

50376
1983
117

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

-0-0-0-

50376
1983
117

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

STATION DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

VILLENEUVE D'ASCQ

N° d'ordre 1028

THESE

pour obtenir

le Diplôme de DOCTEUR de 3ème cycle
BIOCHIMIE

par

ERIC SAMAIN



METABOLISME DES COMPOSES INTERMEDIAIRES DE LA FERMENTATION METHANIQUE

— Isolement et caractérisation des bactéries impliquées
influence des conditions de culture sur leur métabolisme

Soutenue le 07 Février 1983 devant la commission d'examen

19 ex déposés

Professeur J. MONTREUIL

Président

Professeur H. ROMOND

Rapporteur

Messieurs P. RAIBAUD

}
}
}
})

Membres

G. ALBAGNAC

S. BOUQUELET



50376
1983
117

Cette étude a été réalisée à la Station de Technologie Alimentaire de l'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE de VILLENEUVE D'ASCQ sous la direction de Monsieur G. ALBAGNAC.

Je tiens en premier lieu à honorer la mémoire de Monsieur JN. MORFAUX, Directeur de la Station de Technologie Alimentaire qui avait bien voulu m'accepter dans son laboratoire et qui a disparu brutalement le 21 Juillet 81.

Je remercie respectueusement Monsieur le Professeur J. MONTREUIL qui a bien voulu présider le jury ainsi que Monsieur le Professeur H. RONOND et Messieurs G. ALBAGNAC, P. RAIBAUD et S. BOUQUELET qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie Messieurs JP. TOUZEL, HC. DUBOURGUTER, D. VERRIER et R. MOLETTA pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.

Je remercie également tout le personnel technique du laboratoire et notamment Monsieur JP. LEPÔTRE et Madame M. LOONIS.



RÉSUMÉ.

Trois voies de dégradation de l'éthanol et du lactate ont été mises en évidence dans les digesteurs anaérobies (fermentations acétique, propionique et butyrique). La fermentation acétique est réalisée par des souches sulfato-réductrices qui, en absence de sulfate, interviennent comme bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène en association syntrophique avec des bactéries méthanogènes. Les souches qui produisent du propionate et de l'acétate à partir du lactate appartiennent aux genres *Clostridium*, *Propionibacterium* et *Megasphaera*. Une nouvelle bactérie réalisant une fermentation propionique de l'éthanol et du propanol a été isolée et caractérisée. Elle requiert un facteur de croissance qui est présent dans le jus de rumen et qui peut être fourni par une bactérie homoacétogène. Les souches dégradant le lactate en acétate et butyrate ont été identifiées à *Eubacterium limosum*. Elles utilisent également le méthanol et le mélange $H_2 - CO_2$. Les proportions d'acétate et de butyrate produits par ces souches varient suivant les substrats et les conditions de culture. Une bactérie sulfato-réductrice a été isolée à partir d'un enrichissement dégradant le propionate en CO_2 et CH_4 . En présence de sulfate, elle oxyde le propionate en acétate et CO_2 et utilise l'hydrogène. Le rôle de cette souche comme bactérie acétogène productrice obligée d'hydrogène a pu être démontré sur éthanol mais pas sur propionate.

Mots clés : fermentation méthanique - lactate - éthanol - propionate - transfert d'hydrogène - association syntrophique - bactéries acétogènes - bactéries sulfato-réductrices - *Eubacterium limosum*.

ERRATUM

Prendre la figure N° 10 pour la figure N° 26 et inversement.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
I - LES QUATRE GROUPES TROPHIQUES	3
A - BACTERIES HYDROLYTIQUES ET FERMENTATIVES	3
1 - Hydrolyse des biopolymères	
2 - Fermentation des hexoses et des pentoses	
3 - Fermentation du lactate, du glycérol et du succinate	
4 - Fermentation des acides aminés	
5 - Fermentation des composés aromatiques	
6 - Influence des facteurs physico-chimiques sur les produits de fermentation	
B - BACTERIES HOMOACETOGENES	8
C - BACTERIES ACETOGENES PRODUCTRICES OBLIGÉES D'HYDROGENE	10
D - BACTERIES METHANOGENES	12
II - INTERACTIONS ENTRE LES DIFFÉRENTES POPULATIONS BACTERIENNES	15
III - COMPETITION ENTRE BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES ET BACTERIES METHANOGENES	16
<u>CHAPITRE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	
I - ORIGINE DES POPULATIONS BACTERIENNES ÉTUDIÉES	17
II - TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE CULTURE DES BACTERIES	17
III - MILIEU DE CULTURE	17
IV - CULTURE EN CONTINU	18
V - DÉTERMINATIONS ANALYTIQUES	19
VI - IDENTIFICATION DU CYTOCHROME C	20
VII - MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	21

CHAPITRE III : RESULTATS

I - ISOLEMENT	22
A - ISOLEMENT ET NUMERATION DE BACTERIES UTILISATRICES DE LACTATE	22
B - ENRICHISSEMENT ET ISOLEMENT SUR ETHANOL	22
1 - Enrichissement sur éthanol	
2 - Isolement de bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène	
3 - Isolement de bactéries propioniques utilisatrices d'éthanol	
C - ENRICHISSEMENT ET ISOLEMENT SUR PROPIONATE	24
1 - Enrichissement sur propionate	
2 - Isolement de bactéries utilisatrices de propionate	
II - CARACTERISATION DES ISOLATS	25
A - BACTERIES PROPIONIQUES	25
1 - Bactéries isolées sur lactate	
2 - Bactéries isolées sur éthanol	
B - BACTERIES BUTYRIQUES : ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA SOUCHE B ₂	27
1 - Caractérisation cellulaire	
2 - Caractérisation de la croissance	
3 - Produits de fermentation	
4 - Cinétiques de dégradation du méthanol en fermenteur et dosage de la vitamine B ₁₂	
C - BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES	30
1 - Caractérisation cellulaire et morphologique	
2 - Caractérisation de la croissance	
3 - Coculture en continu des souches CP ₆₂ et <i>Methanobrevibacter AZ</i>	

CHAPITRE IV : DISCUSSION

I - ROLE DU LACTATE ET DE L'ETHANOL DANS LA FERMENTATION METHANIQUE	34
A - VOIES DE FERMENTATION DU LACTATE	34
B - VOIES DE FERMENTATION DE L'ETHANOL	35
II - FERMENTATION PROPIONIQUE DE L'ETHANOL	37

III - CARACTERISATION ET ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA SOUCHE B ₂	38
A - IDENTIFICATION	38
B - EQUATION THEORIQUE DE LA FERMENTATION DU LACTATE ET DES COMPOSES MONOCARBONES	38
C - REGULATION DU METABOLISME DU LACTATE ET DU METHANOL	40
D - PRODUCTION DE VITAMINE B ₁₂	43
IV - CARACTERISATION DES SOUCHES SULFATO-REDUCTRICES	44
CONCLUSION	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48

INTRODUCTION.

La fermentation méthanique est un processus biologique qui a lieu dans des environnements anaérobies en absence de lumière et d'accepteur exogène d'électron (sulfate, nitrate). La production de méthane est observée dans des biotopes très variés (rumen, sources chaudes). Cependant, la conversion totale des matières organiques en gaz carbonique méthane et ammoniacque ne se réalise que dans certains écosystèmes (sédiments, digesteurs anaérobies) dans des conditions physicochimiques assez précises : pH proche de la neutralité, température inférieure à 60° C. Cette minéralisation complète des matières organiques fait intervenir quatre groupes bactériens en étroite relation les uns avec les autres (ZEIKUS 1979). On distingue (figure n° 1) :

1 - Les bactéries hydrolytiques et fermentatives qui dégradent les matières organiques en alcools acides organiques, hydrogène et gaz carbonique. Ces bactéries sont taxonomiquement très diverses, possèdent des taux de croissance élevés et sont peu exigeantes vis-à-vis du pH et du potentiel d'oxydoréduction du milieu.

2 - Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène qui convertissent les métabolites intermédiaires formés par les bactéries hydrolytiques et fermentatives en acétate, CO₂ et hydrogène. Ces réactions ne sont possibles thermodynamiquement qu'à très faible pression partielle d'hydrogène et les bactéries acétogènes ne peuvent se développer qu'en présence de méthanogènes utilisatrices d'hydrogène. Peu d'espèces ont été caractérisées et ces bactéries sont encore physiologiquement et taxonomiquement très mal connues.

3 - Les bactéries homoacétogènes qui possèdent la propriété de réduire le gaz carbonique en acétate. Elles réalisent une fermentation homoacétique à partir de composés à un (H₂-CO₂, formate) ou plusieurs carbones (hexose).

4 - Les bactéries méthanogènes qui transforment l'acétate et les composés monocarbonés (H₂ - CO₂, formate, méthanol) en méthane. Ces bactéries constituent un groupe phylogénétiquement et physiologiquement particulier. Elles ont des exigences physicochimiques très strictes (pH proche de la neutralité, potentiel redox inférieur à -350 mv). Leur taux de croissance est plus élevé sur hydrogène et gaz carbonique (temps de génération inférieur à dix heures) que sur acétate (le temps de doublement de *Methanotherix soehngeni* sur acétate est de neuf jours). On admet que 70 % du méthane provient de la décarboxylation

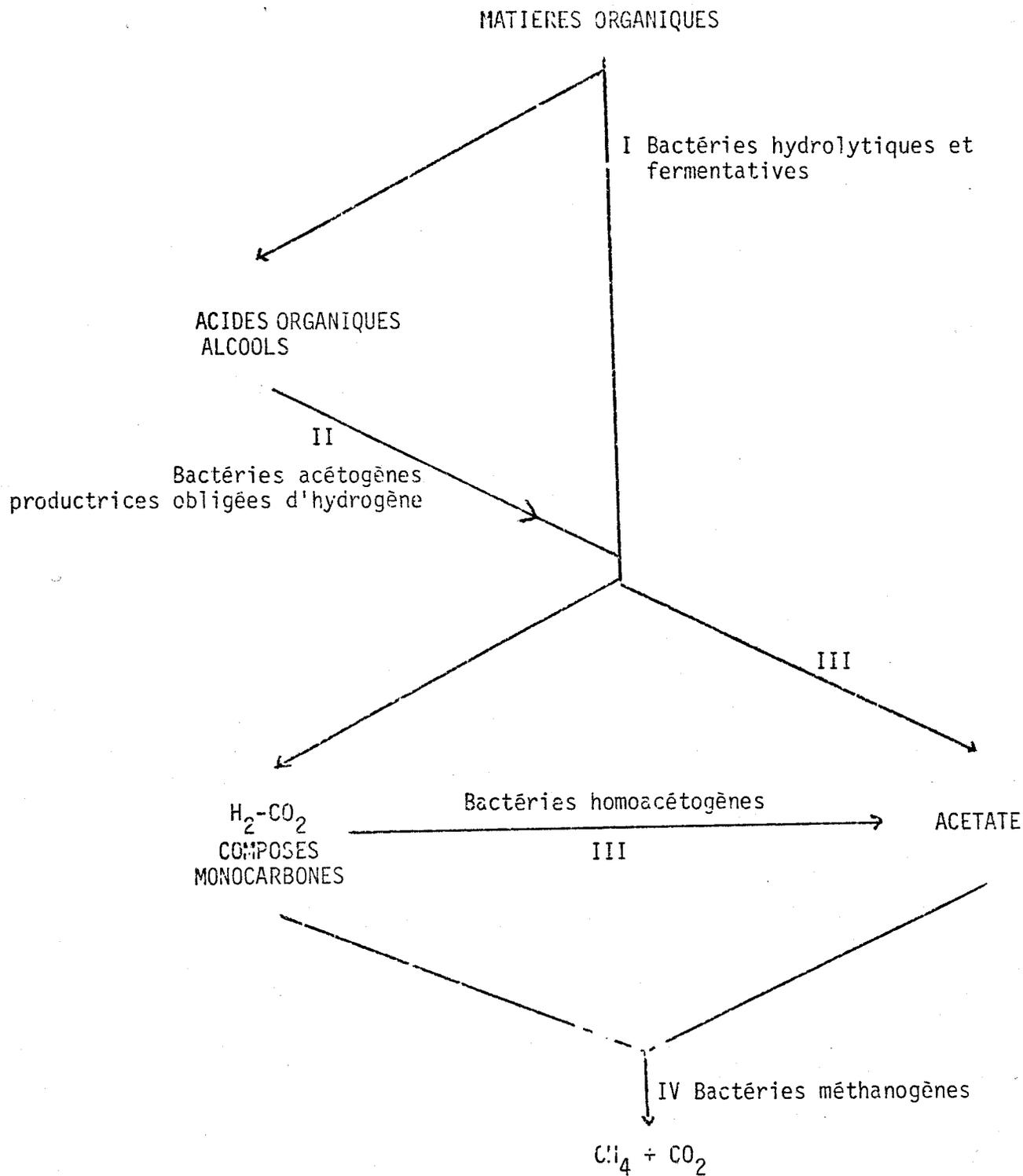


Figure n° 1 : Schéma de méthanogénèse (ZEIKUS 1979).



de l'acétate et cette réaction est un des facteurs limitant de la fermentation méthanique.

Le sujet de cette thèse s'insère dans le programme général de recherche de la station de technologie alimentaire de Lille sur l'épuration et la valorisation par voie anaérobie des effluents d'industrie agro-alimentaire. Ces eaux résiduaires contiennent essentiellement des glucides de faible poids moléculaire. Des études cinétiques (MORFAUX et al., 1981) et microbiologiques (SAMAIN 1980) ont montré que le lactate et l'éthanol étaient avec les acides gras volatils les principaux intermédiaires métaboliques de la fermentation méthanique de ce type d'effluent.

Mon travail a consisté à isoler et à caractériser les micro-organismes responsables de la conversion de ces intermédiaires en acétate. Certaines souches qui réalisent des fermentations originales ont été étudiées plus en détail.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I - LES QUATRE GROUPES TROPHIQUES

A - Bactéries hydrolytiques et fermentatives

1 - Hydrolyse des biopolymères

La fermentation anaérobie des matières organiques complexes nécessite la présence de bactéries possédant des enzymes extracytoplasmiques capables d'hydrolyser les biopolymères en molécules transportables au travers des membranes. A part la lignine, presque toutes les macro-molécules d'origine biologique sont susceptibles d'être dégradées en anaérobie.

De nombreuses espèces sont capables d'hydrolyser les polymères glucidiques (cellulose, hémicellulose, amidon, pectine) en mono ou en disaccharides. Les bactéries cellulolytiques (*Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium thermocellum*) ont été particulièrement étudiées (TAYA et al., 1980 ; GROLEAU et FORSBERG, 1981 ; WEIMER et ZEIKUS, 1977). La plupart d'entre elles peuvent également hydrolyser les xylanes. Parmi les anaérobies, *Clostridium thermocellum* possède la plus forte activité cellulolytique. La possession d'une cellobiose phosphorylase et d'une cellodextrine phosphorylase lui permet d'obtenir du glucose 1 phosphate comme produit d'hydrolyse de la cellulose sans dépense d'ATP (ZEIKUS, 1980). *Clostridium thermocellum* possède également une β glucosidase mais le rôle de cet enzyme reste à préciser. L'hydrolyse anaérobie de la cellulose n'est pas une propriété exclusivement bactérienne. Récemment, des champignons anaérobies cellulolytiques ont été isolés du rumen (BAUCHOP et MOUNTFORT, 1980 ; MOUNTFORT et al., 1982).

L'hydrolyse des pectines conduit à la formation de méthanol et de monosaccharides sous l'action de dépolymérase et de pectine estérases. Les bactéries pectinolytiques (*Clostridium*, *Erwinia*) (SHINK et al., 1980) ne fermentent pas le méthanol. Celui-ci est libéré dans le milieu (SHINK et ZEIKUS, 1980) où il est utilisé par les bactéries méthylotrophes.

Les glycérides sont hydrolysés en acides gras et en glycérol. Des activités lipolytiques ont été mises en évidence dans le rumen et dans les digesteurs anaérobies (HOBSON, 1974).

Voie d'Embden Meyerhof	1 hexose \longrightarrow 2 pyruvate + 2 NADH + 2 ATP
Voie de la phosphocétolase	1 hexose \longrightarrow 1 pyruvate + 1 CO ₂ + 1 acétyl (P) + 3 NADH + 1 ATP 1 pentose \longrightarrow 1 pyruvate + 1 acétyl (P) + 1 NADH + 1 ATP
Voie de Warburg-Dickens	3 pentose \longrightarrow 5 pyruvate + 5 NADH + 5 ATP

Tableau n° 1 : Voies métaboliques utilisées par les anaérobies pour la dégradation des sucres



TOERIEEN (1967) qui a réalisé des enrichissements sur huile de tournesol a suggéré que la flore lipolytique était principalement constituée de vibrio anaérobies stricts. *Anaerovibrio lipolytica* est la seule bactérie décrite ayant une réelle activité lipolytique (HOBSON, 1974).

L'hydrolyse des protéines en acides aminés est réalisée par des espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Peptococcus* et *Bacteroides*.

2 - Fermentation des hexoses et des pentoses

A part les bactéries hétérolactiques qui utilisent la voie de la phosphocétolase, les bactéries anaérobies fermentent les hexoses par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF et les pentoses par la voie de WARBURG-DICKENS (tableau n° 1). Le pyruvate est généralement converti en acétyl CoA et en CO₂ par la réaction phosphoroclastique. Cette réaction est couplée avec la réduction de ferredoxine (DOELLE, 1975). La formation de composés réduits (éthanol, lactate, propionate, butyrate, etc ...) à partir du pyruvate et de l'acétyl CoA permet de régénérer les coenzymes réduits lors de la glycolyse et de la réaction phosphoroclastique. Ces réactions d'hydrogénation ne sont généralement pas couplées avec la synthèse d'ADP par ETP. Seule la formation de propionate permet la phosphorylation d'ADP lors de la réduction du fumarate en succinate. Les produits de fermentation sont variables suivant les espèces (tableau n° 2). La réduction de protons en hydrogène permet également la régénération de ferredoxine et de pyridines nucléotides réduites via une hydrogénase et une NADH ferredoxine oxydoréductase. Ces enzymes ont été mis en évidence chez les *Clostridium butyriques* (PETITDEMANGE et al., 1974). La NADH ferredoxine oxydoréductase régule chez ces bactéries la production d'hydrogène. Elle détermine le rapport acétate sur butyrate et l'efficacité thermodynamique de la fermentation (le nombre d'ATP formé par mole de substrat consommé).

3 - Fermentation du lactate, de l'éthanol, du glycérol et du succinate

Le lactate, l'éthanol, le glycérol et le succinate sont produits lors de la fermentation des hexoses et des pentoses. Dans une seconde étape, ils peuvent être convertis en acides gras volatils.

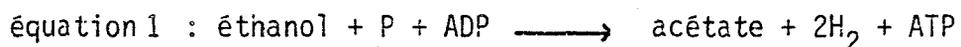
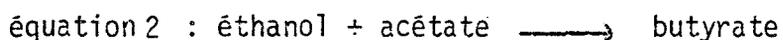
TYPES DE FERMENTATION	PRODUITS DE FERMENTATION DU GLUCOSE	VOIE METABOLIQUE	ORGANISME
Propionique	acétate, propionate, CO ₂	EMP et réaction phosphoclastique	<i>Propionibacterium</i>
Butyrique	acétate, butyrate, H ₂ , CO ₂	EMP et réaction phosphoclastique	<i>Clostridium</i>
Homolactique	Lactate	EMP	<i>Streptococcus Lactobacilles</i>
Hétérolactique	éthanol, lactate, CO ₂	voie de la phosphocétolase	<i>Leuconostoc Lactobacilles</i>
Ethanolique	éthanol, acétate, H ₂ et autres produits (lactate, butyrate)	EMP et réaction phosphoclastique	<i>Clostridium thermophiles</i> <i>Thermoanaerobium</i> <i>Ruminococcus</i>
Homoéthanolique	éthanol	EMP et décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde	Levures

Tableau n° 2 : Produits de fermentation et voies métaboliques chez les bactéries anaérobies

La décarboxylation du succinate en propionate a été mise en évidence dans les fermenteurs de méthanisation et dans le rumen (WOLFE, 1979), mais on ne sait pas si cette réaction est couplée avec une croissance bactérienne.

- Le glycérol est phosphorylé et déshydrogéné en dihydroxyacétone phosphate et rejoint la seconde étape de la glycolyse. Le glycérol est un composé très hydrogéné et ses produits de fermentation sont plus réduits que ceux des sucres. Des fermentations butyriques (*Clostridium*, *Eubacterium*) et propioniques (*Propionibacterium*) du glycérol ont été décrites (HOLDEMAN et al., 1977).

- Le lactate est oxydé en acétate et en CO_2 via le pyruvate par la lactate déshydrogénase et la réaction phosphoroclastique. Cette oxydation est thermodynamiquement peu favorable et doit être couplée à une synthèse exergonique d'acides gras volatils (DOELLE, 1975). Selon les espèces bactériennes, la dégradation du lactate conduit à la formation de différents acides gras de C_2 à C_6 . *Clostridium kluyveri* produit du butyrate, du caproate et de l'hydrogène à partir d'éthanol et d'acétate (BORSTEIN et BARKER, 1948). L'acétate peut être remplacé par le propionate et on observe alors la formation de valérate. Environ 1/6 de l'éthanol consommé est converti en acétate et en hydrogène (équation 1). Cette réaction, bien qu'elle soit thermodynamiquement défavorable, permet cependant la phosphorylation de l'ADP car elle est couplée avec la formation exergonique de butyrate (équation 2) (THAUER et al., 1977).

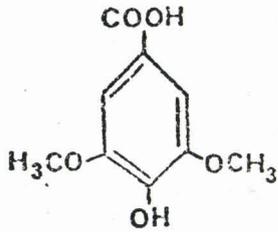


La fermentation propionique de l'éthanol n'a jamais été décrite bien qu'elle soit thermodynamiquement possible. Nous décrivons, dans ce mémoire, une nouvelle bactérie qui dégrade, en présence de CO_2 , l'éthanol en acétate et en propionate.

4 - Fermentation des acides aminés

En anaérobie, les acides aminés sont dégradés en acides gras volatils, CO_2 et NH_3 . On distingue deux types de fermentation.

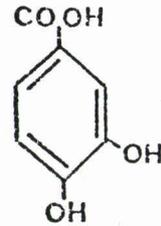
a - Dans la réaction de Stickland, deux acides aminés sont fermentés simultanément (DOELLE, 1975). L'oxydation de l'un (équation 1) est couplée avec la réduction de l'autre (équation 2).



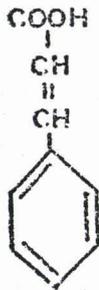
acide syringique



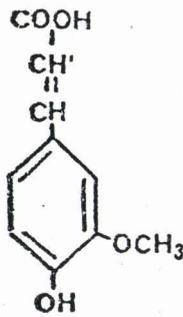
acide pOHbenzoïque



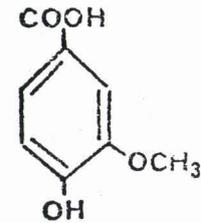
acide protocatéchuïque



acide cinnamique

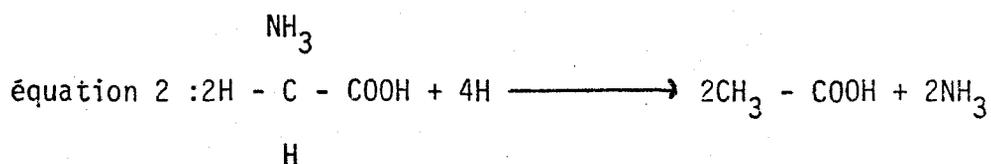
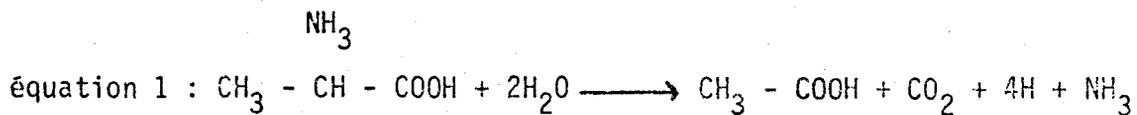


acide férulique



acide vanillique

Tableau n° 3 : Exemples de composés aromatiques obtenus par traitement à chaud de la lignine.



Cette réaction se rencontre essentiellement chez les *Clostridium*. Des acides aminés comme la proline, l'arginine, l'ornithine et le glycolle sont utilisés comme accepteurs d'électrons. La réduction du glycolle en acétate permet de plus la synthèse d'un ATP par le mécanisme ETP (THAUER et al., 1977). L'alanine, la leucine, la valine et l'histidine sont les principaux donneurs d'électrons. Récemment, il a été montré que la leucine pouvait être dismutée en acides isovalérique et isocaproïque. Dans ce cas, la leucine intervient comme donneur et comme accepteur d'électrons (BRITZ et WILKINSON, 1982).

b - Certains acides aminés peuvent également être dégradés seuls. Les voies métaboliques sont complexes et spécifiques de chaque acide aminé.

5 - Fermentation des composés aromatiques

De nombreuses études (NOTTINGHAM et HUNGATE, 1969 ; HEALY et YOUNG 1979 ; HEALY et al., 1980) ont montré que les monomères aromatiques dérivés de la lignine et du tanin (tableau n° 3) étaient dégradés, en anaérobiose, en CH_4 et CO_2 par des populations méthanogènes mixtes. Outre les bactéries méthanogènes, plusieurs populations bactériennes sont impliquées dans la minéralisation complète de ces composés. BACHE et PFENNIG (1981) ont isolé, à partir d'enrichissements sur acide vanillique et syringique une bactérie capable de couper les liaisons éther sur les composés aromatiques méthoxylés. La croissance de la souche est proportionnelle au nombre de groupements méthoxyl. Ces derniers sont métabolisés en acétate. Cette bactérie a été identifiée à *Acetobacterium woodii* qui est une bactérie homoacétogène qui utilise le mélange H_2 , CO_2 et le méthanol.

L'acétate est le principal intermédiaire dans la conversion du benzoate (FERRY et WOLFE, 1976) et des composés aromatiques trihydroxylés (KAISER et HANSELMANN, 1982) en méthane. La dégradabilité du phénol et du pyrocatechol a été décrite par HEALY et YOUNG (1977) mais certains auteurs ont observé une accumulation de pyrocatechol lors de la dégradation de l'acide protocatechuique et de ses dérivés méthoxylés (KAISER et HANSELMANN, 1982).

MOUNTFORT et BRYANT (1982) viennent d'isoler une bactérie qui dégrade le benzoate en acétate, CO_2 , hydrogène et formate en association syntrophique avec une bactérie sulfato-réductrice utilisatrice d'hydrogène (voir chapitre C).

6 - Influence des facteurs physico-chimiques sur les produits de fermentation

Le pH, la concentration en substrat et la pression partielle d'hydrogène influent sur la nature des produits finaux du métabolisme de nombreuses bactéries fermentatives.

- Les pH acides favorisent la formation de lactate (HOBSON et SUMMERS, 1967) *Clostridium butylicum* et *Clostridium acetobutylicum* produisent de l'acétone et du butanol à pH acide et de l'acétate et du butyrate à pH supérieur à 6 (DAVIS, 1942 ; BEESCH, 1952). La formation d'acide formique est également, chez *Micrococcus lactilyticus*, régulée par le pH. Ce micro organisme fermente le pyruvate en acétate, CO_2 et hydrogène à pH 6,5 et en formate et acétate à pH 8,5 (HOBSON, 1974).

- Dans les fermenteurs alimentés en continu, la croissance des bactéries est limitée par la concentration en substrat. *Selenomonas ruminantium* cultivé en continu produit exclusivement, à partir des sucres, de l'acétate et du propionate à faible taux de dilution. Par contre, pour un taux de dilution élevé, le lactate représente plus de 50 % des produits de fermentation (HOBSON, 1965). De même, *Lactobacillus casei*, bactérie hétérolactique, devient homolactique lorsque le taux de dilution augmente (DEVRIES et al., 1970).

- Dans les éco-systèmes méthanogènes, la pression partielle d'hydrogène est maintenue extrêmement basse par l'activité des bactéries méthanogènes utilisatrices d'hydrogène. Dans ces conditions, le flux d'électrons est dévié, chez de nombreuses bactéries fermentatives, vers la formation d'hydrogène. L'importance des transferts d'hydrogène inter espèces conduit à distinguer sur le plan physiologique deux groupes de bactéries :

a - Les bactéries qui ne possèdent pas d'hydrogénase (bactéries homo ou hétérolactiques) ou qui produisent de l'hydrogène par l'intermédiaire de l'hydrogène formate lyase (enterobactéries). Leur métabolisme n'est pas influencé

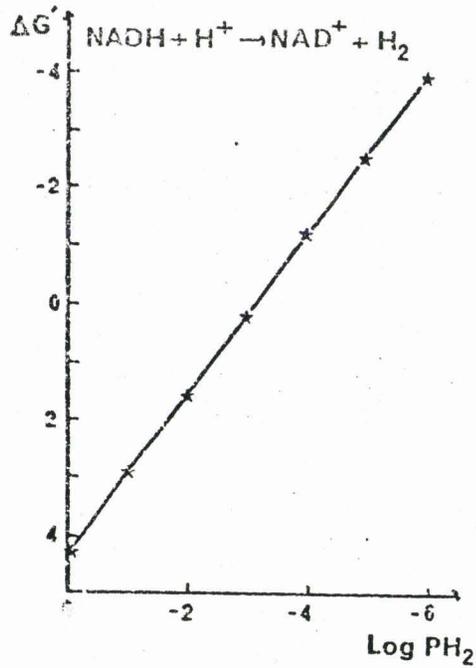


Figure n° 2 : Influence de la pression partielle d'hydrogène sur la variation d'énergie libre $\Delta G'$ de la réaction d'oxydation du NADH en NAD^+ et H_2 (WOLIN 1975).

