50376
1984
243

50 376
1984
243

N° d'ordre 1148

T H E S E

présentée à

l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR 3ème CYCLE
en Biologie et Physiologie Végétale

Martine ARCHIPRETRE

METHANISATION DE RESIDUS VEGETAUX

Aspects cinétiques et microbiologiques

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
LILLE

Soutenue le 27 Novembre 1984 devant la Commission d'Examen

Jury

Président : Monsieur BOURIQUET

Rapporteur : Monsieur ALBAGNAC

Examinateurs : Monsieur BODARD
Monsieur GUILLAUME

SCD LILLE 1
D 030 321829 7

50376
1984
243

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE ★ LILLE

A mes grands-parents,

A Bruno,

Je t'accorde de la bouse de boeuf,
tu feras ton pain dessus

(EZECHIEL, 4-15)

R E M E R C I E M E N T S

_*_*_*_*_*_

Ce travail a pu être réalisé grâce à la MAISON DE LA NATURE ET DE L'ENVIRONNEMENT qui a promu et géré le projet dans lequel s'insère cette étude. Je tiens à la remercier en les personnes de son Directeur, Monsieur BODARD, de Messieurs P. RADANNE (A.F.M.E.) et O. VERBRUGGEN.

Je remercie Monsieur M. BODARD, Professeur à l'Université de LILLE I, qui a bien voulu accepter la direction de ce travail.

Je remercie tout particulièrement :

* Monsieur G. ALBAGNAC, Directeur de la Station de Technologie Alimentaire (I.N.R.A.) qui m'a acceptée dans son laboratoire

* Monsieur R. MOLETTA, Chargé de Recherches, qui m'a conseillée et aidée tout au long de ce travail

* Le personnel de la Station de Technologie Alimentaire de VILLENEUVE D'ASCQ pour l'aide amicale qu'il m'a toujours apportée, et en particulier, Mesdames M. KUBACZKA et C. VASSEUR ainsi que Messieurs JACQUEMONT, LEPOUTRE et MIGDAL dont la patience et la compétence professionnelle n'ont jamais été prises en défaut

Je tiens également à remercier :

- Monsieur BOURIQUET, Professeur à l'Université de LILLE I qui a bien voulu présider le jury de cette thèse

- Monsieur GUILLAUME, Professeur à l'Université de LILLE I qui a accepté de juger ce travail.

- PLAN -
-*-

***** INTRODUCTION *****

***** ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE *****

I.- LA METHANOGENESE

I.1.- Présentation générale
I.1.1.- Historique 2.-
I.1.2.- La fermentation méthanique 3.-
I.2.- Hydrolyse et acidogenèse
I.2.1.- Nature générale des substrats 4.-
I.2.1.1.- Structures rencontrées
I.2.1.2.- Composition chimique
I.2.1.2.1.- Les polysaccharides de structure
I.2.1.2.2.- Les substances de réserves
I.2.2.- Microbiologie des bactéries hydrolytiques et fermentatives
I.2.2.1.- Micro-organismes hydrolytiques 7.-
I.2.2.2.- Les bactéries acidogènes et leur métabolisme
I.2.3.- Hydrolyse 10.-
I.2.3.1.- Les enzymes
I.2.3.1.1.- Les systèmes cellulasiques
I.2.3.1.2.- Les systèmes hémicellulasiques
I.2.3.1.3.- Les amylases
I.2.3.2.- Facteurs affectant l'hydrolyse
I.2.4.- Réactions en retour 14.-
I.3.- Acétogenèse
I.3.1.- Métabolisme 15.-
I.3.2.- Micro-organismes acétogènes 16.-
I.4.- Méthanogenèse
I.4.1.- Microbiologie 17.-
I.4.2.- Métabolisme 18.-
I.4.3.- Eléments de cinétique méthanogène 20.-

II.- INTERACTIONS

II.1.- Complémentarités métaboliques

II.2.- Transferts d'hydrogène interespèces
II.2.1.- Les bactéries dont le métabolisme n'est pas influencé par la pression partielle d'hydrogène 22.-
II.2.2.- Les bactéries dont le métabolisme est influencé par la pression partielle d'hydrogène 23.-

III.- MISE EN OEUVRE DE LA METHANISATION

III.1.- Paramètres
III.1.1.- Potentiel rédox 24.-
III.1.2.- pH 24.-
III.1.3.- Température 25.-
III.1.4.- Nutriments et facteurs de croissance 25.-
III.1.5.- Facteurs inhibiteurs 26.-
III.1.6.- Agitation 27.-
III.1.7.- T.S.H. 27.-
III.2.- Procédés
III.2.1.- Procédés mono-étapes 28.-
III.2.1.1.- Fermenteur discontinu
III.2.1.2.- Fermenteur continu
III.2.2.- Procédé en deux étapes 29.-

***** MATERIELS ET METHODES *****

I.- PILOTES DE LABORATOIRE

II.- SUBSTRATS : DECHETS VEGETAUX

II.1.- Origines 30.-
* Feuilles de choux-fleurs
* Racines d'endives
* Gazon
* Lentilles d'eau
II.2.- Pré-traitement des résidus végétaux 31.-
* Racines d'endives
* Feuilles de choux-fleurs
* Gazon
* Lentilles d'eau

III.- CINETIQUES DE DEGRADATION

III.1.- Substrats 33.-
III.2.- Matériel 33.-
III.3.- Résultats 33.-

IV.- DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

V.- DENOMBREMENTS BACTERIENS

V.1.- Milieu 35.-
V.2.- Ensemencement 35.-
V.3.- Lecture 35.-

VI.- TECHNIQUES ANALYTIQUES

VI.1.- Méthodes de dosage global 36.-
VI.2.- Analyses des acides gras volatils 36.-
VI.3.- Composition du gaz 37.-

***** RESULTATS ET DISCUSSION *****

---------- Première partie : RESULTATS DE METHANISATION ----------

I.- ANALYSE DES SUBSTRATS

II.- FERMENTATIONS DISCONTINUES

II.1.- Méthanisation du chou-fleur 39.-
II.2.- Méthanisation du gazon 40.-
II.3.- Méthanisation du mélange feuilles de choux-fleurs - gazon 41.-
II.4.- Méthanisation des racines d'endives 41.-
II.5.- Méthanisation des lentilles d'eau 41.-
II.6.- Conclusion 42.-

III.- DEGRADATION DES RESIDUS VEGETAUX EN CONTINU AVEC DILUTION DE LA CHARGE

III.1.- Racines d'endives 43.-
III.2.- Feuilles de choux-fleurs 45.-
III.3.- Lentilles d'eau 47.-

IV.- DEGRADATION DES RESIDUS VEGETAUX EN CONTINU SANS DILUTION DE CHARGE

IV.1.- Essais sur gazon 48.-
IV.2.- Essais sur racines d'endives 49.-

V.- DEGRADATION DES RACINES D'ENDIVES EN SURCHARGE

---------- Deuxième partie : ETUDE DES BOUES ----------

I.- CARACTERISTIQUES DES BOUES

I.1.- Physiques
I.1.1.- Matières sèches - Matières volatiles 52.-
I.1.2.- Décantation 52.-
I.1.3.- Filtration 53.-
I.2.- Chimiques
I.2.1.- pH 53.-
I.2.2.- N-P-K 53.-
I.3.- Microbiologiques
I.4.- Métaboliques
Dégradation des A.G.V. 55.-

II.- ETUDE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES

II.1.- Influence du pH sur la méthanisation du xylane 56.-
II.2.- Influence de la température 57.-

III.- ADAPTABILITE DES BOUES AUX DIFFERENTS SUBSTRATS

III.1.- Potentialité de dégradation des sucres 59.-
III.2.- Adaptabilité des boues à dégrader des substrats végétaux bruts
III.3.- Adaptation d'un écosystème à flore hémicellulolytique à un substrat cellulosique 61.-

IV.- INHIBITION/ACTIVATION DE L'ACTIVITE HYDROLYTIQUE

V.- ETUDE ENZYMATIQUE

***** CONCLUSION ET PERSPECTIVES *****

***** REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES *****

***** ANNEXES *****

A B R E V I A T I O N S

_*_*_*_*_

A.G.V. : Acides Gras Volatils :
A : acétate (C_2)
P : propionate (C_3)
B : butyrate (C_4)
iV : isovalérate (C_5)
V : valérate (C_5)

CH_4 : Méthane

CM : Charge Massique

CV : Charge Volumique

DCO_S : Demande Chimique en Oxygène des Matières Solubles

DCO_T : Demande Chimique en Oxygène Totale

MF : Matières Fraîches

MS : Matières Sèches

MV : Matières Volatiles (assimilées à M.O. : Matières Organiques)

NH_4^+ : Azote ammoniacal

O.H.P.A. : Obligate Hydrogen Producting Anaerobic Bacteria

T.S.H. : Temps de Séjour Hydraulique

U N I T E S

-*-*-

g O_2/l : Gramme d'oxygène par litre d'effluent

l/l.j : Litre de gaz par litre de volume utile de digesteur et par jour

l/g MV : Litre de gaz par gramme de matière organique introduit

g MV/g MS.j)
g MV/g MV.j) Gramme de matières organiques introduit par gramme de Matières Sèches ou Volatiles contenues dans les boues du réacteur et par jour

g MV/l.j : Gramme de matières organiques introduit par litre de volume utile de digesteur et par jour

g/l : Gramme par litre de volume utile de digesteur

D E F I N I T I O N S

-*-*-*-*-*-

Acétoclaste : Bactérie productrice de méthane et CO_2 par décarboxylation de l'acétate

Acides gras volatils : Composés de structure R-COOH dont le nombre de carbones ne dépasse pas 6

Acidogène ou acidifiante : Bactérie fermentative productrice d'acides gras volatils

Biogaz : Mélange gazeux principalement composé de CH_4 et CO_2 résultant de la fermentation méthanique

Charge massique : Quantité de matière appliquée par quantité de M.S. ou M.V. de boues et par jour

Charge volumique : Quantité de matière appliquée par unité de volume utile de fermenteur et par jour

Digesteur : Fermenteur

Dilution préférentielle : Elimination progressive de la biomasse bactérienne (ou de nutriments) dans un fermenteur lorsque le taux de dilution est supérieur au taux de croissance des micro-organismes

Temps de séjour hydraulique : Temps de renouvellement du volume total du milieu fermentatif, correspondant à l'inverse du taux de dilution

INTRODUCTION

TABLEAU I : DECHETS VEGETAUX ET ANIMAUX DISPONIBLES EN FRANCE (1980), (BRUNS et APPERT, 1983)

Origine	Nature du déchet	Humidité en %	Tonnage MS en Mt	Non récupéré en %	PCI en tep/t	Récupéré sous forme d'énergie en Mtep	Energie récupérable en Mtep
AGRICULTURE	Pailles de céréales	15 à 20	21,0	30	0,4		2,5
	Pailles d'oléagineux	15 à 20	2,9	100	0,4		1,2
	Rafles et spathes de maïs	35 à 45	2,5	97	0,4		0,9
	Sarments de vigne	25	2,6	100	0,4		1,0
	Tiges et feuilles de maïs	60 à 70	4,3	100	0,2		0,9
	Feuilles et collet de betteraves	85 à 88	2,9	96	0,2		0,6
	Fumier de bovins et ovins	75 à 90	13,0	100	0,2		2,6
	Lisiers porcins	95	1,5	100	0,2		0,4
	Fientes de volaille	80 à 85	1,3	100	0,2		0,2
	Autres sources		5,0	100	0,3		1,5
	TOTAL		57,0				11,8
BOIS	Déchets d'abattage	15 à 20	0,9	100	0,4		0,4
	Industrie du bois	15 à 20	9,0	60	0,4	1	2,2
	Ecorces	20					0,2
	TOTAL		9,9				2,8
Industries Alimentaires et Agricoles			0,9	30	0,2		0,1
TOTAL GENERAL			67,8				15,7

INTRODUCTION

Les végétaux chlorophylliens convertissent l'énergie solaire en énergie chimique grâce à la photosynthèse ; l'édification de ces molécules carbonées conduisant à la formation de biomasse. Les déchets végétaux d'origine agricole constituent donc une réserve énergétique susceptible d'être utilisée moyennant des technologies de conversion et de mobilisation du gisement adaptées.

Le tableau I résume l'état du gisement français (BRUNS et APPERT, 1983). Si une partie de cette biomasse est enfouie en tant que fumure organique, il existe un surplus entraînant parfois des pollutions. D'autre part, la majeure partie de ces gisements de matières organiques est souvent déjà concentrée sur le site d'utilisation, caractère favorable à leur revalorisation énergétique. Le choix de la filière de récupération d'énergie est soumise au degré d'hydratation et de biodégradabilité du déchet. Ces critères permettent l'orientation vers les différentes voies suivantes : combustion directe, gazéification et pyrolyse, synthèse du méthanol pour le matériel à faible teneur en eau, production d'alcool, fermentation méthanique pour les déchets dits humides.

L'étude menée ci-après consiste à revaloriser des résidus horticoles et urbains (racines d'endives, feuilles de choux, gazon, lentilles d'eau) afin d'éliminer la pollution dont ils sont responsables et créer une source d'énergie utilisable directement sur place. En fonction de ces exigences et du degré d'humidité (les résidus végétaux possèdent environ 80% d'eau), la filière choisie est une bioconversion microbiologique. Des considérations d'ordre économique et technique ont permis de sélectionner la fermentation méthanique qui permet la récupération d'énergie sous forme d'un gaz qui se sépare spontanément du milieu de fermentation.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

-

* I.- L A M E T H A N O G E N E S E *

-

I.1.- PRESENTATION GENERALE

I.1.1.- Historique

Dès le XVIIème siècle, VAN HELMONT mentionne un gaz inflammable résultant de la décomposition de la matière organique dans les "conduits intestinaux". Peu après, en 1667, SHIRLEY découvre le "gaz des marais" aux caractéristiques similaires. Par la suite, le méthane apparaît sous le nom de formène dans les travaux de VOLTA et DALTON. Ce dernier essaiera d'établir la première formulation chimique en 1804. Bien que les propriétés de ce gaz aient été connues depuis fort longtemps, en Perse par exemple où les Zoroastriens en avaient un usage domestique, il semble que la première mention de son utilisation en tant que source d'énergie soit due à Ulysse GAYON, élève de PASTEUR, en 1884. Celui-ci proposait l'alimentation en carburant de véhicules utilitaires par décomposition du fumier de cheval ; ce projet n'eut cependant pas de suite.

Durant la première moitié du XXème siècle, divers systèmes de production de méthane furent mis au point d'une manière souvent empirique, tels les procédés de DUCELLIER et ISMAN vers 1940.

Pendant ces dix dernières années, l'intérêt énergétique de la digestion anaérobie a suscité une vague d'enthousiasme trouvant son origine et exacerbée par la crise des carburants fossiles.

Actuellement, le procédé est surtout appliqué en vue de dépollution (lisier de porcs, effluents d'I.A.A., boues de stations d'épuration urbaines) mais peu de travaux existent à propos de la méthanisation de matières cellulosiques. Les raisons en sont à la fois biologiques et techniques. Dans la première catégorie, on peut citer la

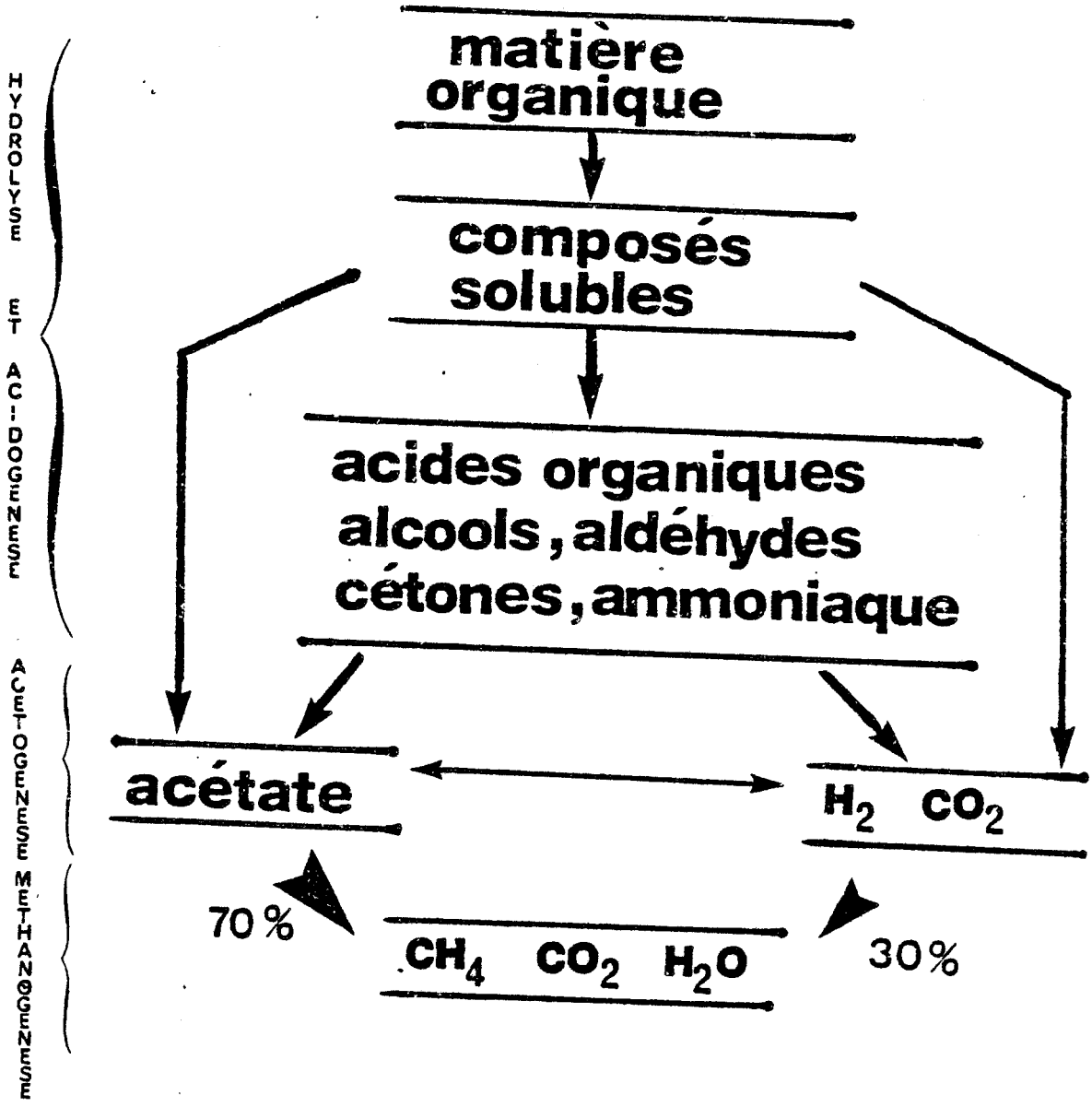


Figure I : Représentation schématique de la méthanisation dans les fermenteurs.

conversion incomplète matière-énergie responsable de la génération d'un résidu liquide polluant et la relative lenteur de la dégradation des glycanes (cellulose en particulier). Les obstacles d'ordre technique incluent le coût énergétique de la collecte et d'un éventuel pré-traitement, l'absence de technologies performantes, fiables et bon marché, et très souvent une mauvaise adéquation production/utilisation du biogaz.

I.1.2.- La fermentation méthanique

Le terme générique de méthanogenèse décrit un phénomène complexe de dégradation de la matière organique ayant, dans des conditions d'anaérobiose stricte, le méthane et le gaz carbonique comme métabolites finaux.

Ceci se produit dans trois écosystèmes (sources chaudes, rumen, sédiments pauvres en sulfates) différant essentiellement par les voies empruntées par le flux carbone (ZEHNDER et al., 1982) (Annexe I).

Dans les fermenteurs, le méthane généré provient pour 70% de l'acétate et pour 30% de la réduction du CO_2 par l'hydrogène (Figure 1). Le formate, le méthanol et les méthylamines ne sont que des substrats d'importance mineure.

L'équation globale de la réaction s'écrit :

$$C_x H_y O_z + (x - \frac{y}{4} - \frac{z}{2}) H_2O \rightarrow (\frac{x}{2} + \frac{y}{8} + \frac{z}{4}) CH_4 + 7(\frac{x}{2} - \frac{y}{8} + \frac{z}{4}) CO_2$$

Une population microbienne très diversifiée est nécessaire pour couvrir l'ensemble du processus.

On la subdivise généralement en quatre grands types (hydrolytiques et acidogènes, acétogènes productrices obligées d'hydrogène, méthanogènes hydrogénophiles, méthanogènes acétoclastes) associés aux trois principales étapes de la dégradation du substrat (Figure 1).

I.2.- HYDROLYSE ET ACIDOGENESE

A partir des polymères carbonés de la matière végétale, cette étape aboutit à des acides organiques, des composés neutres (ex. : éthanol), de l'ammoniac et au mélange gazeux H_2/CO_2.

Il s'agit d'une étape prépondérante lors de la digestion de solides. C'est souvent de sa vitesse de réalisation que va dépendre la vitesse de l'ensemble du processus.

I.2.1.- Nature générale des substrats

Les facteurs importants, du point de vue dégradation, sont d'une part le degré de polymérisation des composants du substrat, qui déterminera leur solubilité dans l'eau et donc la vitesse de la phase d'hydrolyse enzymatique, et d'autre part la présence de lignine. Cette dernière est une macromolécule hydrophobe provenant de la polymérisation tridimentionnelle de trois alcools phénylpropénoïques. Elle forme un réseau infini dont le degré de polymérisation n'est limité que par l'espace disponible ; elle est cependant réactive par ses fonctions phénoliques, hydroxyles et éthers.

La lignine n'est pas dégradée en anaérobiose. Seuls les produits de dégradation artificielle, de poids moléculaire inférieur à 300 n'ont pu être métabolisés par des anaérobies de sédiments lacustres (ZEIKUS et al., 1982). Cependant, des composés aromatiques comme l'acide benzoïque, sont dégradés en acétate et vraisemblablement en H_2/CO_2 et formate par un micro-organisme mobile, Gram négatif cultivé en association avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène (MONTFORT et BRYANT, 1982). Egalement susceptibles d'être assimilés, le pyrogallol, l'acide 1,4-tri hydroxybenzoïque, le phloroglucinol et l'acide gallique (SAMAIN, 1983) sont fermentés en acétate à raison de 3 et 1 mole(s) respectivement pour une mole de substrat. AKIN (1982) a testé l'influence des précurseurs de la lignine : si les acides sinapique et férulique n'ont que peu d'action sur la dégradation des parois cellulaires de Dactylis glomerata, l'acide p-coumarique est toxique pour les bactéries du rumen à 0,1%. HOLT et JONES (1983) attribuent la résistance à la dégradation anaérobie du bois de Pinus sylvestris, à la

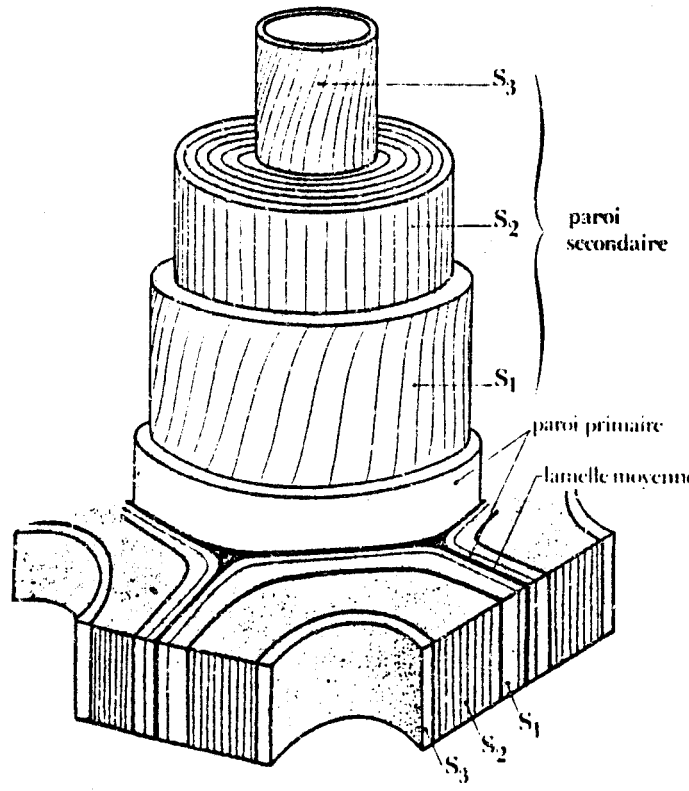


Figure 2 : Structure de la parois cellulaire en vue perspective.

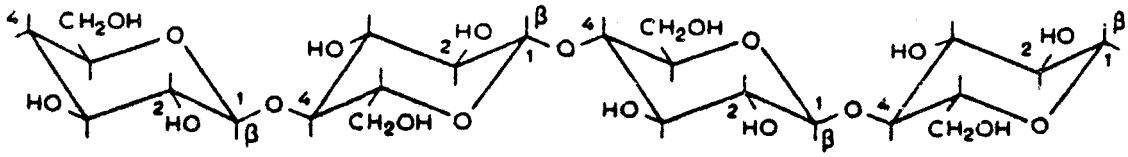


Figure 3 : La longue chaîne de cellulose est formée par la répétition régulière du motif fondamental dimère, le cellobiose, caractérisé par une liaison glycosidique entre deux maillons de D-glucose ayant la conformation chaise ^4C_I

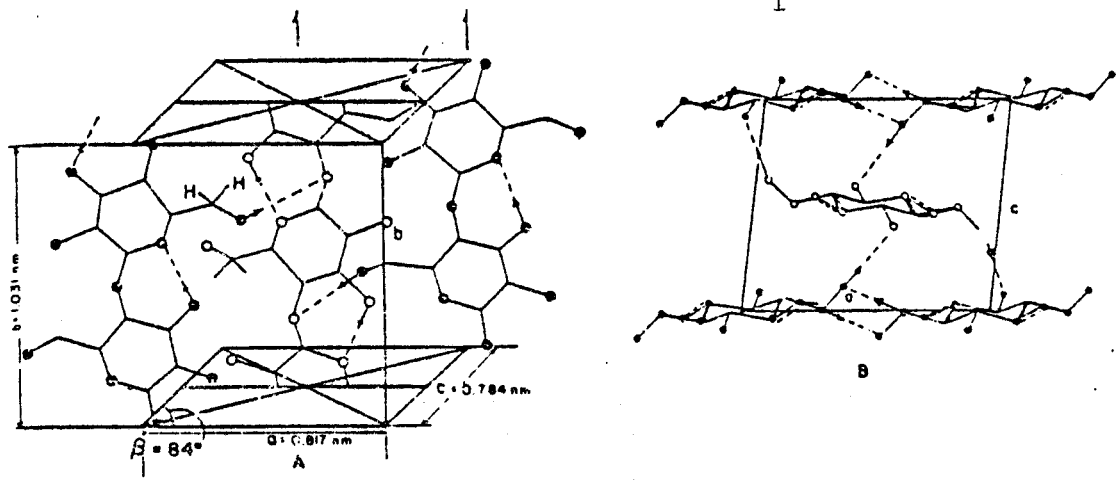


Figure 4 : A-Structure d'un cristal de cellulose
B-Agencement des liaisons hydrogènes entre les molécules de cellulo

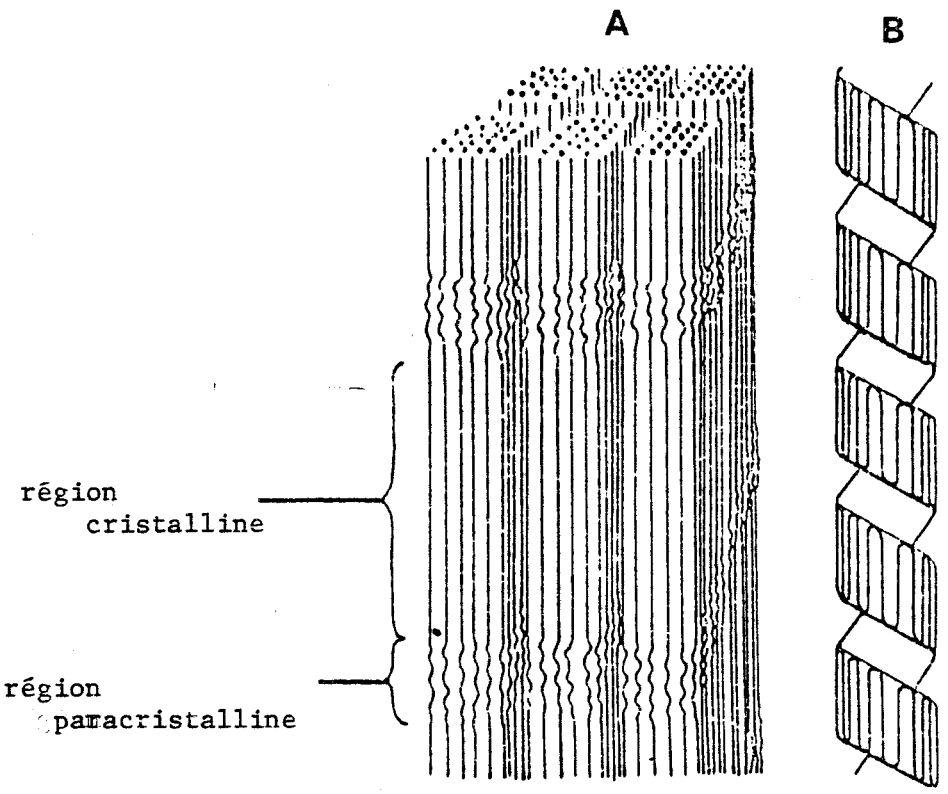


Figure 5 : A-Les molécules de cellulose moins bien ordonnées en certains points de la microfibrille constituent régions amorphes

B-Les molécules de cellulose peuvent exister sous forme de ruban hélicoïdal.

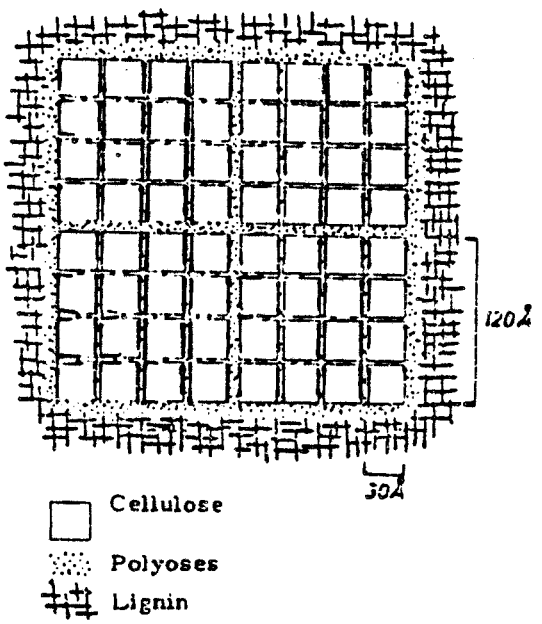


Figure 6 : Fibrilles de cellulose inclues dans une matrice de polysaccharides et de lignine.

Modèle d'organisation ultrastructurale des parois cellulaires du bois.

présence de lignine et de résine. D'une manière générale, le degré de dégradation des tissus végétaux est directement relié à la teneur en lignine (SHARER et MOO YOUNG, 1979).

I.2.1.1.- Structures rencontrées

Contrairement aux cellules nues des animaux, les cellules végétales possèdent une paroi de nature glucidique pour sa plus grande part. On distingue trois régions principales (Figure 2) :

* la lamelle moyenne, constituée de polysaccharides acides : les pectines

* la paroi primaire, hydrophile, riche en hémicelluloses avec une faible proportion de cellulose amorphe

* la paroi secondaire, peu hydratée et constituée de cellulose très cristalline.

Il est à signaler que l'architecture fibrillaire de certaines parois n'est pas constituée de cellulose mais d'hémicelluloses, notamment chez les cellules qui stockent les polysaccharides de réserve (amidon, inuline).

I.2.1.2.- Composition chimique

I.2.1.2.1.- Les polysaccharides de structure

* La cellulose :

C'est le polymère naturel le plus important en tant que réservoir d'énergie solaire, avec 20 à 40% du poids sec végétal (VAN SOEST, 1979). D'après RYU (1980), la quantité approximative de carbone fixé par photosynthèse sous forme de cellulose est estimée à 50 milliards de tonnes par an.

Il s'agit d'un polymère saccharidique linéaire de molécules d'anhydroglucose liées en ß(1-4) (Figure 3).

Une structure secondaire est assurée par les groupements OH situés en position équatoriale ce qui permet des liaisons hydrogène entre les différentes chaînes (Figure 4). La part de la structure cristalline ainsi formée par rapport à la structure amorphe (Figure 5) varie selon les différents types de celluloses. A l'état naturel, les fibrilles cellulosiques sont généralement inclues dans une matrice d'hémicellulose et de lignine (LEE et FAN, 1980) (Figure 6).

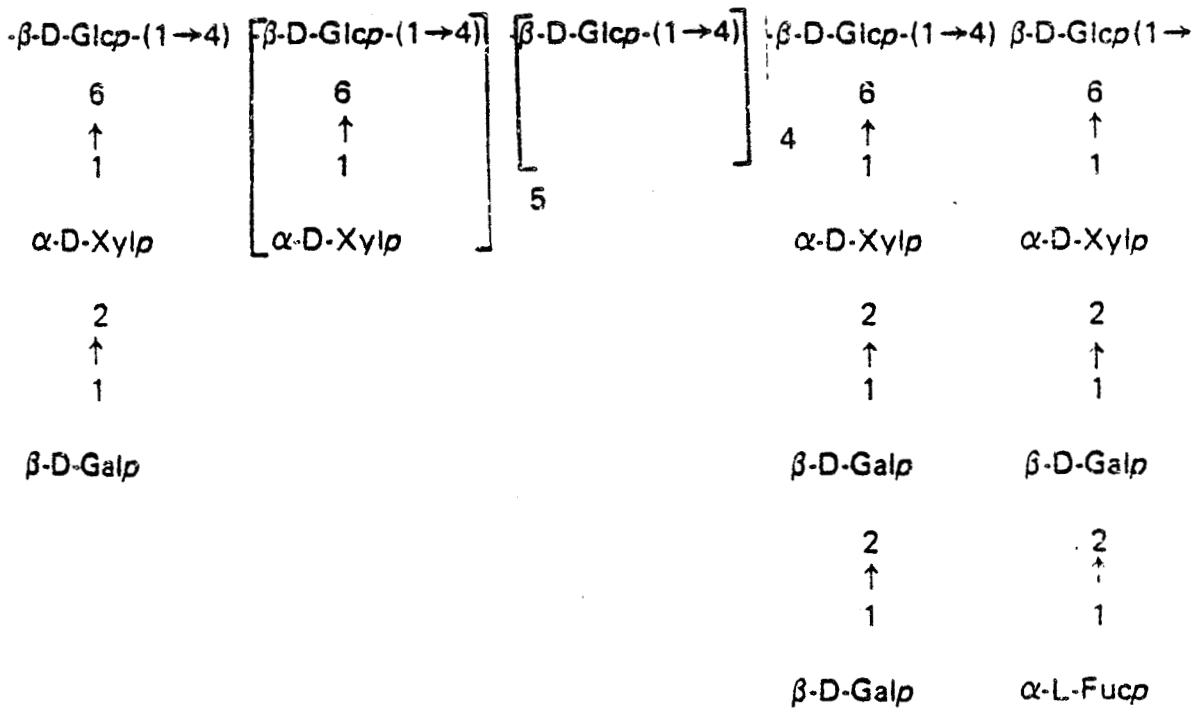


Figure 7 – Représentation schématique de la « xyloglucane » du tissu cambial de *Populus tremuloides* et de *Tilia americana* (d'après T.E. Timell, (1978), *Cell. Chem. Technol.* 12, 51-62).

* Les hémicelluloses (JOSELEAU, 1980) :

Autres constituants importants de la paroi, pouvant atteindre 40% de la biomasse végétale (GONG et al., 1977), les hémicelluloses forment un groupe extrêmement diversifié de polysaccharides.

En effet, ces polymères peuvent être constitués par l'enchaînement d'un ou de plusieurs sucres de la série D (xylose, galactose, mannose, glucose) ou L (arabinose, fucose, rhamnose) ainsi que d'acides uroniques (Figure 7). On distingue ainsi les homopolysaccharides, plus rarement représentés que les hétéropolysaccharides, et qui appartiennent aux groupes des xylanes et mannanes. Les liaisons sont en majorité ß(1-4) (Tableau II) mais les hémicelluloses contenant du galactose peuvent être liées en ß(1-3)(WHISTLER et RICHARDS, 1970). La caractéristique principale est une grande variabilité en fonction de l'origine végétale et de la localisation cytologique (Tableau III).

* Les substances pectiques (THIBAULT, 1980) :

Les pectines sont les principaux constituants de la lamelle moyenne, ciment joignant deux cellules adjacentes. Ces substances ont pour base commune une chaîne d'acides galacturoniques liés en α(1-4) (Figure 8) formant l'acide pectique. Différentes variantes dérivent de ce "squelette" (Tableau IV). Les fonctions acides peuvent être neutralisées par divers ions (K^+, Na^+, Ca^{++}) ou estérifiées par du méthanol. La présence de maillons rhamnose liés en (1-4) ou (2-1) provoque des déviations de 90° sur la chaîne principale. Il existe également des chaînes latérales osidiques dont dépendent le poids moléculaire et la solubilité des pectines dans l'eau. Leurs principales caractéristiques résident dans les propriétés gélifiantes. Les conditions de formation d'un réseau moléculaire tridimensionnel sont fonction du degré de méthylation.

