bois, les résultats de cette étude corroborent le peu d'informations disponibles à ce sujet. Avec un rendement de production de 32 %, le rendement obtenu se situe dans le même ordre de grandeur que des rendements obtenus avec des substrats similaires autour des 22 à 44 % (Atila, Tuzel et al. 2018). Le meilleur rendement de production du champignon *H. erinaceus* a été obtenu à partir d'un substrat composé de sciure de chêne et de graine de coton. Ceci pourrait être justifié par le ratio cellulose/lignine élevé observé dans les résidus de coton (Philippoussis 2009) et les très bons rendements déterminés par plusieurs études sur ce type de substrat (Mane, Patil et al. 2007, Khan, Nawaz et al. 2012, Koutrotsios, Mountzouris et al. 2014, Sardar, Ali et al. 2017). En accord avec de nombreuses données, cette étude confirme les très bons rendements de production de champignons comestibles à partir de substrat de sciure de bois.

En revanche, la fibre de coco seule ne semble pas permettre le bon développement des champignons. Les rendements de production sont très faibles pour *P. ostreatus* avec seulement 29 %, bien inférieurs aux résultats obtenus sur la plupart des substrats connus. En ce qui concerne la production du champignon *H. erinaceus*, celle-ci est presque inexistante avec un rendement de seulement 5 %. La fibre de coco est composée à 40 % de cellulose, 9 % d'hémicellulose et 51 % de lignine. Cette composition semble favorable au développement de Basidiomycètes, en particulier *Pleurotus* spp. Cependant, les rendements de production sont significativement plus faibles ( $P < 0,05$ ) comparativement à la sciure de bois. En effet, plusieurs études estiment les rendements de production des champignons *Pleurotus* spp. entre 0 % et 39 % sur ce type de substrat (Thomas, Prabhu et al. 1998, Aguilar, Barbosa et al. 2010). Ces résultats sont supportés par une étude ayant découvert que l'élongation racinaire est fortement inhibée dans un substrat contenant de la fibre de coco (Ma and Nichols 2004). Cette phytotoxicité serait due à la forte concentration de composés phénoliques dans le substrat. De plus, comme tout autre type de substrat ayant servi à la production de légumes, la fibre de coco souffre potentiellement d'une accumulation d'ions (sodium, chlorure), d'une concentration saline élevée (Spiers and Fietje 2000) et d'une forte hétérogénéité qui nécessite donc des amendements (Urrestarazu, Salas et al. 2003, Mazuela, Salas et al. 2005) et des rinçages pour pouvoir être utilisé comme substrat de culture (Mazuela and Urrestarazu 2009). De plus, la fibre de coco possède une faible teneur en azote et un indice de rétention élevé (Cresswell 2002). Cette capacité de rétention de l'eau aggraverait la toxicité du substrat puisque de nombreux composés phénoliques sont solubles dans l'eau. Une autre étude, réalisée sur les pleurotes, met en avant les faibles rendements de production de la fibre de coco face à la sciure de bois (Vetayasuporn 2006). Une autre étude démontre que tout type de substrat composé à 50 % ou plus de fibre de coco entraîne un ralentissement du développement

du corps fruitier dû à la faible teneur en azote et au ratio C/ N élevé (100:1) dans la fibre de coco (Arenas, Vavrina et al. 2002). Les résultats de cette étude s'opposent à cette information en ce qui concerne le champignon *P. ostreatus*. En effet, avec un rendement de production à 57 %, le mélange composé à 50 % de fibre de coco et 50 % de sciure de bois n'est pas significativement moins performant que le mélange composé à 100 % de sciure de bois ( $P > 0,05$ ). Cette information se confirme cependant en ce qui concerne le champignon *H. erinaceus*. Le mélange composé à 50 % de fibre de coco et 50 % de sciure de bois, obtenant un rendement de production de seulement 18 %, ne permet pas d'être aussi performant que le mélange composé à 100 % de sciure de bois. Enfin, la fibre de coco est composée à 51 % de lignine, mais l'activité lignolytique des champignons est induite par la présence d'un milieu riche en azote (Knop, Yarden et al. 2015). Afin d'augmenter le potentiel de la fibre de coco dans la production de champignons comestibles, celle-ci pourrait potentiellement être traitée afin d'éliminer les composés phénoliques ainsi que les ions accumulés et rendre la fibre de coco plus appropriée au développement de champignons, spécialement si supplémentée avec les nutriments adaptés. En effet, des amendements en nutriments (azote) pourraient être effectués. De plus, l'utilisation de microorganismes exerçant un effet de promotion de la croissance de champignons ou encore des pratiques telles que des cultures de champignon en rotation sur les mêmes substrats pourraient participer à l'amélioration des rendements de production de champignon. Enfin, les résultats de cette étude recommanderaient l'utilisation de la fibre de coco en complément d'un autre substrat plutôt que son utilisation seule pour la production de champignon comestible. Disponible en grande quantité et ce de manière continue, la fibre de coco pourrait potentiellement permettre d'obtenir des rendements de production de champignons rentables en explorant les différentes perspectives présentées dans cette étude.

Dans un second temps, les résultats de production de biogaz permettent d'apporter de nouvelles informations à cette étude. En effet, de nombreuses études démontrent que l'utilisation résidus de substrats de croissance de champignons est appropriée puisque les matériaux lignocellulosiques sont prédigérés biologiquement de ce fait plus disponible à la décomposition bactérienne par digestion anaérobie (Chiu, Law et al. 2000, Mohd Hanafi, Rezania et al. 2018). Une étude rédigée par (Pérez-Chávez, Mayer et al. 2019) recense un total de 31 études, 80 % d'entre elles ont rapporté une augmentation de la production de biogaz suite à l'utilisation de substrats prétraités par la production de champignons par rapport à l'utilisation de substrats bruts. Parmi les études ayant analysé la production de méthane, 74 % rapportent une augmentation de la production de méthane suite à l'utilisation de substrats prétraités par la production de champignons par rapport à l'utilisation de substrat non prétraité. Plusieurs auteurs ont indiqué les résultats en rapportant la production du biogaz par kg de solides volatils (VS) ou en kg de solides totaux (TS) et d'autres ont simplement rapporté en unités de volume. Les solides totaux représentent la quantité de solides contenus dans l'échantillon après l'évaporation de l'eau. Les solides totaux volatils représentent la perte de

substances volatiles lorsque l'échantillon est chauffé à 550 °C. Ces deux unités sont bien différentes et l'expression de rendements en fonction de ces unités rend les comparaisons difficiles. En effet, le rapport VS/TS est propre à chaque résidu organique, ce qui rend les conversions d'unités d'une étude à l'autre impossible. De plus, les études exprimant des quantités de biogaz en volume ne prennent pas en compte la composition du biogaz et le rapport CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> qui n'est pas universel mais dépendant de la température à laquelle s'effectue le procédé, de la durée de ce dernier, du type de résidus utilisé et de la communauté microbienne présente. Toutes ces unités rendent les comparaisons entre les expériences et les résultats très difficiles. De même, la diversité de substrats, d'espèces de champignons utilisés ainsi que les différentes proportions d'inoculum et de substrat ne facilitent pas les comparaisons avec cette étude.

