

Université de Montréal

**Transfert interespèces d'électrons par conduction directe
via la matrice protéinique exocellulaire dans un biofilm
anaérobie granulaire**

par Charles-David Dubé

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Microbiologie et Immunologie

Juin 2018

© Charles-David Dubé, 2018

Résumé

Le fonctionnement efficace des communautés microbiennes anaérobies repose sur le transfert d'électrons interspèces (IET). Par contre, encore aujourd'hui il y a peu d'informations sur les mécanismes par lesquels les micro-organismes coopèrent pour échanger des électrons. Le transfert direct d'électrons interspèces (DIET) est une voie métabolique syntrophe d'IET dans laquelle des électrons libres circulent d'un microorganisme à l'autre sans être transportés par des molécules réduites telles que l'hydrogène moléculaire ou le formate. Cette voie a été proposée comme étant présente entre les populations fermentaires et méthanogènes dans le granule pendant la digestion anaérobie. Elle impliquerait les substances polymériques extracellulaires (EPS) du granule pour faciliter le transfert des électrons libres. L'étude ici présente se penche sur ces hypothèses. Le DIET est divisé en deux grandes catégories, le DIET effectué par l'intermédiaire d'un matériau non organique conducteur (mDIET) et le DIET biologique (bDIET). Ce dernier implique seulement les cellules elles-mêmes et leurs composantes (pilis, nanofils, etc.). En utilisant des granules anaérobies où *Geobacter* n'était pas dominant (*Geobacter* étant reconnu pour sa participation fréquente au DIET), les tests réalisés avec deux co-substrats ont montré que les activités méthanogènes du formate et de l'hydrogène diminuaient en présence d'un co-substrat non méthanogène tel que l'éthanol. Cela peut indiquer que le bDIET se produit et entre en compétition avec l'hydrogène et le formate. De plus, l'ajout de microparticules conductrices, telles que l'acier inoxydable et le charbon actif granulaire, augmente l'activité méthanogène dans les granules désintégrés par rapport aux granules désintégrés dépourvus de microparticules. Ces résultats indiquent que les bactéries syntrophes provenant des boues anaérobies, excluant les espèces de *Geobacter*, peuvent aussi effectuer le mDIET. Par contre, à la suite d'essais réalisés à l'aide d'un petit réacteur conçu pour l'étude du mDIET, il fut déterminé que ce mécanisme n'est peut-être pas exclusif, c'est-à-dire qu'il ne pourrait assurer à lui seul la survie et la croissance des méthanogènes le réalisant; d'autres mécanismes d'IET pourraient devoir se produire en parallèle au mDIET. Les méthanogènes acétoclastes, connues pour effectuer le bDIET, ont été enrichies dans les essais de mDIET, de même que certaines méthanogènes non-acétoclastes, leur suggérant un rôle toujours non défini à ce jour dans cette voie. Finalement, en étudiant les EPS, les protéines de *Methanosaeta concilii*

y étaient les mieux représentées dans l'ensemble des trois boues granulaires étudiées, soulignant son rôle dans la formation et la maintenance du granule anaérobie, ainsi que dans sa stabilité et son efficacité. Sans toutefois confirmer de rôle précis pour les EPS, cette étude met en évidence l'existence de structures et de molécules dans la matrice extracellulaire du granule qui ont chimiquement la capacité de participer au bDIET, tels que les substances humiques et les formate déshydrogénases.

Mots-clés : Transfert direct d'électrons interespèces (DIET), Granule, Digestion anaérobie, Substances polymères extracellulaires (EPS)

Abstract

Effective interspecies electron transfer (IET) is key to the efficient functioning of anaerobic microbial communities. On the other hand, even today there is little information on the mechanisms by which microorganisms cooperate to exchange electrons. Direct interspecies electron transfer (DIET) is a metabolic pathway of IET in which free electrons flow from one microorganism to another without being transported by reduced molecules such as molecular hydrogen or formate. This pathway has been proposed as being present between fermentative and methanogenic populations in the granule during anaerobic digestion. It would involve the extracellular polymeric substances (EPS) of the granule to facilitate the transfer of free electrons. The present study examines these hypotheses. The DIET is divided into two broad categories, DIET mediated by a conductive non-organic material (mDIET) and the biological DIET (bDIET). The latter only involves the cells themselves and their components (pilis, nanowires, etc.). Using anaerobic granules in which *Geobacter* was not dominant (*Geobacter* is known for its frequent participation in DIET), the tests carried out with two co-substrates showed that the methanogenic activities of the formate and the hydrogen decreased in the presence of a non-methanogenic co-substrate such as ethanol. This may indicate that the bDIET occurs and competes with hydrogen and formate. In addition, the addition of conductive microparticles, such as stainless steel and granular activated carbon, increases the methanogenic activity in the disintegrated granules as compared to the disintegrated granules without microparticles. These results indicate that syntrophic bacteria from anaerobic sludge, excluding *Geobacter* species, can also perform mDIET. On the other hand, further to tests with a small reactor designed for the study of mDIET, it was determined that this mechanism may not be exclusive, i.e. alone it can not ensure the survival and growth of the methanogens carrying it out; other IET mechanisms may have to occur in parallel with the mDIET. Acetoclast methanogens, known to perform bDIET, have been enriched in the mDIET assays, as well as some non-acetoclastic methanogens, suggesting a role that is still undefined to date in this pathway. Finally, further to studies of granule EPS, the *Methanosaeta concilii* proteins were shown to be best represented in all three granular sludges studied, highlighting its role in the formation and maintenance of the anaerobic granule, as well as its stability and effectiveness. Without confirming a specific role for EPS, this study highlights the existence of structures and molecules in the extracellular

matrix of the granule that chemically have the ability to participate in the bDIET, such as humic substances and formate dehydrogenases.

Keywords : Direct Interspecies Electron Transfer (DIET), Granule, Anaerobic Digestion, Extracellular Polymer Substances (EPS)

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xii
Introduction	1
Mise en contexte de l'article 1	1
Article 1: Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: A review	2
Résumé	3
Abstract.....	4
Keywords.....	4
Introduction.....	4
Likelihood of DIET in anaerobic granular sludge	5
Anaerobic granular sludge ecology	8
Exoelectrogenic bacteria: the first partner	11
Electrotrophic methanogens: the second partner	12
A new role for the granule extracellular polymeric substances (EPS): electron dispatcher	14
Conclusion	16
Complément.....	18
Présentation de la thèse.....	20
Chapitre 1 : Activité Éthanol-à-méthane de granules anaérobies dépourvus de <i>Geobacter</i>, renforcée par des microparticules conductrices	21
Mise en contexte de l'article 2	21
Article 2 : Ethanol-to-methane activity of <i>Geobacter</i> -deprived anaerobic granules enhanced by conductive microparticles	22
Résumé	23
Abstract.....	24
Keywords.....	24
Highlights	24
Graphical abstract	25

Introduction.....	25
Materials and methods.....	28
Sludge preparation.....	28
Microparticles and proteins amendment.....	29
Activity tests.....	29
Analytical methods.....	30
Scanning electron microscopy (SEM).....	30
DNA extraction and PCR.....	30
Microbial community analysis by high-throughput sequencing (HTS).....	31
Results and discussion.....	31
Conclusions.....	39
Acknowledgments.....	40
Chapitre 2 : Caractérisation de la fraction protéinique des EPS de trois boues granulaires anaérobies.....	41
Mise en contexte de l'article 3.....	41
Article 3 : Characterization of the protein fraction of the extracellular polymeric substances of three anaerobic granular sludges.....	42
Résumé.....	43
Abstract.....	44
Keywords.....	44
Highlights.....	44
Graphical abstract.....	45
Introduction.....	45
Material and methods.....	46
Sources of sludge and preparation.....	46
Microbial community analysis by high throughput screening (HTS).....	47
EPS extraction.....	47
Cell lysis detection.....	48
Characterization of EPS.....	48
Separation using gel electrophoresis.....	49
Mass spectrometry (MS).....	49
Results.....	50
Discussion.....	56
Conclusions.....	59

Acknowledgments	60
Supplementary Data 1: Update of the Frølund's colorimetric method for the determination of mixed proteins and humic substances.....	61
Introduction.....	61
Material and methods.....	62
Results.....	62
Supplementary Data 2:.....	68
Chapitre 3 : Étude du DIET en mini-réacteur à deux chambres dans un environnement de digestion anaérobie	73
Mise en contexte	73
Objectifs.....	74
Matériel et méthodes.....	75
Inoculum	75
Analyses chimiques	75
Configuration du réacteur	76
Microscopie électronique à balayage.....	78
Extraction d'ADN et PCR.....	78
Analyse de la communauté microbienne par séquençage à haut débit (HTS).....	78
Résultats et discussion	79
Conclusion	92
bDIET	92
mDIET	96
Bibliographie	i

Liste des tableaux

Table 1 : Reactions potentially involved in the transformation of ethanol into methane	27
Table 2 : High-throughput sequencing based relative abundance of bacterial and archaeal families identified in both whole and disintegrated granules at inoculation and after the incubations on ethanol with and without carriers.	32
Table 3 : Specific substrate consumption and methane production activities of granular sludge on a variety of substrates, alone or coupled	33
Table 4 : Substrates consumable by the various methanogenic orders*	34
Table 5 : Specific activities of both ethanol consumption (SCA) and methane production (MPA) obtained with disintegrated granules without and with conductive and non-conductive microparticles or proteins	37
Table 6 : Relative abundance of bacterial and archaeal genera for each sludge.....	52
Table 7 : Compound classes of EPS extracted.....	53
Table 8 : Identified proteins and microbial species that produce them, in the EPS of the three tested sludges	55
Table 9 : Table of significant proteins identified.....	68
Tableau 10 : Description des essais	78
Tableau 11 : Abondance relative des genres bactériens et d'archées selon un HTS de l'inoculum et des deux enrichissements provenant des chaque côté de la membrane d'acier du petit réacteur pour l'essai #4	88

Liste des figures

Figure 1 : Multilayered structure of the carbohydrate-fed anaerobic granules.....	7
Figure 2 : Nombre de publication sur le DIET en fonction des années.....	18
Figure 3 : Scanning electron microscope images of colonized microparticles.....	39
Figure 4 : Electrophoresis of precipitated proteins.....	50
Figure 5 : Measured concentration of protein.....	64
Figure 6 : Measured concentration of humic substances.....	66
Figure 7 : Configuration du réacteur.....	77
Figure 8 : Images au microscope électronique à balayage de l'essai #1.....	81
Figure 9 : Images au microscope électronique à balayage de l'essai #2.....	83
Figure 10 : Substrats et produits des essais #4 et #5.....	85
Figure 11 : Images au microscope électronique à balayage de l'essai #4.....	87

Liste des sigles et abréviations

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

bDIET : DIET biologique

BES : Système bioélectrochimique

BSA : Albumine de sérum bovin

CLSM : Microscopie confocale à balayage laser

DIET : Transfert direct d'électrons interespèces

EPS : Substances polymériques extracellulaires

FDH : Formate dehydrogénase

FISH : Hybridation fluorescente in situ

GAC : Charbon actif granulé

HA : Acide humique

HS : Substances humiques

HTS : Séquençage à haut débit

IET : Transfert d'électrons interespèces

mDIET : DIET médié par un matériau non-organique conducteur

MFC : Pile microbienne

MPA : Activité de production de méthane

OHPA : Acétogène productrice d'hydrogène obligatoire

pb : Paire de bases

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PEM : Membrane conductrice de proton

RPM : Rotation par minute

SCA : Activité de consommation du substrat

SRB : Bactérie réductrice de sulfate

UASB : Lit de boue anaérobie à flux ascendant

VSS : Solides volatils en suspension

À ma famille,

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Serge R. Guiot (Ph.D.), qui m'a accueilli dans son laboratoire pour mes études graduées. Il m'a permis d'évoluer dans une atmosphère de recherche stimulante, éclairée et hautement professionnelle. Il a toujours eu confiance en moi et il m'a toujours poussé à me dépasser. Il m'a aidé à développer tous les outils nécessaires à la recherche : la rigueur, la persévérance, avoir de l'ambition, de la curiosité, prendre sa place, viser haut et loin. Je me souviendrai toujours du jour où il est entré dans mon bureau en me disant qu'il n'y a que les gens qui transgressent qui font progresser ! Clairement, c'est un homme qui déplace des montagnes, mais qui pousse et enseigne aussi aux autres à le faire. Sa grande carrière sera toujours une source d'inspiration pour moi. Merci, Serge, pour les nombreuses heures de travail à passer sur mes documents qui en avaient un grand besoin. Merci aussi pour toutes ces heures à échanger et à réfléchir sur des sujets qui nous passionnent.

Je tiens aussi à remercier Ruxandra Cimpovia, qui m'a offert une aide indispensable pour la réussite de mes travaux de recherches. Je ne compte plus le nombre de conseils donnés pour arriver à la finition de cette thèse, qu'ils soient techniques, mathématiques, stratégiques ou même relationnels. Ruxandra fut pour moi un guide qui m'a toujours dit où mettre ou ne pas mettre les pieds pour rester sur le chemin. C'est une collègue de travail qui a grandement influencé ma façon de faire la recherche : aller au fond des choses avec précision et rigueur.

Je veux aussi remercier tous les gens que j'ai côtoyés au laboratoire, au CNRC ou ailleurs, et qui m'ont tous aidé de près ou de loin à réussir ce projet; Mathieu Haddad (Ph.D.), partenaire d'études et ami. Benji Ahvazi (Ph.D.), collègue de bureau, farceur et motivateur. Boris Tartakovski (Ph.D.), Guillaume Bruant (Ph.D.), Jean-Claude Frigon, Caroline Roy, Frédérique M.-Lebrun, Punita Mehta, Alain Corriveau, Stéphane Deschamps, Fred Ngounjdo, Michelle-F. Manuelle, Jérôme Breton, Marie-Josée Lévesque, Sabo Hrapovic, François Lépine (Ph.D.; INRS-IAF), Mark Lefsrud (Ph.D.; Université McGill), S Kelly Sears (Université McGill), Anastasia Nikolakakis (INRS-IAF), René Wollin (conception du réacteur).

Je remercie aussi ma mère Marie-Ange et mon père Gaston qui m'ont transmis leurs valeurs d'engagement, de respect, de curiosité, de créativité, de persévérance, d'intelligence et d'aboutissement. Sans leur amour et encouragement, ce projet n'aurait pas eu lieu. Merci à Pablo

d'être ce qu'il est, de me soutenir et de me faire vivre. Merci à Catherine de toujours être là et de comprendre ; sans elle je n'aurais pas réussi ce défi. Merci, Ricardo, d'avoir si souvent fait mes lunches. Merci à Mehdi et Claude pour la motivation de me lancer dans cette aventure.

Finalement, merci aux entreprises Agropur, Lassonde et Tembec qui m'ont gracieusement fourni des boues anaérobies granulaires. Merci au Conseil national de recherches du Canada et au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada.

Introduction

Mise en contexte de l'article 1

L'article 1 est présenté ici en guise d'introduction à la thèse. Le but de cet article était de faire une revue critique au sujet de l'état actuel des connaissances entourant le DIET, particulièrement dans le contexte de la digestion anaérobie. Cet article a été publié sous forme d'un chapitre dans *Biogas Science and Technology*, un livre publié par le journal *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* en 2015. Il fut le premier article à rassembler et à résumer les processus du DIET en lien avec le granule anaérobie issu des digesteurs à lit de boue anaérobie à flux ascendant (UASB). L'article a été écrit non seulement pour indiquer les principales connaissances dans la compréhension du DIET à cette date, mais aussi dans le but de proposer de nouvelles hypothèses et idées dans un domaine de recherche jeune où relativement peu de recherche fondamentale est effectuée. La plupart de ces hypothèses de recherche ont d'ailleurs été étudiées dans la présente thèse. Cet article est le résultat de l'initiative de l'étudiant et a été rédigé avec Serge R. Guiot (Ph.D.). Il est suivi d'un complément, qui se veut une mise à jour du sujet, afin de couvrir les années manquantes au document publié ici et aussi d'apporter des précisions et des ajouts en lien avec les travaux de recherches de cette thèse.

Article 1:

Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: A review

Charles-David Dubé¹ and Serge R. Guiot^{1,2}

¹ Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal,
Montreal, Canada

charles-david.dube@cnrc-nrc.gc.ca

² Bioengineering Group, Energy, Mining and Environment, National Research Council
Canada, Montreal, Canada. NRC paper No. 55668.

serge.guiot@cnrc-nrc.gc.ca

Référence: Dubé CD, Guiot SR. Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: A review. *Biogas Science and Technology*: Springer International Publishing; 2015. p. 101-15.

Résumé

Le DIET est une voie métabolique syntrophe dans laquelle des électrons libres circulent d'un microorganisme à l'autre sans être transportés par des molécules réduites telles que l'hydrogène moléculaire ou le formate. Comme de plus en plus de microorganismes démontrent une capacité d'échange d'électrons, soit pour les exporter ou les importer, il devient évident que le DIET est une voie métabolique qui est beaucoup plus présente dans la nature qu'on ne le pensait auparavant. L'article suivant passe en revue la littérature en lien au DIET, en particulier en référence à la digestion anaérobie. Les boues granulaires anaérobies, petits biofilms sphériques, sont des microenvironnements spécialisés où les bactéries syntrophes et les archées évoluent ensemble à proximité. Les bactéries exoélectrogènes qui dégradent des substrats organiques ou leurs intermédiaires ont besoin d'une purge pour électrons et les méthanogènes électrotrophes représentent des partenaires parfaits pour assimiler ces électrons et produire du méthane. Les EPS des granules rendent la matrice du biofilm plus conductrice et jouent un rôle en tant que transporteur d'électrons pour le DIET.

Abstract

Direct interspecies electron transfer (DIET) is a syntrophic metabolism in which free electrons flow from one cell to another without being shuttled by reduced molecules such as molecular hydrogen or formate. As more and more microorganisms show a capacity for electron exchange, either to export or import them, it becomes obvious that DIET is a syntrophic metabolism that is more present in nature than previously thought. This article reviews literature related to DIET, specifically in reference to anaerobic digestion. Anaerobic granular sludge, a biofilm, is a specialized microenvironment where syntrophic bacterial and archaeal organisms grow together in close proximity. Exoelectrogenic bacteria degrading organic substrates or intermediates need an electron sink and electrotrophic methanogens represent perfect partners to assimilate those electrons and produce methane. The granule extracellular polymeric substances by making the biofilm matrix more conductive, play a role as electron carrier in DIET.

Keywords

Anaerobic digestion, direct interspecies electron transfer (DIET), granular sludge, extracellular polymeric substance (EPS), exoelectrogenic bacteria, electrotrophic methanogen

Introduction

The first scientific paper on microbial electricity generation was published in 1911 by Michael C. Potter of the University of Durham (UK) (1). But it is only in the past few years that this capability became more than an academic curiosity. The reasons for this recent interest in using bacteria to generate electricity are a combination of the need for new sources of energy, discoveries about microbial physiology related to electron transport, and the advancement of fuel-cell technologies.

In a microbial fuel cell (MFC), bacteria are separated from a terminal electron acceptor at the cathode so that the only means for respiration is to transfer electrons to the anode (2, 3).

However, it is unlikely that the electricity generation has ever been a selective advantage during evolution, unlike the electron transfer to a natural extracellular acceptor. Exoelectrogenic microbes developed during evolution pathways to export electrons through the plasmic membrane to reduce external molecules, such as metal oxides (iron oxide (Fe_2O_3) or manganese oxide (IV), MnO_2) and humic substances, as a respiration mechanism for thereby acquiring energy and growth. For instance, bacteria of the genus *Geobacter* reduce Fe_2O_3 into soluble ferrous oxide (FeO). Fe_2O_3 is, as the anode of a MFC, an extracellular insoluble acceptor, thus requiring mechanisms for extracellular electron transfer (4). As scientists start to exploit this capability to develop MFCs to produce renewable and alternative energies, it started to become obvious that the microbes in a natural environment could also benefit from these extracellular electron transfer pathways for optimizing their syntrophic associations. We review here literature reports that support the reality of the direct interspecies electron transfer (DIET), specifically in the anaerobic granular sludge used in industrial anaerobic digesters for wastewater biotreatment. The anaerobic granule is a stable, efficient and structured micro-environment where direct electron exchange between members of such consortium is likely to exist.

Likelihood of DIET in anaerobic granular sludge

“What appears to be always and everywhere present [in life] is a continuous and rapid flow of electrons and protons passing through each and every living organism” (5). This is presumably universal for each individual organism, but it is even of greater significance for syntrophic organisms. In methanogenic syntrophic communities, electrons and protons or reducing equivalents flow from one organism to the other by shuttle components such as molecular hydrogen. In the case of obligate syntrophy, the hydrogen-utilizing methanogens are essential to maintain the low concentrations of hydrogen that make the hydrogen-producing reaction sufficiently exergonic to support energy conservation (phosphorylation of ADP to ATP), hence cell maintenance and growth (6). Obligate syntrophy was first recognized by Bryant and coworkers in 1967 (7) when they discovered that the originally believed pure culture *Methanobacillus omelianskii* was a co-culture of an ethanol-oxidizing bacterium and a

methanogen, the latter scavenging the hydrogen produced by the former. Nowadays, it is well established that not only hydrogen but formate also plays a key role for electron transfer in methanogenic environments (8-11). Optimization of large-scale anaerobic wastewater treatment relies on highly efficient methanogenic micro-ecosystems such as granular sludge, which develops in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors (12, 13). It has been shown that aggregation of cells such as in methanogenic granules is a key factor for efficient methanization as a direct result of an efficient electron transfer between obligate H₂-producing acetogens (OHPA) and methanogens, especially as granules often present a layered architecture (Figure 1) which provides niches for syntrophic associations and promotes the physical proximity between those syntrophs (14, 15).

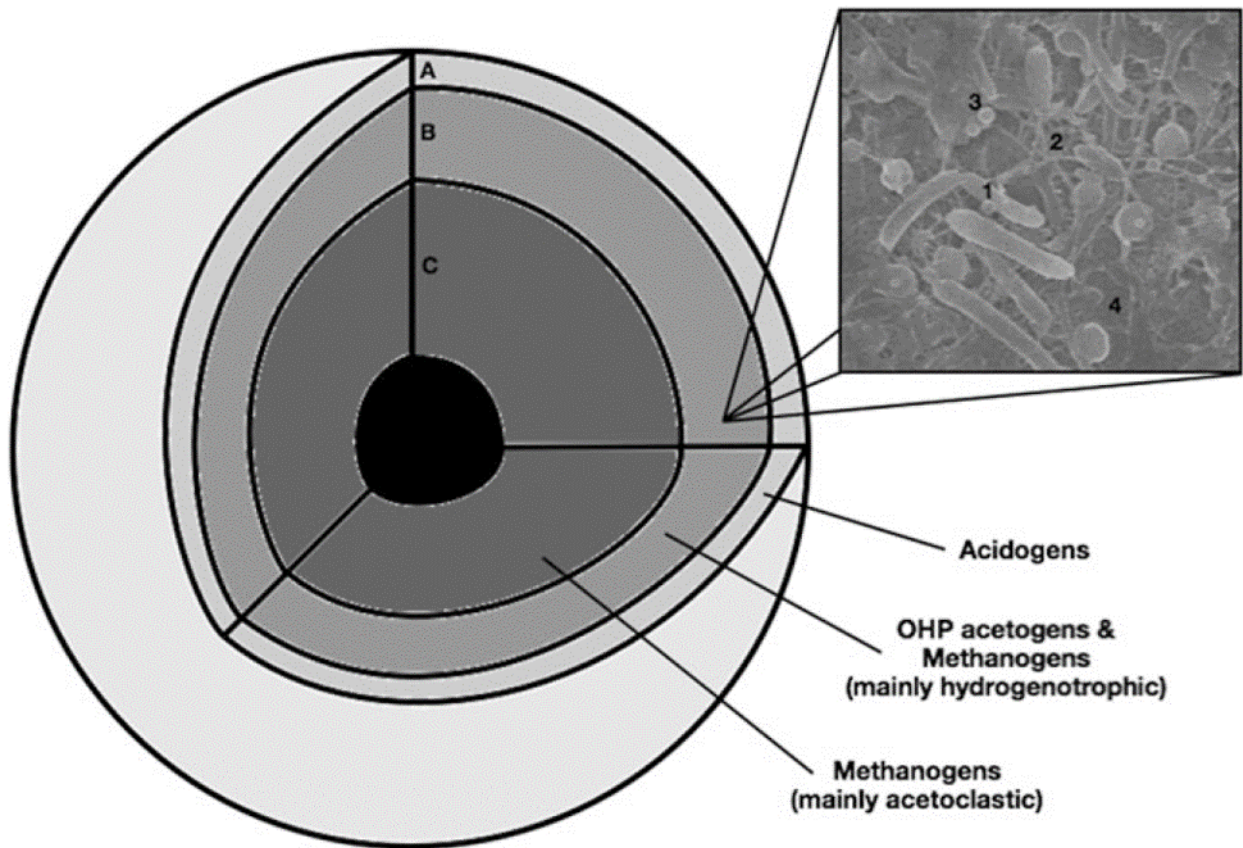


Figure 1 : Multilayered structure of the carbohydrate-fed anaerobic granules

The syntrophic associations between obligate H₂-producing acetogens (OHPA) and H₂-consuming microorganisms are prevailing in the middle layer (B) (16), where presumably direct interspecies electron transfer (DIET) therefore may primarily occur, either by direct contact between cells (1), or through nanowires (2), or EPS or minerals (3), or shuttled by soluble mediators (4).

Methane is not always the ultimate reduced product in anaerobic environments, and sulphur, metal oxides and humic substances are also used as final electron acceptors. Some of those molecules are kept outside of living cells and microorganisms developed specialized pathways to export electrons through their membrane to regenerate reduced coenzymes such as NADH or ferredoxin. For instance, *Geobacter sulfurreducens* uses a chain of trans-membrane cytochromes to transport electrons to acceptors outside the cell (17). This property of

dissimilatory reduction, now known to be widespread in the phylogenetic tree of bacteria, is used in MFCs and other bioelectrochemical systems (BES), where a positively charged electrode acts as a permanent electron acceptor.

In 2006, Stams and co-workers (11), then followed by others (18-22), suggested that a direct electron transfer excluding hydrogen and formate could happen between OHPA bacteria and methanogenic archaea in some environments. Incidentally, DIET might have been an explanation of previous observations that granular sludge was able to degrade propionate even though the Gibbs free energy change based on the dissolved H₂ measured in the liquid surrounding the granules was positive (23-25). This emerging concept of DIET is surveyed here in the particular context of anaerobic granular sludge, an engineered methanogenic micro-ecosystem where the proximity and diversity of cell populations would allow for this exchange.

Anaerobic granular sludge ecology

The efficiency of granular sludge for high-rate anaerobic wastewater treatment has been established since a long time, but the process of anaerobic granulation is still not well understood despite extensive research into granulation mechanisms, microbial ecology, and other significant contributing factors (26). Theories of granulation include amongst others, the interactions and spatial requirements of obligate syntrophic groups. One of the limitations in the study of granules is the relatively high abundance of unknown and uncultivated strains, that restrains genomic or proteomic studies of this particular biofilm. The cells proximity that facilitates the electron transfer undoubtedly plays an important role (27). Most often, when the primary substrate hydrolysis is not the limiting step, granules are built as a layered structure (Figure 1) that conforms to the sequential anaerobic degradation of organic matter: hydrolysis and acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis (15, 28, 29). Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis shows that members of Chloroflexi and Betaproteobacteria colonized mainly the outer layer, members of Firmicutes occupied mainly the middle layer (30) and *Methanosaeta*-, *Methanobacterium*-, *Methanospirillum*-, and *Methanosarcina*-like cells are prevalent in the innermost layer (16, 31). Aging at as short as four weeks (31), or being substrate limited (30), the center of the granule tends to be inactive and composed of inert matter, either

dormant or decaying microbial cells, and inorganic materials (16). Even though this layered architecture is coarse, confocal laser scanning microscopy (CLSM) and FISH pictures clearly show large areas in the middle layer that are simultaneously colonized by the bacterial and archaeal domains, that likely correspond to syntrophic populations (16, 32).

Some studies demonstrate evolution and changing characteristics of the granule population over time (31). There are likely species, and even sub-species and mutants that are advantaged by the selective pressure exerted in this kind of granule environment. One avenue to understand the evolution of species in the anaerobic granule is the use of simplified models using only a few pure strains. Summers and coworkers (33) show that in a syntrophic coculture of *Geobacter metallireducens* and *G. sulfurreducens* that forms aggregates similar to granules, a single mutation in the *pilR* gene always appears in *G. sulfurreducens* (*pilR* is an enhancer binding protein that plays a role in transcriptional regulation when coupled with *RpoN*, an RNA polymerase). This mutation inactivates the binding function of *pilR* and up- or down-regulates the expression of several genes. Globally, this mutation in *pilR* seems to facilitate aggregation and syntrophic metabolism. Interestingly, *OmcS*, a c-type cytochrome, was over-expressed in *pilR* mutants (34) and was abundantly found extracellularly in aggregated cocultures of *G. metallireducens* and *G. sulfurreducens*, as revealed by immunogold labelling (33). *OmcS* is a central protein involved in the reduction of extracellular, insoluble Fe(III) oxides. It should be noted that all other cytochromes, also involved in extracellular transport of electrons were down-regulated in *pilR* mutants (34) and in *G. sulfurreducens* cells growing with an anode as electron acceptor (35). Since there is no need to over-express and produce cytochromes since the pathway of iron reduction is not involved in this assay, why would cytochromes be so important? Cytochromes are known to be involved in electron transfer and the fact that they are abundantly present outside the cell suggests that DIET may occur. Granules have much more complex populations than only Geobacteraceae species, however, as in all other ecosystems, the evolutionary pressure in a granule will select for the most adapted cells. Individual cells that were disadvantaged, by dispersion in a liquid suspension could have a competitive advantage in the granule cluster, in particular if they could better compete for energy due to DIET.

Another interesting case that increases our understanding is the coculture ecology of *Pelotomaculum thermopionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Together

these two species form aggregates that facilitate the interspecies electron transfer and increase the growth rate. What is particularly interesting is that the flagellum-like filaments of *P. thermopropionicum* connect to *M. thermautotrophicus* cells to finally wrap them in aggregates (14). It was then shown that these filaments were electrically conductive (18). Despite these results, there is still no direct experimental evidence that the fermentative bacterium *P. thermopropionicum* directly transfers electrons to *M. thermautotrophicus* with those filaments. Recently, Shimoyama and coworkers found a protein-mediated interaction between filaments and the *M. thermautotrophicus* surface (36). The flagellar cap protein *FliD*, that is part of the filament structure of *P. thermopropionicum*, was found to bind to the syntrophic partner cell surface, *M. thermautotrophicus* and *Methanosaeta thermophila*. Binding of *FliD* to the surface of *M. thermautotrophicus* induces a change in the expression of over 50 genes and most of them have a positive impact on the syntrophic metabolism. This is another example of the specific association between syntrophic microorganisms, and we can expect that several other interactions of this type could occur in methanogenic environments. The hypothesis that flagellum-like proteins binding to methanogenic cells allow them to capture directly electrons from DIET is supported since these filaments are known to be conductive. Granulation seems to give an advantage to organisms, allowing for the development of efficient strategies of interspecies electron transfer and this pressure could push towards the development of DIET.