I.2.1.2.2.- Les substances de réserves

* L'amidon (Figure 9) :

Il s'agit de la substance de réserve la plus importante en quantité du règne végétal. Très peu soluble dans l'eau, il se présente sous forme de grains organisés en couches superposées résultant d'une "cohésion covalente" radiale et d'une "cohésion hydrogène" qui lui est perpendiculaire. Lors de l'hydrolyse qui s'attaque aux liaisons

TABLEAU II

Différents groupes d'hémicelluloses présents dans les parois cellulaires végétales

Groupe	Hémicellulose	Type des liaisons dans la chaîne principale
Xylane		$\beta(1 \rightarrow 4)$
	Arabinoxylanes	
	4-O-méthyl-glucuronoxylanes	
	Arabino 4-O-méthylglucuronoxylanes	
	Galactoarabinoxylanes	
	Hétéro xylanes complexes	
Mannanes		$\beta(1 \rightarrow 4)$
	Galactomannanes	
	Glucomannanes	
	Galactoglucomannanes	
Galactanes		$\beta(1 \rightarrow 4)$
	Galactanes acides	$\beta(1 \rightarrow 4)$ $\beta(1 \rightarrow 6)$
Arabino galactanes		$\beta(1 \rightarrow 3)$ $\beta(1 \rightarrow 6)$
	Glucuronoarabinogalactanes	
Glucanes		$\beta(1 \rightarrow 3)$ $\beta(1 \rightarrow 4)$

TABLEAU III

Distribution des polysaccharides dans les différentes couches des parois de fibres (d'après H. Meier (1961),

Origine	Polysaccharide	M + P ([1])	S_1	S_2 (partie externe)
Bouleau				
	Galactane	16,9	1,2	0,7
	Cellulose	41,4	49,8	48,0
	Glucomannane	3,1	2,8	2,1
	Arabinane	13,4	1,9	1,5
	Glucuronoxylane	25,2	44,1	47,7
Pin				
	Galactane	20,1	5.2	1,6
	Cellulose	35,5	61,5	66,5
	Glucomannane	7,7	16,9	24,6
	Arabinane	29,4	0,6	0,0
	Glucurono arabino-xylane	7,3	15,7	7,4

([1]) Lamelle mitoyenne (M) et paroi primaire (P) contiennent en plus une proportion élevée de polysaccharides pectiques.

TABLEAU IV

Oses neutres libérés par hydrolyse acide de pectines purifiées

Source	AAG[a] %	Arabinose	Galactose	Rhamnose	Xylose
Orange	92,1	+	+	+	0
Pamplemousse	91,7	+	+	+	0
Citron	90,4	+	+	+	0
Carotte	76,7	+	+	+	0
Pomme	88,0	+	+	+	+
Pêche	86,8	+	+	+	+
Abricot	83,1	+	+	+	+
Poire	82,6	+	+	+	+
Betterave	82,3	+	+	+	+
Avocat	79,0	+	+	+	+

a) Teneur en acide anhydrogalacturonique (AAG).

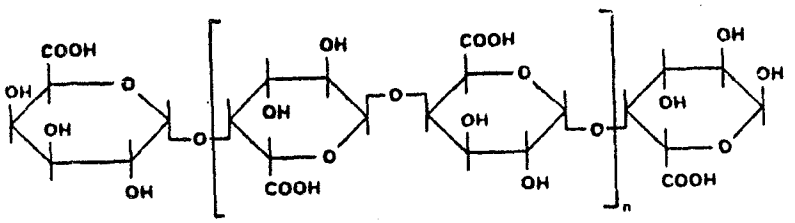
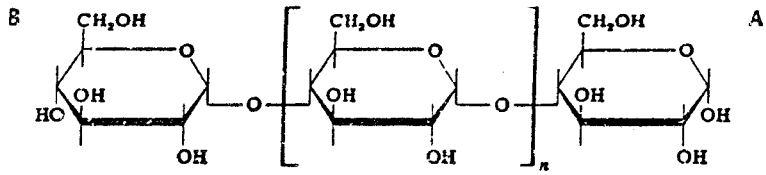
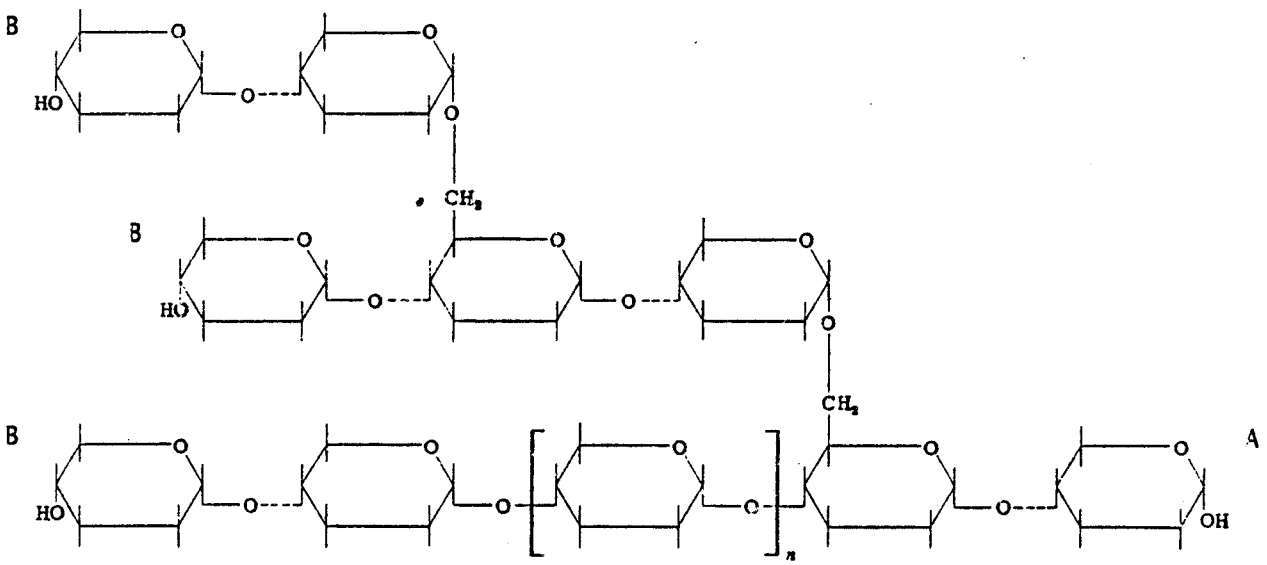


Figure 8 — Structure de l'acide polygalacturonique.



Amylose



Amylopectine

Figure 9 : Structure chimique de l'amylose et de l'amylopectine, composants de l'amidon.

A : extrémité réductrice; B : extrémité non réductrice

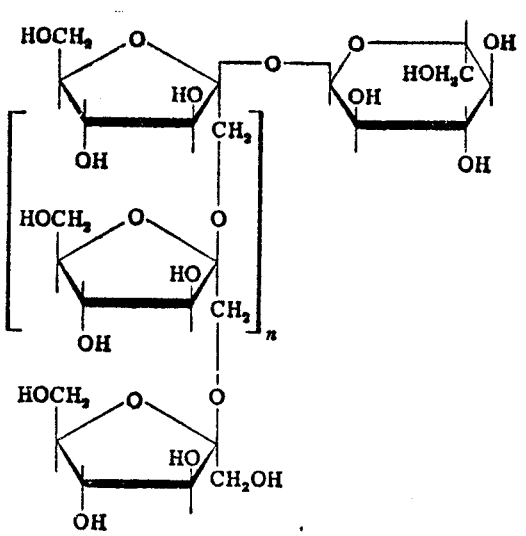


Figure IO : Structure chimique de l'inuline

covalentes, des couches concentriques de densités variables, amorphes ou cristallines se dégagent, révélant une structure compacte et dense (1,6 g/cm^3). Sa structure moléculaire hétérogène se subdivise en deux fractions : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est un polymère linéaire de résidus D-anhydropyranose liés en α (1-4). L'amylopectine, macromolécule ramifiée est formée d'amylose sur laquelle sont branchés des chaînons de D-anhydroglucopyranose en α (1-6).

Dans la plante, on le rencontre dans tous les tissus. Il s'accumule de façon transitoire dans les thylacoïdes des chloroplastes et dans les chromoplastes, et de façon prolongée dans les amyloplastes des organes de réserve (tiges, racines, tubercules, bulbes, diaspores) (DURAT et al., 1981).

* L'inuline (Figure 10) :

Du groupe des fructanes, elle est commune surtout chez les Asteracae, famille de la chicorée qui nous intéresse plus particulièrement. Du point de vue moléculaire, c'est un polymère de résidus de D-fructofuranose liés en ß(2-1) (ASPINALL, 1970) très facilement hydrolysable en milieu acide faible.

I.2.2.- Microbiologie des bactéries hydrolytiques et fermentatives

On distingue essentiellement les micro-organismes capables d'hydrolyser et de transformer les polymères, et ceux dont le rôle est uniquement fermentatif, qui eux, ne peuvent assimiler que les oses ou les oligosides (Voies métaboliques - Annexe II).

I.2.2.1.- Micro-organismes hydrolytiques

Taxonomiquement très variés, ils peuvent être Eucaryotes ou Procaryotes, anaérobies strictes ou non. Le tableau V répertorie les principales bactéries anaérobies qui peuvent être impliquées.

* Bactéries cellulolytiques :

La presque totalité des cellulolytiques anaérobies a été isolée du rumen après la mise au point d'une méthode adaptée à la culture des bactéries extrêmement sensibles à l'action de l'oxygène par HUNGATE en

TABLEAU V : Métabolites produites par des cultures pures de quelques bactéries anaérobies lors de la fermentation de cellulose, hémicellulose et pectine

Organismes	Origine	Substrat	Produits	Température**
Bacteroïdes succinogenes	Rumen	Cellulose	F, A, S*	M
Bacteroïdes fibrisolvens	Rumen	Cellulose	F, L, H_2, CO_2	M
		Hémicellulose	F, B, L, H_2, CO_2	
		Pectine	F, A, B, L, M, H_2, CO_2	
Bacteroïdes ruminicola	Rumen	Hémicellulose	F, A, P, S	M
		Pectine	F, A, P, B, L, S	
Ruminococcus flavefasciens	Rumen	Cellulose	F, A, S, H_2, CO_2	M
Ruminococcus albus	Rumen	Cellulose	E, A, B, S, P, H_2, CO_2	M
		Hémicellulose		
Streptococcus bovis	Rumen	Pectine	M, A, E, L ,B	M
		Amidon		
Lachnospina multiparus	Rumen	Pectine	F, A, L, N, E, H_2, CO_2	M
Acetovibrio cellulolyticus	Digesteurs	Cellulose	A, E, H_2, CO_2	M
Clostridium papyrisolvens	Sédiments marins	Cellulose	F, A, L, E	M
Clostridium butyricum	Déchets de bois	Pectine	A, P, B, M, E, IP	M
Clostridium cellobioparum	Sédiments	Cellulose	A, L, E, H_2, CO_2	M
Clostridium thermocellum	Digesteurs	Cellulose	A, E, H_2, CO_2	T
Clostridium thermohydrosulfuricum	Sources chaudes	Pectine	L, E, A, H_2, CO_2	T
		Amidon		

* F : Formate
A : Acétate
B : Butyrate
P : Propionate
L : Lactate
S : Succinate
E : Ethanol
M : Méthanol
IP : Isopropanol

** M : Mésophile
T : Thermophile

1950. Celui-ci a, en particulier, isolé une des bactéries les plus importantes par son activité cellulolytique : Bacteroïdes succinogenes, étudiée ensuite par de nombreux auteurs (STEWART et al., 1981 ; BRYANT et DOETSCH, 1954). Butyvibrio fibrisolvens, moins performant en cellulolyse, fermente un grand spectre de substrats (cellulose, hémicellulose, pectine) et est, de ce fait, extrêmement fréquent (BRYANT et SMALL, 1956). En dehors de ces bâtonnets Gram négatif asporulés, les autres espèces couramment isolées sont en majorité des coccis Gram négatif asporulés tels que Ruminococcus flavefasciens et Ruminococcus albus (HUNGATE, 1950 & 1957). Dans le rumen, les bâtonnets Gram positif du genre Clostridium sont probablement d'importance mineure. De même, dans les digesteurs mésophiles, ils ne représentent que 16 à 20% de la population anaérobie stricte totale (IANNOTTI et al., 1982). Par contre, seuls des représentants de ce genre ont été isolés en thermophilie : Clostridium thermocellum (Mc BEE, 1950 ; LEE et BLACKBURN, 1975), Clostridium stercoarium (MADDEN, 1983), Clostridium thermolacticum ainsi que d'autres Clostridia sp. taxonomiquement en cours de détermination au laboratoire (LE RUYET, 1984). Ceci est peut-être imputable aux techniques d'enrichissement au cours desquelles ont lieu des acidifications successives, sélectionnant d'une façon préférentielle les formes sporulées. Peu d'espèces sont cependant connues eu égard à l'importante population impliquée dans cette étape.

* Bactéries hémicellulolytiques :

La plupart des espèces isolées du rumen sont également capables d'hydrolyser la cellulose. Ce sont principalement des bâtonnets et coccis asporulés Gram négatif tels que Ruminococcus flavefasciens et Ruminococcus albus (DEHORITY, 1967), Butyrivibrio fibrisolvens (BRYANT et SMALL, 1956), Bacteroïdes ruminicola (DEHORITY, 1966). Ce dernier a également été isolé d'un digesteur (HOBSON et SHAW, 1974). En thermophilie, il n'existe aucune étude particulière à propos des capacités hémicellulolytiques d'anaérobies strictes. Clostridium stercoarium possède une xylanase et fermente le xylose (MADDEN, 1983),

TABLEAU VI : Exemples de bactéries acidogènes isolées dans les écosystèmes méthanogènes, d'après PETROFF (1983)

TYPE DE FERMENTATION	GENRES OU ESPECES CARACTERISTIQUES DE LA FERMENTATION
Lactique	Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Bifidobacterium, Sporolactobacillus
Propionique	
- via acrylate	Clostridium propionicum, Peptostreptococcus elsdenii
- via succinate	Propionibacteriaceae
Mixte	Entérobactéries
Butanédiolique	Enterobacter
	Serratia
Butyrique	Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium, Butyrivibrio
	C. pasteurianum, C. kluyveri, C. butyricum
	C. thermosaccharolyticum

à l'inverse de Clostridium thermocellum incapable d'utiliser les pentoses, mais pouvant cependant hydrolyser le xylane (GARCIA-MARTINEZ et al., 1980).

* Autres bactéries glycanolytiques :

Bacteroïdes ruminocola et Bacteroïdes fibrisolvens hydrolysent la pectine ainsi que Bacteroïdes succinogenes. LUND et BROCKLE HURST (1978) ont également isolé du sol un Clostridia sp. pectinolytique. L'amidon peut être hydrolysé par certaines espèces du rumen telles que Selenomonas ruminantium, Succinomonas amylolytica, Bacteroïdes ruminicola (HUNGATE, 1960). Bacteroïdes amylophilus semble posséder des aptitudes particulières de fixation sur les grains d'amidon (HAMLIN et HUNGATE, 1956). La plupart des micro-organismes amylolytiques isolés des digesteurs sont des bâtonnets sporulés (TORIEN, 1967), des Bacteroïdes (IANNOTTI et al., 1982 ; HOBSON et SHAW, 1974) ou des Lactobacillus (NAKUMURA et CROWELL, 1979).

La plupart des bactéries hydrolytiques possèdent un optimum de croissance aux alentours de la neutralité (pH 7,2-7,4) (HUNGATE, 1966). La majorité d'entre elles, isolées du rumen, sont mésophiles. A ce propos, il est à noter la pauvreté des informations concernant la flore hydrolytique anaérobie des digesteurs en général et des thermophiles en particulier, bien que celle-ci corresponde à une population nombreuse de l'ordre de 10^9 bactéries par ml (MAH et SUSSMAN, 1967).

I.2.2.2.- Les bactéries acidogènes et leur métabolisme

Ces bactéries non hydrolytiques utilisent les substrats solubles provenant de la biomasse initiale ou résultant de l'action des bactéries hydrolytiques.

Le tableau VI répertorie la plupart des micro-organismes responsables de fermentations classiques du type lactique, propionique, butanediolyque ou butyrique.

D'une façon très schématique, les bactéries anaérobies fermentent les hexoses par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (Annexe II), et les pentoses par la voie de WARBURG-DICKENS (Annexe III) dont les bilans globaux sont respectivement de deux moles de pyruvate, 2 ATP, 2 NADH par moles d'hexose et de 5 moles de pyruvate, 3 NADH et 5 ATP pour 3 moles de pentoses fermentés.

Il existe conjointement des voies d'importance mineure telle celle des Bifidobacteria, de la phosphocétolase (bactéries hétérolactiques) et le cycle d'ENTNER-DOUDOROFF (Zimomonas mobilis).

La qualité du substrat est susceptible d'influencer les voies fermentatives. Ainsi, les pentoses induisent préférentiellement une fermentation hétérolactique chez les bactéries homolactiques sur hexose (ANDERSON et WOOD, 1969).

De même, la quantité de substrat disponible est susceptible de faire varier les bilans de fermentation. Par exemple, en sucres limitants, Bacteroïdes fragilis produit principalement du succinate avec accumulation de fumarate et malate, à la place de l'acétate et du propionate, métabolites principaux en substrat non limitant (CASPARI et MACY, 1983). D'autre part, la composition de l'atmosphère gazeuse peut également orienter les voies fermentatives de certaines anaérobies facultatives hétérolactiques qui, en l'absence d'oxygène, ne produisent plus d'acétate (BLICKSTAD, 1983). CASPARI et MACY (1983) remarquent une modification métabolique de B. fragilis vers une augmentation de la production de lactate sous une atmosphère dépourvue de CO_2.

Les bilans de fermentation varient également en fonction du stade physiologique de la bactérie (HSU et ORDAL, 1970) et de la phase de croissance (ANDREESEN et al., 1970).

Du point de vue conditions de croissance, certaines bactéries peuvent tolérer des pH plus acides que ceux exigés par le reste de la flore. Ceci est vrai en particulier pour les bactéries lactiques qui ont une croissance optimale à pH 6,0 mais qui conservent une activité métabolique jusqu'à pH 4,5 (ZOETEMEYER, 1982).

I.2.3.- Hydrolyse

I.2.3.1.- Les enzymes

I.2.3.1.1.- Les systèmes cellulasiques

On désigne sous ce nom l'ensemble des enzymes impliqués dans la dégradation de la cellulose en glucose bien que certains enzymes ne soient pas des cellulases au sens strict (ß glucosidase). Des travaux récents ont révélé des différences notables entre

cellulases fongiques et bactériennes. Parmi les champignons, les genres les plus étudiés à ce propos sont Trichoderma, Phanaerochaete, Penicillium et Fusarium. REESE et ses collaborateurs (1950) ont les premiers suggéré un mécanisme d'attaque de la cellulose à partir de deux fractions enzymatiques C_1 et C_x qui agiraient en synergie. Par la suite, RYU et MANDEL (1980) ont contribué à préciser le processus d'action cellulasique chez T. resei où trois principales enzymes sont associées :

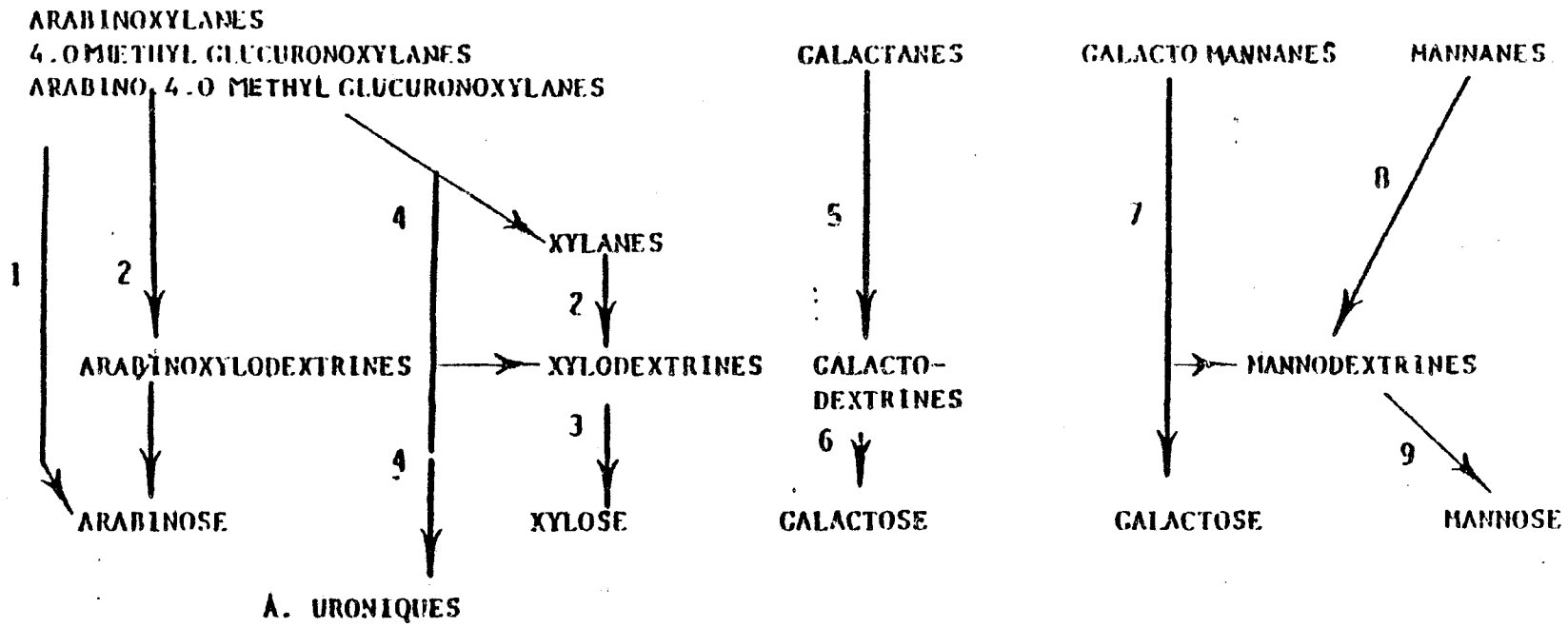
- l'endoglucanase (assimilée au complexe C_x) qui attaque les chaînes de cellulose de préférence dans les zones amorphes, réduisant ainsi le degré de polymérisation.

- la cellobiohydrolase (assimilée au complexe C_1) qui libère du cellobiose à partir des extrêmités non réductrices de la cellulose. Elle ne serait cependant opérationnelle qu'en présence du complexe C_x (SPREY et LAMBERT, 1983).

- la ß glucosidase n'est pas une cellulase mais elle est indispensable à leur action en éliminant du milieu le cellobiose inhibiteur de l'activité des cellulases chez les champignons. La synthèse des cellulases est induite par la cellulose, le maltose, le lactose (TRIVERDI et RAO, 1980) et le sophorose (STERNBERG et MANDEL, 1979). Les acides aminés, les bases purines et pyrimidiques ainsi que les ions métalliques stimulent l'induction (PATNI et al., 1975).

La différence essentielle du système cellulasique des Procaryotes réside dans le fait qu'ils ne possèdent que deux principales enzymes, l'endoglucanase et la glucosidase, l'activité exoglucanasique étant beaucoup plus faible que chez les champignons. Chez quelques espèces bactériennes, on détecte également une cellobiophosphorylase nécessaire comme transporteur des sucres dans la cellule. Autre particularité chez les bactéries : l'endoglucanase peut être à la fois exocellulaire et située dans l'espace périplasmique. WEIMER et ZEIKUS (1977) ont proposé un schéma du processus de dégradation :

Figure 11 : Dégradation enzymatique des hemicelluloses par les bactéeies du rumen.



1 : α L arabinofuranosidase

2 : endo. (1→4) β.D.xylanase

4 : α D glucosiduronidase

5 : Endo (1→4) β D galactanase

6 : β D galactosidase

7 : α D galactosidase

8 : endo (1→4) β D mannase

9 : β D mannosidase

cellulose

↓ endoglucanase extracellulaire

oligosaccharides longs (> 7 glucoses)

↓ endoglucanase périplasmique

oligosaccharides courts (< 7 glucoses)

↓ ß glucosidase périplasmique

cellobiose

↓ ß glucosidase périplasmique

glucose

I.2.3.1.2.- Les systèmes hémicellulasiques

Les hémicelluloses sont, de même que la cellulose, dépolymérisées dans un premier temps en dextrines (Figure 11).

Ce sont des glycanhydrolases qui dégradent spécifiquement les hémicelluloses mais elles sont souvent aptes à dégrader les courtes chaînes et monosaccharides branchés sur la chaîne principale (DEKKER et RICHARDS, 1976). Elles sont classées par spécificité de substrat, les principales étant la L-arabinase, la D-galactanase, la D-mannanase et la D-xylanase. Ne sont pas désignées sous ce nom les glycosidases du type ßD mannosidases ou ßD xylosidases qui hydrolysent les oligomères en sucres simples. On constate que le xylane commercial est mieux dégradé que l'hémicellulose des parois ce qui s'explique par le fait que l'hémicellulose est liée avec d'autres composés, notamment la lignine (HARTLEY, 1972 ; MORRISON, 1973). Aussi, les bactéries qui ne possèdent pas l'éventail d'enzymes nécessaires à la dégradation des composés phénoliques ont des difficultés à attaquer les hémicelluloses in situ. MORRIS et BACON (1977) présument que les groupements acétyl de l'hémicellulose affectent également sa digestibilité.

I.2.3.1.3.- Les amylases

L'amidon est dégradé par quatre types d'enzymes :

* l' α amylase coupe la molécule au niveau des liaisons α 1-4 spécifiquement, avec production de glucose, maltose et oligosaccharides ramifiés. Il est à noter que Ca^{++} et Co^{++} sont des activateurs puissants de cet enzyme.

* la ß amylase agit au niveau des unités maltose des extrêmités non réductrices de l'amylose ou de l'amylopectine.

* l'amyloglucosidase a une action similaire sur les unités glucose.

* des enzymes déramifiants hydrolysent les liaisons α 1-6 de l'amylopectine

Les oligosaccharides sont dégradés par l' α glucosidase (maltose).

I.2.3.2.- Facteurs affectant l'hydrolyse

La capacité des enzymes à dégrader un substrat cellulosique est fonction :

- du rapport entre la taille des complexes enzymatiques et l'espace entre les microfibrilles d'une part, et les molécules de cellulose des régions amorphes d'autre part
- du degré de polymérisation de la cellulose (Figure 5)
- de la conformation et rigidité stérique des unités d'anhydroglucose
- de la nature des composés associés (hémicellulose, lignine) (Figure 6)
- de la distribution et de la nature des groupements de substitution
- de l'organisation du matériel végétal (COWLING, 1975).

Parmi ces facteurs, le plus important semble être la présence de lignine, indégradable en anaérobiose, et intrinséquement liée à la cellulose dans les végétaux. Divers pré-traitements sont susceptibles d'augmenter la vitesse et le rendement de l'hydrolyse enzymatique : broyage, traitement par la chaleur, gonflement, dissolution, régénération (GHOSE, 1977).

Le processus de délignification chimique est opéré par réaction avec l'ammoniaque, l'urée, le polyéthylène glycol ; le procédé Masonite et Asplund utilise une haute pression de vapeur pour dissocier la lignocellulose (HOYT et GOHEEN, 1971). D'une manière générale, divers traitements permettent une meilleure dégradation du matériel lignocellulosique ; en l'occurence nous avons relevé : les traitements à la soude (TARKOW et FEIST, 1969 ; Mc DONALD et al., 1983), à l'ammoniaque (MILLETT et al., 1974), à l'acide (BOYER et REDMOND, 1983), les traitements à la vapeur (DALE et MOREIRA, 1982), les broyages (RYU et al., 1982), les irradiations (LILLEHOJ et HAN, 1983).

D'autre part, la diffusibilité des cellulases est une fonction linéaire de la porosité de la cellulose. Il a été montré que les cellulases fongiques sont de plus petit diamètre que les complexes enzymatiques bactériens (LEE et FAN, 1980), raison pour laquelle les capacités hydrolytiques des champignons seraient très supérieures à celles des bactéries anaérobies les plus performantes. LüTZEN et al. (1983) mentionnent d'ailleurs que la distance entre deux chaînes parallèles de glucanes est sensiblement du même ordre de grandeur que le diamètre de la plupart des cellulases fongiques. Il paraît également logique de supposer que le rapport endoglucanase/exoglucanase, accentue les différences de performance entre champignons et bactéries.

L'observation au microscope électronique ne montre pas de relation entre la fixation de bactéries du rumen sur les parois cellulaires et leur capacité à les dégrader (MORRIS et VAN GYLSWIK, 1980). L'érosion axiale des parois lignifiées paraît être une particularité de la dégradation anaérobie (HOLT et JONES, 1983), bien qu'un type d'attaque radiale en forme de cavité ait été décrit (SCHEFFER et al., 1969). Il semble cependant que cette dernière forme de dégradation soit due à une exposition, même très brève, au milieu aérobie. LATHAM et al. (1977) ont observé l'action d'une coculture de deux des plus importants micro-organismes cellulolytiques du rumen sur des feuilles de Lolium perenne. Ruminococcus flavefasciens prédomine sur les sections tranchées de l'épiderme, du phloème et du sclérenchyme alors que Bacteroïdes succinogenes colonise les sections tranchées ou non du mésophylle. Les zones de dégradation ont été observées sur les parois lignifiées du sclérenchyme mais non sur les vaisseaux du xylème.

I.2.4.- Réactions en retour

La synthèse d'acides gras volatils peut s'effectuer aussi à partir d'H_2/CO_2 (LEVY et al., 1981 ; GOLDBERG et COONEY, 1981) ou de méthanol (LETTINGA et al., 1981).

MACKIE et BRYANT (1981) ont déterminé que l'acétate ainsi formé dans un digesteur était de 1,3 à 2,0% et 3,0 à 5,5% des flux énergétiques respectivement en mésophilie et thermophilie.

ORGANISMES	METABOLITES	REFERENCES
Eubacterium limosum	acétate, butyrate	GENTHNER et al., 1981
Peptostreptococcus productus	acétate, succinate	LOROWITZ & BRYANT, 1983
Desulfobulbus propionicus	propionate	LAANBROEK et al., 1982
Acetobacterium woodii	acétate	BALCH et al., 1977
Clostridium thermoaceticum	acétate	KERBY et ZEIKUS, 1983
Acetobacterium wieringae	acétate	BRAUN et GOTTSCHALK, 1982
Acetobacterium kivui	acétate	LEIGH et al., 1981

TABLEAU VII : Bactéries catalysant les réactions en retour

TABLEAU VIII : Variation d'energie libre $\Delta G'_o$ des réactions de déshydrogènation des principaux produits dela phase d'hydrolyse-acidification.

Réactions	$\Delta G'_o$ en Kcal/mole
Lactate ⟶ acétate + $2H_2$ + CO_2	+ 1
Ethanol ⟶ acétate + $2H_2$	+ 2,3
Butyrate ⟶ 2 acétate + $2H_2$	+ 11,5
Propionate ⟶ acétate + $3H_2$ + CO_2	+ 18,2

La réaction de synthèse de l'acétate par réduction de CO_2 est décrite par :

$$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$$

Ce type de réactions et celles réalisées par les bactéries O.H.P.A. ne peuvent être exergoniques dans les mêmes conditions ; cependant, elles peuvent avoir lieu simultanément grâce aux variations de la pression partielle d'hydrogène au niveau de micro-environnements. Une dizaine de bactéries sont actuellement connues telles que Acetobacterium woodii (BALCH et al., 1977), Peptostreptococcus productus (LOROWITZ et BRYANT, 1983), Eubacterium limosum (GENTHNER et al., 1981) pouvant synthétiser des acides gras volatils à partir de composés monocarbonés. E. limosum a été isolé à la fois dans le rumen et les boues de digesteurs. Le tableau VII répertorie les différents organismes de ce type.

I.3.- ACETOGENESE

Si certains produits de la phase d'acidogenèse sont directement métabolisables par les méthanogènes (acétate + H_2/CO_2), d'autres tels que le butyrate ou le propionate et les AGLC nécessitent d'autres transformations pour être assimilables par ces bactéries. Or, environ la moitié de la DCO originelle est convertie en ces deux composés (KASPAR et WUHRMANN, 1978 ; Mc CARTY, 1964). Lors de l'acétogenèse, les composés organiques résultant de l'étape d'acidogenèse sont convertis en acétate par un groupe de micro-organismes particuliers : les bactéries O.H.P.A. (Obligatory Hydrogen Producting Acetogenic Bacteria).

I.3.1.- Métabolisme

Les réactions de conversion du lactate, éthanol, butyrate, propionate, valérate et AGLC en acétate sont endergoniques sous des conditions standards et donc, thermodynamiquement défavorables.

Le tableau VIII indique les variations d'énergie libre de Gibbs (Δ G'o) de ces réactions.

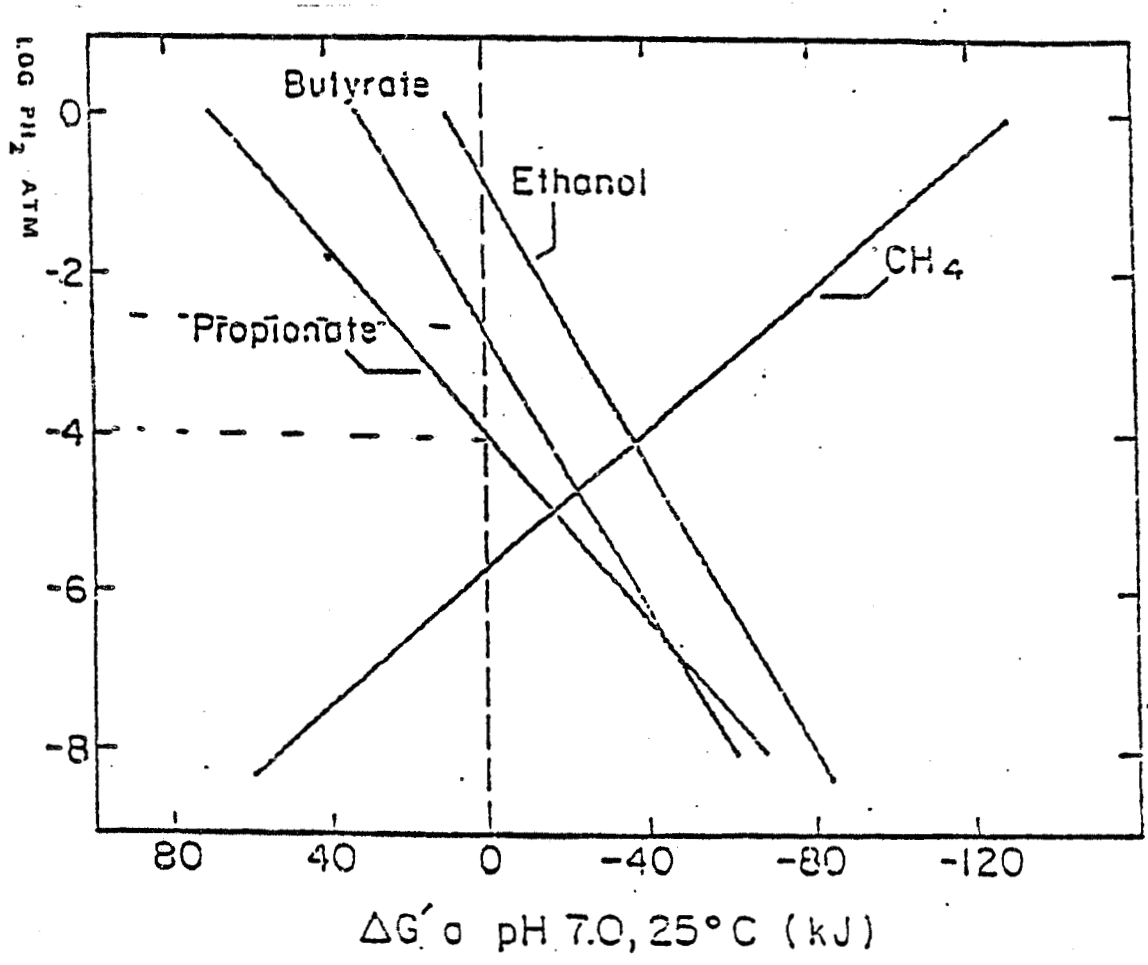


Figure I2 : Effet de la pression partielle d'hydrogène (PH_2) sur la variation d'energie libre G'o des réactions de dégradation de l'ethanol, butyrate, propionate enméthane.

Cependant, si on considère la variation d'énergie libre de ces réactions en fonction de la pression partielle d'hydrogène, elles deviennent réalisables pour des pH2 de l'ordre de 10^{-4}-10^{-5} atm.

Un exemple de l'influence du pH2 sur la valeur du Δ G'o des principales réactions d'acétogenèse ainsi que celle de réduction du CO_2 en méthane est représenté figure 12.