Cependant, des champignons comme *L. edodes* et *P. ostreatus* se confirment comme étant d'excellents prétraitements sur de nombreux types de substrats. En effet, des augmentations de production de CH<sub>4</sub> d'un facteur avoisinant les 1,6 - 2 ont été rapportés suite à l'utilisation de substrats de production de champignons par rapport à un substrat brut (Tuyen, Phuong et al. 2013). La génération de biogaz a également été améliorée par le prétraitement de la biomasse de bois de shorea par *P. ostreatus* avec une augmentation de 143,18 % par rapport au substrat témoin (Amirta, Herawati et al. 2016). Des informations similaires se retrouvent dans plusieurs études où les rendements varient d'un ratio entre 1,5 et 3 pour différents champignons (Müller and Trösch 1986, Liew, Shi et al. 2011, Mutschlechner, Illmer et al. 2015). Aucune information n'est disponible concernant l'utilisation du champignon *H. erinaceus* pour la valorisation de résidus lignocellulosiques sous forme de biogaz.

Dans cette étude, seul le substrat constitué à 100 % de sciure de bois prétraité par le champignon *P. oestreatus* permet d'augmenter significativement les rendements de production en CH<sub>4</sub> par rapport aux substrats non traités ( $P < 0,05$ ). Les résultats présentés rapportent une augmentation d'un facteur de 2,5, en accord avec les études rapportées dans la littérature. Le champignon *H. erinaceus* ne permet pas d'augmenter les rendements de production de CH<sub>4</sub>, quel que soit le type de substrat utilisé ( $P > 0,05$ ). La faible production de champignon *H. erinaceus* sur les trois types de substrat dans cette étude pourrait être un facteur influençant la production de biogaz. En effet, les champignons possèdent l'arsenal enzymatique afin de réduire la cristallinité de la cellulose, réduire le contenu de lignine et ainsi faciliter l'accès à la matière organique pour les microorganismes. Par conséquent, le prétraitement fongique est bénéfique dans la plupart des cas, probablement parce qu'il rend une partie de la cellulose plus digeste et fournit également un matériau supplémentaire sous la forme de mycélium fongique (Pérez-Chávez, Mayer et al. 2019). Cependant, certaines études ne rapportent pas toujours d'augmentation de production de biogaz et de CH<sub>4</sub> suite à l'utilisation de substrats prétraités par certains champignons (Pérez-Chávez, Mayer et al. 2019) voire des diminutions de cette production (Akinfemi, A et al. 2010, Tuyen, Phuong et al. 2013). De plus, de

nombreux paramètres sont à prendre en compte. Les effets observés de l'interaction des champignons avec les substrats dépendent des caractéristiques biochimiques du substrat, de la souche fongique utilisée et de la durée de la fermentation fongique (Tuyen, Phuong et al. 2013). Cette étude recommanderait l'utilisation du champignon *P. oestreatus* afin de valoriser les déchets lignocellulosiques en biogaz. En tenant compte des résultats du volet de production de champignon, de nouveaux essais pourraient être réalisés en utilisant des proportions différentes de sciure de bois et de fibre de coco et en réalisant des amendements nécessaires afin d'optimiser la production de champignons et ainsi la digestion des résidus. En revanche, à la vue des résultats de cette étude, l'utilisation du champignon *H. erinaceus* comme outils de prétraitement et de valorisation des résidus n'est pas recommandée avant un programme d'essais d'optimisation.

L'étude de la diversité des communautés microbiennes présentes dans les bioréacteurs pendant la digestion anaérobie est importante, car celle-ci peut exercer une influence sur les rendements en biogaz. Les résultats de cette étude n'ont pas permis d'identifier une quelconque différence significative au regard de la diversité des espèces faiblement abondantes, abondantes ou très abondantes que ce soit en fonction du type de champignon utilisé comme prétraitement ou alors comme type de substrat. La seule exception étant une diversité des espèces abondantes (indice Shannon) significativement moins élevée dans les échantillons issus de résidus composés à 100 % de sciure de bois par rapport aux deux autres types de substrats. Cette diversité moins élevée pourrait participer à la stabilité du bioprocédé de digestion anaérobie et ainsi les performances de production de biogaz. Les autres indices étudiés ne révèlent aucune différence.

De plus, l'étude des profils de diversité des communautés microbiennes n'a pas révélé de différence significative entre les échantillons, aussi bien en fonction du type de substrat que du type de champignon utilisé. Les profils présentent tous des proportions similaires des *Methanobacteria*, des *Bacteroidia* et des *Clostridia*. Cette information est aussi valable en ce qui concerne les échantillons issus de bioréacteurs ne contenant rien d'autre que les boues granulaires anaérobies et le milieu liquide. Les analyses par PERMANOVA ont permis d'identifier certaines différences significatives concernant les profils de diversité, notamment en fonction du type de champignon utilisé comme prétraitement. Cependant, ce facteur serait responsable de seulement 3 % des différences observées entre lorsque les comparaisons sont réalisées entre deux groupes. De même, de très faibles proportions d'explication sont observées concernant les différences significatives entre les échantillons en fonction du type de substrat utilisé. Ces informations présentent l'influence des facteurs « champignon » et « type de substrat » comme potentiellement négligeable sur la diversité microbienne. Cette diversité serait mise en place par les boues granulaires, très riches en microorganismes, possédant toute la diversité nécessaire afin de réaliser les différentes étapes du processus de digestion anaérobie (McHugh, O'reilly et al. 2003). Cependant, quelques différences significatives d'abondances relatives de certains genres microbiens ont été mises en évidence entre les types

de substrat utilisés et les types de champignon. Plus particulièrement, une abondance relative plus élevée pour le genre *Methanosarcina* spp. en présence du champignon *P. ostreatus* par rapport à l'absence de champignon. Cette différence pourrait potentiellement participer aux différences de rendement en biogaz observées entre ces deux groupes.

Les archées méthanogènes sont communément catégorisées comme hydrogénotrophes ou acétoclastes en fonction de leur donneur d'électron. Certaines études ont démontré que la voie de métabolisme hydrogénotrophe est privilégiée dans les digesteurs de déchets agricoles (Jaenicke, Ander et al. 2011). La présence de bactéries *Methanobacteria*, des *Bacteroidia* et des *Clostridia* dans les échantillons de cette étude est importante. En effet, des membres spécifiques de *Methanobacteria*, des *Bacteroidia* et des *Clostridia* agissent en synergie durant la digestion anaérobie, y compris la dégradation des glucides, la production d'acides gras volatiles et de H<sub>2</sub> ainsi que la méthanogénèse (Vanwonterghem, Jensen et al. 2014). Cependant, l'identification d'une abondance importante de microorganismes lors d'un procédé ne signifie pas nécessairement une activité importante de leur part (De Vrieze, Regueiro et al. 2016). D'où l'importance d'établir une corrélation entre la présence de microorganismes et les rendements de production de méthane et dioxyde de carbone. De même, l'abondance relativement faible des archées méthanogènes en comparaison aux deux autres groupes n'est pas synonyme d'un rôle moins important lors du processus de digestion anaérobie, car des populations d'une abondance faible peuvent être encore plus actives que les plus abondantes (Zakrzewski, Goesmann et al. 2012, Hanreich, Schimpf et al. 2013).