Horizontal gene transfer also influences the evolution of granules. By comparing the genome of syntrophic bacteria with public genomic databases related to methanogenesis, Kato and Watanabe (37) found that the gene content of syntrophic bacteria is more similar to methanogens with which they interact than with other phylogenetically close microorganisms. This genomic similitude with the microbial neighbourhood also includes genes from their central metabolism such as hydrogenases or ATPases. Codon-usage patterns of genes were also more influenced by the microorganisms at proximity than the phylogeny. This niche-associated evolution probably has an important impact on granule development. Indeed, environment (including neighbour microbes) could further influence the population genetics and function than previously thought. Adaptive genes coding for DIET in granules could then efficiently spread to several genetically distant species.

Exoelectrogenic bacteria: the first partner

Enrichment of electricity-producing microorganisms (or exoelectrogens) could be obtained from placing a graphite anode in marine sediments (38) and most of the time it is mainly composed by members of Geobacteraceae family (39). However, many other exoelectrogenic bacteria have been found widespread in the bacteria phylogenetic tree, even though most pertain to the Proteobacteria phylum (20). Exoelectrogens are ubiquitous in anaerobic environments, natural in sediment, or engineered for anaerobic digesters. As a corroboration, anaerobic sludge is often used as inoculum in BES. It seems that exoelectrogens first developed pathways to achieve the dissimilatory reduction of extracellular compounds such as metal oxides. In *G. sulfurreducens*, a membrane NADH-dehydrogenase initiates the exportation of electron across the membrane through a chain of cytochromes to reach the outer membrane layer (17). *Shewanella oneidensis* use a similar pathway to export electrons with a membrane formate-dehydrogenase (40). It was also found that some strains could secrete cytochromes or other electron-shuttling compounds in the environment to more easily reach distant solid electron acceptors (41, 42). Some strains such as *P. thermopropionicum*, *Shewanella oneidensis* and the cyanobacterium *Synechocystis* have developed nanowires (flagellum-like filaments) to reach further electron acceptors and those nanowires seem to be specialized in electron transport over longer distances, such as 20 μm (18, 43).

Interspecies electron transfer (IET) during anaerobic digestion is already well characterized (6, 44). The microbial species that provide electrons in this exchange are the hydrogen and formate producers. Therefore, those same species should be the ones that supply electrons in DIET too. That includes almost all bacteria, which perform dark fermentation. Specifically, in this large group, the candidates for DIET should be those who are genetically equipped to perform this kind of exchange because of their ability to carry out extracellular electron export. However, in granules, syntrophic bacteria are the most likely to undergo a selective pressure inducing the development for DIET capability, because of the thermodynamic limitations related to the hydrogen partial pressure (or formate concentration) and the absolute need to have an electron sink. As a result, syntrophic bacteria represent the best candidates for performing exoelectrogenesis and DIET.

Alike with the traditional interspecies electron transfer mediated by hydrogen or formate, DIET should be thermodynamically advantageous for both electron donor and acceptor. The most common reduced molecules formed during metabolism of syntrophic or exoelectrogenic bacteria are NADH and reduced ferredoxin with standard redox potentials (E°) of -320 mV and -420 mV respectively. Several hydrogenases can oxidize these reduced compounds to produce hydrogen ($E^{\circ} = -414$ mV). However, the hydrogen partial pressure must stay very low (≤ 10 Pa), otherwise the reduced compounds accumulate and inhibit growth. Finding an electron sink is thus vital for syntrophic bacteria. On the other hand, the first step of the methanogenesis is to reduce the ferredoxin ($E^{\circ} = -500$ mV), which is typically made by the hydrogen oxidation. As this reaction is endergonic, methanogens use energy coming from the chemiosmotic H^+ gradient created across the cell membrane with further exergonic methanogenic reactions catalyzed by energy-converting hydrogenases (45, 46). The final step of methanogenesis leads to methane, which has an E° of -240 mV.

Electrotrophic methanogens: the second partner

To achieve DIET, exoelectrogens need partners that are able to accept electrons to generate their energy, such as electrotrophic microorganisms. In 1987, Daniels and coworkers observed that methanogens cultivated with elemental iron (Fe^0) as the only source of electrons were able to reduce CO_2 to produce methane (47, 48). This means electrons were imported through the cell membrane. Afterwards, it was found that some *Methanobacterium*-like and *Methanococcus* archaea were able to produce methane faster with iron than other well-known hydrogen-consuming methanogens (49, 50). It was also shown that the supply of solid iron particles increased the methane production in anaerobic sludge compared to endogenous substrate controls (51). This suggests a more direct pathway to an electron source than hydrogen or formate, and this pathway could represent a competitive advantage for energy in the anaerobic granular sludge. In the same vein, it was shown that a cathode can serve as a direct electron donor to methanogens (52).

Electrotrophs have two ways to produce energy with directly transferred electrons: simply produce hydrogen, or integrate them directly in the electron transport chain to produce

other reduced compounds and chemiosmotic energy. In the first case, hydrogenases would generate hydrogen that would be directly used by the methanogen. In the second case, some membrane-associated hydrogenases (for example EchA-F, VhoACG, HdrDE, etc.) in methanogens would directly reduce ferredoxin, methanophenazine or CoM-S-S-CoB, using free electrons (53-56). At the same time, those enzymatic complexes could generate a proton or sodium gradient across the membrane, a useful source of energy for methanogens. Reduced compounds will be finally used to form methane, or assimilated in biosynthesis, or even yet used to form hydrogen, that can be used by some hydrogenases in methanogens. Only Methanosarcinales have cytochromes (54). But if these membrane-bound hydrogenases play a role in the transport of electrons across membranes (53), they might then accept electrons directly and methanogens other than Methanosarcinales might perform DIET as well.

During evolution, Methanosarcinales developed the ability to produce methane from CO₂ reduction as well as from acetate dismutation. The only exception is the genus *Methanosaeta*, whose members were known to be unable to reduce CO₂. Recently, DIET was demonstrated with *Methanosaeta harundinacea* (32). *M. harundinacea* was grown in coculture with *G. metallireducens*, a proteobacterium able to oxidize ethanol with Fe³⁺ as the only electron acceptor, but unable to produce hydrogen or formate. However, *M. harundinacea*, in association with the ethanol-consuming *G. metallireducens*, was able to produce methane with an electron recovery efficiency of 96 ± 2%, meaning that not only acetate resulting from the ethanol oxidation was used, but also residual electrons and exogenous CO₂ (32). Those authors found that genes related to CO₂ reduction to methane were highly expressed in such a coculture.

Methanosarcina barkeri was also recently found to have DIET capability when associated with *G. metallireducens* (57, 58). Interestingly, the direct use of electrons by *M. barkeri* does not inhibit the acetoclastic pathway, which was the case when hydrogen was present (59). The ability of processing acetate at the same time as reducing CO₂ represents a competitive advantage for those methanogens that can be involved in DIET.

Recently, one strain of *Sporomusa* sp. was shown to grow as an acetogen with Fe⁰ as the sole electron donor and to enhance iron corrosion, which was the first demonstration that bio-corrosion can be mediated by pure acetogenic bacteria (60). This strain is thus able to take

electrons directly from an extracellular donor to produce acetate. A similar mechanism is also plausible in anaerobic granules.

A new role for the granule extracellular polymeric substances (EPS): electron dispatcher

In granules, mixed populations are surrounded by dead cells, debris and inert matter, embedded in extracellular polymeric substances (EPS), that constitute the matrix of biofilms (61). EPS contain proteins, polysaccharides, enzymes, humic substances, lipids, nucleic acids, other complex organic molecules and minerals and can represent up to 20% of the dry weight of a biofilm. The EPS take form and change over time. As EPS are mostly synthesized by nearby cells, their characteristics and properties are highly related to the populations they harbour. In a column of sand (approximately 10 cm) that was colonized by *Shewanella oneidensis* MR-1, Ntarlagiannis and coworkers (62) showed that the bacteria synthesized nanowires all around each sand grain “hardwiring” the column bottom up, so that oxygen, the terminal electron acceptor, could be reached at the top. Even when there is a distance in cm between the electron donors and acceptors, cells can develop mechanisms to overcome the distance obstacle. This example shows how cells can impact their surrounding EPS, create and modify them to their advantage.

The interspecies electron exchange depends on direct or indirect contacts between cells, which must be stable and durable. With the direct type of contact the exoelectrogen’s membrane touches the electrotroph’s membrane and electrons have just to cross the two membranes. That is the optimal way to perform DIET. But in lab-scale experiments, DIET has only been observed with cocultures, which develop as aggregates alike anaerobic granules, and it is likely that contact between cells can only be indirect. Indirect contact implies vectors to conduct electrons from one to another cell and those vectors should be part of the EPS. They were first evidenced in studies on dissimilatory metal oxides (63). Then, they were given a role of electron shuttles with the development of BES systems. Electron shuttles could be humic substances, riboflavins, cysteine, sulphide, phenazine, anthrahydroquinone disulfonate (AQDS), etc. (11). Those

molecules could be reduced and oxidized with relative ease, compared to metal oxides, facilitating the electron exchange from a donor cell to a receptor one (or an electrode). Cell components or molecules such as flagella and nanowires, cytochromes, pilin, flavins and even DNA are all candidates to play a role in direct electron transfer in biofilms (18, 34, 36, 43, 64-66).

Another vector possibility for electron transfer is to use other cells, alive or dead. Nielsen and coworkers showed in sea sediments, that hydrogen sulphide and organic matter that are sufficiently deep so to not have access to oxygen at the surface, were nevertheless oxidized because electrons could travel up to 12 mm across the sediment upper layer (67, 68). They also demonstrated that the native conductors were long, filamentous bacteria of the Desulfobulbaceae family, able to grow and elongate fast in vertically expanded filaments, and to transport electrons across centimeter-long distances (69). Conductive minerals also seem to play a role in the sediment conductivity (70). On the other hand, Esteve-Nunez and coworkers (71) showed that *G. sulfurreducens* had externally-bound cytochromes so that the cell could act as electron-accepting capacitors and could metabolically function during eight minutes without electron acceptors in the medium. In total, 10^7 electrons could be accepted per cell. Within an EPS-dense biofilm, it is realistic to imagine that electrons transit from an exoelectrogenic cell to other cell walls to finally reach the membrane of an electrotrophic cell. Likewise, debris of dead cells could also be used to transfer electrons to higher redox zones.

Anaerobic granules have been found electrically conductive. This conductance does not seem to be related to minerals such as iron contained in the granules, since the temperature dependence response of the aggregate conductance was characteristic of the organic metallic-like conductance previously described for the pili of *G. sulfurreducens* and was inconsistent with minerals conductance (72). Incidentally a moderate correlation was found ($r = 0.67$) between the abundance of *Geobacter* species in the UASB granules and granule conductivity, suggesting that *Geobacter* contributed to granule conductivity (73). In contrast, mineral particles such as magnetite, carbon cloth, granular activated carbon, and biochar have been shown able to facilitate electron transfer, presumably DIET (58, 74-76). Conductive particles were even shown experimentally that they could replace EPS as biological vectors after anaerobic granules were disintegrated and washed (77). Although the use of minerals to increase

the anaerobic reactors efficiency was known for a long time, it is only recently that DIET is seen as one mechanism behind these positive impacts in anaerobic digestion.

Finally, electron vectors should have a redox potential (E') so that DIET is thermodynamically feasible, i.e. a potential that results in a negative change in Gibbs free energy ($\Delta G'$). Vectors in EPS must hence have a higher E' than that of the reduced compounds formed during the substrate oxidation and a lower E' than the ultimate electron acceptor. As an example, the $\Delta G'$ of NADH oxidation coupled to an electron vector reduction is given by:

$$\Delta G' = \Delta G^{o'} + R \cdot T \cdot \ln \frac{[\text{NAD}^+] \cdot [\text{vector}^-]}{[\text{NADH}] \cdot [\text{vector}^+]}$$

For $\Delta G'$ to be negative, as in the case of the molecular hydrogen (H_2) transfer, the concentration of reduced vectors should be low. If electrorophic methanogens capture electrons as fast as the vectors are reduced, cells would be able to regenerate their NADH as they would be permanently surrounded by oxidized vector molecules.

Conclusion

DIET is a recently discovered form of extracellular electron transfer in which microorganisms exchange electrons to degrade cooperatively organic compounds under anaerobic conditions. The phenomenon might also happen in anoxic or aerobic environments, with terminal electron acceptors other than CO_2 , such as sulfate, nitrate, protons or oxygen. This would permit, for example, aerobic cells that live deeply in biofilms to metabolize their substrate even though they have difficulty in accessing oxygen, since O_2 diffusion is limited. DIET could be a more generalized way of getting energy for microbes than it was previously thought, being effected in a large variety of environments.

DIET is potentially an important mechanism for electron exchange in the anaerobic consortia, involved in the conversion of organic wastes into methane, particularly anaerobic granules used in the wastewater treatment (Figure 1). Though, there has not yet been any direct experimental observation of DIET within such granules, and indirect clues of DIET relate only to *Geobacter*-enriched granules from brewery anaerobic wastewater treatment plants. Hence,

there is still much work needed to understand this phenomenon. Genomic and proteomic studies on the complex populations of multispecies biofilms and chemical and physical characterizations of EPS should advance the DIET evidence and understanding in the near future.

A better mechanistic understanding of DIET will allow for technology improvement in the anaerobic digestion field, such as based on the artificial enhancement of DIET.

Complément

Depuis 2006, année où Stams *et al.* (11) ont proposé pour la première fois que le DIET pouvait exister dans les populations microbiennes de façon naturelle, le nombre de publications concernant ce domaine n'a cessé d'augmenter (figure 2). En réponse à la publication des articles phares, concernant *Geobacter* (33), *Methanosaeta* (32) et *Methanosarcina* (57), un grand nombre d'articles, la majorité en fait, ont été publiés concernant des essais et des méthodes pour encourager le DIET en digestion anaérobie afin d'augmenter les taux de production et les rendements en méthane des digesteurs. À la lumière de ces études est ressorti un concept fondamental concernant le DIET en général, proposé pour la première fois par l'équipe de Shrestha en 2014 (78). Il se distingue deux types de DIET : le DIET réalisé par contact direct entre les cellules ou médié par des pilis, nommé le DIET biologique (bDIET), et le DIET à médié par un conducteur minéral, non biologique, nommé le DIET minéral (mDIET).

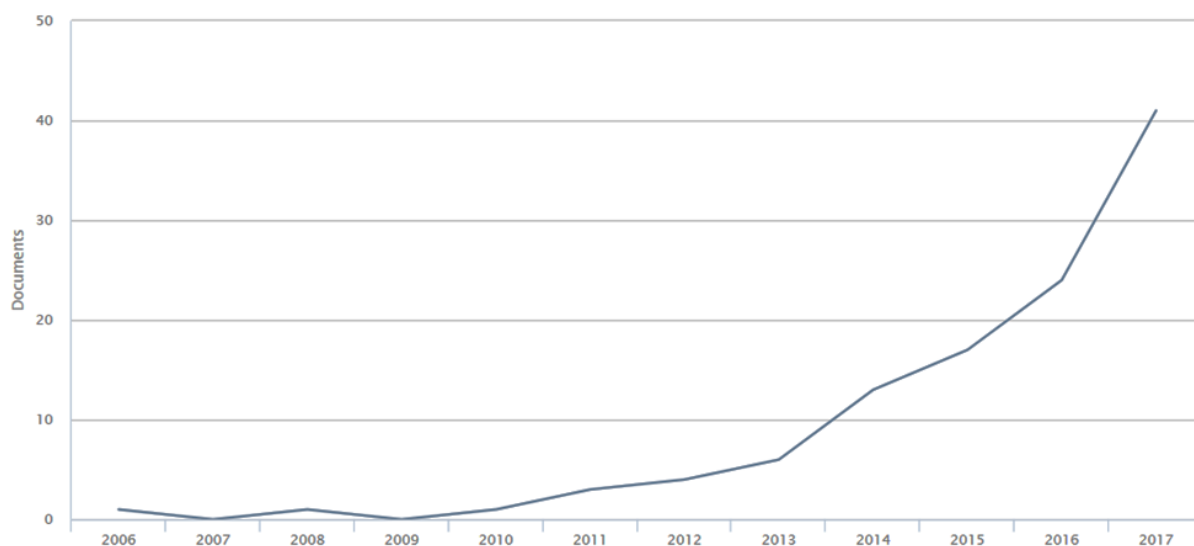


Figure 2 : Nombre de publication sur le DIET en fonction des années

Répertoriées dans le moteur de recherche Scopus (Elsevier) ayant les mots clés *Direct*, *Interspecies*, *Electron* et *Transfer* dans le titre, le résumé ou les mots clés.

Le bDIET a été démontré à l'aide de cultures pures et de leurs mutants, principalement dans les études citées précédemment (voir article 1). Des preuves indirectes supportent le bDIET dans les cultures mixtes (comme le granule issu des UASB). Par exemple la conductance des granules (72), la forte présence de cytochromes extracellulaires (79) ou encore l'enrichissement de *Geobacter* dans les populations et la présence de pilis (73). Une équipe a aussi comparé un modèle de diffusion de molécules réduites à un modèle de conductivité électrique (bDIET) dans des populations méthanotrophes incultivables individuellement et ils en sont venus à la conclusion que le bDIET était le modèle le plus plausible (79). Reste que de démontrer le bDIET dans les cultures mixtes est encore aujourd'hui un véritable défi, puisque les mécanismes d'IET sont difficilement différenciables les uns des autres et ils se produisent simultanément. Le champ de recherche sur le bDIET est relativement petit comparativement aux nombreuses études sorties concernant le mDIET.

La plupart des granules utilisés dans les études publiées à ce jour contiennent une population élevée en membres de la famille des Geobacteraceae, provenant souvent de digesteurs traitant des eaux usées de brasseries riches en éthanol. Or, la plupart des boues anaérobies traitant d'autres eaux usées contiennent très peu de membres de Geobacteraceae. Bien que les microorganismes électrogènes soient très répandus dans l'arbre phylogénétique (3, 80) et que beaucoup plus d'espèces que celles de la famille des Geobacteraceae possèdent cette capacité, très peu d'études se sont penchées sur l'importance de ces autres populations sur le DIET.

Comme mentionné précédemment, davantage d'articles à propos du mDIET que du bDIET ont été publiés dernièrement. Park *et al.* résumant dans une publication les résultats de 27 articles publiés à propos de matériaux conducteurs ajoutés pour augmenter le DIET en réacteur (81). Les différents matériaux utilisés sont le charbon actif granulé (GAC), le biochar, le tissu de carbone (carbon cloth), le graphène, les nanotubes de carbone, la magnétite, la ferrihydrite, l'acier inoxydable et les nanotiges de polyaniline. Les temps de latence pour la formation de méthane dans les réacteurs avec ces matériaux ajoutés étaient de 10 à 75% plus courts que ceux sans matériau. Les taux de formation de méthane ont augmenté de 79-300% et les rendements en méthane ont augmenté de 100-178%. Toutes ces études se concentrent sur des niveaux de maturité technologique de recherche plus élevés afin d'obtenir de meilleurs

rendements économiques et environnementaux avec les technologies impliquant la digestion anaérobie. Or, les mécanismes fondamentaux du mDIET demeurent peu connus (82). Plusieurs suggèrent l'exploitation du mDIET dans des BES, mais les connaissances sont encore trop menues pour en permettre le développement.

Présentation de la thèse

Cette thèse est présentée sous forme d'articles scientifiques. Elle est divisée en trois chapitres, conformément aux modalités et règles de présentation des mémoires et thèses de l'Université de Montréal. Le premier chapitre présente l'article 2, qui traite essentiellement de l'étude du DIET dans le granule anaérobie exempt de *Geobacter*. Le deuxième chapitre présente l'article 3 et se concentre sur l'étude du EPS du granule. Le troisième et dernier chapitre étudie le mDIET avec les populations du granule, exemptes de *Geobacter*, à l'aide d'un petit réacteur conçu pour cet objectif spécifiquement. Ce dernier chapitre n'est pas écrit sous forme d'article. Finalement, une conclusion générale, où sont discutés et intégrés les résultats, vient jeter une perspective globale de cette étude sur le DIET. Des avenues de recherche futures y sont également proposées afin de répondre à des questions spécifiques soulevées en cours d'analyse.

Chapitre 1 :

Activité Éthanol-à-méthane de granules anaérobies dépourvus de *Geobacter*, renforcée par des microparticules conductrices

Mise en contexte de l'article 2

L'article 2 est présenté ici en tant que premier chapitre de la thèse. Le premier objectif de cet article était de vérifier si le granule anaérobie, en l'absence d'espèces de la famille Geobacteraceae, présente le même schéma d'activité méthanogène lors de la consommation d'éthanol que celui démontré par le granule à dominante de Geobacteraceae. Le deuxième objectif était d'évaluer les capacités pour les populations privées de *Geobacter* d'effectuer le mDIET. Cet article a été publié dans le journal *Process Biochemistry* en 2017. Cet article est le résultat de l'initiative de l'étudiant et a été rédigé avec Serge R. Guiot (Ph.D.).

Article 2 :

Ethanol-to-methane activity of *Geobacter*-deprived anaerobic granules enhanced by conductive microparticles

Charles-David Dubé¹ and Serge R. Guiot^{1,2}

¹ Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Canada

charles-david.dube@cnrc-nrc.gc.ca

² Bioengineering Group, Energy, Mining and Environment, National Research Council Canada, Montreal, Canada. NRC paper No. 55668.

serge.guiot@cnrc-nrc.gc.ca

Référence: Dubé CD, Guiot SR. Ethanol-to-methane activity of *Geobacter*-deprived anaerobic granules enhanced by conductive microparticles. *Process Biochemistry*. 2017;63:42-8.

Résumé

Le DIET a été typiquement proposé comme mécanisme de transfert d'électron entre les populations méthanogènes dans les granules pendant la digestion anaérobie où les espèces de *Geobacter* jouent un rôle clé. En utilisant des granules anaérobies où les membres de Geobacteraceae n'étaient pas dominants, représentant seulement 0,3% des bactéries totales, les tests réalisés avec deux co-substrats ont montré que les activités méthanogènes du formate et de l'hydrogène diminuaient en présence d'un co-substrat non méthanogène tel que éthanol. Cela pourrait indiquer que le bDIET se produit et entre en compétition avec l'hydrogène et le formate. De plus, l'addition de microparticules conductrices, telles que l'acier inoxydable et le GAC, augmente l'activité méthanogène dans les granules désintégrés de $190 \pm 15\%$ et de $175 \pm 20\%$ respectivement par rapport aux granules désintégrés dépourvus de microparticules. L'ajout de microparticules non conductrices telles que la porcelaine a cependant diminué l'activité méthanogène de $65 \pm 4\%$ des granules désintégrés dépourvus de microparticules. Ces résultats indiquent que les bactéries syntrophes provenant des boues anaérobies, excluant les espèces de *Geobacter*, peuvent également effectuer le mDIET.

Abstract

Direct interspecies electron transfer (DIET) has been typically proposed as mechanism of electron transfer among methanogenic populations in granules during anaerobic digestion where *Geobacter* species play a key role. Using anaerobic granules where Geobacteraceae members were not prevalent - representing only 0.3% of total bacteria -, tests incubated with two co-substrates showed that the rate of methanogenesis from formate and hydrogen diminished in the presence of a non-methanogenic co-substrate such as ethanol. This could indicate that biological DIET occurs and competes with hydrogen and formate during methanogenesis. Moreover, the addition of conductive microparticles, such as stainless steel and granular activated carbon, was found to increase methanogenic activity in disintegrated granules by $190\pm 15\%$ and $175\pm 20\%$ respectively as compared to disintegrated granules devoid of microparticles. The addition of non-conductive microparticles such as porcelain however decreased methanogenic activity by $65\pm 4\%$ of the disrupted granules without microparticle activity. These results indicate that syntrophic bacteria from anaerobic sludge excluding *Geobacter* species can also carry out conductive mineral mediated DIET.

Keywords

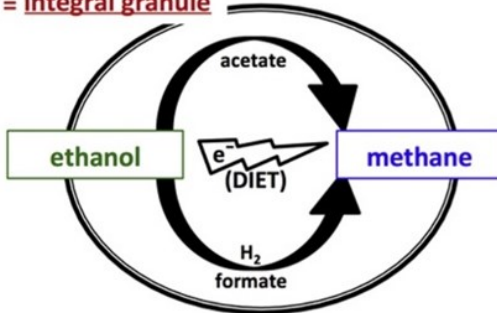
Interspecies electron transfer, DIET, Anaerobic granular sludge, Ethanol, Methane-producing activity, Substrate-consuming activity

Highlights

- The studied anaerobic granules are almost devoid of *Geobacter*.
- Methanogenic activity from formate and H₂ diminishes in the presence of ethanol.
- Conductive particles restore methanogenic activity loss due to granule disruption.
- *Geobacter*-deprived granules might be able of biologically-mediated DIET.

Graphical abstract

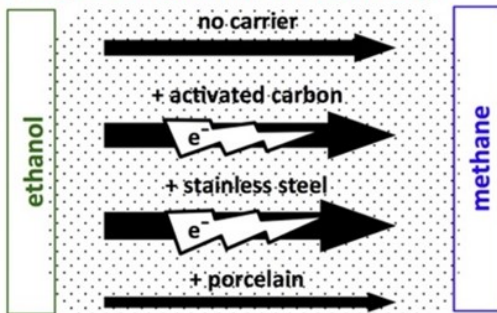
Geobacter-free anaerobic sludge ≡
≡ **integral granule**



Specific methanogenic activity



≡ **suspension (disintegrated granule)**



Introduction

Anaerobic digestion is a process by which microorganisms break down organic matter through a series of reactions in the absence of oxygen ultimately yielding CH₄ and CO₂. This process has found extensive application in the area of waste and wastewater treatment. However, despite the widespread use of anaerobic digesters, the dynamics of the microbial communities remain poorly understood (83). At the final stage of the process, methanogenic archaea achieve the dismutation of acetate into methane and CO₂ and the reduction of CO₂ into methane using the reducing equivalents from the upstream degradation of the organic matter. The latter reaction depends on interspecies electron transfer (IET) mechanisms, which implies electron-transfer molecules such as hydrogen and formate, or possibly the direct use of reducing equivalents, known as direct interspecies electron transfer (DIET).

DIET was first demonstrated during methanogenesis when *Methanosarcina barkeri* and *Methanosaeta harundinacea* were each found to stoichiometrically yield methane by using the four reducing-equivalent byproducts of ethanol oxidation by *Geobacter metallireducens* (Table 1, reactions 3, 10 and 13) (32, 57). *Geobacter* was then assumed to export electrons via its electrical appendages, considered as a biologically mediated DIET (bDIET) (78). Thereafter, *M. barkeri* and *M. harundinacea* both coupled with *Geobacter* were proven able to carry out bDIET during propanol and butanol oxidation into propionate and butyrate, respectively (84). Thus far, few studies offering evidence of bDIET in mixed microbial communities have been reported. It was first suggested in ethanol fed anaerobic granules, which produced methane faster than formate or hydrogen plus acetate fed granules (72). The granules used in the latter study came from a brewery wastewater treatment plant (WWTP) and contained a high predominance of Geobacteraceae members (up to 30% of all bacterial populations). Species of the Geobacteraceae family have been reported as being electrogenic, due to their ability to use electrodes as electron acceptors for anaerobic respiration (85). Moreover, the presence of *Geobacter* species in granules is moderately correlated with granule conductivity (73). Anaerobic granules treating other wastewaters may contain very few Geobacteraceae members, if any. However, electrogenic bacteria are known to be widespread in the phylogenetic tree of bacteria (3, 80) and many more species than those in the Geobacteraceae family are able to externally donate electrons.

Table 1 : Reactions potentially involved in the transformation of ethanol into methane

Ethanol acetogenesis	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	(1)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 3 \text{H}^+ + 2 \text{HCOO}^-$	(2)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 5 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$	(3)
Formate acetogenesis	
$4 \text{HCOO}^- + 3 \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{CO}_2$	(4)
Syntrophic formate/acetate oxidation coupled to H_2 -driven methanogenesis	
$\text{HCOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$	(5)
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2$	(6)
Syntrophic acetate oxidation coupled to formate-driven methanogenesis [7]	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{CO}_2 \rightarrow 4 \text{HCOO}^- + 3 \text{H}^+$	(7)
Carbon dioxide reduction into acetate (homoacetogenesis) or formate	
$2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	(8)
$\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{HCOO}^- + \text{H}^+$	(9)
Methanogenesis	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	(10)
$4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	(11)
$4 \text{HCOO}^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O} + 3 \text{CO}_2$	(12)
$\text{CO}_2 + 8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	(13)
Many combinations of 3 or 4 reactions above lead to the transformation of ethanol into methane, such as: (1), (10) and (11); (2), (10) and (12); (3), (10) and (13); (1), (6) and (11); (1), (8) and (10); (1), (7), (11) and (12); (1), (9), (10) and (12); (2), (5), (6) and (11); (2), (4), (6) and (11); (3), (6), (11) and (13); (3), (7), (12) and (13), all of which result in the following net reaction:	
$2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	(14)

[7] = (86)

Other studies have focused on added materials, which can enhance methane-producing specific activities (MPA), performing conductive mineral-mediated DIET (mDIET) (78). Granular activated carbon (GAC), biochar, carbon cloth, magnetite, hematite, graphite and minerals such as iron ions have all been reported to stimulate DIET in several anaerobic niches (58, 74-76, 87-90). In a co-culture study, it was shown that GAC could replace pili to allow DIET with a pilin-deficient *Geobacter* strain (57). While these results demonstrate mDIET, they do not provide clear enough evidence that microbial communities *de facto* use bDIET in natural

environments, but only bring out their capacity of doing it. In fact, attempts to promote DIET using those conductive minerals in larger digesters did not yield the improvements expected (91). Moreover, low *Geobacter* populations have already been found in anaerobic digesters supplemented with GAC particles, suggesting that there might be other microbes participating in the DIET (92).