Les électrons produits durant les réactions de fermentation sont transférés aux pyridines nucléotides et servent à réduire les protons pour former de l'hydrogène moléculaire. Dans les digesteurs, la réalisation de ces réactions dépend donc essentiellement de l'élimination de l'hydrogène par les méthanogènes hydrogénophiles. Ce problème est résolu au laboratoire, soit par l'addition de bactéries sulfatoréductrices qui forment de l'H_2S à partir de sulfates, soit par des méthanogènes qui réduisent le CO_2 en CH_4. Remarquons qu'en l'absence de sulfate les bactéries sulfatoréductrices peuvent affecter l'oxydation du lactate et de l'éthanol en acétate en association avec des bactéries méthanogènes (BRYANT et al., 1977).

I.3.2.- Micro-organismes acétogènes

La première description du transfert d'hydrogène inter-espèce a été décrite par BRYANT et al. (1967). Ces auteurs ont montré que Methanobacterium omelianski considéré alors comme une bactérie méthanogène utilisant l'éthanol était en réalité une association de deux micro-organismes : une bactérie méthanogène (Methanobacterium bryantii MOH) et une bactérie non caractérisée taxonomiquement (organisme S) qui dégrade l'éthanol en acétate. D'autres associations décrites sont répertoriées dans le tableau IX parmi lesquelles les syntrophes Syntrophomonas wolfei qui oxyde les acides gras volatils à plus de 4 carbones, en association avec Methanospirillum hungatei (Mc INERNEY et al., 1979), et Syntrophobacter wolinii qui décarboxyle le propionate en coculture avec M. hungatei sans sulfate (BOONE et BRYANT, 1980).

ORGANISME PRODUCTEUR D'HYDROGENE	SUBSTRAT	METABOLITES DE LA MONOCULTURE	ORGANISME UTILISATEUR D'HYDROGENE	METABOLITES DE LA CULTURE MIXTE
Ruminococcus flavefasciens	Cellulose	acétate, formate, succinate, H_2, CO_2	Methanobacterium ruminantium	CH_4, acétate$^+$, succinate$^+$
Clostridium thermocellum	Cellulose	acétate, éthanol, formate, H_2, CO_2, butyrate, lactate	Methanobacterium thermoautotrophicum	CH_4, éthanol, acétate$^+$, CO_2, butyrate, lactate$^+$
Selenomonas ruminantium	Glucose	lactate, acétate, propionate	Methanobrevibacter smithii	acétate$^+$, éthanol, CH_4, formate
Clostridium cellobioparum	Glucose	acétate, formate, éthanol, H_2	Methanobrevibacter smithii	acétate$^+$, éthanol, CH_4, formate
Thermoanaerobium brockii	Glucose	acétate, éthanol, lactate, H_2	Methanobacterium thermoautotrophicum	acétate$^+$, éthanol, CH_4, lactate
Anaeroplasma sp.	Glucose	butyrate, propionate	Methanoplasma elizabethii	acétate$^+$, propionate, CH_4, butyrate
Ruminococcus albus	Glucose	acétate, éthanol, H_2, CO_2	Vibrio succinogenes	acétate$^+$, succinate, CO_2
Acetobacterium woodii	Fructose	acétate	Methanobrevibacter arboriphilus AZ	acétate$^-$, CH_4
ORGANISME S	Ethanol	acétate, H_2	Methanobrevibacter bryantii	acétate$^+$, CH_4
ORGANISME S	Pyruvate	éthanol, acétate, H_2	Methanobrevibacter smithii	acétate$^+$, CH_4
Desulfovibrio desulfuricans	Lactate	-	Methanobrevibacter bryantii	acétate$^+$, CH_4
Desulfovibrio vulgaris	Lactate	-	Methanosarcina barkeri	CH_4, CO_2
Anaerovibrio lipolytica	Lactate	acétate, propionate, H_2	Methanobacterium ruminantium	acétate$^+$, propionate$^+$, CH_4
Syntrophomonas wolfei	Butyrate	-	Methanospirillum hungatei	acétate, CH_4
Syntrophomonas wolinii	Propionate	-	Desulfovibrio sp. + sulfate	acétate, H_2S
Syntrophomonas wolinii	Propionate	-	Desulfovibrio sp. + Methanospirillum hungatei	acétate, CH_4

TABLEAU IX : Exemples de transferts d'hydrogène interespèces

I.4.- METHANOGENESE

Les bactéries méthanogènes croissent sur des substrats en nombre limité : formate, méthanol, méthylamines, H_2/CO_2, acétate. Ces deux derniers sont les principaux intermédiaires métaboliques lors de la dégradation des matières organiques. En fonction de leur substrat de croissance les méthanogènes sont subdivisées en bactéries hydrogénophiles ou acétoclastes.

I.4.1.- Microbiologie

Les bactéries méthanogènes (Tableau X), halophiles et thermo-acidophiles possèdent certaines caractéristiques communes qui les distinguent des Eubactéries et qui ont conduit WOESE à les ranger dans le règne des Archaebactéries :

- absence de peptidoglycanes ou muréine dans la paroi (KANDLER, 1982)
- présence d'ARN polymérases différant des Eubactéries par leur complexité et leur composition en sous-unités (ZILLIG et al., 1982 ; STETTER et ZILLIG, 1980)
- les lipides des Archaebactéries se distinguent par une absence d'esters d'acides gras et de glycérol et une prédominance de lipides insaponifiables (LANGWORTHY et al., 1982).

Les bactéries méthanogènes possèdent en outre des caractéristiques propres qui en font un groupe phylogénique cohérent malgré la diversité de leur morphologie (BALCH, 1982) :

- la présence de coenzymes (coenzyme M) et de co-facteurs spécifiques (F 430, F 420, F 342, YFC, FA ...)(VOGELS et al., 1982)
- des tRNA particuliers (GUPTA et WOESE, 1981)
- des séquences particulières d'ARN ribosomal 16 S (FOX et al., 1980 ; MATHESON et YAGUCHI, 1982).

BALCH et al. (1979) se basent sur la structure de l'ARN 16 S pour subdiviser la seule famille des Methanobacteriacae définie par BARKER en 1956, en trois ordres, quatre familles, sept genres et treize

TABLEAU X : BACTERIES METHANOGENES ET LEURS SUBSTRATS

ESPECES	SUBSTRATS
Methanobacterium formicicum	H_2-CO_2, formate
bryantii	H_2-CO_2
bryantii s. MoHG	H_2-CO_2
thermoautotrophicum	H_2-CO_2
Methanobrevibacter ruminantium	H_2-CO_2, formate
arboriphilus	H_2-CO_2
arboriphilus s. AZ	H_2-CO_2
arboriphilus s. DC	H_2-CO_2
smithii	H_2-CO_2, formate
Methanothermus fervidus	H_2-CO_2
Methanococcus vanielii	H_2-CO_2, formate
voltae	H_2-CO_2, formate
thermolithotrophicus	H_2-CO_2, formate
maripaludis JJ	H_2-CO_2, formate
deltae	H_2-CO_2, formate
jannaschii	H_2-CO_2
mazei	Acétate, méthanol, méthylamines
Methanomicrobium mobile	H_2-CO_2, formate
Methanogenium cariaci	H_2-CO_2, formate
marisnigri	H_2-CO_2, formate
talii	H_2-CO_2, formate
thermophilicum	H_2-CO_2, formate
olentangyi	H_2-CO_2
Methanospirillum hungatei	H_2-CO_2, formate
hungatei s. GP_1	H_2-CO_2, formate
Methanosarcina barkeri	H_2-CO_2, méthanol, méthylamines, acétate
barkeri s. 227	H_2-CO_2, méthanol, méthylamines, acétate
barkeri s. W	H_2-CO_2, méthanol, méthylamines, acétate
barkeri s. UBS	H_2-CO_2, méthanol, méthylamines, acétate
barkeri s. Z	H_2-CO_2, méthanol, méthylamines, acétate
TM_1	Méthanol, méthylamines, acétate
mazei MC 3	Méthanol, méthylamines, acétate
mazei S 6	Méthanol, méthylamines, acétate
CHTI 55	Méthanol, méthylamines, acétate
acetivorans	Méthanol, méthylamines, acétate, H_2-CO_2, form.
vacuolata	Acétate, méthanol, méthylamines, H_2-CO_2
Methanothrix soehngenii	Acétate
Methanoplanus limicola	H_2-CO_2, formate
Methanococcoides methylutens	Méthanol, méthylamines

espèces. Depuis, six espèces ont été isolées. Ces 19 espèces sont répertoriées dans le tableau X avec leurs caractéristiques métaboliques.

Ce sont essentiellement des chemolithotrophes dont la plupart utilisent l'H_2/CO_2 et le formate. Seules quatre espèces décarboxylent l'acétate. Parmi celles-ci Methanosarcina TM 1, Methanothrix soehngenii et Methanococcus mazei n'utilisent pas l'hydrogène bien que de faibles croissances de Methanococcus mazei MC 3 soient décrites sur H_2/CO_2 (TOUZEL et ALBAGNAC, 1982). On notera également que Methanosarcina barkeri métabolise tous les substrats connus excepté le formate.

Le temps de doublement de ces bactéries varie de quelques heures à plusieurs jours.

Du point de vue conditions de croissance, les méthanogènes sont des anaérobies strictes extrêmement sensibles à l'action de l'oxygène. Le pH doit être voisin de la neutralité ; ZEHNDER et al. (1982) signalent un pH optimum entre 6 et 8.

Si la plupart des bactéries méthanogènes sont des mésophiles, des thermophiles peuvent cependant utiliser H_2/CO_2 à plus de 40°C.

Parmi les acétoclastes, seules une Methanosarcina souche CHTI 55 (TOUZEL et al., 1984), et un Methanothrix (ZINDER et al., 1984) partiellement purifié montrent un optimum de croissance à 55 et 60°C respectivement.

Bien que le milieu exclusivement minéral suffise à la croissance, la présence d'acides aminés, d'extrait de levure, de trypticase et d'oligo-éléments stimule la croissance.

I.4.2.- Métabolisme

Depuis le schéma proposé par BARKER en 1956 dans lequel la génération de méthane était basée sur un intermédiaire métabolique commun à partir d'acétate, méthanol et H_2/CO_2, la définition exacte des intermédiaires et transporteurs intervenants n'est que partiellement résolue actuellement.

Quelques coenzymes ont cependant été mis en évidence :

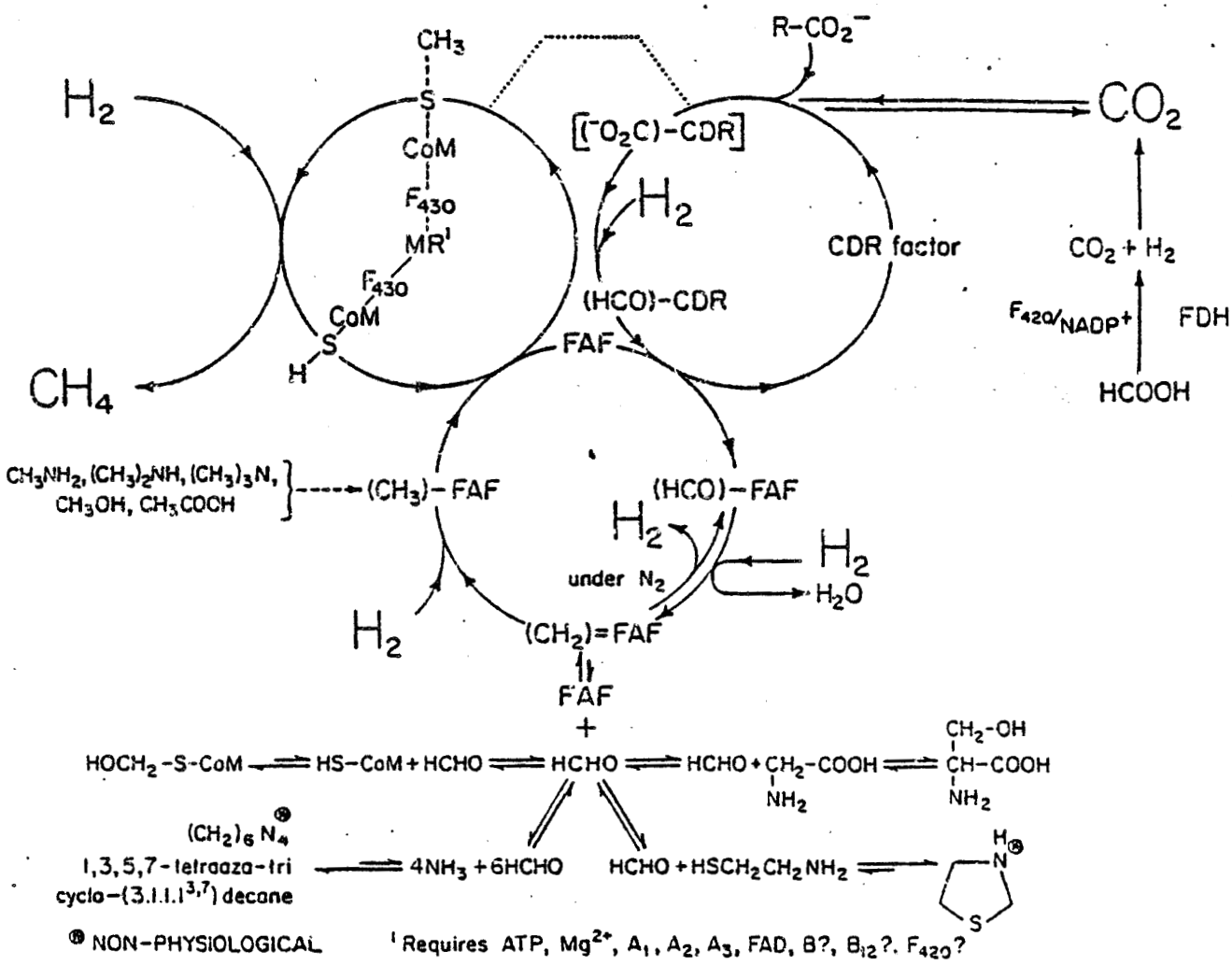


Figure I3 : Voies métaboliques de la méthanogénèse

- le coenzyme M ou acide 2-mercapto-éthane-sulfonique, isolé en 1971 par Mc BRIDE et WOLFE est présent chez toutes les espèces méthanogènes. Il est sans doute le précurseur direct du méthane sous sa forme méthylée et l'intermédiaire commun du schéma de BARKER

- le coenzyme F 420 est également présent chez toutes les bactéries méthanogènes connues. Il a été isolé en 1972 par CHEESMAN et al. et présente la particularité de fluorescer à l'état oxydé. Sa structure chimique le situe parmi les dérivés de la riboflavine. A ceux-là s'ajoutent le facteur CDR ("Carbon Dioxyde Reduction") (ROMESSER et WOLFE, 1982), la méthanoptérine (KELTJENS et al., 1983) et le FAF ("Formaldehyde Activing Factor") (ESCALANTE-SEMERANA, 1983).

- le F 430, isolé par GUNSALUS et WOLFE (1978) présente une structure tétrapyrrole contenant Ni associé au CoM.

* Méthanogenèse à partir d'H_2/CO_2

Dans le plus récent schéma proposé (ESCALANTE-SEMERANA et al., 1984) (Figure 13) le CO_2 est tout d'abord fixé à un transporteur (CDR) puis réduit. Le groupement formyl résultant est pris en charge par un nouveau transporteur (FAF) et subit deux réductions successives pour donner la forme méthyl. La dernière étape consiste en une transméthylation avec HS-Coenzyme M, suivie de la formation de méthane par réduction de CH_3-S-CoM.

* Méthanogenèse à partir de composés méthylés

Substrat méthanogène important, notamment dans les sédiments lacustres, l'acétate a la particularité d'être bicarboné. STADMAN et BARKER (1949) ont déterminé par marquage radioactif que le groupement méthyl était transféré presque intégralement intact dans le méthane, le groupement carboxyl étant converti en CO_2 selon l'équation suivante :

$$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- \quad (-7{,}3 \text{ kcal/mole } CH_4)$$

Dans le schéma précédemment proposé, l'acétate est supposé entrer dans le cycle au niveau de la formation du CH_3-FAF mais on ne dispose actuellement d'aucun renseignement concernant les étapes intermédiaires.

	θ	Ks (Cte d'affinité) moles/l	Temps de doublement h	Prod. de cellules g/mole CH_4	Vitesse de product. de CH_4 mmol/h/g cellules
* A partir de l'acétate :					
Methanosarcina MST-A1	55°C	21.10^{-3}	9.3	-	-
Methanosarcina barkeri 227	36°C	5.10^{-3}	23-35	1,8 2,7	1,4 à $8,5.10^{-3}$
Methanococcus mazei MC 3	35°C	$1,3.10^{-3}$	35.3	-	-
Methanothrix soehngenii	33°C	$0,5.10^{-3}$	230	1,4	$1,6.10^{-3}$
Methanosarcina TM 1	50°C	5.10^{-3}	12	-	-
Methanosarcina CHTI 55	55°C	$7,5.10^{-3}$	7.6	1,4	-
* A partir de l'hydrogène :					
Methanobrevibacter arbophilus	33°C	5.10^{-6}	12-58*	2,4	30.10^{-3}
Methanosarcina barkeri 227	36°C	-	-	6,4	-
Methanobacterium thermoautotrophicum	65°C	80.10^{-6}	3	8,8	110.10^{-3}

* 58 h. sur milieu minéral
12 h. sur milieu complexe

TABLEAU XI : Caractéristiques de croissance de quelques bactéries méthanogènes

Les substrats mineurs comme le méthanol et les méthylamines empruntent sans doute les mêmes voies métaboliques. Les triméthylamines semblent être des composés importants dans la dégradation des composés n-méthylés (WALTHER et al., 1980).

I.4.3.- Eléments de cinétique méthanogène

Le tableau XI résume les différentes informations disponibles à propos des constantes cinétiques (Ks, temps de doublement, μ max) des espèces hydrogénophiles et acétoclastes. Bien que de tels paramètres, ainsi que les spectres de substrats utilisés soient obtenus à partir de conditions définies, leur connaissance est nécessaire de manière à pouvoir prédire la réponse d'une population dans des conditions dynamiques.

Si on a pu remarquer que la pression partielle d'hydrogène des différents écosystèmes méthanogènes était du même ordre de grandeur que la constante d'affinité des hydrogénophiles, il en va différemment en ce qui concerne l'acétate. En effet, la concentration en acétate des biotopes méthanogènes est souvent très faible par rapport à l'affinité des bactéries pour ce substrat. Les bactéries acétoclastes ne peuvent se maintenir dans de tels environnements que grâce aux très faibles taux de renouvellement de la population bactérienne.

Par ailleurs, les faibles taux de croissance observés sur acétate s'expliquent par la valeur du $\Delta G'o$ moins négatif que pour les autres substrats (- 28,3 kj/CH_4, Tableau XI). Cependant, à l'état naturel les conditions d'environnement fluctuantes sont de règle et les taux de croissance deviennent d'importance mineure. Ainsi, une grande affinité pour le substrat, alliée à un taux de croissance peu élevé, est préférable pour le maintien d'une espèce donnée dans un milieu très peu renouvelé.

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

* II.- I N T E R A C T I O N S *

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

La stabilité d'un écosystème bactérien est le reflet des interactions métaboliques qui se traduisent essentiellement par apport de nutriments et/ou assimilation de métabolites inhibiteurs.

Ce chapitre décrit quelques exemples de déviations métaboliques.

II.1.- COMPLEMENTARITES METABOLIQUES

* Clostridium thermocellum, bactérie cellulolytique et hémicellulolytique est incapable d'assimiler le glucose. A l'inverse, Clostridium thermohydrosulfuricum fermente le glucose, le xylose et le cellobiose mais n'hydrolyse pas les polymères saccharidiques.

NG et al. (1981) ont établi des cocultures stables susceptibles d'augmenter le taux de dégradation de la cellulose, Cl. thermohydrosulfuricum utilisant les sucres libérés par les cellulases de C. thermocellum. Cependant, il est à noter que cette association n'augmente en aucun cas la vitesse de dégradation du polymère.

* Plus complexe est l'association de C. thermocellum et Acetogenium kivui. En effet, cette bactérie homo-acétogène utilise le glucose et H_2/CO_2 libérés par C. thermocellum pour produire de l'acétate. A la complémentarité métabolique s'allie donc la déviation du métabolisme de C. thermocellum vers la production exclusive d'acétate par maintenance d'une basse pression d'hydrogène (LE RUYET et al., 1984).

* Il existe également des interactions basées sur l'élimination de l'acétate inhibiteur par une méthanogène acétoclaste. C'est le cas de l'association Acetovibrio cellulolyticus-Methanosarcina barkeri qui permet l'augmentation du taux de dégradation de la cellulose (LAUBE et MARTIN, 1981).

* L'interaction bactérienne joue également au niveau de l'apport des facteurs de croissance, par exemple au niveau des cellulolytiques nécessitant des vitamines B, NH_3 et certains A.G.V. (BRYANT, 1973).

II.2.- TRANSFERTS D'HYDROGENE INTERESPECES

Au niveau de la phase d'hydrolyse et de fermentation apparaissent deux types métaboliques bactériens (GOTTSCHALK, 1979).

II.2.1.- Les bactéries dont le métabolisme n'est pas influencé par la pression partielle d'hydrogène

A haute pression partielle d'hydrogène, l'hydrogène ne peut provenir que du pyruvate, grâce à la pyruvate ferrédoxine réductase et à l'hydrogénase ou du formate par action de la formate hydrogène lyase selon les équations

$$\text{Pyruvate} + H_2O \rightarrow \text{Acétate} + CO_2 + H_2 \qquad \Delta G'^o = -12{,}1 \text{ Kcal/mole}$$

$$\text{Formate} \rightarrow CO_2 + H_2 \qquad \Delta G'^o = +0{,}2 \text{ Kcal/mole}$$

Les Entérobactéries réalisent ce type de réaction. Entrent également dans cette catégorie, les bactéries ne produisant pas d'hydrogène comme les bactéries homolactiques.

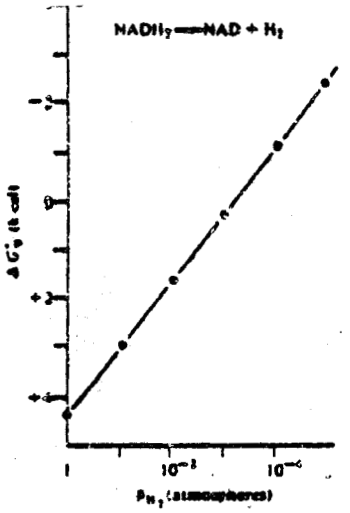


Figure I4 : Variation de l'énergie libre de l'oxidation de NADH2 en NAD et H_2, enfonction de la pression partielle d'hydrogène.

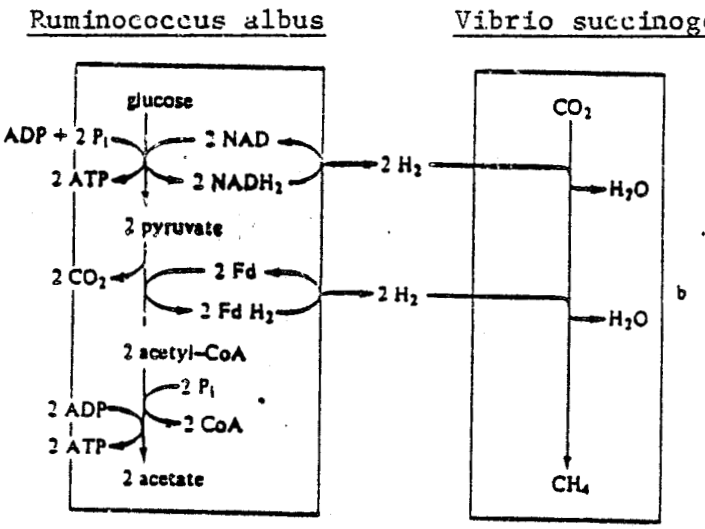


Figure I5 : Transfert d'hydrogène entre Ruminococcus albus et une bactérie méthanogène.

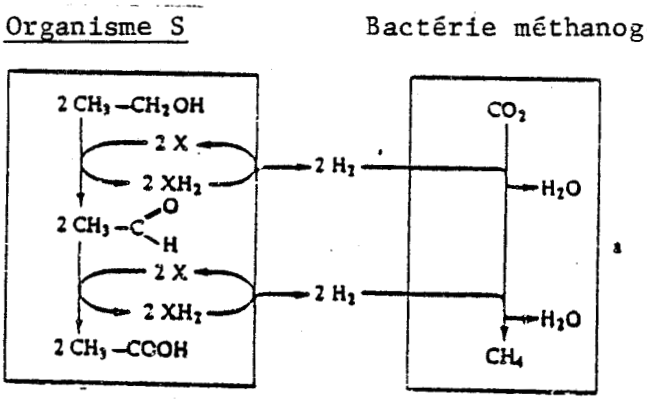


Figure I6 : Transfert d'hydrogène en milieu pauvre en sulfates (GOTTSCHALK, I979)

II.2.2.- Les bactéries dont le métabolisme est influencé par la pression partielle d'hydrogène

Ces bactéries produisent de l'hydrogène grâce à une hydrogène transférase. En dessous de 10^{-3}atm. d'hydrogène, il y a régénération du $NADH_2$ en NAD + H_2 (Figure 14) ce qui permet l'oxydation de composés organiques (éthanol, glucose) en acétate et hydrogène.

En association avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène, ces bactéries se comportent comme des acétogènes productrices d'hydrogène et on observe une déviation de leur métabolisme vers une production exclusive d'acétate avec un rendement énergétique plus important qu'en culture pure (Figure 16).

Ces transferts d'hydrogène ont été observés entre Ruminococcus albus et Vibrio succinogenes, association qui permet la dégradation du glucose en deux acétates (WOLIN, 1975) (Figure 15).

Ce type d'interaction, extrêmement important dans les écosystèmes méthanogènes ne permet cependant pas d'augmenter le taux de dégradation d'un polymère.

Les bactéries méthanogènes pour la plupart hydrogénophiles, entrent en compétition avec les sulfatoréductrices pour l'acétate et/ou l'hydrogène. OREMLAND et al. (1982) ont mis en évidence le rôle clé du sulfate dans l'orientation des associations.

La figure 16 schématise les transferts d'hydrogène entre l'organisme S et une bactérie méthanogène en milieu pauvre en sulfate.

III.- M I S E EN O E U V R E DE LA M E T H A N I S A T I O N

III.1.- PARAMETRES

Les différentes populations bactériennes aux taux de croissance extrêmement variables doivent être organisées en un système stable de manière à éviter l'accumulation de composés intermédiaires. Les facteurs d'environnement doivent donc répondre à des conditions très précises.

III.1.1.- Potentiel rédox

Bien que l'on trouve un certain nombre de bactéries anaérobies facultatives (UEKI et al., 1980), les micro-organismes nécessitent des conditions d'anaérobiose stricte. Les bactéries méthanogènes notamment ont une extrême sensibilité à l'oxygène : la croissance est inhibée à 0,05 atm (SCOTT et al., 1983). Le potentiel rédox du milieu doit être inférieur à - 300 mV. Cependant, l'exposition temporaire à l'atmosphère de boues fermentatives n'a qu'un impact mineur : l'oxygène est rapidement assimilé comme accepteur d'électrons par les bactéries anaérobies facultatives microaérophiles (CHANDLER, 1980).

III.1.2.- pH

Le pH doit être voisin de la neutralité. Sa valeur dépend principalement d'un équilibre entre les concentrations en cations (Ca^{++}, Na^{+}, Mg^{++}, NH_4^{+}) et en anions (HCO_3^{-}, HPO_3^{-}). La diminution du pH résulte principalement d'une accumulation des A.G.V. A pH 6,2, on observe un arrêt de la production de méthane

qui peut être irréversible (Mc CARTY, 1964). Cet effet est, au départ, compensé par le pouvoir tampon qui dépend essentiellement des bicarbonates selon l'équation suivante :

$$CO_2 + NH_3 + H_2O \rightleftarrows NH_4^+ + HCO_3^-$$

Les productions d'A.G.V. et de NH_4^+ déplacent l'équilibre vers une solubilisation ou un dégagement de CO_2. Un excès de l'un ou de l'autre de ces composés peut donc entraîner une déstabilisation du pH par dépassement de la capacité tampon.

L'alcalinité souhaitable se situe à 3-4 g/l (Mc CARTY, 1964).

III.1.3.- Température

Suivant la température choisie, la fermentation méthanique peut être conduite dans les domaines psychrophiles (5-20°C), mésophile (25-50°C) ou thermophile (55-70°C). La majorité des digesteurs est maintenue à des températures mésophiles, ce qui représente un bon compromis entre la vitesse de réaction et la récupération nette d'énergie. Malgré des vitesses de réaction plus élevées, les procédés thermophiles se caractérisent par une plus grande instabilité et ils ne sont que rarement utilisés industriellement.

III.1.4.- Nutriments et facteurs de croissance

Mc CARTY (1964) a déterminé que, si les micro-organismes anaérobies nécessitent proportionnellement moins de nutriments que les aérobies, ils ont cependant besoin de taux d'azote et de phosphore inorganiques assez importants. Les besoins sont évalués à 12% de la masse cellulaire en azote et 2,5% en phosphore, basés sur la formule chimique cellulaire de $C_5 H_7 O_2 N$.

SPEECE et Mc CARTY (1962) indiquent que certaines substances comme la thiamine, les dérivés de la vitamine B 12 et le fer augmentent l'assimilation de l'acétate.

L'extrait de levure et la trypticase stimulent la croissance (MAH et al., 1977).

Les sources d'azote et de soufre des bactéries méthanogènes sont respectivement l'ammoniaque et le sulfure (BRYANT et al., 1974). Ces ions leur sont fournis par les autres bactéries de l'écosystème qui dégradent les acides aminés ou qui réduisent les sulfates.

Bien que les méthanogènes soient capables de se développer sur des substrats relativement simples (H_2/CO_2), la présence de molécules organiques comme les acides gras volatils ramifiés semble stimuler la croissance et est même indispensable pour certaines espèces isolées du rumen (M. ruminantium) (WOODARD et al., 1974). NOVAK (1975) remarque également que l'addition de thymine et d'uridine à 50 mg.l augmentent la vitesse de dégradation de l'acétate.

III.1.5.- Facteurs inhibiteurs

. Les A.G.V. à un pH acide sont particulièrement inhibiteurs (WOLIN, 1969). En effet, les acides gras volatils non ionisés traversent librement la paroi bactérienne. C'est donc sous cette forme qu'ils seraient responsables de l'effet inhibiteur.

. L'accumulation d'ammoniaque est source de toxicité mais les valeurs des concentrations tolérées varient selon les auteurs. Mc CARTY (1964) établit une inhibition de l'ammoniaque libre qui dépend de l'équilibre $NH_4^+ \rightarrow NH_3 + H^+$. Quand la concentration en ammoniaque totale est comprise entre 1,5 et 3 g/l à pH basique de 7,4 à 7,6, l'ammoniac total est inhibé au dessus de 3 g/l. Cependant, VAN VELSEN et LETTINGA (1979) signalent une population supportant 5 g d'azote par litre si l'augmentation de concentration est progressive.

En conclusion, il semblerait que ce soit l'ammoniaque non ionisé qui soit responsable de l'inhibition (KROEKER et al., 1979) car c'est sous cette forme qu'il traverse la membrane.

. Les métaux lourds (Cr, Cu, Ni, Zn) sont également toxiques à de faibles concentrations mais les bactéries peuvent limiter leur impact en concentrant les métaux dans des mucopolysaccharides excrétés (STAFFORD et al., 1978). De plus, ils sont assez souvent précipités sous forme de sulfures ou d'hydroxydes insolubles.

. Les analogues chlorés du méthane tels le tétrachlorure de carbone et le chloroforme arrêtent la croissance des méthanogènes mais n'ont pas d'action sur la flore cellulolytique (CHYNOWETH et MAH, 1971).

Il est cependant utile de rappeler que la notion de toxicité est toute relative et dépend essentiellement de la concentration du composé et du degré d'adaptation des micro-organismes. Ainsi, si les ions Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++} ont un effet stimulant à faible concentration ils peuvent être inhibiteurs à forte concentration (Mc CARTY, 1970). Interviennent également dans ce concept les états d'ionisation et les interactions avec d'autres substances (antagonisme, synergisme, formation de complexes).

. Les bases puriques (thymine, cytosine) semblent provoquer une inhibition de croissance des méthanogènes (NOVAK, 1975).

III.1.6.- Agitation

Elle favorise les transferts thermiques, ioniques et métaboliques et facilite en particulier la coalescence des bulles de gaz produites.

III.1.7.- T.S.H.

Le temps de séjour hydraulique ou temps de rétention d'un système en continu est défini comme l'inverse du taux de dilution. Sa valeur dépend des types de fermenteurs, de la biodégradabilité des substrats, du niveau d'adaptation de la flore, de la température de fonctionnement mais surtout des buts recherchés : production maximale de gaz ou épuration de la matière organique. Pour un fermenteur infiniment mélangé, en zone mésophile, il ne doit pas être inférieur à 7-10 jours sans risque de dilution préférentielle de la flore méthanogène.

III.2.- PROCEDES

La gamme de digesteurs utilisés est très étendue mais aucun modèle ne peut être considéré comme universel si l'on considère la variété de paramètres intervenants (nature du substrat, site d'implantation, conditions d'environnement, buts recherchés ...).

On distingue cependant un certain nombre de "types technologiques" arbitrairement répartis en procédés mono-étape et en deux phases.

III.2.1.- Procédés mono-étapes

Ceux-ci incluent les systèmes pour lesquels tout le processus de méthanisation se déroule dans un seul fermenteur.

III.2.1.1.- Fermenteur discontinu

Il est caractérisé par une alimentation sporadique impliquant une production et une composition gazeuse variable dans le temps. Ce fonctionnement extrêmement simple permet une technologie dépouillée mais les productivités restent faibles (en moyenne 0,2 $m^3/m^3.j$) avec des temps de séjour de 30 à 60 jours.

Cependant, ce système est utile lors d'études expérimentales ou pour obtenir une flore adaptée particulière. Sur site, la mise en parallèle de plusieurs unités dont le démarrage est décalé permet de régulariser la composition et la production de gaz (ex. : digesteurs de fumiers).

III.2.1.2.- Fermenteur continu

* Infiniment mélangé (Figure 17)

L'agitation par moyen mécanique ou recirculation du gaz empêche la formation de phases liquide-solide, assure une homogénéisation de la température et facilite le contact substrat-bactéries. Ce procédé s'applique à des substrats à forte concentration en matière sèche (DCO supérieure à 50 000 mg O_2/l) tels que les lisiers, boues urbaines et ordures ménagères avec des productivités pouvant aller jusqu'à 3 m^3 biogaz/m^3.j. Les charges volumiques généralement appliquées sont inférieures à 6 g MV/l.j.

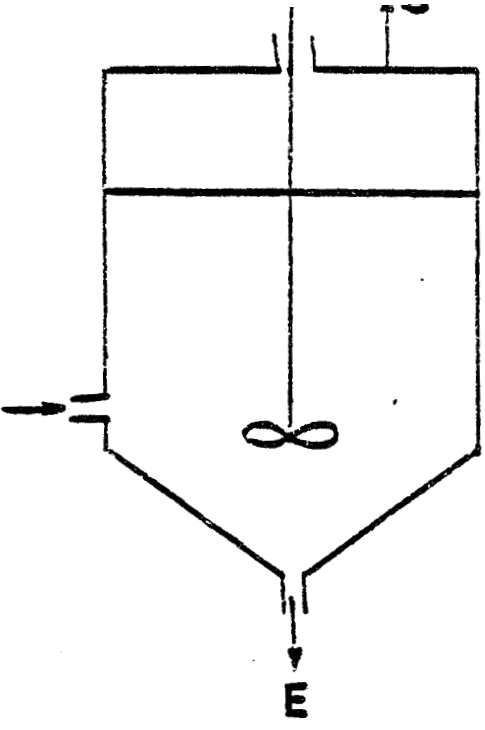


Figure I7 : Mélange complet

G Gaz
F Effluent d'entrée
E Effluent de sortie

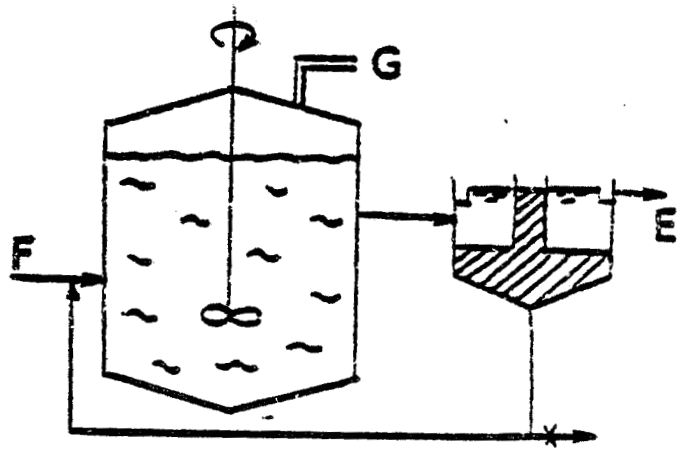


Figure I8 : Procédé contact

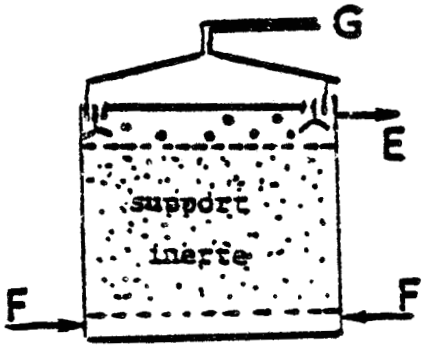


Figure I9 : Filtre anaérobie

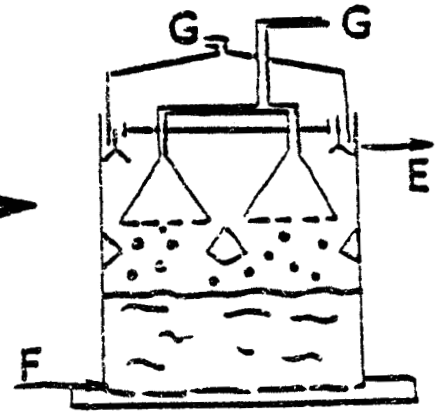


Figure 20 : Lit fluidisé
(U.A.S.B.)