L'étude de la relation entre les communautés microbiennes et les rendements de production de biogaz a permis d'identifier les six ASV (cinq *Bacteroidia* et une *Clostridia*) les plus associés à l'enrichissement en CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub>. Lors de l'analyse de corrélation, chacun de ces microorganismes s'est avéré être positivement corrélé à la production de CH<sub>4</sub> et de CO<sub>2</sub>. Ces bactéries sont très largement retrouvées dans des études de communauté microbienne lors de la digestion anaérobie (Nelson, Morrison et al. 2011, Wang, Li et al. 2016), particulièrement lors de la digestion de résidus lignocellulosiques (Wright and Klieve 2011). Les Firmicutes sont considérés comme d'importants producteurs de H<sub>2</sub> (Park, Lee et al. 2016, Sivagurunathan, Anburajan et al. 2017). En effet, les *Clostridia* comme les *Bacteroidia* sont impliqués dans la promotion de l'hydrolyse par la dégradation de la cellulose (le dihydrogène étant leur sous-produit) (Xia, Wang et al. 2014). Enfin, certaines études présentent des rendements de biogaz plus élevés en présence d'un consortium méthanogène riche en *Clostridia* et *Bacteroidia* (Tukanghan, Hupfauf et al. 2021).

En prenant en compte ces informations, cette étude fournit comme hypothèse la mise en place d'une relation syntrophique entre les bactéries *Clostridia* et *Bacteroidia*, productrices de H<sub>2</sub> et les archées méthanogènes hydrogénotrophes afin de dégrader les résidus lignocellulosiques. De plus, les facteurs tels que le champignon utilisé comme prétraitement et le type de substrat utilisé n'influencent pas la structure ou la

diversité de la communauté microbienne apportée par les boues granulaires anaérobies. Ceci, à l'exception de l'augmentation des abondances relatives observées pour les genres *Clostridium* spp. et *Methanosarcina* spp. en présence du champignon *P. ostreatus*. Cependant, dans la suite des analyses, ces genres n'apparaissent pas comme fortement corrélés à la production de CH<sub>4</sub> et de CO<sub>2</sub> dans les différents échantillons. Ainsi, l'absence d'influence de la part des facteurs sur la communauté microbienne peut être expliquée par l'absence du phénomène de dispersion des microorganismes puisque tous les travaux ont été faits en conditions aseptiques. En principe, seuls les microorganismes présents dans les boues granulaires ont contribué à définir la composition des communautés microbiennes. L'augmentation des rendements de production de biogaz observés serait due seulement à l'activité de dégradation des champignons permettant de faciliter l'accès à la matière organique pour les microorganismes.

## 6 CONCLUSION

---

Ce projet de maîtrise a permis d'évaluer le potentiel de valorisation des déchets tels que la fibre de coco sous forme de biogaz et l'utilisation du champignon *H. ericaceus* comme prétraitement de ce résidu. Ce champignon n'est pas recommandé pour la valorisation de résidus lignocellulosiques sans une optimisation. En effet, même sur un substrat très largement utilisé dans la production commerciale de champignons comestibles, *H. erinaceus* présente de très faibles rendements de production et ne permet pas d'augmenter les rendements en biogaz contrairement au champignon *P. ostreatus*.

La sciure de bois a démontré de très bons résultats, mais son utilité ne se limite pas seulement aux applications réalisées dans cette étude. Des alternatives comme la fibre de coco possèdent un certain potentiel. Bien que les rendements de production de biogaz sur ce type de substrat prétraité par les champignons ne soient pas significativement plus élevés qu'avec une absence de prétraitement, ce résultat est potentiellement dû à la faible production de champignon. Les rendements de production de biogaz pourraient être améliorés via l'optimisation de la production du champignon *P. ostreatus* sur la fibre de coco. Des études complémentaires pourraient être réalisées, en utilisant davantage de substrat de production de champignon dans des proportions variées de fibre de coco et de sciure de bois. De plus, certains amendements pourraient être effectués afin d'améliorer la composition chimique de la fibre de coco pour permettre un meilleur développement du champignon. Cette étude recommanderait cependant de se focaliser sur la production d'un seul champignon à la fois. En effet, cette décision permettrait d'optimiser les paramètres environnementaux des chambres de productions pour satisfaire les besoins d'un champignon spécifique. Le champignon *Lentinula edodes* (shiitaké) fait partie des basidiomycètes très populaires en Asie de l'Est. Ce champignon possède un goût très agréable, des propriétés nutritives remarquables et une richesse en vitamines. Toutes ces propriétés en font un élément très prisé dans la cuisine asiatique et un candidat idéal pour poursuivre ce sujet de recherche. Il serait également intéressant de travailler avec de plus gros volumes à la fois pour la production de champignon mais aussi pour la production de biogaz.

Enfin, cette étude a permis de mettre en valeur que les procédés de production de champignons comestibles utilisés n'influencent pas la diversité de la communauté microbienne présente lors du processus de digestion anaérobie. Les boues granulaires utilisées semblent fournir un consortium microbien favorable à la mise en place de la dégradation anaérobie de la matière organique et la production de méthane par la voie hydrogénotrophe.