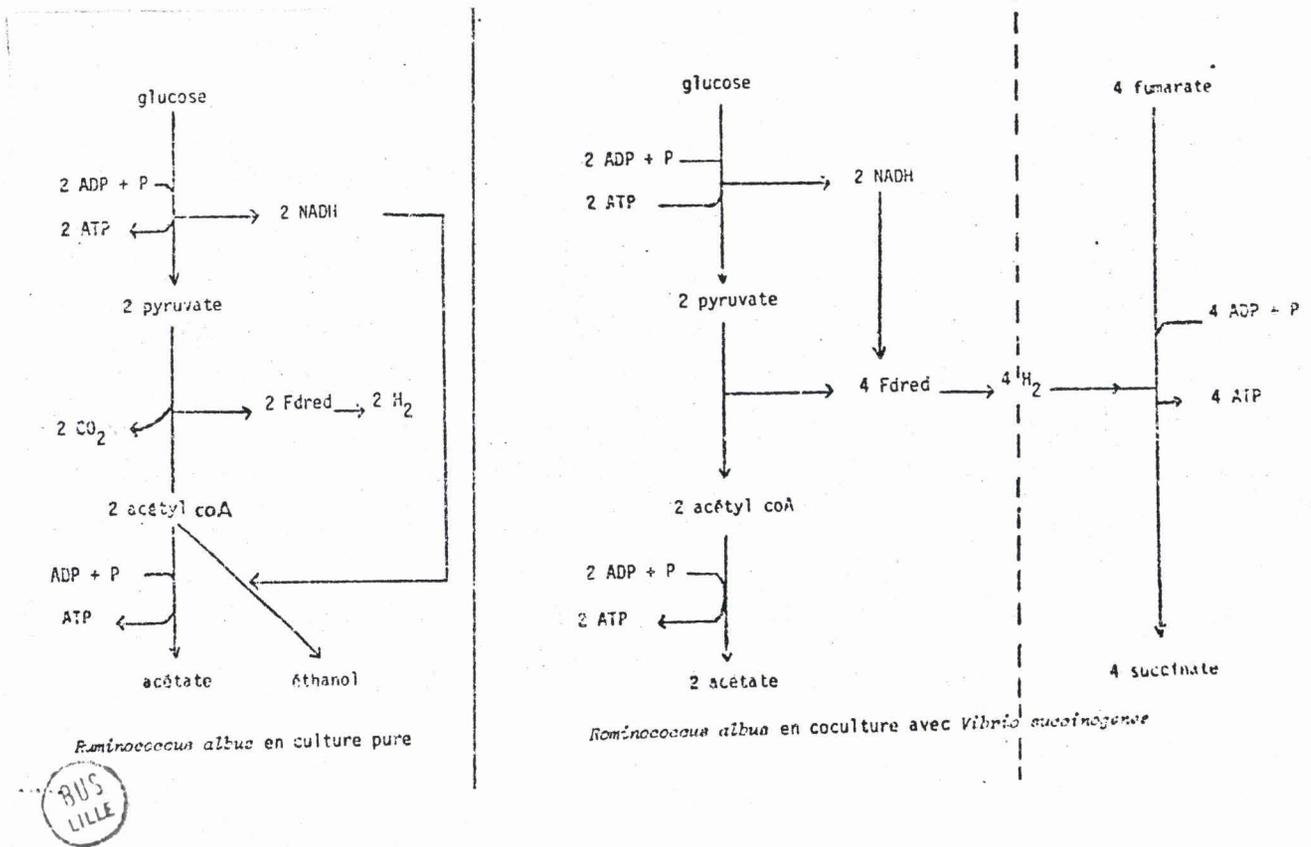


Figure n° 3 : Métabolisme de *Ruminococcus* en culture pure et en coculture avec *Vibrio succinogenes*

BUS
LILLE

par la pression partielle d'hydrogène.

b - Les bactéries qui possèdent une NADH ferredoxine oxydoréductase et une ferredoxine hydrogènase et qui peuvent régénérer leurs coenzymes réduits en produisant de l'hydrogène (WOLIN, 1975). Le transfert des électrons des pyridines nucléotides réduites sur les protons via la ferredoxine est thermodynamiquement défavorable dans les conditions standards. ($E'_0 \text{ NADH/NAD}^+ = - 0,32\text{V}$, $E'_0 \text{ H}_2/\text{H}^+ = - 0,42\text{V}$). Cette réaction est cependant possible si la pression partielle d'hydrogène est suffisamment basse (figure n° 2). En culture pure, ces bactéries produisent, à partir des sucres, de l'acétate, de l'hydrogène, du CO_2 et les composés réduits. En association avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène, leur métabolisme est dévié vers la formation préférentielle d'acétate, de CO_2 et d'hydrogène. L'exemple classique de ces transferts d'hydrogène inter espèces est la coculture de *Ruminococcus albus* et de *Vibrio succinogenes* (figure n° 3). En culture pure, *Ruminococcus albus* fermente le glucose en acétate, éthanol, CO_2 et hydrogène; en coculture avec *Vibrio succinogenes* qui utilise l'hydrogène pour réduire le fumarate en succinate, il produit exclusivement de l'acétate, du CO_2 et de l'hydrogène (IANNOTI et al., 1973). Dans ce cas, l'efficacité thermodynamique de la réaction est plus favorable; l'augmentation de la production d'acétate se traduit en effet par une synthèse d'ATP plus importante.

B - Les bactéries homoacétogènes

Les bactéries homoacétogènes utilisent le CO_2 comme unique accepteur d'électrons et le réduisent en acide acétique. Les substrats fermentés sont variables suivant les espèces (tableau n° 4). La fermentation d'une mole de glucose conduit à la formation de trois moles d'acétate : deux moles sont formées lors de la glycolyse et une mole est synthétisée à partir de deux moles de CO_2 . La voie métabolique de la réduction du CO_2 en acétate a été étudiée chez *Clostridium thermoaceticum* et *Clostridium formicoaceticum* (LJUNGDAHL et WOOD, 1969). (figure N° 4). *Clostridium aceticum* fut la première bactérie homoacétogène utilisatrice d'hydrogène isolée (WIERINGA, 1940). La souche a été perdue mais, en 1978, GOTTSCHALK a retrouvé, dans le laboratoire de BARKER, une culture contenant des spores de *Clostridium aceticum*.

	T° OPTIMALE	SUBSTRATS
<i>C. formicoaceticum</i>	-	méthanol, pyruvate, fumarate, glutamate, lactate, fructose, mannitol, glycérol
<i>C. aceticum</i>	30° C	H ₂ , CO ₂ , formate, pyruvate, fumarate, glutamate, fructose
<i>Acetobacterium woodii</i>	-	H ₂ , CO ₂ , formate, méthanol, lactate, glucose, fructose
<i>Acetogenium kivui</i>	65° C	H ₂ , CO ₂ , formate, pyruvate, glucose, fructose, mannose

Tableau n° 4 : Substrats utilisés par quelques bactéries homoacétogènes

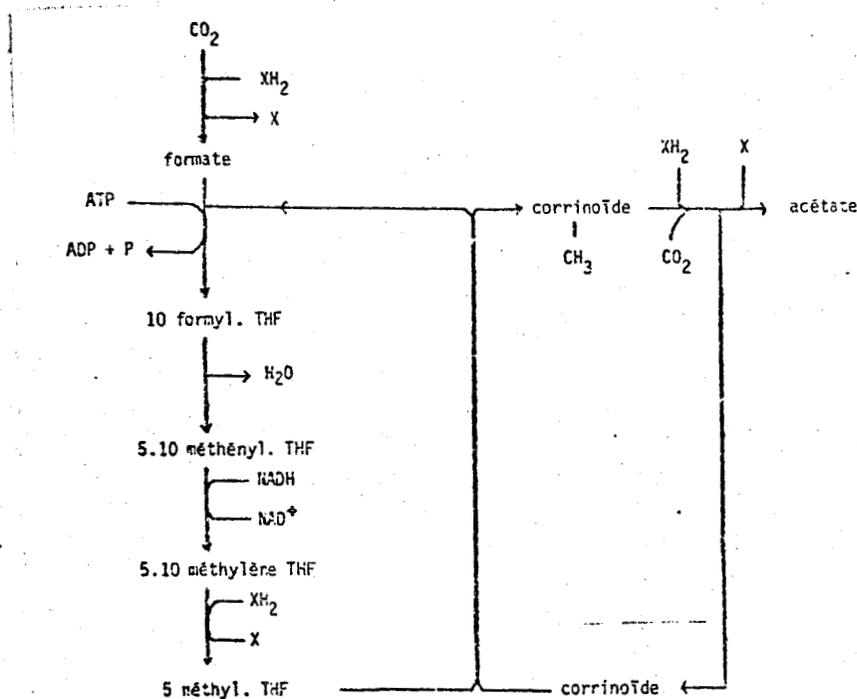
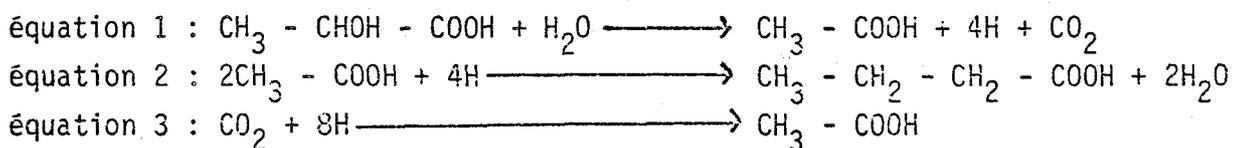


Figure n° 4 : Réduction du CO₂ en acétate chez *Clostridium thermoaceticum*

Il a pu revivifier la souche qui a été redécrite par BRAUN et al. (1931). Le fait que les homoacétogènes utilisent le mélange H₂ - CO₂ comme seule source d'énergie prouve que la réduction du CO₂ est couplée à la synthèse d'ATP par ETP (THAUER et al., 1977). Quatre espèces homoacétogènes utilisant l'hydrogène sont maintenant connues. On distingue deux *Clostridium*, *Clostridium aceticum* et *Clostridium thermoautotrophicum* (GOTTSCHALK, 1932) et deux espèces non sporulées dont l'une est mésophile, *Acetobacterium woodii* (BALCH et al., 1977) et l'autre thermophile, *Acetogenium kivui* (LEIGH et al., 1981).

La détermination des séquences de l'ARN ribosomique 16S chez les bactéries homoacétogènes a permis de démontrer que la propriété de réduire le CO₂ en acétate n'était pas un caractère phylogénique fondamental (TANNER et al., 1982) et que toutes les homoacétogènes, même non sporulées, présentaient de grandes homologues avec les espèces du genre *Clostridium*.

Eubacterium limosum (SHARAK GENTHNER et al., 1981) et *Butyrifacterium methylotrophicum* (ZEIKUS et al., 1980 ; LYND et al., 1981) réalisent une fermentation homoacétique à partir du mélange H₂ - CO₂ et du mono-oxyde de carbone mais produisent un mélange d'acétate et de butyrate à partir de glucose, de lactate et de méthanol. Chez ces deux bactéries, la fermentation butyrique du glucose et du lactate n'est pas associée à un dégagement d'hydrogène comme chez les *Clostridium butyriques* (DOELLE, 1975). BARKER (1945, 1954) a démontré, en utilisant des éléments marqués, que lors de la fermentation du lactate par *Eubacterium limosum*, du CO₂ était incorporé dans l'acétate et le butyrate produits. La réduction du CO₂ en acétate (équation 3) et la formation du butyrate (équation 2) interviendraient simultanément pour permettre la régénération des coenzymes réduits lors de l'oxydation du lactate en acétate (équation 1).



Le rôle des homoacétogènes dans les digesteurs n'est pas encore très clair. BRAUN (1979) a dénombré 10 bactéries homoacétogènes utilisatrices d'hydrogène dans divers biotopes anaérobies. Ces bactéries poussent lentement sur H₂-CO₂ et

		G'o en Kcal/mole
Lactate	→ acétate + 2 H ₂ + CO ₂	- 1
Ethanol	→ acétate + 2 H ₂	+ 2,3
Butyrate	→ 2 acétate + 2 H ₂	+ 11,5
Propionate	→ acétate + 3 H ₂ + CO ₂	+ 18,2

Tableau n° 5 : Variation d'énergie libre $\Delta G'o$ des réactions de dés-hydrogénation des principaux produits de la phase acidifiante dans les conditions standards.

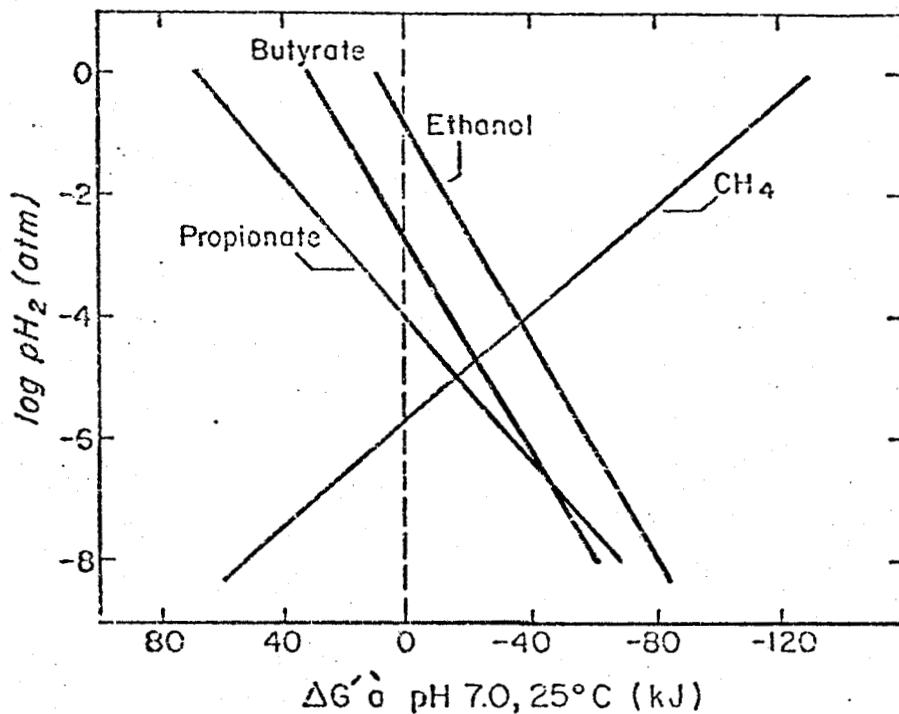


Figure n° 5 : Influence de la pression partielle d'hydrogène sur la variation d'énergie libre des réactions de dés-hydrogénation de l'éthanol, du propionate et du butyrate et de formation de méthane à partir de H₂ - CO₂ (Mac INERNEY et BRYANT 1979).



ne paraissent pas compétitives avec les méthanogènes. Leur rôle dans les fermenteurs de méthanisation serait limité à l'utilisation des composés à plusieurs carbones. Les homoacétogènes possédant une hydrogénase peuvent intervenir comme bactéries acétogènes productrices facultatives d'hydrogène. En effet, lorsque *Acetobacterium woodii* est cultivé en continu en présence de méthanogènes utilisatrices d'hydrogène, il fermente le fructose en deux moles d'acétate et quatre moles d'hydrogène (WINTER et WOLFE, 1980).

C - Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène

Les composés réduits formés lors de la phase hydrolytique et fermentative sont dégradés en anaérobie, en acétate et en méthane. Les premiers auteurs qui mirent en évidence ces fermentations pensaient qu'elles étaient réalisées par des bactéries méthanogènes particulières.

A partir de cultures hautement purifiées, trois bactéries méthanogènes furent décrites : *Methanobacillus omelianskii* qui utilise l'éthanol (BARKER 1956) et deux espèces de *Methanobacterium*, *Methanobacterium propionicum* et *Methanobacterium suboxydens* qui dégradent respectivement la propionate et le butyrate (STADTMANN et BARKER, 1951). Ces bactéries n'étaient pas pures et, en 1967, BRYANT et al ont démontré que *Methanobacillus omelianskii* était l'association syntrophique de deux espèces différentes : l'organisme "S" qui transforme l'éthanol en acétate et en hydrogène et une bactérie méthanogène, *Methanobacterium bryantii* qui utilise l'hydrogène. L'organisme "S" fermente en culture pure le pyruvate en acétate, en éthanol et en CO₂ mais n'utilise l'éthanol qu'en présence d'une bactérie utilisatrice d'hydrogène (REDDY et al., 1972). Cette découverte et le fait qu'aucune des méthanogènes disponibles en culture pure n'utilise, à part l'acétate, des composés à plusieurs carbones ont conduit à la définition d'un groupe de bactéries physiologiquement particulières. Ces bactéries qui sont appelées OHPA (Obligate Hydrogen Producing Acetogenic bacteria) dégradent les acides gras volatils à longue chaîne, les alcools et certains acides organiques en acétate et en hydrogène. Ces réactions sont thermodynamiquement défavorables dans les conditions standards (tableau n° 5) mais sont exergoniques à faible pression partielle d'hydrogène (figure n° 5). Les OHPA ne peuvent donc pousser en culture pure et doivent obligatoirement être associées à des bactéries utilisatrices d'hydrogène.

Elles peuvent être purifiées grâce à la technique du tapis qui consiste à incorporer dans le milieu d'isolement gélosé des bactéries utilisatrices d'hydrogène (méthanogènes ou sulfato-réductrices en présence de sulfate). Trois nouvelles espèces d'OHPA ont été récemment décrites :

- *Syntrophomonas wolfei* qui oxyde en les acides gras volatils possédant plus de quatre carbones. Cette bactérie a été obtenue en association avec *Methanospirillum hungatei* et avec une souche de *Desulfovibrio* (Mac INERNEY et al., 1979 - 1981).

- *Syntrophobacter wolini* qui décarboxyle le propionate en acétate, CO_2 et hydrogène. Cette souche n'a pu être isolée qu'en association avec une bactérie sulfato-réductrice. Elle fermente cependant le propionate sur milieu dépourvu de sulfate en coculture avec *Methanospirillum hungatei* (BOONE et BRYANT, 1980).

- Un bacille anaérobie qui dégrade le benzoate en acétate, CO_2 , hydrogène et formate. (MOUNTFORT et BRYANT, 1982). La souche a été obtenue en association avec une sulfato-réductrice qui utilise l'hydrogène et le formate mais pas le benzoate. Sur milieu pauvre en sulfate, elle dégrade en coculture avec *Methanospirillum hungatei* une mole de benzoate en trois moles d'acétate et 0,75 mole de méthane. Ces associations syntrophiques n'utilisent pas d'autres composés aromatiques, ni d'acides carboxyliques.

A côté de ces trois espèces qui sont taxonomiquement mal définies, il faut souligner le rôle des sulfato-réductrices comme bactéries OHPA dans les milieux pauvres en sulfate. Certaines souches de *Desulfovibrio* et de *Desulfotomaculum* qui possèdent une hydrogénase réalisent en effet, en absence de sulfate et en association avec des bactéries méthanogènes, le même type de fermentation de l'éthanol et du lactate que l'organisme "S" (BRYANT et al., 1977). Récemment, plusieurs nouvelles espèces sulfato-réductrices utilisant des acides gras volatils et l'acide benzoïque comme source de carbone et d'énergie ont été décrites (WIDDEL, 1980). En présence de sulfate, *Desulfobulbus propionicus* oxyde le propionate en acétate et CO_2 et utilise le mélange $\text{H}_2 - \text{CO}_2$ (WIDDEL et PFENNIG, 1982). Cette bactérie possède une hydrogénase et il a été suggéré qu'elle pouvait en absence de sulfate, intervenir comme bactérie OHPA à partir du propionate en association avec une méthanogène (LANNBROEK et PFENNIG, 1981). Cependant aucune preuve expérimentale permettant de vérifier

ou d'infirmier cette hypothèse n'existe actuellement.

La physiologie des bactéries OHPA est très mal connue bien que leur rôle dans la fermentation méthanique soit fondamental. Leur très faible taux de croissance rend leur étude difficile. Le temps de génération de *Syntrophobacter wolinii* sur propionate est de 87 heures en coculture avec un *Desulfovibrio* et de 161 heures en coculture avec *Methanospirillum hungatei*. *Syntrophomonas wolfei* a un temps de génération de 54 heures ou de 90 heures selon qu'il est associé à un *Desulfovibrio* ou à *Methanospirillum hungatei*.

Le temps de doublement des sulfato-réductrices sur lactate et sur éthanol est de quelques heures en présence de sulfate mais est supérieur à 24 heures en absence de sulfate et en association avec des méthanogènes.

D - Bactéries méthanogènes

L'acétate et certains composés monocarbonés ($H_2 - CO_2$, formate, mono-oxyde de carbone, méthanol et méthylamine) sont les seuls substrats utilisables par les méthanogènes. Ces bactéries constituent un groupe phyllogénétique homogène et différent des autres groupes bactériens. Ceci a été démontré par l'analyse des séquences de l'ARN ribosomique 16 S (FOX et al., 1977). Selon CARL WOESE (1978), les méthanogènes appartiennent avec les thermoacidophiles et les halophiles à une troisième lignée d'être vivants, les archéobactéries, qui serait aussi différente des vraies bactéries (eubactéries) que des eucaryotes.

Les archéobactéries se différencient des eubactéries par la composition de leur paroi et la nature de leurs lipides membranaires. Leur paroi, quand elle existe est dépourvue de peptidoglycane et d'acide muramique. Cette propriété permet de cultiver les méthanogènes en présence d'antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi (pénicilline et dérivés). Les lipides membranaires sont constitués de chaînes ramifiées avec des liaisons éther chez les archéobactéries et de chaînes linéaires avec des liaisons ester chez les eubactéries.

ESPECES	SUBSTRATS POUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE METHANE
<i>METHANOBACTERIUM FORMICICUM</i>	H ₂ , formate
<i>BRYANTII</i>	H ₂
<i>BRYANTII s.M.O.H.G.</i>	H ₂
<i>THERMOAUTOTROPHICUM</i>	H ₂
<i>METHANOBREVIBACTER RUMINANTIIUM</i>	H ₂ , formate
<i>ARBORIPHILUS</i>	H ₂
<i>ARBOR. s. AZ</i>	H ₂
<i>ARBOR s. VC</i>	H ₂
<i>SMITHII</i>	H ₂ , formate
<i>METHANOCOCCUS VANNIELII</i>	H ₂ , formate
<i>VOLTAE</i>	H ₂ , formate
<i>THERMOLITHOTROPHICUS</i>	H ₂ , formate
<i>METHANOMICROBIUM MOBILE</i>	H ₂ , formate
<i>METHANOGENIUM CARIACI</i>	H ₂ , formate
<i>MARISNIGRI</i>	H ₂ , formate
<i>METHANOSPIRILLUM HUNGATEI</i>	H ₂ , formate
<i>HUNGATEI s. GP 1</i>	H ₂ , formate
<i>METHANOSARCINA BARKERI</i>	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
<i>BARKERI s. 227</i>	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
<i>BARKERI s. W</i>	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
<i>BARKERI s. UBS</i>	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
<i>BARKERI s. Z</i>	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
<i>METHANOSARCINA TM1</i>	CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
<i>METHANOCOCCUS MAZEI</i>	CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
<i>METHANOTHRIX SOEHNENII</i>	acétate
<i>METHANOPLANUS LIMICOLA</i>	H ₂ , formate
<i>METHANOTHERMUS FERVIDUS</i>	H ₂



Tableau n° 6 : Les méthanogènes et leur substrats

BALCH et al. (1979) ont établi une nouvelle classification des bactéries méthanogènes en se basant sur les homologues entre les séquences de l'ARN ribosomique 16 S. Ils distinguent trois ordres, quatre familles, sept genres et treize espèces (tableau 6). Depuis cette mise au point taxonomique, six espèces nouvelles ont été décrites : *Methanococcus mazei* (MAH, 1980), *Methanotherix soehngeni* (HUSER et al., 1982), *Methanosarcina TM₁* (ZINDER et MAH, 1979), *Methanococcus thermolithotrophicus* (HUBER et al., 1982), *Methanoplanus limicola* (WILDGRUBER et al., 1982) et *Methanothermus fervidus* (STETTER et al., 1982). Les principales caractéristiques morphologiques et biochimiques des 19 espèces méthanogènes connues sont résumées dans le tableau n° 6.

La plupart des espèces utilise le mélange H₂-CO₂ (16/19) et le formate (11/19). Seules quatre espèces, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina TM₁*, *Methanococcus mazei* et *Methanotherix soehngeni* décarboxylent l'acétate. Les trois premières fermentent également le méthanol et les méthylamines. *Methanococcus mazei* et *Methanosarcina TM₁* ont été décrites comme n'utilisant pas l'hydrogène mais de faibles croissances de souches thermophiles de *Methanosarcina* (PETROF, 1982) et de *Methanococcus mazei*, souche MC₃ (TOUZEL, 1982) ont été observées sur H₂ - CO₂.

La réduction du CO₂ en méthane fait intervenir des déshydrogénases, des transporteurs d'électrons et des réductases. Aucun métabolite intermédiaire n'est détecté et BARKER (1956) a suggéré qu'un transporteur x était impliqué dans les quatre étapes de réduction (figure n° 6).

Chez les espèces utilisant l'hydrogène et le formate, des hydrogénases et des formate déshydrogénases ont été mises en évidence. Ces enzymes catalysent la réduction d'un transporteur d'électrons à bas potentiel qui est spécifique des méthanogènes, le F 420 (EIRICH et al., 1979). Ce coenzyme a été découvert par CHEESEMAN. Sa structure qui fut déterminée par EIRICH est proche de celle du FMN (Flavine mononucléotide). Il interviendrait uniquement dans les trois premières étapes de réduction. Le F 420 est fluorescent sous sa forme oxydée et cette propriété est utilisée pour la mise en évidence des méthanogènes sous microscope en fluorescence. (HUTSCHEMARCKERS et al., 1982). La découverte du coenzyme M par MAC BRIDE et WOLFE (1971) a confirmé l'hypothèse de BARKER sur la présence de transporteurs. Le coenzyme M est l'acide 2 mercapto-éthane

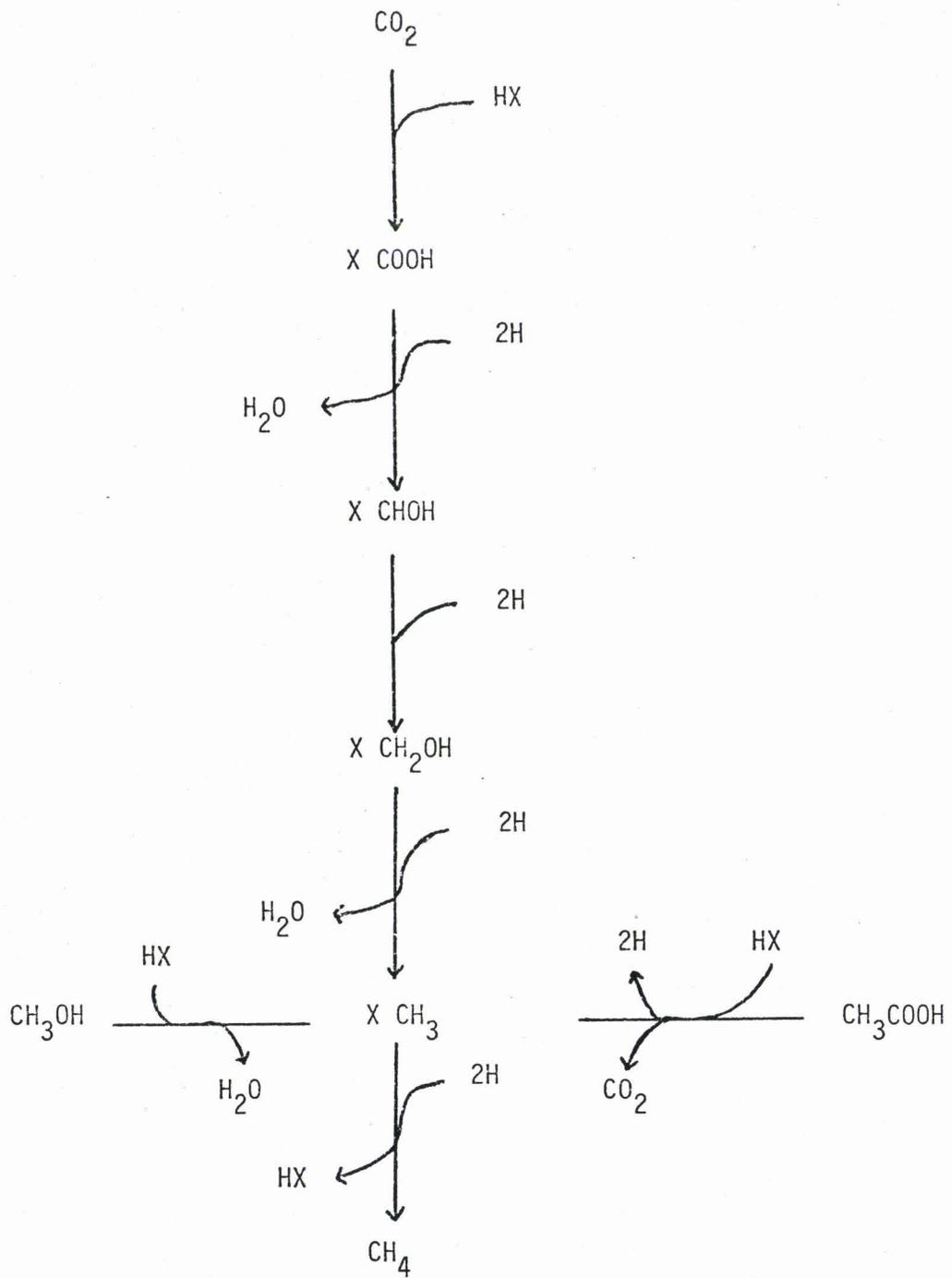


Figure n° 6 : Schéma de BARKER



sulfonique ($\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_3$) (TAYLOR et al., 1974). Il intervient comme transporteur de chaînons monocarbonés dans les deux dernières étapes de la réduction où il est alors sous les deux formes : $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CoM}$ et $\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CoM}$. Le coenzyme M est présent chez toutes les méthanogènes et est un facteur de croissance chez *Methanobacterium ruminantium* (TAYLOR et al., 1974).

Un système enzymatique soluble, la méthyl CoM réductase contenant une hydrogénase catalyse, en présence d'hydrogène, la réduction du méthyl CoM en méthane. Cette réaction nécessite la présence de Mg et d'ATP. Ce dernier joue uniquement un rôle catalytique. Le CO_2 est un activateur de la méthyl CoM réductase (RPG effect) et WOLFE (1979) a suggéré que la réduction du méthyl CoM était couplée avec l'activation du CO_2 .

De nouveaux cofacteurs (F 430 et F 342) ont été récemment mis en évidence (DIERKERT et al., 1981). Leur rôle reste cependant à déterminer.

La réduction du CO_2 en méthane est couplée avec la synthèse d'ATP par un mécanisme de type ETP (THAUER et al., 1977). Les méthanogènes ne possèdent ni quinone, ni cytochrome. Elles se distinguent ainsi des autres micro-organismes qui produisent leur ATP par ETP.

Le méthane produit à partir de l'acétate provient du groupement méthyl. Ceci a été démontré grâce à l'utilisation d'acétate radioactif marqué sur le carbone 2. (STADTMANN et BARKER, 1949). La conversion de l'acétate et du méthanol en méthane passe par l'intermédiaire du méthyl CoM (SMITH et al., 1980). La manière dont les méthanogènes acétoclastes produisent leur ATP est encore mystérieuse. La décarboxylation de l'acétate n'est pas suffisamment exergonique (-7,5 Kcal/mole) pour permettre la formation d'une liaison riche en énergie et la synthèse d'ATP par SLP. Plusieurs faits expérimentaux suggèrent que la formation d'ATP serait réalisée par un mécanisme chimio-osmotique. Une baisse rapide du pH extracellulaire induit la formation d'ATP chez *Methanosarcina barkeri*. Les agents découplants (dinitrophénol, pentachlorophénol) inhibent la synthèse d'ATP chez les acétoclastes. Plusieurs hypothèses expliquant la formation d'ATP par un gradient de protons ont été émises (WOLFE, 1979 ; MOUNTFORT, 1978).

Les méthanogènes ont des exigences physiologiques très strictes vis-à-vis du milieu. Le pH doit être proche de la neutralité et le potentiel rédox-inférieur à -350 mV. Le sulfure est la seule source de soufre utilisée. La plupart des espèces peuvent être cultivées sur un milieu exclusivement minéral mais la présence d'extraits de levure ou de trypticase stimule cependant leur croissance.