* Procédé contact (Figure 18)

L'amélioration par rapport au système précédent consiste en l'adjonction d'un décanteur en sortie, lequel permet un recyclage de la biomasse bactérienne et une diminution du temps de séjour. Cependant, le faible pouvoir de décantation des aggrégats bactériens impose une limite inférieure de T.S.H. de l'ordre de 4 jours (effluents de conserverie - VERRIER et al., 1983 a). Ceci en fait un procédé plus particulièrement adapté aux substrats moyennement concentrés (DCO de 15 000 à 30 000 mg O_2/l).

* Filtre anaérobie (Figure 19)

Originellement conçu par YOUNG et Mc CARTY (1969), le procédé repose sur la rétention de la biomasse bactérienne sur un support inerte (PVC, alginates, céramique ...). Si le T.S.H. peut être réduit à quelques heures, l'inconvénient majeur est un risque de colmatage si la concentration en matière organique en suspension est trop élevée.

* Réacteur à lit de boues (Figure 20)

Un des procédés les plus performants de ce type est Upflow Anaerobic Sludge Blanket (U.A.S.B.). Des boues granuleuses forment un lit fluidisé dans la partie inférieure du réacteur. Le gaz produit assure l'agitation et est récupéré au moyen d'un séparateur de phases.

III.2.2.- Procédé en deux étapes

La séparation des phases d'acidogenèse et de méthanogenèse en deux fermenteurs (GHOSH et KLASS, 1978) est particulièrement efficace pour le traitement des résidus solides, surtout du point de vue épuration (ROY et al., 1983 ; VERRIER et al., 1983 b).

Bien que sans intérêt d'un point de vue strictement biologique (cf. partie Interactions) ils constituent une approche intéressante pour généraliser l'emploi du filtre anaérobie. Divers schémas ont été étudiés mais aucun n'a dépassé le stade du pilote.

Le tableau 12 rassemble quelques résultats obtenus à partir de ces différents procédés.

ALIMENTATION	TEMPERATURE °C	CHARGE kg MO/m³.j	TEMPS DE RETENTION j	RENDEMENT DE PRODUCTION CH_4 m^3/kg MO ajouté	PRODUCTIVITE CH_4 vol/vol dig.	% CH_4	% REDUCTION DE MO	REFERENCES
Jacinthe d'eau	37	6,31	10	0,20	1,26	56	56	CHIN et GOH, 1978
"	37	3,16	20	0,25	0,79	56	66	
Jacinthe d'eau + Herbe des Bermudes + boues en mélange	35	1,6	12	0,22	0,35	64	36	GHOSH et al., 1981
Idem prétraité à la soude	35	1,6	12	0,28	0,41	60	40	
Macrocystis	35	1,6	18	0,28	0,45	56	50,8	
"	35	1,6	40	0,28	0,42	59,6	50,8	CHYNOWETH et al., 1978
Macrocystis	35	1,6	18	0,30	0,48	55-60		YANG, 1981
Herbe des Bermudes (HB)	35	1,61	12	0,12	0,19	61,3	20	
HB + Azote	35	1,61	12	0,22	0,35	59,8	37,5	KLASS et GHOSH, 1979
HB + Azote	55	1,61	12	0,17	0,53	51,8	33,5	
Déchets de conserverie :								
* Epinards	33	0,83-1,18	32	0,31-0,32	0,26-0,38	77-80	70	
* Asperges	33	0,74-1,06	32	0,19-0,25	0,14-0,27	64-82	40	
* Haricots verts	33	0,96-1,15	32	0,33-0,35	0,32-0,46	71-75	70	
* Fraises	33	1,02-1,15	32	0,24-0,28	0,24-0,32	72-82	50	KNOL et al., 1978
* Pommes (pulpe)	33	1,02-1,50	32	0,25-0,07	0,26-0,59	50-75	40	
* Pommes	33	0,83-1,15	32	0,27-0,29	0,22-0,33	72-75	60	
* Carottes	33	0,80-0,90	32	0,41-0,42	0,33-0,38	71-73	75	
* Petits pois	33	0,87-1,25	32	0,28-0,34	0,24-0,43	66-81	75	
* Lisier + pommes	33	0,90-1,12	32	0,32-0,34	0,29-0,38	72-75	50	
- Tomates	35	1,0	35	0,24	0,24	64	39	
- Tomates	35	3,0	35	0,11	0,34	63	32	
- Tomates	35	5,0	35	0,07	0,36	61	24	
- Tomates	35	1,0	25	0,23	0,23	65	42	HILLS et DYKSTRA, 1980
- Tomates	35	3,0	25	0,10	0,29	62	33	
- Tomates	35	5,0	25	0,07	0,36	66	21	
- Tomates	35	1,5	15	0,14	0,14	66	36	
- Tomates	35	3,0	15	0,09	0,28	59	23	
- Tomates	35	5,0	15	0,07	0,33	58	18	
Effluent de blancheur de poires	35	3,5	6	0,29	1,02	60	95	
Pulpe de poires	35	16,5	1	0,13	2,15	-	-	CHAMBERLHAC et al., 1982
Effluent de blanchour de haricots verts	35	2,7	5,5	0,25	0,68	55	96	
Pulpe de carottes	35	7,5	2,7	0,25	1,88	60	96	
Fumier de bovins								
* 90% paille	35	6,5	15	0,02	0,13	15,7	47	
* "	55	6,5	10	0,09	0,59	33,2	39	
Fumier de bovins								
* 75% paille	35	6,1	8	0,03	0,16	15,5	58	
* "	35	6,1	10	0,02	0,14	11,2	47	HASHIMOTO, 1983
* "	55	6,1	6	0,11	0,66	25,0	32	
* "	55	6,1	8	0,20	1,19	44,9	42	
* 30% paille	35	6,6	6	0,13	0,88	40,0	38	
* "	35	6,6	10	0,11	0,73	37,4	42	
* "	55	6,6	8	0,24	1,58	47,1	48	
* "	55	6,6	10	0,19	1,26	46,5	46	
* 0% paille	35	6,3	8	0,25	1,56	48,5	49	
* "	35	6,3	10	0,29	1,81	54,6	55	
* "	55	6,3	8	0,37	2,34	55,1	53	
* "	55	6,3	10	0,32	2,01	57,9	53	
Pulpe de carottes (monoétape)	35	5,6	23	0,37	1,35	48	87	
"	55	6,25	13	0,36	2,27	49	83,1	VERRIER et al., 1983
Pulpe de carottes (2 étapes)	50-35	12-5,65	2-2,3	0,42	2,39	75	96,6	

TABLEAU XII : RESULTATS D'ESSAIS DE METHANISATION RELEVES DANS LA LITTERATURE

MATERIELS ET METHODES

I.- PILOTES DE LABORATOIRE

Il s'agit de fermenteurs de 20 et 22 litres de volume utile, thermostatés à 35°C par serpentin intérieur (Figure 21). Les boues sont homogénéisées par agitation mécanique. L'alimentation est du type semi-continu (1 ou 2 alimentations par jour) et l'extraction du résidu méthanisé se fait par pompage ou soutirage par le bas. La quantité de gaz produit est mesurée par des compteurs SCHLUMBERGER et des compteurs à gaz à déplacement de liquide (MOLETTA et ALBAGNAC, 1983).

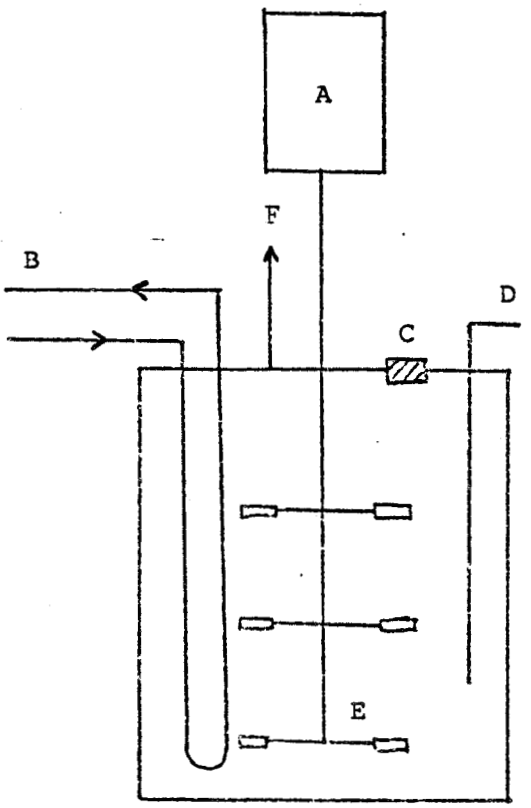
II.- SUBSTRATS : DECHETS VEGETAUX

II.1.- ORIGINES

Les résidus végétaux ont été stockés à - 18°C ; leurs origines sont les suivantes :

*** Feuilles de choux-fleurs**

Elles proviennent de la Région Audomaroise. Les choux-fleurs, principale culture d'été, subissent éventuellement pour des raisons économiques, un séjour de quelques mois à + 4°C. Au sortir de la chambre froide, les premières feuilles légèrement défraîchies sont enlevées et constituent le substrat étudié.



A = Moteur à vitesse variable
B = Régulation de température
C = Alimentations
D = Prélèvements
E = Turbines.
F = Sortie gaz

Figure 21 : Schéma des réacteurs utilisés.

*** Racines d'endives**

Egalement de la Région de SAINT OMER, les endives sont obtenues par cultures hydroponiques en serre. Après récolte du bourgeon, les racines sont amassées en bordure de champs, tas sur lesquels un échantillonnage a été prélevé.

*** Gazon**

Les tontes de gazon ont été récoltées à VILLENEUVE D'ASCQ.

*** Lentilles d'eau**

Celles-ci proviennent des plans d'eau de VILLENEUVE D'ASCQ où nous les avons récoltées au moyen de filets. Quelques petits représentants de la faune de ces étangs se trouvent donc parfois incorporés accidentellement à ce matériel végétal.

II.2.- PRE-TRAITEMENT DES RESIDUS VEGETAUX

Il consiste en un broyage de la matière végétale afin de faciliter sa manipulation et sa biodégradation.

*** Racines d'endives**

Elles sont broyées en particules de 2 mm de diamètre. Lors des essais avec dilution de charge, 200 ml d'eau ont été additionnés pour 100 g de poids frais.

*** Feuilles de choux-fleurs**

Le broyat est constitué de particules de taille variant de 2 mm à 2 cm. Cette variation est due principalement à la structure hétérogène des feuilles (limbes minces et cellulosiques, nervures épaisses et lignifiées). Avant addition dans le digesteur, le broyat est mis en suspension dans 200 ml d'eau pour 100 g de poids frais.

*** Gazon**

Lors des essais discontinus, le gazon, coupé manuellement aux ciseaux est utilisé sous forme de particules de 0,5 cm environ. Pour les essais en continu, une broyeuse industrielle SCHNELL-MUSER a été utilisée. Le gazon a été alors réduit en un composé pâteux.

*** Lentilles d'eau**

Pour l'expérience en continu, elles sont broyées en particules de 0,5 à 1 mm de diamètre.

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

* III.- CINETIQUES DE DEGRADATION *

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

III.1.- SUBSTRATS

- L'insoluble d'endives est obtenu par trois macérations successives de 20 mn dans de l'eau, suivies de centrifugations.
- Les sucres utilisés sont des produits SIGMA, SERVA, MERCK et PROLABO. La cellulose la plus employée lors des dégradations est du papier filtre Whatman N° 1.

III.2.- MATERIEL

Il s'agit de flacons de 125 et 500 ml scellés et purgés à l'azote. Les boues y ont été introduites en chambre anaérobie sous l'atmosphère composite de 75% N_2 - 15% CO_2 - 10% H_2.

L'incubation se fait en étuve, bain-marie ou chambre à 35°C.

III.3.- RESULTATS

Sauf précision contraire, l'activité résiduelle des boues est soustraite dans les valeurs de production de méthane indiquées sur les graphiques.

IV.- DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Le dosage a été opéré à la fois sur des boues entières et sur le surnageant. Dans ce dernier cas, les boues sont centrifugées 20 mn à 10 000 tours/mn à 6°C.

Dans le cas d'un pré-traitement aux ultrasons, les boues sont soniquées 20 mn à 200 W.

Un ml de boues ou de surnageant et 0,5 ml d'eau distillée sont ajoutés à 1,5 ml de substrat, celui-ci consistant en une solution ou une suspension à 1% dans du tampon citrate pH 6.

Après 30 minutes d'incubation pour les activités CMC-ase et xylanase et 60 minutes pour les activités papier filtre et avicelasique à 35°C, les sucres réducteurs libérés sont dosés par le D.N.S. (MILLER et al., 1960). La densité optique est lue à 515 nm.

Une unité enzymatique est exprimée en µmole d'équivalent glucose ou xylose libérée par minute et par ml (UI/ml).

V.- DENOMBREMENTS BACTERIENS

Après dilution sérielle des échantillons, les dénombrements bactériens sont réalisés en milieu liquide selon la technique du nombre le plus probable (Mc CRADY, 1915).

TABLEAU XIII

Composition du milieu utilisé pour les dénombrements bactériens

	ml/l ou g/l
Solution I	50
Solution II	10
Solution de vitamines	5
Extrait de levure	0,5
NH_4Cl	0,5
Hydrolysats de caséine	0,5
Résazurine (à 0,2%)	1
Cystéine HCl (à 2,5%)	20
$KHCO_3$	4,5
Atmosphère gazeuse	N_2/CO_2
Substrat	5

Solution I : KH_2PO_4 : 0,6% - NaCl : 1,2% - $MgSO_4.7H_2O$: 0,24% - $CaCl_2.2H_2O$:0,16%

Solution II : Acide nitriloacétique : 1,28% - $FeSO_4.7H_2O$: 0,02%
$MnCl_2.4H_2O$: 0,01%
$CoCl_2.6H_2O$: 0,017% - $CaCl_2.2H_2O$: 0,01% - $ZnCl_2$: 0,01%
$CuCl_2.2H_2O$: 0,0025% - H_3BO_3 : 0,001% - Na Molybdate : 0,001%
NaCl : 0,1% - $Na_2SeO_3.5H_2O$: 0,0026% - $NiSO_4.6H_2O$: 0,0024%.

Solution de vitamines : biotine : 2 mg/l - acide folique : 2 mg/l - B_6HCl : 1 mg/l - B_2 : 5 mg/l - acide nicotinique : 5 mg/l acide panthoténique : 5 mg/l - B_{12} cristalline : 0,1 mg/l acide para amino benzoïque : 5 mg/l - acide lipoique : 5 mg/l.

V.1.- MILIEU

La composition du milieu est indiquée tableau XIII. Si les substrats tels que la cellulose ou le xylane ont été ajoutés en même temps que les autres composants du milieu, les sucres solubles sont injectés dans les flacons après autoclavage, à partir de solutions-mères stérilisées par filtration (filtre Millipore 0,22 u).

V.2.- ENSEMENCEMENT

Les boues sont broyées au Polytron pendant 10 minutes en chambre anaérobie. On ensemence trois flacons par dilution, lesquels sont mis à incuber à 35°C pendant 15 jours.

V.3.- LECTURE

La lecture est faite par estimation visuelle de la croissance bactérienne (turbidité du milieu ou degré d'hydrolyse dans le cas du papier filtre).

Les métabolites produits sont également dosés (A.G.V., acides organiques, gaz).

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

* VI.- TECHNIQUES ANALYTIQUES *

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

VI.1.- METHODES DE DOSAGE GLOBAL

* Matières sèches : séchage à 105°C jusqu'à poids constant

* Matières volatiles : matières sèches disparues après une demi-heure de calcination à 550°C (NFT 90-101)

* $D.C.O._T$: méthode normalisée AFNOR (NT 90-101)

* $D.C.O._S$: méthode normalisée AFNOR (NT 90-101) et méthode automatisée sur chaîne d'analyse à flux continu (MORFAUX et SARRIS, 1974)

* Azote total : méthode de KJELDAHL

* Azote ammoniacal : dosé à l'électrode spécifique par la méthode des ajouts connus (HELAINE, 1977)

* Eléments minéraux : dosés par le laboratoire I.N.R.A. d'Analyses des Sols (ARRAS)

* Dosage de la cellulose, hémicellulose, lignine : méthode de VAN SOEST par la Station d'Elevage des Porcs (I.N.R.A. RENNES)

* Chaleur de combustion : méthode de la bombe calorimétrique (Station d'Elevage des Porcs, I.N.R.A. RENNES).

VI.2.- ANALYSES DES ACIDES GRAS VOLATILS

Les acides gras volatils sont séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse. Les conditions opératoires sont les suivantes :

* Chromatographe VARIAN, série 3700, muni d'un détecteur à ionisation de flamme

* Colonne en acier inox de 1/8 pouce x 2,5 m remplie de Chromosorb W-AW 100-120 mesh imprégné de 25% de néopentylglycoladipate et de 2% d'acide phosphorique

* Gaz vecteur : azote (débit 30 ml/mn), saturé en acide formique

* Température de colonne : 160°C

* Température d'injecteur : 230°C

* Détecteur : - température 230°C
- débit d'hydrogène 30 ml/mn
- débit d'air 300 ml/mn

La détermination quantitative des acides gras volatils est réalisée par injection de 1 ul d'effluent de digesteur préalablement centrifugé.

VI.3.- COMPOSITION DU GAZ

Composition du gaz en méthane, gaz carbonique, azote par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

* Chromatographe PYE UNICAM à catharomètre

* Colonne acier inox 4 mm x 3 m remplie de Porapak S

* Gaz vecteur : hélium (débit 45 ml/mn)

* Température de colonne : 50°C

* Température d'injecteur : 60°C

* Température de détecteur : 100°C

1 ml de gaz est injecté.

L'étalonnage est effectué en injectant des quantités connues des différents gaz.

RESULTATS ET DISCUSSION

Première partie

RESULTATS DE METHANISATION

TABLEAU XIV : Analyse des végétaux.

		Feuilles de choux-fleurs (g)	Gazon (g)	Racines d'endives (g)	Lentilles d'eau (g)
Pour 100 g de matière fraîche	Matière sèche	12,4	19,5	14,6	5,3
	Humidité	87,6	80,5	85,4	94,7
	Cendres	2,2	3,0	1,8	0,8
	Matières organiques	10,2	16,6	12,8	4,5
Pour 100 g de matière sèche	Cendres	17,9	15,3	12,5	14,9
	Matière organique	82,1	84,7	87,5	85,1
	Sucres totaux	41,9	–	–	20,04
	Hémicellulose	39,8	20,6	16,5	–
	Cellulose	7,5	23,5	0	–
	Lignine	–	5,3	6,0	–
	Azote total	4,8	4,0	1,3	1,7
	Calcium	3,44	1,27	1,13	4,08
	Potassium	2,53	2,84	2,20	1,74
	Sodium	0,55	0,16	0,24	0,03
	Acide phosphorique	1,77	1,21	0,48	0,31
	Silicium	–	2,37	–	–
Pour 100 g de cendres	Calcium	19,20	8,30	9,06	27,40
	Potassium	14,15	18,55	17,59	11,67
	Sodium	3,09	1,03	1,91	0,21
	Acide phosphorique	9,88	7,91	3,82	2,42
	Silicium	–	15,5	–	–
Pour 1 g de matière sèche	Chaleur de combustion (cal.)	3 640	4 125	3 430	3 790
	DCO*/N/P	350/17/1,9	350/ 13,8/1,3	350/4,4/0,5	350/5,8/0,37

* DCO calculée en considérant 1,2 g DCO/g M.O.

Première Partie : **RESULTATS DE METHANISATION**

-

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

* I.- ANALYSE DES SUBSTRATS *

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

Les rendements, les vitesses de production de CH_4 et la nature des micro-organismes composant la population microbienne dépendent principalement de la composition du substrat à méthaniser.

Une analyse, non exhaustive toutefois, des caractéristiques physico-chimiques des résidus végétaux à méthaniser est reportée dans le tableau XIV.

S'il existe une unité dans la composition globale du matériel végétal, il faut cependant noter certaines variations qui reflètent la diversité des substrats.

En effet, pour un même poids de matière fraîche, les lentilles d'eau contiennent 2 à 4 fois moins de matières organiques que les plantes terrestres.

Du point de vue composition chimique proprement dite, il faut noter que le gazon contient 44% de polymères polysaccharidiques, molécules plus lentes à se dégrader ; par contre, les racines d'endives ne possèdent que peu de ces substances (16% d'hémicellulose).

La nature exacte des polymères hémicellulosiques, qui nous intéresseront plus particulièrement par la suite n'a pas été déterminée. Cependant, STEVENS et SELVENDRAN (1984) ont mis en évidence la prédominance de xyloglucanes dans les tissus parenchymateux de choux ; ces substances sont associées aux substances pectiques par un type liaison non défini. Par ailleurs, des complexes analogues pectine -

	Volume du réacteur (l)	Charge volumique (g M.O./l)	Biogaz (l)	Méthane (l)	Productivité Biogaz (l/l)	Productivité Méthane (l/l)	Rendement Biogaz (l/g M.O.)	Rendement Méthane (l/g M.O.)	Rendement DCO (%)	Durée (j)
Feuilles de choux-fleurs										
- essai n° 1	16	1	7	2,8	0,136	0,056	0,44	0,18	38,8	3,2
- essai n° 2	16	3,3	32	13,2	0,400	0,165	0,60	0,25	55,5	5
- essai n° 3	16	5	52	20,2	0,541	0,210	0,65	0,25	55,5	6
- essai n° 4	16	5	42	21,6	0,625	0,321	0,52	0,26	60	4,2
Gazon + Choux-fleurs	16	8	57,4	30,4	0,390	0,205	0,45	0,24	52,7	9,2
Gazon										
- essai n° 1	16	8,8	83	44,2	0,518	0,276	0,58	0,31	69,7	10
- essai n° 2	14	7,2	54	25	0,385	0,173	0,53	0,25	55,1	10
Lentilles d'eau non broyées	14	3,4	6,6	1,4	0,067	0,015	0,14	0,03	6,5	7
Racines d'endives										
- essai n° 1	17	1	5,4	4,4	0,019	0,016	0,32	0,26	57,5	16
- essai n° 2	18	3	24,5	13	0,170	0,090	0,45	0,24	53,5	8

TABLEAU XV : Résultats des essais en discontinu.

xyloglucane - arabinoxylane - protéine ont déjà été mis en évidence dans les parois de l'endosperme du riz (SHIBUYA et IWASAKI, 1978 ; SHIBUYA et MISAKI, 1978).

D'autre part, WHAITE et al. (1964) ont analysé les proportions en différentes hémicelluloses chez différentes graminées. Il est à noter que le pourcentage global d'hémicellulose que nous avons indiqué à propos du gazon (20,6% de la M.S.) s'intègre parfaitement dans la fourchette de résultats obtenus par ces auteurs.

D'autre part, si on considère que, pour qu'un substrat organique soit correctement méthanisable le rapport DCO/N/P doit être équivalent à 350/5/1 (LETTINGA, 1980), on remarque que les racines d'endives présentent une carence en azote et phosphore ; les lentilles d'eau seraient, pour leur part déficientes en phosphore.

-
* **II.- FERMENTATIONS DISCONTINUES** *
-

Dans ces expériences, les résidus végétaux sont introduits dans le réacteur sans subir de dilution. Les expériences sont considérées comme terminées lorsque l'on n'observe plus de production de biogaz. Les principaux résultats obtenus sont reportés dans le tableau XV.

II.1.- METHANISATION DU CHOU-FLEUR

Les boues initiales proviennent d'une flore mésophile adaptée à la dégradation d'un polysubstrat (ordures ménagères, drêches de brasserie et boues primaires de station d'épuration).

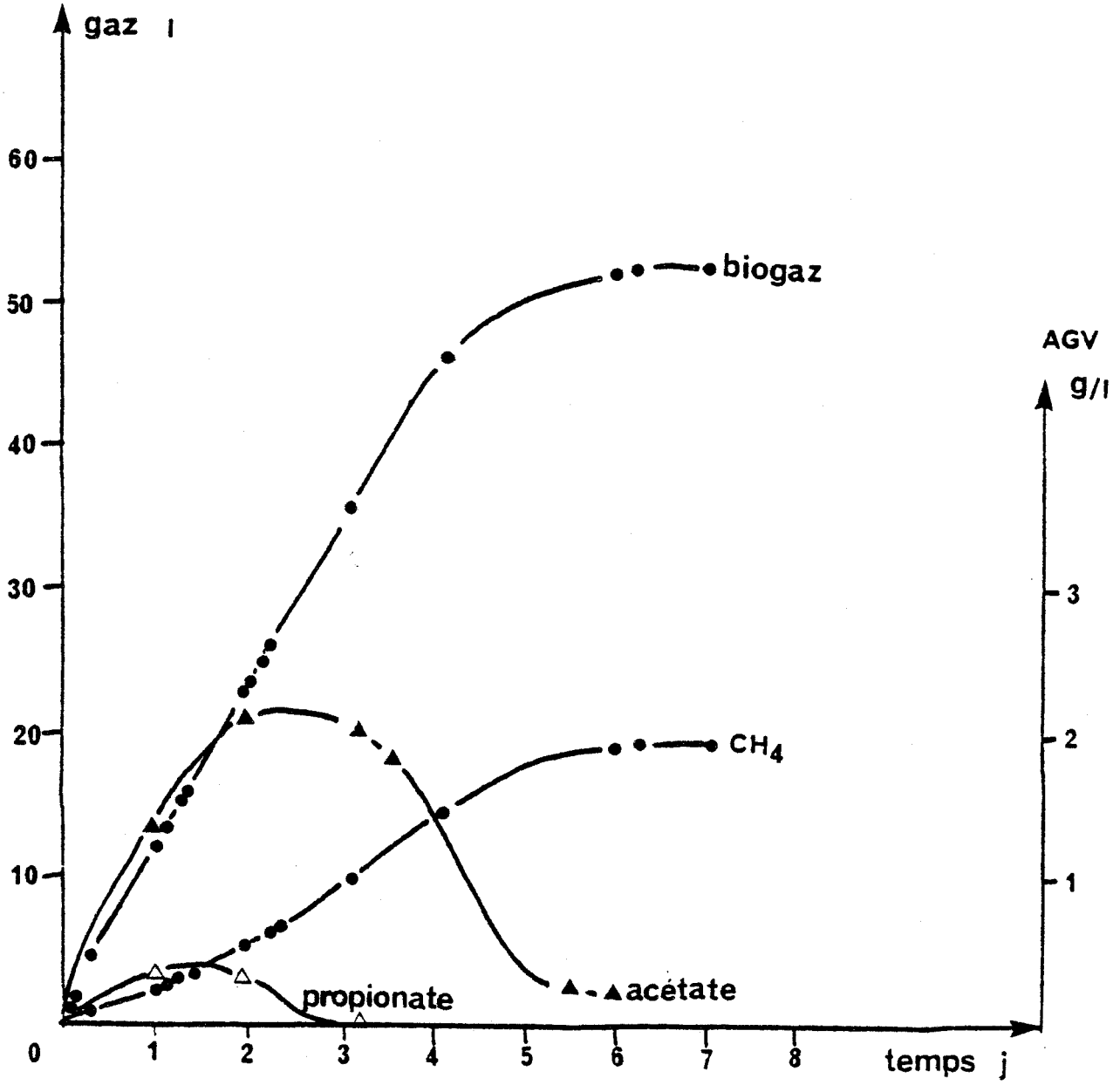


Figure 22 : Variations des concentrations en AGV et du volume de gaz formé lors de la fermentation discontinue des feuilles de choux-fleurs.

Pendant ces essais, le pH est resté légèrement alcalin (7,3 à 7,9) malgré une accumulation transitoire d'acétate et de propionate après addition du substrat.

A titre d'exemple, nous avons reporté les variations des concentrations en A.G.V. et les volumes de biogaz et de méthane produits lors du troisième essai (Figure 22).

L'augmentation successive des productivités et des rendements (Tableau XV) traduit un phénomène d'adaptation de la flore à la dégradation des feuilles de choux-fleurs. Le rendement DCO, calculé d'après la variation de la demande chimique en oxygène, représentée par la charge et celle récupérée sous forme de méthane, traduit l'efficacité d'épuration du procédé. Il est légèrement supérieur à 50%, ce qui permet d'évaluer, en première approximation que la moitié de la matière organique introduite dans le digesteur a été dégradée. D'une manière globale, l'introduction, lors des quatre essais de 228,8 g de matière organique a conduit à la formation de 133 l de biogaz dont 57,8 l de méthane.

Ces valeurs sont à l'origine de rendements moyens de production de 0,58 l de biogaz et de 0,25 l de méthane par gramme de matière volatile.

II.2.- METHANISATION DU GAZON

Lors de ces essais, les rendements et les productivités ont des valeurs analogues à celles observées précédemment sur feuilles de choux-fleurs. Les variations de concentration en A.G.V. et les productions de biogaz et de méthane du premier essai sont rapportées figure 23. Une augmentation de la concentration en acétate résiduel au début de culture montre qu'il y a utilisation rapide de la fraction soluble et que la dégradation de l'acétate est, dans un premier temps, limitante. Ce résidu est méthanisable avec des rendements DCO de 50 à 70%.

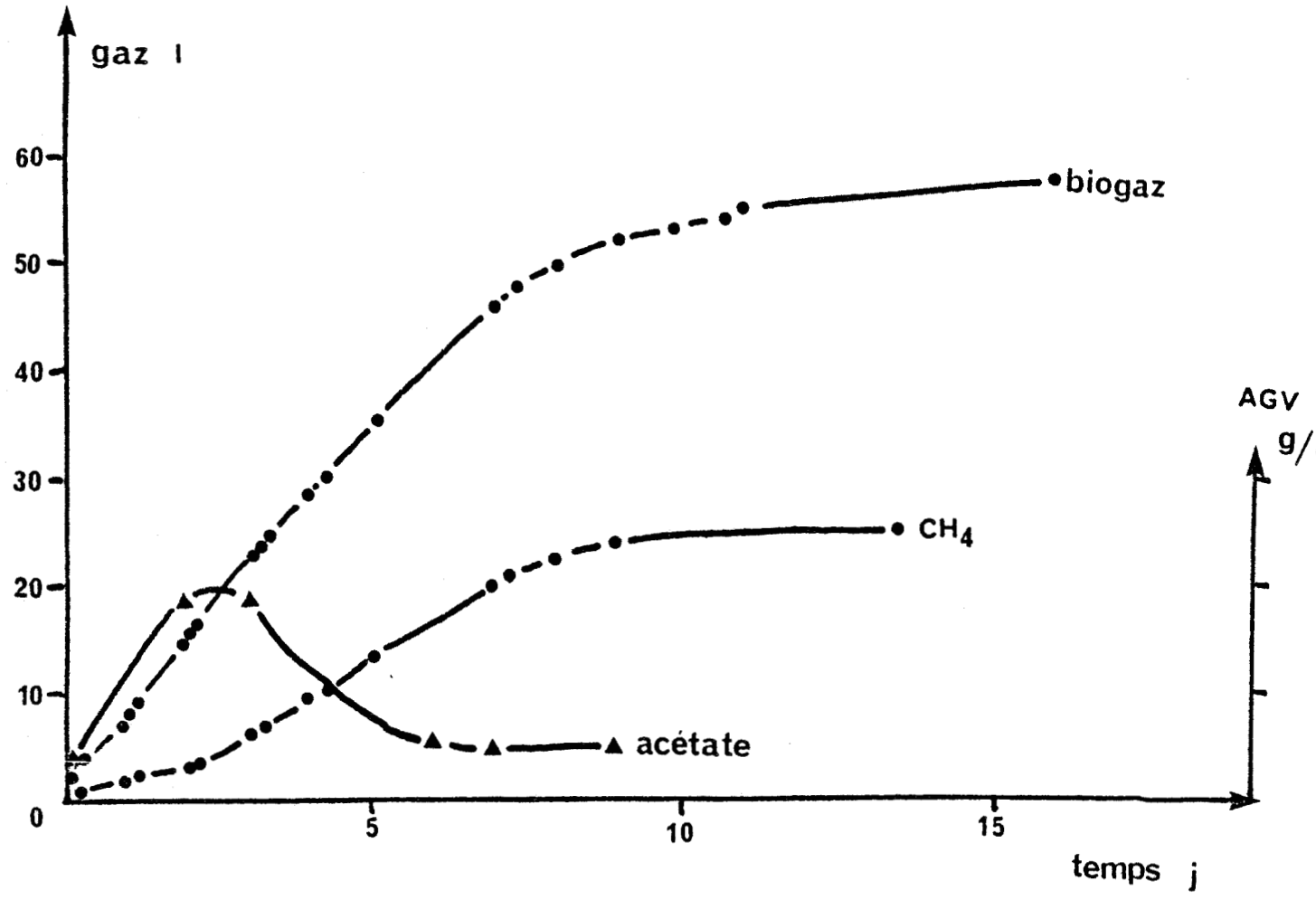


Figure 23 : Variations des volumes de biogaz et de méthane formés, ainsi que de la concentration en acétate lors de la fermentation discontinue du gazon.

II.3.- METHANISATION DU MELANGE FEUILLES DE CHOUX-FLEURS-GAZON

Cet essai a été réalisé afin d'évaluer les potentialités de formation de méthane à partir d'un mélange de résidus. La matière organique provient pour 41% des feuilles de choux-fleurs et pour 59% du gazon. Ce mélange a été méthanisé avec un rendement de production en méthane de 0,24 l/g M.V. introduite (ou dégradée) (Tableau XV), lequel est analogue à celui observé sur les feuilles de choux-fleurs.

II.4.- METHANISATION DES RACINES D'ENDIVES

Après adaptation des boues d'un digesteur mésophile, nous avons effectué deux cinétiques de dégradations discontinues de racines d'endives. Nous avons reproduit, figure 24, les variations de concentration en A.G.V. et les volumes de biogaz et de méthane produits lors du second essai. Les principaux résultats obtenus sont reportés sur le tableau XV.

Les racines d'endives ont un rendement de production de méthane équivalent à 0,25 l/g M.V. et le rendement DCO est de l'ordre de 56%, ce qui laisse présager un fonctionnement correct de la méthanisation en continu. Les faibles productivités en méthane sont principalement dues à un degré d'adaptation insuffisant de la population bactérienne au nouveau substrat utilisé.

II.5.- METHANISATION DES LENTILLES D'EAU

Les lentilles d'eau n'ont pas été broyées, contrairement aux résidus précédents. Les particules de 2 à 3 mm ont été considérées comme étant d'une taille acceptable pour un traitement biologique.

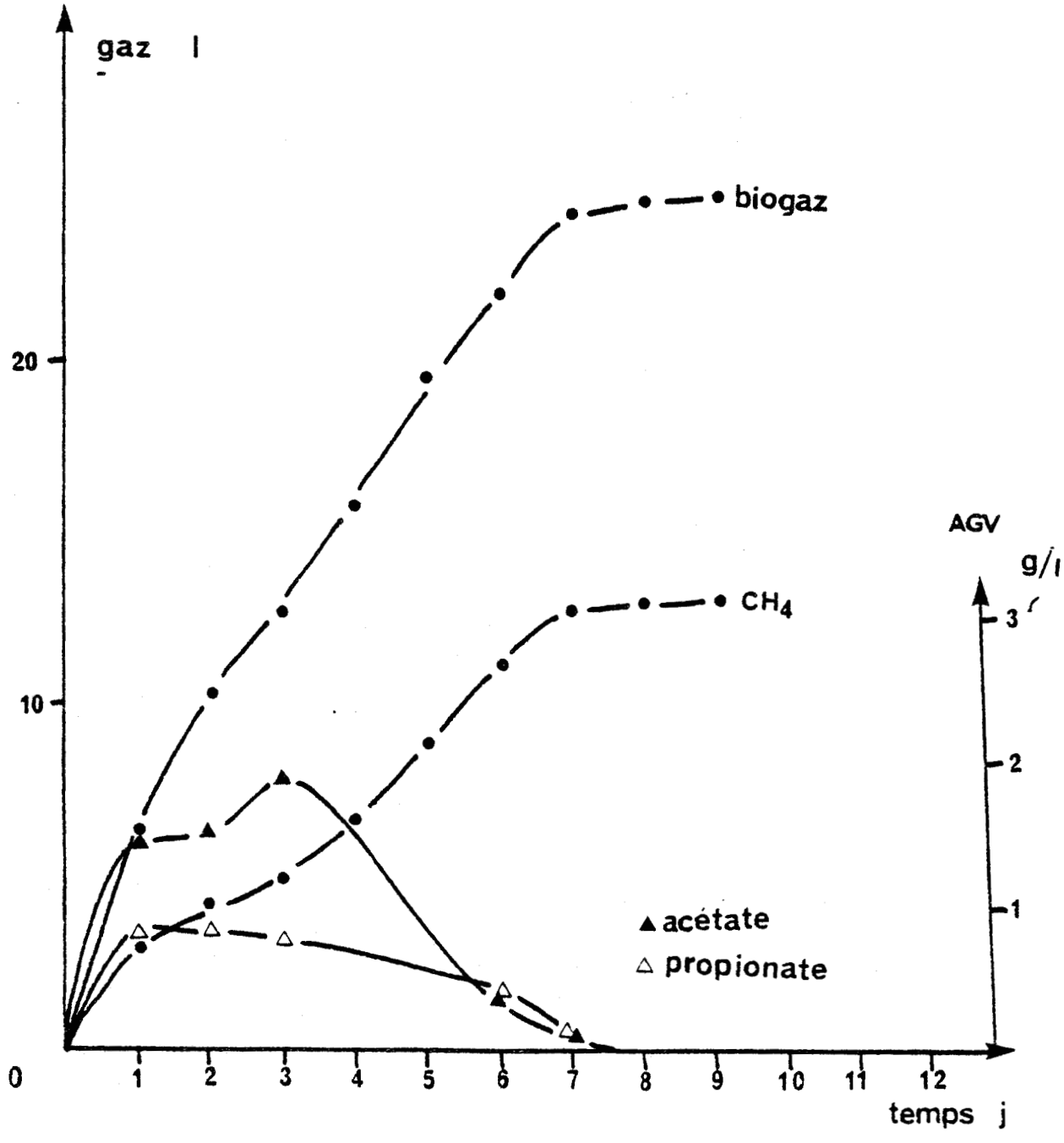


Figure 24 : Variations des volumes de biogaz et de méthane formés ainsi que de la concentration en AGV lors de la fermentation discontinue des racines d'endives.