## 7 BIBLIOGRAPHIE

---

- Abdi, H. and L. J. Williams (2010). "Newman-Keuls test and Tukey test." Encyclopedia of research design **2**: 897-902.
- Aguilar, C. H. M., J. Barbosa, F. L. Zapico and R. S. Flamiano (2010). "Growth and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) feeding on different agro-industrial wastes." Universiti Sains Malaysia Research and Development Journal **18**(1): 18-30.
- Aguilar-Rivera, N. and D. Jesús-Merales (2010). "Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* production on cellulosic biomass of sugar cane." Sugar Tech **12**(2): 176-178.
- Akinfemi, A, Adu, A. O, Doherty and F (2010). "Conversion of sorghum stover into animal feed with white-rot fungi: *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*." African Journal of Biotechnology **9**(11): 1706-1712.
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros and M. J. Negro (2010). "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review." Bioresource technology **101**(13): 4851-4861.
- Amirta, R., E. Herawati, W. Suwinarti and T. Watanabe (2016). "Two-steps Utilization of Shorea Wood Waste Biomass for the Production of Oyster Mushroom and Biogas – A Zero Waste Approach." Agriculture and Agricultural Science Procedia **9**: 202-208.
- Anderson, M. J. (2014). "Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)." Wiley statsref: statistics reference online: 1-15.
- Angelidaki, I., M. Alves, D. Bolzonella, L. Borzacconi, J. L. Campos, A. J. Guwy, S. Kalyuzhnyi, P. Jenicek and J. B. van Lier (2009). "Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays." Water Sci Technol **59**(5): 927-934.
- Anonyme. (2017). "QUAND L'ÉNERGIE VERTE FAIT POUSSER LES TOMATES." from [https://plus.lapresse.ca/screens/fb1bcb29-e39e-44df-9ab0-ed1abf7624b2\\_7C\\_0.html?fbclid=IwAR1iEwUiPutifG06keUbu8haee4UrCYqO90bF5KNFhUtv1JGda2BRiPZmk](https://plus.lapresse.ca/screens/fb1bcb29-e39e-44df-9ab0-ed1abf7624b2_7C_0.html?fbclid=IwAR1iEwUiPutifG06keUbu8haee4UrCYqO90bF5KNFhUtv1JGda2BRiPZmk).
- Anonyme. (2020). "Profil sectoriel de l'industrie horticole au Québec." from <https://statistique.quebec.ca/fr/fichier/profil-sectoriel-de-lindustrie-horticole-au-quebec-edition-2020.pdf?fbclid=IwAR3rNrKbHrUM57Yys7vu1DVIHCQrZLQ3HNgpHI-MP65ijU8F2KMI3iWbeR8>.
- Arenas, M., C. Vavrina, J. Cornell, E. Hanlon and G. Hochmuth (2002). "Coir as an alternative to peat in media for tomato transplant production." HortScience **37**(2): 309-312.
- Atila, F., Y. Tuzel, J. A. Fernández, A. F. Cano and F. Sen (2018). "The effect of some agro-industrial wastes on yield, nutritional characteristics and antioxidant activities of *Hericium erinaceus* isolates." Scientia Horticulturae **238**: 246-254.
- Beetz, A. E. and L. Greer (2004). Mushroom cultivation and marketing, ATTRA.

Berglund Odhner, P., A. Schabbauer, I. Sarvari Horvath and M. Mohseni Kabir (2012). "Biogas from lignocellulosic biomass."

Borrello, M., S. Pascucci and L. Cembalo (2020). "Three Propositions to Unify Circular Economy Research: A Review." Sustainability **12**(10).

Bruni, E., A. P. Jensen and I. Angelidaki (2010). "Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production." Bioresource technology **101**(22): 8713-8717.

Buah, J., G. Van der Puije, E. Bediako, E. Abole and F. Showemimo (2010). "The growth and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates." Biotechnology **9**(3): 338-342.

Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson and S. P. Holmes (2016). "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data." Nature Methods **13**(7): 581-583.

Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer and R. Knight (2011). "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(supplement\_1): 4516-4522.

Cheuk, W., K. V. Lo, R. M. Branion and B. Fraser (2003). "Benefits of sustainable waste management in the vegetable greenhouse industry." J Environ Sci Health B **38**(6): 855-863.

Chiu, S.-W., S.-C. Law, M.-L. Ching, K.-W. Cheung and M.-J. Chen (2000). "Themes for mushroom exploitation in the 21st century: Sustainability, waste management, and conservation." The Journal of General and Applied Microbiology **46**(6): 269-282.

Chiu, S. L. H. and I. M. C. Lo (2016). "Reviewing the anaerobic digestion and co-digestion process of food waste from the perspectives on biogas production performance and environmental impacts." Environmental Science and Pollution Research **23**(24): 24435-24450.

Chorvathova, V., P. Bobek, E. Ginter and J. Klvanova (1993). "Effect of the oyster fungus on glycaemia and cholesterolaemia in rats with insulin-dependent diabetes." Physiological research **42**: 175-175.

Christy, P. M., L. Gopinath and D. Divya (2014). "A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms." Renewable and Sustainable Energy Reviews **34**: 167-173.

Chynoweth, D. and P. Pullammanappallil (1996). "Microbiology of solid waste." Anaerobic digestion of municipal solid waste. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla: 71-113.

Claye, S. S., A. Idouraine and C. W. Weber (1996). "Extraction and fractionation of insoluble fiber from five fiber sources." Food Chemistry **57**(2): 305-310.

Cohen, R., L. Persky and Y. Hadar (2002). "Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*." Applied microbiology and biotechnology **58**(5): 582-594.

- Costa, J., A. Abreu, E. Ferreira and M. Alves (2007). "Quantitative image analysis as a diagnostic tool for monitoring structural changes of anaerobic granular sludge during detergent shock loads." Biotechnology and bioengineering **98**(1): 60-68.
- Cresswell, G. (2002). Coir dust a proven alternative to peat. Proceedings of the Austral. Potting Mix Manufacturers Conf., Sydney.
- Dangcong, P., N. Bernet, J.-P. Delgenes and R. Moletta (1999). "Aerobic granular sludge—a case report." Water Research **33**(3): 890-893.
- De Vrieze, J., L. Regueiro, R. Props, R. Vilchez-Vargas, R. Jáuregui, D. H. Pieper, J. M. Lema and M. Carballa (2016). "Presence does not imply activity: DNA and RNA patterns differ in response to salt perturbation in anaerobic digestion." Biotechnology for biofuels **9**(1): 1-13.
- De Zeeuw, W. (1988). "Granular sludge in UASB reactors." Granular anaerobic sludge: microbiology and technology. Pudoc, Wageningen, The Netherlands: 132-145.
- Dehariya, P., D. Vyas and S. K. Kashaw (2013). "Mushroom nutraceuticals on different substrates." Int J Pharm Pharm Sci **5**: 88-90.
- Delgenès, J.-P., V. Penaud and R. Moletta (2003). Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes, IWA Publishing.
- Etterer, T. and P. Wilderer (2001). "Generation and properties of aerobic granular sludge." Water science and technology **43**(3): 19-26.
- Fan, L., M. Gharpuray and Y. Lee (1987). "Biotechnology monographs." Cellulose Hydrolysis **3**.
- Fan, L., Y.-H. Lee and M. Gharpuray (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Microbial reactions, Springer: 157-187.
- Figlas, D., R. G. Matute and N. R. Curvetto (2007). "Cultivation of culinary-medicinal lion's mane mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers.(Aphylllophoromycetidae) on substrate containing sunflower seed hulls." International Journal of Medicinal Mushrooms **9**(1).
- Frankin, R. (2001). "Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater." Water Science and Technology **44**(8): 1-6.
- González, A., C. Nobre, L. S. Simões, M. Cruz, A. Loredó, R. M. Rodríguez-Jasso, J. Contreras, J. Teixeira and R. Belmares (2021). "Evaluation of functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom." Food Chemistry **346**: 128884.
- Goswami, R., P. Chattopadhyay, A. Shome, S. N. Banerjee, A. K. Chakraborty, A. K. Mathew and S. Chaudhury (2016). "An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: a step towards sustainable waste management." 3 Biotech **6**(1): 72.
- Guiot, S., Y. Arcand and C. Chavarie (1992). "Advantages of fluidization on granule size and activity development in upflow anaerobic sludge bed reactors." Water Science and Technology **26**(3-4): 897-906.
- Gupta, A., S. Sharma, S. Saha and S. Walia (2013). "Yield and nutritional content of *Pleurotus sajor caju* on wheat straw supplemented with raw and detoxified mahua cake." Food chemistry **141**(4): 4231-4239.