Aucune acétoclaste poussant à une température supérieure à 60° C n'a été décrite mais on connaît des extrêmes thermophiles qui utilisent H₂-CO₂ à plus de 70° C.

Les temps de génération sur hydrogène et CO₂ sont d'environ 10 heures. Sur acétate, *Methanosarcina barkeri* et *Methanococcus mazei* ont un taux de croissance relativement élevé (environ 24 heures de temps de doublement) mais une faible affinité pour le substrat. Au contraire, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* possède des temps de génération très lents (10 jours) mais une forte affinité pour l'acétate.

II - INTERACTION ENTRE LES DIFFERENTES POPULATIONS BACTERIENNES

Les interactions entre les différentes populations bactériennes présentes dans un digesteur ont une importance fondamentale sur la stabilité de la fermentation méthanique. La régulation du pH et de la pression partielle d'hydrogène est assurée par l'activité des bactéries méthanogènes. La conversion de l'acétate en méthane permet d'éliminer l'acidité produite par le métabolisme des bactéries fermentatives. Le maintien d'une faible pression partielle d'hydrogène est indispensable pour la croissance des bactéries OHPA. Si l'activité des méthanogènes est insuffisante pour absorber le flux d'acétate et d'hydrogène, on assiste à une baisse du pH, à une accumulation d'acides gras volatils et à un blocage de la méthanogénèse.

Des interactions nutritionnelles entre les bactéries ont été mise en évidence dans les digesteurs et dans le rumen. De nombreuses souches nécessitent des facteurs de croissance (vitamines, acides aminés, acides gras ramifiés...). Ces facteurs de croissance sont présents dans le jus de rumen et les surnageants de digesteurs et seraient excrétés lors de la croissance de certaines espèces. (ZEIKUS, 1979).

III - COMPETITION ENTRE BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES ET BACTERIES METHANOGENES

La réduction du sulfate en sulfure (-36,4 Kcal/mole) est plus exergonique que la réduction du CO₂ en méthane (-31,3 Kcal/mole). Dans les écosystèmes anaérobies, la méthanogénèse est inhibée par la présence de sulfate (WINDEREY et ZEIKUS, 1977). La compétition entre les bactéries sulfato-réductrices et méthanogènes se situe au niveau de l'acétogénèse et de l'utilisation de l'hydrogène, du formate et de l'acétate : presque toutes les sulfato-réductrices fermentent le lactate et l'éthanol en acétate, *Desulfobulbus propionicus* décarboxyle le propionate en acétate (WIDDEL et PFENNIG, 1982) et *Desulfotomaculum acetoxidans* oxyde complètement l'acétate et le butyrate en CO₂ (WIDDEL et PFENNIG, 1977). Certaines souches utilisent également l'hydrogène et le formate (BADZIONG et al., 1978).

Les concentrations en sulfate dans les digesteurs anaérobies sont en général faibles et l'inhibition de la méthanogénèse par les sulfates est surtout observée dans certains éco-systèmes comme les sédiments.

Les sulfato-réductrices ne fermentent pas le méthanol et les méthylamines. OREMLAND et al. (1982) ont mis en évidence dans les sédiments, une production simultanée de méthane et de sulfure en présence de ces composés.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

I - ORIGINE DES POPULATIONS BACTERIENNES ETUDIEES

Les numérations et les isollements sur lactate ont été réalisés à partir de quatre digesteurs de laboratoire A, B, C et D et les enrichissements sur éthanol et propionate à partir du digesteur D. Tous les fermenteurs ont été inoculés avec des boues de digesteurs urbains et ont été conduits à 35° C. Les milieux d'alimentation de ces quatre digesteurs sont :

- Digesteur A : milieu synthétique contenant du saccharose, du lactate et des acides gras volatils.

- Digesteur B : eau recyclée de fabrication de panneaux de fibres de bois. Les substrats carbonés sont principalement des oses et des hémicelluloses partiellement hydrolysées.

- Digesteur C : vinasses de vin blanc concentrées et détartrées, riches en lactate et en glycérol. La population bactérienne a été fournie par A. BORIES de la station de technologie végétale de Narbonne.

- Digesteur D : eau de blancheur de petits pois. Les substrats carbonés sont essentiellement des glucides de faible poids moléculaire (saccharose, glucose, fructose).

II - TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE CULTURE DES BACTERIES

Les isollements et les numérations sont réalisés suivant les cas sur boîtes de pétri en chambre anaérobie (FORMA SCIENTIFIC 1024) sous atmosphère de N₂, CO₂, H₂ (75/15/10) ou en roll tubes selon la technique de HUNGATE modifiée par MILLER et WOLIN (1973). Cette dernière technique est également appliquée pour la culture des souches en milieu liquide en flacons pénicilline de 16, 25, 50 et 125 ml et en tubes de culture de 18 x 160. Tous les isollements et toutes les cultures sont réalisés à 35° C.

III - MILIEUX DE CULTURE

Le milieu CBBM (carbonate buffered bas al medium) est utilisé comme milieu de base (ZEIKUS et WOLFE 1973). Sa composition par litre est la suivante :
solution macrominérale (KH₂ PO₄, 6 g/l ; Na Cl, 12 g/l ; Mg SO₄, 7 H₂O, 2,4 g/l ; Ca Cl₂, 2 H₂O, 1,6 g/l) 50 ml, solution d'oligo-éléments (Fe SO₄, 7 H₂O, 0,1 g/l ; Mn Cl₂, 4 H₂O, 0,1 g/l ; Ca Cl₂, 6 H₂O, 0,17 g/l ; Co Cl₂, 2 H₂O, 0,1 g/l ; Zn Cl₂, 0,1 g/l ; Cu Cl₂, 0,02 g/l ; H₃ BO₃, 0,01 g/l ; Na molybdate 0,01 g/l ; Na Cl, 1 g/l ; Na₂ Se O₃, 0,017 g/l ; Ni SO₄, 6 H₂O, 0,026 g/l ; acide nitrilotriacétique, 12,8 g/l

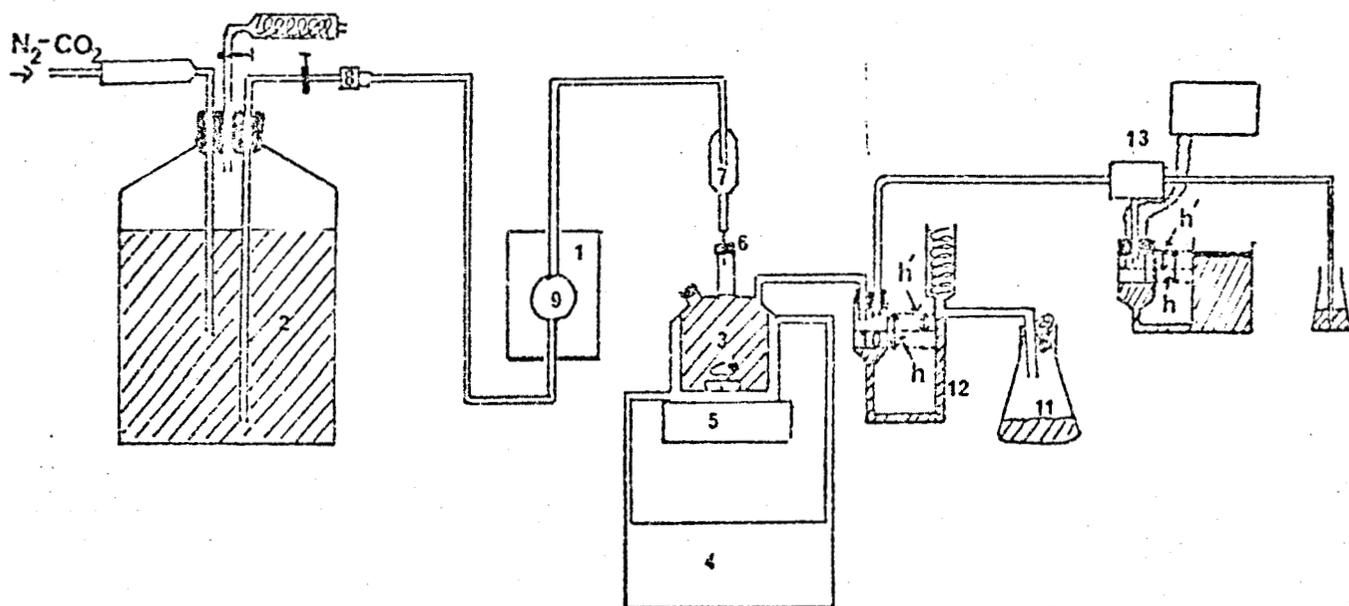


Figure n° 1 : Schéma du système de culture continue pour bactéries anaérobies



neutralisé à pH 6,5 avec KOH) 10 ml, solution de vitamines (biotine, 2 mg/l ; acide folique, 2 mg/l ; B₆ (pyridoxal), HCL, 0,1mg/l ; B₁ (thiamine), HCL, 5 mg/l ; B₂ (riboflavine), 5 mg/l ; acide nicotinique (niacine), 5 mg/l ; acide pantothénique, 5 mg/l ; B₁₂, cristalline (cyanocobalamine), 0,1 mg/l ; PABA (acide para-aminobenzoïque), 5 mg/l ; acide lipoïque, 5 mg/l) 10 ml, NH₄ Cl, 1 g, resazurine (0,1 %) 1 ml. La concentration de bicarbonate a été modifiée pour obtenir un pH de 7,3 sous une atmosphère de CO₂ de 15 % (milieu BM, KHCO₃ = 4,5 g/l) et de 100 % (milieu BC, KHCO₃ = 30 g/l).

Le milieu BY est le milieu BM supplémenté avec 0,5 g/l d'extrait de levure. Pour l'isolement et la caractérisation de la souche X₄, le milieu BC est supplémenté avec 0,5 g/l d'extrait de levure (milieu BCY) et 0,5 g/l d'extrait de levure et 5 % de jus de rumen (milieu BCR). Le milieu de base BS pour les bactéries sulfato-réductrices est le milieu BM dépourvu de NH₄ Cl et supplémenté avec (NH₄)₂ SO₄, 1,24 g/l et Na₂ SO₄, 1,24 g/l. Le milieu BYS est le milieu BS additionné de 0,5 g/l d'extrait de levure. Les milieux d'isolement gélosés contiennent 15 g/l d'agar (Merck référence 1614). Les sources de carbone et la solution réductrice (Cysteine H Cl, 1,25 %, Na₂ S, 1,25 %) sont autoclavées séparément dans des flacons pénicilline sous atmosphère d'azote et ajoutées stérilement au milieu.

IV - CULTURE EN CONTINU

Le dispositif expérimental représenté sur la figure n°1 a été conçu de manière à limiter les risques de contamination microbienne et de diffusion de l'oxygène. Toutes les canalisations sont en inox (1/8 pouce) ou en caoutchouc butyl (diamètre intérieur 6 mm). La régulation du débit d'alimentation est assurée par une pompe doseuse (1) (BRAUH Fe 211) à membrane avec une tête en inox autoclavable. Le milieu d'alimentation (8 litres) est préparé, stérilisé et réduit dans un flacon en pyrex de 10 litres (2). Il est maintenu sous une légère surpression d'un mélange gazeux N₂ - CO₂ (85/15). Le réacteur (3) dont le volume utile est de 350 ml est en pyrex avec une double enveloppe reliée à un bain-marie thermostaté (4). L'homogénéisation du milieu est réalisée par un barreau aimenté et un agitateur magnétique (5). Le milieu neuf est introduit dans le réacteur goutte à goutte à travers une aiguille piquée dans un bouchon en butyl (6). Une ampoule (7) située avant l'aiguille permet d'éviter une remontée des bactéries dans les canalisations et le milieu d'alimentation. Un raccord en inox (8) est situé entre le réservoir de milieu neuf et la

pompe d'alimentation. La membrane de la pompe (9) peut donc être facilement remplacée en maintenant le reste du système stérile et anaérobie. Le milieu fermenté est évacué par débordement et tombe dans le séparateur gaz-liquide (10). Il est finalement récupéré dans un erlenmeyer stérile (11) après un passage dans un syphon (12) qui intervient comme joint hydrolique empêchant la diffusion de l'oxygène dans le système. Le volume de gaz produit est déterminé grâce à un compteur (13) à impulsion (MOLETTA et ALBAGNAC 1982). En cas de production de gaz, tout le dispositif est sous une légère surpression de quelques centimètres d'eau (h - h').

V - DETERMINATIONS ANALYTIQUES

- Dosage des acides gras volatils et des alcools

Ils sont dosés par chromatographie en phase gazeuse sur un chromatographe (Varian 3700) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne en acier inoxydable (1/8" x 8') est remplie avec du chromosorb W.AW.DHCS 100 - 120 mesh imprégné de 25 % de NPGA (néopentylglycoladipate) et de 2 % d'acide phosphorique. Le gaz vecteur est de l'azote saturé en acide formique. Son débit est de 30 ml par minute.

Les AGV sont dosés en isotherme à 130° C. Une programmation linéaire de température entre 80° C et 130° C pendant 10 mn permet de séparer les alcools et les AGV.

- Dosage du lactate et du succinate

Ils sont dosés par chromatographie liquide haute pression avec un détecteur UV à 210 nm (Waters). La colonne à compression radiale (radial pack C₁₈) a une granulométrie de 10 µm. L'élution est réalisée par un tampon phosphate 0,2 M à pH 3.

- Dosage des gaz

L'analyse des gaz est effectuée sur un chromatographe Pye Unicam GCD équipé d'un détecteur à conductivité thermique. La colonne en acier inoxydable est remplie de Porapak S. La séparation est réalisée en isotherme à 50° C.

- Détermination du carbone minéral

Les tubes de culture scellés sont alcalinisés par l'injection de Na OH 1 0 N (5% v/v) afin de piéger sous forme de carbonate tout le CO₂ présent dans l'atmosphère du flacon. La concentration en carbone minéral est ensuite déterminée sur un analyseur à infrarouge (HORIBA - PIR 2000).

- Dosage de l'acide formique

L'acide formique est dosé par une méthode colorimétrique (LANG 1972). Dans une solution de propanol et d'anhydride acétique, l'acide formique réagit avec l'acide citrique en donnant une coloration rouge. La lecture se fait à 515 nm.

- Détermination de la croissance

La croissance est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 550 nm pour les milieux réduits et à 680 nm pour les milieux oxydés contenant de la resazurine. Les croissances dans les tubes de culture anaérobie de 18 x 160 sont mesurées directement en insérant les tubes dans la cellule de lecture du spectrophomètre (JEAN et CONSTANT - PROLABO).

- Dosage des sulfures

Ils sont dosés ionométriquement à l'aide d'une électrode spécifique (ORION).

VI - IDENTIFICATION DU CYTOCHROME C

Les cellules (1 g) sont récupérées après centrifugation du milieu de culture et resuspendues dans 3 ml d'eau distillée à 0° C. Elles sont broyées dans une presse de FRENCH à 20 000 psi . Les extraits acellulaires sont dilués 50 fois dans un tampon tricine KOH 50mM à pH 7,6. Les deux cuves (référence et mesure) sont remplies avec de l'extrait dilué. Le cytochrome C est réduit dans la cuve de mesure par l'addition de quelques cristaux de Na₂ S₂ O₄ avant la réalisation du spectre de différence (BADZIONG et al., 1978).

VII - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE *

- Coloration négative

Une goutte de culture bactérienne est déposée sur une grille parlodionée et carbonée pendant 30". Après séchage les bactéries sont colorées par une solution alcoolique d'acétate d'uranyle à 50 % pendant 30" et séchées de nouveau. Les observations sont réalisées sur un microscope HITACHI HS 75.

- Coupes

Les cellules bactériennes sont fixées pendant deux heures par la glutaraldehyde 1,2 % en tampon cacodylate 0,07 M (pH 7,3) contenant du rouge de ruthenium 0,05 %. Elles sont lavées (une heure) par un tampon cacodylate 0,1 M avec du rouge de ruthenium 0,075 %. La postfixation (trois heures) est réalisée à l'acide osmique 1 % en tampon cacodylate 0,1 M. L'inclusion a été pratiquée en EPON après déshydratation par les alcools croissants et passage dans l'oxyde de propylène. Les coupes sont effectuées au PORTER BLUM et observées aux microscopes HITACHI HS 75 et JEOL EM 120C après avoir été contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

* toute la partie concernant la microscopie électronique a été réalisée par le Dr PRENSIER du laboratoire de microscopie électronique de l'université des sciences et techniques de LILLE

CHAPITRE III

RESULTATS

DIGESTEUR	BACTERIES UTILISATRICES DE LACTATE	BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES
A milieu synthétique saccharose lactate AGV	8.10^8	$1,5.10^8$
B effluent de panneaux de fibres de bois	5.10^8	non déterminé
C vinasse de vin blanc détartrée et concentrée	5.10^8	$2,4.10^8$

Tableau n° 1 : Numération des bactéries utilisatrices de lactate



I - ISOLEMENT

A - Isolement et numération de bactéries utilisatrices de lactate

La concentration des bactéries utilisatrices de lactate a été déterminée par dilutions sérielles dans trois différents digesteurs de laboratoires (tableau n° 1). Sur le milieu BY lactate gélosé, les numérations furent réalisées en chambre anaérobie et ont toutes donné des résultats voisins de 5.10 bactéries par ml de contenu de digesteur. Le dénombrement sélectif des bactéries sulfato-réductrices est effectué en roll tubes (tubes roulés) en comptant les colonies noires sur le milieu BYS lactate gélosé. Leur concentration est de 2.10 bactéries par ml dans les digesteurs A et C. Ces résultats sont à comparer avec les 5.10 bactéries par ml que l'on observe par comptage direct au microscope après coloration à l'acridine orange. Les bactéries utilisatrices de lactate représentent donc au moins 10 % de la microflore des digesteurs étudiés. Douze souches fermentant le lactate ont été isolées et purifiées soit à partir des colonies présentes sur les dilutions 10^{-7} et 10^{-8} (digesteurs A, B et C), soit par épuisement à partir du digesteur. Ces souches ont été classées en six groupes en fonction de leurs caractéristiques morphologiques principales et de leurs spectres fermentaires (tableau n° 2).

B - Enrichissement et isolement sur éthanol

1 - Enrichissement sur éthanol

Trois enrichissements ont été réalisés à partir du même digesteur anaérobie avec des transferts toutes les semaines. Les produits de fermentation de l'éthanol sont différents suivant les conditions de culture (tableau n° 3). De fortes concentrations en éthanol et en extrait de levure ont permis de sélectionner une fermentation de type *Clostridium kluyveri* (ME₁). Par contre, pour de faibles concentrations en éthanol et en extrait de levure on observe une fermentation propionique avec un faible inoculum et une atmosphère de 100 % de CO₂ (ME₃) et une fermentation homoacétique couplée avec une production de méthane avec un fort inoculum et une atmosphère de N₂, CO₂ 85/15 (ME₂).

2 - Isolement de bactéries acétogènes productrices d'hydrogène

A partir de l'enrichissement ME₂, des dilutions sérielles furent inoculées en roll tubes. Sur milieu BYS éthanol des colonies noires apparaissent en trois jours.

FERMENTEUR D'ORIGINE	SOUCHES	CARACTERISTIQUE MORPHOLOGIQUE	PRODUITS DE FERMENTATION DU LACTATE	IDENTIFICATION PRESUMEE
B	L ₅	cocci gram -, non sporulé, non mobile	A + P + B + V + C + H ₂ (1)	<i>Megasphaera elsdenii</i>
C	BL ₁ BL ₂	bacille gram +, non sporulé,	A + P (1)	<i>Propionibacterium sp.</i>
B	L ₁ L ₃	non mobile		
D	B ₂	bacille gram + non mobile	A + B	<i>Embacterium sp.</i>
A	CL ₁ CL ₂	bacille gram + sporulé non mobile	A + P (1)	<i>Clostridium propionicum</i>
D	B ₁	bacille en forme de spirales gram - mobile	A + P (1)	<i>Treponema</i>
A	CL ₃	vibrio gram - non sporulé mobile	A + H ₂ S (2)	<i>Desulfovibrio sp.</i>

Tableau n° 2 : Regroupement en six groupes de bactéries utilisatrices de lactate isolés.

(1) milieu BY lactate

(2) milieu BYS lactate

A = acétate

V = valérate

P = propionate

C = coproate

B = butyrate

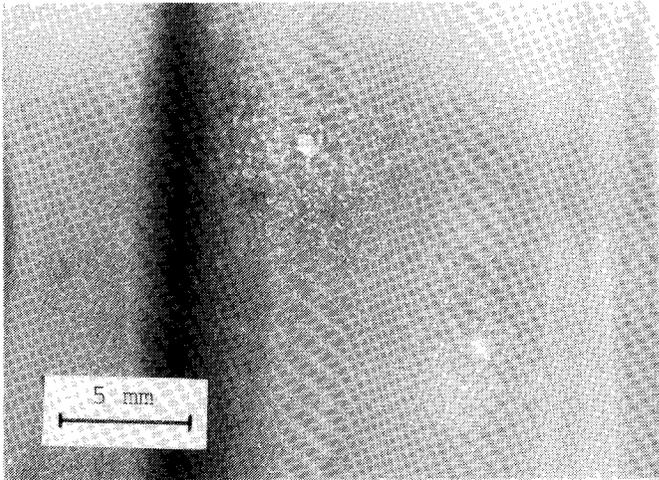


Figure N° 1 : Petites colonies de la souche X_4 entourant une colonie de la souche X_8 sur milieu BCY éthanol

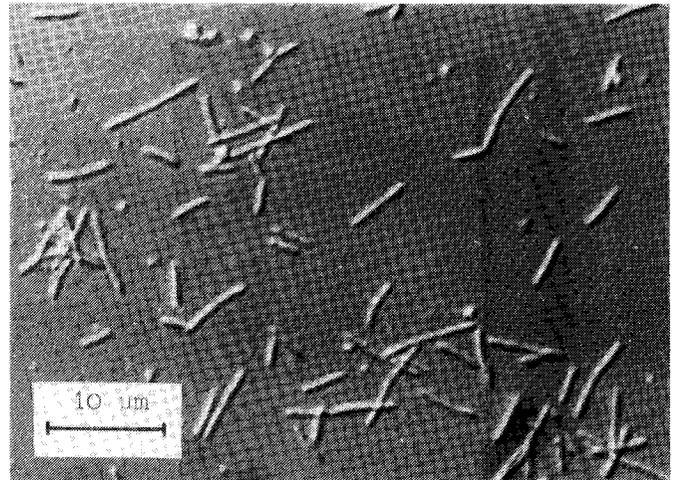


Figure N° 7 : Morphologie de la souche X_4 (microscope à contraste interférentiel)

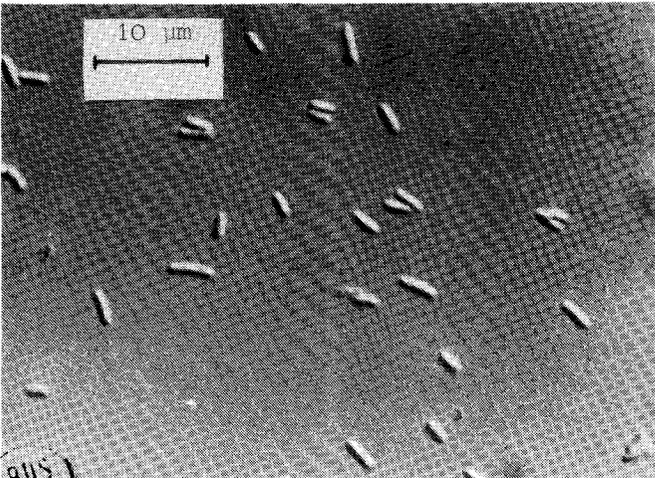


Figure N° 10 : Morphologie de la souche X_8 (microscope à contraste interférentiel)

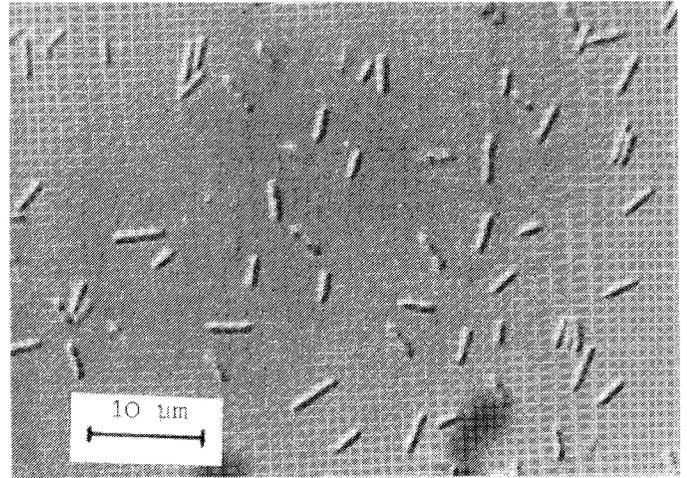


Figure N° 26 : Morphologie de la souche FP (microscope à contraste interférentiel)

Deux souches sulfato-réductrices RE₁ et RE₂₆ furent isolées et purifiées. Sur milieu BY éthanol avec un tapis de *Methanobrevibacter* AZ, on observe, après un mois d'incubation, des colonies crèmes formant parfois des poches de gaz dans la gélose. Ce type de colonies n'apparaît pas sur le milieu témoin BY sans éthanol. A partir d'une colonie gazogène, nous avons purifié une souche AE₁. Cette souche pousse en culture pure sur milieu BYS éthanol et paraît semblable à la souche RE₂₆.

3 - Isolement de bactéries propioniques utilisatrices d'éthanol

L'enrichissement ME₃ fut maintenu sur le même milieu avec des transferts hebdomadaires. Aucune croissance n'est observée après un choc thermique de 10 mn à 80° C ou en absence d'extrait de levure. Des dilutions sérielles furent inoculées en roll tubes sur milieu BCY gélosé avec et sans éthanol. Dans les deux cas on observe des colonies blanches irrégulières jusqu'à la dilution 10⁻⁸. Des colonies jaunes régulières apparaissent jusqu'à la dilution 10⁻⁴ uniquement sur le milieu BCY éthanol. Une souche dénommée X₈ a été purifiée à partir des colonies blanches irrégulières. Elle ne fermente pas l'éthanol et pousse sur l'extrait de levure. Une colonie jaune régulière fut prélevée sur la dilution 10⁻⁴ et mise en suspension dans un tube de milieu liquide. Des dilutions sérielles furent réalisées immédiatement à partir de ce tube et inoculées sur quatre milieux gélosés différents : BCY, BCY éthanol, BCY éthanol préincubé avec une culture de X₈ et BCR éthanol (tableau n° 4). Des colonies jaunes régulières sont retrouvées à la dilution 10⁻⁴ seulement sur les milieux BCR éthanol et BCY éthanol préincubé avec la souche X₈. Sur les milieux BCY, BCY éthanol et BCR éthanol, on observe environ 10² colonies blanches régulières. Sur milieu BCY éthanol, ces colonies sont entourées de petites colonies jaunes dont la taille décroît en fonction de la distance qui les sépare de la colonie blanche centrale (figure n° 1). Ces faits indiquent clairement que le développement des colonies jaunes nécessite la présence d'un facteur de croissance produit par la souche X₈ et qui est présent dans le jus de rumen. L'isolement d'une souche pure X₄ put être réalisée à partir des colonies présentes sur la dilution 10⁻⁴ sur le milieu BCR éthanol. Contrairement à la souche X₈, la souche X₄ fermente l'éthanol en acétate et propionate.

ENRICHISSEMENT N°	CONDITION DE CULTURE				PRODUITS FINAUX
	Ethanol mM	Extrait de levure g/l	Phase gazeuse	Inoculum %	
ME ₁	100	1	N ₂ /CO ₂	2	Butyrate + Caproate
ME ₂	30	0,2	N ₂ /CO ₂	20	Acétate + CH ₄
ME ₃	30	0,2	CO ₂	2	Acétate + Propionate

Tableau n° 3 : Produits de fermentation de l'éthanol par trois enrichissements obtenus à partir du même digesteur anaérobie.

MILIEU GELOSE	COLONIES RETROUVEES A LA DILUTION 10 ⁻¹	COLONIES RETROUVEES A LA DILUTION 10 ⁻⁴
BCY	8 colonies blanches	-
BCY éthanol	12 colonies blanches entourées de petites colonies jaunes	-
BCY éthanol préincubé avec la souche X ₈	-	3 colonies jaunes
BCR éthanol	13 colonies blanches	5 colonies jaunes

Tableau n° 4 : Purification de la souche X₄ sur différents milieux gélosés



C - Enrichissement et isolement sur propionate

1 - Enrichissement sur propionate

Un enrichissement réalisé à partir de digesteur anaérobie a été maintenu sur milieu BM propionate pendant un an avec des transferts de 10 % (v/v) toutes les six semaines. Le propionate est entièrement utilisé et le CH₄ et le CO₂ sont les seuls produits finaux. Après stabilisation de l'enrichissement la masse bactérienne présente un aspect cotonneux et le milieu de culture reste limpide. L'examen microscopique permet d'observer de longs filaments qui, entrecroisés les uns avec les autres, forment un réseau serré emprisonnant une population variée de bactéries. Lorsque l'enrichissement est transféré sur milieu BM acétate, on obtient la croissance du filament et une décarboxylation de l'acétate en méthane. Cette bactérie méthanogène se rapproche par ses caractéristiques morphologiques et biochimiques de *Methanothrix soehngeni* (HUSER et al., 1982) dont aucune culture pure n'est actuellement disponible. Par une série de dilutions sérielles sur milieu BY acétate contenant 0,1 g/l de vancomycine nous avons pu obtenir une culture hautement enrichie du filament. Cette culture dénommée FE n'est pas absolument pure mais peut cependant être utilisée pour des études physiologiques et pour réaliser des associations bactériennes. Aucune croissance n'est en effet observée après inoculation de la culture FE sur des milieux contenant de l'extrait de levure, des acides aminés et différentes sources de carbone (glucose, lactate, éthanol, propionate).

2 - Isolement des bactéries utilisatrices de propionate

A partir de l'enrichissement sur propionate, des dilutions sérielles ont été inoculées en roll tubes sur milieu BYS gélosé avec et sans propionate. On observe après trois semaines d'incubation, des colonies noires à la dilution 10⁻⁵ uniquement sur le milieu BYS propionate. A partir de ces colonies, nous avons isolé et purifié une souche FP qui utilise le propionate en présence de sulfate dans le milieu. Nous avons également réalisé des isollements à partir des mêmes dilutions en incorporant des bactéries utilisatrices d'hydrogène dans la gélose afin de pouvoir isoler des organismes syntrophes. Les souches isolées sur milieu BYS propionate avec un tapis d'une souche de *Desulfovibrio* (MADISON STRAIN) qui utilise l'hydrogène mais pas le propionate sont semblables à la souche FP. Aucune bactérie fermentant le propionate n'a pu être isolée sur le milieu BY propionate en présence d'un tapis de *Methanobrevibacter* AZ.