Dans le réacteur, les lentilles d'eau ont tendance à flotter et il a été nécessaire d'augmenter la vitesse d'agitation afin de les répartir de manière homogène. Introduits sous cette forme, ces végétaux n'ont produit qu'une très faible quantité de gaz. Le rendement DCO obtenu après 7 jours d'essai est de 6,5% (Tableau XV).

Les lentilles d'eau non broyées ont donc une potentialité de production de méthane très faible. Nous avons essayé d'améliorer la biodégradabilité en réalisant un broyage préalable. Ceci a été effectué lors des essais en continu.

II.6.- CONCLUSION

Les feuilles de choux-fleurs, le gazon et les racines d'endives peuvent générer du méthane avec un rendement DCO de l'ordre de 50%. En première approximation, on peut en déduire que la moitié des matières organiques introduites sont dégradées avec des rendements de production voisins de 0,25 l CH_4/g M.V. ajouté.

Travaillant sur un matériel végétal quelque peu différent par sa haute teneur en lignine, JERGER et al. (1982) obtiennent en discontinu mésophile (35°C) 0,31 l CH_4/g M.V. pour le peuplier hybride alors que d'autres espèces ligneuses ont des rendements de production compris entre 0,21 et 0,26 l CH_4/g M.V., ceci avec des pourcentages de réduction de matières volatiles assez variables (32-57%).

Par contre, les lentilles d'eau non broyées ont une biodégradabilité extrêmement faible par rapport aux autres substrats.

En ce qui concerne les A.G.V., l'accumulation d'acétate indique une vitesse de dégradation limitante de ce composé. Plus généralement, l'apparition d'A.G.V. en début de culture permet l'hypothèse suivante : seule la partie soluble et les polymères facilement biodégradables des résidus végétaux sont utilisés pour former le biogaz. La productivité reflète non seulement la dégradabilité du substrat, mais aussi le niveau d'adaptation des boues au substrat.

Ceci permet de prévoir des productivités plus élevées lors de la méthanisation en continu de ces résidus, après une première phase d'adaptation de la population bactérienne hydrolytique.

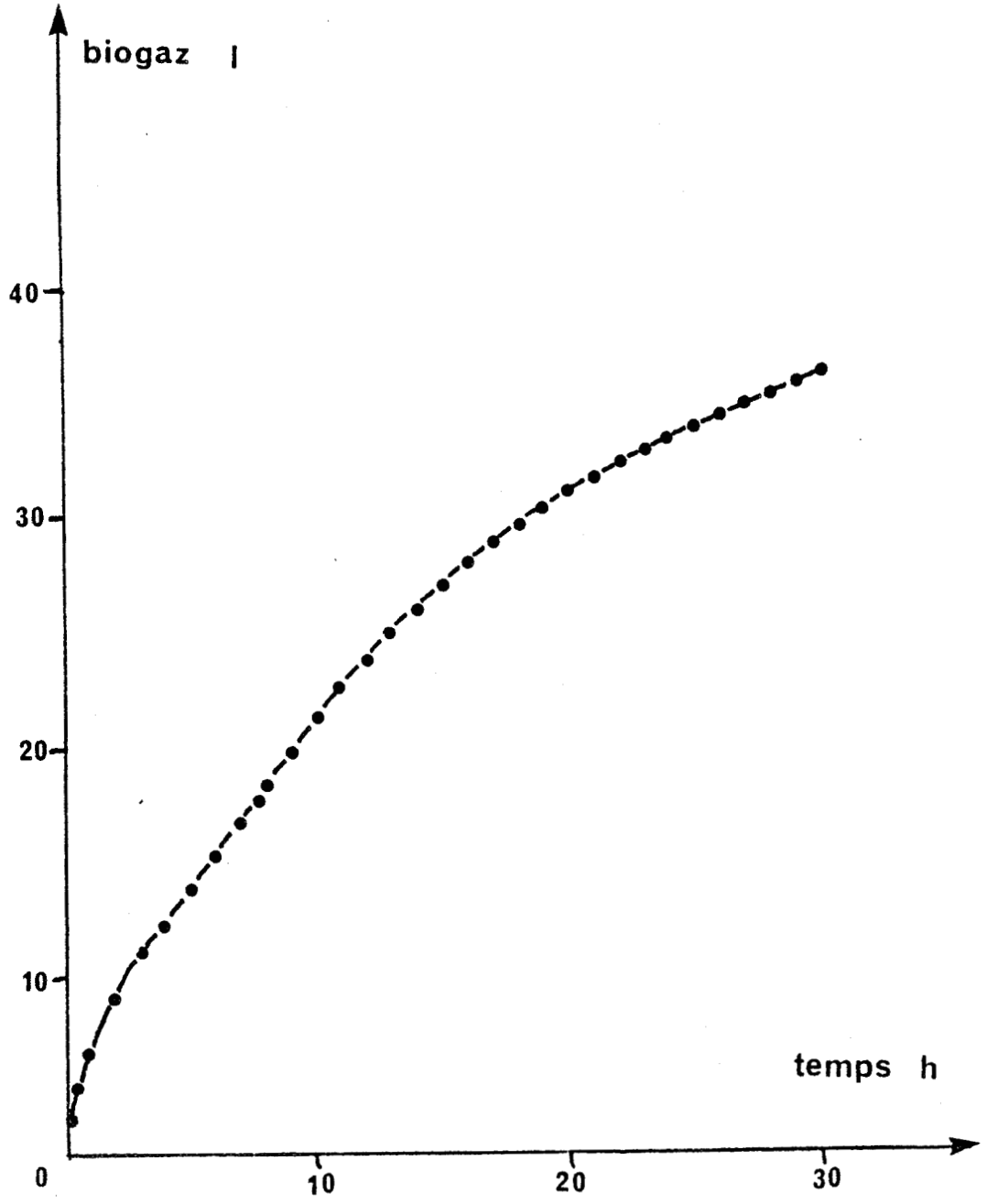


Figure 25 : Cinétique du dégagement gazeux correspondant à une charge (2,5 gMV/1.j) lors de la fermentation des racines d'endives en continu.

III.- DEGRADATION DES RESIDUS VEGETAUX EN CONTINU AVEC DILUTION DE LA CHARGE

Lors de ces essais, le matériel végétal, broyé et dilué au tiers (cf. chapitre Matériel et Méthodes) est introduit quotidiennement dans le fermenteur ; simultanément, le même volume de contenu de digesteur est soutiré.

Le temps de séjour est diminué, à concentration de M.V. constante, jusqu'à ce que l'on observe une accumulation d'A.G.V. La charge journalière correspondante est ainsi définie comme la charge volumique maximale admissible (g M.V./l.j).

III.1.- RACINES D'ENDIVES

Dans ce cas, à partir de 2 g M.V./l.j la charge journalière a été répartie en deux alimentations à 09h.00 et à 17h.00. En effet, une étude cinétique a montré que près de la moitié de la quantité de gaz totale (dégagée en 24 heures) est produite dans les huit premières heures (Figure 25). De plus, le fait de procéder à deux alimentations par jour évite une accumulation transitoire massive d'A.G.V. dans les boues. La charge a été augmentée régulièrement jusqu'à 3 g/l.j pendant les 35 premiers jours (Figure 26). A cette charge, il a été observé une apparition d'A.G.V. résiduels (0,87 g/l dont 0,15 g/l d'acétate et 0,65 g/l de propionate). Durant cette période, la concentration en ammoniaque dans le réacteur était très faible (Figure 27).

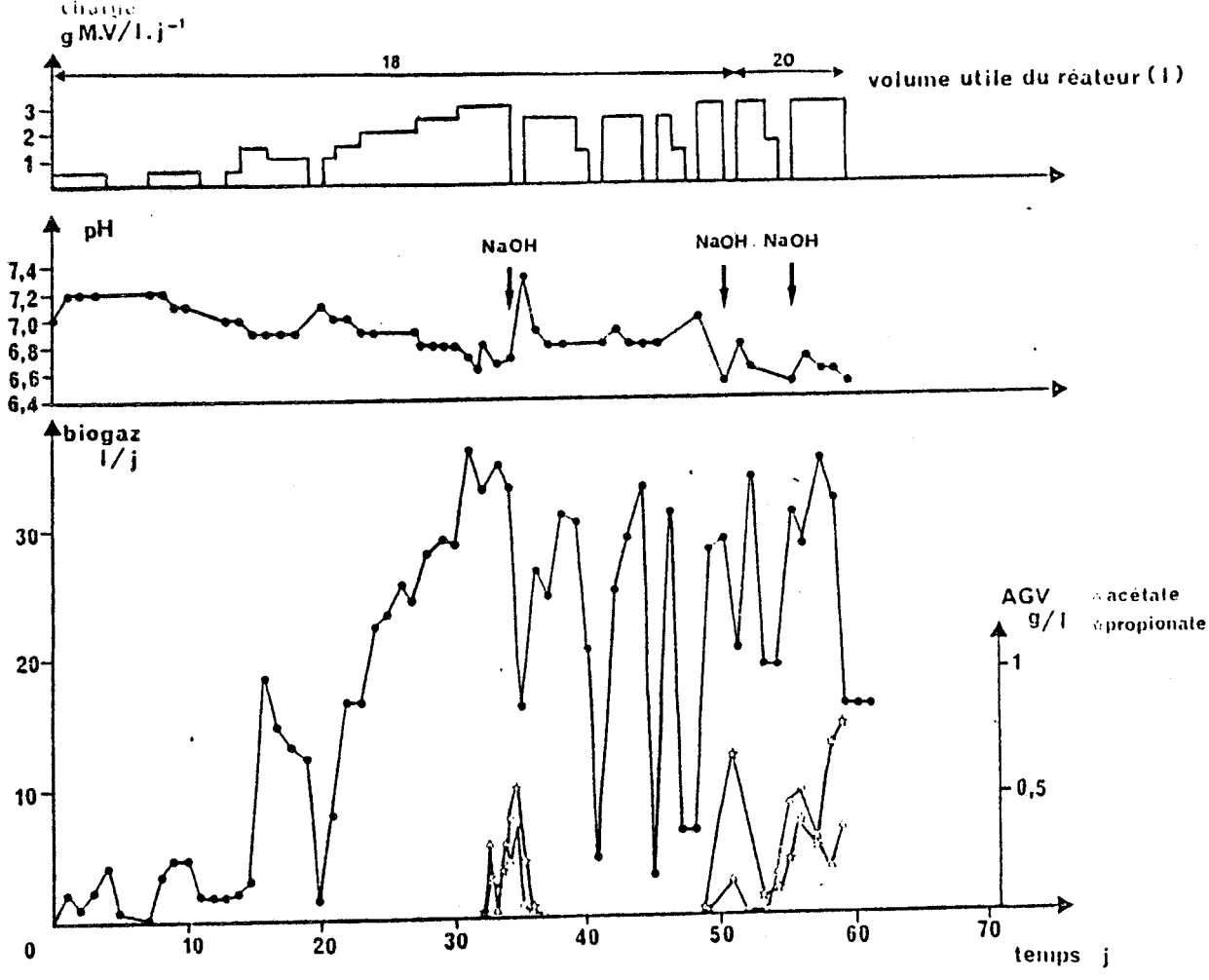


Figure 26 : Fermentation des racines d'endives avec dilution de charge

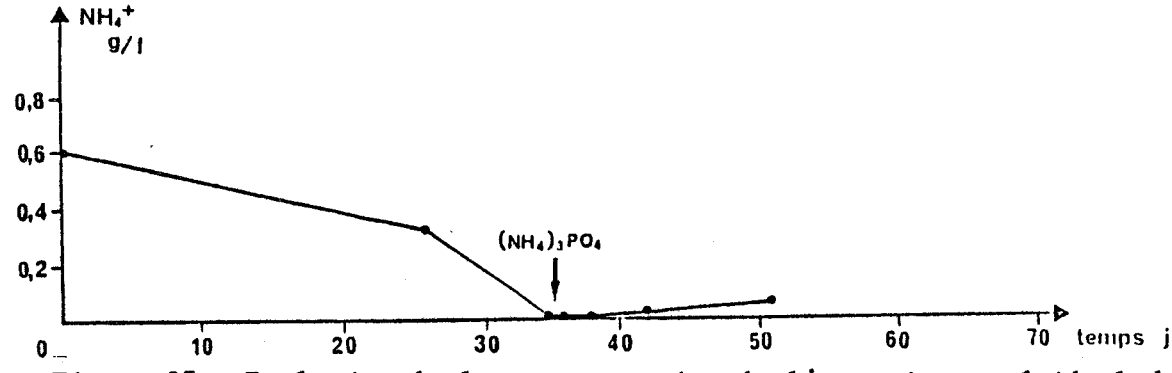


Figure 27 : Evolution de la concentration de l'ammoniaque résiduel des boues lors de la fermentation des racines d'endives.

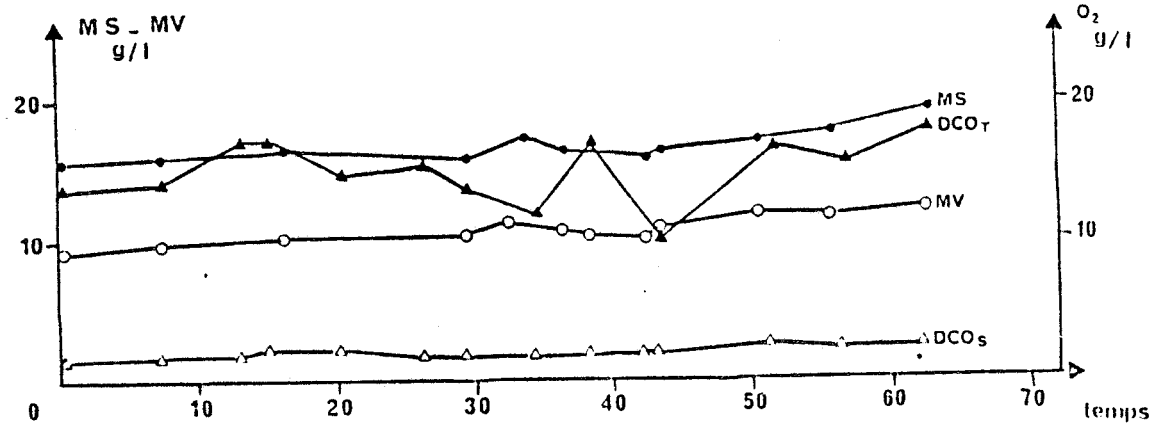


Figure 28 : Evolution de la concentration en matiéres sèches et matières volatiles, ainsi que de la DCO des boues lorsde la fermentation des racines d'endives.

Afin de vérifier si l'absence de NH_4^+ n'est pas responsable de cette mauvaise dégradation des A.G.V., la charge a été diminuée à 2,5 g M.V./l.j et supplémentée en $(NH_3)_2HPO_4$ (0,165 g/l.j) de manière à obtenir un rapport DCO/N/P/ de 350/5/1. La concentration résiduelle en A.G.V. a immédiatement régressé pour se stabiliser à l'état de traces. Les jours de non alimentation il n'y avait pratiquement pas de dégagement gazeux. Par contre, lorsque la charge a été de nouveau portée à 3 g M.V./l.j, ces mêmes périodes étaient sujettes à une production importante de biogaz, ce qui laisse supposer une accumulation transitoire de matières organiques dans le réacteur (A.G.V. en particulier, cf. Figure 26) et un stripping des bicarbonates qui explique la production importante de biomasse.

Bien que la concentration en NH_4^+ soit légèrement remontée, une charge de 3 g M.V./l.j avec le même rapport DCO/N/P s'est traduite par une accumulation d'A.G.V. au 60ème jour (acétate 0,35 g/l ; propionate 0,48 g/l).

Le pH est resté légèrement acide malgré de fréquentes neutralisations à la soude. Cette acidité est à relier à la faible concentration en ions ammonium du réacteur.

Pendant toute la durée de la culture continue, la concentration en matières sèches du digesteur est pratiquement restée constante à 16 g/l, dont 11 g/l de matières volatiles. La DCO totale en sortie a varié entre 10 et 18 g O_2/l ; la DCO soluble reste dans une gamme de 1,4 à 2,3 g O_2/l (Figure 28).

Juste après addition de la charge, le pourcentage de CH_4 est de 48% environ et monte rapidement pour atteindre 55% après 24 heures.

Par contre, le rapport $CH_4/CH_4 + CO_2$ reste voisin de 54%. La baisse initiale de la teneur en méthane est due essentiellement à l'introduction d'air lors de l'alimentation.

Le rendement moyen de dégradation des matières volatiles est de 73%, ce que corroborent les valeurs du rendement DCO (environ 75%).

* Discussion : La décroissance de la concentration en NH_4^+ dans les boues confirme la remarque effectuée lors de l'analyse des végétaux, où il a été noté une insuffisance de la teneur en azote des racines d'endives.

TABLEAU XVI : Principaux résultats des essais en continu sur racines d'endives avec dilution de charge.

Charge volumique (g MV/l . j)	2	2,5	3	2,5	3	
Charge massique						
g MV/g MS.j	-	0,158	0,173	0,154	0,165	
g MV/g MV.j	-	0,239	0,265	0,238	0,253	
Volume utile du digesteur	18	18	18	18	18	20
MS des boues (g/l)	-	15,76	17,30	16,20	18,13	
MV des boues (g/l)	-	10,42	11,30	10,51	11,83	
Production de biogaz (l/j)	23,8	28,5	34,25	28,8	28,5	34,5
Méthane (%)	55	53	55	54	52,5	
Productivité (l/l .j)						
* Biogaz	1,32	1,58	1,91	1,60	1,65	
* Méthane	0,73	0,84	1,04	0,86	0,86	
Rendement de production (l/g MV)						
* Biogaz	0,66	0,63	0,63	0,64	0,54	
* Méthane	0,36	0,34	0,35	0,34	0,29	
Rendement DCO	80	75,5	78	75,5	64,5	
Dégradation de la MV (%)	-	75	73	75	72	
Temps de séjour (j)	21	16	15	16	15	

Ces résultats sont des valeurs moyennes, déterminées pour une même charge

Les rendements et les productivités moyens aux charges les plus élevées sont représentés sur le tableau XVI.

On observe une production moyenne de 0,61 m^3 de biogaz par kg de matières organiques ajouté, dont 0,33 m^3 de méthane (taux moyen de CH_4 = 54%).

Les rendements DCO sont relativement élevés et le procédé transforme 70 à 80% l'énergie chimique en méthane.

L'addition de 2,5 g M.V./l.j est la charge volumique maximale que peuvent admettre les boues de ce réacteur sans apparition d'A.G.V. résiduels. La charge massique applicable est de 0,16 g M.V./g M.S.j pour un temps de rétention de 16 jours et une concentration en susbtrat de 42,5 g M.V./l.

Pour une meilleure maniabilité de ces données le tableau XVII présente ces valeurs, ramenées à la quantité de matières fraîches.

* Conclusion : Les racines d'endives constituent un substrat facilement biodégradable à 70%.

Néanmoins, la méthanisation de ce composé nécessite une supplémentation en azote. L'addition simultanée d'un substrat riche en cet élément devrait permettre un meilleur équilibre du processus.

III.2.- FEUILLES DE CHOUX-FLEURS

* Déroulement de l'essai et résultats : Les principaux résultats sont portés figures 29 et 30.

La concentration moyenne en M.V. du substrat est de 34 g/l.

La charge journalière est apportée par une seule alimentation dans le digesteur, le débit gazeux étant plus régulier que lors des essais sur racines d'endives.

La charge a été montée régulièrement jusqu'à 2 g M.V./l.j (Figure 29) où est alors notée l'apparition d'A.G.V. (1,47 g/l dont : 1,08 G/l d'acétate et 0,30 g/l de propionate).

Charge volumique maximale		19,5 kg MF/m^3.j
Charge massique	Matières sèches	1,25 kg MF/kg MS.j
	Matières volatiles	1,95 kg MF/kg MV.j
Rendement de production	Biogaz	0,078 m^3/kg MF
	Méthane	0,042 m^3/kg MF
Temps de séjour		16 jours

TABLEAU XVII

Données concernant la méthanisation en continu des racines d'endives par rapport à la matière fraîche

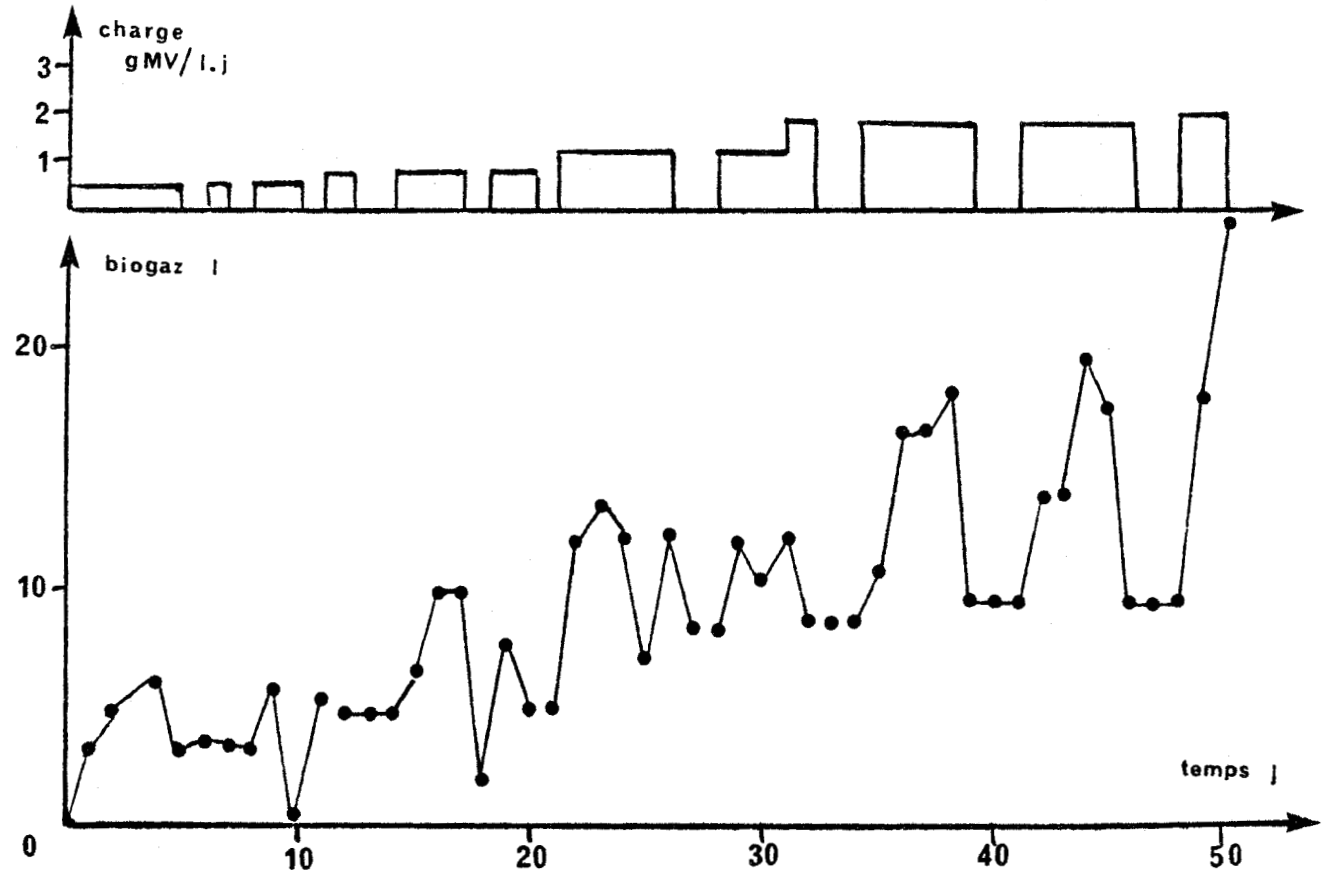


Figure 29 : Fermentation des feuilles de choux-fleurs

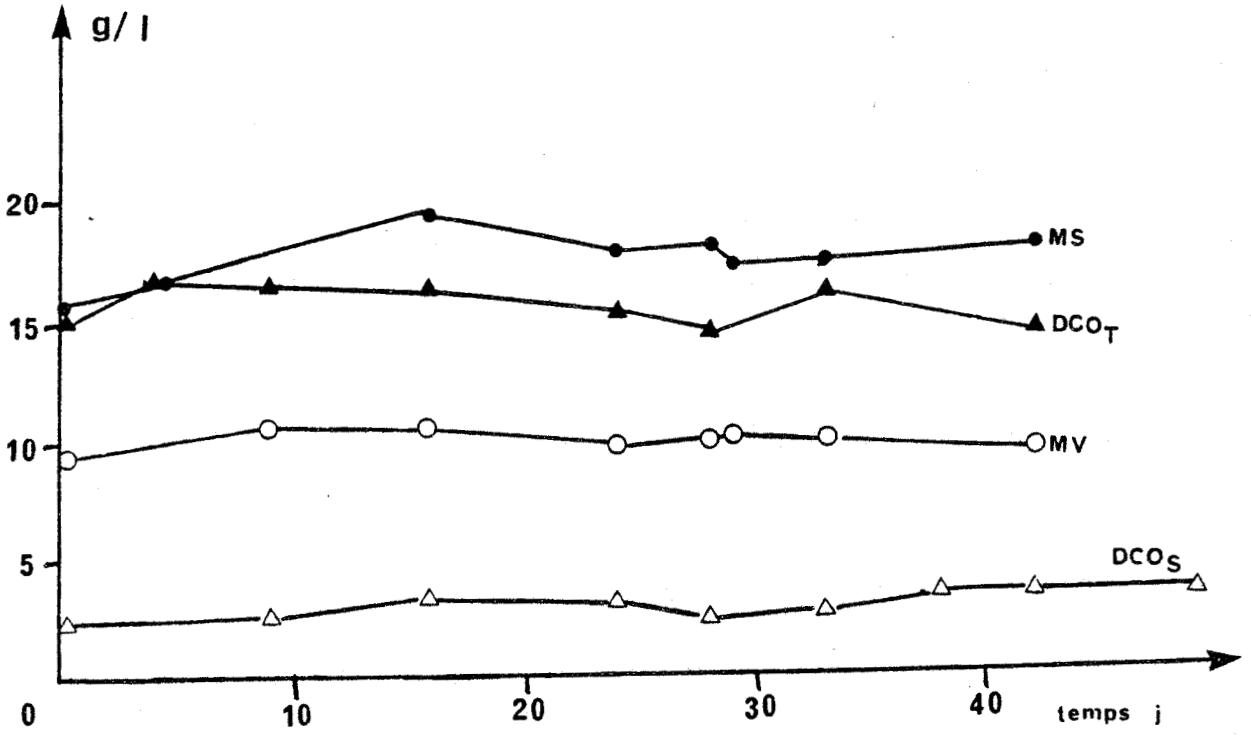


Figure 30 : Evolution des concentrations en matières sèches et matières volatiles, ainsi que de la DCO des boues de fermentation de fermentation des feuilles de choux-fleurs.

TABLEAU XVIII : Principaux résultats des essais en continu sur feuilles de choux-fleurs

Charge volumique (g MV/l. j)	0,5	0,8	1,2		1,8	2
Charge massique						
g MV/g MS.j	0,032	0,041	0,068		0,100	0,132
g MV/g MV.j	0,053	0,075	0,120		0,188	0,258
Volume utile du digesteur (l)	16	16	16	18	18	18
MS des boues (g/l)	15,6	19,4	17,7		18,1	15,1
MV des boues (g/l)	9,3	10,6	10,0		9,6	7,8
Production de biogaz (l/j)	3,50	9,25	12,57	12,70	15,68	21,75
Méthane (%)	52,5	56,5	54	55,5	55,5	53
Productivité (l/l .j)						
* Biogaz	0,218	0,578	0,785	0,705	0,871	1,208
* Méthane	0,115	0,327	0,422	0,391	0,483	0,640
Rendement de production (l/g MV)						
* Biogaz	0,437	0,722	0,654	0,588	0,484	0,604
* Méthane	0,115	0,409	0,362	0,326	0,268	0,320
Rendement DCO	25,5	90	80	72	60	71
Dégradation de la MV (%)	73	69	70		72	77
Temps de séjour (j)	40	32	26		18	15

NB : Ces résultats sont des valeurs moyennes, déterminées pour une même charge

Les productions de gaz sont reportées figure 29. D'une manière générale, les périodes de non-alimentation se caractérisent par une production de biogaz non négligeable en l'absence d'A.G.V. résiduels, ce qui traduit une dégradation assez lente de la partie cellulosique de ce substrat.

Le pH est resté légèrement basique (7,3 - 7,2), la concentration en ammoniaque (1 g/l) assure un bon pouvoir tampon au contenu de ce digesteur.

La teneur en matières sèches est de 18 g/l en moyenne, dont environ 55% sont constitués d'éléments minéraux.

Les valeurs de DCO sont reportées sur la figure 30.

En bonne corrélation avec la concentration en matières sèches résiduelles, la D.C.O.T. en sortie varie entre 14 et 16 g/l, alors que la D.C.O.S. est comprise entre 2,5 et 3,5 g/l.

* Discussion : Le tableau XVIII présente les rendements et productivités moyens pour les différentes charges appliquées.

Le rendement de production est de 0,58 m^3 de biogaz par kilogramme de matière organique ajouté. Avec un pourcentage de méthane dans le biogaz de 55% ceci correspond à 0,32 m^3 CH_4/kg M.V. D'après les valeurs des rendements énergétiques, il apparaît qu'approximativement les 2/3 de l'énergie chimique des feuilles de choux-fleurs sont récupérés sous forme de méthane, ce qui recoupe bien le taux de dégradation des matières organiques (70%).

La charge volumique maximale admise par les boues de ce réacteur est de 1,8 g M.V./l.j.

La charge massique maximale applicable est de 0,10 g M.O./g M.S.j ou de 0,19 g M.O./g M.V.j si on l'exprime par rapport à la matière volatile, et ceci pour un temps de séjour de 18 jours.

* Conclusion : Les feuilles de choux-fleurs constituent un substrat apte à la méthanisation.

Le NH_4^+ résiduel confère un bon pouvoir tampon et un pH correct au contenu du fermenteur.

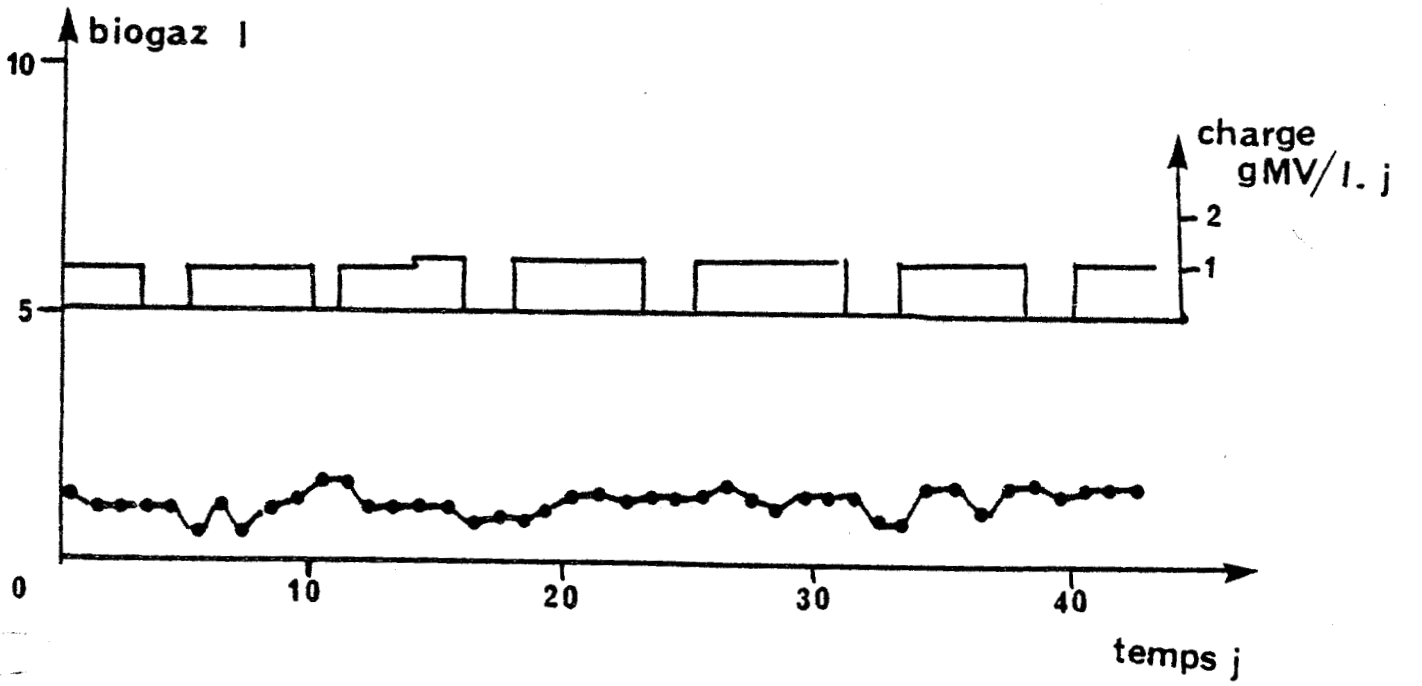


Figure 3I : Fermentation des lentilles d'eau.

III.3.- LENTILLES D'EAU

* Déroulement de l'expérience et résultats : Nous rappelons que dans ces expériences, les lentilles d'eau sont broyées après dilution de moitié. La concentration en matières organiques du substrat est de 22,8 g/l en moyenne.

L'expérience a été arrêtée au bout de 40 jours (Figure 31) à la charge volumique 1 g/l.j, cette alimentation étant réalisée en une seule fois.

Les boues possèdent une concentration en azote ammoniacal variant de 0,6 à 0,7 g/l, avec un pH sensiblement constant à 7,2.

Leur teneur en matières sèches se situe à 12 g/l environ dont 8 g de M.V.

* Discussion : A la charge de 1 g M.O./l.j correspond une productivité de 0,075 l de biogaz/l.j (51% de CH_4) à peine supérieure à celle de la charge précédente de 0,8 g M.O./l.j (0,058 l/l.j) (Tableau XIX). Ces valeurs, très inférieures à celles obtenues avec les substrats précédents traduisent une faible dégradation des lentilles d'eau en anaérobiose, hypothèse confortée par l'absence d'A.G.V. résiduels dans les boues, et ceci malgré des paramètres de fonctionnement (pH, ...) corrects.

Il s'agit donc d'un problème situé au niveau de la phase d'hydrolyse et de fermentation, le pré-traitement utilisé (broyage) ne s'avérant pas suffisant pour permettre une bonne récupération de l'énergie.

Cependant, le faible rendement DCO (8%) était sans doute prévisible si on considère le biotope aquatique de ces végétaux, entraînant nécessairement des aptitudes à résister à la dégradation en milieu aqueux soit par des barrières physiques (constitutions des parois) soit par émission de substances bactériostatiques. Les travaux de ANGRAND (1980) semblent confirmer cette dernière hypothèse.

BROUARD (1983) obtient des résultats équivalents et constate une mauvaise acidogenèse sur des expériences en batch ainsi qu'un échec de la fermentation en continu. Il émet l'hypothèse d'une inhibition par l'abondante matière colorante de type polyphénol libérée dans le

TABLEAU XIX : Résultats de méthanisation en continu de lentilles d'eau broyées

Charge volumique (g MO/l.j)	0,8	1
Charge massique g MV/g MS.j g MV/g MV.j	 0,069 0,104	 0,082 0,125
Volume digesteur (l)	16	16
M.S. (g/l)	11,60	12,17
M.V. (g/l)	7,67	8,00
Biogaz (l/j)	0,93	1,21
Méthane (l/j)	0,47 (50,5%)	0,62 (51%)
Productivité * Biogaz * Méthane	 0,058 0,029	 0,075 0,038
Rendement de production * Biogaz * Méthane	 0,072 0,036	 0,075 0,038
Rendement DCO	8	8,5
T.S.H.	29	23
NH_4^+ (g/l)	0,6-0,7	
DCO_T moyenne	9,66	(7,78-10,12)

milieu. En analogie avec ceci, LANE (1980) démontre la toxicité du limonène et de la fraction non volatile des huiles essentielles de citron envers le processus de fermentation anaérobie. Si ceci s'avère exact, le broyage ne ferait qu'accentuer le relargage de cette substance et ainsi, augmenter la toxicité.