Hanreich, A., U. Schimpf, M. Zakrzewski, A. Schlüter, D. Benndorf, R. Heyer, E. Rapp, A. Pühler, U. Reichl and M. Klocke (2013). "Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation." Systematic and applied microbiology **36**(5): 330-338.

Harmsen, H., A. Akkermans, A. Stams and W. De Vos (1996). "Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge." Applied and Environmental Microbiology **62**(6): 2163-2168.

Harmsen, P. F., W. Huijgen, L. Bermudez and R. Bakker (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass, Wageningen UR-Food & Biobased Research.

Hartmann, H., I. Angelidaki and B. K. Ahring (2000). "Increase of anaerobic degradation of particulate organic matter in full-scale biogas plants by mechanical maceration." Water Science and Technology **41**(3): 145-153.

Hedvigy, M., Ľ. Rohaľová and E. Szabová (2013). "SEMI-SOLID FERMENTATION OF *PLEUROTUS OSTREATUS*." Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.

Heleno, S. A., L. Barros, A. Martins, M. J. R. Queiroz, P. Morales, V. Fernández-Ruiz and I. C. Ferreira (2015). "Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species." LWT-Food Science and Technology **63**(1): 475-481.

Hénault-Éthier, L. (2015). "Étude de cas de récupération des matières organiques dans une industrie, commerce ou institution." from [https://www.recyc-quebec.gouv.qc.ca/sites/default/files/documents/Exemple-casMO\\_Fermes-Lufa.pdf](https://www.recyc-quebec.gouv.qc.ca/sites/default/files/documents/Exemple-casMO_Fermes-Lufa.pdf).

Hendriks, A. and G. Zeeman (2009). "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." Bioresource technology **100**(1): 10-18.

Hiwatashi, K., Y. Kosaka, N. Suzuki, K. Hata, T. Mukaiyama, K. Sakamoto, H. Shirakawa and M. Komai (2010). "Yamabushitake mushroom (*Hericium erinaceus*) improved lipid metabolism in mice fed a high-fat diet." Bioscience, biotechnology, and biochemistry **74**(7): 1447-1451.

Ho, H. T., C.-L. Wang and C.-H. Wang (2015). "The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*)." Mycobiology **43**(4): 423-434.

Hsieh, T. C., K. H. Ma and A. Chao (2016). "iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers)." Methods in Ecology and Evolution **7**(12): 1451-1456.

Hu, S.-H., J.-C. Wang, C.-Y. Wu, S.-L. Hsieh, K.-S. Chen and S.-J. Chang (2008). "Bioconversion of agro wastes for the cultivation of the culinary-medicinal lion's mane mushrooms *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. and *H. laciniatum* (Leers) Banker (Aphyllorphoromycetidae) in Taiwan." International Journal of Medicinal Mushrooms **10**(4).

- Huete, E. (2007). Estudio comparativo de la digestión anaerobia mesófila y termófila de fangos urbanos. Estado del arte, parámetros de operación y modelado matemático del sistema, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, San Sebastián ....
- Ikeda, S., T. Watari, M. Yamauchi, M. Hatamoto, H. Hara, S. Maki, M. Yamada and T. Yamaguchi (2019). "Evaluation of pretreatment effect for spent mushroom substrate on methane production." Journal of Water and Environment Technology **17**(3): 174-179.
- Iza, J., E. Colleran, J. Paris and W.-M. Wu (1991). "International workshop on anaerobic treatment technology for municipal and industrial wastewaters: summary paper." Water Science and Technology **24**(8): 1-16.
- Izumi, K., Y.-k. Okishio, N. Nagao, C. Niwa, S. Yamamoto and T. Toda (2010). "Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste." International biodeterioration & biodegradation **64**(7): 601-608.
- Jaenicke, S., C. Ander, T. Bekel, R. Bisdorf, M. Droge, K. H. Gartemann, S. Junemann, O. Kaiser, L. Krause, F. Tille, M. Zakrzewski, A. Puhler, A. Schluter and A. Goesmann (2011). "Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing." PLoS One **6**(1): e14519.
- Jandaik, C. and S. Goyal (1995). "Farm and farming of oyster mushroom (*Pleurotus* sp)." Mushroom Production Technology (Eds. Singh, RP and Chaube, HS). GB Pant Univ. Agril. And Tech., Pantnagar India: 72-78.
- Jiang, Y., K. Yang, Y. Shang, H. Zhang, L. Wei and H. Wang (2019). "Response and recovery of aerobic granular sludge to pH shock for simultaneous removal of aniline and nitrogen." Chemosphere **221**: 366-374.
- Kato, M. T., J. A. Field and G. Lettinga (1993). "High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen." Biotechnology and bioengineering **42**(11): 1360-1366.
- Kawagishi, H., C. Zhuang and R. Yunoki (2008). "Compounds for dementia from *Hericium erinaceum*." Drugs of the Future **33**(2): 149.
- Khan, S. M., A. Nawaz, M. A. Ali, T. Ahmad, N. A. Khan and A. Rehman (2012). "Response of oyster mushroom on different agricultural wastes of Southern Punjab." Pak. J. Agric. Sci **49**: 127-130.
- Khdhiri, M., S. Piché-Choquette, J. Tremblay, S. G. Tringe and P. Constant (2017). "The tale of a neglected energy source: elevated hydrogen exposure affects both microbial diversity and function in soil." Applied and environmental microbiology **83**(11): e00275-00217.
- Kim, J. S., Y. Lee and T. H. Kim (2016). "A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass." Bioresource technology **199**: 42-48.
- Klein-Marcuschamer, D., P. Oleskowicz-Popiel, B. A. Simmons and H. W. Blanch (2012). "The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels." Biotechnology and bioengineering **109**(4): 1083-1087.