SUBSTRATS	SOUCHES		
	L ₁	L ₅	B ₁
Glucose	+	+	-
Mannitol	+	+	-
Saccharose	+	-	-
Maltose	+	+	-
Xylose	+	-	-
Arabinose	+	-	-
Cellobiose	+	-	-
Glycérol	+	-	-

Tableau n° 5 : Substrats fermentés par les souches L₁, L₅ et B₁

substrat	Do	pH final	Produits finaux en mM		
			acétate	propionate	lactate
Glucose 25 mM	2,5	6	9	69	13
Lactate 50 mM	1,2	6,9	14,5	35	-

Tableau n° 6 : Fermentation du lactate et du glucose par la souche L₁

substrats	D0	pH	Produits finaux en mM					H ₂ *
			acétate	Propionate	butyrate	valérate	caproate	
Lactate (50)	0,45	6,8	20,5	21	3	2,5	-	48 %
Glucose (25)	1,3	6,2	10,5	1	11	0,9	2,3	58 %

* pourcentage dans la phase gazeuse

Tableau n° 7 : Fermentation du lactate et du glucose par la souche L₅.

II - CARACTERISATION DES ISOLATS

Neuf souches représentatives des voies de dégradation du lactate, de l'éthanol et du propionate ont été caractérisées. Elles ont été regroupées suivant le type de fermentation qu'elles réalisent :

- fermentation propionique (souches L₁, L₅, B₁, X₄)
- fermentation butyrique (souche B₂)
- fermentation acétique (souches sulfato-réductrices CP₆₂, RE₁, RE₂₆ et FP).

A - Bactéries propioniques

1 - Bactéries isolées sur lactate

La formation de propionate à partir de lactate est réalisée par différentes espèces bactériennes. Nous avons identifié des souches appartenant aux genres *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Megasphaera* et *Treponeme*.

- souche L₁ : (*Propionibacterium* sp.)

La souche L₁ utilise le lactate, le glycérol et une grande variété de sucres (tableau n° 5). Les relations entre la croissance et les produits de fermentation sur lactate et sur glucose sont indiqués sur le tableau n° 6. On observe sur glucose une production d'acétate, de propionate mais également de lactate.

La souche L₁ peut être cultivée sur le milieu minéral BM. L'addition d'extrait de levure stimule toutefois la croissance (figure n° 2). Le temps de génération est de 15 heures sur milieu BM lactate et de 9 heures sur milieu BY lactate (contenant 0,5 g/l d'extrait de levure). Le pH optimum se situe entre 6,9 et 7,5 (figure n° 3).

- souche B₁ : (*Clostridium propionicus*)

A part le lactate, la souche B₁ n'utilise aucun des composés testés (tableau n° 5). Elle réalise une fermentation propionique classique du lactate. Il faut noter le faible rendement de croissance (0,31 unité de DO pour 50 mM de lactate fermenté). L'extrait de levure est indispensable à la croissance. Le temps de génération de la souche B₁ sur milieu BY lactate est de 9 heures ($\mu = 0,0741 \text{ h}^{-1}$) (figure n° 4).

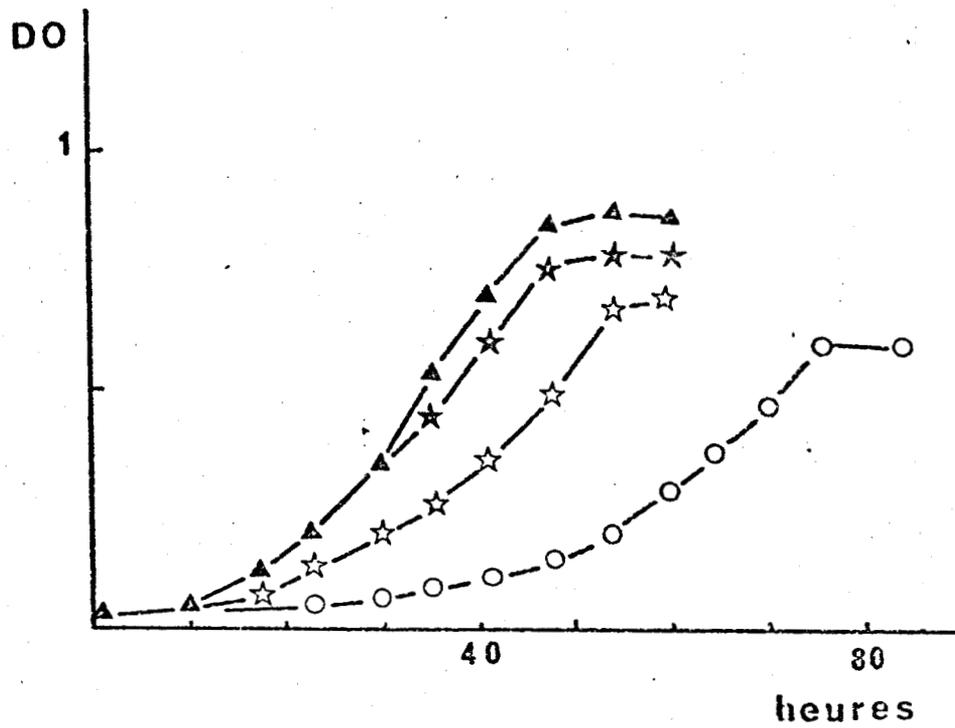


Figure n° 2 : Influence de la concentration en extrait de levure (○ 0 g/l ; ☆ 0,25 g/l ; ★ 0,5 g/l ; ▲ 1 g/l) sur les cinétiques de croissance de la souche L₁ sur lactate.

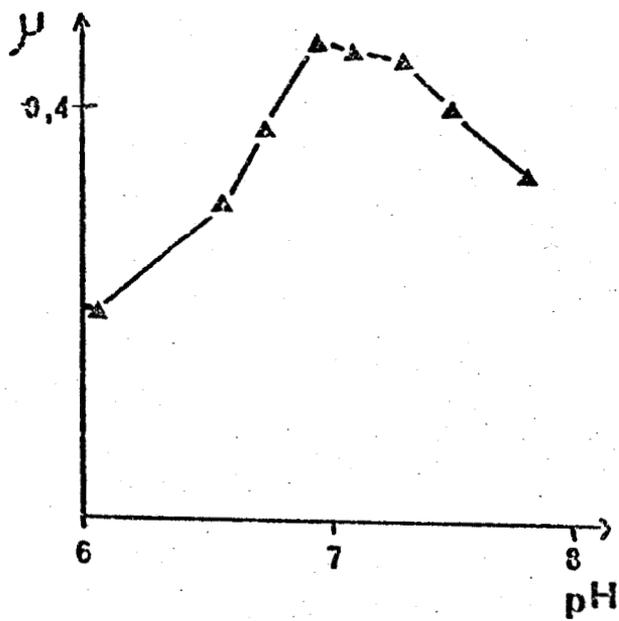


Figure n° 3 : Influence du pH sur le taux de croissance de la souche L₁ sur milieu BM lactate.



2

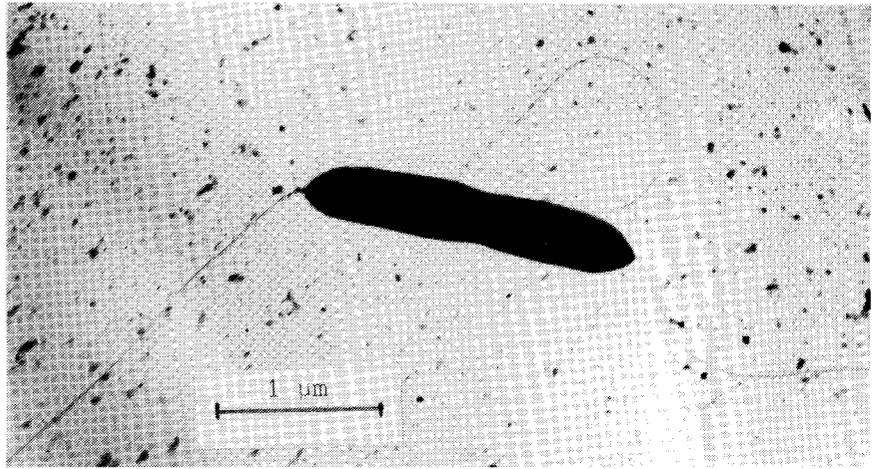


Figure N° 8 : Morphologie de la souche X₄ en coloration négative (grossissement x 7 500)

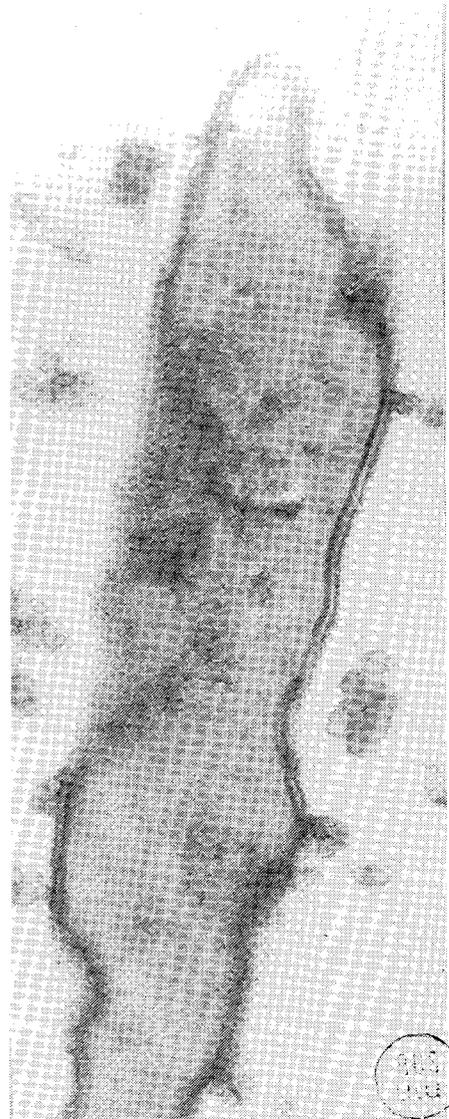
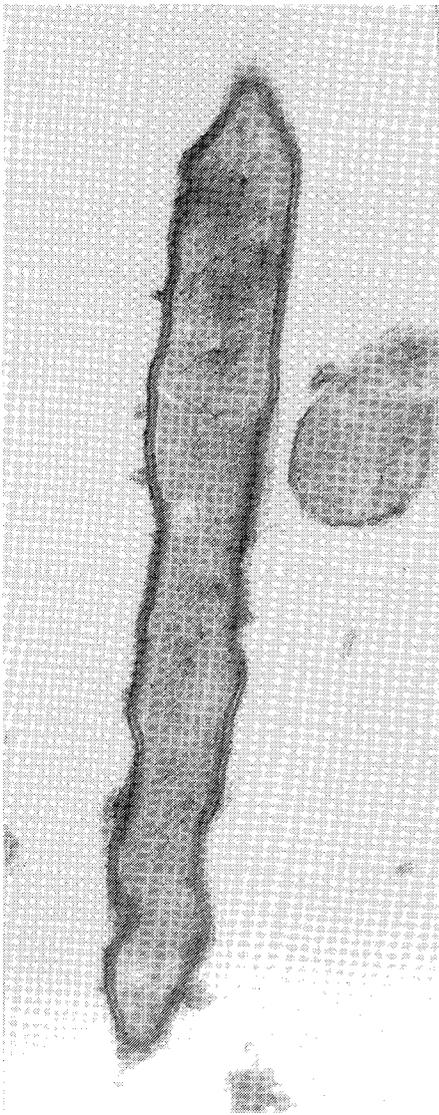


Figure N° 5 : Coupes fines de la souche X₄ observées en microscopie électronique

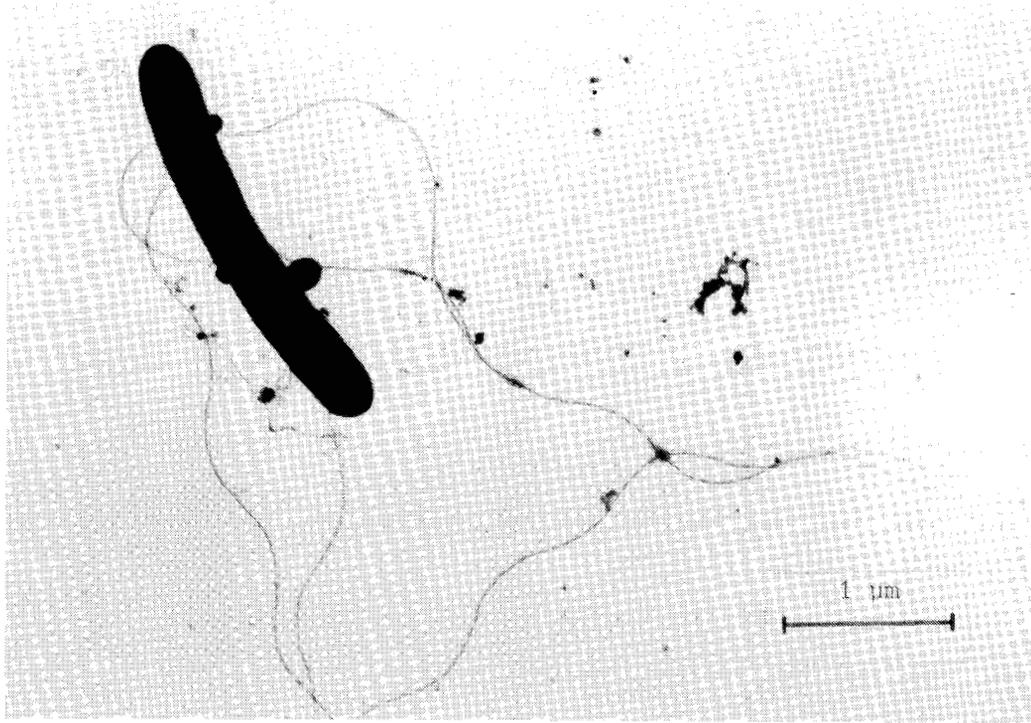


Figure N° 9 : Morphologie de la souche X₈ en coloration négative
(grossissement x 9 000)

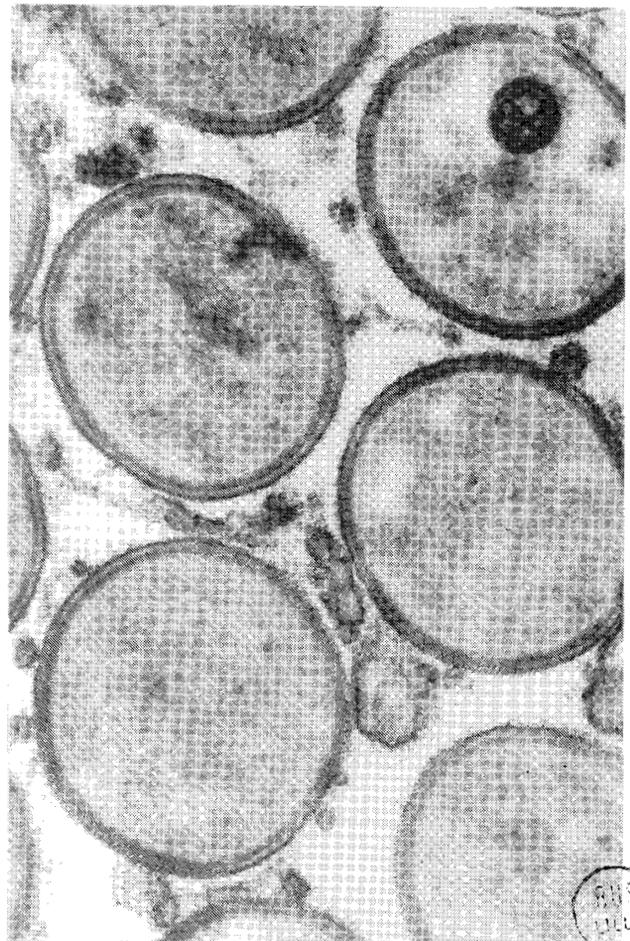
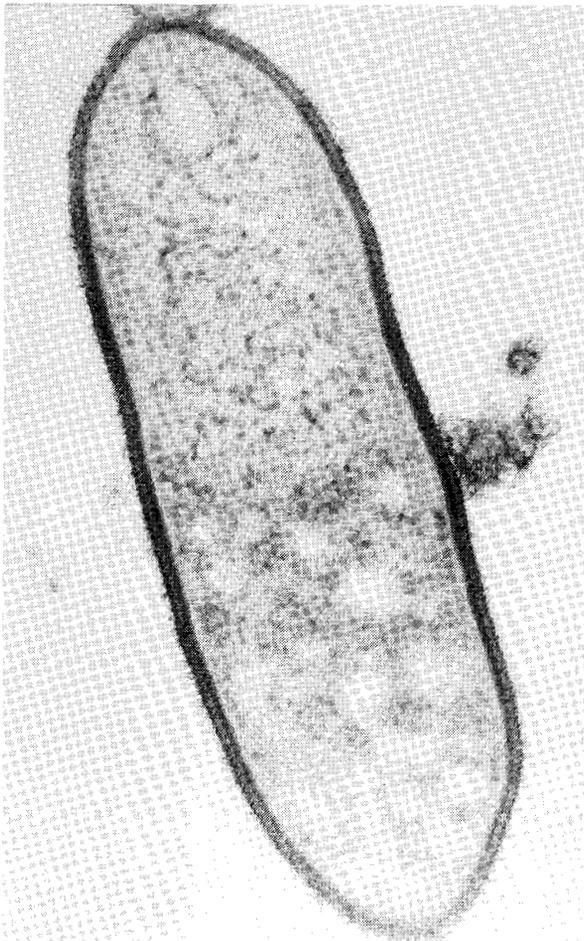


Figure N° 6 : Coupes fines de la souche X₈ observées au microscope
électronique

- souche L₅ : (*Megasphaera elsdenii*)

La souche L₅ fermente le lactate, le glucose, le mannitol et le maltose en hydrogène, en CO₂ et en un mélange d'acides gras volatils (C₂ et C₆). On observe une variation dans les rapports entre les produits finaux selon que la souche est cultivée sur glucose ou sur lactate (tableau n° 7). Les principaux produits de fermentation du lactate sont l'acétate et le propionate. Le glucose est par contre converti principalement en acétate, butyrate et caproate. La souche L₅ ne peut être cultivée qu'en présence d'extrait de levure dans le milieu. Son temps de génération sur milieu BY lactate est inférieur à 4 heures ($\mu=0,195 \text{ h}^{-1}$)(figure n° 4).

2 - Bactéries isolées sur éthanol

Les deux souches X₄ et X₈ isolées à partir de l'enrichissement ME₃ sont morphologiquement peu différentes. Ce sont deux bacilles anaérobies stricts non sporulés et gram négatif. La structure de type gram négatif des parois des deux souches est confirmée par l'examen au microscope électronique (figures n° 5 et n° 6).

Les cellules de la souche X₄ apparaissent isolées ou associées en courtes chaînes. La taille moyenne d'une cellule est de 0,6 x 1,4 μm (figure n° 7). L'examen au microscope électronique de coupes longitudinales montre l'absence de septum dans les chaînes qui paraissaient constituées de plusieurs éléments en microscopie optique. Les cellules présentent des formes assez irrégulières mais ces morphologies anormales sont peut être dues au fixateur ou à une contrainte mécanique. Bien que la souche X₄ ne paraisse pas mobile au microscope optique, des flagelles ont cependant pu être mis en évidence par examen en microscopie électronique en coloration négative (figure n° 8). Les cellules de la souche X₈ sont isolées ou en paires. Elles sont mobiles et possèdent plusieurs flagelles (figure n° 9). La taille moyenne d'une cellule est de 0,8 x 3 μm (figure n° 10).

Les deux souches X₄ et X₈ se différencient par leur sensibilité à différents antibiotiques. La souche X₄ est résistante à l'ampicilline (100 mg/l) à la néomycine (50 mg/l) et à la D-cyclosérine (100 mg/l) et sensible à la vancomycine (100 mg/l) et à la bacitracine (30 mg/l). La souche X₈ est seulement résistante à l'ampicilline et à la D-cyclosérine.

Aucune des deux souches ne fermente le lactate, le fumarate, le méthanol et le butanol. La souche X₈ utilise le glucose, le pyruvate et le mélange H₂ - CO₂ ;

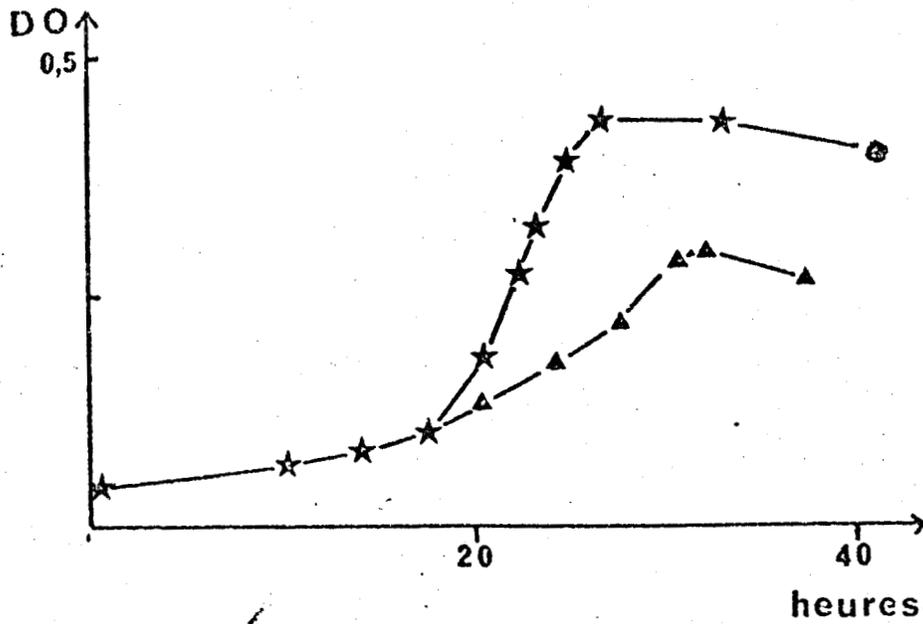


Figure n° 4 : Cinétiques de croissances des souches L₅ (★) et B₁ (▲) sur milieu BY lactate

SUBSTRATS (mM)	SOUCHE X ₄			SOUCHE X ₈	
	DO	Produits (ΔmM)		DO	Produits (ΔmM)
		acétate	propionate		acétate
Glucose (16)	0	-	-	1,04	47,8
Xylose (20)	0,2	11,00	9,6	0	-
H ₂ - CO ₂ *	0	-	-	0,15	15,7
Pyruvate (50)	0,29	34,8	15,4	0,38	35,7
Ethanol (30)	0,21	11,5	16,9	0	-
Propanol (30)	0,07	0	6,7	0	-
Propanol (30) + Acétate (30)	0,14	- 8,3	22,0	0	-



Tableau n° 8 : Substrats fermentés par les souches X₄ et X₈

* atmosphère de 2 bars

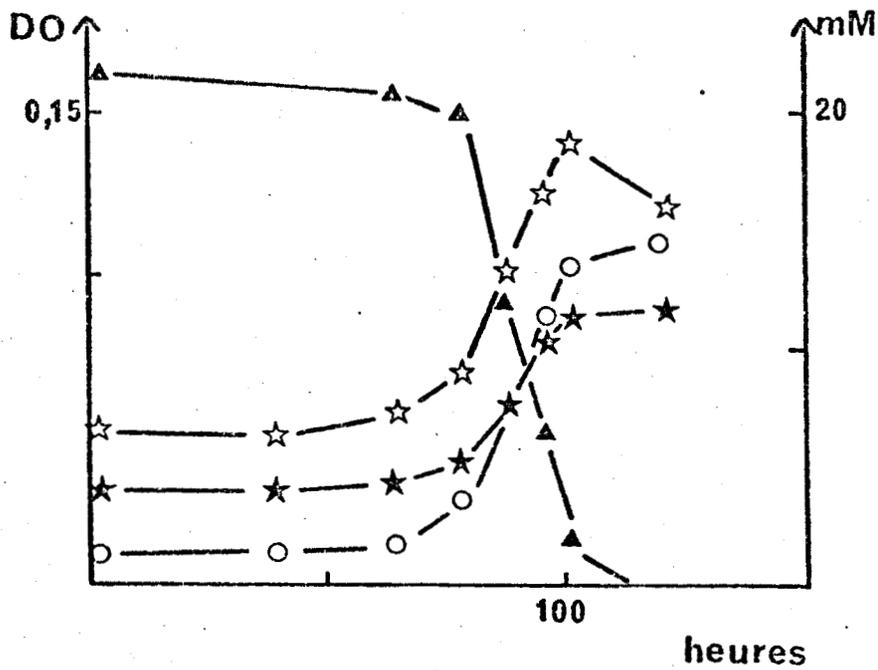


Figure n° 11 : Cinétique de dégradation de l'éthanol par la souche X_4 sur milieu BCY préincubé avec la souche X_8 .
 (\blacktriangle éthanol, \star acétate, \circ propionate, \star densité optique).

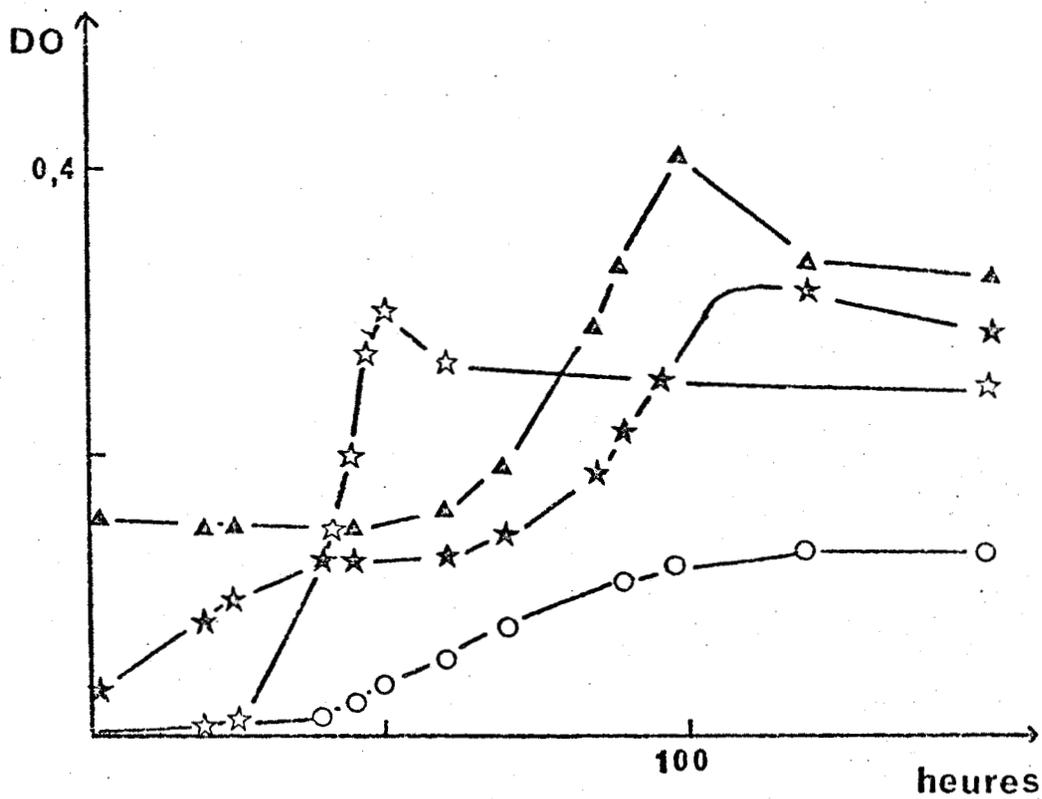


Figure n° 12 : Cinétiques de croissance de la souche X_4 cultivée seule ou en association avec la souche X_8 (\circ X_4 sur milieu BCY éthanol ; \star X_4 sur milieu BCR éthanol ; \star $X_4 + X_8$ sur milieu BCY éthanol ; \blacktriangle X_4 sur milieu BCY éthanol préincubé avec X_8).

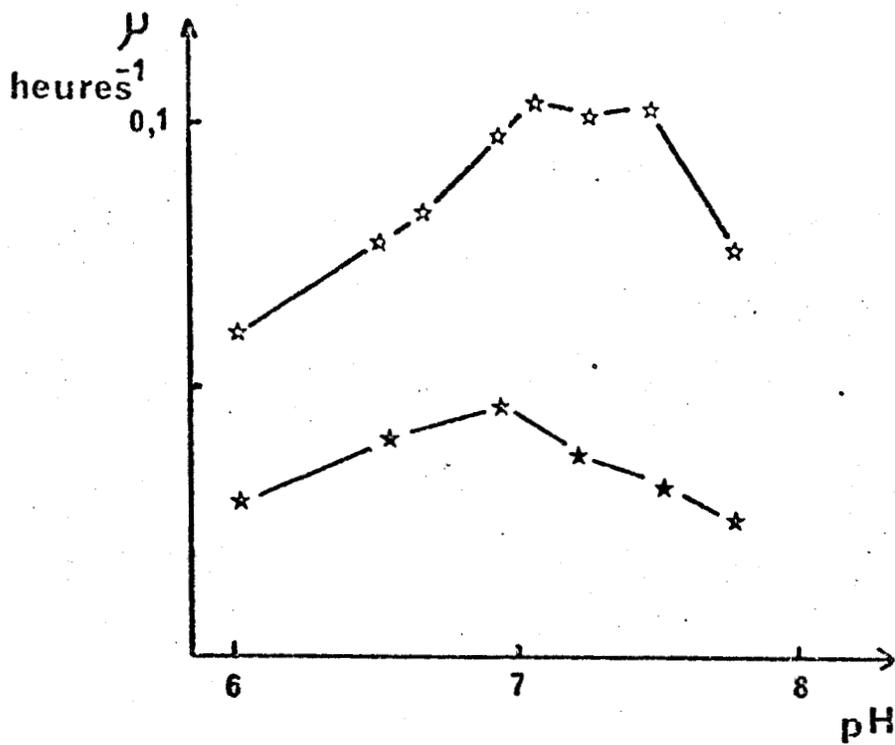


Figure n° 13 : Influence du pH sur le taux de croissance de la souche B_2 sur lactate (☆) et sur méthanol (★).