Hence the first objective of this study was to verify whether granules in the absence of Geobacteraceae species would present the same methanogenic pattern of activity on ethanol than that used by Geobacteraceae-dominated granules (72). In order to do this, MPAs and substrate-consuming specific activities (SCA), that represent the maximum rate observed for methane production or substrate uptake, respectively, in non-limiting conditions, were evaluated when ethanol was used as a substrate. The second objective was to evaluate the mDIET capacities in *Geobacter*-deprived populations. Specific activities of the *Geobacter*-free granules, after disintegration, were compared in the presence of conductive and non-conductive microparticles to verify if they can restore IET efficiency lost during disintegration. Porosity and surface area of materials were also evaluated to underline the impact of conductivity itself on results rather than other factors that could also impact the IET efficiency.

Materials and methods

Sludge preparation

Anaerobic granular sludge was taken from a full-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) digester treating fruit processing wastewater (Lassonde Inc., Rougemont, QC, Canada; 45°25'52.71" N, 73°03'12.15" W). It was stored at 4°C until the experiments were carried out. Prior to the tests, the granular sludge was rinsed three times with an equal volume of carbonate buffer (g/L) (NaHCO₃ 10; NH₄Cl 0.5; KH₂PO₄ 0.3; K₂HPO₄ 0.4; pH 7.0) (93) to remove unattached biomass and debris. For assays using cells from disintegrated granules, 15 mL of carbonate buffer was added to 15 g of dewatered, rinsed granular sludge and then sonicated (Sonics Vibra Cell VC130; probe CV18 3987, S&M 0204) for 8 min (with a 2 min sonication break every 2 min) to completely disrupt granules. The sonication was done at 30W (1 W/mL)

in an ice bath to prevent overheating. The resulting sludge was then centrifuged and the pellet was re-suspended with carbonate buffer for specific activity tests, as described below. The supernatant was tested for D-glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) as an indicator of cell lysis (94) and all samples were tested negative. Carbonate buffer was bubbled with nitrogen to remove oxygen prior utilisation.

Microparticles and proteins amendment

Pro-Pak made of stainless steel (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, #Z210552), 4x8 mesh (2.36 mm to 4.75 mm) GAC (Sigma #C2764) and porcelain microparticles were used in bottles as highly conductive, conductive and non-conductive microparticles respectively. Porcelain saddles (Sigma #Z169013) were broken down into smaller pieces and screened using a 4x8 mesh sieve to be the same size of GAC. All microparticles were dried overnight at 105°C and kept in a desiccator. After being weighed, they were autoclaved before proceeding with activity tests. Cytochrome C (Sigma-Aldrich #C2506) and bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich #A7906) were used as conductive and non-conductive soluble proteins respectively.

Activity tests

Acetate (20 mM), ethanol (13.3 mM), hydrogen (80 mM) or formate (80 mM) was added in the test bottle such as to nominally produce 10 mL of methane (0.45 mmol) when entirely consumed. This initial amount did not limit the reaction as for each substrate the time course curve remains linear long enough before the substrate depletion decelerates the reaction. The slope of the linear part of the curve is used as the maximum consumption or production rate, which, reported to the microbial biomass added, gives the specific activity (mmol/g VSS·d). The bottle headspace was adjusted to 1 atm of N₂/CO₂ (4:1) at the start of the test. For hydrogen tests, headspace was adjusted to 3 atm of H₂/CO₂ (4:1) in the bottles so to nominally form 10 mL of methane also. For tests with co-substrates, the same volume of substrate (or gas for hydrogen) was added such that 20 mL of methane could be nominally produced per bottle. 60 mL bottles were then incubated at 35°C and shaken at 400 rpm to promote the hydrogen gas mass transfer in liquid (95). No volatile fatty acid, formate or hydrogen was detected in the assays, except the production of acetate during ethanol oxidation, and pH was stable over time.

For assays with microparticles, cells from disintegrated granules were used with 50 g/L of microparticles and bottles were incubated at 100 rpm to promote cell contact with the materials added. For the experiments with cytochrome c and BSA amendments, 1.2 g/L of protein was used in each case. All tests were done in triplicate and completed within 24 h.

Analytical methods

The suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) were determined according to Standard Methods standard (96). Acetate and ethanol were measured on a gas chromatograph (Model 6890, Agilent, Wilmington, DE) equipped with a flame ionization detector (FID) as described elsewhere (97). Formate was monitored using a high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Waters Corp., Milford, MA) equipped with a refractive index detector (Waters model 2414) connected to a photodiode array (PDA) detector (Waters model 2996) as described elsewhere (97). Gas sample (0.3 mL) was taken with a model 1750 gas-tight syringe (Hamilton, Reno, NV) and analyzed for H₂ and CH₄ by gas chromatography (GC). The GC was an HP 6890 gas chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) coupled to a thermal conductivity detector (TCD) as described elsewhere (98).

Scanning electron microscopy (SEM)

Microparticles were harvested at the end of each experiment (24 h). They were fixed, dehydrated in a CPD 030 apparatus (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using the critical point drying method, coated with a thin layer of Au-Pd and analysed with a S-4700 Hitachi FE-SEM (Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 10 kV as described elsewhere (97).

DNA extraction and PCR

Total genomic DNA was extracted from samples using the PowerSoil™ DNA isolation kit (MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. For experiment with carriers, a representative sample including suspended and attached cells (carrier pieces) was taken in the bottles at the end the incubation. Bacterial 16S rRNA genes were amplified using the set of primers F343 (5' TACGGRAGGCAGCAG 3') and R533 (5' ATTACCGCGGCTGCTGGC 3') (99). Archaeal 16S rRNA genes were amplified using the set

of primers 958arcF (5' AATTGGANTCAACGCCGG 3') and an equimolar mix of 1048arcR-major (5' CGRCGGCCATGCACCWC 3') and 1048arcR-minor (5' CGRCRGCCATGYACCWC 3') (100). A sample-specific multiplex identifier was added to each forward primer and an Ion Torrent (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) adapter was added to each primer. Details for amplification reactions can be found elsewhere (101).

Microbial community analysis by high-throughput sequencing (HTS)

The polymerase chain reaction (PCR) products were purified and quantified using respectively a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) and a Quant-iT PicoGreen double-stranded DNA quantitation kit (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Bacterial and archaeal 16S rRNA gene amplicons were then sequenced using the Ion Torrent sequencing platform with a 314 chip according to the manufacturer's instructions. For sequencing analysis, bacterial and archaeal 16S rRNA gene sequences generated were analyzed using the RDP classifier (102), with a bootstrap confidence cutoff of 50%, as recommended by RDP classifier for short sequences (less than 250 bp) (103). Sequences that were shorter than 75 bp and sequences with unidentified bases (N) were removed from the analysis.

Results and discussion

The bacterial and archaeal families sequenced in the granular sludge from the fruit juice factory WWTP that was used in this study are shown in Table 2. Propionibacteriaceae family represents the main bacterial population identified. This group of the Actinobacteria phylum mainly consumes carbohydrates to produce propionic acid. On the archaeal side, the main family detected was the Methanoregulaceae, which consume either hydrogen or formate to produce methane. Acetoclastic methanogens were represented mainly with the Methanosaetaceae family. Geobacteraceae members were also almost absent representing 0.3% of the total bacterial families identified, which is far from the brewery granules where DIET was recently studied (72).

Table 2 : High-throughput sequencing based relative abundance of bacterial and archaeal families identified in both whole and disintegrated granules at inoculation and after the incubations on ethanol with and without carriers.

Table 2
High-throughput sequencing (HTS)-based relative abundance of bacterial and archaeal families identified in both whole and disintegrated granules at inoculation and after the incubations on ethanol with and without carriers.

Family	Before inoculation		After incubation				
	Granules	Disintegrated granules	Granules	Disintegrated granules			
				No carrier	GAC	ProPak (stainless steel)	Porcelain
Bacterial domain							
<i>Propionibacteriaceae</i>	32.9%	40.2%	24.7%	5.7%	7.1%	2.7%	2.8%
<i>Thermodesulfobivibrionaceae</i>	10.8%	29.5%	19.0%	1.9%	2.4%	1.7%	1.9%
<i>Spirochaetaceae</i>	5.4%	0.3%	4.7%	0.2%	0.4%	0.4%	0.2%
<i>Rikenellaceae</i>	3.9%	0.5%	3.7%	0.1%	0.2%	0.1%	2.3%
<i>Nocardioidaceae</i>	3.0%	4.2%	2.7%	0.8%	0.6%	0.5%	0.5%
<i>Ruminococcaceae</i>	2.1%	0.7%	1.5%	1.6%	3.9%	1.5%	1.9%
<i>Synergistaceae</i>	1.9%	0.7%	1.9%	0.4%	3.1%	0.4%	0.5%
<i>Christensenellaceae</i>	1.7%	0.6%	1.6%	0.8%	0.2%	0.6%	1.2%
<i>Syntrophaceae</i>	1.4%	0.5%	1.4%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
<i>Porphyromonadaceae</i>	1.4%	0.6%	1.4%	15.1%	13.0%	30.6%	29.1%
<i>Clostridiaceae</i>	1.1%	0.2%	0.8%	7.7%	14.9%	6.8%	15.9%
<i>Desulfomicrobiaceae</i>	1.0%	2.7%	1.4%	0.1%	0.3%	0.1%	0.2%
<i>Brachyspiraceae</i>	0.8%	0.1%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Anaerolinaceae</i>	0.7%	0.2%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Thermotogaceae</i>	0.6%	0.1%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Syntrophobacteraceae</i>	0.6%	0.8%	0.7%	0.1%	2.3%	0.1%	0.2%
<i>Actinomycetaceae</i>	0.6%	2.4%	0.4%	0.2%	0.2%	0.1%	0.3%
<i>Rhodocyclaceae</i>	0.4%	0.1%	1.9%	3.9%	2.1%	1.7%	0.2%
<i>Desulfobalobiaceae</i>	0.3%	0.3%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
<i>Sphaerochaetaceae</i>	0.3%	0.0%	0.3%	0.0%	1.2%	0.0%	0.0%
<i>Campylobacteraceae</i>	0.3%	0.1%	0.4%	0.1%	0.0%	0.1%	0.2%
<i>Geobacteraceae</i>	0.3%	0.8%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Intrasporangiaaceae</i>	0.2%	0.4%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Syntrophorhabdaceae</i>	0.2%	0.6%	0.2%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0.2%	0.6%	0.4%	18.2%	4.7%	11.9%	13.1%
<i>Veillonellaceae</i>	0.2%	0.1%	1.3%	0.6%	9.7%	6.0%	6.0%
<i>Mogibacteriaceae</i>	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%	24.3%	2.9%	0.2%
<i>Tissierellaceae</i>	0.2%	0.0%	0.2%	3.7%	0.3%	4.9%	2.1%
<i>Pseudomonadaceae</i>	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%
<i>Alcaligenaceae</i>	0.1%	0.1%	0.2%	1.2%	0.0%	0.1%	0.5%
<i>Peptococcaceae</i>	0.1%	0.1%	0.1%	0.7%	0.3%	0.9%	1.9%
<i>Eubacteriaceae</i>	0.1%	0.0%	0.0%	0.6%	0.7%	0.1%	0.1%
<i>Gracilibacteraceae</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.6%	0.5%
<i>Lachnospiraceae</i>	0.0%	0.0%	0.1%	2.1%	0.1%	2.3%	3.0%
<i>Bacteroidaceae</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.3%	0.8%
<i>Yaniellaceae</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%	0.1%	0.1%
<i>Bacillaceae</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.5%	0.3%	0.3%
Other or unknown	26.7%	12.1%	26.4%	23.0%	13.9%	18.4%	13.7%
Archaeal domain							
<i>Methanoregulaceae</i>	25.2%	5.7%	27.0%	3.9%	3.7%	5.4%	2.7%
<i>Methanosaeataceae</i>	17.8%	15.5%	16.9%	20.4%	21.6%	18.9%	19.9%
<i>Methanobacteriaceae</i>	16.5%	51.5%	17.6%	41.9%	40.8%	47.3%	41.5%
<i>Methanomassiliococcaceae</i>	4.3%	0.5%	3.0%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%
<i>Methanosarcinaceae</i>	0.4%	0.4%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.2%
<i>Methanospirillaceae</i>	0.4%	0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.3%
Unknow from <i>Methanomicrobia</i> class	28.3%	23.6%	28.6%	31.5%	31.9%	26.0%	34.0%
Other or unknown	7.1%	2.6%	6.4%	1.6%	1.4%	1.8%	1.3%

Table 3 shows the MPAs and SCAs of granular sludge on a range of simple substrates, such as ethanol, acetate, formate and hydrogen, alone or coupled. As displayed in Table 4, those substrates all can be directly used by methanogens, including ethanol by the *Methanogenium* genus. However, no *Methanogenium* species were detected in this study's sludge (Table 2). Moreover, in the assays with ethanol as the single substrate, delays were observed before the production of methane even if the substrate was consumed, while at the end of each test, the

actual methane yield attained the stoichiometric ratio. This indicates there was production of intermediates before the final step toward methane. Ethanol is thus considered here as a substrate that necessitates interspecies electron transfer, possibly including DIET.

Table 3 : Specific substrate consumption and methane production activities of granular sludge on a variety of substrates, alone or coupled

Substrate	Co-substrate	Specific Activity	
		Substrate consumption	CH ₄ production
		mmol substrate/gVSS-d	mmol CH ₄ /gVSS-d
Ethanol	–	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.3
	Acetate	5.2 ± 0.1	6.2 ± 0.7
	Formate	1.9 ± 0.1 ^{**}	9.4 ± 0.4 ^{**}
	Hydrogen	3.1 ± 0.3 ^{**}	5.8 ± 0.3
Acetate	–	2.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3
	Ethanol	-3.9 ± 0.2 ^{a**}	6.2 ± 0.7 [*]
	Formate	2.3 ± 0.0	14.9 ± 1.8 ^{**}
	Hydrogen	0.8 ± 0.7 ^{**}	7.2 ± 0.4 ^{**}
Formate	–	32.0 ± 0.6	11.9 ± 0.2
	Acetate	32.3 ± 1.8	14.9 ± 1.8 [*]
	Ethanol	29.6 ± 1.7	9.4 ± 0.4 ^{**}
	Hydrogen	32.0 ± 2.6	12.9 ± 1.0
Hydrogen	–	57.3 ± 3.4	7.7 ± 0.8
	Acetate	31.1 ± 3.5 ^{**}	7.2 ± 0.4
	Ethanol	41.4 ± 3.5 ^{**}	5.8 ± 0.3 [*]
	Formate	30.4 ± 4.5 ^{**}	12.9 ± 1.0 ^{**}

Activity on a substrate in presence of co-substrate is significantly different from the activity on the substrate alone at a 0.05 level (^{*}) or at a 0.01 level (^{**}).

^a Negative sign means production instead of consumption.

Table 4 : Substrates consumed by the various methanogenic orders*

Methanogenic order	Substrate consumed
<i>Methanosarcinales</i>	Acetate H ₂ + CO ₂ ^a e ⁻ + H ⁺ + CO ₂ ^b
<i>Methanomicrobiales</i>	Formate H ₂ + CO ₂ Ethanol ^c
<i>Methanobacteriales, Methanococcales, Methanocellales</i>	Formate H ₂ + CO ₂
<i>Methanopyrales</i>	H ₂ + CO ₂

^a Except *Methanosaetaceae*.

^b Only *Methanosaeta harundinacea* and *Methanosarcina barkeri* (to date).

^c Only *Methanogenium*.

*(32, 57, 104)

For all substrates, their consumption rate was never stimulated by the presence of co-substrates. In contrast, negative impacts of the co-substrates were observed on most SCAs. For instance, the hydrogen SCA decreased when coupled with any other co-substrate. The ethanol SCA activity did not decrease in the presence of acetate, but did so in the presence of formate or hydrogen, as expected since ethanol oxidation is thermodynamically restrained by the hydrogen partial pressure or formate concentration (105). The acetate SCA became negative (i.e. an accumulation of acetate occurred) when ethanol was present as expected given that acetate is the ethanol oxidation product and that the SCA was higher for ethanol than for acetate. Acetate SCA was not reduced by formate, but by hydrogen. This is consistent with reports that hydrogen inhibits the acetate catabolism in *Methanosarcina* genera (59, 106, 107).

The methane production rate from ethanol by anaerobic granules was previously found to be higher than the combined methane production rates from hydrogen and acetate or from formate and acetate (72). This earlier study used a granular sludge from a brewery digester, which was rich in Geobacteraceae members, which are well known as candidates to achieve bDIET and represent a large proportion of most electrogenic biofilms (108). Since the consortium could use ethanol to produce methane in a faster way than its intermediates, it was suggested that there was an IET pathway other than those implicating electron-transfer

molecules, presumably a pathway involving DIET. However, in the present study, anaerobic granules where Geobacteraceae species were detected as only 0.3% of total bacteria behaved differently. The combined MPA from hydrogen and acetate (Table 1, reactions 10 and 11) (i.e. the sum of the activities obtained separately within single substrate incubation) totaled 12.1 mmol-CH₄/g VSS·d, while a similar combination for formate and acetate (Table 1, reactions 10 and 12) yielded 16.3 mmol-CH₄/g VSS·d. Those values represent the maximum rate that could be expected for the production of methane from ethanol. Both values significantly exceeded the corresponding MPA with ethanol alone i.e. 5.2 mmol-CH₄/g VSS·d (Table 1, reaction 14). Other values in Table 3 are the activities for each of the same substrates in presence of another one as a co-substrate in the same bottle. The MPAs on hydrogen or formate in the presence of acetate amounted to 7.2 and 14.9 mmol-CH₄/g VSS·d, respectively. Even though these MPAs were lower than the combined (or maximum) MPA values, since the intermediates in a co-incubation can compete against each other, they were still exceeding the MPA from ethanol alone. Therefore, we could not conclude that a faster IET than the one using electron-transfer molecules such as formate or/and H₂, was operative during the oxidation of ethanol with such granules poor in Geobacteraceae members.

The addition of a co-substrate always increased the MPA as compared to the MPA of the single substrate alone, as expected, except for ethanol. The MPAs from hydrogen or formate decreased, in presence of ethanol as co-substrate (Table 3). This MPA reduction was not caused by toxicity, since ethanol does not inhibit methanogenic bacteria in anaerobic sludge at concentrations as used here (109). This decrease in MPA could not be caused either by competition of the acetate produced during the ethanol oxidation, since the acetate used as a co-substrate did not reduce either the hydrogen or formate MPAs. One explanatory hypothesis would be that ethanol is processed through DIET. The electrons resulting from ethanol oxidation would then be directly captured by membrane-bound hydrogenases of the electrotrophic methanogens to reduce the co-factors implied in methanogenesis, such as ferredoxin or F₄₂₀, also used during hydrogen and formate methanogenesis. This might be a preferential pathway, competing out the H₂ or formate pathways, for a reason still to specify, and explaining a decrease of the methanogenesis rate, essentially controlled then by the ethanol oxidation rate, which is lower than the H₂ or formate consumption potential. This is consistent with the fact that the

MPA on the ethanol and H₂ mix is similar to the MPA on ethanol alone, although it should be larger, since the SCA for H₂ when either alone or with a co-substrate is 3 to 5 times larger than the production of H₂ (or reducing equivalents) from ethanol alone, which was ~ 11 mmol H₂/g VSS.d (2 times the ethanol SCA) (Table 3). It is as if the CO₂-reducing methanogenesis was preferentially driven by directly transferred electrons, even though molecular H₂ was present.

To further investigate the question whether DIET could occur in *Geobacter*-deprived granules, specific activities of disintegrated granules with and without electrically conductive and non-conductive microparticles were compared to each other. Three materials were tested: GAC (conductive), stainless steel (ProPak) (highly conductive) and porcelain (non-conductive). GAC is known to help methanogenesis during digester start-up or recovery (75, 90). GAC provides a large specific surface area for biofilm development, just like porcelain, while ProPak offers the greatest conductivity but a lower specific surface area for colonisation.

Methanogenic granules present also a particular layered architecture, which promotes the physical proximity between syntrophic cells and facilitates IET (15, 28, 30, 110). Their architecture could also promote bDIET provided there is an enabling environment for the establishment of a pili/cytochromes network, as previously seen in granules formed with *Geobacter* species (33). Consequently, any disruption of such a structure should result in a reduced MPA, and in most cases, reduced SCAs also (111). As shown in Tables 3 and 5, MPA and ethanol SCA with cells from disintegrated granules clearly confirmed the negative effect of granules disruption. The disintegration of the granules resulted in a decrease of the ethanol SCA and MPA at 41% and 38%, respectively, of those of the integral granular sludge. When incubated with ProPak and GAC, the cells from disintegrated granules had a higher MPA, reaching 190±15% and 175±20% of the MPA obtained with disintegrated granules without microparticles, respectively. When porcelain (non-conductive) microparticles were added, the MPA was reduced at 65±4% of the control without microparticles. Thus, the conductivity of the microparticles added to cells from disintegrated granules seems instrumental and suggests the occurrence of conductive mineral-mediated DIET. This DIET implementation could not be due to a *Geobacter* population expansion. As shown in Table 2, *Geobacteraceae* family members declined, even became untraceable, when incubated with any carriers.

The granules extracellular matrix constitutes a space for biological conductive materials (nanowires, cytochromes) but also for shuttle molecules (humic substances, flavins and sulphur compounds) to surround cells and facilitate DIET. The addition of cytochrome C, as a soluble conductive protein, instead of solid microparticles, did not restore the original ethanol SCA and MPA of disintegrated sludge, even though these activities were slightly higher than those obtained in the presence of non-conductive proteins (e.g. BSA), used as a control (Table 5). It is possible that the soluble state of the cytochrome limited its role for DIET as compared to when attached to extracellular polymeric substances (EPS), as mentioned in the literature (33). Performance of microbial fuel cells using pili-mediated electron transfer to the anode greatly surpassed those using soluble electron shuttles (112). The solid state of the electron carrier could be essential for the reaction rate, highlighting the importance of non-soluble EPS in granular sludge. However, no cytochromes were detected via liquid chromatography mass spectrometry analysis in the soluble EPS fraction of the sludge used in this study.

Table 5 : Specific activities of both ethanol consumption (SCA) and methane production (MPA) obtained with disintegrated granules without and with conductive and non-conductive microparticles or proteins

Biomass	Ethanol SCA		MPA	
	mmol/ gVSS·d	% relative to disintegrated granules	mmol/ gVSS·d	% relative to disintegrated granules
Disintegrated granules	2.2 ± 0.1	100	2.0 ± 0.1	100
Disintegrated granules with				
GAC	5.4 ± 0.4	245 ± 21	3.5 ± 0.4	175 ± 22
ProPak (stainless steel)	2.1 ± 0.3	95 ± 14	3.8 ± 0.3	190 ± 18
Porcelain	2.1 ± 0.4	95 ± 19	1.3 ± 0.0	65 ± 3
Cytochrome C	1.0 ± 0.0	45 ± 2	1.7 ± 0.1	85 ± 7
Bovine serum albumin (BSA)	0.4 ± 0.1	18 ± 5	1.4 ± 0.2	70 ± 11

Scanning electron microscopy (SEM) clearly showed that GAC and porcelain microparticles were colonized to a greater extent than the stainless steel microparticles by the end of assay. By contrast, SEM showed that ProPak was ineffective for cell colonisation, where most cells observed were still separated (Figure 3). This was expected since the former ones presented a higher porosity and ruggedness than the stainless steel. The porosity and ruggedness of non-conductive microparticles (e.g. porcelain) facilitated cells from disintegrated anaerobic granules to reform a biofilm without the methanogenic activity to be recovered as compared to that of whole original granules. On the contrary, cells in the presence of non-porous but highly conductive microparticles (e.g. ProPak) did recover a significant level of the whole granule activity without reformation of biofilm. This suggests that anaerobic granule architecture facilitates IET not only because of the reduced distance of diffusion for the electron-transfer molecules, but also because they provide an enabling matrix for DIET.

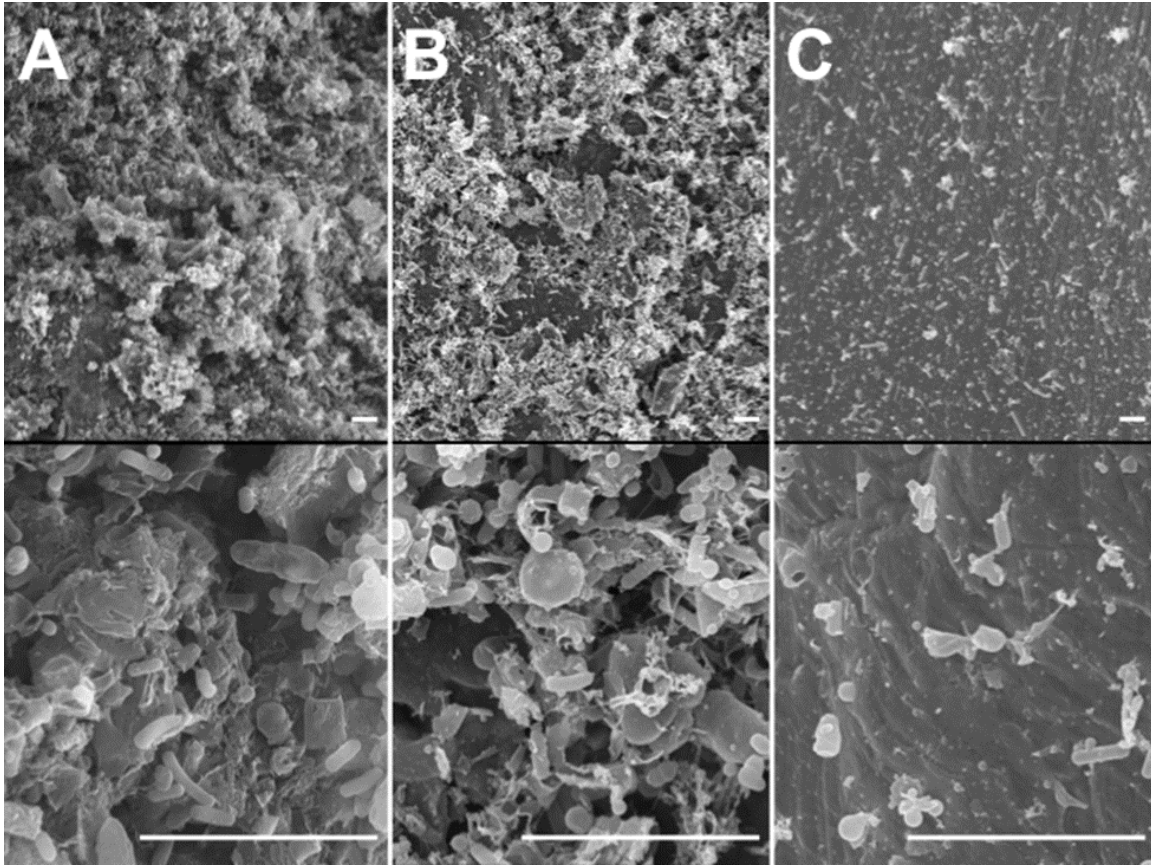


Figure 3 : Scanning electron microscope images of colonized microparticles GAC (A), porcelain (B), and ProPak (C) at the end of the assays. Magnification: top, 1000X; bottom, 10,000X. Bar = 5 μm .

Conclusions

Little is known about bDIET occurrence in natural mixed anaerobic populations. As such, to gain a deeper insight into this electron transfer behavior in natural populations, substrate consumption and methane production rates in anaerobic granules were examined with different electron donor substrates. Although some pathways could be linked to the DIET process, more powerful investigative techniques are required in order to adequately validate the existence and activity of bDIET in anaerobic granules, which is quite challenging. However it was shown here that granules almost devoid of *Geobacter* species are also able to use conductive mineral

material to perform an assisted DIET and restore MPA loses following disintegration of the granule.

Acknowledgments

We thank R. Cimpoaia, M.-F. Manuel and P. Mehta for discussions and manuscript proofreading. We acknowledge the support of A. Corriveau and S. Deschamps for the analytical chemistry, and of G. Bruant and M.-J. Lévesque, for the DNA sequencing. This work was partly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant 185778-2009). This publication is recorded as NRC-EME-55866.

Chapitre 2 :

Caractérisation de la fraction protéinique des EPS de trois boues granulaires anaérobies

Mise en contexte de l'article 3

L'article 3 est présenté ici en tant que second chapitre de la thèse. L'objectif ultime de cette étude était d'identifier des protéines provenant des EPS, ainsi que les espèces qui les produisent, qui sont en lien avec le bDIET. Or, pour faire suite à l'obtention de résultats mitigés, l'article a pris une tangente un peu différente pour permettre tout de même la publication des données obtenues. Le premier objectif de cet article fut donc de caractériser les populations des granules de trois boues granulaires anaérobies traitant différents effluents industriels afin d'identifier les espèces omniprésentes et celles plus spécifiques à chaque type de granule. Le second objectif fut d'identifier les protéines issues des EPS extraites de ces granules afin d'identifier les principales espèces microbiennes qui les produisent et de mieux comprendre les rôles que les EPS et ces espèces peuvent jouer dans les granules anaérobies. Cet article a été soumis au journal *Water Research* en 2018. Cet article est le résultat de l'initiative de l'étudiant et a été rédigé avec Serge R. Guiot (Ph.D.). L'objectif ultime, mentionné ci-dessus, sera abordé davantage dans la conclusion de la thèse.

Article 3 :

Characterization of the protein fraction of the extracellular polymeric substances of three anaerobic granular sludges

Charles-David Dubé¹ and Serge R. Guiot^{1,2}

¹ Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Canada

charles-david.dube@cnrc-nrc.gc.ca

² Bioengineering Group, Energy, Mining and Environment, National Research Council Canada, Montreal, Canada. NRC paper No. 55668.

serge.guiot@cnrc-nrc.gc.ca

Manuscript number : WR44278

Résumé

Les EPS jouent un rôle majeur dans la réussite des biofilms tels que les granules anaérobies, allant de la stabilité structurelle à des fonctions beaucoup plus spécifiques. Les EPS de trois boues anaérobies granulaires d'origine différente ont été étudiées et comparées. Plus en détail, les peptides de la fraction protéique ont été identifiés en spectrométrie de masse. Les genres bactériens *Desulfoglaeba* et *Treponema* et les genres archaeal *Methanosaeta* et *Methanobacterium* étaient prédominants dans les trois boues. Les protéines de *Methanosaeta concilii* étaient les mieux représentées dans les EPS de l'ensemble des trois boues étudiées, soulignant son rôle dans la formation et la maintenance des granules de celles-ci. Quatre protéines retrouvées dans les trois boues, soit la protéine *S-Layer*, l'acétyl-CoA synthase CO-méthylante, une protéine de liaison au substrat transporteur ABC et la méthyl-coenzyme M réductase, sont exprimées par *Methanosaeta concilii*. Principalement des enzymes cataboliques ont été retrouvées parmi les 45 protéines identifiées dans la fraction protéique des EPS, indiquant qu'elles auraient un rôle important à jouer dans les réactions cataboliques extracellulaires.