IV.- DEGRADATION DES RESIDUS VEGETAUX EN CONTINU SANS DILUTION DE CHARGE

De manière à augmenter le temps de séjour et ainsi, d'élever la productivité, des essais en continu sans ajout d'eau à la charge ont été appliqués à deux substrats : gazon et endives.

IV.1.- ESSAIS SUR GAZON

* Déroulement de l'essai et résultats : L'ensemencement initial a été réalisé à partir des boues du digesteur sur choux-fleurs, dont les caractéristiques sont les suivantes :

M.S. : 28,25 g/l

M.V. : 12,07 g/l

NH_4^+ : 1,04 g/l

La charge a été augmentée régulièrement jusqu'à 2,5 g M.V./l.j (Figure 32). A cette charge, des A.G.V. résiduels sont apparus en concentration croissante. L'alimentation a été ramenée ensuite à 2,2 g/l pendant deux semaines, période pendant laquelle les dosages d'A.G.V. se sont révélés négatifs.

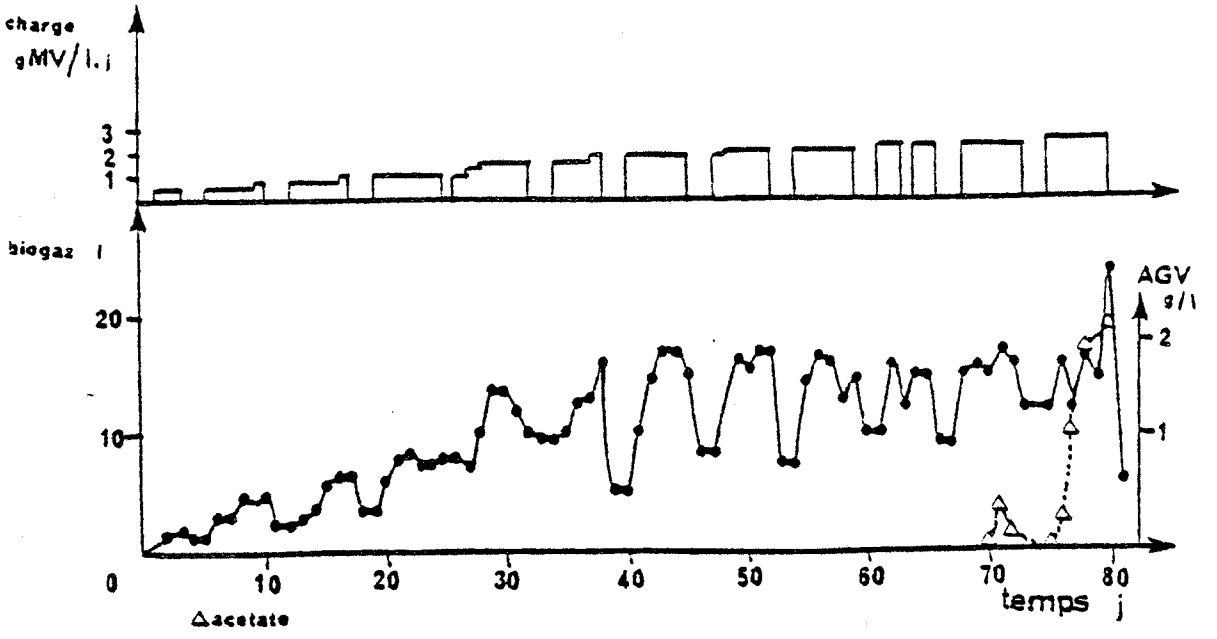


Figure 32 : Fermentation du gazon.

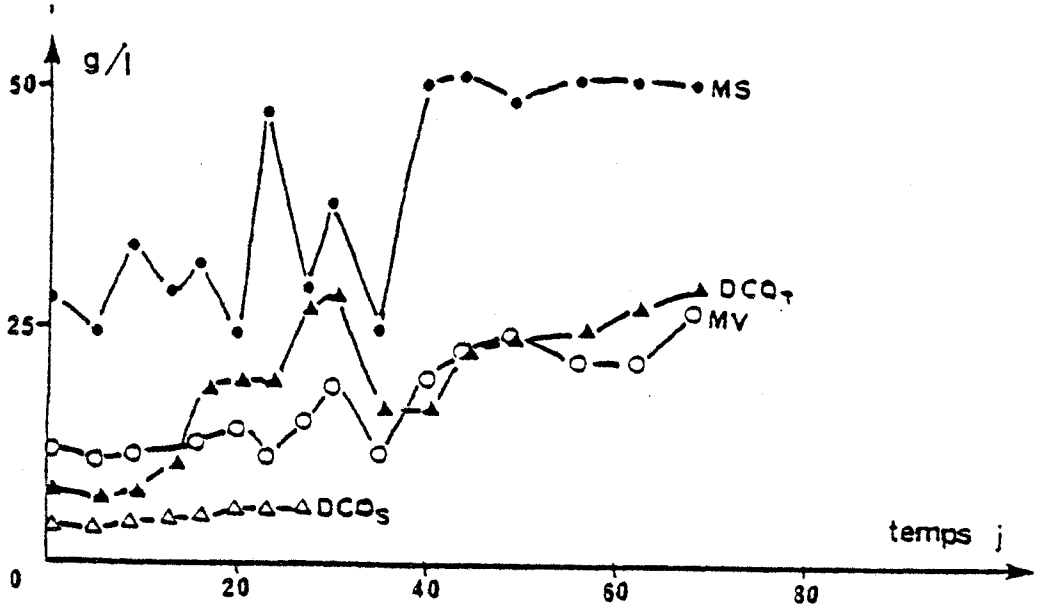


Figure 33 : Evolution des concentrations en matières sèches et matières volatiles, ainsi que de la DCO dans les boues de fermentation du gazon.

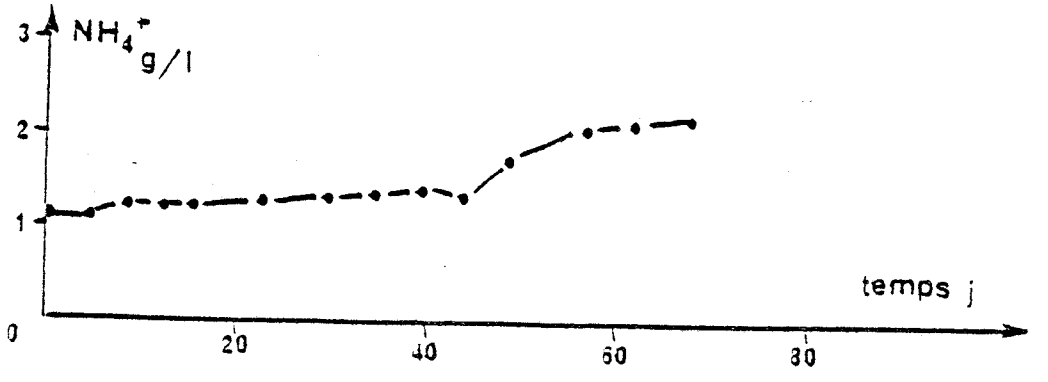


Figure 34 : Variation de la concentration en ammoniaque résiduel des boues fermentatives du gazon.

Durant les 90 jours d'expérimentation, la teneur en matière organique des boues a triplé. La DCO_S est restée relativement stable autour de 5 g/l, mais la DCO_T a suivi l'augmentation constatée avec la matière organique (Figure 33).

Le pH est resté constant à 7,2, la teneur élevée en NH_4^+ (jusqu'à plus de 2,2 g/l) ayant contribué à assurer un bon pouvoir tampon (Figure 34).

* Discussion : Le tableau XX présente les rendement et productivité moyens en fonction des différentes charges appliquées.

Les rendements de production, assez variables s'échelonnent entre 0,214 et 0,334 l/g M.V. Ces fluctuations sont vraisemblablement dues au fait que les moyennes sont calculées alors que le fermenteur n'est pas à l'équilibre. De même, la baisse de productivité observée pour la charge de 2,2 g M.O./l.j résulterait de l'état de stabilité précaire des boues, l'intervalle de temps entre chaque augmentation de charge étant largement inférieur au temps de séjour. La productivité est d'environ 1 l de biogaz/l.j. Cependant, l'augmentation de la teneur en NH_4^+ jusqu'à plus de 2 g/l pourrait présenter des risques d'inhibition.

IV.2.- ESSAIS SUR RACINES D'ENDIVES

* Déroulement de l'essai et résultats : La charge a été amenée de 1 g M.O./l.j à 3 g M.O./l.j en 80 jours. De même que pour l'essai sur endives avec dilution, c'est à cette dernière charge que de l'acétate et du propionate résiduels sont apparus dans les boues.

On peut noter que, au cours du temps, la production de gaz correspondant à des jours de non-alimentation est de plus en plus importante (Figure 35), et ceci allant de pair avec l'augmentation de matière sèche qui est passée de 27 à 37 g/l au cours de l'essai. La DCO_T s'est quasi stabilisée à 15 g/l (Figure 36) et la teneur en ammoniaque résiduel évolue autour de 0,9 g/l.

La concentration d'H_2S dans le gaz est de 0,01%.

Le pH est resté constant à la neutralité.

TABLEAU XX : Résultats de l'essai en continu sur gazon, sans dilution

Charge volumique (g MO/l.j)	1	1,5	1,8	2	2,2	2,5
Charge massique g MO/g MO.j	0,076	0,098	0,086	0,087	0,092	0,080
MO boues (g/l)	13,0	15,3	20,9	22,9	24	31,1
Productivité (l/l.j)						
* Biogaz	0,45	0,68	0,92	1	0,95	1,05
* Méthane	0,25	0,38	0,51	0,55	0,52	0,53
Rendement de production (l/g MO)						
* Biogaz	0,45	0,61	0,51	0,50	0,43	0,42
* Méthane	0,25	0,33	0,28	0,27	0,23	0,21
Temps de séjour (j)	133	89	74	66	61	53,5
Concentration en NH_4^+ (g/l)	1,23	1,33	1,37	1,93	2,17	2,06

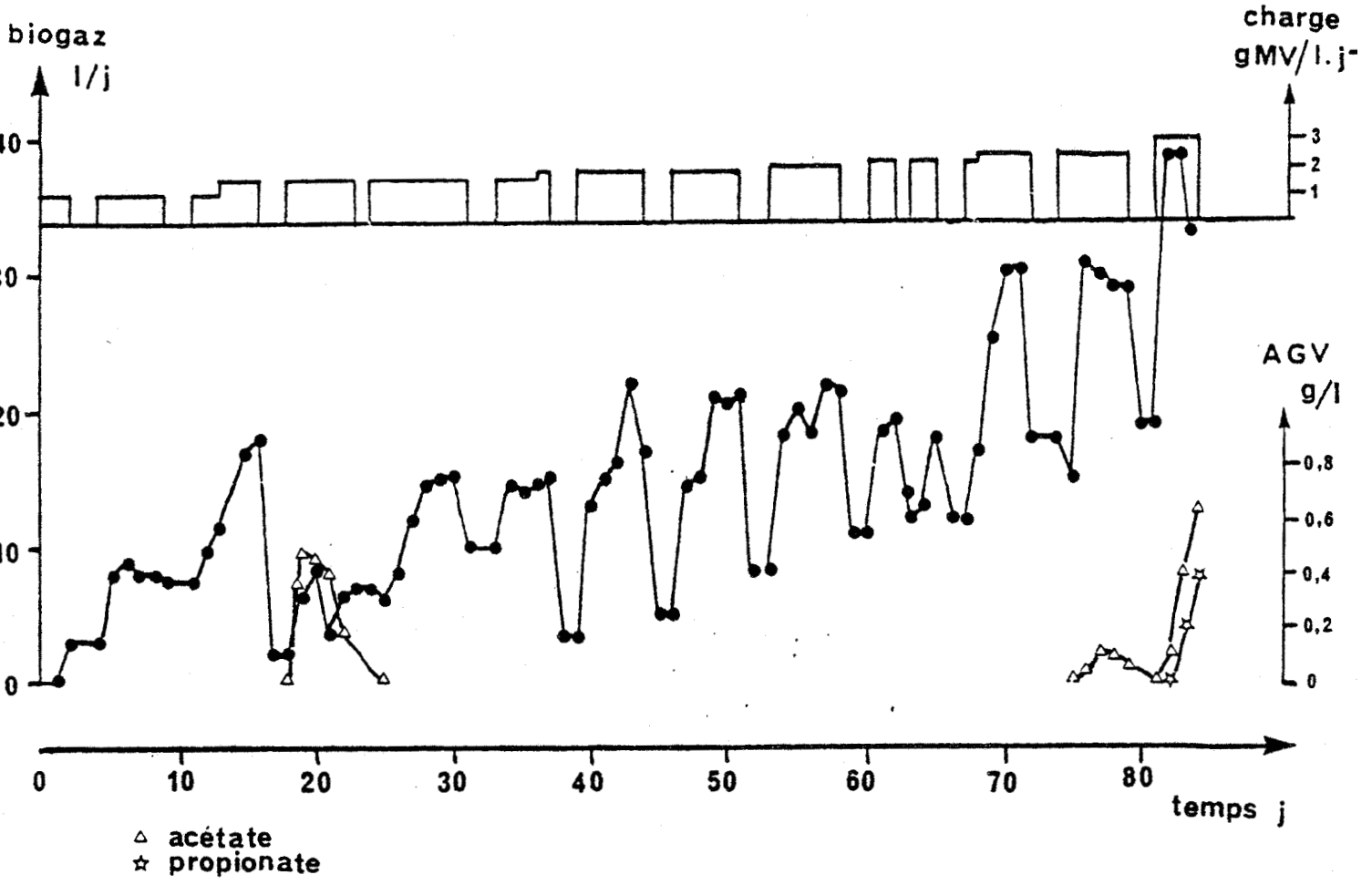


Figure 35 : Fermentation des racines d'endives sans dilution de charge.
- Production de gaz et concentration en AGV dans les boues

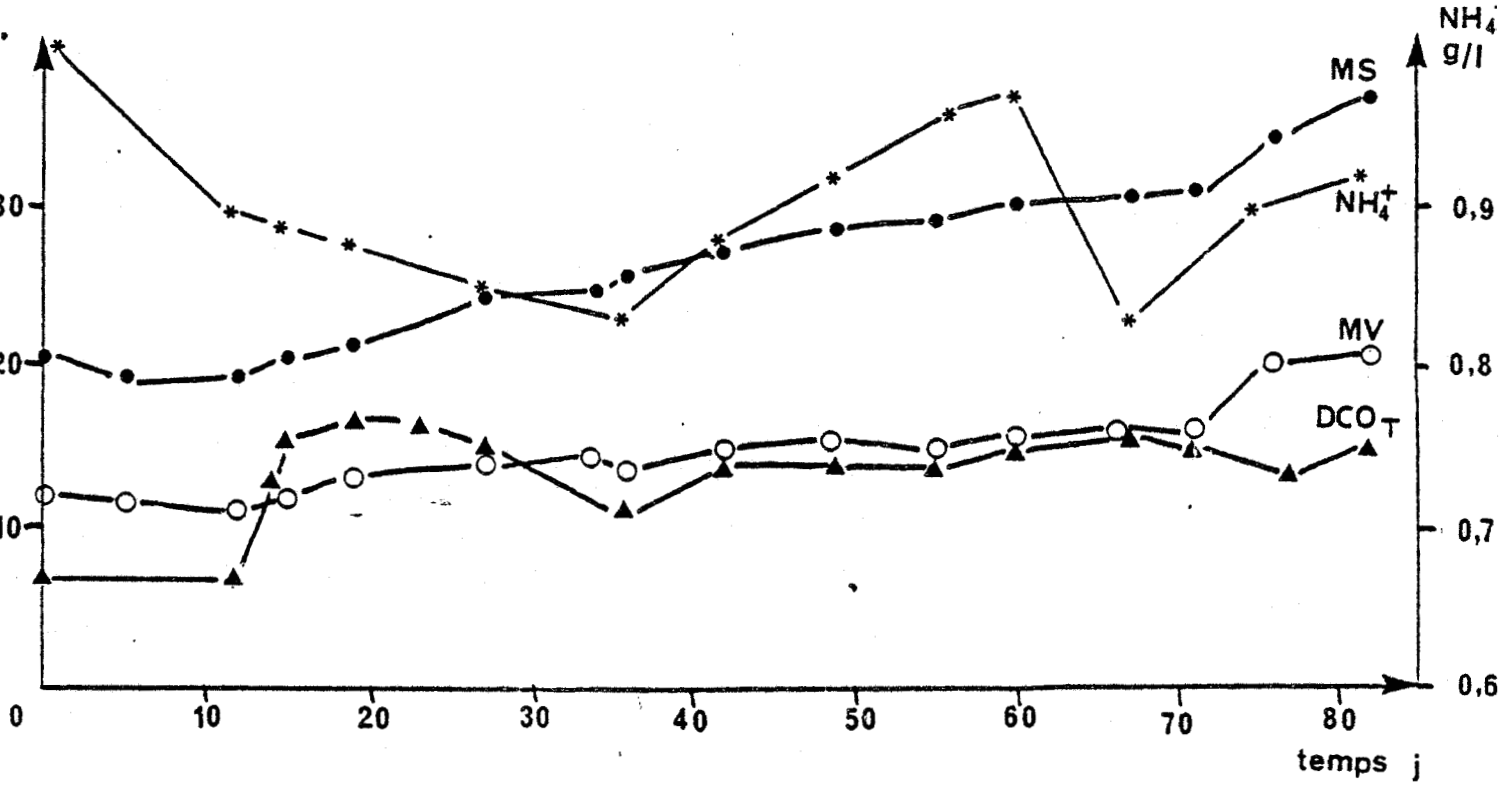


Figure 36 : Variation des concentrations en matières sèches et matières volatiles, ainsi que de la DCO dans les boues de fermentation des racines d'endives sans dilution de charge.

BUS LILLE

TABLEAU XXI

Résultats des essais en continu sur racines d'endives avec ou sans dilution

	DILUE		NON DILUE	
Charge volumique (g MO/l.j)	2,5	3	2,5	3
Charge massique (g MO/g MO.j)	0,239	0,253	0,119	0,141
M.S. boues (g/l)	15,76	18,13	37,30	37,50
M.O. boues (g/l)	10,42	11,83	20,94	21,03
Productivité (l/l.j)				
* Biogaz	1,58	1,65	1,47	1,32
* Méthane	0,84	0,86	0,81	0,72
Rendement de production (l/g MO)				
* Biogaz	0,63	0,54	0,59	0,44
* Méthane	0,34	0,29	0,32	0,24
Temps de séjour (j)	16	15	43	42,5
Concentration maximale en A.G.V.				
* Acétate	-	0,78		1,63
* Propionate	-	0,35		0,42
* Butyrate	-	-		2,10

* Discussion et conclusion : Comme l'indique le tableau XXI, pour une même charge, la variation du temps de séjour ne produit pas d'impact significatif sur la production de gaz. En effet, les productivités et rendements, quoique légèrement inférieurs dans le cas d'un temps de séjour de 43 jours, ne sont pas très éloignés des résultats obtenus avec 15 jours de temps de séjour (0,81 et 0,84 respectivement en productivité de méthane à la charge de 2,5 g M.O./l.j).

Cependant, le fait d'avoir augmenté le temps de séjour semble avoir minimisé sinon résolu le problème de la carence en ammoniaque qui ne subit pas de lessivage dans ce cas.

D'autre part, avec un tel temps de séjour, il est possible d'augmenter la charge volumique en présence d'A.G.V. résiduels sans pour cela déstabiliser le processus de méthanisation, comme le montre l'essai suivant.

V.- DEGRADATION DES RACINES D'ENDIVES EN SURCHARGE

L'essai précédent a été poursuivi durant 95 jours supplémentaires par augmentation de la charge jusqu'à 6 g M.O./l.j. C'est à cette charge que le critère de charge maximale admissible défini cette fois par la chute du pH entraînant un arrêt total de la production de gaz a été observé.

Durant cet essai, il y a eu une augmentation continuelle de la concentration en A.G.V. dans les boues (Figure 37). Il est à noter que, dès que la concentration globale dépasse un certain seuil, on observe une accumulation prioritaire de propionate avec apparition d'un peu de butyrate, contrairement au début de l'essai où le rapport acétate/propionate était plus élevé. Il convient de rappeler à cet

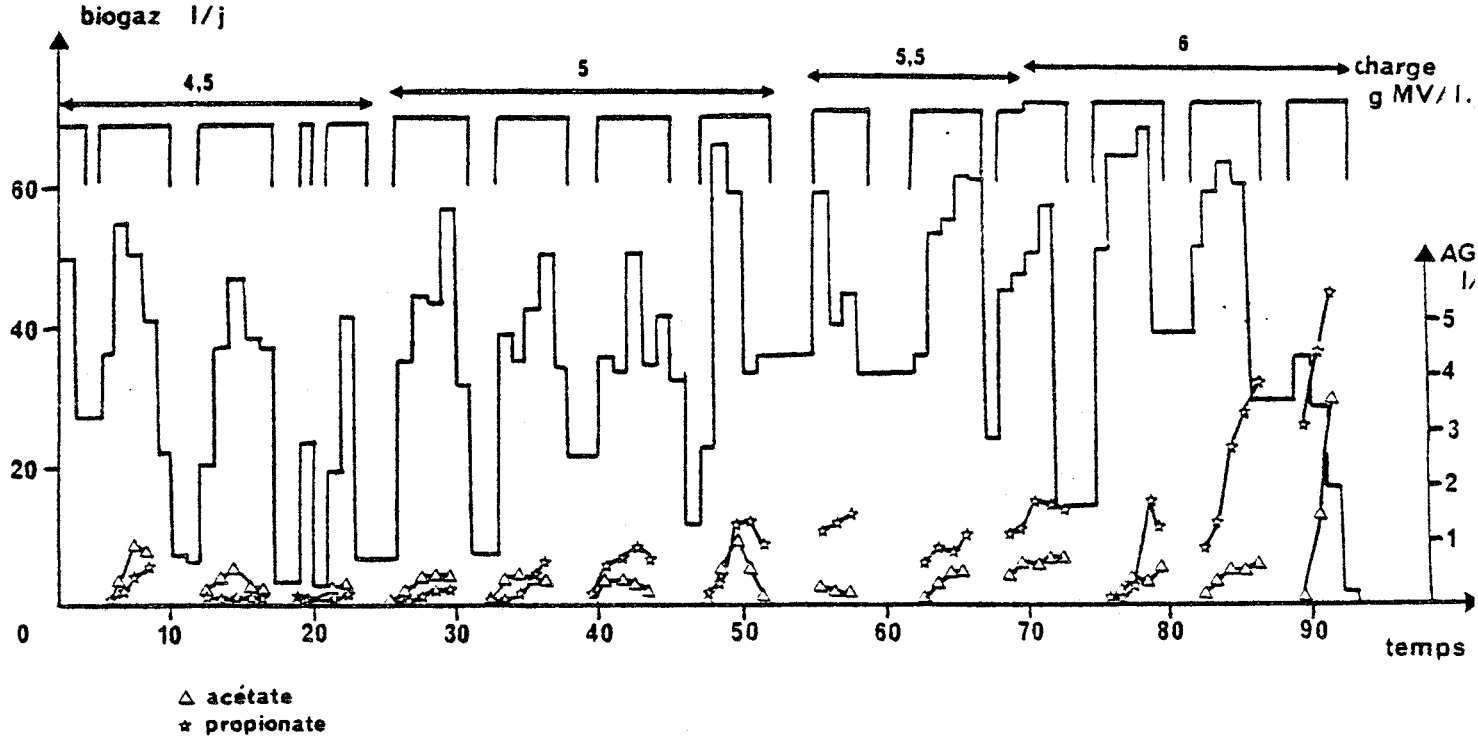


Figure 37 : Fermentation des racines d'endives avec surcharge.
Production de gaz et concentration en AGV

effet que le propionate se dégrade assez difficilement et est donc moins rapidement résorbé lors d'une diminution ou d'un arrêt de charge. La concentration en matières sèches s'est stabilisée aux environs de 46 g/l dont la moitié est constituée de matières organiques.

* Discussion : Les résultats obtenus sont exposés tableau XXII. Si on exclut la charge de 6 g M.O./l.j à 21 jours de temps de séjour pour laquelle le pH constant de 7,2 durant l'essai a chuté jusqu'à 5,7 au bout de 9 jours d'alimentation, la productivité en gaz a pu être sensiblement augmentée par rapport aux essais précédents (2,49 l de biogaz/l.j à 55% de méthane pour la charge maximale de 5,5 g/l). Par contre, les rendements de production sont plus faibles (environ 0,45 l/g M.O.), la présence d'A.G.V. résiduels et l'augmentation de la matière sèche dans les boues traduisant une perte au niveau du potentiel méthanisable.

* Conclusion : Les racines d'endives apparaissent comme le substrat le plus facilement dégradable en anaérobiose. Le problème majeur susceptible de se poser lors de leur utilisation en tant que substrat de méthanisation est leur carence azotée, entraînant un déficit en ammoniaque résiduel, lui même responsable d'un mauvais pouvoir tampon des boues. Ceci a pour conséquence une acidification du milieu et une chute de pH létale pour les bactéries méthanogènes. Ce problème, particulièrement sensible pour des temps de séjour courts ne semble pas se poser dans le cadre de cet essai qui n'occasionne pas de lessivage d'ammoniaque.

TABLEAU XXII : Résultats de l'essai en continu sur endives avec surcharge.

Volume du digesteur : 20 litres

Charge volumique (g MO/l.j)	PRODUCTION (l/j)		PRODUCTIVITE (l/l.j)		RENDEMENT DE PRODUCTION (l/g MO.j)		TEMPS DE SEJOUR (j)
	Biogaz	Méthane	Biogaz	Méthane	Biogaz	Méthane	
4	31,62	17,39	2,180	1,199	0,545	0,299	32
4,5	37,71	20,74	1,885	1,037	0,419	0,230	28,5
5	41,12	22,61	2,056	1,131	0,411	0,226	25,5
5,5	49,85	27,42	2,492	1,370	0,453	0,249	23
6 *	57,94	31,87	2,897	1,593	0,483	0,265	21,5

* calculé avant la chute de pH

RESULTATS ET DISCUSSION

Deuxième partie

ETUDE DES BOUES

Deuxième Partie : **ETUDE DES BOUES**

-

Les boues étudiées sont celles obtenues lors de l'étude de la méthanisation des racines d'endives non diluées pour des charges volumiques supérieures à 2,5 g M.V./l.j.

Après caractérisation de leurs principales particularités physico-chimiques et microbiologiques, des études cinétiques établissent leurs potentialités de dégradation et d'adaptation.

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

* I.- CARACTERISTIQUES DES BOUES *

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

I.1.- PHYSIQUES

I.1.1.- Matières Sèches - Matières Volatiles

Après une phase d'adaptation, les taux de matières sèches et volatiles se sont stabilisés, respectivement, aux environs de 46 g/l et 20 g/l, soit 56,5% de matières volatiles par rapport aux matières sèches (Figure 38).

I.1.2.- Décantation

La vitesse de décantation est déterminée d'après l'évolution, en fonction du temps, du volume occupé par les matières en suspension correspondant à 500 ml de boues (39,25 g/l M.S., 21,60 g/l M.V.) dans une éprouvette.

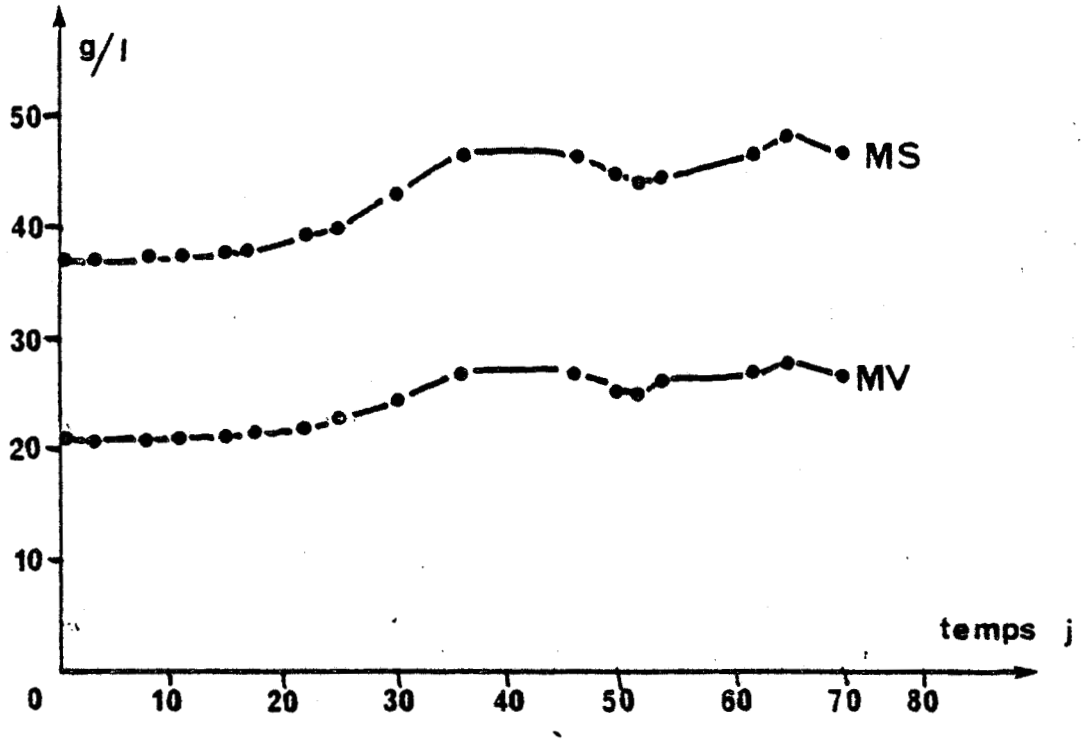


Figure 38 : Evolution des matières sèches et volatiles des boues étudiées en fonction du temps.

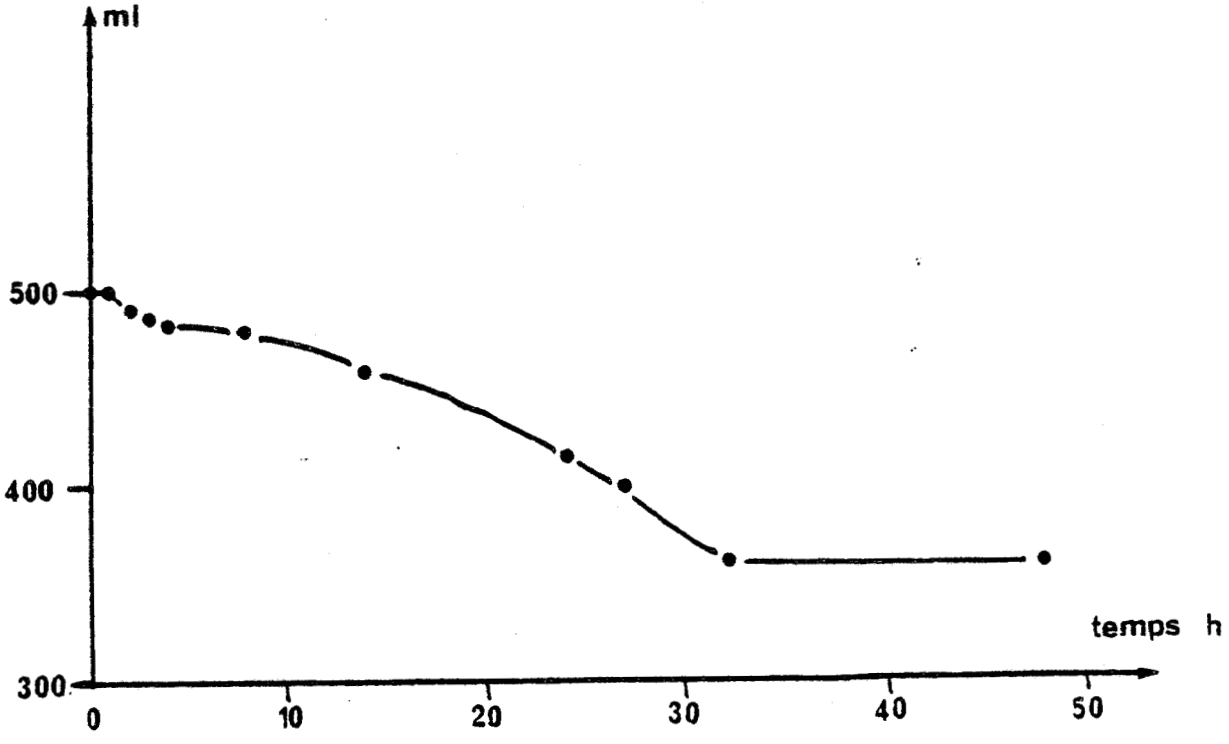


Figure 39 : Décantation des boues en fonction du temps

Après une vingtaine d'heures, des bulles de gaz entraînent une partie des particules vers la surface de contact atmosphère-liquide, aussi, une petite proportion de chloroforme a été additionnée aux boues de manière à supprimer l'activité fermentaire.

La figure 39 révèle un phénomène de décantation très lent avec une stabilisation en 32 heures et une faible sédimentation puisque, à ce moment, les matières en suspension occupent encore 350 ml/500 ml.

I.1.3.- Filtration

Les boues ont été filtrées à travers divers tamis métalliques à mailles plus ou moins serrées (0,125 à 0,800 mm de côté). Les matières sèches et volatiles ont été dosées à la fois sur le rétentat et le filtrat (Tableau XXIII).

Les résultats obtenus sont peu concluants, la variation du taux de matières sèches du filtrat par rapport au rétentat ne variant pratiquement pas en fonction des différentes mailles de tamis, en raison d'un colmatage rapide des filtres.

I.2.- CHIMIQUES

I.2.1.- pH

L'acidité des boues étudiées s'est maintenue en permanence à pH 7,2-7,3.

I.2.2.- N-P-K

Le dosage de ces éléments dans un échantillon de boues à 48,3 g/l de M.S. a donné les résultats suivants :

* Azote total : 4,08 g/l dont 1 g/l d'azote ammoniacal
* Potassium : 6,42%)) /M.S.
* Acide phosphorique : 2,88%)

TABLEAU XXIII : FILTRATION DES BOUES D'ENDIVES

maille du filtre(mm)	0,125		0,160		0,250		0,400		0,800	
g/l	M.S.	M.V.	M.S.	M.V.	M.S.	M.V.	M.S.	M.V.	M.S.	M.V.
Rétentat (R)	52,57	32,94	55,53	33,66	57,67	34,93	69,65	45,60	74,54	51,62
Filtrat (F)	37,79	21,24	39,94	22,44	38,35	21,68	42,22	23,73	46,69	28,48
% (F/R)	71,88		71,92		66,49		60,61		62,63	

Azote total : 4,08 g/l
Potassium : 6,42%)
Acide phosphorique : 2,88%)) M.S. : 51,21 g/l

I.3.- MICROBIOLOGIQUES (N.P.P.)

Les dénombrements ont été effectués à partir de deux digesteurs mésophiles, l'un alimenté par des racines d'endives (16,5% d'hémicellulose) et l'autre alimenté par du gazon (20,6% d'hémicellulose, 23,5% de cellulose) (Tableau XXIV).

Tous les substrats ont été fermentés dans une fourchette de dilution de 10^{-5} à 10^{-11} (Tableau XXV).

Le dénombrement comparatif des deux écosystèmes sur papier filtre révèle la nature peu cellulolytique des boues d'endives ($11,5/10^{5}$ bactéries/ml), d'autant que le papier filtre des flacons positifs était seulement délité indiquant une mauvaise dégradation.

Par contre, dans les deux cas, la flore hémicellulolytique apparaît dans des concentrations équivalentes à la flore fermentative totale dénombrée sur oses. On observe notamment une très forte croissance bactérienne sur glucomannane en ce qui concerne les boues d'endives ($20/10^{10}$ bactéries/ml).

Par ordre d'assimilation décroissante, les oses se rangent dans l'ordre suivant : glucose, xylose, mannose, arabinose.

Les bactéries méthanogènes n'ont pas fait l'objet d'un dénombrement spécifique, cependant, il a été mis en évidence du méthane de réduction jusqu'à la dilution 10^{-7} lors des dénombrements sur glucose à partir des boues de gazon. Pour ce qui est des boues d'endives, du méthane a été détecté uniquement dans les flacons de dilution 10^{-5} et 10^{-6} du glucomannane, en relation avec l'observation microscopique de quelques formes sarcines présentes dans ces flacons.

Tous les substrats se dégradent essentiellement en acétate et propionate avec des traces de butyrate en concentration un peu plus élevée toutefois sur papier filtre (0,11 g/l).

Les plus fortes concentrations en propionate sont observées sur papier filtre (1,07 g/l) et glucose (1,99 g/l). Pour l'acétate, il s'agit du xylose et de la pectine (supérieure à 1 g/l).