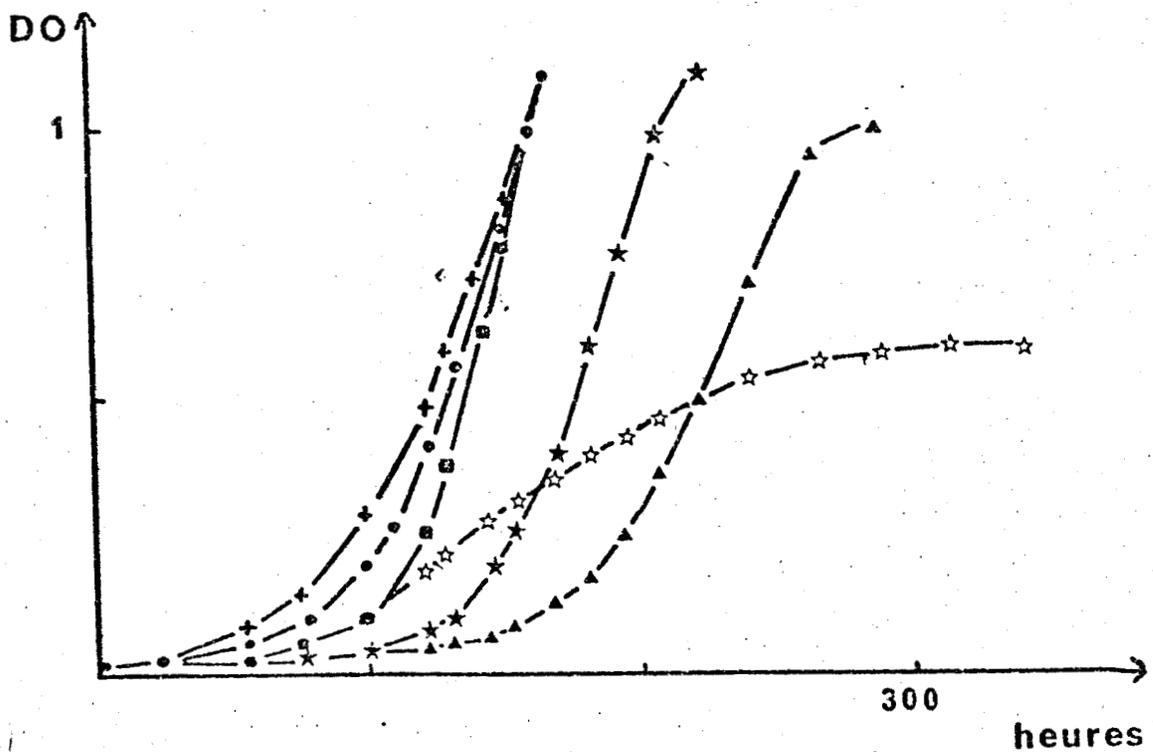
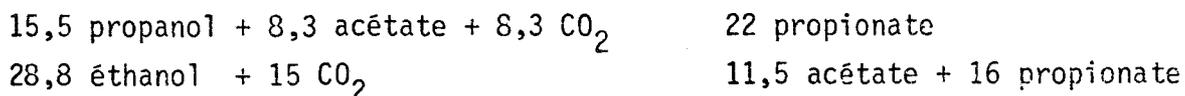


Figure n° 14 : Influence du pH (▲ 6,0 ; ★ 6,5 ; ■ 6,9 ; ● 7,3 ; + 7,6 ; ☆ 7,9) sur les cinétiques de croissance de la souche B_2 sur milieu BM méthanol.

l'acétate est le seul produit détecté. La souche X_4 fermente l'éthanol, le pyruvate et le xylose en un mélange d'acétate et de propionate. La croissance sur propanol nécessite la présence d'acétate dans le milieu et le propionate est alors le seul produit formé (tableau n° 8). La figure n° 11 montre les relations entre la croissance de la souche X_4 , la consommation d'éthanol et la production d'acétate et de propionate. Les bilans expérimentaux de fermentation de l'éthanol et du propanol sont :



Des cinétiques de croissance ont permis de confirmer la dépendance nutritionnelle de la souche X_4 pour un facteur de croissance (figure n° 12). Sur le milieu BCY éthanol, la croissance de la souche X_4 seule est très faible. Lorsque les souches X_4 et X_8 sont inoculées simultanément on observe une croissance en deux phases. La comparaison avec l'absorbance initiale de la culture préincubée de X_8 sur BCY éthanol suggère que la première phase est due à la croissance de la souche X_8 pendant 45 heures et la deuxième à celle de la souche X_4 à partir de la soixante cinquième heure. La souche X_8 fournit le facteur de croissance nécessaire à la souche X_4 . Ce facteur est présent dans le jus de rumen car la souche X_4 pousse très bien sur milieu BCR éthanol avec un temps de génération de 6 heures. L'augmentation de la concentration en jus de rumen (10, 20, 40, 100 %) ne se traduit pas par un accroissement du taux de croissance.

B - Bactéries butyriques : étude physiologique de la souche B_2

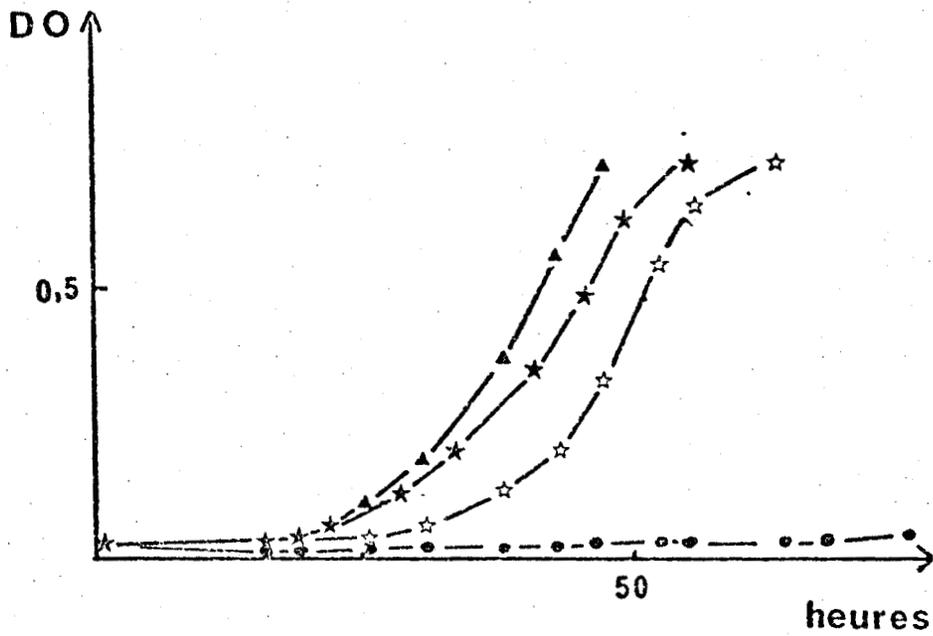
Des bactéries productrices de butyrate ont été isolées uniquement sur lactate. Toutes les souches purifiées appartiennent au genre *Eubacterium* et seule la souche B_2 a été étudiée.

1 - Caractérisation cellulaire

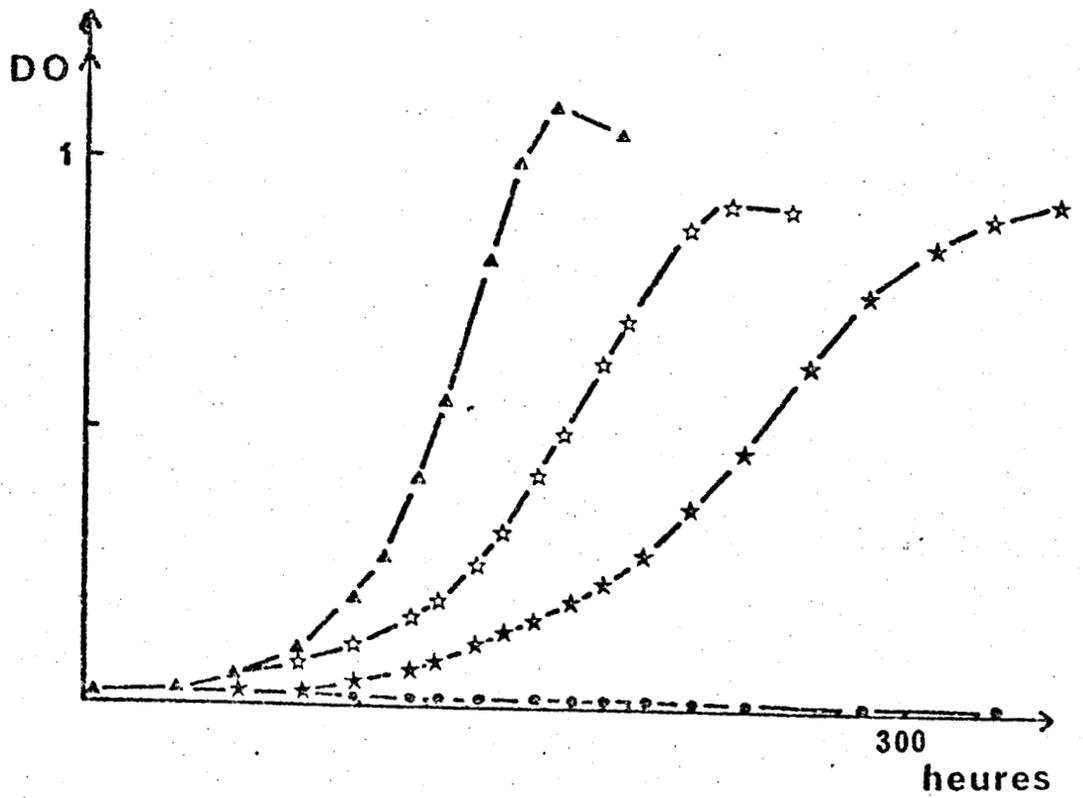
La souche B_2 a été isolée sur milieu BY lactate à partir du digesteur D. C'est un bacille gram positif, anaérobie strict, non mobile. Les cellules sont généralement isolées ou en paires et présentent quelquefois des embranchements. Leur taille moyenne est de $0,8 \times 2,7 \mu m$.

2 - Caractérisation de la croissance

La souche B_2 peut être cultivée sur le milieu BM qui est dépourvu d'extrait de levure et d'azote organique. Elle fermente le glucose, le fructose, le mannitol, le lactate, le pyruvate, le méthanol et le mélange $H_2 - CO_2$. Le pH optimum de



Influence de la pression partielle de CO_2 (● 0 bar ; ★ 0,05 bar ; ▲ 0,15 ; ☆ 1 bar) sur les cinétiques de croissance de la souche B_2 sur milieu BM lactate (25 mM).



: Influence de la pression partielle de CO_2 (● 0 bar ; ★ 0,05 bar ; ▲ 0,15 bar ; ☆ 1 bar) sur les cinétiques de croissance de la souche B_2 sur milieu BM méthanol (50 mM).

Figure n° 15

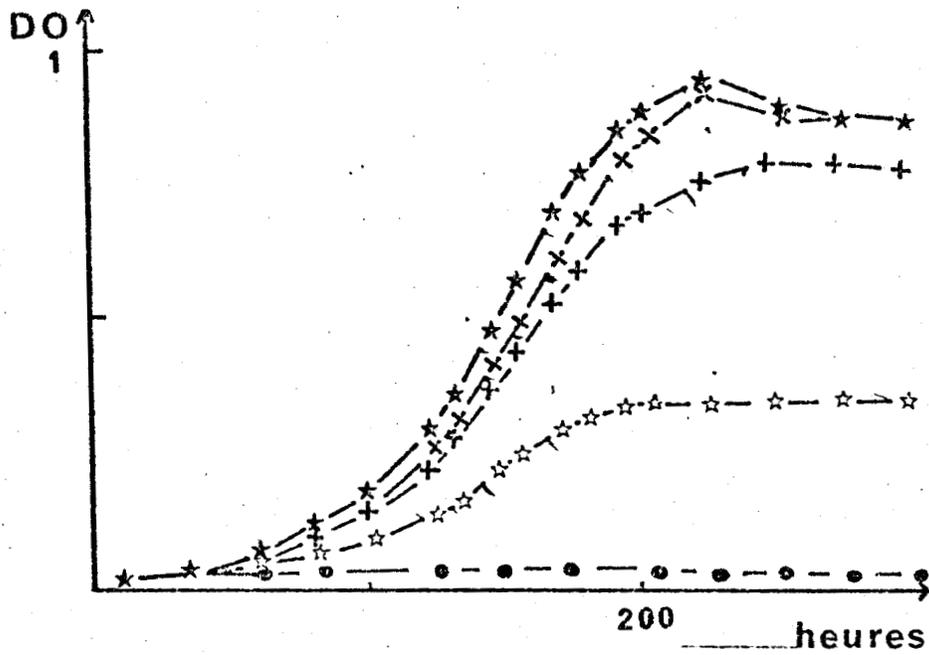


Figure n° 16 : Influence de la concentration en acétate (● 0 mM, ☆ 10 mM, + 20 mM, ★ 50 mM, × 100 mM) sur les cinétiques de croissance de la souche B₂ sur milieu BC méthanol (50 mM).

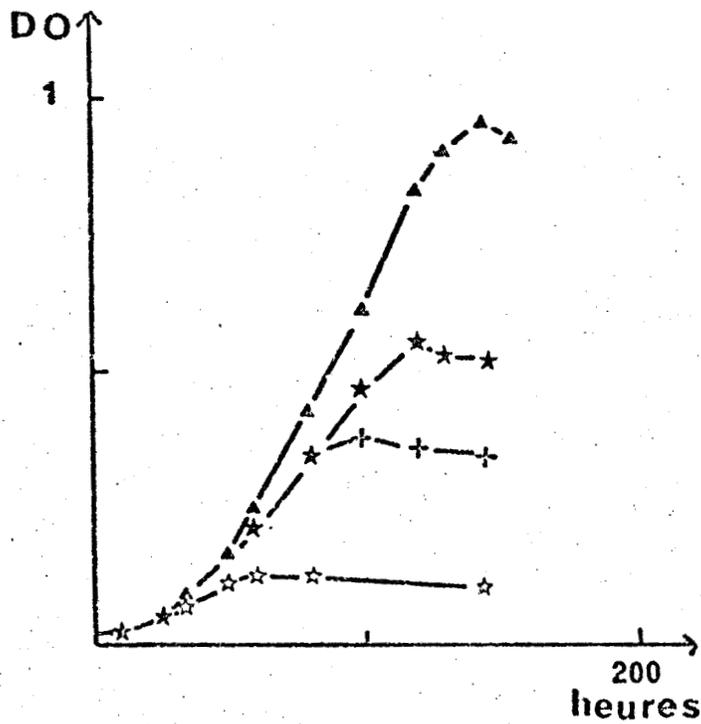


Figure n° 17 : Influence de la concentration en méthanol (☆ 0 mM, + 5 mM, ★ 10 mM, ▲ 20 mM) sur les cinétiques de croissance de la souche B₂ sur milieu BM sous atmosphère de 2 bars de H₂CO₂

BU
LILLE

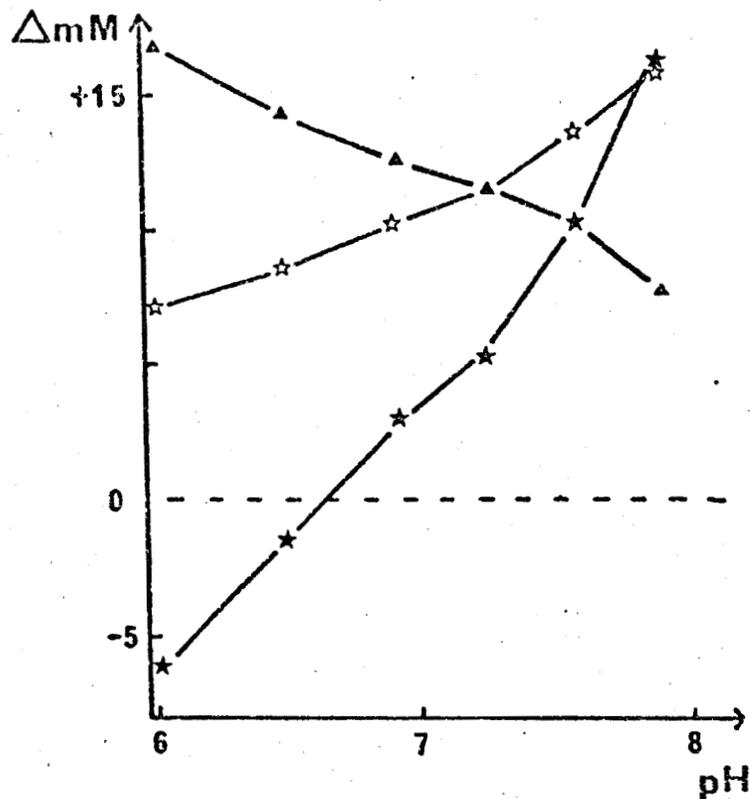


Figure n° 18 : Influence du pH sur les bilans de fermentation du méthanol (50 mM) sur milieu BM en présence d'acétate (50 mM). (★ acétate, ☆ CO₂ consommé, ▲ butyrate).

* calculé suivant l'équation: $CO_2 = \frac{2}{3} (\text{acétate} + \text{butyrate})$

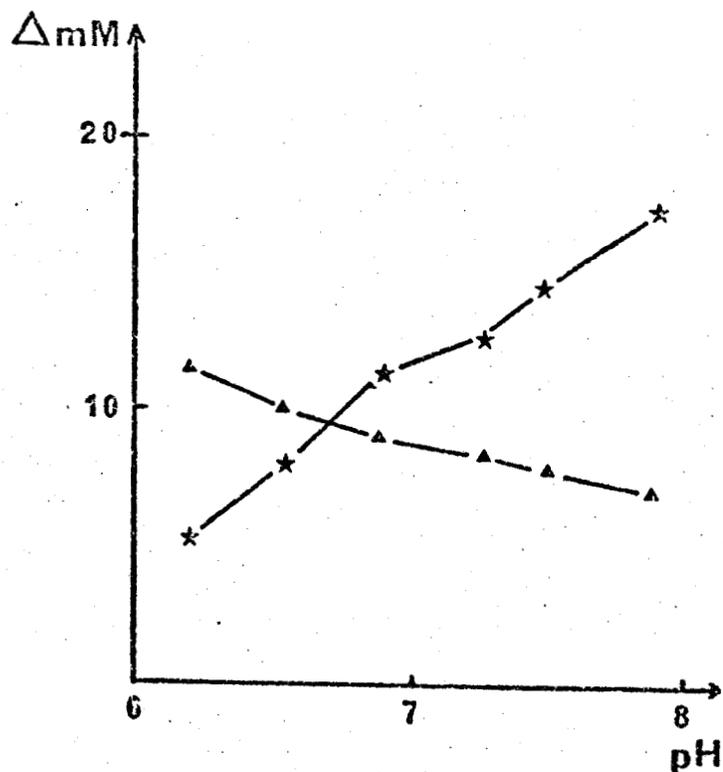


Figure n° 19 : Influence du pH sur les bilans de fermentation du lactate (25 mM) sur milieu BM en présence d'acétate (50 mM). (☆ acétate, ▲ butyrate).

croissance sur lactate et sur méthanol est compris entre 6,9 et 7,6 (figure n° 13). Le pH influe sur le temps de latence. Celui-ci augmente avec l'acide du milieu. Sur méthanol la croissance débute immédiatement après inoculation à pH 7,6 mais seulement après une période de 100 heures à pH 6 (figure n° 14). Un phénomène analogue mais moins marqué est observé sur lactate. Le gaz carbonique est indispensable à la croissance sur lactate et sur méthanol. La souche pousse cependant sur lactate en absence de CO_2 si le milieu n'est pas agité. Les taux de croissance maximum sont obtenus pour une pression partielle de CO_2 de 0,15 bar (figure n° 15). Sur milieu BM sous atmosphère de CO_2 la souche ne fermente le méthanol qu'en présence d'acétate dans le milieu. Sa concentration optimale est de 50 mM (figure n° 16). En absence d'acétate on observe une croissance sur méthanol si le milieu est supplémenté en extrait de levure ou si l'atmosphère contient de l'hydrogène. La figure n° 17 montre qu'en absence d'acétate dans le milieu et sous une atmosphère de 2 bars de mélange $\text{H}_2 - \text{CO}_2$ (80/20), la croissance de la souche B_2 est proportionnelle à la concentration en méthanol. La présence d'acétate n'est pas indispensable à la fermentation du lactate mais elle a un effet stimulateur sur le taux de croissance et diminue le temps de latence.

3 - Produits de fermentation

Les produits retrouvés en fin de fermentation sont différents selon les substrats utilisés (tableau n° 9). La souche B_2 réalise une fermentation homoacétique du pyruvate et du mélange $\text{H}_2 - \text{CO}_2$. A partir du glucose, du lactate et du méthanol elle produit du butyrate et des quantités variables d'acétate. L'hydrogène n'est jamais produit en quantité significative. En fin de culture, son pourcentage dans la phase gazeuse est toujours inférieur à 0,1 %. Le pH, la composition de l'atmosphère (pression partielle de CO_2 et d' H_2) et la concentration en acétate et en propionate influent sur la nature des produits de fermentation du lactate et du méthanol.

- Influence du pH :

L'influence du pH sur les produits de fermentation du méthanol et du lactate a été déterminée sur milieu BM en présence d'acétate et sous une atmosphère de $\text{N}_2 - \text{CO}_2$ (85/15) (figure n° 18 et 19). Les pH acides favorisent la formation d'acétate. A pH 6 et 6,5 on observe une fermentation homobutyrique du méthanol et une consommation d'acétate. Inversement à pH 7,9 l'acétate représente plus de 50 % du carbone retrouvé. Sur lactate, le rapport acétate sur butyrate est

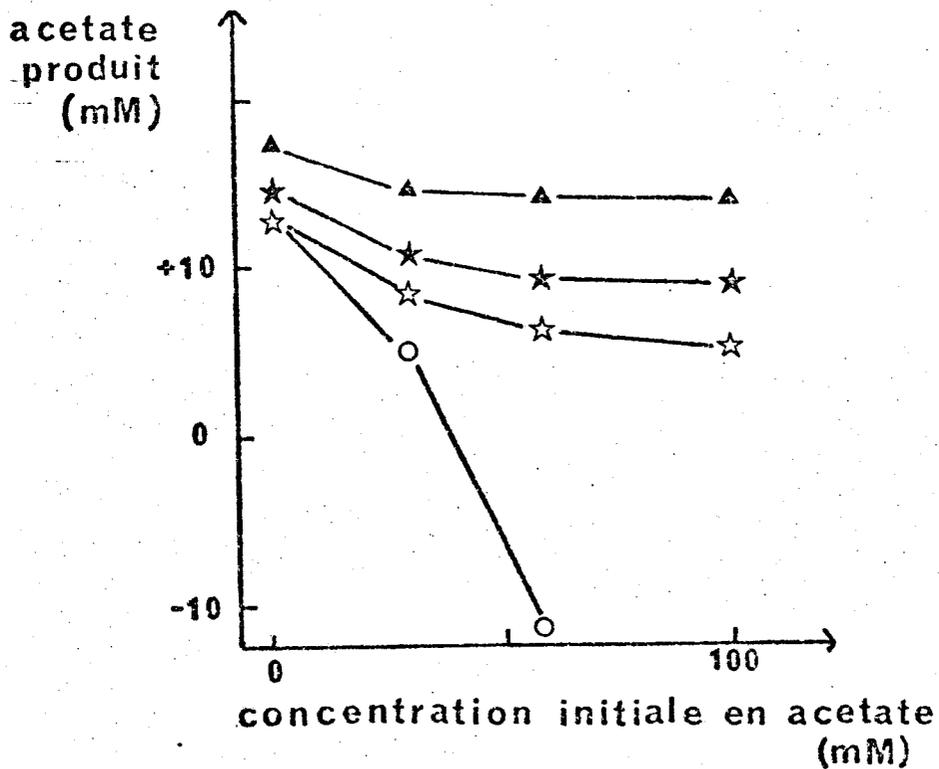
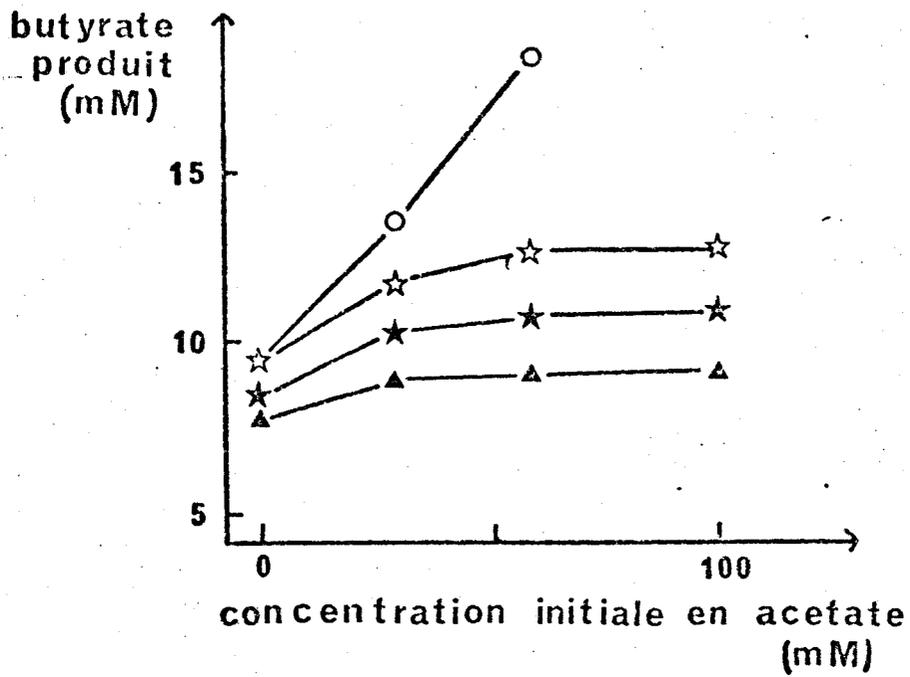


Figure n° 20 : Influence de l'acétate et du CO₂ (▲ 1 bar, ★ 0,15 bar, ☆ 0,05 bar, ○ 0 bar) sur les bilans de fermentation du lactate (25 mM).

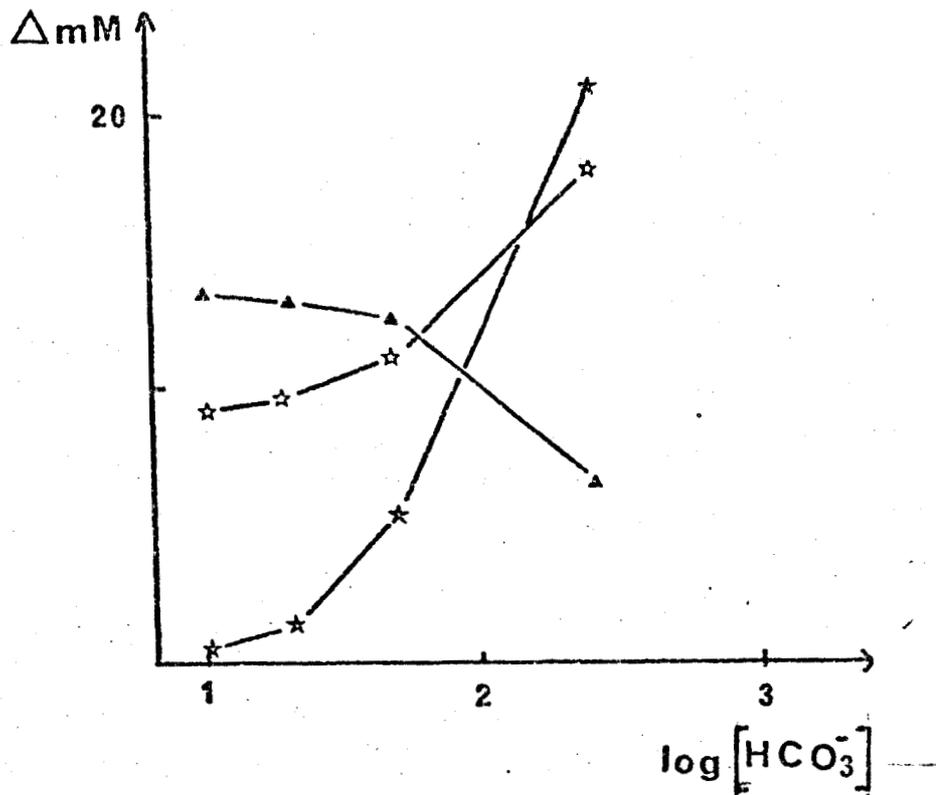


Figure n° 21 : Influence de la pression partielle de CO₂ (concentration de KHCO₃⁻) sur les bilans de fermentation du méthanol (50 mM) en présence d'acétate (50 mM). (★acétate, ☆ CO₂ consommé*, ▲ butyrate).

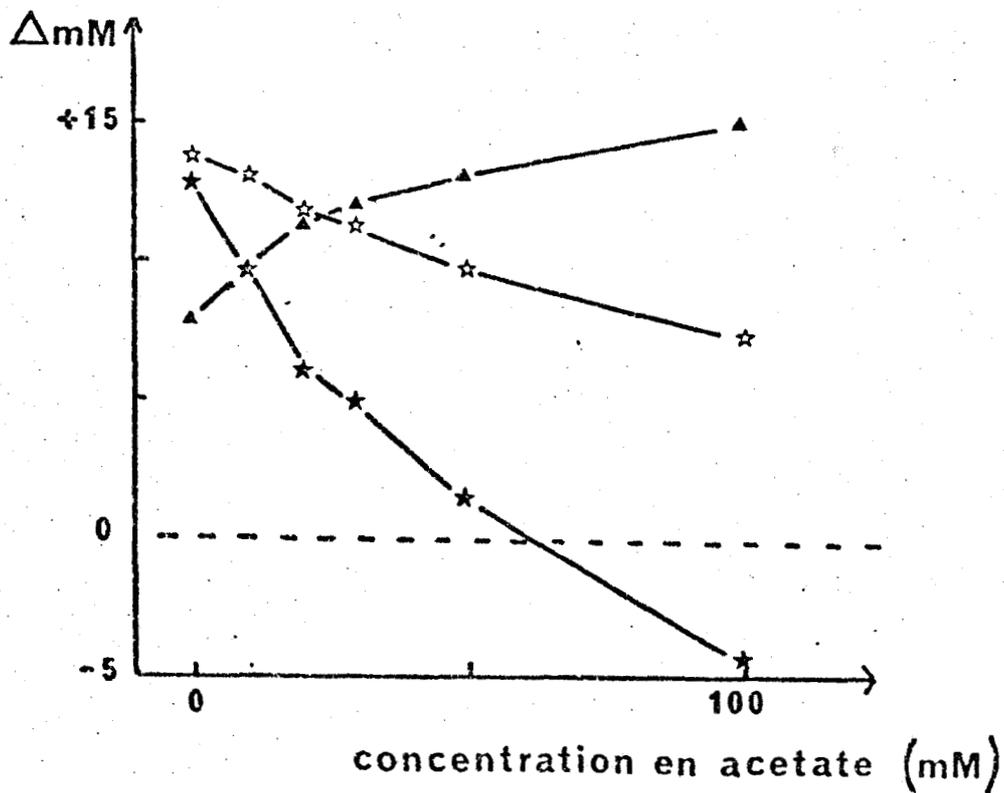


Figure n° 22 : Influence de la concentration en acétate sur les bilans de fermentation du méthanol (50 mM) sur milieu BY (KHCO₃ = 20 mM). (★acétate, ☆ CO₂ consommé*, ▲ butyrate).