Abstract

Extracellular polymeric substances (EPS) play major roles in the efficacy of biofilms such as anaerobic granules, ranging from structural stability to more specific functions. The EPS of three granular anaerobic sludges of different origin were studied and compared. Particularly, the peptides from the protein fraction were identified by mass spectrometry. *Desulfoglaeba* and *Treponema* bacterial genera and *Methanosaeta* and *Methanobacterium* archaeal genera were prominent in all the three sludges. *Methanosaeta concilii* proteins were the most represented in EPS of all the three sludges studied, highlighting its role in EPS formation and maintenance. Principally, four proteins found in the three sludges, the S-layer protein, the CO-methylating acetyl-CoA synthase, an ABC transporter substrate-binding protein and the methyl-coenzyme M reductase, were expressed by *Methanosaeta concilii*. Mainly catabolic enzymes were found from the 45 proteins identified in the protein fraction of EPS, indicating that EPS would have a role allowing extracellular catabolic reactions.

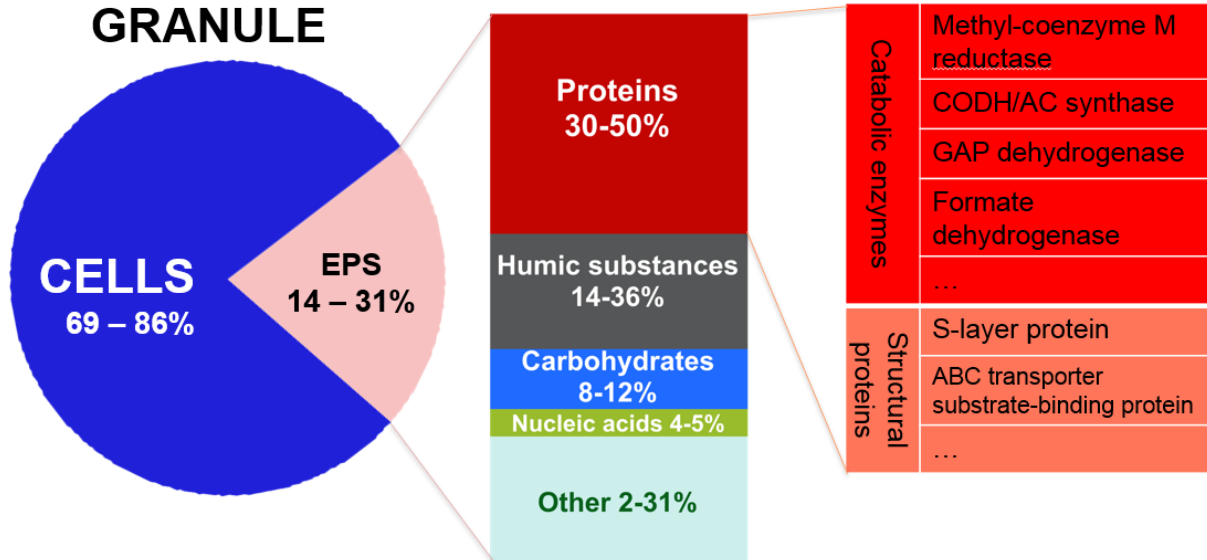
Keywords

Anaerobic granule, Extracellular polymeric substances (EPS), humic substances (HS), Proteins, Mass spectrometry

Highlights

- Extracellular polymeric substances (EPS) of 3 anaerobic sludge granules were compared.
- Proteins represented always the main EPS fraction in all sludge.
- The EPS proteins producing-bacterial community is more diverse than the archaeal one.
- *Methanosaeta concilii* proteins were the most represented in EPS in all the three sludges.
- Catabolic enzymes were the predominant proteins in EPS matrix.

Graphical abstract



Introduction

Biofilm is the best-known community lifestyle for microorganisms. Extracellular polymeric substances (EPS) embed the biofilm cells, thus play an important role in the biofilm development and cohesion. The EPS are high molecular weight macromolecules, either excreted by microorganisms, or produced from cell lysis, or adsorbed from the external environment (e.g. wastewater) (113). The question of which microbial species contributes most in the biofilm matrix construction remains, in most cases, unclear. EPS include proteins, humic substances (HS), carbohydrates and nucleic acids. There is also a mineral fraction mainly composed of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. Such divalent cations bridge negatively charged functional groups within the EPS and neutralize the negative charges so decreasing the repulsive forces between particles and cells, which in either case helps the bioaggregation and biofilm stabilization (114, 115).

Anaerobic sludge granules are small spherical biofilms, which contain the different microbial groups typically found in anaerobic digestion consortia. Each group performs specialized metabolic functions sequentially leading to the transformation of the primary

substrate ultimately into methane and CO₂. EPS are known to be important in the maintenance of granule stability and cohesion (116, 117). The EPS matrix can also trap extracellular enzymes and keep them in close proximity to the cells, protect the cells against oxygen and toxic compounds, allow for sorption of organic and inorganic compounds, act as electron donor and acceptor, and facilitate communication among the cells through biochemical signals as well as gene exchange (118).

In most anaerobic sludge systems, the largest fraction of EPS extracts are proteins, which significantly contribute to the granule formation (119). Proteins from aerobic sludge EPS had previously been studied by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and mass spectrometry (120, 121), but never those from anaerobic sludge. The identification of these proteins and their origin could help us to clarify the hypothetical roles of EPS and better understand the microbial ecology of anaerobic granular biofilms and the adhesion mechanisms behind granules formation in UASB reactors.

This study focuses on the comparison of three anaerobic granular sludges treating different industrial effluents. The first objective was to characterize their populations in order to identify ubiquitous species and those that are more specific to each granule type. The second objective was to identify the proteins from the EPS extracted from these granules to identify the main microbial species that produce them and better understand the roles that EPS and these species could play within the anaerobic granules.

Material and methods

Sources of sludge and preparation

The anaerobic granular sludge samples used in this study came from three large-scale reactors of the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) type, treating industrial wastewaters. The three companies were Agropur, a cheese factory, Lassonde, a fruit juice factory, and Tembec, a pulp and paper mill, respectively. Sludge was stored at 4°C until experiments were performed. Before the initiation of experiments, sludge was rinsed with anoxic carbonate buffer of pH 7.0 containing (g/L) NaHCO₃ (10), NH₄Cl (0.5), KH₂PO₄ (0.3) and K₂HPO₄ (0.4) (93),

to remove free cells and debris. To determine the dry weight (DW) and mineral weight (MW) of the sludge, samples were heated overnight at 105°C and 1h at 600°C, respectively (96).

Microbial community analysis by high throughput screening (HTS)

Total genomic DNA was extracted from the sludges samples using the PowerSoil™ DNA isolation kit (Mobio Laboratories, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Bacterial 16S rRNA genes were amplified using the set of primers E786F (5' GATTAGATACCCTGGTAG 3') and U926R (5' CCGTCAATTCCTTTRAGTTT 3') (122). Archaeal 16S rRNA genes were amplified using the set of primers 958arcF (5' AATTGGANTCAACGCCGG 3') and an equimolar mix of 1048arcR-major (5' CGRCGGCCATGCACCWC 3') and 1048arcR-minor (5' CGRCRGCCATGYACCWC 3') (123). A sample-specific multiplex identifier was added to each forward primer and an Ion Torrent adapter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was added to each primer. The polymerase chain reaction (PCR) amplification reactions were performed as described previously (101) using the rTaq DNA polymerase (GE Healthcare, Life Sciences Piscataway, NJ). The PCR products were purified and quantified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) and a Quant-iT PicoGreen double-stranded DNA quantitation kit (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA), respectively, according to the manufacturer's instructions. The pooled bacterial and archaeal 16S rRNA gene amplicons were then sequenced using the Ion Torrent sequencing platform with a 314 chip, according to the manufacturer's instructions. For sequencing analysis, bacterial and archaeal 16S rRNA gene sequences generated were analyzed using the ribosomal database project (RDP) classifier (124) using a bootstrap confidence cutoff of 50 %, as recommended by the RDP classifier for short sequences (less than 250 bp) (125). Sequences that were shorter than 75 bp and sequences with unidentified bases (N) were removed from the analysis.

EPS extraction

Sonication (Sonics Vibra Cell VC130, probe CV18 3987, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT) was used for granules disruption and EPS extraction. Various times of sonication (2, 4, 8 and 12 minutes) were compared. After 2 and 4 minutes, a large amount of integral

granules were still recovered, meaning that extraction was too short to breakdown all granules. The amount of all materials extracted, except minerals, tended to increase with the sonication duration. However this increase tendency faded for most of constituents between 8 and 12 min, while after 8 min of sonication, no integral granules could be recovered. We thus considered that the optimal sonication time to obtain the maximum of high quality EPS, was 8 minutes, and that longer sonication times would likely affect the cell integrity. After rinsing and removal of the water excess, 15 g of wet granules were added to 15 mL of carbonate buffer and then sonicated at 30 W (1 W/mL) for 8 minutes. Sonication was performed on ice with a 2 min interval between each 2 min of sonication, to prevent overheating. The sonicated samples were then centrifuged at 15, 000 x g, three times 15 minutes (Sorvall RC6Plus, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts). The supernatant containing EPS were frozen at -20°C until further characterisation or directly used for precipitation steps (see SDS-PAGE section) and cell lysis detection.

Cell lysis detection

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity was measured on EPS extract to evaluate the cell lysis during the sonication (94). 800 µL of enzymatic substrate solution (0.2M Tris-HCl, 0.2M 2 mercaptoethanol, 0.5mM NAD, 10mM D-glucose-6-phosphate, pH 8.5) were added to 200 µL of each extracts. Absorbance was measured at 340 nm at room temperature every 35 sec using UV1 (ThermoSpectronic) for 10 min to measure NADH production. 1U of G6P-DH gives 1 nmol of NADH produced per minute, and it is equivalent to approximately 5×10^6 lysed cells, or 20 ng of dry lysed cells (126).

Characterization of EPS

Protein, carbohydrate, humic substance and nucleic acid fractions were determined by colorimetric methods. All measurements were done using a DR 3900 spectrophotometer (Hach, London, Ontario). Carbohydrates were determined following the Dubois' protocol (127) and nucleic acids, the Burton's protocol (128). Proteins and humic substances were determined using Lowry-based Frølund's method (129, 130), modified as detailed in the Supplementary Data 1.

Separation using gel electrophoresis

Prior to separation on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), sequential precipitations of EPS extracts were done to roughly separate the protein from the humic substances (HS) fraction, which precipitates at lower salt concentration (131). Ammonium sulfate was stepwise added from 0.2 g/mL to 0.6 g/mL (+0.1 g/mL at each step), incubated for at least 6 h at 4°C and then centrifuged at 20,000 x g, 30 minutes at 4°C. The centrifugation pellets were resuspended in 1.5 mL of carbonate buffer. SDS-PAGE (132) were done on 4-12% bis-tris polyacrylamide gels and coloured with Coomassie blue (Bio-rad, Mississauga, Ontario). During the EPS precipitation steps with ammonium sulfate, HS tended to precipitate in fractions with between 0 to 0.3 g (NH₄)₂SO₄/mL while proteins predominated in the other fractions, with 0.4 to 0.6 g (NH₄)₂SO₄/mL. Several bands of proteins appeared in the three last fractions (i.e. with 0.4 to 0.6 g (NH₄)₂SO₄/mL). Those three fractions were pooled and passed on the gels.

Mass spectrometry (MS)

The more representative protein bands (shown in Figure 4) were cut from the gel for each sample (about 8 bands per sample). Bands were destained with water/sodium bicarbonate buffer and acetonitrile. The protein fragments were reduced with dithiothreitol (DTT) and alkylated with iodoacetamide prior to in-gel digestion with trypsin. The tryptic peptides were eluted from the gel with acetonitrile containing 0.1% of tri-fluoro-acetic acid and then separated on an Agilent Nanopump using a C18 ZORBAX trap and a SB-C18 ZORBAX 300 reversed phase column (150 mm x 75 µm, 3.5 µm particle size) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). All mass spectra were recorded on a hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometer (Q-Trap, Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments, Concord, Ontario) equipped with a nano-electrospray ionization source. The accumulation of tandem mass spectrometry (MS/MS) data was performed with the Analyst Software, version 1.4 (Applied Biosystems, MDS SCIEX). MASCOT (Matrix Science, London, UK) was used to create peak lists from MS and MS/MS raw data. Only individual ions scores that indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$) and only proteins with at least one significant sequence were kept for interpretation.

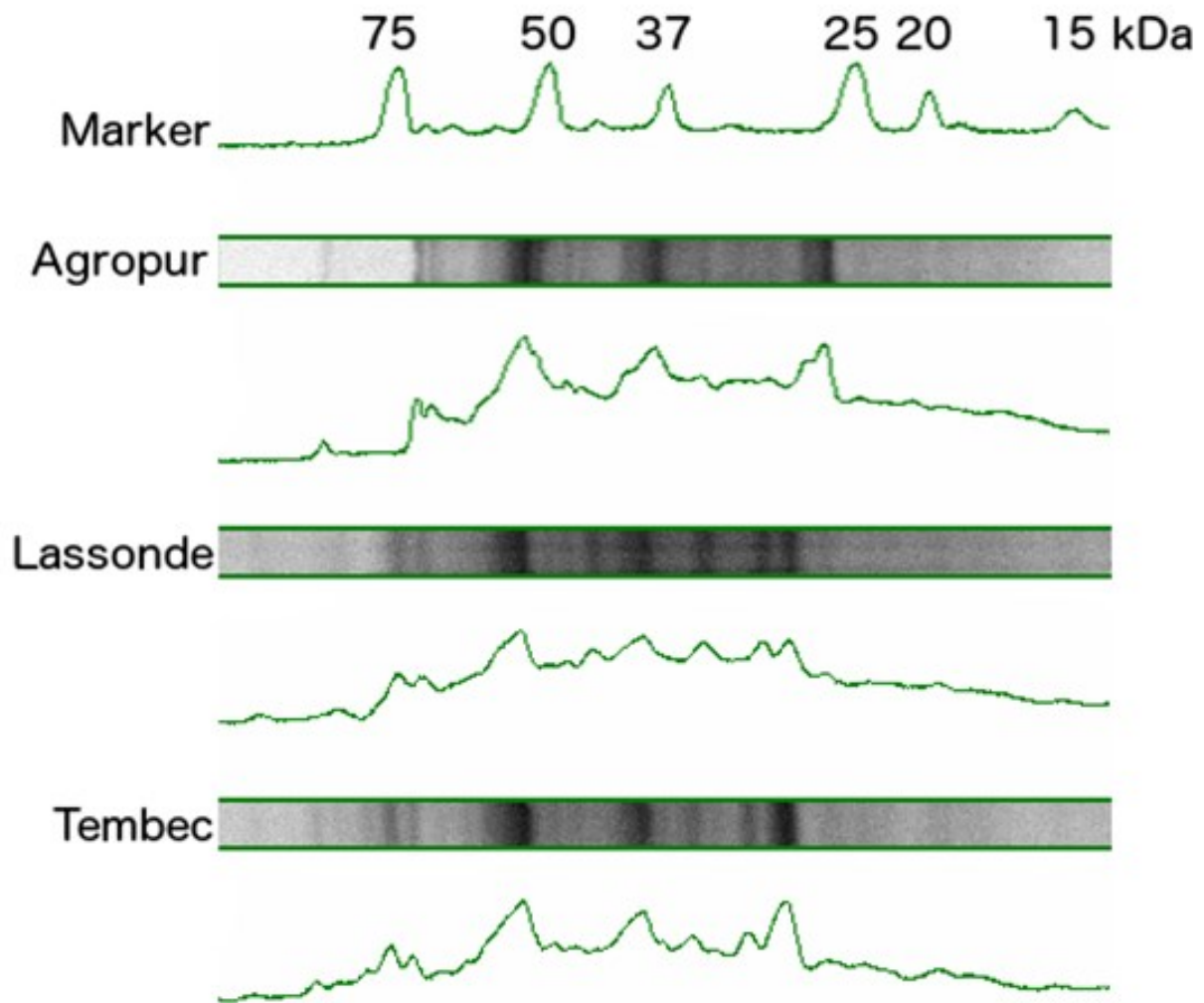


Figure 4 : Electrophoresis of precipitated proteins

From Agropur, Lassonde and Tembec sludges. Migration is from left to right.

Results

The molecular-based profiles of the microbial communities were first determined in the three anaerobic sludges under investigation (i.e. Agropur, cheese factory; Lassonde, juice industry; Tembec, paper mill), using high throughput screening (HTS). Results are shown in Table 6. Some genera found at high levels in some sludge were totally absent in others. This is

the case for the bacterial genera *Mesotoga* and *Syntrophobacter* (absent in the Tembec sludge), *Propioniciclava* (absent in the Agropur and Tembec sludges), *Desulfovirga* (absent in the Lassonde sludge). On the other hand, bacterial genera such as *Desulfoglaeba* and *Treponema* were relatively abundant in all sludges. Yet a large percentage of bacterial genera remained unknown (between 60 and 68%) in the anaerobic granules within this study, meaning that anaerobic processes remain to a large extent a black box of diversified and complex populations. On the archaeal side, the three sludges seem to have the acetoclastic and hydrogenophilic (including formate consumers) populations well balanced, with the genus *Methanosaeta* and the classes Methanobacteriales or Methanomicrobiales amply present in all sludges. The genera *Methanolinea* and *Methanomethylovorans* were absent in the Tembec and Lassonde sludges, respectively. No *Methanosarcina* has been found in any sludge studied.

Table 6 : Relative abundance of bacterial and archaeal genera for each sludge

Sludge origin	AGROPUR	LASSONDE	TEMBEC
BACTERIA			
<i>Desulfoglaeba</i>	18%	3%	2%
<i>Mesotoga</i>	8%	3%	0%
<i>Propioniciclava</i>	0%	7%	0%
<i>Desulfovirga</i>	1%	0%	5%
<i>Syntrophobacter</i>	5%	1%	0%
<i>Propionibacterium</i>	0%	4%	1%
<i>Desulfovibrio</i>	0%	1%	4%
<i>Treponema</i>	3%	3%	4%
<i>Aminivibrio</i>	1%	2%	4%
<i>Desulfomicrobium</i>	0%	2%	3%
<i>Syntrophorhabdus</i>	3%	1%	2%
<i>Smithella</i>	0%	2%	1%
<i>Olsenella</i>	0%	0%	2%
<i>Alkalibaculum</i>	0%	0%	2%
<i>Propionivibrio</i>	0%	1%	1%
<i>Brooklawnia</i>	0%	1%	0%
<i>Syntrophobotulus</i>	0%	0%	1%
<i>Thermovirga</i>	0%	0%	1%
<i>Sporobacter</i>	0%	0%	1%
<i>Gaiella</i>	1%	0%	0%
<i>Cloacibacillus</i>	0%	0%	1%
<i>Propionicimonas</i>	0%	1%	0%
<i>Flavonifractor</i>	0%	1%	0%
<i>Syntrophus</i>	0%	0%	1%
<i>Aminiphilus</i>	0%	0%	1%
<i>Streptomyces</i>	0%	1%	0%
<i>Petrimonas</i>	0%	0%	1%
<i>Pelolinea</i>	1%	0%	0%
Other or unknown	60%	68%	66%
ARCHAEA			
<i>Methanosaeta</i>	57%	36%	48%
<i>Methanobacterium</i>	9%	47%	23%
<i>Methanolinea</i>	25%	6%	0%
<i>Methanomethylovorans</i>	3%	0%	8%
<i>Methanomassiliicoccus</i>	1%	1%	2%
Other or unknown	6%	10%	18%

A variety of physical and chemical methods have been proposed for EPS extraction, with variable results in terms of extraction yield and quality of the extract (113, 133, 134). Physical methods are usually preferred to chemical or combined methods, when the quality of the extract

is of prime importance, as the latter usually leads to chemical contamination of the extract. Sonication for 8 min was chosen to extract EPS from the sludge specimens to proceed with protein characterization. Although sonication is an effective method to disintegrate cell aggregates such as anaerobic granules, it could also damage the cell membrane and induce cell lysis, depending of the strength and duration of sonication (135). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity was measured on EPS extract to evaluate the cell lysis during the sonication (94). All samples were tested negative. Composition of EPS extracted from three different anaerobic sludges is listed in Table 7. The EPS represented 31%, 20% and 14% of the dry weight (DW) of Agropur, Lassonde and Tembec sludge, respectively. The EPS compound with the smallest fraction was nucleic acids, followed by carbohydrate, while the protein fraction represented always the main compound, and HS, the second most important EPS constituent, for all sludges. Proteins and HS represent by consequence the core of this matrix where cells are embedded. The protein-to-carbohydrate ratio was 3, 3 and as high as 6 to 1, for Lassonde, Agropur and Tembec sludge, respectively. Protein and HS size exclusion chromatograms give more qualitative information on protein and humic fractions of EPS. The protein-like molecules are distributed in a wide apparent molecular weight (aMW) range, from >600 kDa to <10 kDa, whereas HS correspond to low aMW (from 6 kDa to <1.2 kDa) (136). Chromatographs show also that the EPS fingerprint changes significantly from one to another type of anaerobic sludge and were affected by the extraction method used (137).

Table 7 : Compound classes of EPS extracted

Sludge origin	Agropur	Lassonde	Tembec
EPS/Sludge (mg/g, dry weight (dw))	311 ±22	195 ±6	143 ±3
EPS/Sludge (mg/g, volatile dry weight (vdw))	310 ±33	151 ±7	132 ±3
Proteins EPS/sludge (mg/g, vdw)	124 ±13	46 ±17	66 ±4
Humic substances EPS/Sludge (mg/g, vdw)	44 ±6	36 ±6	47 ±4
Carbohydrate EPS/Sludge (mg/g, vdw)	37 ±11	16 ±1	11 ±1
Nucleic acids EPS/Sludge (mg/g, vdw)	16 ±1	6 ±1	6 ±0
Protein/carbohydrate ratio	3	3	6

Protein precipitation was done with EPS extracts prior to separation on gels as shown in Figure 4. The migration patterns were slightly different from one sludge to the other, but there were still bands of the same molecular weight in the three sludges. Proteins were ranging between 26-89 kDa. Those results are consistent with previous studies (119) where a thermal EPS extraction was used. After 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMBZ) staining (138), no metalloprotein (such as cytochromes) were detected on gels. The most representative bands on SDS-PAGE gels were cut and analyzed by HPLC-tandem mass spectrometry for protein identification. Table 9 (Supplementary Data 2) presents the significant proteins that were identified. Four proteins were found in every sludge tested: the S-layer protein, the CO-methylating acetyl-CoA synthase complex (CODH/AC synthase), an ABC transporter substrate-binding protein and the coenzyme-B sulfoethylthiotransferase, also known as methyl-coenzyme M reductase (MCR). A total of 45 proteins from more than 50 species of archaea and bacteria have been identified (Table 8). *Methanosaeta concilii* is by far the microorganism that has been the most represented by this overall proteomic search. The Agropur sludge (cheese factory) was the less diversified sludge with only 31 positive hits and 17 proteins found, instead of 52 and 64 hits or 33 and 39 proteins found, for the Lassonde and Tembec sludge, respectively. It should also be mentioned that many sequenced peptides were not associated to any known organism or known protein, as already highlighted with the bacterial HTS results.

Table 8 : Identified proteins and microbial species that produce them, in the EPS of the three tested sludges (A, Agropur; L, Lassonde; T, Tembec)

Description	Species	Sludge
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	<i>Methanosaeta concilii</i>	L T
5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase	<i>Methanobacterium formicicum</i>	T
ABC transporter substrate-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
	<i>Candidatus Vecturithrix granuli</i>	A
	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	L
	<i>Flexilinea flocculi</i>	L
acetate--CoA ligase	<i>Methanosaeta concilii</i>	A
acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex	<i>Methanosarcina mazei</i>	T
acetyl-CoA synthase	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
adenyl-sulfate reductase	<i>Candidatus Rokubacteria bacterium</i>	T
ATP-utilizing enzymes of ATP-grasp superfamily (probably carbonylase)	<i>Methanobacterium</i>	T
benzaldehyde dehydrogenase II	<i>Mycobacterium abscessus</i>	T
C-5 cytosine-specific DNA methylase family protein	<i>Clostridioides difficile</i>	T
cellulase	<i>Methanosaeta</i>	T
CO dehydrogenase/CO-methylating acetyl-CoA synthase complex	<i>Methanosaeta concilii</i>	A L T
coenzyme-B sulfoethylthiotransferase (also known as methyl-coenzyme M reductase)	<i>Methanobacterium flexile</i>	L T
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	L T
	<i>Methanobacterium paludis</i>	L T
	<i>Methanobrevibacter filiformis</i>	L T
	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	L
	<i>Methanoculleus</i>	L
	<i>Methanolinea tarda</i>	A
	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	T
	<i>Methanoregula formicica</i>	A
	<i>Methanosaeta concilii</i>	A L T
	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	A
	<i>Methanosaeta thermophila PT</i>	T
	<i>Methanospirillum hungatei</i>	T
	<i>Methanothermobacter</i>	L T
Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family protein	<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>	T
extracellular solute-binding protein family 1	<i>Candidatus Vecturithrix granuli</i>	A
FAD-binding oxidoreductase	<i>Dietzia</i>	T
fasciclin domain protein	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
formate dehydrogenase	<i>Methanolinea tarda</i>	A
	<i>Pseudodesulfovibrio indicus</i>	A
formate dehydrogenase-N	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	A
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Xenoturbella bocki</i>	L
	<i>Actinomyces cardiffensis</i>	L
	<i>Candidatus Synechococcus spongiarum</i>	L
	<i>Phytophthora nicotianae</i>	L
	<i>Microbacterium</i>	L T
	<i>Arsenicococcus bolidensis</i>	L
	<i>Cutibacterium granulorum</i>	L
	<i>Demequina aurantiaca</i>	L
	<i>Elusimicrobia bacterium</i>	L

	<i>Planctomycetales bacterium</i>	T
	<i>Propionibacterium namnetense</i>	L
	<i>Saccharothrix espanaensis</i>	L
	<i>Serinicoccus profundus</i>	L
	<i>Tessaracoccus lapidicaptus</i>	L
glycerol kinase	<i>Methylacidiphilum fumariolicum</i>	T
	<i>Spirosoma</i>	T
ketol-acid reductoisomerase	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
LL-diaminopimelate aminotransferase	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
methanol-cobalamin methyltransferase	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	T
methanol--corrinoid methyltransferase	<i>Methanobolus profundus</i>	T
methylmalonyl-CoA mutase	<i>Bacterium</i>	T
mit domain-containing protein 1	<i>Ascaris suum</i>	L
molecular chaperone DnaK	<i>Verrucumicrobiae bacterium</i>	T
N5,N10-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (coenzyme F420-dependent)	<i>Methanococcus jannaschii</i>	T
peptidase M42	<i>Methanosaeta concilii</i>	L
peptidylprolyl isomerase	<i>Microbacterium</i>	L
periplasmic-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
phosphate-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>	T
phosphoglycerate kinase	<i>Propionibacterium</i>	L
pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	<i>Mycobacterium palustre</i>	A
radical SAM protein	<i>Clostridium cellulovorans</i>	L
recombinase family protein	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	A
S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>	A L T
	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	A
thioesterase	<i>Leptolyngbya</i>	A
TIGR03759 family integrating conjugative element protein	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>	A
Transketolase domain-containing protein	<i>Cephalotus follicularis</i>	L
tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	T
Uncharacterized membrane protein SpoIIM, required for sporulation	<i>Prevotella jejuni</i>	L
V-type H ⁺ -transporting ATPase	<i>Methanosaeta</i>	T

Discussion

The EPS represents an important proportion of the granules studied, from 14% to 31% by dry weight. Proteins were the main constituents. MS results show that most of the proteins identified were related to catalytic activities. Shotgun proteomic analysis of the cation exchange resin extracted EPS fraction from anaerobic sludge had reached the same conclusion (139). After protein, HS represent the second largest constituent of EPS. The HS of EPS could come from biomass degradation or/and from polycondensation of relatively small molecules released during biomass decay, but also from synthesis by the microorganisms themselves (140). Their role in the microbial aggregates has not yet been clearly explained. HS in anaerobic environment may act as a reducing agent for electron transfer (141-143) and as such, promote direct

interspecies electron transfer (DIET). As proteins extracted were mostly related to metabolism, HS are then the next candidate to play the structural role expected by EPS.

Main bacterial populations found in the sludges examined were fermenters of several C-compounds (including aminoacids) and most of them were sulfate reducing bacteria (SRB) (144-149). The variation in genera from one sludge to another is probably mainly due to the difference in the substrates composing the wastewater treated by the sludge, which can be preferentially consumed by one genus rather than another. The balanced coexistence of SRB and other fermentative acetogenic bacteria in anaerobic digesters has long been known. This balance between both populations is related to the substrate to sulfate ratio of the wastewater, and in a less obvious but major way, also related to acetate and propionate concentrations since acetate favor methanogens, while propionate favor SRB (150-152).

Methanosaeta concilii is the microorganism for which the most protein hits were obtained regardless of the sludge origin. This archaeon has been reported as having a key role in granulation (153). S-Layer duplication domain protein from *Methanosaeta concilii* were found in the three protein extracts. S-Layer duplication domain protein is one of the primary proteins of the S-layer in archaea (154, 155). The archaeal S-layer proteins are known to have a structural role and to be involved in cell adhesion and population cohesion (156). The MCR and CODH/acetyl-CoA (CODH/AC) synthase enzymes were the other major proteins found in all sludges. MCR is an enzyme responsible for the last step of methanogenesis, combining the methyl group on coenzyme M with hydrogen from the coenzyme B to form methane (157). The CODH/AC synthase works primarily through the Wood–Ljungdahl pathway which converts CO₂ to acetyl-CoA (158). Archaeal methanogens, particularly *Methanosaeta*, largely predominate in the innermost layer of the granule (16, 28). It is therefore expected that most dead archaea are also located in the granule center, where they can accumulate, since they are confined in that remote zone of the EPS matrix and that they would be released in abundance during the sonication extraction. In this respect, Agropur granules typically were of light grey color, indicating the lesser importance of such a usually dark methanogenic core; this would explain the lower number of archaeal enzymes found in the EPS of Agropur granules.

The MCR and CODH/AC synthase enzymes are extremely sensitive to oxygen. When oxidized they are deactivated and can not be regenerated (159). Either the cell decomposes the

deactivated enzymes for recycling, or simply excretes them, as recycling could cost too much energy. The presence of a large amount of MCR and CODH/AC synthase in EPS could then be a marker of oxygen stress undergone by methanogens. Small oxygen levels added in anaerobic reactors does not affect the methane production, however a long-term exposure to O₂ leads to smaller granule sizes in the reactors (160).