- Knop, D., O. Yarden and Y. Hadar (2015). "The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications." Applied microbiology and biotechnology **99**(3): 1025-1038.
- Ko, H. G., H. G. Park, S. H. Park, C. W. Choi, S. H. Kim and W. M. Park (2005). "Comparative study of mycelial growth and basidiomata formation in seven different species of the edible mushroom genus *Hericium*." Bioresource Technology **96**(13): 1439-1444.
- Koszel, M. and E. Lorencowicz (2015). "Agricultural Use of Biogas Digestate as a Replacement Fertilizers." Agriculture and Agricultural Science Procedia **7**: 119-124.
- Koutrotsios, G., K. C. Mountzouris, I. Chatzipavlidis and G. I. Zervakis (2014). "Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi— Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties." Food chemistry **161**: 127-135.
- Lankinen, P. (2004). "Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media."
- Lee, T.-S. (1990). "The full list of recorded mushrooms in Korea." The Korean Journal of Mycology **18**(4): 233-259.
- Legendre, P. and M. J. Anderson (1999). "Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments." Ecological monographs **69**(1): 1-24.
- Legendre, P. and E. D. Gallagher (2001). "Ecologically meaningful transformations for ordination of species data." Oecologia **129**(2): 271-280.
- Lens, P. N., D. De Beer, C. C. Cronenberg, F. P. Houwen, S. P. Ottengraf and W. H. Verstraete (1993). "Heterogeneous distribution of microbial activity in methanogenic aggregates: pH and glucose microprofiles." Applied and Environmental Microbiology **59**(11): 3803-3815.
- Lettinga, G. (1995). "Anaerobic digestion and wastewater treatment systems." Antonie van leeuwenhoek **67**(1): 3-28.
- Lettinga, G., J. Field, J. van Lier, G. Zeeman and L. W. Hulshoff Pol (1997). "Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future." Water Science and Technology **35**(10): 5-12.
- Lettinga, G., A. Van Velsen, S. d. Hobma, W. De Zeeuw and A. Klapwijk (1980). "Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment." Biotechnology and bioengineering **22**(4): 699-734.
- Li, X., L. Wang, Z. Wu, L. Hou, J. Liang and Q. Li (2017). "Convergence Analysis on a Second Order Algorithm for Orthogonal Projection onto Curves." Symmetry **9**(10): 210.
- Liang, B., Z. Guo, F. Xie and A. Zhao (2013). "Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of aqueous extract of *Hericium erinaceus* in experimental diabetic rats." BMC complementary and alternative medicine **13**(1): 1-7.
- Liew, L. N., J. Shi and Y. Li (2011). "Enhancing the solid-state anaerobic digestion of fallen leaves through simultaneous alkaline treatment." Bioresource Technology **102**(19): 8828-8834.

- Lin, H. and S. D. Peddada (2020). "Analysis of compositions of microbiomes with bias correction." Nature communications **11**(1): 1-11.
- Lindorfer, H., C. Pérez López, C. Resch, R. Braun and R. Kirchmayr (2007). "The impact of increasing energy crop addition on process performance and residual methane potential in anaerobic digestion." Water Science and Technology **56**(10): 55-63.
- Liu, Y. and J.-H. Tay (2002). "The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge." Water research **36**(7): 1653-1665.
- Ma, Y. and D. Nichols (2004). "Phytotoxicity and detoxification of fresh coir dust and coconut shell." Communications in soil science and plant analysis **35**(1-2): 205-218.
- Maimaiti, J., Y. Zhang, J. Yang, Y. P. Cen, D. B. Layzell, M. Peoples and Z. Dong (2007). "Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth." Environ Microbiol **9**(2): 435-444.
- Maity, S. K. (2015). "Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I." Renewable and Sustainable Energy Reviews **43**: 1427-1445.
- Mane, V. P., S. S. Patil, A. A. Syed and M. M. V. Baig (2007). "Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer." Journal of Zhejiang University Science B **8**(10): 745-751.
- Mansour–Benamar, M., J.-M. Savoie and L. Chavant (2013). "Valorization of solid olive mill wastes by cultivation of a local strain of edible mushrooms." Comptes rendus biologiques **336**(8): 407-415.
- Manzi, P., A. Aguzzi, V. Vivanti, M. Paci and L. Pizzoferrato (1999). Mushrooms as a source of functional ingredients. Euro. Food Chem X European conference on functional foods. A new challenge for the food chemist.
- Manzi, P., L. Gambelli, S. Marconi, V. Vivanti and L. Pizzoferrato (1999). "Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study." Food chemistry **65**(4): 477-482.
- Martin, M. (2011). "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." EMBnet. journal **17**(1): 10-12.
- Mazuela, P., M. d. C. Salas and M. Urrestarazu (2005). "Vegetable waste compost as substrate for melon." Communications in soil science and plant analysis **36**(11-12): 1557-1572.
- Mazuela, P. and M. Urrestarazu (2009). "The Effect of Amendment of Vegetable Waste Compost Used as Substrate in Soilless Culture on Yield and Quality of Melon Crops." Compost Science & Utilization **17**: 103-107.
- McCarty, P. (2001). "The development of anaerobic treatment and its future." Water Science and Technology **44**(8): 149-156.
- McHugh, S., M. Carton, T. Mahony and V. O'Flaherty (2003). "Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors." FEMS microbiology letters **219**(2): 297-304.

- McHugh, S., C. O'reilly, T. Mahony, E. Colleran and V. O'flaherty (2003). "Anaerobic granular sludge bioreactor technology." Reviews in environmental science and biotechnology **2**(2): 225-245.
- MELCC. (2020). "Stratégie de valorisation de la matière organique." from <https://www.environnement.gouv.qc.ca/matieres/organique/strategie-valorisation-matiere-organique.pdf?fbclid=IwAR1m88ppiwF8055CulpxThuACRxYh4azxI0NAzuDQntXLD0guFVFERG5PbM>.
- Miller Jr, R. G. (1997). Beyond ANOVA: basics of applied statistics, CRC press.
- Mizuno, T. (1999). "Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers.(Yamabushitake), and its medicinal utilization." International Journal of Medicinal Mushrooms **1**(2).
- Mohd Hanafi, F. H., S. Rezania, S. Mat Taib, M. F. Md Din, M. Yamauchi, M. Sakamoto, H. Hara, J. Park and S. S. Ebrahimi (2018). "Environmentally sustainable applications of agro-based spent mushroom substrate (SMS): an overview." Journal of Material Cycles and Waste Management **20**(3): 1383-1396.
- Monlau, F., E. Latrille, A. C. Da Costa, J.-P. Steyer and H. Carrère (2013). "Enhancement of methane production from sunflower oil cakes by dilute acid pretreatment." Applied Energy **102**: 1105-1113.
- Morais, M., A. Ramos, N. Matos and E. J. S. Oliveira (2000). "Note. Production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on lignocellulosic residues/Nota. Cultivo del hongo shiitake (*Lentinus edodes*) en residuos lignocelulósicos." Food science and technology international **6**(2): 123-128.
- Morales-Polo, C., M. D. M. Cledera-Castro and B. Y. Moratilla Soria (2018). "Reviewing the Anaerobic Digestion of Food Waste: From Waste Generation and Anaerobic Process to Its Perspectives." Applied Sciences **8**(10): 1804.
- Morgenroth, E., T. Sherden, M. Van Loosdrecht, J. Heijnen and P. Wilderer (1997). "Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor." Water research **31**(12): 3191-3194.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Lee, M. Holtzapple and M. Ladisch (2005). "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." Bioresource technology **96**(6): 673-686.
- Mosquera-Corral, A., M. De Kreuk, J. Heijnen and M. Van Loosdrecht (2005). "Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor." Water Research **39**(12): 2676-2686.
- Müller, H. and W. Trösch (1986). "Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production." Applied Microbiology and Biotechnology **24**(2): 180-185.
- Müller, H. W. and W. Trösch (1986). "Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production." Applied Microbiology and Biotechnology **24**(2): 180-185.