* calculé suivant l'équation :

$$CO_2 = \frac{2}{3} (\text{acétate} + \text{butyrate})$$



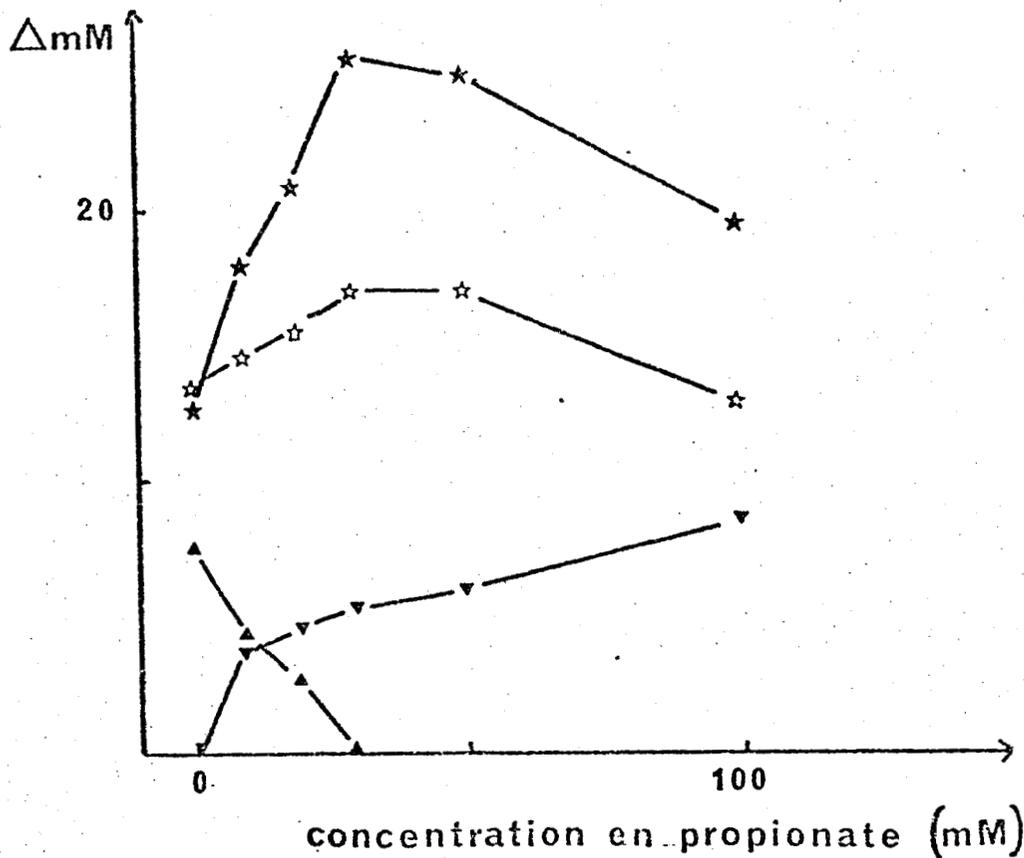


Figure n° 23 : Influence de la concentration en propionate sur les bilans de fermentation du méthanol (50 mM) sur milieu BY ($\text{KHCO}_3 = 20 \text{ mM}$) (★acétate, ▲ butyrate, ▼ valérate produit et propionate consommé, ☆ CO_2 consommé *).

* calculé suivant l'équation : $\text{CO}_2 = \frac{2}{3} (\text{acétate} + \text{butyrate})$

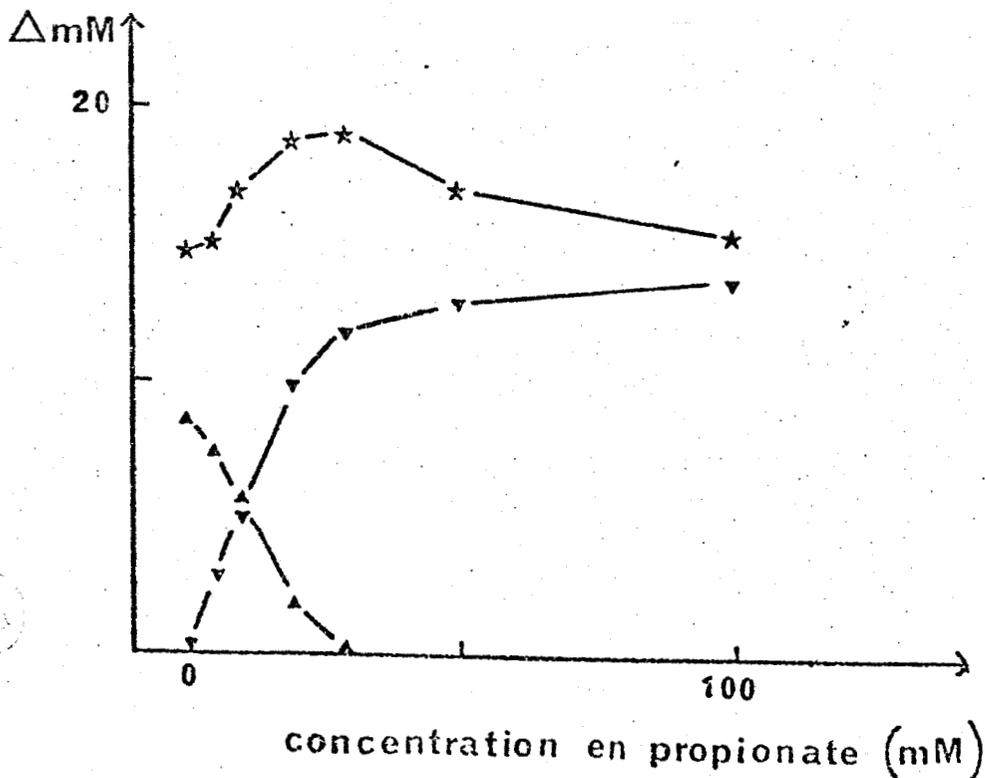


Figure n° 24 : Influence de la concentration en propionate sur les bilans de fermentation du lactate (25 mM) sur milieu BM. (★acétate, ▲ butyrate, ▼ valérate produit et propionate consommé).

multiplié par cinq entre pH 6,25 et 7,9.

- Influence de l'acétate et du CO₂

Nous avons cultivé la souche B₂ sur le milieu BM lactate à pH 7,3 en présence de quatre concentrations croissantes en acétate. Pour chacune de ces concentrations, nous avons réalisé quatre essais différents sous quatre pressions partielles de CO₂. Les dosages de produits finaux en fin de fermentation montrent que le CO₂ et l'acétate ont un effet antagoniste sur le rapport acétate sur butyrate produit (figure n° 20). Pour une pression partielle de CO₂ constante, une augmentation de la concentration en acétate a pour conséquence une production supérieure de butyrate et une diminution de la formation d'acétate. Cet effet est surtout marqué pour de faibles pressions partielles de CO₂ et s'atténue avec l'accroissement de la teneur en CO₂ dans la phase gazeuse. Pour une même concentration en acétate, on observe une baisse de la production de butyrate et une augmentation de la production d'acétate lorsque l'on accroît le taux de CO₂. Dans ce cas, l'influence du CO₂ est d'autant plus importante que la concentration en acétate est élevée. L'acétate et le CO₂ régulent de la même façon la proportion d'acétate et de butyrate produits à partir de méthanol (figure n° 21 et 22). En présence de 50 mM d'acétate sur milieu BM méthanol et à pH 7,3, on observe une formation préférentielle de butyrate avec de faibles pressions partielles de CO₂. L'augmentation du pourcentage de CO₂ se traduit par un accroissement de la production d'acétate qui devient alors le principal produit retrouvé. L'influence de l'acétate sur le métabolisme du méthanol a été déterminée sur le milieu BY méthanol à pH 7,3 en présence de KHCO₃ 20mM. En absence d'acétate, la production de butyrate est inférieure à celle d'acétate. On observe une diminution du rapport acétate sur butyrate lorsque la concentration en acétate initial est augmentée. En présence de 100 mM d'acétate, la dégradation du méthanol conduit exclusivement à la formation de butyrate et une partie de l'acétate du milieu est utilisée.

- Influence du propionate

Sur milieu BM lactate et BY méthanol, la souche B₂ produit du valérate en présence de propionate dans le milieu (figure n° 23 et 24). La formation de valérate est couplée stoechiométriquement à une consommation de propionate. Elle est d'autant plus importante que la concentration initiale en propionate est élevée.

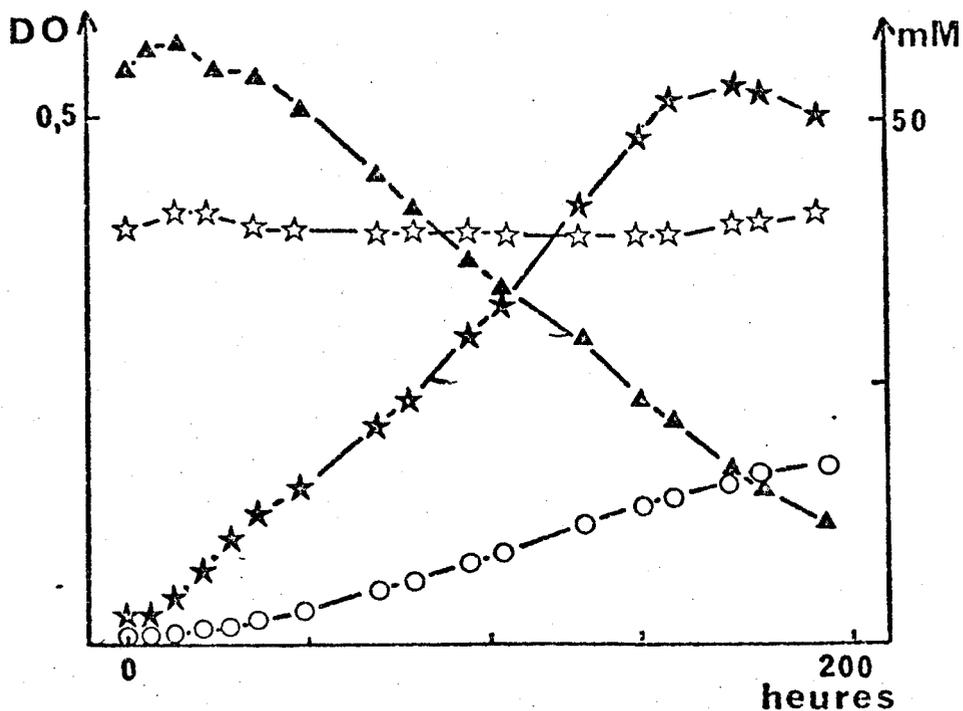


Figure n° 25 : Cinétique de dégradation du méthanol par la souche B₂ sur milieu BY (▲ méthanol, ☆ acétate, ○ butyrate, ★ densité optique).

SUBSTRATS (mM)	DO	PRODUITS DE FERMENTATION (Δ mM)	
		acétate	butyrate
Glucose (25)	1,7	23	16
Lactate (50)	1,1	28	17
Pyruvate (50)	1,2	59	-
Méthanol (50 mM) Acétate (50mM)	0,97	0,6	13,5
H ₂ - CO ₂ * Méthanol (5)	0,14	10,66	-
H ₂ - CO ₂ * Méthanol (10)	0,38	33,3	-
H ₂ - CO ₂ Méthanol (20)	0,55	38,5	-
H ₂ - CO ₂ * Méthanol (20)	0,91	49,6	-

* H₂ - CO₂ (80/20) 2 bars

Tableau n° 9 : Substrats fermentés par la souche B₂ sur milieu BM



SOUCHE	ORIGINE	TAILLE POYENNE DES CELLULES (μm)	MOBILITE
CP ₆₂	numération à partir du digesteur D	0,5 x 1,3	+++
RE ₁	enrichissement sur éthanol ME ₂	0,7 x 2,1	++
RE ₂₆	enrichissement sur éthanol ME ₂	1 x 2,8	++
FP	enrichissement sur propionate	0,7 x 3,1	+

Tableau n° 10 : Principales caractéristiques morphologiques des souches sulfato-réductrices isolées

SUBSTRATS	CROISSANCE			
	FP	CP ₆₂	RE ₁	RE ₂₆
H ₂ CO ₂ (85/15) 2 bars	0,26 (4)	0,29 (5)	0,38 (3)	0,45 (3)
formate (50 mM)	0	0,210 (2)	0,54 (2)	0,310 (2)
lactate (25 mM)	0,66 (6)	0,652 (2)	0,76 (2)	0,725 (3)
éthanol (25 mM)	0,35 (7)	0,29 (4)	0,221 (6)	0,54 (2)
pyruvate (25 mM)	0,68 (10)	0,69 (2)	0,88 (2)	0,78 (2)
fumarate (25 mM)	0	0	0,745 (2)	0,755 (4)
propionate (25 mM)	0,29 (10)	-	-	-
témoin	0	0	0,070 (2)	0,170 (2)

Les chiffres entourés indiquent le nombre de jours après lequel on observe une croissance maximum.

Tableau n° 11 : Substrats fermentés par les quatre souches sulfato-réductrices sur milieu BY5.



SUBSTRATS (mm)	SOUCHES	MILIEUX										
		BY		BYS		BY en coculture avec M AZ		BY en coculture avec M AZ		BY en coculture avec M AZ		
		D0	acétate	H ₂ (1)	D0	acétate	D0	acétate	D0	acétate	D0	acétate
	CP ₆₂		nd	nd	0,65	24,3		0,41	23,8			10
Lactate (25)	RE ₁	0,07	nd	nd	0,76	26,2		0,59	27,5			11
	RE ₂₆	0,17	nd	nd	0,72	29,3		0,51	28,1			11
	CP ₆₂	0	nd	nd	0,29	23,5		0,30	24,2			11
Ethanol (25)	RE ₁	0,07	nd	nd	0,22	24,6		0,35	25,7			11
	RE ₂₆	0,16	nd	nd	0,54	27,2		0,45	28,5			11
	CP ₆₂	0,41	15,8	3	0,69	23,5		0,45	21,0			2
Pyruvate (25)	RE ₁	0,54	17,0	6	0,88	25,3		0,61	24,0			4
	RE ₂₆	0,60	21,1	2	0,78	28,0		0,71	27,0			5
	CP ₆₂	0	nd	0	0	nd		0	nd			0
Fumarate (25)	RE ₁	0,65	8,6	0	0,74	12,5		0,65	8,7			0
	RE ₂₆	0,59	9,01	0	0,75	17,6		0,66	10,4			0

(1) mmolles d'hydrogène formées par litre de milieu

(2) mmolles de méthane formées par litre de milieu

Tableau n° 12 : Substrats fermentés par les souches CP₆₂, RE₁, et RE₂₆ sur milieu BY, BYS et BY en association avec M AZ

L'augmentation de la concentration en propionate jusqu'à 30 mM se traduit par une diminution de la formation de butyrate et un accroissement de celle d'acétate. Pour des concentrations supérieures à 30 mM, on n'observe plus de production de butyrate et l'augmentation de la formation de valérate est alors liée à une baisse de la production d'acétate.

- Influence de l'hydrogène sur le métabolisme du méthanol

Sur milieu BM méthanol à pH 7,3, sous une atmosphère de 2 bars de mélange $H_2 - CO_2$ (80/20) l'acétate est le seul produit de fermentation formé. La concentration en acétate trouvée en fin de fermentation est supérieure à la concentration initiale en méthanol (tableau n° 9). Pour les trois concentrations en méthanol testées on observe une différence de 28 mM entre la concentration en acétate finale et la concentration en méthanol initiale. Seulement 10,66 mM d'acétate sont produites à partir du mélange $H_2 - CO_2$ dans le tube témoin sans méthanol. La présence d'hydrogène entraîne une modification du métabolisme du méthanol vers la production exclusive d'acétate et la présence de méthanol permet une utilisation plus complète de l'hydrogène.

4 - Cinétique de dégradation du méthanol en fermenteur et dosage de la vitamine B₁₂

La souche B₂ a été cultivée en fermenteur de deux litres sur milieu BY méthanol sous atmosphère de $N_2 - CO_2$ (85/15) et en présence d'acétate (50 mM). Les relations entre la croissance, la consommation de méthanol et la production de butyrate et d'acétate sont indiquées sur la figure n° 25. Le rendement de croissance est de 3,7 mg de cellule par mmole de méthanol consommé. La concentration de cyanocobalamine dans le milieu était de 0,5 µg/ml en fin de culture. Cette valeur correspond à une production de 3,12 µg par mg de cellule et 0,36 mg par gramme de méthanol.

C - Bactéries sulfato-réductrices

1 - Caractérisations cellulaire et morphologique

Les quatre souches sulfato-réductrices CP₆₂, RE₁, RE₂₆ et FP sont des bacilles incurvés, gram négatif, anaérobies stricts, mobiles et non sporulés. La présence de spores n'a jamais été détectée ni par l'observation microscopique ni par la résistance à la chaleur (choc thermique de 10 mn à 80° C).

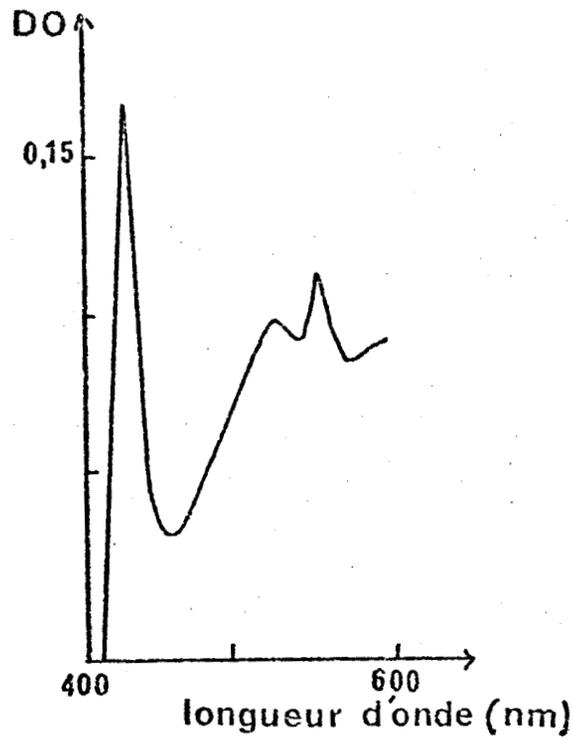


Figure n° 29 : Spectre de différence (réduit moins oxydé) d'extraits acellulaires de la souche FP

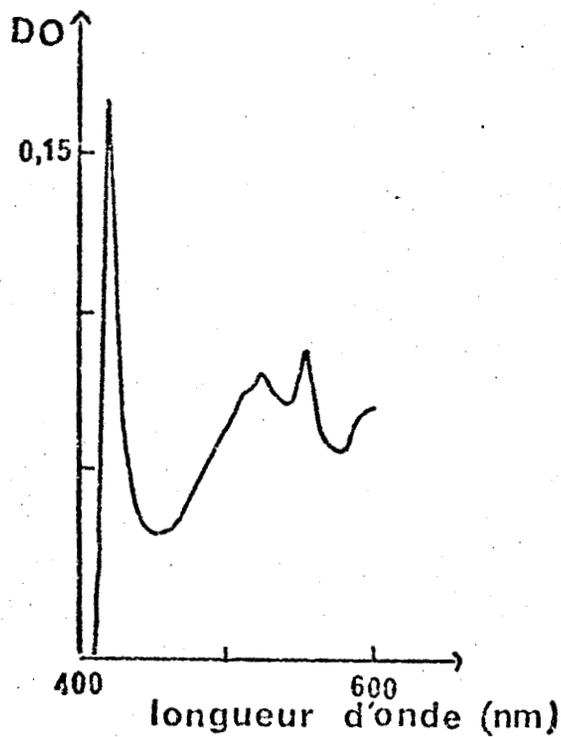


Figure n° 30 : Spectre de différence (réduit moins oxydé) d'extraits acellulaires d'une souche de *Desulfovibrio* (Madison Strain) contenant du cytochrome C₃.

BUS
LILLE

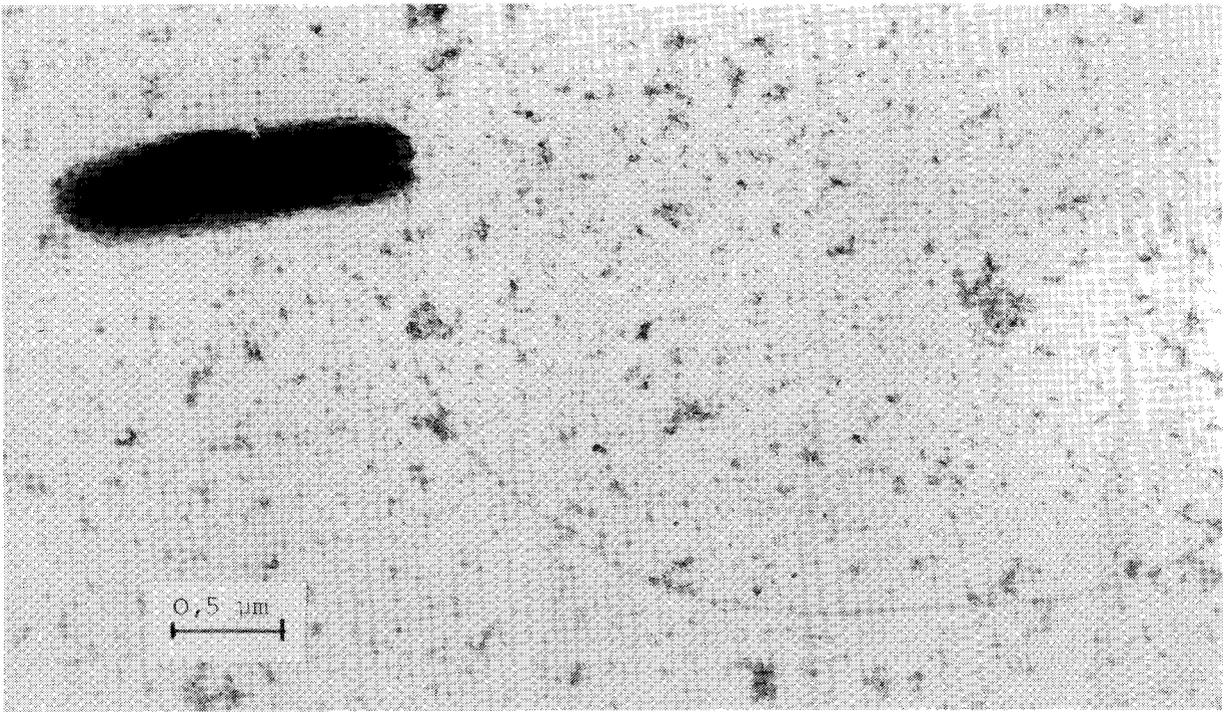


Figure N° 27 : Morphologie de la souche FP en coloration négative
(grossissement x 10 000)

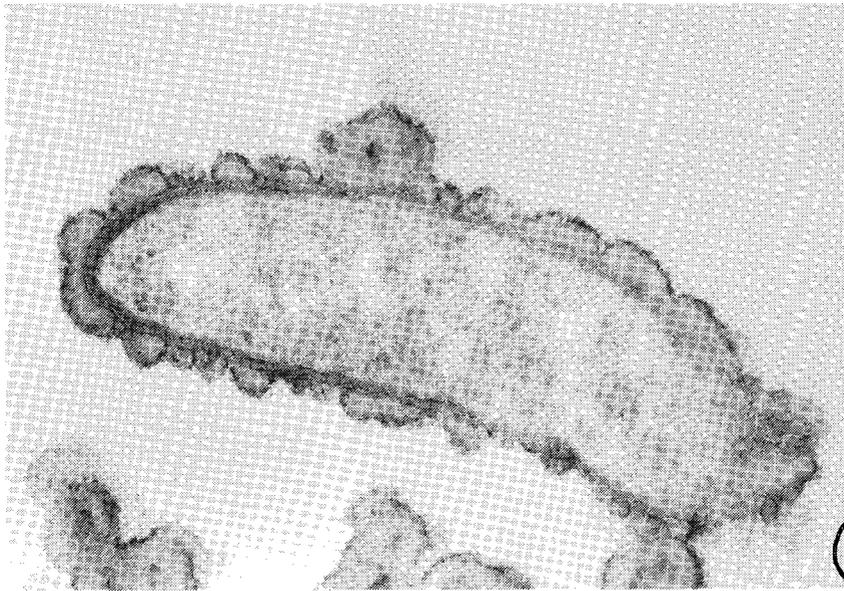


Figure N° 28 : Coupe fine de la souche FP observée en microscopie électronique

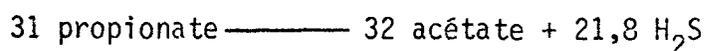
Le test de la desulfovirdine de Postgate est négatif pour les quatre souches. Ce test a été réalisé parallèlement sur une souche de *Desulfovibrio* de collection (MADISON STRAIN) et s'est révélé positif. Ces quatre souches sont cependant différentes morphologiquement (tableau n° 10). La souche FP qui utilise le propionate est un bacille faiblement incurvé et est beaucoup moins mobile que les autres souches. Les cellules sont généralement isolées et leur taille moyenne est de $0,7 \times 3,1 \mu\text{m}$ (figure n° 26). On observe en coloration négative un seul flagelle par cellule (figure n° 27). L'examen de coupes en microscopie électronique confirme la structure de type gram négatif de la paroi (figure n° 28). La présence de cytochrome C a pu être détectée chez la souche FP. Le spectre de différence d'absorbance (réduit - oxydé) d'extraits acellulaires est en effet caractérisé par trois pics à 420, 523 et 554 nm (figure n° 29). La figure n° 30 représente le même spectre de différence réalisé sur une souche témoin de *Desulfovibrio* (MADISON STRAIN) possédant le cytochrome C₃ (BADZIONG et al., 1978).

2 - Caractérisation de la croissance

Ces quatre souches peuvent être cultivées sur le milieu BM qui est dépourvu d'azote organique. Mais la présence d'extrait de levure stimule cependant leur croissance.

- Croissance en présence de sulfate (milieu BYS)

Sur milieu BYS (tableau n° 11) aucune souche ne fermente l'acétate ni le butyrate. Elles utilisent toutes le lactate, l'éthanol, le pyruvate et le mélange H₂ - CO₂. La souche FP pousse sur propionate et les souches RE₁ et RE₂₆ sur fumarate. Ces deux dernières ainsi que la souche CP₆₂ peuvent être également cultivées en présence de formate comme seule source source d'énergie. L'acétate et le sulfure d'hydrogène sont les seuls produits de fermentation des composés à plusieurs carbones (tableau n° 12 et 13). L'utilisation du mélange H₂ - CO₂ et du formate se traduit uniquement par la formation d'H₂S. Une cinétique de dégradation du propionate par la souche FP sur milieu BS propionate a été réalisée en fermenteur (figure n° 31). La croissance n'est exponentielle qu'en début de culture. Le temps de génération est alors d'environ 12 heures. Le taux de croissance décroît ensuite rapidement sans doute à cause de l'accumulation de sulfure. On observe en fin de croissance la stoechiométrie de fermentation suivante (en m.mole/l).



SUBSTRATS (mM)	MILIEUX					
	BYS			BY		
	DO	acétate	DO	acétate	propionate	
Lactate (25)	0,66	24	0,31	8,5	14	
Ethanol (25)	0,38	25,2	0,03	nd	nd	
Pyruvate	0,68	23,0	0,64	16,0	7	
H ₂	0,27	-	-	non fait	-	

Tableau n° 13 : Substrats fermentés par la souche FP sur milieu BY et BYS

SUBSTRATS	CROISSANCE (DO)						
	FE	M AZ	FP + M AZ	FP + M. barkeri	FP + FE	FP + FE + M AZ	
Ethanol	0	0	0	0	0,45	0,45	
Propionate	0	0	0	0	0	0	

Tableau n° 14 : Croissance de la souche FP sur éthanol et sur propionate en association avec différentes souches de méthanogène sur milieu BY



Le sulfate et le CO_2 n'ont pas été dosés. Le rendement de croissance est de 3 mg de cellule par m.mole de sulfure produit.

- Croissance en absence de sulfate

Sur milieu BY en culture pure, les quatre souches fermentent le pyruvate (tableau n° 12). La souche FP utilise également le lactate et les souches RE_1 et RE_{26} le fumarate. Le lactate et le pyruvate sont convertis, par la souche FP, en un mélange d'acétate et de propionate (tableau n° 13). Par contre, aucun composé réduit (H_2 , formate, éthanol, acides gras volatils, succinate) n'a été détecté en quantité significative comme produit de fermentation du pyruvate et du fumarate par les trois autres souches. L'acétate est le seul composé retrouvé (tableau n° 12) mais sa concentration finale est nettement inférieure à la concentration initiale en substrats. Ces faits suggèrent l'existence d'un composé réduit non détectable par les techniques analytiques utilisées.

Sur milieu BY et en association avec *Methanobrevibacter* AZ les souches CP_{62} , RE_1 et RE_{26} utilisent le lactate et l'éthanol (tableau n°12). Ces composés sont stoechiométriquement oxydés en acétate et la formation de méthane permet d'utiliser les électrons provenant de cette oxydation. La présence de *Methanobrevibacter* AZ modifie le métabolisme du pyruvate. Elle se traduit par une augmentation de la production d'acétate et une formation de méthane.

La souche FP possède une hydrogénase et nous avons essayé de la cultiver sur éthanol et sur propionate en absence de sulfate et en association avec différentes souches de méthanogènes (tableau n° 14). On observe, après un temps de latence de trois mois, une croissance sur éthanol de deux associations : FE + FP et FE + FP + *Methanobrevibacter* AZ. Le CO_2 et le méthane sont les seuls produits retrouvés en fin de fermentation. Comme la culture FE n'utilise pas l'éthanol, la souche FP est donc bien responsable de la conversion de l'éthanol en acétate et en hydrogène. *Methanotherix soehngeni* n'utilise pas l'hydrogène de manière significative et on observe au microscope la présence de petits granules de formes irrégulières dans les deux cocultures. Cette bactérie est fluorescente en UV et est sans doute la bactérie méthanogène utilisatrice d'hydrogène.

3 - Coculture en continu des souches CP_{62} et *Methanobrevibacter* AZ

Les souches CP_{62} et *Methanobrevibacter* AZ ont été cocultivées en continu sur milieu BM lactate pendant six semaines. Le volume du fermenteur est de 350 ml.

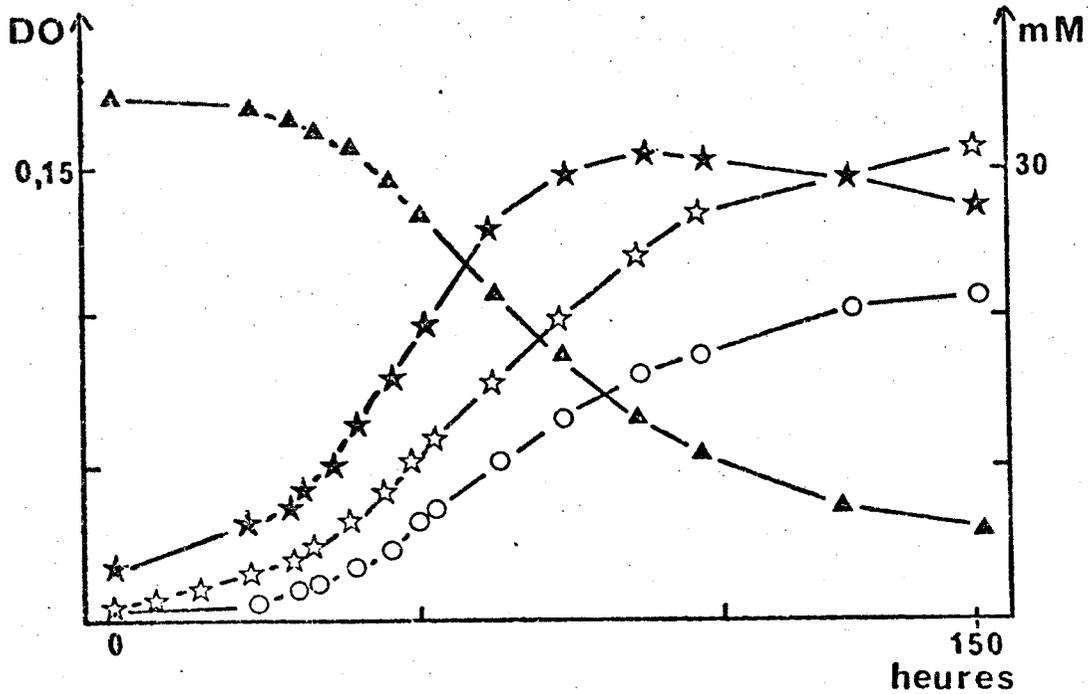


Figure n° 31 : Cinétique de dégradation du propionate par la souche FP sur milieu BS (▲ propionate, ☆ acétate, ○ H₂S, ★ densité optique).