Among the other identified proteins, the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was largely found in Lassonde sludge and originates from many bacterial strains (Table 8). It actually represents the principal hit for bacterial strains overall the three sludges. GAPDH is an essential enzyme during glycolysis but it has also several other roles. It has been detected at the surface of several prokaryotes (161, 162) as an adhesion and binding protein (163). It binds albumin and several other mammalian proteins (164) and it is now considered as a virulence factor for some bacterial strains (165). GAPDH is required for EPS production in *Xanthomonas* proteobacteria (166). As a protein with multiple roles, GAPDH could play a role in granulation and in maintaining the granule integrity. Fasciclin domain proteins also have an important role in cell adhesion (167) and have been found expressed by *Methanosaeta concilii* in Tembec sludge.

Bacterial formate dehydrogenase (FDH) was identified from Agropur sludge proteins. This FDH is associated with molybdenum (Mo) or tungsten (W) and is NAD-independent. This enzyme catalyses the reduction of CO₂ using reducing equivalents coming from the upstream degradation of the primary substrate. FDH could also oxidize formate to produce CO₂ and reducing equivalents. The beta subunit has a transmembrane domain that allows the conduction of electrons within the protein. This enzyme is probably a key enzyme to regulate formate catabolism in granules as it can both produce and consume formate and in this way ensure that thermodynamic conditions are favourable during the degradation of organic matter (168). As this enzyme is NAD-independent and possesses its own catalyzer, it could be extracellularly active, expanding the regulation of formate in the extracellular environment. As for hydrogen, increasing formate concentration rapidly prevents its production, limiting the oxidation of substrates. This ability to excrete FDH in the extracellular environment would therefore be a considerable advantage for bacteria, since it could reduce the concentration of formate faster than its diffusion and intracellular consumption by methanogens. In such a scenario, FDH would

externally produce reducing-equivalents and CO₂. The reducing equivalents could then be used by methanogens via DIET to reduce CO₂ to methane, since *Methanosaeta* and *Methanosarcina*, in addition to acetate, are able to consume free electrons via DIET (32, 57). In Agropur sludge, *Methanosaeta* was found to represent 57% of the archaeal genera identified (Table 6). Eventually and contrary to what was acknowledged in the past, *Methanosaeta* could be a major player in non-acetoclastic methanogenesis in granular sludge (169). Another bacterial FDH, the nitrate-inducible FDH or FDH-N, was found in Agropur sludge. This FDH-N plays a major role in the respiration of nitrate. This is likely related to the fact that Agropur sludge processes wastewater containing proteins, and therefore, that the nitrogen cycle is more prominent than in Lassonde and Tembec sludge. For the same reason, cellulase has been found specifically in Tembec EPS, which is in direct link with typical paper mill wastewater substrates. The role of extracellular enzymes are likely more instrumental in a confined environment such as the innermost region of granules than in the open medium of a free suspension. This likely adds to the competitive advantages of biofilm as compared to planktonic growth.

Conclusions

Previous studies have characterized the protein fraction of EPS only in aerobic sludge. The current study improved the quantification and contributed to the characterization of the EPS protein fraction for anaerobic granules expressly. The major conclusions are as follows:

- Proteins formed the main EPS fraction in all sludge samples, while the second most important constituent was humic substances, which typically can act as electron donor and acceptor and facilitate extracellular electron transfer.
- The EPS proteins producing-bacterial community is more diverse than the archaeal one, which probably impacted negatively the results obtained by mass spectrometry, where the same protein family would be represented by many organisms, resulting in lower scores for protein hits. That was the case for GAPDH that was found from 14 different organisms. *Methanosaeta concilii* proteins were the most represented in EPS in all the three sludges studied, particularly: the S-layer protein, the CO-methylating acetyl-CoA

synthase, an ABC transporter substrate-binding protein and the methyl-coenzyme M reductase.

- Catabolic enzymes were the predominant proteins in EPS matrix, amongst which the CODH/AC synthase, the methyl-coenzyme M reductase and the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase were the most frequently found, the two former in every sludge tested, the latter only in one out of three. This predominance of catabolic enzymes shows that the EPS matrix has the capacity for extracellular catabolic reactions, which represents a competitive advantage for anaerobic granules.

Acknowledgments

The authors wish to thank A. Corriveau and S. Deschamps for their support in analytical chemistry, G. Bruant and M.-J. Lévesque, for their support in DNA sequencing, F. Lépine and A. Nikolakakis (INRS-IAF) for their support in mass spectrometry, and P. Mehta, for proof-reading. This research was partly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant 185778-2009).

Supplementary Data 1:

Update of the Frølund's colorimetric method for the determination of mixed proteins and humic substances

Introduction

In 1995, Frølund's team proposed a modified method of Lowry's procedure to determine proteins and humic substances (HS) (130). As the Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FCPR) is used for colorimetric determination of both proteins and HS (129, 170), they estimated which part of the color development was due to protein versus HS in samples that contain both. With CuSO_4 , the total absorbance is equal to the sum of the absorbances from proteins and HS. Without CuSO_4 , the color development (blind absorbance) is due to HS, in addition to chromogenic amino acids. They observed that HS were responsible for a decrease of the color developed by proteins to 20% but there was no decrease for humic acids, in the absence of CuSO_4 . The mutual interference of proteins and humic compounds was addressed as following:

$$A_{\text{total}} = A_{\text{protein}} + A_{\text{humic}} \quad (1)$$

$$A_{\text{protein}} = 1.25 (A_{\text{total}} - A_{\text{blind}}) \quad (2)$$

$$A_{\text{humic}} = A_{\text{blind}} - 1/5 A_{\text{protein}} \quad (3)$$

where A_{total} is the total absorbance at 750 nm (A_{750}) with CuSO_4 , A_{blind} is the total A_{750} without CuSO_4 , A_{humic} is the A_{750} due to humic compounds, and A_{protein} is the A_{750} due to proteins.

In the particular case of exopolymeric substances (EPS) extracted from mixed anaerobic biofilms, those equations yielded results particularly high in HS and low in proteins, compared to the literature. Following further investigation, we propose here to update the Frølund's method for the determination of proteins and humic substances when they are both present in the same sample.

Material and methods

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich #A7030, MilliporeSigma Canada Co., Oakville, Ontario) and humic acid (HA) (Sigma-Aldrich #53680) were used as the standards for measurement of proteins and humic compounds, respectively. A dilution series of calibration standards in water were prepared, either with HA, or BSA, to give concentrations of 0 to 1 mg/mL. A few drops of concentrated NaOH were used to dissolve HA in water. Solution A is freshly made daily with 50 mL of solution B and 1 mL of solution C. Solution B contains 2% Na₂CO₃ in 0.1M NaOH. Solution C contains 1% sodium tartrate dihydrate with or without 0.5% CuSO₄. A few drops of concentrated H₂SO₄ were used to dissolve CuSO₄. Solution D contains FCPR (purchased from Sigma-Aldrich, #47641) diluted with an equal volume of HCl 2M. Each mL of sample is mixed with 5 mL of solution A. Thereafter within maximum 10 minutes, 0.5 mL of solution D is added and immediately mixed. Absorbance is read at 750 nm after between minimum 30 minutes and maximum 1 hour using a spectrophotometer (DR3900, Hach, London, Ontario). Total absorbance (A_{total}) was measured in presence of CuSO₄ while blind absorbance (A_{blind}) was measured with CuSO₄ omitted, using the series of standards with known BSA or HA concentrations (CBSA or CHA, in mg/mL), to yield the calibration factors from the calibration plot slope, either FBSA (i.e. $\Delta CBSA / \Delta A_{total}$) or FHA (i.e. $\Delta CHA / \Delta A_{total}$).

Results

Mixed solutions of HA and BSA were prepared with various combined concentrations of HA and BSA from 0 to 1 mg/mL for each. Total absorbance (A_{total}) and blind absorbance (A_{blind}) were measured on all samples, and the concentrations of proteins and humic substances were estimated using the formulas (4) and (5) below, to be confronted with their nominal values (concentrations added) in order to test the adequacy of the Frølund's equations (2) and (3) above.

$$C_{protein} = A_{protein} FBSA \quad (4)$$

$$C_{humic} = A_{humic} FHA \quad (5)$$

where $C_{protein}$ and C_{humic} are the concentrations (mg/mL) in proteins and humic substances, respectively, and $A_{protein}$ and A_{humic} are given by the equations (2) and (3), respectively.

Figure 5A displays the plots of the protein concentration measured using the Frølund's equations as above described, as a function of the nominal or added concentration of proteins, with no HA added and with different concentrations of HA added. That is, each dot corresponds to the average measured protein concentration of several samples, all with the same protein concentration added, while humic acid concentrations ranged from 0 to 1 mg/mL. We observed that the discrepancy between the measured BSA concentration as estimated according to Frølund and the expected concentrations is inversely proportional the concentration of the HA that the sample contains (not shown). The presence of HA in the assay clearly lowers the detection of BSA. In presence of 1 mg/mL of HA, the BSA concentration is underestimated by almost half. Even in absence of HA, BSA concentrations remain underestimated by 30% when calculated with equations (4) and (2).

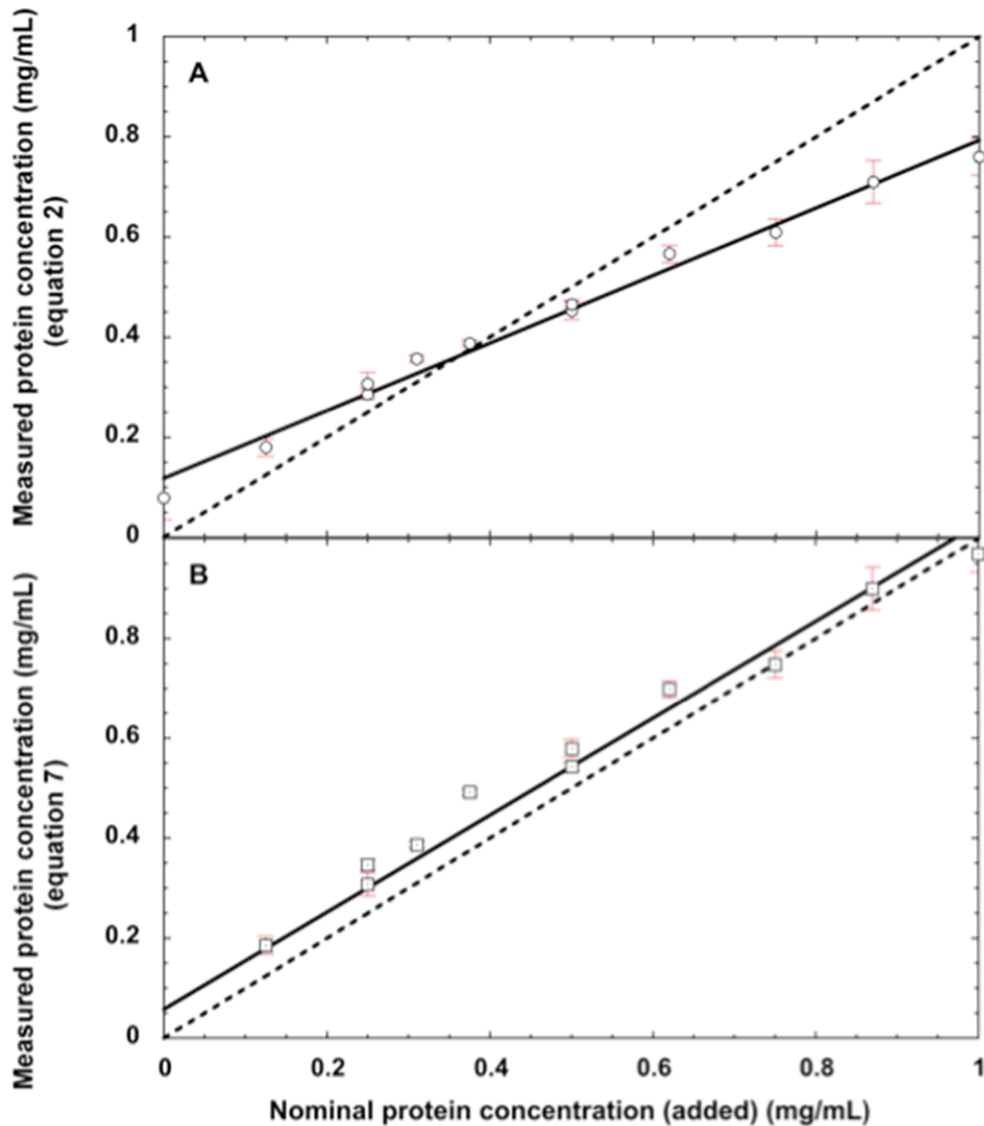


Figure 5 : Measured concentration of protein

A) using the Frølund's equation (2), B) using the newly developed equation (7), as a function of the nominal (added) protein concentration. Each dot corresponds to the average measured protein concentration of several samples, all with the same protein concentration added, while humic acid concentrations were varying from 0 to 1 mg/mL.

----- Expected concentration (measured = nominal values)

_____ Linear regression curve: (A) $C_{\text{measured}} = 0.112 + 0.676 C_{\text{nominal}}$ ($R = 0.994$); (B) $C_{\text{measured}} = 0.055 + 0.971 C_{\text{nominal}}$ ($R = 0.984$)

Similarly, Figure 6A displays the plots of the HA concentration measured using the Frølund's equations as above described, as a function of the nominal or added concentration of HA when proteins are absent and with different protein concentrations. That is, each dot corresponds to the average measured HA concentration of several samples, all with the same HA concentration added, while BSA concentrations ranged from 0 to 1 mg/mL. As with the results obtained for protein measurements, the change for the HA estimates using equations (5) and (3) is directly related to the added BSA concentration (not shown). When there is no BSA, the HA estimated value coincides with the expected value. In contrast, the addition of 1 mg/mL of BSA in the samples overestimates the estimated values by 0.1 mg/mL, for expected HA concentrations near 1 mg/mL, and by 0.3 mg/mL, when HA concentration tends to zero.

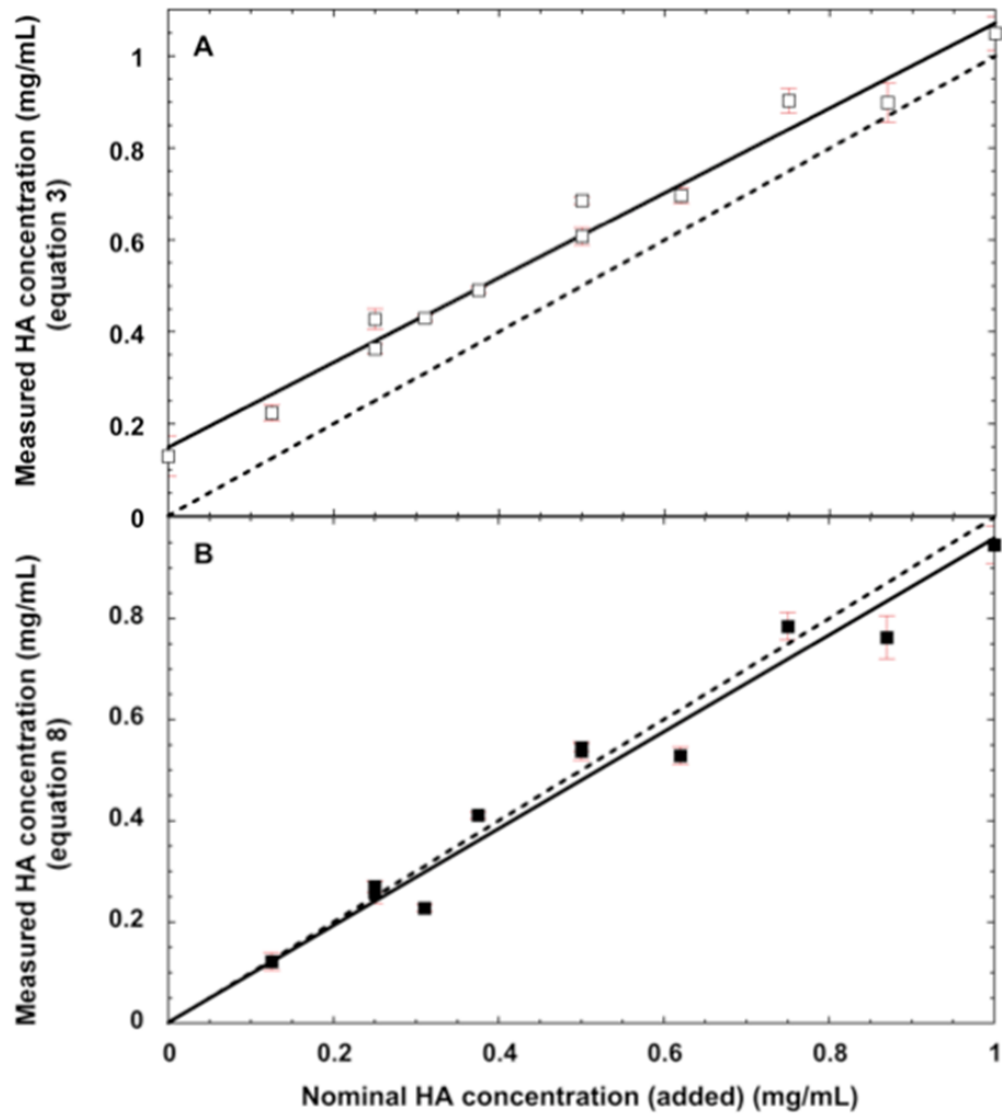


Figure 6 : Measured concentration of humic substances

A) using the Frølund's equation (3), B) using the newly developed equation (8), as a function of the nominal (added) HA concentration. Each dot corresponds to the average measured HA concentration of several samples, all with the same HA concentration added, while BSA concentrations were varying from 0 to 1 mg/mL.

----- Expected concentration (measured = nominal values)

_____ Linear regression curve: (A) $C_{\text{measured}} = 0.15 + 0.92 C_{\text{nominal}}$ ($R = 0.99$); (B) $C_{\text{measured}} = 0.0025 + 0.96 C_{\text{nominal}}$ ($R = 0.985$)

This means that chromogenic amino acids represent a higher color development in the absence of CuSO_4 than previously described. We estimated that this color development was higher by 40% instead of 20% (equation (8) instead of equation (3)). A ratio R (equation (6)) is also introduced in equation (2) to offset the underestimation of protein fraction when HA fraction tends to be high (Figure 5A), and the coefficient of the total absorbance in the same equation is reduced accordingly (equation (7)). The use of equations (6), (7) and (8) as developed below makes it possible to reconcile the experimental and expected values as shown in Figure 5B and 6B, respectively.

$$R = A_{\text{blind}} / A_{\text{total}} \quad (6)$$

$$A_{\text{protein}} = 1.15 A_{\text{total}} - R A_{\text{blind}} \quad (7)$$

$$A_{\text{humic}} = A_{\text{blind}} - 0.4 A_{\text{protein}} \quad (8)$$

Supplementary Data 2:

Table 9 : Table of significant proteins identified (The score is the probability that the observed match is a random event, report as $-10*\text{LOG}_{10}(\text{P})$, where P is the absolute probability)

Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of sequences	Description	Species
AGROPUR SLUDGE						
AMK11930.1	51	91	1	1	formate dehydrogenase	<i>Pseudodesulfovibrio indicus</i>
WP_011696912.1	70	89	2	2	formate dehydrogenase-N subunit alpha	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>
OYV08313.1	104	80	3	2	S-layer-related duplication domain-containing protein	<i>Methanosaeta</i> sp. ASP1-1
WP_013718926.1	190	77	6	4	S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718926.1	114	77	4	4	S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718926.1	63	77	3	3	S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_042688872.1	57	76	1	1	formate dehydrogenase subunit alpha	<i>Methanolinea tarda</i>
WP_013718459.1	57	74	1	1	acetate--CoA ligase	<i>Methanosaeta concilii</i>
GAK56414.1	58	64	1	1	ABC transporter, substrate binding protein	<i>Candidatus vecturithrix granuli</i>
WP_081035769.1	69	62	1	1	recombinase family protein	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
WP_014586065.1	85	61	3	2	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanosaeta harundinacea</i>
WP_013718622.1	119	61	6	4	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718622.1	116	61	3	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718622.1	96	61	3	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013719066.1	75	52	2	2	CO dehydrogenase/CO-methylating acetyl-CoA synthase complex subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
KUK43246.1	55	50	2	2	Methyl-coenzyme M reductase, alpha subunit, partial	<i>Methanosaeta harundinacea</i>
GAK59571.1	77	49	1	1	extracellular solute-binding protein family 1	<i>Candidatus Vecturithrix granuli</i>
GAK59735.1	73	46	2	2	extracellular solute-binding protein family 1	<i>Candidatus Vecturithrix granuli</i>
WP_015286559.1	111	46	3	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanoregula formicica</i>
KUK43225.1	268	46	11	6	Methyl-coenzyme M reductase, beta subunit	<i>Methanosaeta harundinacea</i>
OYV09330.1	407	45	18	10	methyl-coenzyme M reductase beta subunit	<i>Methanosaeta</i> sp. NSP1
OYV09330.1	75	45	1	1	methyl-coenzyme M reductase beta subunit	<i>Methanosaeta</i> sp. NSP1
WP_013718625.1	593	45	22	14	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718625.1	100	45	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
BAL72752.1	75	43	1	1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanolinea tarda</i>
BAL72752.1	73	43	1	1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanolinea tarda</i>
WP_085077459.1	56	36	1	1	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	<i>Mycobacterium palustre</i>
KUK44334.1	54	33	1	1	S-layer-related duplication domain protein, partial	<i>Methanosaeta harundinacea</i>
WP_007314360.1	57	29	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit gamma	<i>Methanolinea tarda</i>
WP_014159660.1	48	27	1	1	TIGR03759 family integrating conjugative element protein	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>
WP_008313207.1	54	22	2	1	thioesterase	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 6406

Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of sequences	Description	Species
LASSONDE SLUDGE						
GAV78649.1	51	80	1	1	Transketolase domain-containing protein	<i>Cephalotus follicularis</i>
WP_013718926.1	291	77	13	8	S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718926.1	268	77	9	7	S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
CVK33165.1	81	63	1	1	Methyl-coenzyme M reductase I subunit alpha	<i>Methanoculleus</i> sp. MAB1
WP_013718622.1	157	61	6	6	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_004031277.1	433	61	13	7	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanobacterium formicicum</i>
EKQ53862.1	158	61	4	4	methyl-coenzyme M reductase, alpha subunit	<i>Methanobacterium</i> sp. Maddingley MBC34
WP_023992801.1	371	61	12	7	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanobacterium</i> sp. MB1
WP_023992801.1	148	61	4	4	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanobacterium</i> sp. MB1
WP_013826564.1	81	60	2	2	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanobacterium paludis</i>
WP_013291967.1	48	56	1	1	radical SAM protein	<i>Clostridium cellulovorans</i>
WP_013719066.1	85	52	2	2	CO dehydrogenase/CO-methylating acetyl-CoA synthase complex subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013826568.1	188	47	5	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium paludis</i>
WP_048072495.1	233	47	12	8	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium formicicum</i>
WP_048072495.1	92	47	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium formicicum</i>
WP_048072495.1	84	47	2	2	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium formicicum</i>
WP_004032914.1	62	47	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobrevibacter smithii</i>
WP_004031273.1	205	47	11	8	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium formicicum</i>
WP_066972983.1	123	47	2	2	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobrevibacter filiformis</i>
WP_066972983.1	57	47	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobrevibacter filiformis</i>
WP_013718625.1	74	45	3	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
EPH00329.1	71	42	1	1	phosphoglycerate kinase	<i>Propionibacterium</i> sp. oral taxon 192 str. F0372
ADM52196.1	131	41	3	3	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanobacterium flexile</i>
ADM52196.1	88	41	1	1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanobacterium flexile</i>
ADM52196.1	84	41	2	2	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanobacterium flexile</i>
OGS20011.1	110	38	5	2	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Elusimicrobia bacterium</i> RIFOXYA2_FULL_39_19
WP_013720082.1	77	38	1	1	peptidase M42	<i>Methanosaeta concilii</i>
KKZ10447.1	66	37	1	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Candidatus Synechococcus spongiarum</i> SP3
SCY12049.1	200	37	6	2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	<i>Microbacterium</i> sp. LKL04
SCY12049.1	116	37	2	2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	<i>Microbacterium</i> sp. LKL04
SCY12049.1	92	37	2	2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	<i>Microbacterium</i> sp. LKL04
SCY12049.1	66	37	1	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	<i>Microbacterium</i> sp. LKL04
WP_062283483.1	71	37	1	1	BMP family ABC transporter substrate-binding protein	<i>Flexilinea flocculi</i>

Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of sequences	Description	Species
ENO17529.1	197	36	8	4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Actinomyces cardiffensis</i> F0333
WP_002548822.1	162	36	7	3	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Propionibacterium namnetense</i>
WP_021104351.1	141	36	6	2	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Cutibacterium granulosum</i>
WP_015103632.1	85	36	2	2	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Saccharothrix espanaensis</i>
WP_061965983.1	70	36	1	1	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Demequina aurantiaca</i>
WP_029210506.1	90	36	1	1	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Arsenicococcus bolidensis</i>
WP_068752506.1	130	35	2	2	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Tessaracoccus lapidcaptus</i>
WP_010148539.1	123	35	3	2	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Serinicoccus profundus</i>
SNR67343.1	41	35	1	1	Uncharacterized membrane protein SpoIIIM, required for sporulation	<i>Prevotella jejuni</i>
ABM97669.1	33	35	1	1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial	<i>Xenoturbella bocki</i>
OTA40626.1	74	32	1	1	branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein, partial	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>
KUF91121.1	119	32	5	2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Phytophthora nicotianae</i>
WP_013718654.1	58	31	2	2	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	<i>Methanoseta concilii</i>
BAW31875.1	63	29	1	1	methyl-coenzyme M reductase I, subunit gamma	<i>Methanothermobacter</i> sp. MT-2
ERG83110.1	46	29	1	1	mit domain-containing protein 1	<i>Ascaris suum</i>
WP_004031276.1	103	28	4	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit gamma	<i>Methanobacterium formicicum</i>
ODT28037.1	71	23	1	1	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	<i>Microbacterium</i> sp. SCN 70-27
ODT28037.1	70	23	1	1	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	<i>Microbacterium</i> sp. SCN 70-27
WP_023953331.1	51	22	1	1	peptidylprolyl isomerase	<i>Microbacterium</i> sp. TS-1

Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of sequences	Description	Species
TEMBEC SLUDGE						
AEB68019.1	219	88	7	6	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex, alpha subunit	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6
WP_013718926.1	95	77	2	2	S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718926.1	77	77	3	3	S-layer protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
SMD10738.1	48	73	1	1	Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family protein	<i>Desulfobacterium vacuolatum</i> DSM 3385
OGL04997.1	39	70	1	1	adenylyl-sulfate reductase subunit alpha	<i>Candidatus rokubacteria bacterium</i> RIFCSPLOWO2_02_FULL_68_19
PAW70078.1	46	68	1	1	molecular chaperone DnaK	<i>Verrucomicrobiae bacterium</i> Tous-C5FEB
WP_011449112.1	47	63	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanospirillum hungatei</i>
OAI44204.1	62	63	1	1	methylmalonyl-CoA mutase	<i>Bacterium</i> SCGC AG-212-C10
WP_013718622.1	351	61	14	10	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718622.1	60	61	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit alpha	<i>Methanosaeta concilii</i>
AEB68670.1	117	58	3	3	oligopeptide ABC transporter, solute-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6
WP_009059370.1	44	56	1	1	glycerol kinase	<i>Methylacidiphilum fumariolicum</i>
OJW77027.1	66	55	1	1	glycerol kinase	<i>Spirosoma</i> sp. 48-14
SHQ02298.1	86	54	1	1	benzaldehyde dehydrogenase II	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>
WP_013719063.1	128	52	3	3	acetyl-CoA synthase subunit gamma	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013719063.1	87	52	3	3	acetyl-CoA synthase subunit gamma	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013719066.1	72	52	3	3	CO dehydrogenase/CO-methylating acetyl-CoA synthase complex subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_015324191.1	98	51	2	2	methanol-cobalamin methyltransferase B subunit	<i>Methanomethylivorans hollandica</i>
WP_091936189.1	83	50	2	2	methanol-corrinoid methyltransferase	<i>Methanobolus profundi</i>
WP_013719695.1	76	50	1	1	ABC transporter substrate-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013719707.1	79	49	1	1	periplasmic-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
OYV09307.1	121	49	3	3	V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit B	<i>Methanosaeta</i> sp. NSP1
WP_013719064.1	79	48	1	1	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase subunit delta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013826568.1	75	47	2	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium paludis</i>
WP_048072495.1	86	47	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium formicicum</i>
WP_048072495.1	66	47	2	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobacterium formicicum</i>
WP_066972983.1	99	47	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobrevibacter filiformis</i>
WP_066972983.1	98	47	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanobrevibacter filiformis</i>
WP_013719720.1	75	47	5	5	periplasmic-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
ABK14363.1	53	46	1	1	methyl-coenzyme M reductase, beta subunit	<i>Methanosaeta thermophila</i> PT
AEB68256.1	60	46	1	1	periplasmic binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6
WP_015325024.1	82	46	1	1	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanomethylivorans hollandica</i>
OYV09330.1	62	45	1	1	methyl-coenzyme M reductase beta subunit	<i>Methanosaeta</i> sp. NSP1

Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of sequences	Description	Species
WP_013718625.1	411	45	14	8	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718625.1	252	45	6	5	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718625.1	108	45	3	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718625.1	100	45	3	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013718625.1	81	45	3	3	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit beta	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_067718779.1	49	45	1	1	FAD-binding oxidoreductase	<i>Dietzia</i> sp. 111N12-1
WP_013718386.1	63	42	2	2	ABC transporter substrate-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013719904.1	62	42	1	1	LL-diaminopimelate aminotransferase	<i>Methanosaeta concilii</i>
BAL63107.1	93	42	2	2	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanosaeta concilii</i>
BAL63107.1	53	42	1	1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanosaeta concilii</i>
ADM52196.1	69	41	2	2	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit, partial	<i>Methanobacterium flexile</i>
EKQ54804.1	63	41	1	1	ATP-utilizing enzymes of ATP-grasp superfamily (probably carboligase)	<i>Methanobacterium</i> sp. Maddingley MBC34
WP_013719754.1	127	40	4	4	ABC transporter substrate-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
SCY12049.1	75	37	1	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)	<i>Microbacterium</i> sp. LKL04
WP_013718333.1	66	37	2	2	ketol-acid reductoisomerase	<i>Methanosaeta concilii</i>
pir E64491	64	37	1	1	N5,N10-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (coenzyme F420-dependent)	<i>Methanococcus jannaschii</i>
OQY04731.1	57	36	1	1	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Planctomycetales bacterium</i> 4572_13
KKG40403.1	75	34	1	1	acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex subunit beta	<i>Methanosarcina mazei</i>
WP_013719528.1	124	34	2	2	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_004030775.1	89	33	2	2	5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase	<i>Methanobacterium formicicum</i>
AEB67029.1	87	33	1	1	fasciclin domain protein	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6
AEB67029.1	70	33	1	1	fasciclin domain protein	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6
WP_013718654.1	69	31	2	2	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_013719834.1	55	29	2	2	phosphate-binding protein	<i>Methanosaeta concilii</i>
BAW31875.1	46	29	1	1	methyl-coenzyme M reductase I, subunit gamma	<i>Methanothermobacter</i> sp. MT-2
WP_013718623.1	410	28	15	7	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit gamma	<i>Methanosaeta concilii</i>
WP_015325027.1	96	28	2	2	coenzyme-B sulfoethylthiotransferase subunit gamma	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>
ELT48911.1	53	20	1	1	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	<i>Ochrobactrum intermedium</i> M86
OYV07818.1	86	16	1	1	cellulase, partial	<i>Methanosaeta</i> sp. ASP1-2
EQH17102.1	15	9	1	1	C-5 cytosine-specific DNA methylase family protein, partial	<i>Clostridioides difficile</i> DA00210
OYV10830.1	57	7	1	1	cellulase, partial	<i>Methanosaeta</i> sp. NSP1

Chapitre 3 :

Étude du DIET en mini-réacteur à deux chambres dans un environnement de digestion anaérobie

Mise en contexte

La formation microbiologique du méthane résulte principalement soit de la réduction du CO₂ précédée de la fermentation de la matière organique, soit de l'oxydation directe de l'acétate (10). Les environnements méthanogènes sont divers et répandus tels que les sédiments, les marécages, les rizières ou les bioréacteurs (171). Les microorganismes de ces environnements vivent de façon syntrophe ; les bactéries fermentaires produisent un excès d'électrons qui sont consommés par les archées méthanogènes (172). Cet échange d'électrons, à savoir les mécanismes d'IET, est la pierre angulaire de la digestion anaérobie où l'énergie disponible est très limitée (6). Cet échange peut être fait en utilisant l'hydrogène, le formate, ou par DIET (173).