La présence de lactate (supérieure à 2 g/l) a été détectée sur les sucres simples excepté le xylose.

TABLEAU XXIV : DENOMBREMENTS BACTERIENS

-*-*-

SUBSTRATS	BOUES D'ENDIVES	BOUES DE GAZON
Glucose	$11,5.10^{10}$ *	$6,5.10^{9}$
Xylose	30.10^{8}	
Arabinose	$6,5.10^{8}$	
Mannose	20.10^{8}	
Xylane	$11,5.10^{8}$	$6,5.10^{9}$
Arabinogalactane	$11,5.10^{8}$	
Glucomannane	20.10^{10}	
Papier filtre Whatman N° 1	$11,5.10^{5}$	2.10^{9}
Pectine	20.10^{8}	
Amidon	-	$6,5.10^{9}$

* nombre le plus probable de bactéries

Boues	Substrats	10^{-5} ☆	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
Endives	Glucose					A, P, L	A, P, L	A, P, L
	Xylose					A, P	A, P, B	
	Arabinose				A, B, L	A, B, L		
	Mannose				A, P, L	A, P, L		
	Xylane				A, P, B	A, P		
	Arabinogalactane				A, P, B	A, P		
	Glucomannane	CH_4	CH_4		A, P	A, P		
	Papier filtre	A, P, B	A, P, B					
	Pectine				A, P, B	A, P		
Gazon	Glucose	B, A, P, CH_4	B, A, P, CH_4	B, A, P, CH_4	A, P	A, P	–	
	Xylane	B. A, P, CH_4	B, A, P	A, P	A, P	A, P	–	
	Papier filtre	A, B, P	A, B, P	A, B, P	A	A	–	
	Amidon	A, B	A, B	A, B	A	A	–	

A : Acétate
P : Propionate
B : Butyrate
CH_4 : Méthane
L : Lactate

☆ dilution

Note : L'absence d'indication signifie que les métabolites n'ont pas été dosées

TABLEAU XX V : Métabolites produites lors des dénombrements bactériens

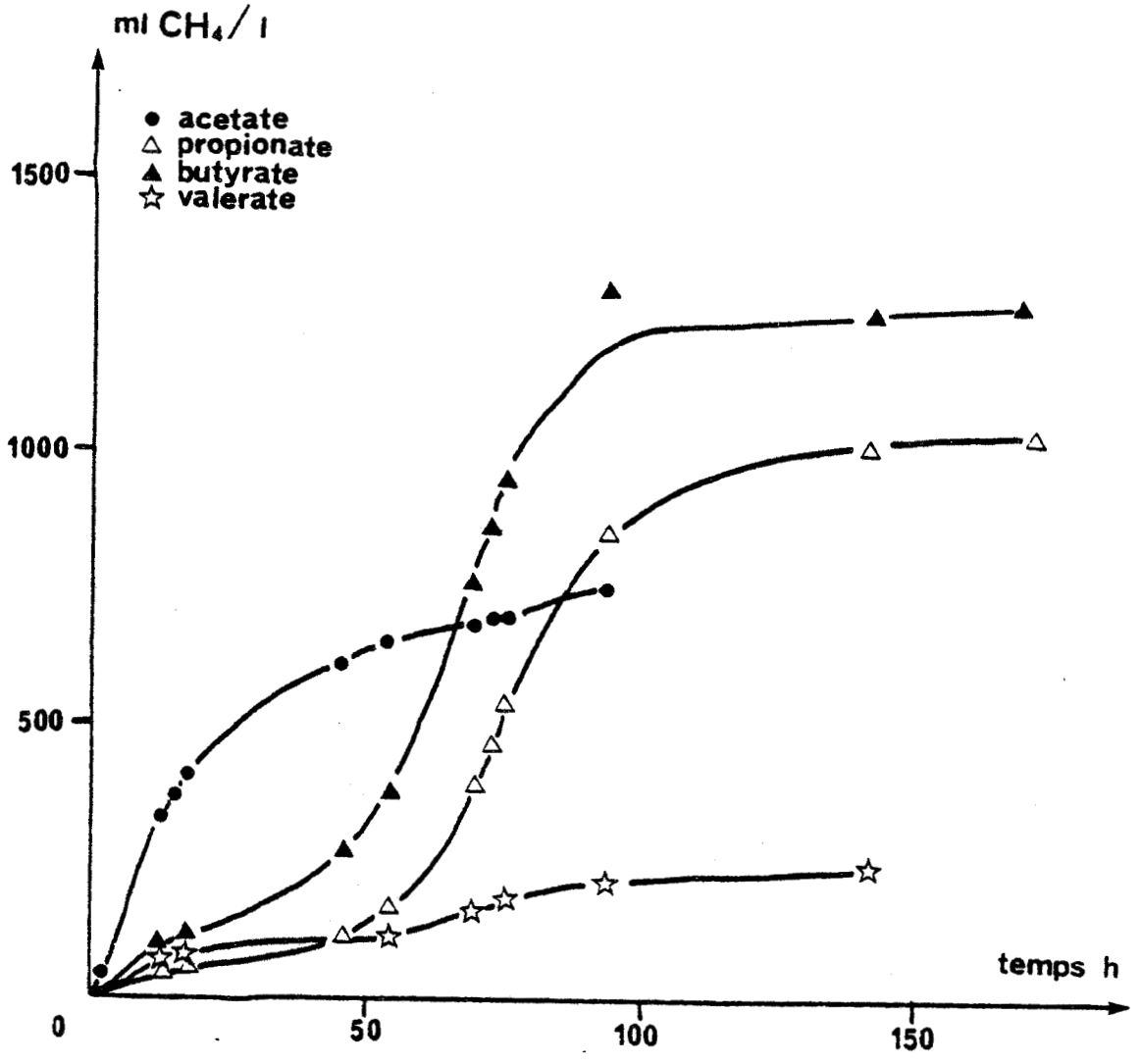


Figure 40 : Dégradation des acides gras volatiles.

De nombreux genres bactériens ont été observés en contraste de phase, toutefois, les types morphologiques, vibrio et spirille n'ont été détectés que sur papier filtre et glucomannane. Il existe une prédominance de coques sur glucomannane et de bacilles sur les autres hémicelluloses, papier filtre et glucose.

I.4.- METABOLIQUES

I.4.1.- Dégradation des A.G.V.

La figure 40 visualise la dégradation de l'acétate, propionate, butyrate et valérate en concentration équivalente à 2 g/l de boues, par le dégagement de méthane en fonction du temps.

Sur le tableau suivant sont indiquées d'une part les valeurs théoriques du rendement en méthane calculé d'après les équations stoechiométriques, et d'autre part les valeurs obtenues expérimentalement.

	CH_4 (ml)	
2 g A.G.V.	Valeurs théoriques	Valeurs obtenues
Acétate	746	688,5
Propionate	1 059	1 021
Butyrate	1 272	1 253
Valérate	1 427	448

Ces dernières coïncident parfaitement dans le cas du propionate, butyrate, acétate. Par contre, en ce qui concerne le valérate, la quantité de gaz expérimentale ne représente que 30% de la valeur théorique.

Il semble donc que l'acétate, en tant que précurseur direct de la méthanogenèse se dégrade plus rapidement que les composés en C_3 et C_4 dont la conversion en méthane est toutefois complète. Par contre, le valérate n'est que partiellement méthanisé, indiquant une mauvaise dégradation des composés à 5 carbones qui représentent donc un risque d'accumulation lors de productions massives d'A.G.V. en cas de surcharge du fermenteur par exemple.

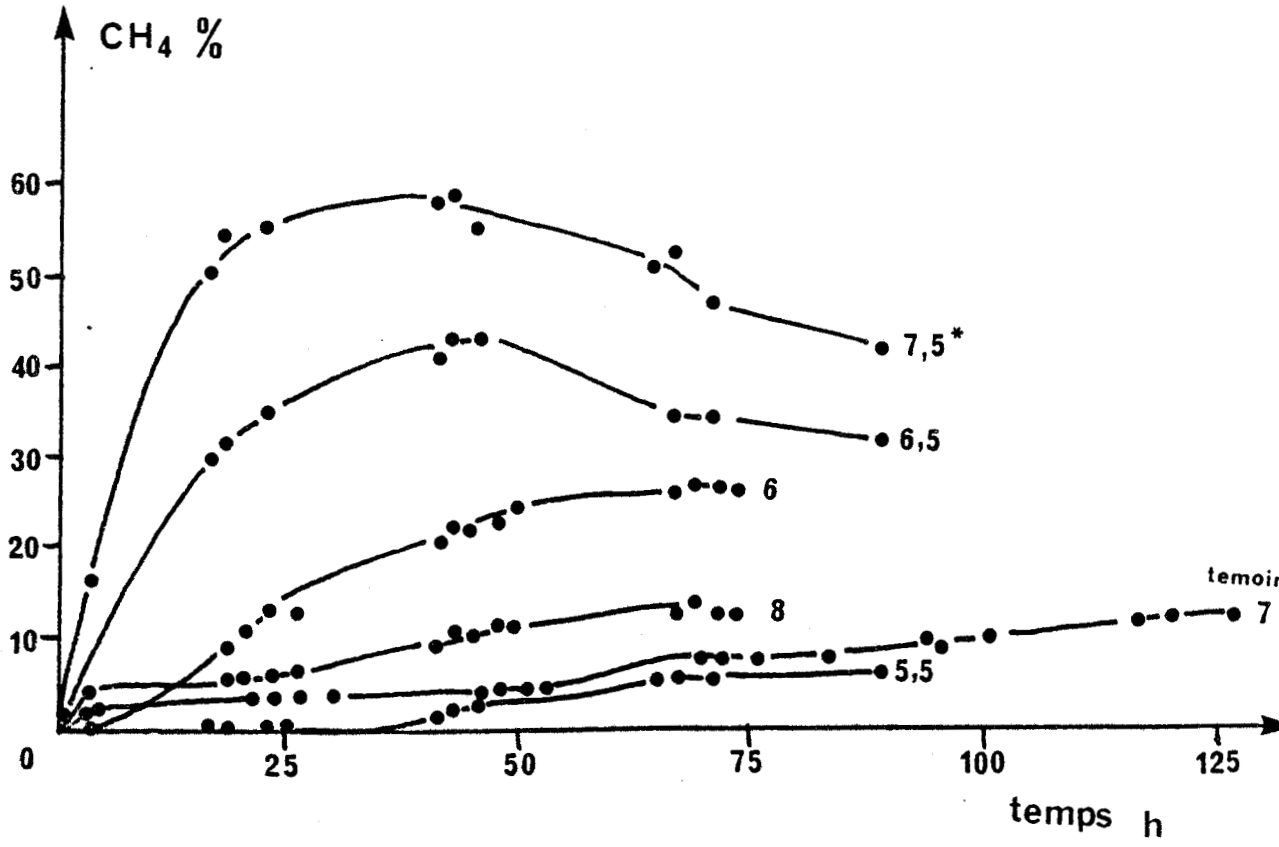


Figure 41 : Variation du pourcentage de méthane dans le biogaz dégagé lors de la fermentation anaérobie du xylane à différents pH en fonction du temps.

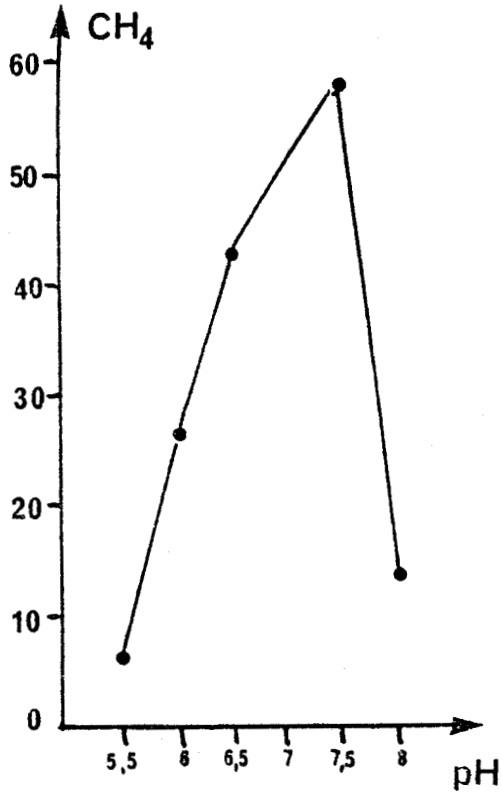


Figure 42 : Maximum du % de méthane en fonction du pH.

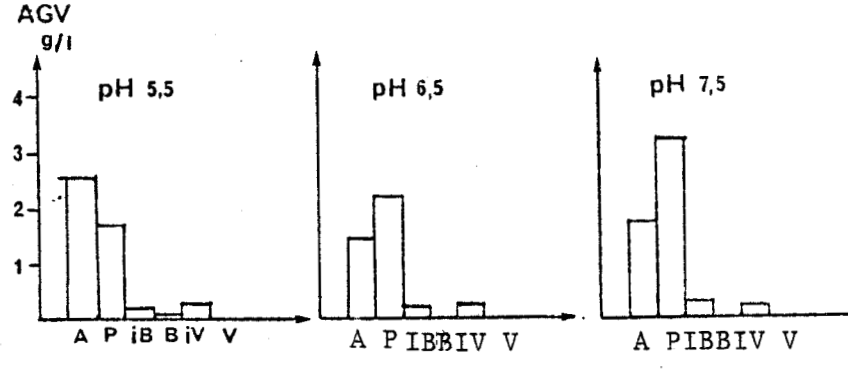


Figure 43 : Concentrations en acides gras volatil. obtenues pour différents pH
A: acétate; P: propionate;
IB: isobutyrate; B: butyrate
IV: isovalérate; V: valérate

-

* II.- ETUDE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES *

-

II.1.- INFLUENCE DU pH SUR LA METHANISATION DU XYLANE

La dégradation du xylane a été suivie d'après l'évolution du pourcentage de CH_4 au cours du temps et en fonction du pH (Figure 41). L'hémicellulose a été additionnée à raison de deux grammes par litre dans des réacteurs contenant 500 ml de boues d'endives. Les différents pH testés (5,5 - 6 - 6,5 - 8) sont régulés par l'acide phosphorique et la soude 10N.

Les caractéristiques des boues sont les suivantes :

M.S. : 45,5 g/l (51,4% M.V.)

pHi : 7,4 - 7,5

A.G.V. : 0,18 g d'acétate

D'après les résultats obtenus, le maximum de la vitesse de production de méthane se situe vers la neutralité (optimum au pH initial des boues) (Figure 42). En accord avec les données bibliographiques, la production gazeuse chute rapidement pour des pH très acides ou basiques (courbes à pH 5,5 et 8).

Le dosage des A.G.V. indique que, quelque soit le pH, la concentration en propionate ne varie que très peu (Figure 43). Par contre, la concentration d'acétate diminue au cours du temps pour les pH 6,5 et 7,5 et augmente pour les pH 5,5 et 8. Les bactéries méthanogènes semblent donc beaucoup plus sensibles aux variations de pH, que les micro-organismes intervenant en amont du processus. Par contre, CLARKE et SPEECE (1970) étudiant l'influence du pH sur la fermentation de l'acétate en filtre anaérobie ne trouvent aucune inhibition dans une fourchette de 6 à 8.

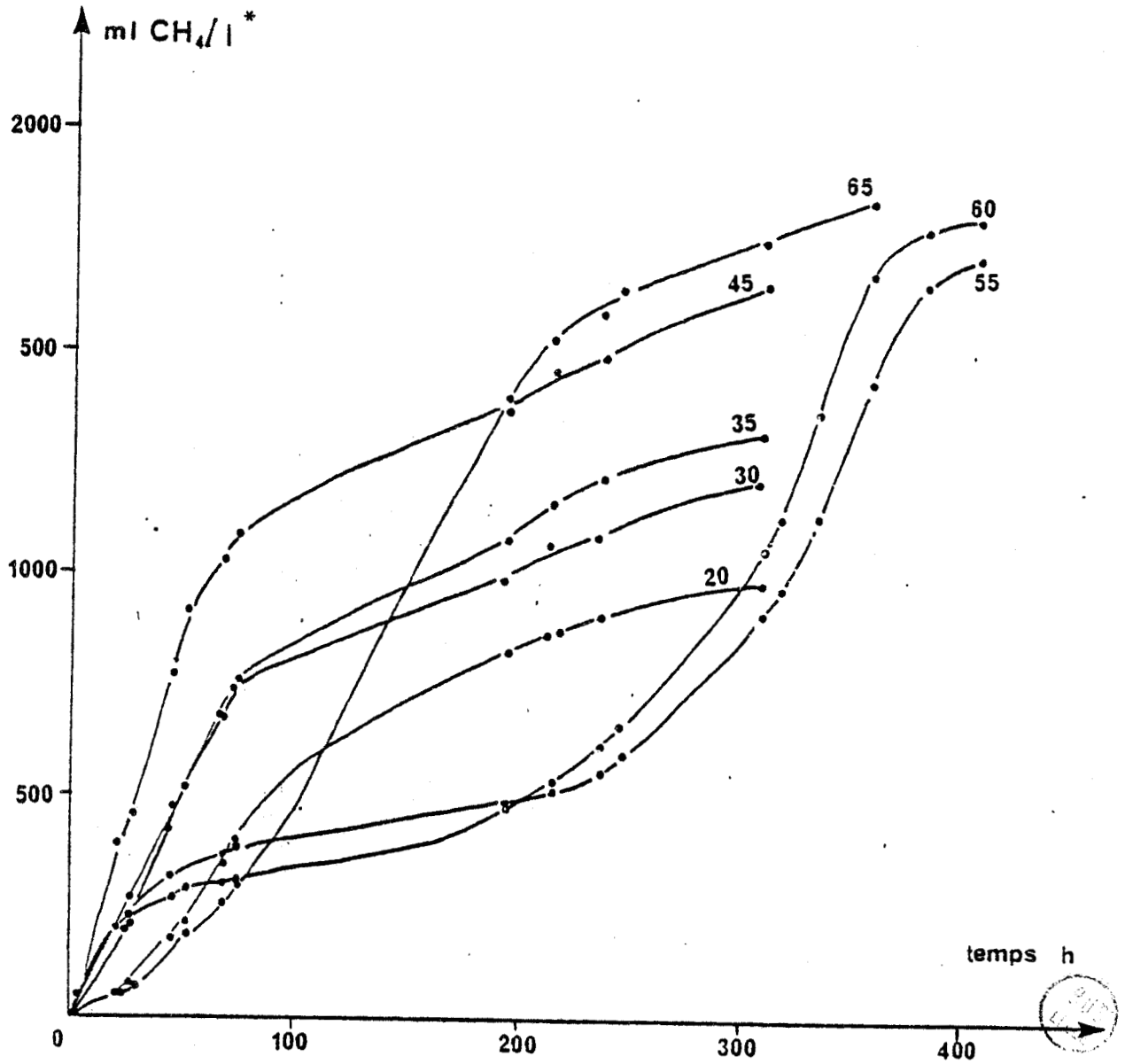


Figure 44 : Production de méthane en fonction du temps lors de la fermentation du xylane à différentes températures.

* L'activité résiduelle des boues n'est pas soustraite. Elle est estimée à 1000 ml de méthane en 400 heures à 35°C. En théorie, 2g de xylane produisent 0,756 ml de méthane. Il en résulte une production totale de 1,756 ml de méthane, qui crrespond aux valeurs expérimentales :

- 1,675 ml à 45°C
- 1,710 ml à 55°C
- 1,794 ml à 60°C
- 1,846 ml à 65°C

II.2.- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE (Substrat : xylane)

* Des flacons de 125 ml contenant 20 ml de boues d'endives (M.S. : 38,72 g/l - M.V. : 21,40 g/l) et 2 g/l de xylane ont été placés à incuber à différentes températures (20, 30, 35, 45, 55, 60, 65°C). La production de CH_4 en fonction du temps a été suivie pour chaque flacon (Figure 44). L'activité résiduelle des boues n'a pas été soustraite, elle est estimée à 2,5 ml CH_4/l.h à 35°C.

Selon le calcul théorique, 2 g de xylane (équivalent xylose) produisent 0,756 ml de méthane en dégradation complète. En fonction de l'activité résiduelle des boues estimée à 2,5 ml de méthane par litre de boues et par heure, nous devons obtenir environ 1,750 l de méthane en 400 heures.

Les rendements obtenus coïncident avec les valeurs calculées (Figure 44). Les bilans de méthane similaires en thermophilie et en mésophilie, indiquent une dégradation équivalente du substrat et une production obligatoire d'acétate. D'autre part, les dosages d'A.G.V. en fin d'expérience se sont révélés négatifs dans tous les flacons (0,05 g/l d'acétate). Si on néglige la conversion de l'acétate en hydrogène et gaz carbonique (cf. Etude bibliographique : réactions en retour), celui-ci est donc entièrement transformé en méthane et CO_2. Ayant constaté l'absence d'acétate résiduel en fin de culture à 65, 60, 55°C, nous pouvons supposer la présence de bactéries méthanogènes acétoclastes thermophiles.

Or, aucune souche de ce type n'a encore été isolée à l'exception d'un Methanothrix sp. ayant un optimum de croissance à 58°C et poussant faiblement à 70°C (ZINDER et al., 1984 a, 1984 b) et d'une Methanosarcina, souche CHTI 55, dont l'optimum de température est situé à 55°C (TOUZEL et al., 1984).

* La figure 44 fait apparaître trois allures de courbes.

Dans le premier groupe (courbes de 30, 35, 45°C) nous n'observons pas de phase de latence. A 45°C, la vitesse de production est sensiblement supérieure à celles, identiques, des courbes correspondant

à 30 et 35°C. Après 80 heures, le débit gazeux des trois flacons diminue et se stabilise vraisemblablement au niveau de l'activité résiduelle des boues, et ne varie pas pendant le reste de l'expérience.

Les courbes de 20 et 65°C constituent un deuxième groupe nécessitant une phase d'adaptation d'environ 30 heures. Cependant, si la pente de la courbe 20°C s'infléchit assez rapidement, le dégagement gazeux à 65°C est équivalent à celui de 30 et 35°C, soit 10 ml CH_4/h.l, pour obtenir une production totale de gaz très légèrement supérieure même au maximum observé précédemment à 45°C.

Enfin, à 55 et 60°C, après une amorce de démarrage de croissance, il se présente un plateau de 150 heures environ, à la suite de quoi une reprise de la production de gaz a lieu.

* L'optimum de vitesse de production de CH_4 par les boues additionnées de xylane se situe à 45°C. Cependant une adaptation aux températures plus élevées est obtenue en 100 heures pour 65°C et 240 heures pour 60 et 55°C.

Il est possible d'adapter la flore originelle mésophile à la thermophilie pour l'utilisation de l'hydrogène.

Il est à noter que des isolements de souches cellulolytiques et xylanolytiques thermophiles ont été faits à partir de ce type de digesteur fonctionnant à 35°C et en particulier Clostridium thermocellum dont l'optimum de croissance, situé à 65°C expliquerait la phase de latence plus courte à cette température qu'à 60 et 55°C (LE RUYET et al., 1984). CHEN (1983) estime leur représentation à 10% (9% de bactéries thermotolérantes et 1% de thermophiles) par rapport à l'ensemble de la flore d'un digesteur mésophile. Celui-ci obtient une adaptation de la méthanogenèse à partir de pectine et de cellulose en respectivement 20 et 85 jours lorsque la température est élevée subitement de 35°C à 60°C. Ces périodes de latence étant obtenues sur un fermenteur en continu à 18 jours de temps de séjour et chargé à 1,36 g M.V./l.j.

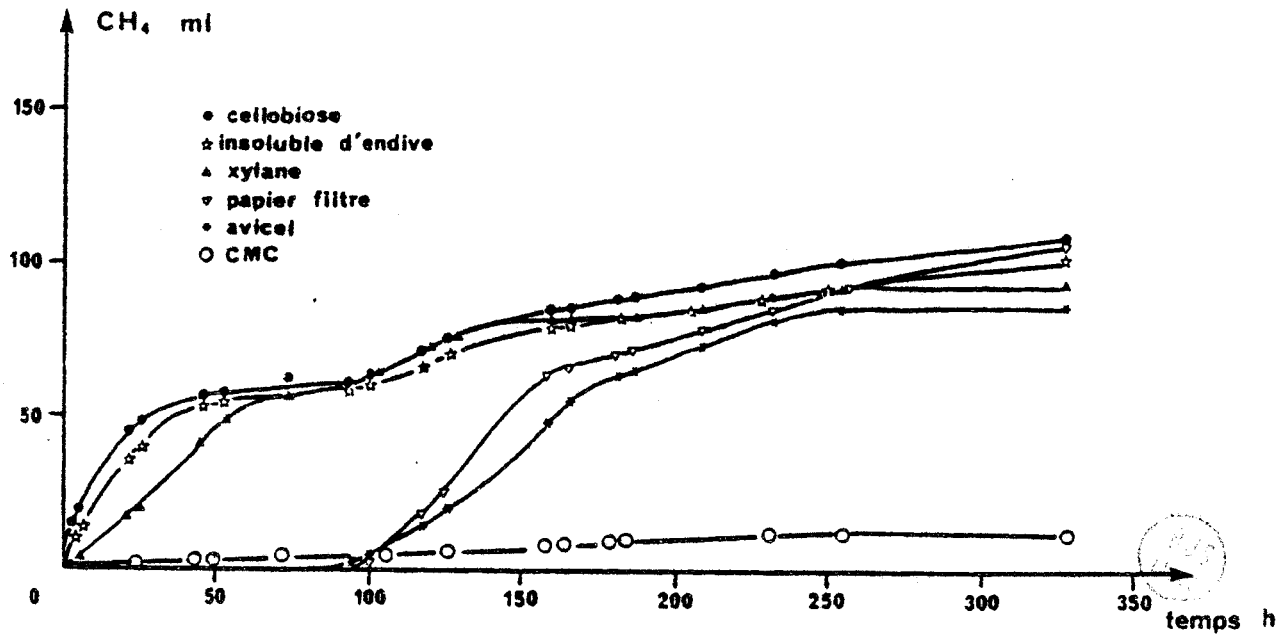


Figure 45 : Dégradation des sucres.

III.- ADAPTABILITE DES BOUES AUX DIFFERENTS SUBSTRATS

III.1.- POTENTIALITE DE DEGRADATION DES SUCRES (Test en flacons)

La figure 45 fait apparaître deux types de courbes : celles correspondant, d'une part à la dégradation du cellobiose, de l'insoluble d'endives et du xylane et, d'autre part, à l'avicel et papier filtre.

La courbe correspondant à la carboxy-méthyl-cellulose, dont les produits d'hydrolyse ne sont pas assimilables, n'est là qu'à titre indicatif. Son hydrolyse n'est mise en évidence que lors de l'étude enzymatique.

En vitesse et en production de gaz, le cellobiose est le composé qui se dégrade le mieux, résultat prévisible, car cette petite molécule est facilement hydrolysée en deux glucoses par une population mixte. Les boues étant adaptées à la dégradation et méthanisation des racines d'endives, la courbe correspondant à l'insoluble d'endives suit le tracé de celle du cellobiose, avec une production de gaz légèrement inférieure.

Le xylane est également dégradé rapidement. Cependant, cette hémicellulose n'est probablement pas la structure dominante des racines d'endives car la courbe indique une vitesse de production de méthane initiale nettement inférieure à celle de l'insoluble d'endives.

Quant aux papier filtre et avicel, ils ne commencent à être dégradés qu'avec une latence de 100 heures ; la vitesse de production gazeuse diminue nettement après 70 heures.

Si le papier filtre a un rendement de production de gaz proche du cellobiose (et de ce fait supérieur aux hémicelluloses), l'avicel est le composé qui produit le moins de gaz total, sans doute en raison de son taux élevé de cellulose cristalline.

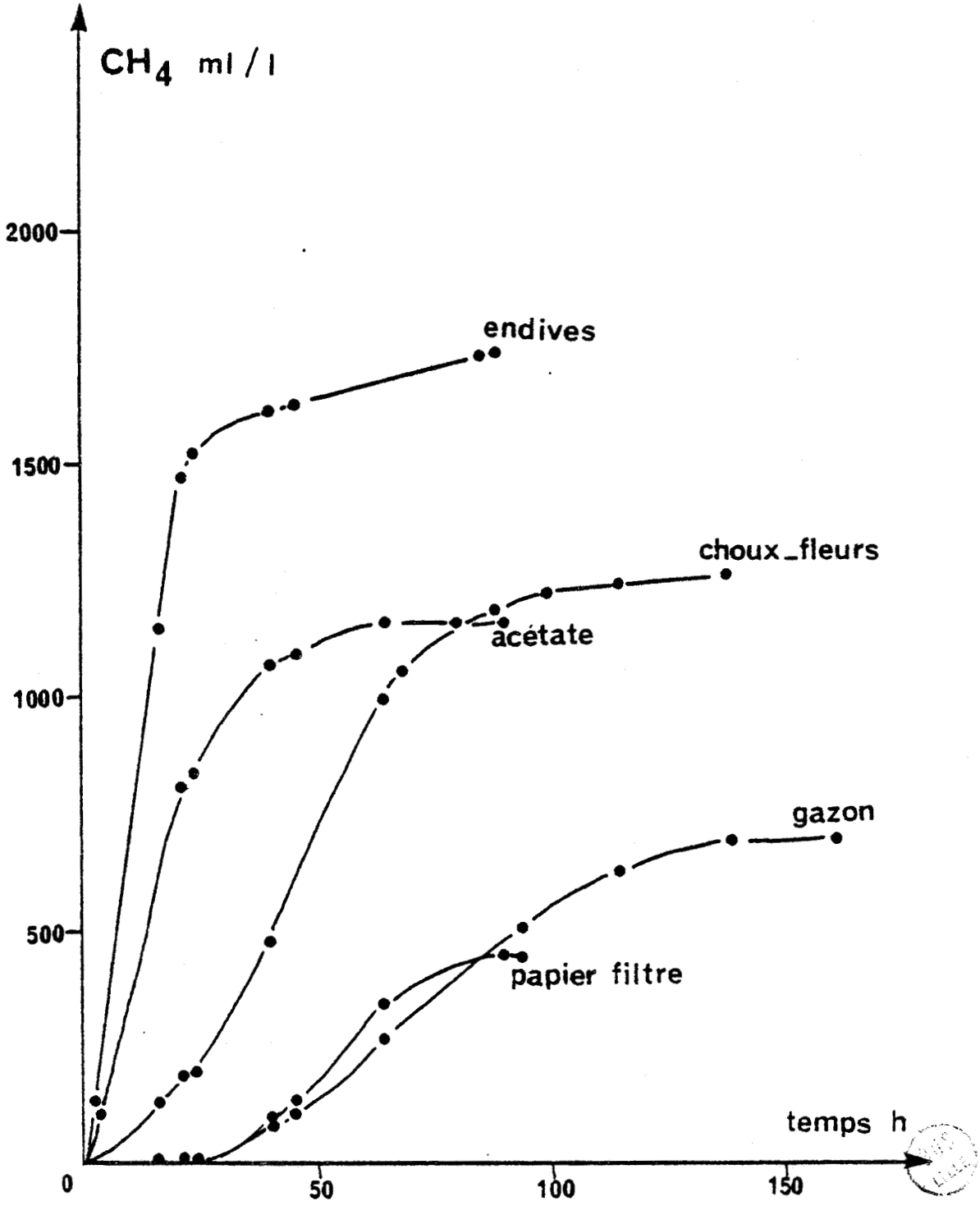


Figure 46 : Aptitude des boues à méthaniser des substrats végétaux bruts (en comparaison avec l'acétate et le papier filtre).

En conclusion, en bonne corrélation avec les résultats obtenus à partir des dénombrements bactériens, nous sommes en présence de boues particulièrement aptes à la dégradation des hémicelluloses, ne possédant pas l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation de la cellulose, mais pouvant d'adapter en une centaine d'heures. L'agitation des boues permet de réduire cette phase de latence à 40 heures.

III.2.- ADAPTABILITE DES BOUES A DEGRADER DES SUBSTRATS VEGETAUX BRUTS

Des résidus végétaux broyés (gazon, feuilles de choux-fleurs, racines d'endives) ont été utilisés en tant que substrats de dégradation à raison de 2 g M.O./l boues.

A cet effet, nous rappelons la composition chimique de ces végétaux dans le tableau suivant :

	Hémicelluloses	Cellulose (% de M.S.)
Racines d'endives	16,5	0
Feuilles de choux-fleurs	39,8	7,5
Gazon	20,6	23,5

A titre de comparaison, les dégradations du papier filtre (2 g/l) et de l'acétate (2 g/l) ont été suivies.

Les courbes de production de méthane en fonction du temps pour ces différents substrats sont rapportées figure 46.

L'allure de la courbe de production de gaz des endives confirme l'adaptation des boues à ce substrat : méthanisation immédiate et rapide, vitesse d'acidogenèse supérieure à celle de la dégradation de l'acétate.

La vitesse de production de méthane diminue de 75% pour le choufleur (16,6 ml CH_4/h) et de 90% pour le gazon (7,6 ml CH_4/h) par rapport à celle des racines d'endives (71,4 ml CH_4/h).

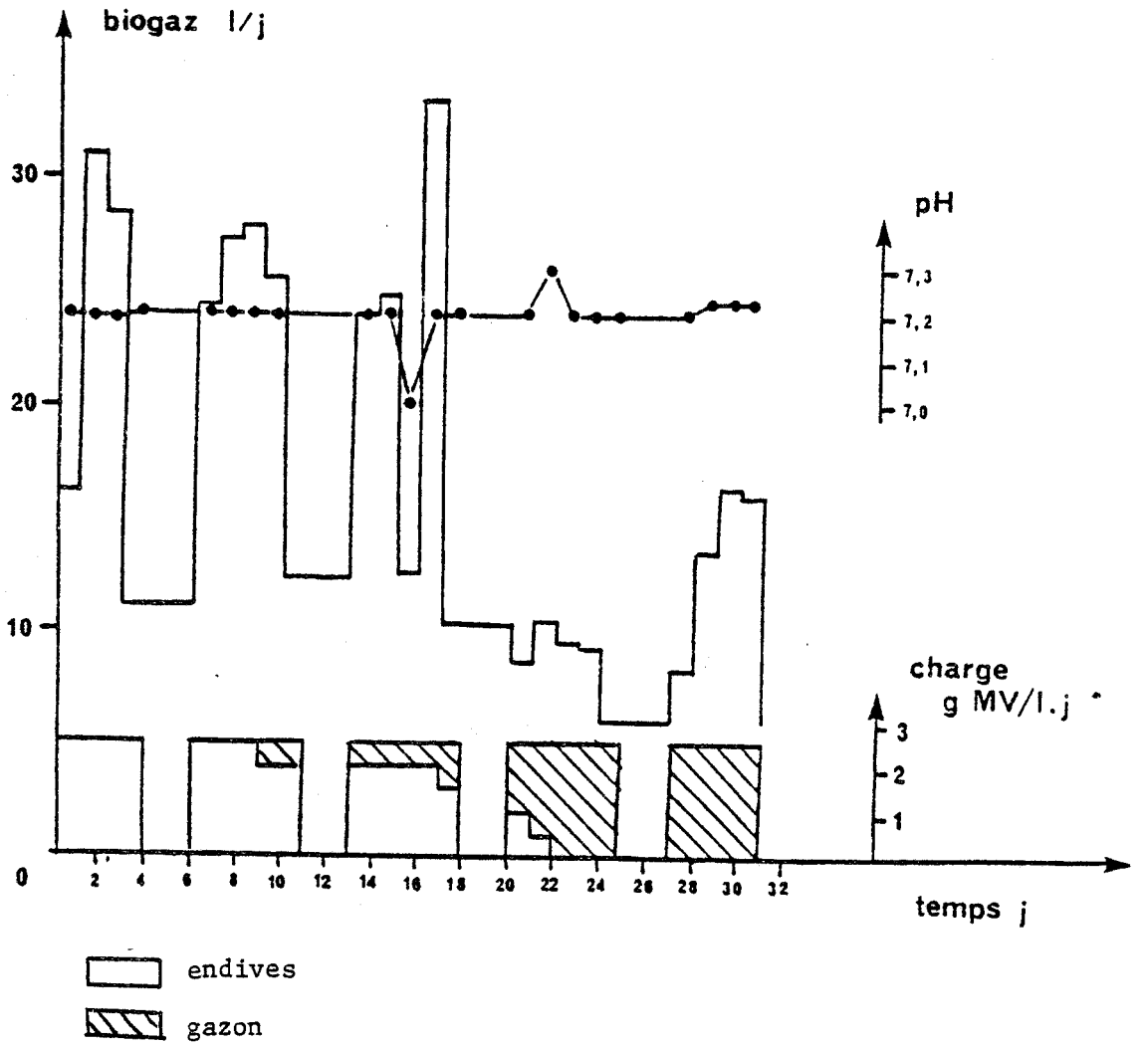


Figure 47 : Fermentation en continu d'un substrat de composition variable endives-gazon.
Production de gaz et valeurs du pH en fonction de la qualité de la charge.

TABLEAU XXVI : Dénombrement des bactéries cellulolytiques

Jours	Nombre de bactéries
8	$11,5 \cdot 10^5$
16	$20,0 \cdot 10^6$
22	$20,0 \cdot 10^7$

Il est à noter une certaine similitude entre les courbes de dégradation du papier filtre et du gazon (temps de latence et pente).