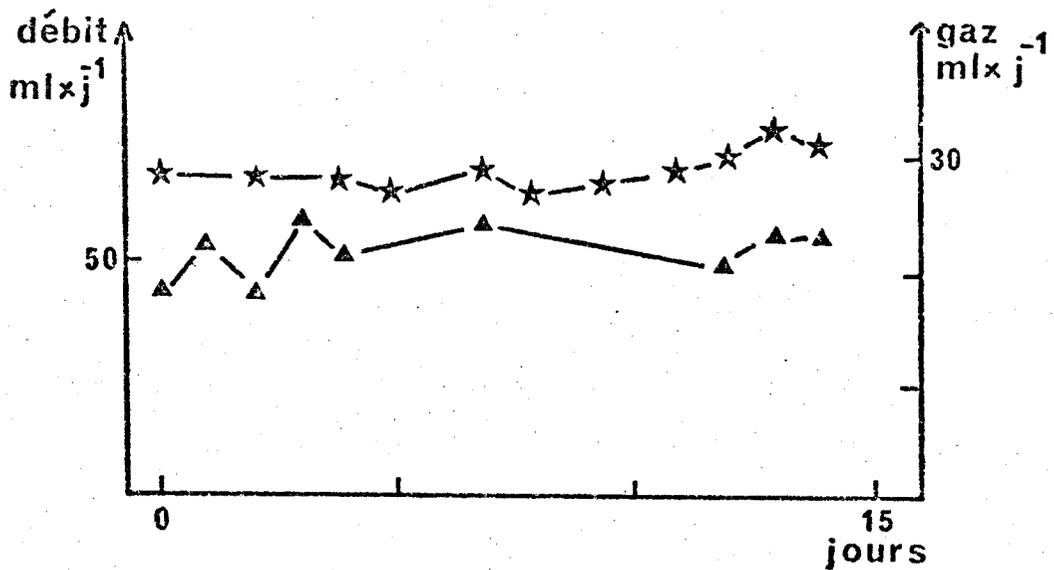


Figure n° 32 : Production de gaz et débit d'alimentation de la coculture en continue sur lactate de la souche CP₆₂ et de *Methanobrevibacter* AZ (★ débit d'alimentation, ▲ volume de gaz produit).



Dans le milieu d'alimentation le pH est équilibré à 7,3 sous une atmosphère de $N_2 - CO_2$ (85/15) et la concentration en lactate est de 25 mM. Le fermenteur rempli de milieu neuf a été inoculé à 5 % avec une préculture de l'association CP₆₂ + *Methanobrevibacter* AZ. L'alimentation n'a débuté qu'après l'arrêt de la production de gaz et du développement bactérien. En culture discontinue, le temps de génération de l'association est d'environ 24 heures. Le débit a été fixé à 70 ml/jour. Pendant toute la durée de l'expérience le taux de dilution et la production de gaz sont restés à peu près constants (figure n° 32). Le taux de dilution moyen est d'environ $0,2 \text{ jour}^{-1}$ ce qui correspond à un temps de séjour hydrolique de cinq jours. La production journalière moyenne de gaz est de 22 ml. Le gaz produit est composé de CO_2 (16 %) et de CH_4 (33 %). Le pH dans le fermenteur est de 6,9 et le lactate est entièrement consommé. L'acétate et le méthane sont les seuls produits retrouvés. Le bilan journalier moyen (en m.moles) de conversion du lactate est :



Le CO_2 n'a pas été dosé dans le milieu.

A aucun moment, nous avons décelé une baisse de l'activité bactérienne ni observé la présence de contaminants.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

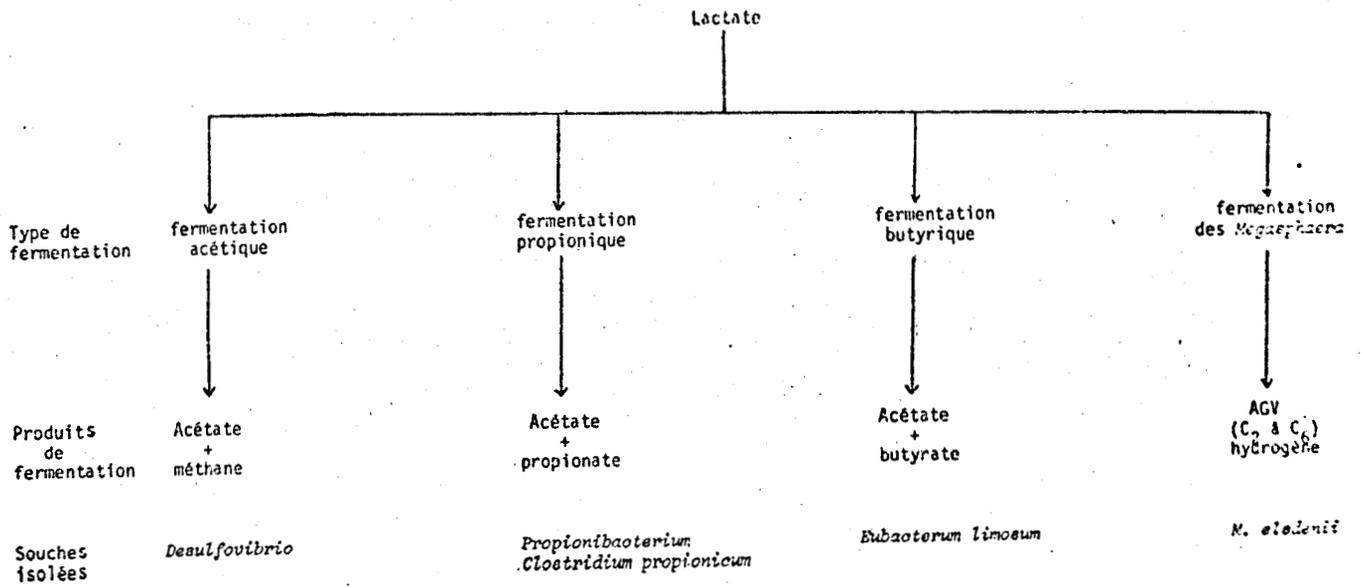


Figure n° 33 : Voies de fermentation du lactate dans les digesteurs anaérobies

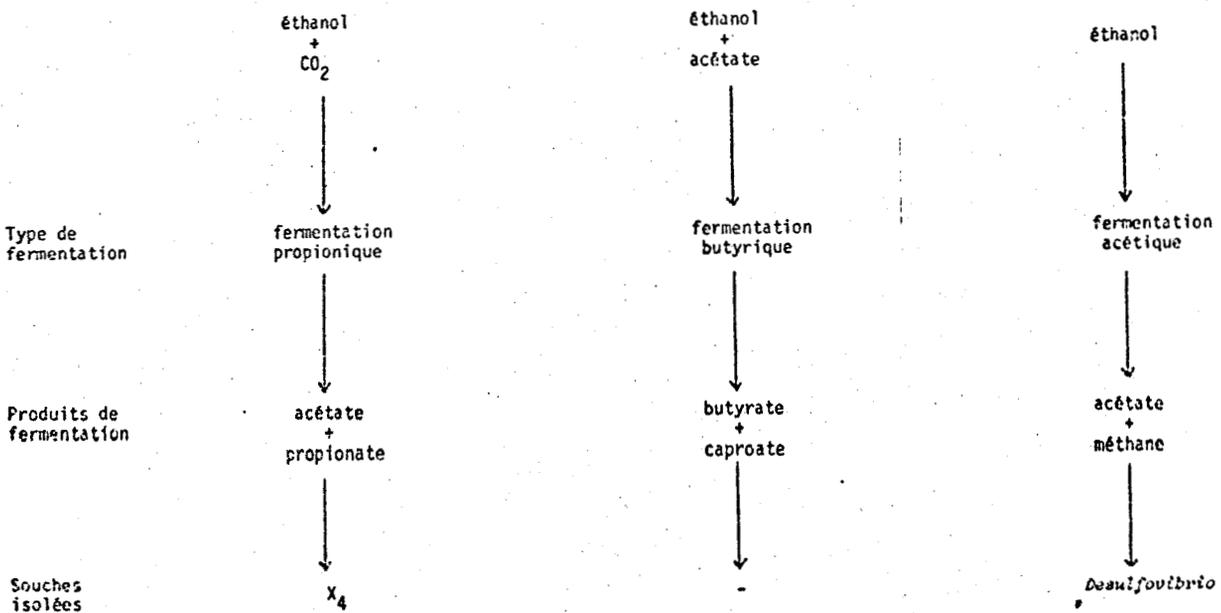


Figure n° 34 : Voies de fermentation de l'éthanol dans les digesteurs anaérobies



I - ROLE DU LACTATE ET DE L'ETHANOL DANS LA FERMENTATION METHANIQUE

Le lactate et l'éthanol sont produits à partir des sucres par de nombreuses espèces bactériennes. Il a été montré qu'ils étaient des intermédiaires importants de la fermentation méthanique des glucides (MORFAUX et al., 1981). L'importance du lactate est confirmée par les fortes concentrations de bactéries qui le fermentent dans les digesteurs. Elles représentent au moins 10 % de la population totale. Leur rôle dans les fermenteurs est limité à la conversion du lactate en acides gras volatils. En effet, à part la souche L₁ aucune des bactéries isolées sur lactate n'utilise le saccharose et certaines ne fermentent même aucun sucre (souches B₁ et CP₆₂). Le lactate est un substrat relativement énergétique et sa fermentation s'accompagne d'une production de biomasse importante. Nous avons donc pu réaliser directement des isolements par dilutions sérielles à partir de digesteurs et les souches isolées sont représentatives de la flore dégradant le lactate. Par contre, les rendements de croissance des bactéries cultivées sur éthanol et sur propionate sont très faibles et nous avons dû passer par l'intermédiaire d'enrichissements avant de procéder à des isolements. La signification réelle de ces souches est donc discutable.

A - Voie de fermentation du lactate

L'isolement et la caractérisation des bactéries utilisatrices de lactate a permis de mettre en évidence quatre voies de dégradation du lactate (figure n° 33). Nous indiquons sur le tableau n° 15 les stoechiométries et les variations d'énergie libre ($\Delta G'_0$) des fermentations acétique, propionique et butyrique. La conversion du lactate en acétate, méthane et CO₂ est la réaction la plus exergonique mais elle fait intervenir une association syntrophique de deux espèces bactériennes. Les $\Delta G'_0$ des fermentations propionique et butyrique sont sensiblement égaux.

La fermentation du lactate en acétate et propionate est réalisée par différentes espèces bactériennes appartenant aux genres *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Megasphaera* et *Treponema*. Le résultat des numérations et des isolements indique que les espèces du genre *Propionibacterium* sont dans les digesteurs les bactéries propioniques utilisatrices de lactate les plus répandues. Elles possèdent en effet un certain nombre d'avantages nutritionnels et métaboliques sur les autres espèces de bactéries propioniques. Elles utilisent la voie du fumarate pour la synthèse du propionate. Elles possèdent ainsi des rendements de croissance

TYPE DE FERMENTATION	EQUATIONS THEORIQUES	G'0 Kcal/mole de lactate
Propionique	$3 \text{ CH}_3 \text{ CHOH COO}^- + 3 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow 1 \text{ CH}_3 \text{ COO}^- + 2 \text{ CH}_3 \text{ CH}_2 \text{ COO}^- + 1 \text{ H CO}_3^- + \text{H}^+$	- 13,29
Acétique couplée à une production d'hydrogène	$2 \text{ CH}_3 \text{ CHOH COO}^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{ CH}_3 \text{ COO}^- + 1 \text{ H CO}_3^- + 1 \text{ CH}_4 + \text{H}^+$	- 17,31
* Butyrique	$1 \text{ CH}_3 \text{ CHOH COO}^- \longrightarrow 0,34 \text{ CH}_3 \text{ (CH}_2)_2 \text{ COO}^- + 0,65 \text{ CH}_3 \text{ COO}^- + 0,34 \text{ H CO}_3^- + 0,33 \text{ H}^+$	- 13,27

* N₂ CO₂ (85/15)

Tableau n° 15 : Stoechiométrie et variation d'énergie libre des fermentations acétiques, propioniques et butyriques du lactate.

supérieurs à ceux de *Clostridium propionicum* et de *Megasphaera elsdenii* qui empruntent la voie de l'acrylate. Contrairement à ces dernières, les souches de *propionibacterium* isolées peuvent utiliser l'ion NH_4 comme seule source d'azote et une grande variété de substrats (sucres, glycérol).

Parmi toutes les souches utilisatrices de lactate isolées, la souche L₅ (*Megasphaera elsdenii*) a le taux de croissance le plus élevé. Son temps de génération est inférieur à quatre heures. Dans des conditions physiologiques favorables à sa croissance, elle est sans doute la bactérie utilisatrice de lactate la plus performante. Il a été démontré que *Megasphaera elsdenii* était la principale bactérie utilisatrice de lactate dans le rumen et qu'elle était responsable d'environ 75 % de sa dégradation (COUNOTTE et al., 1981). Cependant, le rôle de cette bactérie dans les digesteurs anaérobies semble moins important que dans le rumen. Elle n'a en effet été isolée que dans un seul fermenteur.

Toutes les bactéries butyriques utilisatrices de lactate que nous avons isolées appartiennent au genre *Eubacterium*. Il peut paraître surprenant que nous n'ayons pas trouvé de *Clostridium* butyriques. En effet, ces bactéries poussent très bien sur lactate et sont très répandues dans la nature. Elles sont bien connues dans l'industrie laitière car elles contaminent souvent les fromages qui deviennent impropres à la consommation. Les conditions de culture dans les fermenteurs de méthanisation que nous avons étudiés ne sont sans doute pas favorables au développement des *Clostridium* butyriques. La présence d'acétate est en effet indispensable à la fermentation du lactate par les *Clostridium* (BHAT et BARKER 1947). La souche B₂ pousse très bien en absence d'acétate et ce type de bactéries est donc favorisé dans les digesteurs où l'activité des méthanogènes maintient une faible concentration en acétate.

Les souches sulfato-réductrices isolées sur lactate appartiennent au genre *Desulfovibrio*. Le rôle de la souche CP₆₂ comme bactérie acétogène productrice d'hydrogène dans les milieux pauvres en sulfate a été démontré aussi bien en culture continue que discontinue. Les souches CP₆₂ et *Methanobrevibacter* AZ forment dans les deux cas une association stable dégradant le lactate en acétate, CO_2 et méthane.

B - Voie de fermentation de l'éthanol

Les enrichissements ont permis de mettre en évidence trois types de fermentations de l'éthanol (figure n° 34) dans les digesteurs anaérobies.



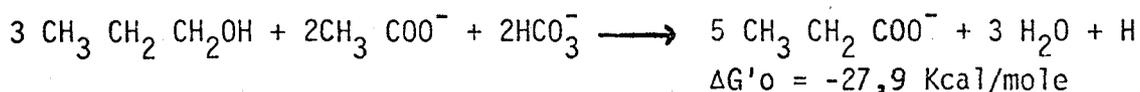
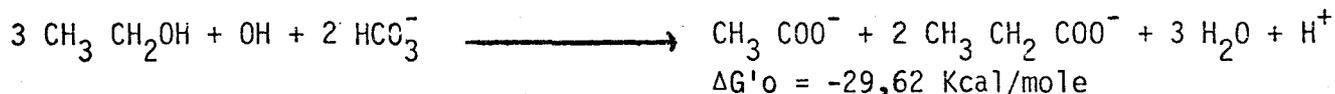
TYPE DE FERMENTATION	EQUATIONS THEORIQUES	ΔG° Kcal/mole éthanol
Propionique	$3 \text{ CH}_3 \text{ CH}_2\text{OH} + 2 \text{ H CO}_3^- \longrightarrow \text{CH}_3 \text{ COO}^- + 2 \text{ CH}_3 \text{ CH}_2 \text{ COO}^- + 3 \text{ H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-9,87
Acétique couplée avec une production d'hydrogène	$2 \text{ CH}_3 \text{ CH}_2\text{OH} + \text{H CO}_3^- \longrightarrow 2 \text{ CH}_3 \text{ COO}^- + \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-13,89
Butyrique	$6 \text{ CH}_3 \text{ CH}_2\text{OH} + 4 \text{ CH}_3 \text{ COO}^- \longrightarrow 2 \text{ H}_2 + 5 \text{ CH}_3 \text{ CH}_2\text{CH}_2 \text{ COO}^- + \text{H}^+ + 4 \text{ H}_2\text{O}$	-7,3

Tableau n° 16 : Stoechiométries et variations d'énergie libre des fermentations acétiques, propioniques et butyriques de l'éthanol

Les stoechiométries et les variations d'énergie libre de ces fermentations sont indiquées sur le tableau n° 16. Le volume important de l'inoculum dans l'enrichissement ME_2 permet d'obtenir une concentration élevée en méthanogènes. Ces bactéries maintiennent une faible pression partielle d'hydrogène qui favorise le développement des bactéries acétogènes productrices d'hydrogène. Les conditions de culture de l'enrichissement ME_2 se rapprochent de celles existant dans les digesteurs où l'acétogénèse représenterait donc la voie préférentielle de dégradation de l'éthanol. Les fermentations propionique et butyrique n'auraient une importance significative qu'en cas d'absence d'activité méthanogène. La fermentation butyrique de l'éthanol (*Clostridium kluyveri*) est couplée à une consommation d'acétate, les faibles concentrations d'acétate présentes dans les digesteurs ne sont pas favorables à la croissance de cette bactérie.

II - FERMENTATION PROPIONIQUE DE L'ETHANOL

La description de la souche X_4 a permis de démontrer l'existence d'une fermentation propionique de l'éthanol et du propanol. Les variations d'énergie libre de ces fermentations sont suffisantes pour permettre une croissance bactériennes :



L'éthanol et le propionate servent de donneurs d'électrons en étant oxydés respectivement en acétate ($\Delta G'_{\text{o}} = +2,3 \text{ Kcal/mole}$) et en propionate ($\Delta G'_{\text{o}} = +2,87 \text{ Kcal/mole}$). Les électrons produits sont utilisés pour la carboxylation et la réduction de l'acétate en propionate. L'existence de cette voie est confirmée par la consommation de CO_2 et d'acétate durant la fermentation du propanol. Le $\Delta G'_{\text{o}}$ de cette réaction ($-18,26 \text{ Kcal/mole}$) est suffisant pour permettre la synthèse d'une mole d'ATP. Chez les bactéries propioniques la synthèse d'ATP par ETP a été démontrée dans la voie du fumarate et suggérée dans celle de l'acrylate. L'oxydation de l'éthanol en acétate est thermodynamiquement défavorable. Elle permet cependant la synthèse d'ATP chez *Clostridium kluyveri* car elle couplée à la formation exergonique de butyrate. La production d'ATP chez la souche X_4 pourrait être réalisée par des mécanismes similaires soit par ETP lors de la formation du propionate soit par SLP lors de la formation d'acétate.

La dépendance nutritionnelle de la souche X_4 vis-à-vis de la souche X_8 a été démontrée par les enrichissements et les premières tentatives d'isolement. Elle a été confirmée également par les cinétiques de croissance. Si les isollements avaient été réalisés directement sur un milieu supplémenté en jus de rumen, nous n'aurions pas pu mettre en évidence cette interaction nutritionnelle. De nombreuses bactéries isolées de différents biotopes anaérobies (rumen, digesteurs anaérobies) nécessitent des facteurs de croissance connus (MIURA et al., 1980) ou inconnus (BALCH et al., 1979). La souche X_4 est un exemple particulier où le facteur de croissance inconnu est apporté par une autre bactérie. Des études supplémentaires sont nécessaires pour l'identification de ce facteur de croissance.

Les deux souches X_4 et X_8 se différencient par leur voie métabolique, leur source d'énergie et leurs produits de fermentation. La souche X_8 est une bactérie homo-

acétogène, gram négatif, non sporulée et mobile. La plupart des homoacétogènes décrites sont gram positif : *Acetobacterium woodii* (BALCH et al., 1977), *Clostridium acetium* (WIERINGA 1940). Seule une espèce thermophile, *Acetogenium kivui* (LEIGH et al., 1981) est gram négatif et non sporulée. De par ces sources d'énergie et son type de fermentation, la souche X₄ apparaît comme une bactérie originale. Les principales caractéristiques des souches X₄ et X₈ (gram négatif, non sporulées, anaérobies stricts) les font appartenir à la famille des *Bacteroidaceae* (BUCHANAN et GIBBONS 1974), mais une étude détaillée sur la taxonomie de ces souches reste à faire.

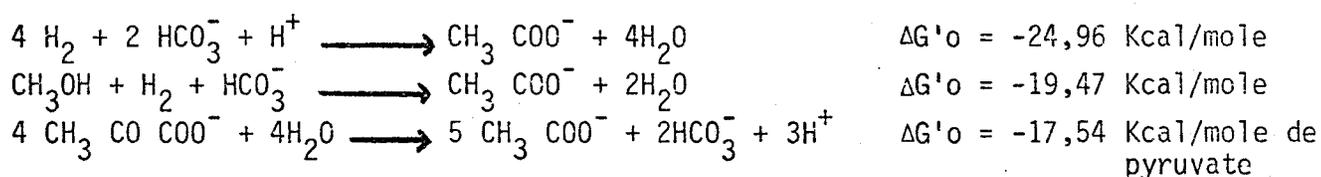
III - CARACTERISATION ET ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA SOUCHE B₂

A - Identification

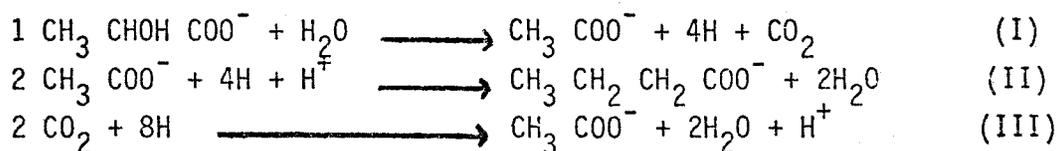
Les principales caractéristiques morphologiques et métaboliques de la souche B₂ permettent de l'identifier à *Eubacterium limosum*. Elle utilise les mêmes sources d'énergie (HOLDEMAN et MORE 1977) et réalise le même type de fermentation du glucose et du lactate. L'utilisation du mélange H₂ - CO₂ et du méthanol par *Eubacterium limosum* a été récemment démontrée (SHARAK GENTHNER et al., 1981).

B - Equation théorique de la fermentation du lactate et des composés monocarbonés

La souche B₂ réalise une fermentation homoacétique à partir du mélange H₂ - CO₂, du pyruvate et du méthanol en présence d'hydrogène. Les stoechiométries de ces réactions sont les suivantes :



Les fermentations butyriques du lactate et du méthanol ne peuvent être exprimées par des simples réactions stoechiométriques puisque le rapport acétate sur butyrate varie suivant les conditions de culture. La fermentation du lactate en acétate et en butyrate peut s'écrire sous la forme de trois équations :



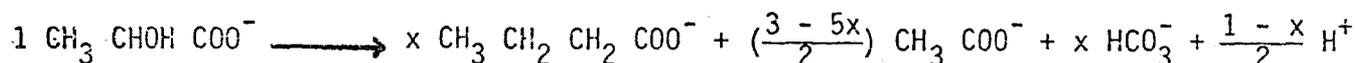
Nous définissons par x le nombre de mmoles de butyrate formées par mole de lactate dégradé. $4xH$ sont consommés dans la formation du butyrate et $(4 - 4x)H$ dans la réaction de réduction du CO_2 en acétate. L'acétate total produit est égal à la différence entre l'acétate formé par l'oxydation du lactate (1) dans l'équation I et par la réduction du CO_2 dans l'équation III ($\frac{1-x}{2}$) et l'acétate consommé dans la synthèse du butyrate dans l'équation II ($2x$) :

$$\text{acétate produit} = 1 + \frac{1-x}{2} - 2x = \frac{3-5x}{2}$$

De même le CO_2 formé est égal au CO_2 libéré dans l'équation I (1) moins le CO_2 consommé dans l'équation III ($1-x$).

$$CO_2 \text{ produit} = 1 - (1-x) = x$$

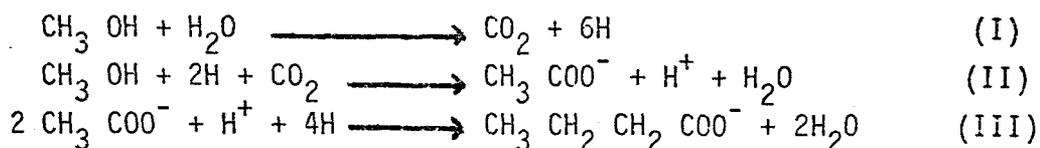
L'équation de la fermentation du lactate peut s'écrire en fonction de x :



Les bilans expérimentaux donnent pour x des valeurs comprises entre 0,3 et 0,75.

On observe une fermentation homobutyrique pour $x = 3/5$.

En absence d'hydrogène la fermentation butyrique du méthanol est la résultante de trois équations :



Nous définissons par a et b l'acétate et le butyrate produits. L'acétate formé dans l'équation II est égal à $2b + a$. L'hydrogène utilisé dans les équations II ($4b + 2a$) et III ($4b$) est égal à l'hydrogène libéré dans l'équation I.

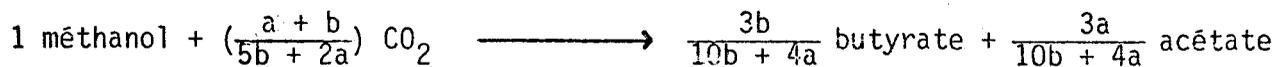
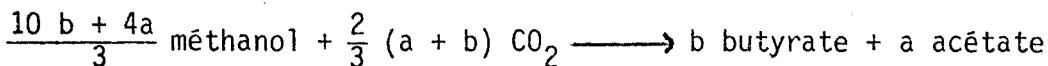
Le méthanol total consommé est donc égal à la somme du méthanol utilisé dans l'équation II ($2b + a$) et du méthanol servant de donneur d'électrons dans l'équation I ($\frac{8b + 2a}{6}$) :

$$\text{méthanol consommé} = 2b + a + \frac{8b + 2a}{6} = \frac{10b + 4a}{3}$$

Le CO_2 total consommé est égal au CO_2 utilisé dans l'équation II ($2b + a$) moins le CO_2 produit dans l'équation I ($\frac{4b + a}{3}$) :

$$CO_2 \text{ consommé} = 2b + a - \left(\frac{4b + a}{3}\right) = \frac{2}{3} (a + b)$$

L'équation de fermentation du méthanol peut donc s'écrire :



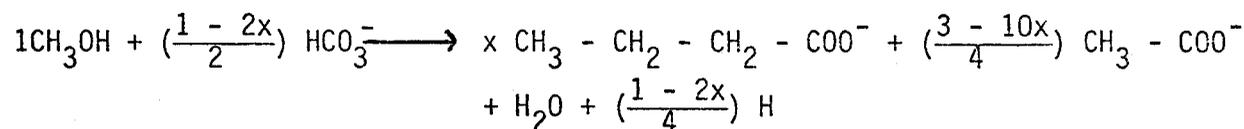
Si l'on pose x le nombre de moles de butyrate formées par m.moles de méthanol consommées, on peut exprimer le produit d'acétate et de CO_2 en fonction de x :

$$x = \frac{3b}{10b+4a} \implies b = \frac{-4ax}{10x-3}$$

En remplaçant b par sa valeur en fonction de x , on obtient :



En tenant compte de l'eau produite, l'équation complète de la fermentation du méthanol est :



Le ΔG° de cette fermentation n'est pas influencé de manière sensible par la valeur de x :

$$\Delta G^{\circ} = -13,23 + 0,95x \text{ Kcal/mole de méthanol}$$

Lorsque $x = 0,3$, le butyrate est le seul produit de fermentation. Les résultats expérimentaux donnent pour x des valeurs comprises entre 0,12 et 0,34.

C - Régulation du métabolisme du lactate et du méthanol

Les oxydations du lactate en acétate et en CO_2 et du méthanol en CO_2 sont couplées avec la réduction de pyridines nucléotides et de transporteurs d'électrons à plus bas E° (proche du potentiel d'oxydo-réduction de l'hydrogène). Le NAD^+ est en effet le coenzyme des lactate déshydrogénases et la ferredoxine est le transporteur d'électrons qui intervient dans la réaction phosphoroclastique. Bien que la nature de tous les transporteurs d'électrons impliqués dans la réduction du CO_2 et du méthanol en acétate ne soit pas encore déterminée, on a cependant pu mettre en évidence chez une bactérie homoacétogène, *Clostridium thermoaceticum*, la présence de ferredoxine et le rôle des pyridines nucléotides dans la réduction du méthylène THF en méthényl THF.

Dans le cycle de formation du butyrate, la réduction de l'acétyl CoA en OH butyryl CoA et du crotonyl CoA en butyryl CoA permet de réoxyder les pyridine nucléotides réduites. La réduction du CO_2 et du méthanol en acétate doit faire intervenir principalement des transporteurs d'électrons à bas E'_0 . On observe en effet une fermentation homoacétique lorsque la souche B_2 est cultivée en présence de donneurs d'électrons à bas E'_0 . C'est le cas de la fermentation du mélange $\text{H}_2\text{-CO}_2$ du pyruvate et du méthanol sous atmosphère d'hydrogène. Dans la fermentation du lactate et du méthanol, les variations observées dans le rapport entre les produits finaux, acétate et butyrate peuvent s'expliquer par des échanges d'électrons entre les pyridine nucléotides et des transporteurs à plus bas E'_0 . Des réactions de ce type ont été décrites chez les *Clostridium* où l'on a pu mettre en évidence un enzyme la NADH ferredoxine oxydo-réductase qui catalyse la réduction de la ferredoxine par le NADH. Un mécanisme de régulation analogue pourrait exister chez la souche B_2 . Un transfert d'électrons des pyridines nucléotides réduites sur des transporteurs d'électrons à plus bas E'_0 de type ferredoxine se traduirait par une augmentation de formation d'acétate de réduction et donc une diminution de la production de butyrate.