Le DIET a été suggéré comme mécanisme de méthanogénèse il y a plusieurs années (11). Jusqu'à présent, il a été démontré que *Methanosarcina barkeri* et *Methanosaeta haurindaceae* effectuent le DIET en collaboration avec *Geobacter metallireducens* lors d'essais en cultures pures (32, 57). A ce jour, aucune autre espèce méthanogène, outre ces deux acétoclastes, n'a été identifiée précisément pour effectuer le DIET. Dans ces essais, la présence de pili de *Geobacter* s'est avérée essentielle. Ce type de DIET a été appelé DIET biologique (bDIET) : il se produit de cellule à cellule sans intermédiaire inorganique. En opposition, le DIET dépendant d'un matériau conducteur (mDIET), utilise un intermédiaire minéral (ou autre matériau conducteur) entre les bactéries fermentaires et les archées méthanogènes (78). Le mDIET a été mis en évidence avec du GAC, de l'acier inoxydable, du feutre de carbone, de la magnétite (un minéral semi-conducteur), des oxydes de fer et du biocharbon entre autres (revue de littérature dans (81)). En utilisant ces matériaux dans des digesteurs de moyenne ou de grande

taille, des résultats généralement favorables pour les taux et les rendements de production de méthane ont été rapportés. Même si ces résultats suggèrent la présence de mDIET entre les bactéries fermentaires et les méthanogènes, des preuves claires de son mécanisme restent à être trouvées (173). Tant pour le bDIET, qui se produit hypothétiquement dans la boue granulaire anaérobie, que pour le mDIET qui implique des matériaux additionnels, il est difficile d'évaluer séparément le rôle de chaque mécanisme d'IET qui peuvent impliquer l'hydrogène, le formate ou les électrons libres.

Objectifs

L'objectif de ce chapitre est de démontrer que les populations naturelles des granules anaérobies peuvent effectuer exclusivement le mDIET lors de la digestion anaérobie, c'est-à-dire que les autres mécanismes d'IET, impliquant l'hydrogène et le formate, sont exclus. Pour ce faire, un petit réacteur à deux chambres a été conçu où seule une communication électrique est possible entre ces deux chambres. Une membrane d'acier inoxydable conductrice sépare les deux chambres, où évolue d'un côté une population fermentaire productrice d'électrons, et de l'autre côté évolue une population méthanogène qui accepte ces électrons. On devrait pouvoir ainsi vérifier si ces populations peuvent bel et bien utiliser les matériaux conducteurs ajoutés aux réacteurs afin de réaliser le mDIET. Ceci pourrait mener au développement de protocoles de stimulation des digesteurs anaérobie, par exemple par ajout de microparticules conductrices, et de technologies bioélectrochimiques, par exemple à des piles électrolytiques microbiennes où le méthane est produit à la biocathode. On pourrait également vérifier ici que les méthanogènes non-acétoclastes, jamais montrées comme capables d'effectuer le bDIET, peuvent effectuer le mDIET. Ce sont d'ailleurs les méthanogènes non-acétoclastes qui sont habituellement enrichies aux biocathodes (82). Finalement, on devrait pouvoir aussi vérifier si les méthanogènes acétoclastes, capables de réaliser le bDIET, sont aussi capables de réaliser le mDIET.

Matériel et méthodes

Inoculum

Une boue granulaire anaérobie désintégrée a été utilisée pour inoculer le réacteur. La boue a été prélevée dans un digesteur de type UASB traitant les eaux usées de traitement des fruits (Lassonde Inc., Rougemont, QC, Canada, 45 ° 25'52.71 "N, 73 ° 03'12.15" W) et a été conservée à 4° C. Pour préparer l'inoculum, les granules de la boue ont été rincés avec du tampon carbonate anaérobie (par litre d'eau distillée : NaHCO₃ 10 g, NH₄Cl 0,5 g, KH₂PO₄ 0,3 g, K₂HPO₄ 0,4 g; pH 7,0) (93) puis traités par sonication (Sonics Vibra Cell VC130, sonde CV18 3987, S&M 0204) comme décrit dans le chapitre 1. La boue désintégrée obtenue a été tamisée sur mailles de 63 µm et le filtrat a été conservé et retenu comme l'inoculum méthanogène. L'inoculum fermentaire a été obtenu en chauffant l'inoculum méthanogène précédemment obtenu pendant une heure à 100°C.

Analyses chimiques

Les mesures de H₂, N₂, O₂, CO, CH₄ et CO₂ ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse (GC) Agilent 7820 (Wilmington, DE) couplé à un détecteur de conductivité thermique comme décrit précédemment (174). Le glucose, le formate et le lactate ont été mesurés en utilisant un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) (modèle de pompe 600, modèle d'échantillonneur automatique 717 plus, Waters Corp., Milford, MA) équipé d'un détecteur d'indice de réfraction (Waters modèle 2414), tel que décrit précédemment (97). Les acides gras volatils (acétate, propionate et butyrate) et les alcools (méthanol, éthanol, 2-propanol, tert-butanol, n-propanol, sec-butanol et n-butanol) ont été mesurés sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 (Wilmington, DE) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) comme décrit précédemment (175). Les solides volatils en suspension (VSS) ont été obtenus par différence entre les poids secs et les poids de cendres, selon les méthodes standard (96).

Configuration du réacteur

La figure 7 montre le design du réacteur conçu en poly(méthacrylate de méthyle), commercialisé sous le nom de *Plexiglas*. Une membrane d'acier inoxydable de 4 cm² et d'épaisseur de 0,1 mm (Goodfellow, AISI316), et une membrane de Nafion renforcée de 4 cm² (Ion Power Inc., NR438) dans le cas de l'essai #4 (table 10), séparent les deux chambres. Les deux plaques sont changées en fonctions des membranes utilisées. Les deux chambres contiennent chacune 20 mL de tampon carbonate anoxique enrichi avec une solution SL-10 (0,1%) et 20 mL d'espace de tête, initialement composé de N₂:CO₂ (80:20). La solution SL-10 est une solution d'oligo-éléments (par litre d'eau distillée : HCl 7,7 M 10 ml; FeCl₂·4H₂O 1,5 g; ZnCl₂ 70 mg; MnCl₂·4H₂O 100 mg; H₃BO₃ 6 mg; CoCl₂·6H₂O 190 mg; CuCl₂·2H₂O 2 mg; NiCl₂·6H₂O 24 mg; Na₂MoO₄·2H₂O 36 mg; www.dsmz.de). Le côté fermentaire (côté gauche) du réacteur a été inoculé avec 0,1 g VSS/L d'inoculum chauffé. L'addition de 18 mg (0,1 mmol) de glucose tous les deux jours permet la croissance du biofilm de bactéries fermentaires sur la feuille d'acier inoxydable; le tampon assure un pH stable. Le côté méthanogène (côté droit) a été inoculé à 0,1 g VSS/L avec l'inoculum méthanogène et, contrairement au côté fermentaire, le côté méthanogène n'a pas été alimenté, sauf pour l'essai #5 (Table 10), où 12 mg (0,2 mmol) d'acétate était ajouté tous les deux jours. Le réacteur a été placé dans un incubateur à 35°C et mis en rotation à 150 RPM, avec deux petites billes pour créer des turbulences dans les chambres, pendant environ 40 jours pour chaque essai. Les deux chambres ont été délicatement rincées chaque semaine avec un nouveau tampon pour éliminer le milieu épuisé et les cellules non attachées. L'atmosphère des espaces de tête a également été rafraîchie au même moment. Des témoins négatifs avec une seule inoculation unilatérale ont également été effectués comme décrit pour les essais #2 et #3 (Table 10).

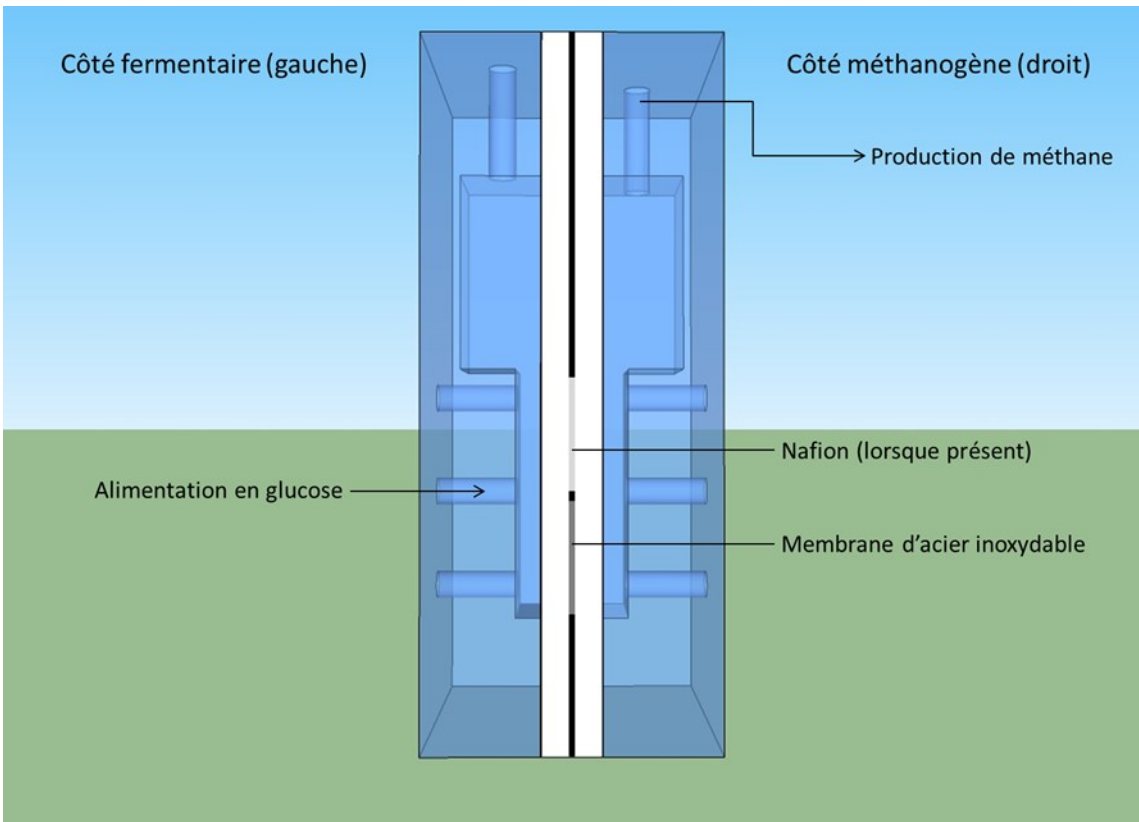
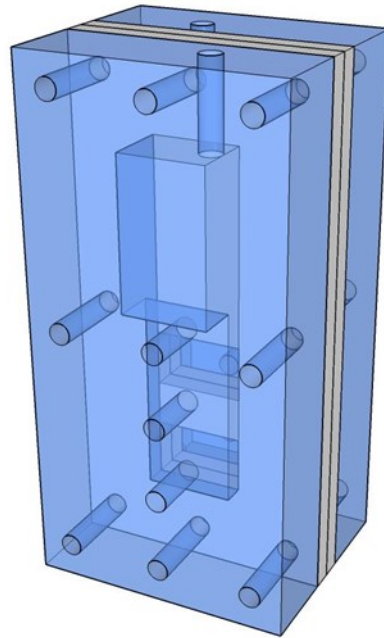
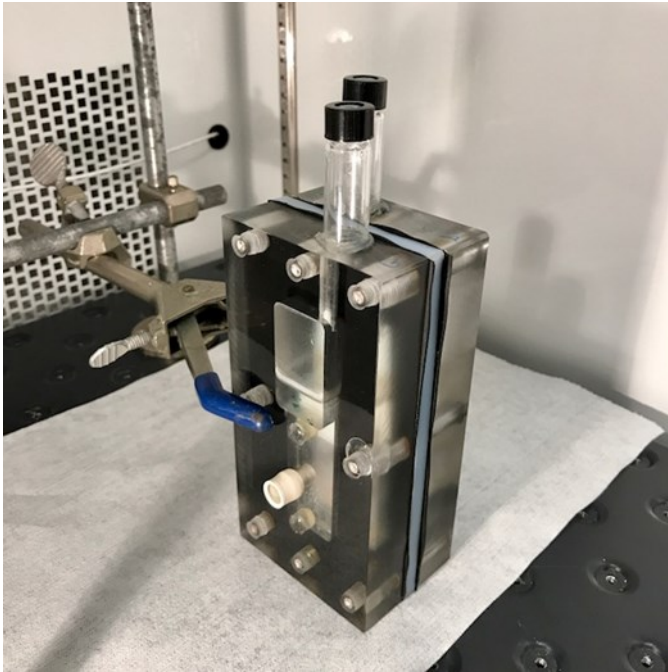


Figure 7 : Configuration du réacteur

Tableau 10 : Description des essais

# Essai	Côté fermentaire (gauche)	Alimentation du côté fermentaire (gauche)	Côté méthanogène (droit)	Alimentation du côté méthanogène (droit)	Nafion
1	inoculé	glucose	inoculé	-	non
2	inoculé	glucose	abiotique	-	non
3	abiotique	-	inoculé	-	non
4	inoculé	glucose	inoculé	-	oui
5	inoculé	glucose	inoculé	acétate	non

Microscopie électronique à balayage

Des sections de la membrane d'acier inoxydable ont été récupérées, fixées, déshydratées dans un appareil CPD 030 (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) en utilisant la méthode de séchage par points critiques, revêtues d'une fine couche d'Au-Pd et observées avec un microscope S-4700 Hitachi FE-SEM (Tokyo, Japon) comme décrit précédemment (97).

Extraction d'ADN et PCR

Le biofilm qui a poussé de chaque côté de la membrane d'acier inoxydable a été récupéré et s'en est suivi une extraction d'ADN en utilisant le trousse d'isolement d'ADN PowerSoil (MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA) selon les instructions du fabricant. L'ADN a également été extrait de l'inoculum original (non bouilli). Les gènes de l'ARNr 16S bactérien et archéal ont été amplifiés par PCR comme décrit dans (100). Un identifiant multiplex spécifique à chaque échantillon a été ajouté pour chaque amorce « forward » et un adaptateur Ion Torrent (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) a également été ajouté à chacune des amorces. Les détails des réactions d'amplification peuvent être trouvés dans une publication antérieure (101).

Analyse de la communauté microbienne par séquençage à haut débit (HTS)

Les produits de PCR ont été purifiés et quantifiés en utilisant respectivement un kit d'extraction de gel QIAquick (Qiagen, Valencia, CA) et un kit de quantification d'ADN double brin Quant-iT PicoGreen (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) selon les instructions du fabricant. Les amplicons du gène de l'ARNr 16S bactérien et archéal ont ensuite été séquencés en utilisant la plate-forme de séquençage Ion Torrent avec une puce 314 selon les instructions

du fabricant. Pour l'analyse, les séquences géniques de l'ARNr 16S bactérien et archaéal ont été analysées en utilisant le classificateur du projet de la base de données ribosomique (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu>) (102) en utilisant un seuil de confiance « bootstrap » de 50%, tel que recommandé par le classificateur pour les séquences courtes (moins de 250 pb) (103). Les séquences qui étaient plus courtes que 75 pb et les séquences avec des bases non identifiées ont été retirées de l'analyse.

Résultats et discussion

Un petit réacteur avec deux chambres séparées par une membrane d'acier inoxydable a été utilisé pour évaluer si les électrons pouvaient être transférés d'une population de bactéries fermentaires qui consomme du glucose d'un côté (gauche) à une population de méthanogènes affamée de l'autre côté (droit) par un matériau conducteur (figure 7). Différents essais ont été réalisés tels que décrits à la table 10. Le réacteur a fonctionné pendant environ 40 jours pour chaque essai avec une alimentation en glucose du côté fermentaire (sauf pour l'essai #3 où le côté fermentaire était abiotique). Pour l'essai #4, une membrane de Nafion a été ajoutée en plus de la membrane d'acier entre les deux chambres, et pour l'essai #5, une alimentation en acétate a aussi été effectuée du côté méthanogène. Une fois par semaine, le milieu de culture des deux côtés a été remplacé par du milieu frais et l'atmosphère de l'espace de tête des deux côtés, renouvelée, afin de favoriser la croissance des biofilms attachés sur la membrane d'acier. Cela permettait aussi d'éliminer les cellules en suspension et les métabolites indésirables. Une production de méthane est attendue du côté méthanogène si les électrons, provenant de l'oxydation du glucose, passent à travers la membrane d'acier conductrice et sont utilisés pour réduire le CO₂ par les méthanogènes affamés. Les cellules formant le biofilm de fermentation seraient alors capables de créer dans la membrane d'acier un potentiel d'oxydoréduction suffisamment bas pour permettre la méthanogénèse du côté opposé. Une fois initiée, cette voie favoriserait la croissance d'espèces capables d'exporter du côté fermentaire, ou d'importer du côté méthanogène, les électrons directement à travers leur membrane cellulaire. Ainsi, l'apparence générale des biofilms observés en microscopie serait donc différente d'un essai à l'autre, selon qu'il y eut présence ou non de DIET.

Dans le premier essai réalisé, où il n'y avait pas de membrane de Nafion utilisée entre les deux chambres du réacteur, les deux chambres ont été inoculées, et le côté méthanogène était maintenu en famine. Le Nafion est un polymère synthétique aux propriétés ioniques appelé ionomère. Il est utilisé en tant que membrane conductrice de protons (PEM), entre autres pour les piles microbiennes. Les pores permettent le mouvement des cations, mais ne permettent pas le transfert d'anions ou d'électrons. La membrane de Nafion a été omise dans cet essai puisqu'elle est légèrement perméable à l'acétate et à l'éthanol. L'objectif du test étant de démontrer que le méthane produit du côté méthanogène provient uniquement de la réduction du CO₂ à l'aide des électrons traversant la membrane conductrice d'acier, il fallait que le transfert d'acétate ou d'éthanol du côté méthanogène soit impossible, puisque ces molécules auraient permis la production de méthane ne provenant pas du mDIET. Étant donné que seulement une faible production de méthane provenant du mDIET était attendue, on a jugé que le tampon carbonate serait suffisant comme source de proton pour cette production de méthane.

Au cours de cet essai, aucune production de méthane n'a été observée. Les biofilms ont toutefois été observés en microscopie (figure 8). Du côté fermentaire, la membrane d'acier est fortement colonisée par les bactéries (figure 8A). À plus fort grossissement (figure 8B et 8C), il est possible d'observer une population de bactéries qui évoluent sur l'acier avec une présence de pilis, sans toutefois couvrir complètement la surface. Les pilis pourraient constituer des nanofils bactériens et suggérer qu'il y a un échange électrique entre les deux populations. Du côté méthanogène, la membrane d'acier est faiblement colonisée (figure 8D). Par contre, en observant les cellules présentes à plus fort grossissement, il est possible de remarquer, tout comme du côté fermentaire, des pilis qui les entourent (figures 8E et 8F). L'absence de méthane produit pour cet essai peut s'expliquer par deux hypothèses. 1) Les populations naturelles des granules anaérobies sont incapables d'effectuer le mDIET lors de la digestion anaérobie. 2) Une membrane conductrice de protons est essentielle à la réalisation du mDIET entre les deux chambres. Dans le cas de la deuxième hypothèse, malgré qu'aucune augmentation du pH ne soit observée, le tampon carbonate serait insuffisant pour fournir les protons nécessaires à la réduction du CO₂ avec les électrons transmis via la membrane d'acier. Pour tenter de répondre à cette question, il fallait donc qu'une membrane de Nafion soit ajoutée, ce qui a nécessité l'essai #4.

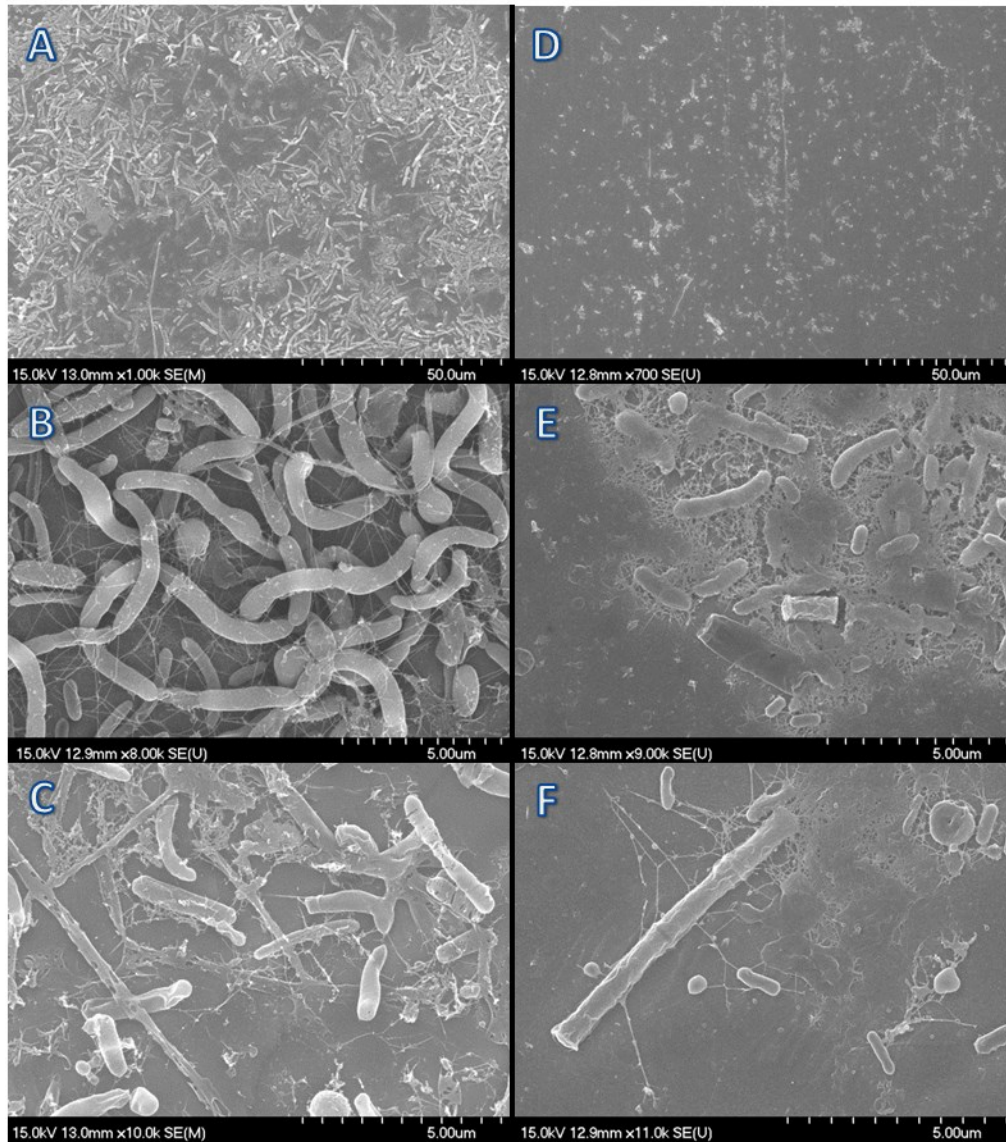


Figure 8 : Images au microscope électronique à balayage de l'essai #1
Côté fermentaire (A, B et C) et méthanogène (D, E et F) de la membrane d'acier colonisée après 40 jours pour différents grossissements.

Dans le but de savoir si les deux biofilms de l'essai #1 s'influençaient l'un l'autre, par exemple avec la formation de pilis possiblement conducteurs d'électrons, et ce, même si la

production de méthane n'était pas détectable, on a réalisé des essais pour suivre l'évolution des biofilms sur la membrane d'acier, de part et d'autre, lorsque l'autre côté est abiotique. L'essai #2 fut inoculé seulement du côté fermentaire et l'essai #3, seulement du côté méthanogène (Table 10). De façon attendue, aucune production de méthane n'a été observée pour les deux essais. La figure 9 montre les biofilms observés en microscopie; A, B et C pour l'essai #2 et D, E et F pour l'essai #3. Pour l'essai #2, on observe bien que les bactéries fermentaires ont fortement colonisé la membrane d'acier. Par contre, le biofilm s'est développé d'une façon différente de celui de l'essai #1. Il couvre d'une façon beaucoup plus uniforme la membrane d'acier et la matrice d'EPS est beaucoup plus dense. À plusieurs endroits, la membrane d'acier n'est plus visible. À plus fort grossissement (figures 9B et 9C), on remarque que les cellules sont imbriquées dans les EPS et qu'aucun pili n'est observable. L'interaction avec ou l'accès à la membrane d'acier semble inutile pour les cellules. Pour l'essai #3, les micrographies montrent le biofilm du côté méthanogène. Étonnamment, la surface est davantage occupée que pour l'essai #1. Par contre, à plus fort grossissement, on réalise encore une fois qu'il y a présence de beaucoup d'EPS et que la quantité de cellules observables est semblable à l'essai #1. Et tout comme le côté fermentaire de l'essai #2, aucun pili n'est observable. Il semble y avoir beaucoup de débris et de cellules mortes. Il semble donc évident que les biofilms qui se développent de part et d'autre de la membrane d'acier peuvent s'influencer l'un l'autre. Faute d'électrons manifestement destinés à la réduction du CO₂ du côté méthanogène, il y aurait à tout le moins une communication entre les fermentaires et les méthanogènes, une communication possible via un matériau conducteur.

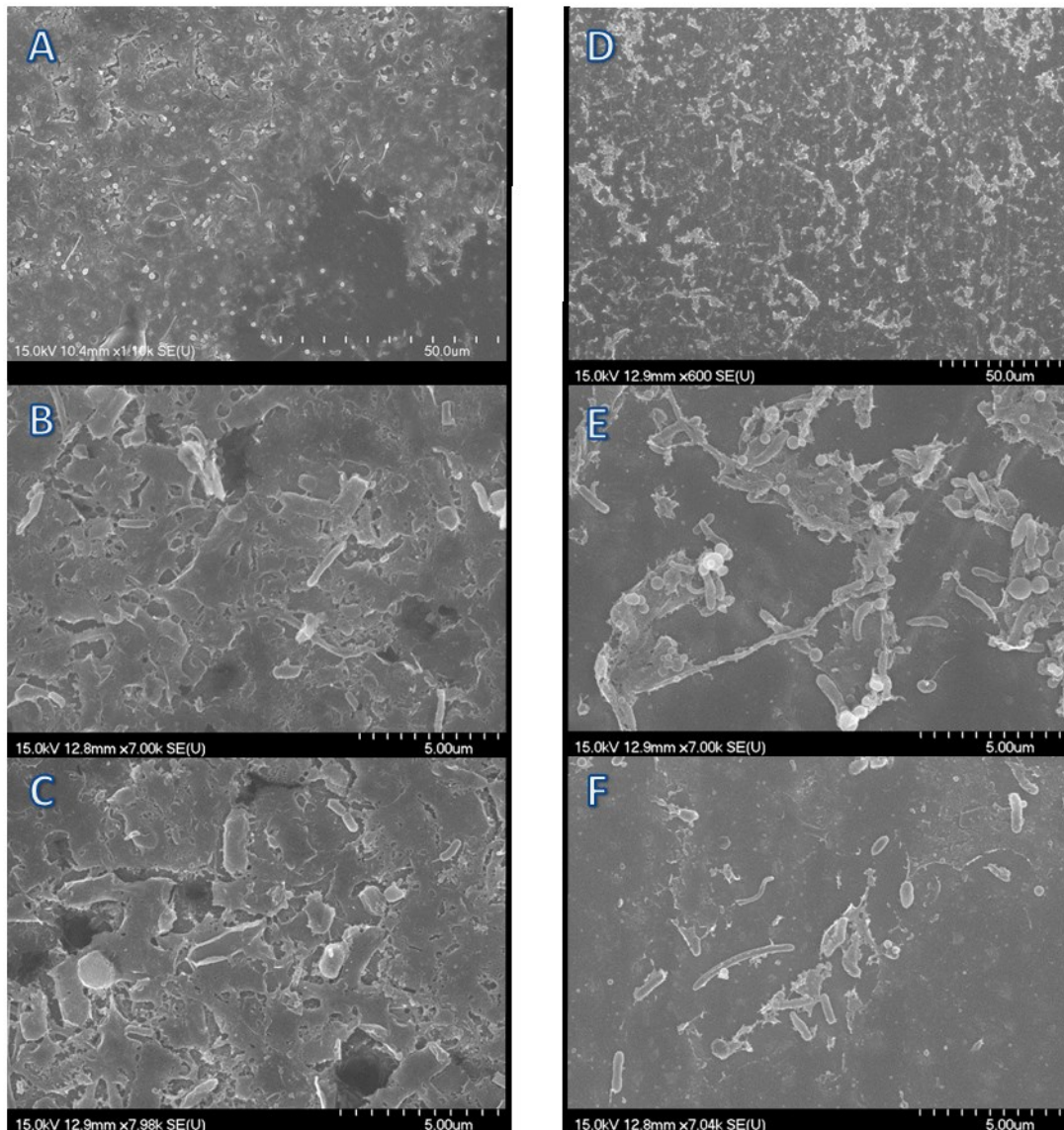


Figure 9 : Images au microscope électronique à balayage de l'essai #2

Côté fermentaire (A, B et C) et de l'essai #3 du côté méthanogène (D, E et F) de la membrane d'acier colonisée après 40 jours pour différents grossissements.