- Mutschlechner, M., P. Illmer and A. O. Wagner (2015). "Biological pre-treatment: Enhancing biogas production using the highly cellulolytic fungus *Trichoderma viride*." Waste Management **43**: 98-107.
- Nelson, M. C., M. Morrison and Z. Yu (2011). "A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters." Bioresource technology **102**(4): 3730-3739.
- Oleszek, M., J. Tys, D. Wiącek, A. Król and J. Kuna (2016). "The Possibility of Meeting Greenhouse Energy and CO<sub>2</sub> Demands Through Utilisation of Cucumber and Tomato Residues." BioEnergy Research **9**(2): 624-632.
- Olivier, J. and J. Delmas (1987). "Vers la maîtrise des champignons comestibles." Biofutur: 23-41.
- Ouellet, J. (2018). "Portrait-diagnostic sectoriel des légumes de serre au Québec." from [https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Portaitdiagnosticdeslegumesdeserre\\_final.pdf?fbclid=IwAR2-gHYOt\\_EokxhfAvVdXAT20hBrCKxRLOZVR1U2L9TC7I8pYZCq480MkbM](https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Portaitdiagnosticdeslegumesdeserre_final.pdf?fbclid=IwAR2-gHYOt_EokxhfAvVdXAT20hBrCKxRLOZVR1U2L9TC7I8pYZCq480MkbM).
- Park, J.-H., S.-H. Lee, H.-J. Ju, S.-H. Kim, J.-J. Yoon and H.-D. Park (2016). "Failure of biohydrogen production by low levels of substrate and lactic acid accumulation." Renewable energy **86**: 889-894.
- Patra, A. and B. Pani (1995). "Evaluation of banana leaf as a new alternative substrate to paddy straw for oyster mushroom cultivation." J Phytol Res **8**(2): 145-148.
- Pérez-Chávez, A. M., L. Mayer and E. Albertó (2019). "Mushroom cultivation and biogas production: A sustainable reuse of organic resources." Energy for Sustainable Development **50**: 50-60.
- Philippoussis, A. N. (2009). Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation, Springer: 163-196.
- Piché-Choquette, S., P. Constant and A. J. M. Stams (2019). "Molecular Hydrogen, a Neglected Key Driver of Soil Biogeochemical Processes." Applied and Environmental Microbiology **85**(6): e02418-02418.
- Purkayastha, R. and D. Nayak (1981). "Analysis of protein patterns of an edible mushroom by gel-electrophoresis and its amino acid composition." Journal of food science and technology.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies and F. O. Glöckner (2012). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." Nucleic Acids Research **41**(D1): D590-D596.
- Rodrigues, D. M., A. C. Freitas, T. A. Rocha-Santos, M. W. Vasconcelos, M. Roriz, L. M. Rodríguez-Alcalá, A. M. Gomes and A. C. Duarte (2015). "Chemical composition and nutritive value of *Pleurotus citrinopileatus* var *cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. salmoneo stramineus*, *Pholiota nameko* and *Hericium erinaceus*." Journal of Food Science and Technology **52**(11): 6927-6939.
- Rühl, M., C. Fischer and U. Kües (2008). "Ligninolytic enzyme activities alternate with mushroom production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheatstraw-based substrate." Current Trends in Biotechnology and Pharmacy **2**(4): 478-492.

- Sánchez, C. (2004). "Modern aspects of mushroom culture technology." Applied microbiology and biotechnology **64**(6): 756-762.
- Sánchez, C. (2009). "Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi." Biotechnology advances **27**(2): 185-194.
- Sánchez, C. (2010). "Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms." Applied microbiology and biotechnology **85**(5): 1321-1337.
- Sanders, W., M. Geerink, G. Zeeman and G. Lettinga (2000). "Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates." Water Science and Technology **41**(3): 17-24.
- Sanders, W. T. M. (2001). Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates.
- Sardar, H., M. A. Ali, M. A. Anjum, F. Nawaz, S. Hussain, S. Naz and S. M. Karimi (2017). "Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*)." Scientia Horticulturae **225**: 327-334.
- Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Harada and K. Nakamura (1998). "Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis." Microbiology **144**(9): 2655-2665.
- Shapiro, S. S. and M. B. Wilk (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)." Biometrika **52**(3/4): 591-611.
- Sindhu, R., P. Binod and A. Pandey (2016). "Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview." Bioresource technology **199**: 76-82.
- Sivagurunathan, P., P. Anburajan, J.-H. Park, G. Kumar, H.-D. Park and S.-H. Kim (2017). "Mesophilic biogenic H<sub>2</sub> production using galactose in a fixed bed reactor." International Journal of Hydrogen Energy **42**(6): 3658-3666.
- Spiers, T. and G. Fietje (2000). "Green waste compost as a component in soilless growing media." Compost Science & Utilization **8**(1): 19-23.
- Stams, A. J. (1994). "Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments." Antonie van Leeuwenhoek **66**(1): 271-294.
- Taherdanak, M. and H. Zilouei (2014). "Improving biogas production from wheat plant using alkaline pretreatment." Fuel **115**: 714-719.
- Tay, J. H., Q. S. Liu and Y. Liu (2001). "Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor." Journal of Applied Microbiology **91**(1): 168-175.
- Thomas, G. V., S. Prabhu, M. Reeny and B. Bopaiah (1998). "Evaluation of lignocellulosic biomass from coconut palm as substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer." World Journal of Microbiology and Biotechnology **14**(6): 879-882.
- Tong, X., L. H. Smith and P. L. McCarty (1990). "Methane fermentation of selected lignocellulosic materials." Biomass **21**(4): 239-255.
- Tukanghan, W., S. Hupfauf, M. Gómez-Brandón, H. Insam, W. Salvenmoser, P. Prasertsan, B. Cheirsilp and S. O-Thong (2021). "Symbiotic Bacteroides and Clostridium-rich methanogenic

consortium enhanced biogas production of high-solid anaerobic digestion systems." Bioresource Technology Reports **14**: 100685.

Tuyen, D. V., H. N. Phuong, J. W. Cone, J. J. P. Baars, A. S. M. Sonnenberg and W. H. Hendriks (2013). "Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on chemical composition and in vitro rumen fermentation and methane production." Bioresource Technology **129**: 256-263.

Urrestarazu, M., M. Salas and P. Mazuela (2003). Methods of correction of vegetable waste compost used as substrate by soilless culture. International Symposium on Managing Greenhouse Crops in Saline Environment 609.

Vanwonterghem, I., P. D. Jensen, P. G. Dennis, P. Hugenholtz, K. Rabaey and G. W. Tyson (2014). "Deterministic processes guide long-term synchronised population dynamics in replicate anaerobic digesters." The ISME Journal **8**(10): 2015-2028.

Vavilin, V., S. Rytov and L. Y. Lokshina (1996). "A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter." Bioresource technology **56**(2-3): 229-237.

Vetayasuporn, S. (2006). "Oyster mushroom cultivation on different cellulosic substrates." Res J Agric Biol Sci **2**(6): 548-551.