- Influence de l'acétate

La présence d'acétate est indispensable à la croissance sur méthanol et stimule la fermentation du lactate. Elle est en effet nécessaire pour permettre l'activité de l'acétate CoA transférase. Cet enzyme catalyse le transfert du groupement CoA du butyryl CoA sur l'acétate et maintient ainsi un pool d'acétyl CoA suffisant au bon fonctionnement de la cellule. L'acétyl CoA intervient à deux niveaux : par un mécanisme de régulation semblable à celui des *Clostridium*, il induit le transfert des électrons des pyridine nucléotides sur les transporteurs à plus bas E'_0 qui sont impliqués dans la réduction du CO_2 et du méthanol en acétate. Il est le point de départ du cycle de formation du butyrate : deux molécules d'acétyl CoA se condensent en acéto-acétyl CoA. Ce dernier est ensuite réduit en butyryl CoA. Des concentrations relativement élevées en acétate sont donc indispensables pour obtenir une concentration intracellulaire suffisante en acétyl CoA et permettre ainsi la régénération des pyridines nucléotides soit par la formation de butyrate soit par la réduction de transporteurs à plus bas E'_0 .

- Influence du CO_2

Le CO_2 est indispensable à la croissance sur méthanol et sur lactate.

Le fait que la fermentation du lactate libère du CO_2 explique que l'on observe tout de même sans agitation une croissance lente en absence de CO_2 . En effet, lorsque la culture n'est pas agitée, le CO_2 produit reste dissous dans le milieu. La présence de CO_2 est nécessaire à la réaction de réduction du CO_2 et du méthanol en acétate. L'importance de cette réaction dans les bilans globaux de fermentation est fonction de la pression partielle de CO_2 . Il n'est pas possible de dire si le CO_2 intervient comme effecteur enzymatique des transferts d'électrons entre pyridines nucléotides et transporteurs d'électrons à bas E_0' ou si de fortes teneurs en CO_2 permettent seulement d'améliorer la thermodynamique de la voie de synthèse de l'acétate à partir de composés monocarbonés.

L'acétate et le CO_2 possèdent un effet antagoniste sur le rapport acétate sur butyrate obtenus en fin de fermentation. L'effet du CO_2 prédomine cependant sur celui de l'acétate. L'influence de la concentration en acétate sur la production du butyrate est en effet surtout marquée pour de faibles teneurs en CO_2 ; dans ce cas la voie de fermentation de l'acétate de réduction fonctionne mal et la présence d'acétate stimule la formation de butyrate qui devient la voie principale d'utilisation des électrons.

- Influence du pH

Le pH a également une influence sur le rapport acétate butyrate. La réduction du CO_2 et du méthanol est favorisée en milieu alcalin. Cette observation est confirmée par le fait que toutes les bactéries homoacétogènes ont un optimum de croissance sur $\text{H}_2 - \text{CO}_2$ vers pH 8 (GOTTSCHALK 1982) et qu'aucune ne pousse en-dessous de pH 6. Pour une pression partielle de CO_2 donnée, l'augmentation du pH se traduit par une augmentation de la concentration en ions HCO_3^- . Il est donc possible que la formation préférentielle d'acétate observée en milieu basique soit due aux fortes concentrations en ions HCO_3^- .

- Influence du propionate

La production de valérate à partir de méthanol et de lactate est couplée à une consommation de propionate. Ce phénomène a déjà été observé par SHARAK GENTHNER et al. (1981) sur une culture d'*Eubacterium* dans un milieu contenant du jus de rumen. Les voies de synthèse du valérate sont sans doute analogues à celles du butyrate. Le propionate est converti par la CoA transférase en propionyl CoA qui se condense avec un acétyl CoA en propiono-acétyl CoA. Ce dernier est réduit en valéryl CoA qui est transformé, par transfert du CoA, en valérate. Une compétition existe entre l'acétate et le propionate au niveau de l'acétate CoA transférase.

SOUCHE	SUBSTRAT	PRODUCTION DE VITAMINE B ₁₂		REFERENCES
		µg/l	µg/g de substrat	
B ₂	méthanol	500	360	
<i>Propionibacterium</i>	sucre	40 000		FLORENT et NINET (1979)
<i>Klebsiella sp 101</i>	méthanol	156	7,8	
<i>Mycobacterium eburneus</i> ATCC : 21373	méthanol	102	5,1	TADASHI KAMIKURO et al (1977)
<i>Pseudomonas sp</i> ATCC : 14718	méthanol	156	7,8	

Tableau n° 17 : Production de vitamine B₁₂ sur méthanol et sur sucre par différentes bactéries aéro et anaérobies



Le rapport valérate sur butyrate produit est dépendant des concentrations en acétate et en propionate dans le milieu. La formation de valérate a pour conséquence une augmentation de la production d'acétate car elle entraîne une moindre consommation d'acétate pour la formation du butyrate.

D - Production de vitamine B₁₂

La vitamine B₁₂ est actuellement produite par des souches de *Propionibacterium* cultivées sur des milieux sucrés. De nombreuses études ont été réalisées ces dernières années afin de trouver des substrats meilleur marché. Elles ont essentiellement porté sur l'utilisation du méthanol et des alcanes. Nous avons indiqué sur le tableau n° 17 les productions de vitamine B₁₂ obtenues sur méthanol et sur glucose par différentes bactéries. Sur méthanol, la souche B₂ et *Butyribacterium methylotrophicum* sont de loin les bactéries les plus performantes. La production de vitamine B₁₂ par les *Eubacterium* apparaît très prometteuse. Elle n'est pas pour l'instant compétitive avec celle obtenue par les *Propionibacterium* mais elle pourrait facilement être améliorée par une meilleure définition des paramètres de culture et par l'obtention de mutants.

IV - CARACTERISATION DES SOUCHES SULFATO-REDUCTRICES

Les quatre souches CP₆₂, RE₁, RE₂₆ et FP sont des *Vibrio* sulfato-réducteurs mobiles, non sporulés et doivent être classées dans le genre *Desulfovibrio*. La souche FP a de nombreux caractères communs avec *Desulfohalobium propionicus*. Elle utilise les mêmes sources de carbone, oxyde le propionate en acétate et CO₂ en présence de sulfate et réalise une fermentation propionique du lactate en absence de sulfate (WIDDEL et PFENNIG 1982). Les deux souches sont toutefois très différentes morphologiquement. La souche FP est un vibrio tandis que *Desulfohalobium propionicus* présente des formes ovoïdes en citrons ou en oignons.

En présence de sulfate les quatre souches réalisent une fermentation acétique classique de l'éthanol et du lactate. Elles peuvent toutes utiliser l'hydrogène comme seule source d'énergie. En absence de sulfate et en culture pure seule la souche FP est capable de fermenter le lactate. La formation de propionate lui permet de régénérer ses coenzymes réduits. Les autres souches n'utilisent que des composés (pyruvate, fumarate) qui ne sont jamais présents dans les écosystèmes anaérobies. Nous n'avons détecté aucun produit réduit lors de conversion en acétate du pyruvate et du fumarate par les souches CP₆₂, RE₁ et RE₂₆.

SISLER et ZOBELL (1951) ont observé avec une souche de *Desulfovibrio desulfuricans* cultivée sur hydrogène plus sulfate, une consommation d'hydrogène supérieure à la quantité théorique. Ils ont pu extraire par le CCl₄ à partir des cellules des composés organiques dont 30 % était probablement des paraffines.

Il est possible que les souches CP₆₂, RE₁ et RE₂₆ produisent à partir du pyruvate et du fumarate des hydrocarbures du même genre.

Le rôle des souches CP₆₂, RE₁ et RE₂₆ comme bactéries acétogènes productrices d'hydrogène a pu être démontré sur lactate et sur éthanol. Ces résultats confirment les travaux de BRYANT sur l'importance des bactéries sulfato-réductrices dans les milieux pauvres en sulfate (BRYANT et al., 1977). La dégradation des AGV en acétate et hydrogène par des bactéries sulfato-réductrices en association avec des bactéries méthanogènes n'a jamais été démontrée. La souche FP et *Desulfohalobium propionicus* utilisent l'hydrogène en présence de sulfate et l'on pourrait supposer que ces organismes peuvent oxyder le propionate en réduisant les protons en hydrogène. BRYANT a suggéré que les hydrogénases de ces bactéries n'étaient pas réversibles et qu'elles permettaient l'utilisation de l'hydrogène mais pas sa production.

Cependant la souche FP réalise une fermentation acétique de l'éthanol en association avec des méthanogènes. Ceci indique qu'elle possède une hydrogénase réversible. Nous n'avons pas pour l'instant obtenu de croissance de cette association sur propionate. A côté du problème de l'adaptation de la souche sulfato-réductrice et de l'induction de l'hydrogénase, se pose celui du choix de la bactérie méthanogène. Les différentes souches utilisatrices d'hydrogène n'ont en effet pas les mêmes caractéristiques de croissance ni les mêmes constantes d'affinité pour l'hydrogène. La croissance de la souche FP sur éthanol en association avec la culture FE n'a été possible que grâce au développement d'une bactérie méthanogène différente du filament et de *Methanobrevibacter* AZ. Cette bactérie est peut être plus adaptée à l'utilisation de l'hydrogène dans des conditions de croissance lentes que *Methanobrevibacter* AZ. La concentration en acétate a sans doute une influence sur les cinétiques de dégradation du propionate et de l'éthanol. Dans ce cas la présence du filament aurait favorisé le développement de la souche FP sur éthanol. Les résultats que nous avons obtenus sur la souche FP ne sont pas suffisants pour démontrer que les bactéries sulfato-réductrices interviennent comme bactéries acétogènes à partir du propionate, aussi des études complémentaires sur ce sujet sont-elles actuellement en cours.

CONCLUSION.

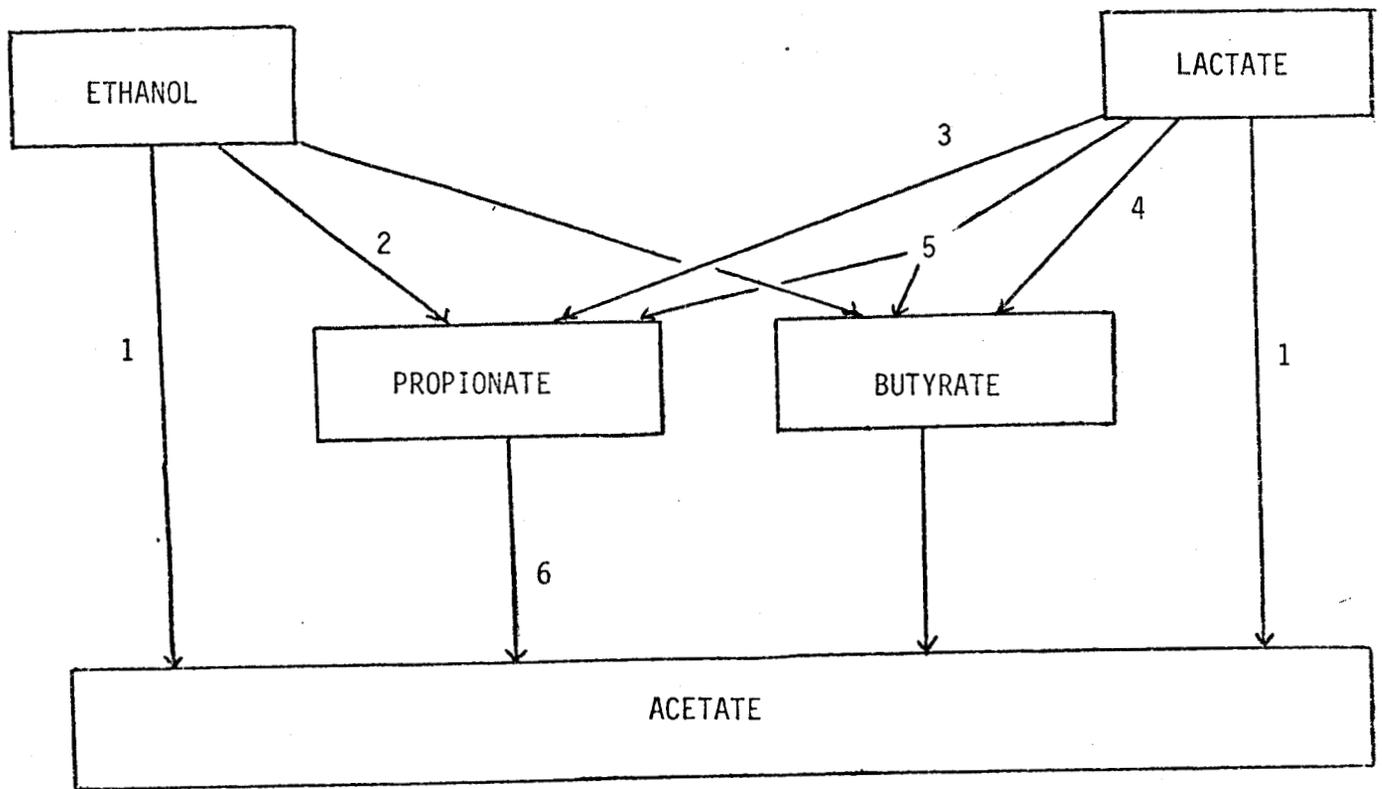
Les isolements et les numérations sur lactate d'une part, les enrichissements et les isolements sur éthanol et propionate d'autre part, ont permis de mettre en évidence dans les digesteurs anaérobies deux voies principales de conversion de l'éthanol et du lactate en acétate et en méthane (figure n° 35). On distingue :

- une voie directe qui est réalisée par des associations syntrophiques de bactéries sulfato-réductrices et de bactéries méthanogènes.

- une voie indirecte qui passe par l'intermédiaire d'acides gras volatils à longues chaînes (propionate, butyrate...).

L'acétogénèse directe représente sans conteste la voie idéale car elle évite la formation d'acides gras volatils toujours difficiles à dégrader. Les numérations de bactéries sulfato-réductrices sur lactate et les résultats des enrichissements sur éthanol montrent que l'acétogénèse directe joue un rôle très important dans le processus de méthanisation. Les bactéries productrices de propionate et de butyrate possèdent cependant des taux de croissance plus élevés que ceux des bactéries acétogènes productrices d'hydrogène. L'importance de l'acétogénèse dans les fermenteurs de méthanisation alimentés en continu est peut être due à une plus grande affinité des bactéries acétogènes pour le substrat. Cette hypothèse est actuellement vérifiée au laboratoire en chemostat avec l'association CP₆₂ *Methanobrevibacter* AZ et les souches L₁ et B₂. Ces cultures en continu devraient également permettre de déterminer les conditions expérimentales qui favorisent la fermentation acétique et limiteraient le développement des bactéries productrices d'AGV et en particulier de propionate.

A notre connaissance, la fermentation propionique de l'éthanol n'avait jamais été décrite auparavant. La souche X₄ qui dégrade l'éthanol en acétate et en propionate a été caractérisée morphologiquement et physiologiquement, mais nous n'avons pour l'instant aucune idée précise sur les voies de formation du propionate à partir de composés à deux carbones (éthanol, acétate). Il serait particulièrement intéressant de déterminer le mécanisme de fixation du CO₂ et de comparer la voie de synthèse du propionate chez la souche X₄ avec les deux voies métaboliques actuellement connues (voie du fumarate et de l'acrylate). La dépendance de la souche X₄ pour un facteur de croissance fourni par une autre souche constitue un exemple particulier du type d'interactions nutritionnelles qui existent dans les populations mixtes.



Souches isolées

- 1 *Desulfovibrio sp.* : strain CP₆₂, RE₁, RE₂₆
- 2 Souche X₄
- 3 *C. propionicum*, *Propionibacterium sp.*
- 4 *E. limosum*
- 5 *Megasphaera elsdenii*
- 6 Souche FP

Figure n° 35 : Voies de conversion de l'éthanol et du lactate en acétate



La fermentation des composés monocarbonés par la souche B₂ et par les *Eubacterium* pourrait trouver des applications économiques importantes. Le méthanol, le mélange H₂ - CO₂ et le CO sont des substrats bon marché et disponibles en abondance notamment par la pyrolyse du charbon et des débris végétaux. On peut envisager la production par voie biologique des acides gras volatils qui sont actuellement obtenus à partir du pétrole. Nous avons montré que l'on pouvait en modifiant les conditions de culture, orienter facilement le métabolisme de la souche B₂ vers la production d'un composé particulier (acétate, butyrate, valérate). L'acétate est utilisé en grande quantité dans l'industrie et pourrait être obtenu par fermentation du méthanol en présence d'hydrogène et de gaz carbonique. Les besoins de l'industrie en butyrate et en valérate sont pour l'instant peu importants mais ces acides pourraient trouver d'autres débouchés et servir comme précurseurs d'autres produits comme des cétones. On obtient une fermentation homobutyrique du méthanol à pH relativement acide avec une faible pression partielle de CO₂ et une concentration importante en acétate.

L'utilisation des acides gras volatils par les bactéries sulfato-réductrices n'a été décrite que très récemment. La souche FP qui dégrade en présence de sulfate le propionate en acétate et en CO₂ pourrait être étudiée plus en détail d'un point de vue biochimique. Les voies métaboliques et les transporteurs d'électrons impliqués dans ce type de fermentation sont en effet encore totalement inconnus. Nous avons montré qu'en absence de sulfate et en association avec des méthanogènes, la souche FP intervenait comme bactérie acétogène productrice obligée d'hydrogène à partir de l'éthanol. Nous espérons maintenant réussir à adapter sur propionate l'association (souche FP - méthanogènes) obtenu sur l'éthanol. Des études dans ce sens sont actuellement en cours dans le laboratoire.

- BACHE R., PFENNIG N., 1981. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on Methoxylated Aromatic Acids and determination of Growth Yields. Arch. Microbiol., 130, 255-261.
- BADZIONG W., THAUER R.K., ZEIKUS J.G., 1978. Isolation and characterisation of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energie source. Arch. Microbiol., 116, 41-49.
- BALCH W.E., FOX G.E., MAGRUM L.J., WOESE R.S., 1979. Methanogens : reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev., 43, 2, 260-296.
- BALCH W.E., SCHOBERTH S., TANNERS R.S., WOLFE R.S., 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen oxidising carbon dioxide reducing anaerobic bacteria. Int. J. System bacteriol 27, 4, 355-361.
- BARKER H.A., 1956. Bacterial fermentations. John Wiley et Sons, New York.
- BARKER H.A., KAMEN M.D., HAAS V., 1945. Carbondioxide utilization in the synthesis of acetic and butyric acids by *Butyribacterium rettgeri*. Bacteriology, 31, 355-360.
- BAUCHOP T., MOUNTFORT D.O., 1981. Cellulose fermentation by rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. Appl. Environm. Microbiol. 42, 6, 1103-1110.
- BEESCH S.C., 1952. Acetone-butanol fermentation of sugars. Indust. Eng. Chem. 44, 1677-1682.
- BHAT J.V., BARKER H.A. *Clostridium lacto-acetophilum* nov. spec. and the rolé of acetic acid in the butyric acid fermentation of lactate. J. Bact., 54, 381-391.
- BOONE D.R., BRYANT M.P., 1980. Propionate degrading bacterium, *Syntrophobacter wolini*, from methanogenic ecosystems. Appl. Environm. Microbiol., 40, 3, 626-632.
- BORNSTEIN B.T., BARKER H.A., 1948. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. J. of Biol. Chem., 172, 659-669.
- BRAUN M., MAYER F., GOTTSCHALK G., 1981. *Clostridium aceticum* (Wieringa), a Microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Arch. Microbiol. 128, 288-293.
- BRAUN M., SCHOBERTH S., GOTTSCHALK G., 1979. Enumeration of bacteria forming acetate from H₂ and CO₂ in anaerobic habitats. Arch. Microbiol., 120, 201-204.

- BRITZ M.L., WILKINSON R.G., 1982. Leucine dissimilation to isovaleric and isocaproic acids by cell suspension of amino acid fermenting anaerobe : The stickland reaction revisited. *Can. J. Microbiol.*, 28, 291-300.
- BRYANT M.P., LEON CAMPBELL L., REDDY C.A., CRABILL M.R., 1977. Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 1162-1169.
- BRYANT M.P., WOLIN E.A., WOLIN M.J., WOLFE R.S., 1967. *Methanobacillus omelianskii* a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.* 59, 20)31.
- BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E., 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. Baltimore : Williams & Wilkins.
- COUNOTTE G.H.M., PRINS R.A., JANSSEN R.H.A.M., DEBIE M.J.A., 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL- 2- C lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environm. Microbiol.*, 42, 4, 649-655.
- DAVIS R., 1942. The acetone - butyl alcohol fermentation. *Biochem. J.*, 36, 582-599.
- DEVRIES W., KEPTEIJN W.M.C., VAN DER BEEK E.G., STOUTHAMER A.H., 1970. Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L₃ in batch cultures and in continous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 63, 333-343.
- DIEKERT G., KONHEISER V., PIECHULLA K., THAUER R.K., 1981. Nickel requirement and factor F 430 content of methanogenic bacteria. *J. Bact.*, 148, 2, 459-464.
- DOELLE N.H., 1975. *Bacterial metabolism*. New York Academic 2nd ed.
- EIRICH L.D., VOGELS G.D., WOLFE R.S., 1979. Distribution of coenzyme F 420 and properties of its hydrolytic fragments. *J. Bact.*, 140, 1, 20-27.
- FERRY J.G., WOLFE R.S., 1976. Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Arch. Microbiol.* 107, 33-40.
- FOX G.E., MAGRUM L.J., BALCH W.E., WOLFE R.S., WOESE C.R., 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4537-4541.
- GROLEAU D., FORSBERG C.W., 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Microbiol.*, 27, 517-530.
- GOTTSCHALK G., 1982. *Principle of anaerobic fermentation*. Coloque annuel de la société française de microbiologie. Microbiologie industrielle et biotechnologie Rueil Malmaison.



- HEALY J.B., YOUNG L.Y., 1978. Catechol and phenol degradation by a methanogenic population of bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, 35, 216-218.
- HEALY J.B., YOUNG L.Y., 1979. Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environm. Microbiol.*, 38, 84-89.
- HEALY J.B., YOUNG L.Y., 1980. Methanogenic decomposition of ferulic acid, a model lignin derivative. *Appl. Environm. Microbiol.*, 39, 436-444.
- HOBSON P.N., 1965. Continuous culture of some anaerobic and facultatively anaerobic rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 38, 167-180.
- HOBSON P.N., BOUSFIELD S., SUMMERS R., 1974. Anaerobic digestion of organic matter. *CRC. Critical reviews in environmental control*, 4, 131-191.
- HOBSON P.N., SUMMERS R., 1967. The continuous culture of anaerobic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 47, 53-65.
- HOLDEMAN L.V., CATO E.P., MOORE W.E.C., 1977. Anaerobe laboratory manual 4th edition. Edited by the V.P.I. Anaerobe laboratory, BLACKSBURG, Virginia 24061.
- HUBER H., THOMM M., KONIG H., THIES G., STETTER K.O., 1982. *Methanococcus thermo-lithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch. Microbiol.*, 132, 47-50.
- HUSER B.A., WUHRMANN K., ZEHNDER A.J.B., 1982. *Methanotherix soehgenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 132, 1-9.
- HUTSCHEMACKERS J., DELAFONTAINE M., NAVEAU H.P., NYNS E.J., 1982. Coenzyme F 420 indicates potential for methane production. *Biomass* 2, 115-125.
- IANNOTTI E.L. et al., 1973. Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*. Changes caused by interspecies transfer of H₂. *J. Bact.*, 114, 1231.
- KAISER J.P., HANSELMANN K.W., 1982. Aromatic chemicals through anaerobic microbial conversion of lignin monomers. *Experientia*, 38, 167-175.
- LANG, 1972. Spezifische farbreaktion zum direkten nachweis der ameisen säure. *Z. Anal. Chem.*, 260, 8-10.
- LAANBROEK H.J., PFENNIG N., 1981. Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Arch. Microbiol.*, 128, 330-335.

- LEIGH J.A., MAYER F., WOLFE R.S., 1981. *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium. Arch. Microbiol., 129, 275-280.
- LJUNGDAHL L.G., WOOD H.G., 1969. Total synthesis of acetate from CO₂ by heterotrophic bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 23, 515-535.
- LYND L., KERBY R., ZEIKUS J.G., 1932. Carbon monoxide metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylotrophicum*. J. Bact., 149, 1, 255-263.
- MC BRIDE, WOLFE, 1971. A new coenzyme of methyl transfert, coenzyme M. Biochemistry, 10, 12, 2317-2323.
- MAH R.A., 1980. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei*. Curr. Microbiol., 3, 321-326.
- MAC INERNEY M.J., BRYANT M.P., HESPELL R.B., COSTERTON J.M., 1981. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic fatty acid oxidizing bacterium. Appl. Environm. Microbiol., 41, 4, 1029-1039.
- MAC INERNEY M.J., BRYANT M.P., PFENNIG M., 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty acid in syntrophic association with methanogens. Arch. Microbiol., 122, 129-135.
- MILLER T.L., WOLIN M.J., 1973. A serum bottle modification of the hungate technique for cultivation obligate anaerobes. Appl. Microbiol., 27, 985-987.
- MIURA H., Horiguchi M., MATSUMOTO T., 1980. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii* and *Ruminococcus*. Appl. Environm. Microbiol., 40, 294-300.
- MONTFORT, 1978. Evidence for A.T.P. synthesis driven by a proton gradient in *Methanosarcina*. Bioch. and Biophys res. communication 85, 4, 1346-1351.
- MOUNTFORT D.O., ASHER R.A., BAUCHOP T., 1982. Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp. strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. Appl. environm. Microbiol., 128-134.
- MOUNTFORT D.O., BRYANT M.P., 1982. Isolation and characterisation of an anaerobic benzoate degrading bacterium from sewage sludge. Arch. Microbiol., (in press).
- MORFAUX J.N., ALBAGNAC G., TOUZEL J.P., 1981. Epuration par fermentation mēthanique des effluents de blancheur de petits pois. Science des Aliments, 1, 2, 293-314.
- NOTTINGHAM P.M., HUNGATE R.E., 1969. Methanogenic fermentation of benzoate. J. Bact. 98, 1170-1172.

- OREMLAND R.S., MARSH L.M.; POLCIN S., 1982. Methane production and simultaneous sulfate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature*, 296, 5853, 143-145.
- PETITDEMANGE H., BENGONE J.M., CHERRIER C., GAY R., 1974. Influence de la source carbonée sur les activités NAD^+ et NADP^+ ferredoxine oxydoréductasique de *Clostridium tyrobutyricum*. *C.R. acad. Sc. Paris*, 278, 2707-2710.
- REDDY C.A., BRYANT M.P., WOLIN M.J., 1972. Characteristics of S organism isolated from *Methanobacillus omeliansii*. *J. Bact.*, 110, 126-132.
- SAMAIN E., 1980. Etude de la phase acidifiante de la fermentation méthanique des glucides. D.E.A. de Biochimie - Université de LILLE I.
- SHARAK GENTHNER B.R., DAVIS C.L., BRYANT M.P., 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol and $\text{H}_2\text{-CO}_2$ -utilizing species. *Appl. Environm. Microbiol.* 42, 1, 12-19.
- SCHINK B., WARD J.C., ZEIKUS J.G., 1981. Microbiology of wetwood : Role of anaerobic bacterial populations in living trees. *J. Gen. Microbiol.*, 123, 313-322.
- SCHINK B., ZEIKUS J.G., 1980. Microbial methanol formation : A major end product of pectin metabolism. *Curr. Microbiol.*, 4, 387-389.
- SMITH M.R., Ph. D, ZINDER S.H., Ph. D, MAH R.A., Ph. D, 1980. Microbial methanogenesis from acetate. *Process. Biochem.*, 15, 54-59.
- STADTMAN T.C., BARKER H.A., 1951. Studies on the methane fermentation VII. Tracer experiments on fatty acid oxidation by methane bacteria. *J. Bact.*, 61, 67-80.
- STETTER K.O., THOMM M., WINTER J., WILDGRUBER G., HUBER H., ZILLIG W., JANECOVIC D., KONIG H., PALM P., WUNDERL S., 1981. *Methanothermus fervidus*, *sp. nov.*, a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an icelandic hot spring. *Zbl. Bakt. Hyg.*, I. Abt. Orig. C 2, 166-178.
- TAYA M., KOBAYASHI T., SHIMIZU S., 1980. Synthetic medium for cellulolytic anaerobe *Ruminococcus albus*. *Agri. Biol. Chem.*, 44, 2225-2227.
- TANNER R.S., STACKEBRANDT E., FOX G.E., GUPTA R., MAGRUM L.J., WOESE C.R., 1982. A phylogenetic analysis of anaerobic eubacteria capable of synthesizing acetate from carbon dioxide. *Curr. Microbiol.*, 7, 127-132.
- TAYLOR C.D., WOLFE R.S., 1974. Structure and methylation of coenzyme M ($\text{HSCH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$). *J. Biol. Chem.*, 249, 4879-4885.

- THAUER R.K., JUNGERMANN K., DECKER K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bact. Reviews*, 41, 1, 100-160.
- TOERIEN D.F., 1967. Enrichment culture studies on aerobic and facultative anaerobic bacteria found in anaerobic digesters. *Water research*, Pergamon Press, 1, 147-155.
- TOUZEL J.P., ALBAGNAC G., 1982. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC₃. *FEMS Letters* (in press)
- WEIMER, ZEIKUS, 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautrophicum*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 33, 2, 289-297.
- WIDDEL F., 1980. Anaerobier Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfat-reduzierender Bakterien. Thesis. University of Göttingen, FRG.
- WIDDEL F., PFENNIG N., 1977. A new anaerobic, sporing, acetate oxidising, sulfate reducing bacterium, *Desulfatomaaculum aceto-oxidans*. *Arch. Microbiol.*, 112, 119-122.
- WIDDEL F., PFENNIG N., 1982. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 131, 360-365.
- WIERINGA, 1940. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore forming bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol*, 6, 251-262.
- WILDGRUBER G., THOMM M., KONIG H., OBER K., RICCHIUTO T., STETTER K.O., 1982. *Methanoplanus limicola*, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the methanoplanaceae. *Arch. Microbiol.* 132, 31-36.
- WINDEREY, ZEIKUS, 1977. Effect of sulfate on sediment methanogenesis. *Appl. Environm. Microbiol.*, 33, 275-281.
- WINTER J.U., WOLFE R.S., 1980. Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. *Arch. Microbiol.*, 124, 73-79.
- WOESE C.R., MAGRUM L.J., FOW G.E., 1978. Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.*, 11, 3, 245-252.
- WOLFE R.S., 1979. Methanogens a surprising microbiol group. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 45, 353-364.

- WOLFE R.S., 1979. Biochemical pathways and control. CR. 1st Symposium on Anaerobic Digestion. Cardiff.
- WOLIN M.J., 1975. Interaction between H₂ producing and methane producing species. Microbiol production and utilisation of gases. Gottingen.
- ZEIKUS J.G., 1979. Microbiol populations in anaerobic digestors. 1st International Symposium on Anaerobic Digestion. Cardiff.
- ZEIKUS J.G., 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 34, 423-456.
- ZEIKUS J.G., LYND L.H., THOMSON T.E., KRZYCKI J.A., WEIMER P.J., HEGGE P.W., 1980. Isolation and characterization of a new methylotrophic, acidogenic anaerobe, the Marburg strain. Curr. Microbiol., 3, 381-386.
- ZEIKUS J.G., WOLFE R.S., 1972. *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. , an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. J. Bact., 109, 707-713.
- ZINDER S.H., MAH R.A., 1979. Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use H₂-CO₂ for methanogenesis. Appl. Environm. Microbiol. 38, 5, 996-1008.