Dans l'essai #4, les deux chambres du réacteur ont été inoculées comme dans l'essai #1 mais cette fois-ci en ajoutant aussi une membrane de Nafion entre les deux chambres. L'objectif est de valider une production de méthane du côté méthanogène, sachant qu'elle peut provenir

soit du mDIET, soit de la diffusion d'acétate au travers la membrane de Nafion, et de voir si l'une peut être différenciée de l'autre.

Une faible production de méthane a été détectée du côté méthanogène affamé. La figure 10A en montre la production en fonction des semaines d'opération. Les premières semaines, peu de méthane a été détecté. Avec l'acclimatation et la croissance du biofilm, le taux de production de méthane a augmenté d'une semaine à l'autre, malgré l'absence de substrat, atteignant 21 $\mu\text{L}/\text{d}$. En parallèle de cette production de méthane du côté méthanogène, les produits de fermentation du glucose ajouté du côté fermentaire (figure 10B) ont été dosés et suivis lors de l'essai. L'acétate, le propionate et le butyrate ont été détectés, l'acétate étant le principal produit, atteignant un maximum de 2 g/L, tandis que le propionate n'a pas dépassé une concentration de 0,2 g/L et le butyrate 0,06 g/L. La figure 10C montre l'accumulation de ces produits de fermentation détectés en fonction des semaines d'opération, en équivalents-méthane. La figure 10D montre l'équivalent-méthane du côté fermentaire mais pour l'acétate seulement, le principal produit de fermentation détecté. L'équivalent-méthane est une mesure qui sert à comparer différents substrats de la méthanogénèse. Elle est calculée en fonction du nombre de moles maximum de méthane que peut produire une mole de substrat lors de la digestion anaérobie. Par exemple, 1 mole de glucose peut produire au maximum 3 moles de méthane, tandis qu'une mole d'acétate ne peut produire qu'une seule mole de méthane. Avec les semaines, l'équivalent-méthane des produits de fermentation qui s'accumulent dans le réacteur tend à diminuer légèrement, ce qui laisse croire que davantage de ceux-ci (sous forme d'électrons libres via la membrane d'acier ou sous forme d'acétate via la membrane de Nafion) sont transférés du côté méthanogène. La vitesse de diffusion de l'acétate au travers la membrane de Nafion est fonction de la résistance du matériau et du gradient de concentration de part et d'autre, et ne devrait donc pas augmenter avec les semaines, d'autant plus que la concentration en acétate du côté fermentaire diminue avec les semaines (Figure 10E). Il est donc possible que la quantité d'équivalents-réducteurs transférés sous forme d'électrons libres via la membrane d'acier augmente de semaine en semaine alors que celle transférée sous forme d'acétate via la membrane de Nafion diminue.

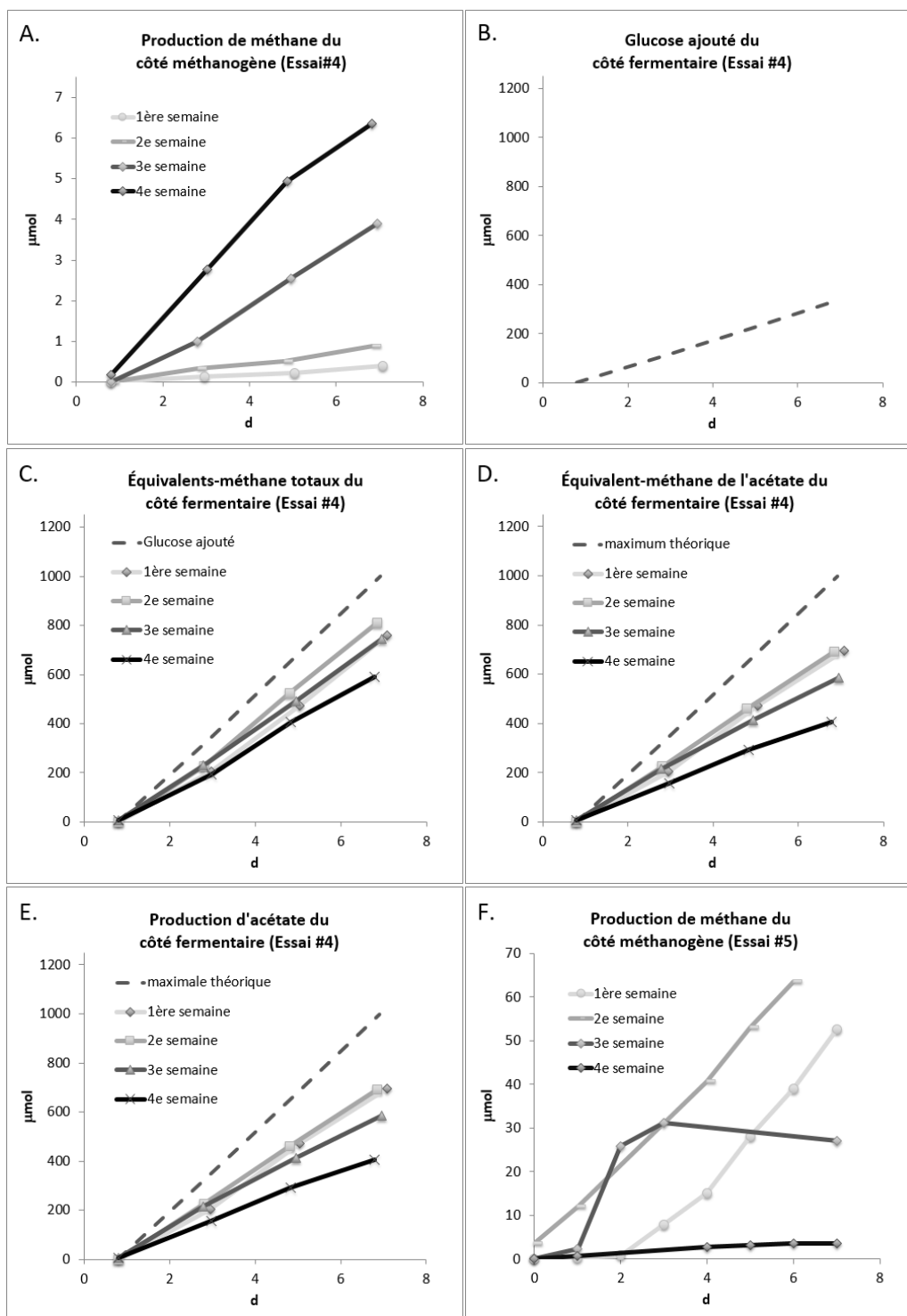


Figure 10 : Substrats et produits des essais #4 et #5

C et D : L'équivalent-méthane d'un substrat est son équivalence, mole pour mole, avec le maximum de potentiel en méthane de celui-ci. D et E : Le maximum théorique correspond au maximum qui peut être produit en fonction du glucose ajouté.

Cela suggère qu'il y a bien des électrons qui circulent à travers la membrane d'acier pendant le test et qui seraient utilisés par les méthanogènes affamés de l'autre côté pour réduire le CO₂ en CH₄ et s'alimenter. La production croissante de méthane serait associée à la croissance des biofilms de chaque côté de la membrane d'acier expliquant un plus grand rendement.

Les micrographies à balayage électronique des biofilms de l'essai #4 sont illustrées à la figure 11. Du côté fermentaire (A, B et C), l'apparence globale ressemble beaucoup à celle de l'essai #1, quoique légèrement plus peuplée. Le biofilm semble bien vivant avec les EPS moins uniformes qu'à l'essai #2. À plus forts grossissements, des creux bien visibles qui donnent accès à la membrane d'acier sont de toute évidence observés. Un dense réseau de pilis s'est mis en place, plus important que celui observé à l'essai #1. Cette architecture de biofilm avec des pilis qui est observée au cours de cet essai #4, a déjà été observée précédemment sur des anodes ainsi que des cathodes (3). Du côté méthanogène, le biofilm le plus dense observé de ce côté est illustré aux figures 11D, E et F. Les cellules sont nombreuses et les pilis font manifestement des liens entre les cellules et l'acier inoxydable. Le développement du biofilm reste non complet, mais semble plus organisé avec un meilleur recouvrement de la surface que les biofilms observés du même côté dans les autres essais.

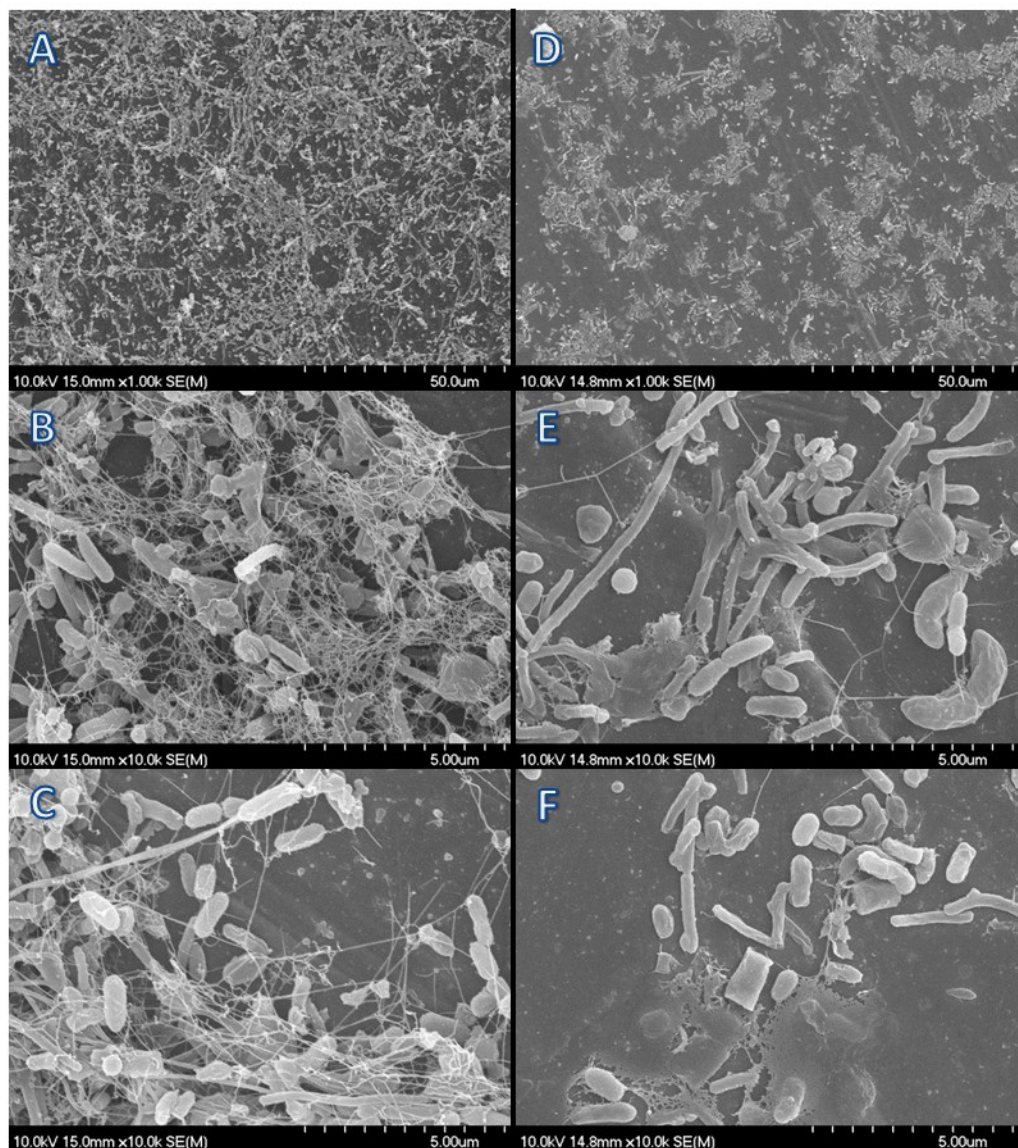


Figure 11 : Images au microscope électronique à balayage de l'essai #4

Côté fermentaire (A, B et C) et méthanogène (D, E et F) de la membrane d'acier colonisée après 40 jours pour différents grossissements.

Une analyse de séquençage des populations se développant de chaque côté de l'acier inoxydable a été réalisée pour l'essai #4 (Table 11). La population d'archées du côté méthanogène et la population bactérienne du côté de la fermentation ont subi des changements importants par rapport à la population initiale de l'inoculum.

Tableau 11 : Abondance relative des genres bactériens et d'archées selon un HTS de l'inoculum et des deux enrichissements provenant des chaque côté de la membrane d'acier du petit réacteur pour l'essai #4

Essai #4	Innoculum	Enrichissement côté fermentaire	Enrichissement côté méthanogène
ARCHÉES			
Methanobacterium	52%	19%	19%
Methanosaeta	37%	1%	24%
Methanobrevibacter		11%	6%
Methanosarcina	1%		9%
Methanothermobacter		5%	3%
Methanolinea	3%		1%
BACTÉRIES			
Anaerobacter		31%	3%
Propionibacterium	13%		
Pleomorphomonas		10%	2%
Propioniciclava	8%		
Desulfomicrobium	7%		
Petrimonas		4%	5%
Sporomusa		4%	1%
Hydrogenophaga		1%	3%
Treponema	1%	2%	1%
Tissierella		2%	
Acetoanaerobium		1%	2%
Aminivibrio	1%		
Clostridium	1%		
Desulfobulbus	1%		
Desulfoglaeba	1%		
Geobacter	1%		
Propionicimonas	1%		
Smithella	1%		
Streptomyces	1%		
Syntrophobacter	1%		
Syntrophorhabdus	1%		
Syntrophus	1%		
Propionivibrio		1%	
Pseudomonas			1%
Thauera			1%

La population bactérienne du côté de la fermentation s'est grandement enrichie pour les genres *Anaerobacter* et *Pleomorphomonas* entre autres, qui tous deux représentaient 31% et 10% de la population finale, et moins de 1% dans l'inoculum initial de boue. Ces deux genres ont été trouvés présents dans des populations d'anodes dans les MFC suggérant donc un rôle dans le transfert d'électrons (176-178). *Anaerobacter* appartient à la famille des Clostridiacées et est une bactérie fixatrice d'azote qui est capable de former plusieurs spores (179, 180). *Pleomorphomonas* est un genre appartenant à la famille des Methylocystaceae, qui utilise les glucides comme source de carbone et a également été retrouvée présente dans des biocathodes (181, 182).

Les populations d'archées du côté méthanogène se sont quant à elles aussi diversifiées pendant l'essai #4. *Methanobacterium* et *Methanosaeta* sont demeurés les genres les mieux représentés, mais *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina* et *Methanothermobacter* ont fortement proliféré. Des souches de *Methanosaeta* et *Methanosarcina* ont été montrées capables d'effectuer le bDIET (32, 57). Cependant, ce n'est pas le cas pour les autres méthanogènes. Les méthanogènes non-acétoclastiques sont des méthanogènes sans cytochromes (54) et ces hèmes-protéines pourraient bien être essentielles pour effectuer le DIET (33, 183, 184), quoiqu'il ait été également proposé que les hydrogénases membranaires pourraient remplacer la fonction des cytochromes à la surface membranaire (185). Il a également été proposé que des hydrogénases extracellulaires puissent réduire les protons à l'aide d'électrons pour produire de l'hydrogène (186). Les méthanogènes non-acétoclastiques pourraient donc éventuellement participer au DIET, ou du moins indirectement, en consommant les électrons pour produire de l'hydrogène au niveau de la membrane externe ou du milieu environnant.

L'essai #4 impliquant la membrane de Nafion, et sa perméabilité à l'acétate, mène à une autre hypothèse concernant les expériences ici décrites. Il est possible que l'acétate soit nécessaire aux méthanogènes acétoclastes pour effectuer le DIET. Les essais sur le DIET en cultures pures avec *Methanosaeta* et *Methanosarcina* ont été réalisés avec de l'éthanol comme substrat, qui fournit toujours l'acétate en même temps que des électrons lors de son oxydation (32, 57). Le DIET chez les acétoclastes pourrait être exécuté simultanément avec la consommation d'acétate comme une voie complémentaire, mais pas comme une voie unique.

Le DIET pourrait donc être dépendant de la présence d'acétate. Le DIET implique la réduction du CO₂ à l'aide d'électrons venant de l'extérieur de la membrane cellulaire. Lors de ce processus, qui implique 4 étapes successives de réduction-oxydation, les enzymes impliquées ne peuvent utiliser que 3 substrats réduits : l'hydrogène, la ferrédoxine et la coenzyme F₄₂₀ (187). Il existe une certaine interchangeabilité entre ces substrats, mais elle est mal comprise, et est fort probablement spécifique. Dans le cas du formate, l'interchangeabilité avec l'hydrogène est clairement établi et efficace, ce qui ne semble pas le cas pour les autres substrats réduits énoncés plus haut. Il est possible que lors de la réduction du CO₂ pendant le DIET, les acétoclastes puissent utiliser les électrons externes pour effectuer certaines des étapes, mais que pour une (ou certaines) de ces étapes, cette voie soit impossible. Comme lors de l'oxydation de l'acétate chez les acétoclastes, la ferrédoxine est réduite, il est possible que cette ferrédoxine réduite puisse pallier à (ou aux) étapes impossibles à réaliser par la voie du DIET. Ainsi les deux voies métaboliques (la réduction du CO₂ et l'oxydation de l'acétate) peuvent avoir lieu simultanément.

L'objectif de l'essai #5 était donc de valider l'influence réelle de la présence de la membrane de Nafion à l'essai #4 comme transporteur de protons, et non d'acétate, comme étant essentielle au mDIET. Lors de cet essai, la membrane de Nafion était absente, c'est-à-dire qu'un essai semblable à l'essai #1 a été réalisé, mais le côté méthanogène a été alimenté en acétate, pour mimer les conditions de l'essai #4 où de l'acétate diffusait au travers de la membrane de Nafion. Au cours de cet essai, le méthane est produit avec l'acétate ajouté du côté méthanogène. De façon surprenante, la production de méthane cesse au cours de la 3^e semaine du côté méthanogène (figure 10F). La culture alimentée en acétate adhère très peu aux parois et à la membrane d'acier du réacteur, et lors des rinçages hebdomadaires, elle est de plus en plus lessivée, menant à l'extinction des acétoclastes. À ce propos il est possible que des substrats solubles (ici l'acétate) maintiennent les populations microbiennes plutôt en suspension que sous forme d'un biofilm, comme l'encouragerait plutôt le DIET par exemple, avec la formation de pilis et des EPS. Étant donné que *Methanosaeta* est reconnue comme jouant un rôle important, sinon le rôle le plus important, lors de la granulation dans les réacteurs UASB (153), il est possible que ce soit en effectuant le DIET, plus que la méthanogénèse acétoclastique, qu'elle arrive à jouer ce rôle. Le DIET induirait l'expression d'un phénotype chez *Methanosaeta* axé

sur la production d'EPS et de pilis. L'efficacité reconnue du granule serait ainsi directement liée au mécanisme du DIET, qui, à la base, a nécessairement besoin que les cellules soient reliées entre elles pour exister. Le DIET en conférant un avantage compétitif - celui d'avoir un 3e type d'IET plus rapide que l'échange d'hydrogène ou de formate - aux espèces qui en sont capables, agirait comme mécanisme de sélection favorisant les microorganismes capables de s'auto-agrégier, donc favorisant une granulation dense. Par conséquent, les réacteurs de type UASB, conçus spécifiquement pour conserver les agrégats et les granules, favorisent l'enrichissement en espèces qui ont une prédisposition pour effectuer le DIET.

Pour conclure, certaines évidences présentées ici suggèrent que les populations naturelles des granules anaérobies, excluant *Geobacter*, sont capables d'effectuer le mDIET au travers d'une membrane d'acier inoxydable. Nous ne pouvons cependant affirmer si ce mécanisme peut être exclusif, c'est-à-dire le seul pour assurer la survie et la croissance des méthanogènes. Il est possible que les méthanogènes qui effectuent le DIET aient besoin d'une voie secondaire, comme l'oxydation de l'acétate, en simultané pour arriver à effectuer toutes les étapes nécessaires à la réduction du CO₂. Dans un digesteur normal, ce pourrait être aussi l'hydrogène ou le formate qui comblerait cette ou ces étapes que le DIET ne peut accomplir. Comme il est difficile de différencier les trois voies d'IET dans le granule, le type d'expérience réalisée ici demeure important et pertinent pour notre compréhension future du DIET. Concernant les méthanogènes non-acétoclastiques, il est possible que leur implication dans le mDIET soit importante, mais il reste à déterminer précisément leur rôle et de quelle façon elles sont impliquées. Finalement, il est hautement probable que *Methanosarcina*, une acétoclaste capable d'effectuer le bDIET, soit aussi capable d'effectuer le mDIET, puisque son enrichissement sur la membrane d'acier a été démontré ici lors d'un test où les électrons menant à la formation du méthane provenaient de l'autre côté de celle-ci.

Conclusion

L'objectif de ce projet de recherche consistait à déterminer si certaines espèces microbiennes d'un biofilm anaérobie granulaire se transfèrent des électrons par la matrice protéinique extracellulaire (EPS). Cette section discute de façon critique des résultats de la littérature et des résultats obtenus dans cette étude, de leur importance, tout en identifiant quelques aspects spécifiques qui mériteraient une attention particulière lors de futures investigations. Elle aborde tout d'abord le bDIET, pour terminer avec le mDIET.

bDIET

Peu de choses sur la présence du bDIET dans les populations anaérobies mixtes naturelles n'étaient et ne sont toujours pas connues. Tel que mentionné au chapitre 1, les MPA du formate et de l'hydrogène diminuent en présence d'un co-substrat non-méthanogène tel que l'éthanol, ce qui peut indiquer que le bDIET se produit et entre en compétition avec l'hydrogène et le formate. Par contre, des techniques d'investigation plus puissantes sont nécessaires pour valider de manière adéquate l'existence et l'activité de bDIET dans les granules anaérobies, ce qui est assez difficile.

Un des premiers éléments importants qui est ressorti de cette étude a été la démonstration de la quasi-absence de *Geobacter* dans les trois boues granulaires étudiées (Agropur, Lassonde et Tembec). *Geobacter* n'a jamais été enrichie non plus au cours des essais réalisés ici (essais avec microparticules et petit réacteur). Ceci marque une grande différence avec la plupart des études publiées sur le DIET à ce jour. Est-il important, voire primordial, que *Geobacter* soit présent pour qu'il y ait présence de DIET ?

Pour répondre à cette question, une expérience clé de la publication de Morita et collaborateurs parue en 2011 (72) a été reproduite ici. Ils démontraient que, dans des granules anaérobies nourris à l'éthanol, le méthane était produit plus rapidement que ceux nourris avec du formate ou de l'hydrogène en combinaison avec de l'acétate, qui sont pourtant les produits d'oxydation de l'éthanol. Ceci suggère qu'une troisième voie de transfert des électrons, plus rapide que celle avec l'hydrogène ou le formate, existe lorsque l'éthanol est utilisé comme

substrat. Ces résultats n'ont pas été reproduits avec les granules dépourvus de *Geobacter* utilisés dans la présente étude. Cette discordance remettait en question l'existence du DIET sans *Geobacter*. Par contre, en se penchant un peu plus longuement sur la méthode utilisée par Morita et collaborateurs, une importante faiblesse fut notée dans le protocole. Lors des tests avec hydrogène utilisé comme substrat, seulement 0,7 atmosphère du mélange de gaz H₂:CO₂ (80:20) fut ajouté aux microcosmes, ce qui est beaucoup trop peu pour permettre un transfert de masse adéquat de l'hydrogène à l'état gazeux vers le liquide, n'assurant pas ainsi une concentration d'hydrogène dans le liquide suffisante pour observer la vitesse maximale de consommation d'hydrogène que les granules peuvent atteindre. Ils expliquèrent que l'activité de consommation d'hydrogène était très faible parce que 90% des archées présentes appartenaient au genre *Methanosaeta* et que ceux-ci ne consomment pas l'hydrogène. Or, dans un granule à très forte présence d'acétoclastes (par exemple *Methanosaeta*), il y a généralement une forte population réalisant l'homoacétogénèse, transformant rapidement l'hydrogène en acétate. Cette activité hydrogénéophile aurait dû être observée. Nous mesurons habituellement l'activité de la consommation de l'hydrogène d'une population microbienne en ajoutant une pression de 3 atmosphères dans la tête de la bouteille et nous l'agitons à 400 RPM pendant son incubation. Ces conditions permettent d'obtenir un transfert de masse de l'hydrogène gazeux vers le liquide qui n'est pas limitant. Il est ainsi possible d'évaluer la vitesse de consommation réelle de l'hydrogène par la population microbienne. Nos résultats devenaient donc incomparables avec ceux de Morita. Ce type d'expérience, refaite avec des granules riches en *Geobacter*, pourrait nous apporter plus de réponses.

Une autre étude, sortie en 2014, s'est penchée sur l'importance de *Geobacter* pour le bDIET. Un point qu'amenaient Morita et collaborateurs en 2011 pour démontrer le potentiel des granules anaérobies à effectuer le bDIET était que les granules étaient conducteurs. Cette autre étude a donc évalué la corrélation entre la présence de *Geobacter* et la conductivité de granules provenant de plusieurs digesteurs (73). Il fut démontré qu'une corrélation modérée ($r = 0.67$) existait entre ces deux paramètres. Malheureusement, cette étude n'a utilisé que des granules provenant de digesteurs UASB traitants tous des eaux usées de brasserie, et tous les échantillons contenaient *Geobacter*. Il serait intéressant de connaître la conductivité des boues granulaires provenant de digesteurs traitant d'autres types d'eaux usées et où *Geobacter* n'est pas présente,

ou du moins, peu détectée. Aussi, dans cette étude de 2014, la majorité des granules avaient une conductivité très faible; seulement 5 digesteurs sur 14 avaient des granules avec des conductivités de plus de 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, avec un maximum d'environ 40 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pour un granule avec 30% de *Geobacter*. En 2011, Morita et collaborateurs avaient obtenu une conductivité élevée de près de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ avec des granules qui contenaient 25% de *Geobacter*. Cette conductivité était d'ailleurs 3 fois plus élevée que les conductivités précédemment rapportées pour des agrégats à deux espèces dans lesquelles les deux espèces – *Geobacter metallireducens* et *Geobacter sulfurreducens* - effectuaient le bDIET. Ceci démontre que *Geobacter* joue un rôle dans la conductivité granulaire, mais que ce n'est probablement pas le seul, puisqu'il y a une variation non expliquée dans les résultats obtenus. Il n'y a donc pas, à nos yeux, de raison évidente pour donner l'exclusivité du bDIET aux granules anaérobies qui contiennent *Geobacter*.

Un autre élément critique sur lequel nous nous sommes penchés pendant cette étude est la méthode d'extraction des EPS. Tout d'abord, lorsque des analyses en spectrométrie de masse sont planifiées, les méthodes physiques sont généralement préférées aux méthodes chimiques, car ces dernières conduisent généralement à une contamination chimique de l'extrait. De plus, la procédure d'extraction doit être optimisée pour éviter au maximum la lyse cellulaire afin d'éviter une contamination de l'extrait par les protéines intracellulaires. Finalement, la méthode d'extraction doit aussi assurer un extrait représentatif des EPS du granule. C'est pour ces raisons que l'extraction par sonication fut retenue. Par contre, lors de cette extraction, il est possible que les protéines structurales des EPS ne se soient pas solubilisées. Comme seule la fraction solubilisée des EPS a été recueillie et analysée ici, la fraction des EPS à l'état solide (ou insoluble) a probablement été négligée. Par exemple, les pilis pourraient ne pas avoir été solubilisés dans le milieu aqueux et avoir été exclus de l'analyse. Des HS ou des hydrates de carbone insolubles pourraient également avoir été omis alors qu'ils peuvent jouer des rôles importants. De même, les cytochromes extracellulaires, reconnus pour leur implication dans le bDIET, sont possiblement restés ancrés à la matrice des EPS (tel que proposé dans le modèle suggéré par Flemming (118)) et n'ont pas été solubilisés. D'ailleurs, les cytochromes solubles se sont révélés inefficaces pour le DIET sous leur forme soluble (188) ; il est donc probable qu'ils soient retrouvés sous une forme non-soluble dans les EPS. À cet égard, de futures études

sur le rôle et la fonction des EPS devraient tenir compte à la fois des états solides ou solubles des molécules de la matrice que constituent les EPS.

L'étude présentée au chapitre 2, bien qu'elle ne démontre pas l'existence de bDIET dans les granules, met au moins en évidence l'existence de structures et de molécules dans la matrice extracellulaire du granule, qui ont chimiquement la capacité d'effectuer le bDIET, tels que les HS et les formate déshydrogénases. Ici fut utilisée la séparation sur gel par électrophorèse précédant une analyse par spectrométrie de masse en tandem pour chacune des bandes de protéines les plus fortement représentées. Or cette technique peut éliminer des protéines moins représentées dans l'échantillon, du seul fait que l'intensité de leur bande sur gel est faible, mais qui peuvent avoir un grand rôle à jouer dans le bDIET. Ou encore, les protéines hautement représentées peuvent masquer des protéines moins représentées si elles se situent au même endroit sur le gel. Il y a de plus en plus de développement pour l'identification des protéines avec la chromatographie liquide bidirectionnelle couplée à la spectrométrie de masse en tandem (2D-LC-MS/MS). Dans cette technique de métaprotéomique, la séparation sur gel (1D ou 2D) est remplacée par une séparation en chromatographie liquide double. Après cette séparation, les différentes fractions obtenues sont analysées en spectrométrie de masse en tandem. Cette technique qui nécessite que l'on travaille avec de petites quantités d'échantillons, requiert des outils statistiques puissants pour évaluer la présence relative des protéines. Elle est encore couramment difficilement accessible. Il est probable que dans un avenir rapproché, il soit possible d'utiliser cette technique afin d'augmenter considérablement la qualité des résultats de protéomique.