Vézina, R. (2017). "Ces tomates québécoises poussent grâce a vos déchets." from [https://www.lesaffaires.com/strategie-d-entreprise/entreprendre/faire-eclore-de-belles-tomates-sur-un-amoncellement-de-dechets/593714?fbclid=IwAR29zYWzgDXr2\\_J4OJkNjh6aM8SogHU9rRW-3ZlvvuFPpPVn3jmb8ZyFG8A](https://www.lesaffaires.com/strategie-d-entreprise/entreprendre/faire-eclore-de-belles-tomates-sur-un-amoncellement-de-dechets/593714?fbclid=IwAR29zYWzgDXr2_J4OJkNjh6aM8SogHU9rRW-3ZlvvuFPpPVn3jmb8ZyFG8A).

Visser, F. A., J. B. van Lier, A. J. Macario and E. C. de Macario (1991). "Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium." Applied and environmental microbiology **57**(6): 1728-1734.

Walsh, J. J., D. L. Jones, G. Edwards-Jones and A. P. Williams (2012). "Replacing inorganic fertilizer with anaerobic digestate may maintain agricultural productivity at less environmental cost." Journal of Plant Nutrition and Soil Science **175**(6): 840-845.

Wang, X., Z. Li, X. Zhou, Q. Wang, Y. Wu, M. Saino and X. Bai (2016). "Study on the bio-methane yield and microbial community structure in enzyme enhanced anaerobic co-digestion of cow manure and corn straw." Bioresource technology **219**: 150-157.

Wei, T., V. Simko, M. Levy, Y. Xie, Y. Jin and J. Zemla (2017). "Package 'corrplot'." Statistician **56**(316): e24.

Wei, Y., G. Li and B. Wang (2011). "Application of granular sludge membrane bioreactor in the treatment of wastewater." Procedia Environmental Sciences **10**: 108-111.

Wilderer, P. (1997). "Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor." Water Res **31**(12): 31913194Mulder.

Wright, A.-D. G. and A. V. Klieve (2011). "Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation?" Animal feed science and technology **166**: 248-253.

- Xia, Y., Y. Wang, H. H. Fang, T. Jin, H. Zhong and T. Zhang (2014). "Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis." Scientific reports **4**(1): 1-9.
- Xiao, Z., M. Lin, J. Fan, Y. Chen, C. Zhao and B. Liu (2018). "Anaerobic digestion of spent mushroom substrate under thermophilic conditions: performance and microbial community analysis." Applied microbiology and biotechnology **102**(1): 499-507.
- Yan, Y.-G. and J.-H. Tay (1997). "Characterisation of the granulation process during UASB start-up." Water Research **31**(7): 1573-1580.
- Yildiz, S., Ü. C. Yildiz, E. D. Gezer and A. Temiz (2002). "Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom." Process Biochemistry **38**(3): 301-306.
- Yuan, X. and D. Gao (2010). "Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor." Journal of Hazardous Materials **178**(1-3): 1041-1045.
- Zakrzewski, M., A. Goesmann, S. Jaenicke, S. Jünemann, F. Eikmeyer, R. Szczepanowski, W. A. Al-Soud, S. Sørensen, A. Pühler and A. Schlüter (2012). "Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing." Journal of biotechnology **158**(4): 248-258.
- Zhu, J., C. Wan and Y. Li (2010). "Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment." Bioresource technology **101**(19): 7523-7528.

**ANNEXE I****VOLUME DES CONSTITUANTS À PRÉLEVER  
POUR LA PRÉPARATION DU MILIEU MINIMUM  
ANAÉROBIE**

---

Solution A	Formule	Concentration	Pour 500mL
Chlorure d'ammonium	$\text{NH}_4\text{Cl}$	100 g/L	50 g
Chlorure de sodium	$\text{NaCl}$	10 g/L	5 g
Chlorure de magnésium hexahydraté	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 g/L	5 g
Chlorure de calcium dihydraté	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g/L	2,5 g

Solution B	Formule	Concentration	Pour 500mL
Dipotassium phosphate trihydraté	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	200 g/L	100 g

Solution C	Formule	Concentration	Pour 500mL
Resazurin		0,5 g/L	0,25 g

Solution D	Formule	Concentration	Pour 500mL
Chlorure de fer tétrahydraté	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 g/L	1 g

Acide Borique	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05 g/L	0.025 g
Chlorure de zinc	ZnCl <sub>2</sub>	0.05 g/L	0.025 g
Chlorure de cuivre dihydraté	CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.038 g/L	0.019g
Chlorure de manganèse II tétrahydraté	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.05 g/L	0.025g
Heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.05 g/L	0.025 g
Chlorure d'aluminium	AlCl <sub>3</sub>	0.05 g/L	0.025 g
Chlorure de cobalt II hexahydraté	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.05 g/L	0.025 g
Chlorure de nickel II hexahydraté	NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.092 g/L	0.046 g
Ethylenediaminetetraacetate		0.5 g/L	0.25 g
HCL concentré		1 mL	0.5 mL
Sodium selenite pentahydraté	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.1 g/L	0.05 g

Solution E	Concentration	Pour 500 mL
Biotine	2 mg/L	1 mg
Acide folique	2 mg/L	1 mg
Acide pyridoxine	10 mg/L	5 mg
Ridoflavine	5 mg/L	2.5 mg
Thiamine hydrochloride	5 mg/L	2.5 mg

Cyanocobalamine	0,1 mg/L	0.05 mg
Acide Nicotinique	5 mg/L	2.5 mg
P-Aminobenzoic Acid	5 mg/L	2.5 mg
Lipoic acid	5 mg/L	2.5 mg
DL-pantothenic acid	5 mg/L	2.5 mg

Solution F	Formule	Concentration	Pour 10 mL
Cystéine hydrochloride	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S• HCl	50 g/L	0.5 g
Bicarbonate de soude	NaHCO <sub>3</sub>	260 g/L	2.6 g

**ANNEXE II                    VOLUME DES CONSTITUANTS À PRÉLEVER  
POUR LA PRÉPARATION DU MASTER MIX DE  
LA PCR 16S**

---

Constituants	x1 échantillon (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	38
Amorce F (10 µM)	1
Amorce R (10 µM)	1
dNTPs	1

MgCl <sub>2</sub> (25 µM)	1
BSA (20mg/mL)	0,5
Buffer II (10X)	5
Taq HF	0,5

### **ANNEXE III      PARAMETRES DE LA REACTION DE PCR 16S**

---

Température	Durée
95°	5 min
95°	30 sec
55°	30 sec
72°	30 sec
72°	10 min
4°	∞

} x 30 cycles

### **ANNEXE IV      VOLUMES DES CONSTITUANTS À PRÉLEVER POUR LA RÉALISATION DE LA PCR INDEX**

---

Constituants	x 1 échantillon (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	12,9

MgSO4 (25 mM)	0,25
BSA (20 µg/mL)	0,25
Buffer II (10 X)	2,5
Taq HF	0,1

## ANNEXE V      PARAMETRES DE LA REACTION DE PCR INDEX

---

Température	Durée	
94°C	3min	
94°C	30sec	} X 8 cycles
55°C	30sec	
68°C	30sec	
68°C	5min	
4°C	∞	