La possibilité que des microorganismes dans certains agrégats méthanogènes naturels puissent échanger directement des électrons en effectuant le bDIET, plutôt que de produire de l'hydrogène ou du formate comme vecteur d'électrons intermédiaire, est un changement de paradigme important avec des implications pour la modélisation et la conception de réacteurs anaérobies et pour comprendre comment les communautés méthanogènes réagiront aux perturbations environnementales. Beaucoup d'indices suggèrent sa présence, mais il y a toujours un besoin de preuves directes et de compréhension supplémentaires. Le bDIET reste un champ de recherche relativement récent, étudié par peu de groupes de recherche, et où beaucoup de questions sont encore sans réponses.

mDIET

De nombreux articles ont été publiés dernièrement concernant le mDIET. Principalement, des matériaux conducteurs sont ajoutés aux réacteurs dans le but d'augmenter le DIET, et par conséquent, les taux et rendements en méthane de ceux-ci. Dans l'ensemble, la réponse est positive (81). Or, les mécanismes réels de ce mDIET avec les matériaux impliqués restent peu connus.

Un premier point à considérer est l'environnement physique des microorganismes. Dans une boue granulaire, les microorganismes vivent déjà dans une architecture très spécifique, qui, comme suggérée précédemment, permet le bDIET. Dans le cas du mDIET, le contact avec le matériau conducteur est important. L'architecture du granule devient donc inutile et la plupart des études sont réalisées avec des boues non granulaires. L'étude présentée au chapitre 1 fut la première étude à amener l'idée que ces matériaux conducteurs peuvent restaurer le bDIET perdu du granule. En détruisant la structure du granule, le bDIET s'en trouvait fortement réduit, et les matériaux conducteurs restauraient l'activité, maintenant sous forme de mDIET. La reformation du biofilm sur les supports pour rétablir le bDIET (au lieu du mDIET) a été exclue du fait que la porcelaine non conductrice n'arrivait pas à restaurer l'activité, bien qu'elle était une excellente niche pour reformer le biofilm. Ceci démontre que le mDIET est bien réel, et que les matériaux conducteurs ne sont pas utilisés comme des amplificateurs de bDIET (ou autres IET), mais qu'ils sont bel et bien utilisés comme transporteurs d'électrons pour effectuer le mDIET.

Finalement, les champs d'application du mDIET sont variés et prometteurs. Des avancées technologiques dans le domaine de la digestion anaérobie impliquant des matériaux conducteurs risquent de voir le jour dans un futur rapproché. Un autre secteur aussi très prometteur, mais relativement peu étudié pour l'instant, est la bioélectrométhanogénèse, qui est la stimulation électrique de la digestion anaérobie. Dans ce champ de recherche, il reste encore beaucoup de questions sans réponses. Par exemple pourquoi la plupart des enrichissements aux biocathodes effectuant l'électrométhanogénèse impliquent des microorganismes différents de ceux ayant été identifiés comme ceux réalisant le bDIET, question soulignée par Holmes en 2016 (82). Effectivement, les ordres Methanobacteriales et Methanococcales sont généralement

enrichies aux biocathodes productrices de méthane (19, 189) bien que ces méthanogènes ne possèdent pas de cytochromes et n'aient jamais été démontrées capables de bDIET. Ceci rappelle les résultats obtenus et discutés au chapitre 3, lorsque du côté méthanogène du petit réacteur, des méthanogènes non-acétoclastes avaient proliféré, suggérant un rôle à jouer dans le mDIET. Les particularités du mDIET peuvent différer du bDIET lorsqu'il est impliqué dans les systèmes bioélectrochimiques (BES), ces systèmes microbiens utilisés pour produire de l'électricité ou autres produits à valeurs ajoutées tels que l'acétate, le butyrate, des alcools, de l'hydrogène et du méthane directement à partir de déchets organiques (190). C'est pourquoi des études plus approfondies sur les mécanismes impliqués dans le mDIET sont certainement requises.

Bibliographie

1. Potter MC. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc R Soc Lond Biol.* 1911;84(571):260-76.
2. Arends JB, Verstraete W. 100 years of microbial electricity production: three concepts for the future. *Microb Biotechnol.* 2012;5(3):333-46.
3. Logan BE, Regan JM. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 2006;14(12):512-8.
4. Lovley DR. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(3):327-32.
5. Kurakin A. The self-organizing fractal theory as a universal discovery method: the phenomenon of life. *Theor Biol Med Model.* 2011;8(1):4.
6. Stams AJ, Plugge CM. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Aug;7(8):568-77.
7. Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch Mikrobiol.* 1967;59(1):20-31.
8. Thiele JH, Zeikus JG. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: Significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(1):20-9.
9. Boone DR, Johnson RL, Liu Y. Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(7):1735-41.
10. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61(2):262-80.
11. Stams AJ, de Bok FA, Plugge CM, van Eekert MH, Dolfing J, Schraa G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environ Microbiol.* 2006;8(3):371-82.
12. Lettinga G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1995;67(1):3-28.
13. Lettinga G, van Velsen AFM, Hobma SW, de Zeeuw W, Klapwijk A. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol Bioeng.* 1980;22(4):699-734.

14. Ishii S, Kosaka T, Hori K, Hotta Y, Watanabe K. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):7838-45.
15. Guiot SR, Pauss A, Costerton JW. A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Sci Technol.* 1992;25(7):1-10.
16. Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, Ohashi A, Harada H. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(3):1280-8.
17. Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Physiol.* 2004;49:219-86.
18. Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(30):11358-63.
19. Cheng S, Xing D, Call DF, Logan BE. Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. *Environ Sci Technol.* 2009;43(10):3953-8.
20. Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(5):375-81.
21. Nealson KH. Geomicrobiology: Sediment reactions defy dogma. *Nature.* 2010;463(7284):1033-4.
22. Lovley DR, Nevin KP. A shift in the current: new applications and concepts for microbe-electrode electron exchange. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22(3):441-8.
23. Pauss A, Samson R, Guiot S. Thermodynamic evidence of trophic microniches in methanogenic granular sludge-bed reactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1990;33(1):88-92.
24. Guiot SR, MacLeod FA, Pauss A. Thermodynamical and microbiological evidence of trophic microniches for propionate degradation in a methanogenic sludge-bed reactor. Dans: Bélaich J-P, Bruschi M, Garcia J-L, rédacteurs. *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer.* Boston, MA: Springer US; 1990. p. 173-83.
25. Frigon JC, Guiot SR. Impact of liquid-to-gas hydrogen mass transfer on substrate conversion efficiency of an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Enzyme Microb Technol.* 1995;17(12):1080-6.

26. Picioreanu C, Batstone DJ, van Loosdrecht MCM. Multidimensional modelling of anaerobic granules. *Water Sci Technol.* 2005;52(1-2):501-7.
27. Ishii S, Kosaka T, Hotta Y, Watanabe K. Simulating the contribution of coaggregation to interspecies hydrogen fluxes in syntrophic methanogenic consortia. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):5093-6.
28. MacLeod FA, Guiot SR, Costerton JW. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(6):1598-607.
29. Rocheleau S, Greer CW, Lawrence JR, Cantin C, Laramée L, Guiot SR. Differentiation of methanosaeta concilii and methanosarcina barkeri in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent In situ hybridization and confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(5):2222-9.
30. Satoh H, Miura Y, Tsushima I, Okabe S. Layered structure of bacterial and archaeal communities and their in situ activities in anaerobic granules. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(22):7300-7.
31. Diaz EE, Stams AJ, Amils R, Sanz JL. Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):4942-9.
32. Rotaru A-E, Shrestha PM, Liu F, Shrestha M, Shrestha D, Embree M, et al. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to Methanosaeta for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ Sci.* 2014;7(1):408-15.
33. Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, Franks AE, Malvankar NS, Lovley DR. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science.* 2010;330(6009):1413-5.
34. Juarez K, Kim BC, Nevin K, Olvera L, Reguera G, Lovley DR, et al. PilR, a transcriptional regulator for pilin and other genes required for Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2009;16(3-4):146-58.
35. Holmes DE, Chaudhuri SK, Nevin KP, Mehta T, Methe BA, Liu A, et al. Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Microbiol.* 2006;8(10):1805-15.
36. Shimoyama T, Kato S, Ishii S, Watanabe K. Flagellum mediates symbiosis. *Science.* 2009;323(5921):1574.

37. Kato S, Watanabe K. Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia. *Microbes Environ.* 2010;25(3):145-51.
38. Reimers CE, Tender LM, Fertig S, Wang W. Harvesting energy from the marine sediment--water interface. *Environ Sci Technol.* 2001;35(1):192-5.
39. Bond DR, Holmes DE, Tender LM, Lovley DR. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science.* 2002;295(5554):483-5.
40. Tikhonova TV, Popov VO. Structural and functional studies of multiheme cytochromes C involved in extracellular electron transport in bacterial dissimilatory metal reduction. *Biochemistry (Mosc).* 2014;79(13):1584-601.
41. Nevin KP, Lovley DR. Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(5):2294-9.
42. Seeliger S, Cord-Ruwisch R, Schink B. A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J Bacteriol.* 1998;180(14):3686-91.
43. Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature.* 2005;435(7045):1098-101.
44. Schmidt JE, Ahring BK. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioeng.* 1996;49(3):229-46.
45. Thauer RK, Kaster AK, Goenrich M, Schick M, Hiromoto T, Shima S. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:507-36.
46. Kaster AK, Goenrich M, Seedorf H, Liesegang H, Wollherr A, Gottschalk G, et al. More than 200 genes required for methane formation from H₂ and CO₂ and energy conservation are present in *Methanothermobacter marburgensis* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Archaea.* 2011;2011:973848.
47. Daniels L, Belay N, Rajagopal BS, Weimer PJ. Bacterial methanogenesis and growth from CO₂ with elemental iron as the sole source of electrons. *Science.* 1987;237(4814):509-11.
48. Chastain BK, Kral TA. Zero-valent iron on Mars: An alternative energy source for methanogens. *Icarus.* 2010;208(1):198-201.
49. Dinh HT, Kuever J, Mussmann M, Hassel AW, Stratmann M, Widdel F. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature.* 2004;427(6977):829-32.

50. Uchiyama T, Ito K, Mori K, Tsurumaru H, Harayama S. Iron-corroding methanogen isolated from a crude-oil storage tank. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(6):1783-8.
51. Karri S, Sierra-Alvarez R, Field JA. Zero valent iron as an electron-donor for methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic sludge. *Biotechnol Bioeng.* 2005;92(7):810-9.
52. Gregory KB, Bond DR, Lovley DR. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ Microbiol.* 2004;6(6):596-604.
53. Rosenbaum M, Aulenta F, Villano M, Angenent LT. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour Technol.* 2011;102(1):324-33.
54. Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Micro.* 2008;6(8):579-91.
55. Welte C, Kallnik V, Grapp M, Bender G, Ragsdale S, Deppenmeier U. Function of Ech hydrogenase in ferredoxin-dependent, membrane-bound electron transport in *Methanosarcina mazei*. *J Bacteriol.* 2010;192(3):674-8.
56. Gottschalk G, Blaut M. Generation of proton and sodium motive forces in methanogenic bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1018(2-3):263-6.
57. Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, Markovaite B, Chen S, Nevin KP, et al. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(15):4599-605.
58. Chen S, Rotaru AE, Liu F, Philips J, Woodard TL, Nevin KP, et al. Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures. *Bioresour Technol.* 2014;173:82-6.
59. Ferguson TJ, Mah RA. Effect of H₂-CO₂ on methanogenesis from acetate or methanol in *Methanosarcina* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1983;46(2):348-55.
60. Kato S, Yumoto I, Kamagata Y. Isolation of acetogenic bacteria that induce biocorrosion by utilizing metallic iron as the sole electron donor. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(1):67-73.
61. Baloch MI, Akunna JC, Kierans M, Collier PJ. Structural analysis of anaerobic granules in a phase separated reactor by electron microscopy. *Bioresour Technol.* 2008;99(5):922-9.
62. Ntarlagiannis D, Atekwana EA, Hill EA, Gorby Y. Microbial nanowires: Is the subsurface "hardwired"? *Geophys Res Lett.* 2007;34(17).
63. Lovley DR. Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol.* 1993;47:263-90.

64. Busalmen JP, Esteve-Nunez A, Berna A, Feliu JM. C-type cytochromes wire electricity-producing bacteria to electrodes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(26):4874-7.
65. Cohen H, Nogues C, Naaman R, Porath D. Direct measurement of electrical transport through single DNA molecules of complex sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(33):11589-93.
66. Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(10):3968-73.
67. Nielsen LP, Risgaard-Petersen N, Fossing H, Christensen PB, Sayama M. Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. *Nature.* 2010;463(7284):1071-4.
68. Schauer R, Risgaard-Petersen N, Kjeldsen KU, Tataru Bjerg JJ, B BJ, Schramm A, et al. Succession of cable bacteria and electric currents in marine sediment. *ISME J.* 2014;8(6):1314-22.
69. Pfeffer C, Larsen S, Song J, Dong M, Besenbacher F, Meyer RL, et al. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature.* 2012;491(7423):218-21.
70. Malvankar NS, King GM, Lovley DR. Centimeter-long electron transport in marine sediments via conductive minerals. *ISME J.* 2015;9(2):527-31.
71. Esteve-Nunez A, Sosnik J, Visconti P, Lovley DR. Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Microbiol.* 2008;10(2):497-505.
72. Morita M, Malvankar NS, Franks AE, Summers ZM, Giloteaux L, Rotaru AE, et al. Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates. *mBio.* 2011;2(4).
73. Shrestha PM, Malvankar NS, Werner JJ, Franks AE, Elena-Rotaru A, Shrestha M, et al. Correlation between microbial community and granule conductivity in anaerobic bioreactors for brewery wastewater treatment. *Bioresour Technol.* 2014;174:306-10.
74. Cruz Viggli C, Rossetti S, Fazi S, Paiano P, Majone M, Aulenta F. Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation. *Environ Sci Technol.* 2014;48(13):7536-43.
75. Liu F, Rotaru A-E, Shrestha PM, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ Sci.* 2012;5(10):8982.
76. Chen S, Rotaru AE, Shrestha PM, Malvankar NS, Liu F, Fan W, et al. Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Sci Rep.* 2014;4:5019.

77. Dubé CD, Guiot SR. Direct interspecies electron transfer investigation in granular sludge. Dans: Gübitz GM, Gronauer A, Bauer A, Bochman G, Scheidl S, Weiß S, rédacteurs. *Biogas Sciences* 2014; 2014; Vienna, Austria: University of Natural resources and Life Sciences; 2014. p. 85-6.
78. Shrestha PM, Rotaru AE. Plugging in or going wireless: strategies for interspecies electron transfer. *Front Microbiol.* 2014; 5: 237.
79. McGlynn SE, Chadwick GL, Kempes CP, Orphan VJ. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia. *Nature.* 2015;526:531-5.
80. Rabaey K, Rodriguez J, Blackall LL, Keller J, Gross P, Batstone D, et al. Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *ISME J.* 2007;1(1):9-18.
81. Park JH, Kang HJ, Park KH, Park HD. Direct interspecies electron transfer via conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications. *Bioresour Technol.* 2018 Apr;254:300-311.
82. Holmes DE, Smith JA. Biologically Produced Methane as a Renewable Energy Source. *Adv Appl Microbiol.* 2016;97:1-61.
83. Werner JJ, Knights D, Garcia ML, Scalfone NB, Smith S, Yarasheski K, et al. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(10):4158-63.
84. Wang LY, Nevin KP, Woodard TL, Mu BZ, Lovley DR. Expanding the diet for DIET: Electron donors supporting direct interspecies electron transfer (DIET) in defined co-cultures. *Front Microbiol.* 2016;7(MAR):236.
85. Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(3):1548-55.
86. Dolfing J. Thermodynamic constraints on syntrophic acetate oxidation. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(4):1539-41.
87. Zhao Z, Zhang Y, Woodard TL, Nevin KP, Lovley DR. Enhancing syntrophic metabolism in up-flow anaerobic sludge blanket reactors with conductive carbon materials. *Bioresour Technol.* 2015;191:140-5.
88. Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environ Microbiol.* 2012;14(7):1646-54.
89. Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(25):10042-6.

90. Lu F, Luo C, Shao L, He P. Biochar alleviates combined stress of ammonium and acids by firstly enriching *Methanosaeta* and then *Methanosarcina*. *Water Res.* 2016;90:34-43.
91. Cheng Q, Call DF. Hardwiring microbes: Via direct interspecies electron transfer: Mechanisms and applications. *Environ Sci Process Impacts.* 2016;18(8):968-80.
92. Xu S, He C, Luo L, Lü F, He P, Cui L. Comparing activated carbon of different particle sizes on enhancing methane generation in upflow anaerobic digester. *Bioresour Technol.* 2015;196:606-12.
93. Dolfing J, Mulder JW. Comparison of methane production rate and coenzyme F420 content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49(5):1142-5.
94. Monique R, Elisabeth GN, Etienne P, Dominique L. A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresour Technol.* 2008;99(16):7464-71.
95. Frigon JC, Breton J, Bruneau T, Moletta R, Guiot SR. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. *Bioresour Technol.* 2009;100(18):4156-63.
96. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st^e éd. Washington, D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2005.
97. Zhao Y, Haddad M, Cimpoia R, Liu Z, Guiot SR. Performance of a Carboxydotherrmus hydrogenoformans-immobilizing membrane reactor for syngas upgrading into hydrogen. *Int J Hydrogen Energy.* 2013;38(5):2167-75.
98. Frigon J-C, Mehta P, Guiot SR. Impact of mechanical, chemical and enzymatic pre-treatments on the methane yield from the anaerobic digestion of switchgrass. *Biomass Bioenergy.* 2012;36:1-11.
99. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(3):695-700.
100. Tartakovsky B, Manuel MF, Beaumier D, Greer CW, Guiot SR. Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. *Biotechnol Bioeng.* 2001;73(6):476-83.

101. Hussain A, Bruant G, Mehta P, Raghavan V, Tartakovsky B, Guiot SR. Population analysis of mesophilic microbial fuel cells fed with carbon monoxide. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;172(2):713-26.
102. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(16):5261-7.
103. Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkila J, Marchesi JR, Smidt H, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One.* 2009;4(8):e6669.
104. Angelidaki I, Karakashev D, Batstone DJ, Plugge CM, Stams AJM. Biomethanation and its potential. *Methods Enzymol.* 2011;494:327-51.
105. Dürre P. *Handbook on Clostridia.* : CRC Press; 2005.
106. Boone DR, Menaia JA, Boone JE, Mah RA. Effects of Hydrogen Pressure during Growth and Effects of Pregrowth with Hydrogen on Acetate Degradation by Methanosarcina Species. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53(1):83-7.
107. McInerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 1981;41(4):1029-39.
108. Kiely PD, Regan JM, Logan BE. The electric picnic: Synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22(3):378-85.
109. Wang Y, Zhang Y, Wang J, Meng L. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass Bioenergy.* 2009;33(5):848-53.
110. Agapakis CM, Boyle PM, Silver PA. Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. *Nat Chem Biol.* 2012;8(6):527-35.
111. Thiele JH, Chartrain M, Zeikus JG. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: Role of floc formation in syntrophic methanogenesis. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(1):10-9.
112. Smith JA, Tremblay PL, Shrestha PM, Snoeyenbos-West OL, Franks AE, Nevin KP, et al. Going wireless: Fe(III) oxide reduction without pili by *Geobacter sulfurreducens* strain JS-1. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(14):4331-40.
113. Sheng GP, Yu HQ, Li XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol Adv.* 2010;28(6):882-94.

114. Liu Y, Fang HHP. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2003;33(3):237-73.
115. Raszka A, Chorvatova M, Wanner J. The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *Acta Hydrochim et Hydrobiol*. 2006;34(5):411-24.
116. MacLeod FA, Guiot SR, Costerton JW. Electron microscopic examination of the extracellular polymeric substances in anaerobic granular biofilms. *World J Microbiol Biotechnol*. 1995;11(5):481-5.
117. Ding Z, Bourven I, Guibaud G, van Hullebusch ED, Panico A, Pirozzi F, et al. Role of extracellular polymeric substances (EPS) production in bioaggregation: application to wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(23):9883-905.
118. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623-33.
119. Zhu L, Zhou J, Lv M, Yu H, Zhao H, Xu X. Specific component comparison of extracellular polymeric substances (EPS) in flocs and granular sludge using EEM and SDS-PAGE. *Chemosphere*. 2015;121:26-32.
120. Zhang L, Feng X, Zhu N, Chen J. Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme Microb Technol*. 2007;41(5):551-7.
121. Park C, Novak JT, Helm RF, Ahn YO, Esen A. Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Res*. 2008;42(14):3879-89.
122. El Fantroussi S, Naveau H, Agathos SN. Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol Prog*. 1998;14(2):167-88.
123. Hadjeb N, Berkowitz GA. Preparation of T-overhang vectors with high PCR product cloning efficiency. *BioTechniques*. 1996;20(1):20-2.
124. Schmidt JJ. DNA Cloning: A Practical Approach Volumes 1 and 2. *Biochem Educ*. 1986;14(2):91.
125. Juteau P, Beaudet R, McSween G, Lépine F, Milot S, Bisailon JG. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Appl Microbiol Biotech*. 1995;44(1-2):218-24.
126. Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Paul E, Girbal-Neuhauser E. Extracellular Polymeric Substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res*. 2011;45(4):1529-38.
127. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956;28(3):350-6.

128. Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J.* 1956;62(2):315-23.
129. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
130. Frolund B, Griebe T, Nielsen PH. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995;43(4):755-61.
131. Park C, Helm RF. Application of metaproteomic analysis for studying extracellular polymeric substances (EPS) in activated sludge flocs and their fate in sludge digestion. *Water Sci Technol.* 2008;57(12):2009-15.
132. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
133. D'Abzac P, Bordas F, Van Hullebusch E, Lens PN, Guibaud G. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(5):1589-99.
134. Pellicer-Nàcher C, Domingo-Félez C, Mutlu AG, Smets BF. Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass. *Water Res.* 2013;47(15):5564-74.
135. Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X, Simonet P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(9):2717-22.
136. Bhatia D, Bourven I, Simon S, Bordas F, van Hullebusch ED, Rossano S, et al. Fluorescence detection to determine proteins and humic-like substances fingerprints of exopolymeric substances (EPS) from biological sludges performed by size exclusion chromatography (SEC). *Bioresour Technol.* 2013;131:159-65.
137. Simon S, Pairo B, Villain M, D'Abzac P, Van Hullebusch E, Lens P, et al. Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresour Technol.* 2009;100(24):6258-68.
138. Jensen HM, Albers AE, Malley KR, Londer YY, Cohen BE, Helms BA, et al. Engineering of a synthetic electron conduit in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(45):19213-8.

139. Zhang P, Shen Y, Guo JS, Li C, Wang H, Chen YP, et al. Extracellular protein analysis of activated sludge and their functions in wastewater treatment plant by shotgun proteomics. *Sci Rep.* 2015;5(12041).
140. Claus H, Gleixner G, Filip Z. Formation of humic-like substances in mixed and pure cultures of aquatic microorganisms. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* 1999;27(4):200-7.
141. Roden EE, Kappler A, Bauer I, Jiang J, Paul A, Stoesser R, et al. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nat Geosci.* 2010;3(6):417-21.
142. Voordeckers JW, Kim BC, Izallalen M, Lovley DR. Role of *Geobacter sulfurreducens* outer surface c-type cytochromes in reduction of soil humic acid and anthraquinone-2,6-disulfonate. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(7):2371-5.
143. Klüpfel L, Piepenbrock A, Kappler A, Sander M. Humic substances as fully regenerable electron acceptors in recurrently anoxic environments. *Nat Geosci.* 2014;7(3):195-200.
144. Tanaka K, Stackebrandt E, Tohyama S, Eguchi T. *Desulfovira adipica* gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, gram-negative, sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50(2):639-44.
145. Davidova IA, Duncan KE, Choi OK, Suflita JM. *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. nov., sp. nov., an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(12):2737-42.
146. Sugawara Y, Ueki A, Abe K, Kaku N, Watanabe K, Ueki K. *Propioniciclava tarda* gen. nov., sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011;61(9):2298-303.
147. Nesbø CL, Bradnan DM, Adebusuyi A, Dlutek M, Petrus AK, Foght J, et al. *Mesotoga prima* gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the Thermotogales. *Extremophiles.* 2012;16(3):387-93.
148. Ben Hania W, Postec A, Aüllo T, Ranchou-Peyruse A, Erauso G, Brochier-Armanet C, et al. *Mesotogainfera* sp. nov., a mesophilic member of the order Thermotogales, isolated from an underground gas storage aquifer. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(8):3003-8.
149. Kuever J. The Family Syntrophobacteraceae. Dans: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, rédacteurs. *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 289-99.
150. Ueki K, Ueki A, Takahashi K, Iwatsu M. The role of sulfate reduction in methanogenic digestion of municipal sewage sludge. *J Gen Appl Microbiol.* 1992;38(3):195-207.

151. Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJM, Kuenen JG, Muyzer G. Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl Microbiol and Biotechnol.* 2008;78(6):1045-55.
152. van den Brand TPH, Roest K, Brdjanovic D, Chen GH, van Loosdrecht MCM. Influence of acetate and propionate on sulphate-reducing bacteria activity. *J Appl Microbiol.* 2014;117(6):1839-47.
153. Hulshoff Pol LW, de Castro Lopes SI, Lettinga G, Lens PN. Anaerobic sludge granulation. *Water Res.* 2004;38(6):1376-89.
154. Sara M, Sleytr UB. S-Layer proteins. *J Bacteriol.* 2000;182(4):859-68.
155. Fagan RP, Fairweather NF. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(3):211-22.
156. De Vrieze J, Hennebel T, Boon N, Verstraete W. Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour Technol.* 2012;112:1-9.
157. Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev.* 1979;43(2):260-96. Epub 1979/06/01.
158. Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics.* 2008;1784(12):1873-98.
159. Cedervall PE, Dey M, Pearson AR, Ragsdale SW, Wilmot CM. Structural insight into methyl-coenzyme M reductase chemistry using coenzyme B analogues. *Biochemistry.* 2010;49(35):7683-93.
160. Stephenson RJ, Patoine A, Guiot SR. Effects of oxygenation and upflow liquid velocity on a coupled anaerobic/aerobic reactor system. *Water Res.* 1999;33(12):2855-63.
161. Pancholi V, Chhatwal GS. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2003;293(6):391-401.
162. Oliveira L, Madureira P, Andrade EB, Bouaboud A, Morello E, Ferreira P, et al. Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages. *PLoS One.* 2012;7(1):e29963.
163. Brassard J, Gottschalk M, Quessy S. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol.* 2004;102(1-2):87-94.

164. Jin H, Song YP, Boel G, Kochar J, Pancholi V. Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J Mol Biol.* 2005;350(1):27-41.
165. Seidler NW. GAPDH, as a virulence factor. *Adv Exp Med Biol.* 2013;985:149-78.
166. Lu GT, Xie JR, Chen L, Hu JR, An SQ, Su HZ, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for extracellular polysaccharide production and full virulence. *Microbiology.* 2009;155(Pt 5):1602-12.
167. Moody RG, Williamson MP. Structure and function of a bacterial Fasciclin I Domain Protein elucidates function of related cell adhesion proteins such as TGFBIp and periostin(). *FEBS Open Bio.* 2013;3:71-7.
168. Crable BR, Plugge CM, McInerney MJ, Stams AJ. Formate formation and formate conversion in biological fuels production. *Enzyme Res.* 2011;2011(1):532536.
169. Smith KS, Ingram-Smith C. Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol.* 2007;15(4):150-5.
170. Box JD. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* 1983;17(5):511-25.
171. Liu Y, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Mar;1125:171-89.
172. Stams AJM. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1994;66(1-3):271-94.
173. Shen L, Zhao Q, Wu X, Li X, Li Q, Wang Y. Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors. *Renew Sust Energ Rev.* 2016;54:1358-67.
174. Haddad M, Cimpoaia R, Guiot SR. Performance of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* in a gas-lift reactor for syngas upgrading into hydrogen. *Int J Hydrogen Energy.* 2014;39(6):2543-8.
175. Guiot SR, Cimpoaia R, Carayon G. Potential of wastewater-treating anaerobic granules for biomethanation of synthesis gas. *Environ Sci Technol.* 2011;45(5):2006-12.
176. Ahmed S, Rozaik E, Abdelhalim H. Effect of configurations, bacterial adhesion, and anode surface area on performance of microbial fuel cells used for treatment of synthetic wastewater. *Water, Air, Soil Poll.* 2015;226(9).
177. Kimura Z, Okabe S. Acetate oxidation by syntrophic association between *Geobacter sulfurreducens* and a hydrogen-utilizing exoelectrogen. *ISME J.* 2013;7(8):1472-82.

178. Park TJ, Ding W, Cheng S, Brar MS, Ma APY, Tun HM, et al. Microbial community in microbial fuel cell (MFC) medium and effluent enriched with purple photosynthetic bacterium (*Rhodospirillum rubrum* sp.). *AMB Express*. 2014;4(1):1-8.
179. Stackebrandt E. The family Clostridiaceae, other genera. *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014. p. 67-73.
180. Xie CH, Yokota A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55(3):1233-7.
181. Huang J, Wang Z, Zhu C, Ma J, Zhang X, Wu Z. Identification of microbial communities in open and closed circuit bioelectrochemical MBRs by high-throughput 454 pyrosequencing. *PLoS ONE*. 2014;9(4).
182. Yamamuro A, Kouzuma A, Abe T, Watanabe K. Metagenomic analyses reveal the involvement of syntrophic consortia in methanol/electricity conversion in microbial fuel cells. *PLoS ONE*. 2014;9(5).
183. Liu F, Rotaru AE, Shrestha PM, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange. *Environ Microbiol*. 2015;17(3):648-55.
184. Estevez-Canales M, Kuzume A, Borjas Z, Fueg M, Lovley D, Wandlowski T, et al. A severe reduction in the cytochrome C content of *Geobacter sulfurreducens* eliminates its capacity for extracellular electron transfer. *Env Microbiol Rep*. 2015;7(2):219-26.
185. Dubé CD, Guiot SR. Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: A review. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015;151:101-15.
186. Deutzmann JS, Sahin M, Spormann AM. Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis. *MBio*. 2015;6(2).
187. Welander PV, Metcalf WW. Loss of the mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10664-9.
188. Dubé CD, Guiot SR. Ethanol-to-methane activity of *Geobacter*-deprived anaerobic granules enhanced by conductive microparticles. *Process Biochemistry*. 2017;63:42-8.
189. Lohner ST, Deutzmann JS, Logan BE, Leigh J, Spormann AM. Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *ISME J*. 2014;8(8):1673-81.

190. Kumar G, Saratale RG, Kadier A, Sivagurunathan P, Zhen G, Kim S-H, et al. A review on bio-electrochemical systems (BESs) for the syngas and value added biochemicals production. *Chemosphere*. 2017;177:84-92.