D'après ces résultats, il semblerait que les vitesses et rendements en gaz soient en relation inverse avec la teneur en cellulose du substrat, cependant d'autres facteurs doivent interférer comme la teneur en sucres solubles et l'accessibilité des polymères.

Toutefois, à l'appui de cette hypothèse, il faut signaler les travaux de WALKER et HOPGOOD (1961) sur une hémicellulase purifiée qui hydrolyse l'hémicellulose en xylose et dérivés, mais ne peut pas dégrader l'amidon et la cellulose.

III.3.- ADAPTATION D'UN ECOSYSTEME A FLORE HEMICELLULOLYTIQUE A UN SUBSTRAT CELLULOSIQUE

Un fermenteur de 16 litres alimenté par des racines d'endives est adapté à la dégradation du gazon.

Pour une charge volumique constante de 2,5 g M.V./l.j la concentration en gazon est progressivement augmentée pendant quinze jours jusqu'à une charge exclusivement composée de ce matériau.

La figure 47 indique le rendement en biogaz en fonction de la qualité de la charge, et les valeurs journalières du pH.

On observe une chute de la production de gaz suivie d'une reprise du dégagement gazeux vers le 27ème jour, correspondant à un début d'adaptation de la flore à la dégradation de ce nouveau substrat.

La variation qualitative de la flore est confirmée par trois dénombrements bactériens sur papier filtre opérés au cours de l'expérience, le 8ème, 16ème et 22ème jour.

Le tableau XXVI démontre une augmentation du nombre de bactéries cellulolytiques équivalente à une puissance de 10 pour chaque numération révélant d'une façon incontestable l'adaptation d'une flore hémicellulolytique à la dégradation d'un substrat cellulosique.

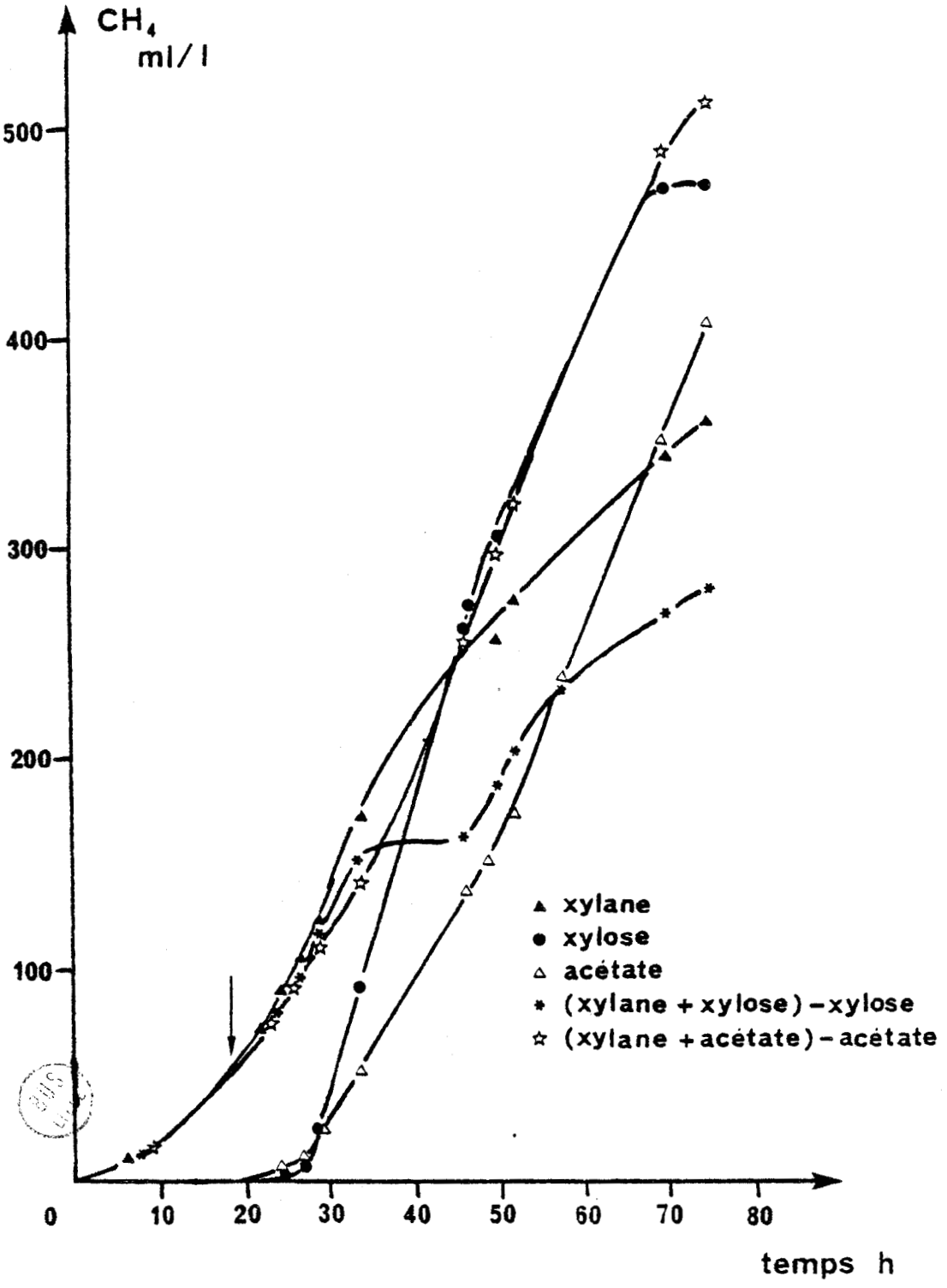


Figure 48 : Influence de l'acétate et du xylose à 2g/l sur la fermentation du xylane.

IV.- INHIBITION/ACTIVATION DE L'ACTIVITE HYDROLYTIQUE

Influence du xylose et de l'acétate sur la dégradation du xylane

La dégradation du xylane (2 g/l) a été suivie par le truchement de la production en méthane, et ceci en présence de xylose ou d'acétate à la concentration arbitrairement choisie de 2 g/l.

Le xylose et l'acétate ne sont additionnés qu'au début de la phase exponentielle de croissance (20ème heure).

Environ 10 heures après l'adjonction de xylose la production de méthane du xylane accuse une nette diminution mise en évidence par le plateau d'une douzaine d'heures sur la figure 48.

A la suite de cette stagnation, le dégagement gazeux reprend avec une vitesse de production sensiblement identique qu'en début de fermentation.

Par contre, l'addition d'acétate augmente la vitesse de production de méthane à partir du xylane, d'ailleurs identique à celle de la dégradation de l'acétate, et très supérieure à celle du témoin xylane seul.

On observe donc une activation de l'hémicellulolyse par l'acétate et une inhibition par le xylose.

Pour cette dernière remarque, deux hypothèses peuvent être avancées : soit l'utilisation séquentielle de substrats, soit une inhibition enzymatique. Cependant, dans le cas d'une compétition entre deux substrats, les enzymes libérés avant l'addition de xylose, encore en activité, n'auraient pas permis un arrêt de la production gazeuse aussi évident. Il semblerait donc préférable de choisir la deuxième hypothèse, la rétro-inhibition des xylanases par le xylose libéré étant classiquement décrite dans la littérature. L'influence des sucres solubles sur la quantité initiale d'inoculum a été évitée par

l'addition de xylose retardée par rapport au début de culture. En effet, HILTNER et DEHORITY (1983) ont observé un raccourcissement de la phase de latence de la digestion de cellulose par augmentation de la biomasse bactérienne en présence de sucres solubles. Par contre, GUPTA et al. (1972) ayant observé une augmentation de la production de cellulase chez Trichoderma viride par l'acétate et l'ascorbate, l'effet activateur de l'acétate pourrait jouer directement au niveau enzymatique chez les bactéries.

Cependant, il convient de faire une restriction importante quant à l'interprétation de ces résultats car nous n'avons pas la certitude que le xylose ou l'acétate sont dégradés pareillement dans les témoins et en présence de xylane.

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

* V.- ETUDE ENZYMATIQUE *

--*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

La détection enzymatique a porté sur l'hydrolyse de cinq substrats : trois celluloses (avicel, papier filtre, CMC) du xylane et de l'insoluble d'endives, substrat riche en hémicelluloses. Le dosage a été opéré immédiatement après alimentation, puis après 5 heures et 72 heures, et ceci en parallèle sur le surnageant (S) et les boues brutes (B).

	Xylane		CMC		Ins.d'endives		Avicel		papier filtre	
	B	S	B	S	B	S	B	S	B	S
t : 0 h.	0,054	0,034	0,024	0	0	0	0	0,001	0	0
5 h.	0,053	0,033	0,009	0,002	0,087	0,040	0,011	0,011	0	0
72 h.	0	0,005	0,011	0,004	0,032	0,013	0	0	0	0

en mmoles eq. glucose ou xylose/ml/mn

Les valeurs obtenues sont très faibles. Il se peut que les enzymes déjà fortement liés aux substrats déjà présents dans les boues possèdent donc une faible affinité pour les nouveaux substrats fournis. Les sucres présents dans les boues pourraient également jouer un rôle d'inhibiteur enzymatique (MANDELS et al., 1978 ; GONG et al., 1977). Le rôle des protéases excrétées par les bactéries non cellulolytiques est à prendre en considération envers la destruction des cellulases extracellulaires (SCHARER et MOO YOUNG, 1979). Cependant, COHEN et DRUCKER (1977) ont observé une répression de la synthèse protéasique par les ions ammonium chez Neurospora crassa, or, ces ions sont présents à raison de 1 g/l dans les boues.

Malgré la faiblesse des résultats, il apparaît que les celluloses ne suscitent pas ou très peu d'activité hydrolytique en comparaison des hémicelluloses (xylane, insoluble d'endives). Ces activités enzymatiques présentes à la fois dans les boues et le surnageant suggèrent la présence de systèmes enzymatiques libérés dans le milieu.

Afin de "décrocher" éventuellement les bactéries de leur substrat initial, un dosage enzymatique a été fait sur des boues soniquées (20 mn - 40 W). Aucune différence significative n'a été obtenue entre les boues soniquées et le témoin.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des quatre substrats étudiés, seules, les lentilles d'eau présentent une restriction importante quant à leur emploi en tant que substrat de méthanisation sans pré-traitement ou sélection d'une flore particulière. Malgré les quelques études dont elles ont fait l'objet, les causes exactes de leur mauvaise dégradation ne sont pas déterminées.

Parmi les autres substrats, ce sont les racines d'endives qui présentent la meilleure productivité gazeuse et le meilleur rendement d'épuration (Tableau XXVII). Cependant, la fermentation méthanique en monosubstrat pose des problèmes au niveau de l'azote (carence pour les racines d'endives, éventuel excès dans le cas du gazon) et sélectionne une population bactérienne très spécialisée. Le gazon possède un rapport C/N bien équilibré.

Une étude des boues provenant de la fermentation anaérobie des racines d'endives a montré leur spécificité hydrolytique quant à la dégradation des hémicelluloses, constituants polysaccharidiques principaux du substrat. Des dénombrements bactériens ont corroboré ces résultats et révélé la pauvreté de la flore hydrolytique en bactéries cellulolytiques. Ces boues possèdent cependant des potentialités d'adaptation à la dégradation de substrats cellulosiques d'une part, et à la thermophilie d'autre part.

Un essai au stade semi-industriel assurera la continuité de cette étude de laboratoire qui a servi de base au projet visant à l'installation d'un fermenteur pilote dans la région de SAINT OMER. Celui-ci fonctionnera à partir de déchets horticoles produits par cette région à vocation maraîchère, le plus important tonnage de résidus disponibles étant représenté par les racines d'endives durant l'hiver. Le méthane obtenu sera utilisé soit directement comme combustible, soit

	Feuilles de choux-fleurs	Gazon	Lentilles d'eau	Racines d'endives	
				Diluées	Non diluées
Charge volumique (g MV/l.j)	1,8	2,2	1	2,5	5,5
Temps de séjour	18	61	-	16	23
Productivité en méthane (l/l.j) (% méthane)	0,48 (55)	0,52 (55)	0,038 (50)	0,86 (54)	1,37 (55)
Rendement de production (m^3 CH_4/kg MV)	0,37	0,23	0,038	0,34	0,25
Rendement DCO	60	49,5	8,5	75,5	55

TABLEAU XXVII : Récapitulatif des résultats obtenus lors des essais de méthanisation des différents résidus végétaux

converti en énergie électrique. Cette application à double finalité (production énergétique et épuration du milieu) coïncide donc parfaitement avec les caractéristiques pratiques de la méthanisation. Cependant, comme tout phénomène biologique, ce système n'est pas parfait, en particulier au niveau de l'épuration, où les boues produites à DCO encore très élevée ne sont que difficilement décantables et filtrables. Cependant, leurs caractéristiques chimiques sont compatibles avec les normes régissant l'emploi de boues organiques à des fins agricoles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

* AKIN D.E., 1982. Forage cell wall degradation and p-couramic, ferulic and sinapic acids. Agronomy Journal 74, May-June 1982, p. 424-428.

* ANDERSON R.L., WOOD W.A., 1969. Carbohydrate metabolism in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 539-577.

* ANDREESEN J.R., GOTTSCHALK G., SCHLEGEL K.G., 1970. Clostridium formicoaceticum nov. sp. Isolation, description and distinction from Clostridium aceticum and Clostridium thermoaceticum. Arch. Microbiol. 72, 154-174.

* ANGRAND B., 1980. Etude de la méthanisation des lentilles d'eau. D.E.A. Amélioration des Productions Végétales et Microbiennes. Université de LILLE I.

* ASPINALL G.O., 1970. Polysaccharides. Pergamon Press Ltd., OXFORD, p. 80-83.

* BALCH W.E., 1982. Methanogens : their impact on our concept of Procaryote diversity. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3. 295-303.

* BALCH W.E., FOX G.E., MAGRUM L.J., WOESE C.R., WOLFE R.S., 1979. Methanogens : reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43, 260-296.

* BALCH W.E., SCHOBERTH S., TANNE R.S., WOLFE R.S., 1977. Acetobacterium, a new genus of hydrogen-oxydizing, carbon dioxide-reducing anaerobic bacteria. In J. Syst. Bacteriol. 27, 355-361.

* BARKER H.A., 1956. Bacterial fermentations. John Wiley and Sons, Inc. NEW YORK p. 1-95.

* BRAUN M., GOTTSCHALK G., 1982. Acetobacterium wieringae sp. nov., a new species producting acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg., C-Allg. 3, 368-376.

* BROUARD F., 1983. Digestion anaérobie de la biomasse végétale aquatique. Thèse Docteur-Ingénieur. Institut National des Sciences Appliquées de TOULOUSE.

* BRUN M.J., APPERT F., 1983. Les déchets, source d'énergie. Vol. 1 : Déchets végétaux et animaux. Institut Français de l'Energie. E.E.T.I. PARIS.

* BRYANT M.P., 1973. Nutritional requirements of the predominant cellulolytic bacteria. Fed. Proc. 32, 1809-1813.

* BLICKSTAD D.R., BRYANT M.P., 1980. Propionate degrading bacterium, Syntrophobacter wolinii from methanogenic ecosystems. Appl. Environm. Microbiol., 40, 3, 626-632.

* BOYER R.F., REDMOND M.A., 1983. Effect of chemical modification of cellulose on the activity of a cellulase from Aspergillus niger. Biotechnol. Bioeng. 25, 1311-1319.

* BRYANT M.P., CAMPBELL L.L., REDDY C.A., CRABILL M.R., 1977. Growth of Desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H_2-utilizing methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162-1169.

* BRYANT M.P., DOETSCH R.N., 1954. A study of actively cellulolytic rod-shaped bacteria of the bovine rumen. J. of Dairy Sci. 37, 1176-1183.

* BRYANT M.P., SMALL N., 1956. The anaerobic monitrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. J. of Bcateriol. 72, 16-21.

* BRYANT M.P., TZENG S.F., ROBINSON I.N. and SOYNEN A.E., 1971. Nutrient requirements of methane organic bacteria. Adv. Chem. Ser., 105, 23.

* 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.

* CASPARI D., MARCY J.M., 1983. The role of carbon dioxide in glucose metabolism of Bacteroïdes fragilis. Arch. Microbiol. 153, 16-24.

* CHAMBERLHAC B., BEBIN J., ALBAGNAC G., 1982. Stabilization and methane production by commercial scale digestion of green vegetable cannery wastes. In : Symposium papers : Energy from biomass and wastes VI. D.L. Klass (Ed.), Inst. of gas Technol., CHICAGO, Ill. 443.

* CHANDLER J.A., 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. Thèse - Cornell University - Department of Agricultural Engineering - College of Agriculture and Life Sciences - ITHACA, NEW YORK 14853.

* CHEESEMAN P., TOMS-WOOD A., WOLFE R.S., 1972. Isolation and properties of a fluorescent compound factor 420 from Methanobacterium, strain MOH. J. Bacteriol., 112, 527-531.

* CHEN M., 1983. Adaptation of mesophilic anaerobic sewage fermentor populations to thermophilic temperatures. Applied and Environmental Microbiology 45, 4, 1271-1276.

* CHIN K.K., GOH T.N., 1978. Bioconversion of solar energy : methane production through water hyacinth. In : Symposium papers : Energy from Biomass, p. 215-228.

* CHYNOWETH D.P., KLASS D.L., GHOSH S., 1978. Biomethanation of giant brown kelp Macrocystis pyrifera. Symposium papers : Energy from Biomass and Wastes 229-251.

* CHYNOWETH D.P. MAH R.A., 1971. Volatile acid formation in sludge digestion. Adv. Chem. Ser. 105, 41.

* CLARCK R.H. and SPEECE R.E., 1970. The pH tolerance of anaerobic digestion. Vth International Water Pollution Research Conference, II, 27, 1-14.

* COHEN B.L., DRUCKER H., 1977. Regulation of exocellular protease in Neurospora crassa : induction and repression under conditions of nitrogen starvation. Arch. of Biochemistry and Biophysics 182, 601-613.

* COWLING E.B., 1975. Physical and chemical contraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulose materials. Biotechnol. and Bioeng. Symposium V, 163-181. John Wiley and Sons, Inc.

* DALE B.E., MOREIRA M.J., 1982. A freeze explosion technique fro increasing cellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 31-34.

* DEHORITY B.A., 1966. Characterization of several bovine rumen bacteria isolated with a xylan medium. J. of Bacteriol. 91, 1724.

* DEHORITY B.A., 1967. Rate of isolated hemicellulose degradation and utilisation by pure culture of rumen bacteria. Appl. Microbiol. 15, 987-993.

* DEKKER R.F., RICHARDS G.N., 1976. Hemicellulases : their occurence, purification, properties and mode of action. Adv. Carboh. Res. Biochem. 32, 277-352.

* DURAT F., GALLANT D., GUILBOT A., MERCIER C., ROBIN J.P., 1981. L'amidon. Les polymères végétaux.

* ESCALANTE-SEMERANA J.C., 1983. Ph. D. thesis, University of Illinois, URBANA.

* ESCALANTE-SEMERANA J.C., LEIGH J.A., WOLFE R.S., 1984. New insights into the biochemistry of methanogenesis from H_2 and CO_2. Microbial growth on C 1 compounds. Proceedings of the 4th International Symposium p. 191-198. Ed. R.L. CRAWFORD, R.S. HANSON, American Society for Microbiology Washington D.C.

* FAN L.T., LEE Y.H., 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolisis of insoluble cellulose : derivation of a mechanistic kinetic model. Biotechnol. Bioeng. Vol. XXV, p. 2707-2733.

* FAN L.T., LEE Y.H., BEARDMORE D.H., 1980. Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. Adv. Biochem. Eng. 14, p. 101. A Fiechter (Ed.), BERLIN, Springer Verlag.

* FOX G.E., STACKEBRANDT E., HESPELL R.B., GIBSON J., MANILOFF J., DYER T.A., WOLFE R.S., BALCH W.E., TANNER R.S., MAGRUM L.J., ZABLEN L.B., BLAKEMORE R., GUPTA R., BONEN L., LEWIS B.J., STAHL D.A., LUEHSEN K.R., CHEN K.W., WOESE C.R., 1980. The phylogeny of Procaryotes. Sciences 209, 457-463.

* GARCIA-MARTINEZ D.V., SHINMYO A., NADIA A., DEMAIN A.L., 1980. Studies on cellulase production by Clostridium thermocellum. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 189-197.

* GENTHNER B.R.S., DAVIS C.L., BRYANT M.P., 1981. Feature of rumen and sewage sludge strains of Eubacterium limosum, a methanol- and H_2-CO_2 utilizing species. Appl. and Environ. Microbiol. 42, 12-19.

* GHOSE T.K., 1977. Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances. In : "Advances in biochemical engineering" 6, Ed. T.K. GHOSE, A. FIECHTER, N. BLAKEBROUGH, Springer Verlag, p. 39-76.

* GHOSH S., HENRY M.P., KLASS D.L., 1981. Bioconversion of water hyacinth-coastal bermuda grass - MSW - Sludge blends to methane. Biotechnol. Bioeng. Symp. 10, 163.

* GHOSH S., KLASS D.L., 1978. Two-phases anaerobic digestion. Process. Biochemistry, April, 15-24.

* GOLDBERG I., COONEY C.L., 1981. Formation of short-chain fatty acids from H_2 and CO_2 by a mixed culture bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41, 148-154.

* GONG C.S., LADISCH M.R., TSAO G.T., 1977. Cellobiose from Trichoderma viride : purification properties, kinetics and mecanism. Biotechnol. Bioeng. 19, 959-981.

* GOTTSCHALK G., 1979. Bacterial metabolism. Springer Verlag, BERLIN.

* GUNSALUS R.P., WOLFE R.S., 1978. Chromophoric factors F 342 and F 430 of Methanobacterium thermoautotrophicum. FEMS Microb. Letters 3, 191-193.

* GUPTA J.K., DAS N.B., GUPTA Y.P., 1972. Effect of cultural conditions on cellulase formation by Trichoderma viride. Agr. Biol. Chem. 36, 11, p. 1961-1967.

* GUPTA R., WOESE C.R., 1981. Unusual modification patterns in the transfert of RNAs of Archaebacteria. Curr. Microbiol. 4, 24-28.

* HAMLIN L.J. and HUNGATE R.E., 1956. Culture and physiology of a starch degrading bacterium (Bacteroïdes amylophilus N. sp.) from the bovine rumen. J. Bacteriol. 72, 548-554.

* HARTLEY R.D., 1972. P-couramic and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationship with lignin and digestibility. J. of the Science of Food and Agriculture 23, 1347-1354.

* HASHIMOTO A.G., 1983. Conversion of straw-manure mixtures to methane at mesophilic and thermophilic temperatures. Biotechnol. Bioeng. 25, 185.

* HELAINE E., 1977. Dosage d'ammoniaque dans le lait par électrode spécifique. Industries Alimentaires et Agricoles, 6, p. 581-589.

* HILLS D.J., DYKSTRA R.S., 1980. Anaerobic digestion of cannery tomato solid wastes. J. Environ. Eng. Div. Proc. Ann. Soc. Civ. Eng. 106, 257.

* HILTNER P., DEHORITY B.A., 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. Appl. and Environm. Microbiol., Vol. 46, 3, p. 642-648.

* HOBSON P.N., SHAW B.G., 1974. The bacterial population of piggery waste anaerobic digesters. Water Res. 8, 507-516.

* HOLT D.M., JONES E.B.G., 1983. Bacterial degradation of lignified wood cell walls in anaerobic aquatic habitats. Appl. and Environ. Microbiol. (Sept.) 722-727.

* HOYT C.H. and GOHEEN D.W., 1971. Polymeric products. Lignins : occurence, formation, structure and reactions. p. 833-865. Edited by Sarkanen K.V. and Ludwig C.H. Wiley Interscience - NEW YORK, LONDON, SYDNEY, TORONTO.

* HSU E.J., ORDAL Z.J., 1970. Comparative metabolism of vegetative and sporulating cultures of Clostridium thermosaccharolyticum. J. Bacteriol. 102, 369-376.

* HUNGATE R.E., 1950. The anaerobic mesophilic bacteria. Bact. Rev. 14, 1.

* HUNGATE R.E., 1957. Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. Canad. J. of Microbiol. 3, 289-311.

* HUNGATE R.E., 1960. Microbial ecology of the rumen. Bacteriological Res. 24, 353-364.

* HUNGATE R.E., 1966. The rumen and its microbes. Academic Press Inc. NEW YORK.

* IANNOTTI E.L., FISCHER J.R., SIEVERS D.M., 1982. Characterization of bacteria from a swine manure digestor. Appl. Env. Microbiol., 43, 136-143.

* IERGER D.E., CONRAD J.R., FANNIN K.F., CHYNOWTH D.P., 1982. Biogasification of woody biomass. In : Symposium papers : Energy from Biomass and Wastes VI - D.L. Klass (Ed.) Inst. of Gas Technol. CHICAGO, Ill., 341.

* JOSELEAU J.P., 1980. "Les hémicelluloses" p. 87-121. In : "Les polymères végétaux" Bernard MONTIES, Biochimie appliquée, Gauthier-Villars, Bordas, PARIS.

* KANDLER O., 1982. Cell wall structures and their phylogenic implications. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 149-160.

* KASPAR H.F., WUHRMANN, 1978. Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. Appl. Environ. Microbiol., 36, 1-17.

* KELTJENS J.T., HUBERT M.J., LAARNOVE W.H., VOGELS G.D., 1983. Structural elements of methanopterin, a novel pterin present in Methanobacterium thermoautotrophicum.

* KERBY R., ZEIKUS J.G., 1983. Growth of Clostridium thermoaceticum on H_2 CO_2 or CO as an energy source. Curr. Microbiol. 8, 27-30.

* KLASS D., GHOSH S., 1979. Methane production by anaerobic digestion of Bermuda Grass. In : Symposium papers : Biomass as a non-fossil fuel source. P.L. Mc Carty (Ed.) Amer. Chem. Soc./Chem., Japan Chem. Congr., HONOLULU.

* KNOL W., VAN DER MOST M.M., DE WAART J., 1978. Biogas production by anaerobic digestion of fruit and vegetable waste. A preliminary study. J. Sci. Fd. Agric. 29, 822.

* KROEKER E.J., SCHULTE D.D., SPARLING A.B., LAPP H.N., 1979. Anaerobic treatment process stability. J. Water Pollut. Contr. Fed. 51, 4, 718-727.

* LAANBROEK H.J., ABEE T., VOOGD I.L., 1982. Alcohol conversions by Desulfobulbus propionicus lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. Arch. Microbiol. 133, 178-184.

* LANE A.G., 1980. Production of aromatic acids during anaerobic digestion of citrus peel. J. Chem. Tech. Biotechnol. 30, 345-350.

* LANHWORTHY T.A., TORNABENE T.G., HOLZER G., 1982. Lipids of Archaebacteria. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 228-244.

* LATHAM M.J., BROOKER B.E., PETTIPHER G.L., HARRIS P.J., 1978. Adhesion of Bacteroïdes succinogenes in pure culture and in the presence of Ruminococcus flavefaciens to the cell walss in leaves of perennial Ryegrass (Lolium perenne). Appl. Env. Microbiol. 35, 1166-1173.

* LAUBE V.M., MARTIN S.M., 1981. Conversion of cellulose to methane and carbone dioxide by triculture of Acetovibrio cellulolyticus, Desulfovibrio sp. and Methanosarcina barkeri. Appl. Environ. Microbiol., 42, 413-420.

* LEE B.H., BLACKBURN T.H., 1975. Cellulase production by a thermophilic Clostridium species. Appl. Microbiol. 36, 346-353.

* LEE Y.H., FAN L.T., 1980. Properties and mode of action of cellulase. Adv. Biochem. Eng. 17, 101-129.

* LEIGH J.A., MAYER F., WOLFE R.S., 1981. Acetogenium kivui, a new thermophilic hydrogen-oxidizing acetogenic bacterium. Arch. Microbiol., 129, 275-280.

* LE RUYET P., 1984. Hydrolyse et fermentation des polyosides végétaux par les bactéries anaérobies. Thèse de Docteur-Ingénieur. LILLE I.

* LE RUYET P., DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G., 1984. Thermophilic fermentation of cellulose and xylan by methanogenic enrichment cultures : preliminary characterization of main species. System. Appl. Microbiol., 5, 247-253.

* LETTINGA G., 1980. Anaerobic digestion for energy saving and production. International Conference : "Energy from Biomass", 4-7 November 1980.

* LETTINGA G., DE ZEEUW W., OUBORG E., 1981. Anaerobic treatment of wastes containing methanol and higher alcohols. Wat. Res. 15, 171-218.

* LEVY P.F., BARNARD G.W., GARCIA-MARTINEZ D.V., SANDERSON J.E., WISE D.L., 1981. Organic acid production from CO_2/H_2 by mixed culture anaerobes. Biotechnol. Bioeng. 23, 2293-2306.

* LILLEHOJ E.B., HAN Y.W., 1983. Chemical and ray modification bagasse as substrates for bioproduction of cellulase and proteins. Biotechnol. Bioeng. 25, 2077-2084.

* LOROWITZ W.H., BRYANT M.P., 1983. Peptostreptococcus productus produces acetate and succinate from carbon monoxide. Abstracts, Symposium on Microbiol. Ecology.

* LUND B.M., BROCKLEHURST T.F., 1978. Pectic enzymes of pigmented strains of Clostridium. J. of Gen. Microbiol. 104, 59-66.

* LüTZEN N.W., NIELSEN M.H., OXENBOELL K.M., SCHULEIN M., STENTEBJERG-OLESEN, 1983. Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 300, 283-291.

* MACKIE R.I., BRYANT M.P., 1981. Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate and CO_2 to methanogenesis in cattle waste at 40°C and 60°C. Appl. Environ. Microbiol., 41, 1363-1373.

* MADDEN R.H., 1983. Isolation and characterization of Clostridium stercoarium sp. nov., a cellulolytic bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 837-840.

* MAH R.A., WARD D.L., BARESI L., GLASS T.L., 1977. Biogenesis of methane. Annu. Rev. Microbiol., 3, 321-326.

* MAH R.A., SUSSMAN C., 1967. Microbiology of anaerobic sludge fermentation : I. Enumeration of the non methanogenic anaerobic bacteria. Appl. Microbiol. 16, 358-361.

* MATHESON A.T., YAGUCHI M., 1982. The evolution of the archaebacterial ribosome. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 192-199.

* Mc BEE R.H., 1950. The anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev., 14, 51-63.

* Mc BRIDE B.C., WOLFE R.S., 1971. A new coenzyme of methyl transfert, coenzyme M. Biochemistry, 10, 2317-2324.

* Mc CARTY P.L., 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals. Public works, 95(9, 10, 11, 12) 107-112, 123-126, 91-94, 95-99.

* Mc CARTY P.L., 1970. Energetics and kinetics of anaerobic treatment. Anaerobic biological treatment processes. Advances in Chemistry Series 105.

* Mc CRADY M.H., 1915. The numerical interpretation of fermentation tube results. Journal of infections diseases 17, 183-212.

* Mc DONALD D.G., BAKSI N.N., MATHEW J.F., ROYCHOWDHURY A., BAJPAI P., MOO-YOUNG M., 1983. Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 25, 2067-2076.

* Mc 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.

* MANDELS M., DORVAL S., MEDEIROS J., 1978. In "Cellulases : biosynthesis and applications" Ryn D.D.Y., Mandels M. - Enzyme. Microb. Technol. 1980 Vol. 2, April p. 91-102.

* MILLER G.L., BLUM R., GLENNON W.E., BURTON A.L., 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. Anal. Biochem. 2, 127-132.

* MILLETT M.A., BAKER A.J., SATTER L.D., 1974. Pre-treatments to enhance chemical, enzymatic and microbiological attack of cellulosis materials. Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 5, 193-219. John Wiley and Sons, Inc.

* MOLETTA R., ALBAGNAC G., 1982. A gas meter for low rates of gas flow. Application to the methane fermentation. Biotechnology letters, Vol. 4, N° 5, p. 319-322.

* MONTFORD D.O., BRYANT M.P., 1982. Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate degrading bacterium from sewage sludge. Arch. of Microbiol. 133, 249-256.

* MORFAUX J.N., SARRIS J., 1974. Détermination automatique de la DCO : étude critique de l'oxydation de quelques corps purs. La Tribune du Cebedeau, 363, 1-8.

* MORRIS E.J., BACON J.S.D., 1977. The fate of acetyl groups and sugar components during the digestion of grass cell walls in sheep. J. Agric. Sci. Camb. 89, 327-340.

* MORRIS E.J., VAN GYLSWYK N.O., 1980. Comparison of the action of rumen bacteria on cell walls from Eragrostis tef. J. Agric. Sci. Camb. 95, 313-323.

* MORRISON I.M., 1973. Isolation and analysis of lignin-carbohydrate complexes from Lolium multiflorum. Phytochemistry 12, 2979-2984.

* NAKUMURA L.K., CROWELL C.D., 1979. Lactobacillus amylophilus, a new starch-hydrolyzing species from swine waste corn fermentation. Developmental and Indust. Microbiol. 20, 531-540.

* NG T.K., BEN BASSAT A., ZEIKUS J.G., 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria : fermentation of cellulosic substrates by co-cultures of Clostridium thermocellum and Cl. thermohydrosulfuricum. Appl. Environm. Microbiol. 41, 6, 1337-1343.

* NOVAK J.T., 1975. Water Research, Vol. 9, p. 963-967. Pergamon Press. Great Britain.

* OREMLAND R.S., MARSH L.M., POLCIW S., 1982. Methane production and simultaneous sulfate reduction in anoxic, salt marsh sediments. Nature, 296, 5853, 143-145.

* PATNI N.J., REGE D.V., 1975. Induction of cellulolytic enzymes in Streptomyces caespitosus. Indian Journal of Experimental Biology 13, 551-554.

* PETROFF D., 1983. Fermentation méthanique de polysusbtrats - Aspects cinétiques et microbiologiques - Thèse de Docteur-Ingénieur (Microbiologie) Université Claude Bernard - LYON I.

* REESE E.T., SIU R.G.H., LEVINSON H.S., 1950. In "Properties and mode of action of cellulase" LEE Y.H., FAN L.T. Adv. in Biochem. Eng. Vol. 17, J. Bacteriol. 59, 485.

* ROY F., VERRIER D., FLORENTZ M., 1983. Symposium A.W.W.T. PAYS BAS, Novembre 1983.

* RYU D.D.Y., LEE S.B., TASSINARI T., MACY C., 1982. Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics. Bictechnol. Bioeng. 24, 1047-1067.

* RYU D.D.Y., MANDELS M., 1980. Cellulases : biosynthesis and applications. Enzyme Microb. Technol., Vol. 2, p. 91-101.

* SAMAIN E., 1983. Métabolisme des composés intermédiaires de la fermentation méthanique. Thèse de 3ème cycle. Université de LILLE I.

* SCOTT R.I., YARLETT N., HILLMAN K., WILLIAMS T.N., WILLIAMS A.G., 1983. The presence of oxygen in rumen liquor and its effects on methanogenesis. J. of Appl. Bacteriol. 55, 143-149.

* SHARER J.M., MOO-YOUNG M., 1979. Methane generation by anaerobic digestion of cellulose containing wastes. Adv. in Biochim. Eng. 11.

* SHEFFER T.C., DUNCAN C.G., WILKINSON T., 1969. Condition of pine piling submerged 62 years in river water. Wood Preserv. News 47, 22-24.

* SHIBUYA N., IWASAKI T., 1978. Agric. Biol. Cem., 42, 2259. In : Hemicellulosic polymers of cabbages leaves, STEVENS B.J.H., SELVENDRA R.R., 1984. Phytochemistry 23, 2, p. 339-347.

* SHIBUYA N., MISAKI A., 1978. Agric. Biol. Chem. 42, 2267. In : Hemicellulosic polymers of cabbages leaves. STEVENS B.J.H., SELVENDRA R.R., Phytochemistry 23, 2, p. 339-347, 1984.

* SPEECE, Mc CARTY P.L., 1962. Nutrient requirements and biological solids. Accumulation in anaerobic digestion. J. Water Poll. Control. Fed. 34, 3, 229-230.

* SPREY B., LAMBERT C., 1983. Titration curves of cellulases from Trichoderma reesei demonstration of a cellulase xylanase ß glucosidase containing complex. FEMS Microbiol. Lett. 18, 217-222.

* STAFFORD D.A., HAWKES D.L., HORTON R., 1978. Methane production from organic matter. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, 285 p.

* STERNBERG D., MANDELS G.R., 1979. Induction of cellulolytic enzymes in Trichoderma reesei by sophorose. J. Bacteriol. 139, 761-769.

* STEVENS B.J.H., SELVENDRA R.R., 1984. Hemicellulosic polymers of cabbage leaves. Phytochemistry 23, 339-347.

* STEWART C.S., PANIAYUA C., DINSDALE D., CHENG K.J., GARROW S.H., 1981. Selective isolation and characterization of Bacteroïdes succinogenes from the rumen of cow. Appl. and Environ. Microbiol. 41, 504-510.

* TARKOW H., FEIST W.C, 1969. In Cellulase and their applications (Advan. Chem. Ser. 95), Amer. Chem. Soc., Washington D.C.

* THIBAULT J.F., 1980. Les substances pectiques. In : Les polymères végétaux. B. MONTIES Gauthier Villars (Ed.) Bordas, PARIS. p. 232.

* TOERIEN D.F., 1967. Enrichment culture studies on aerobic and anaerobic bacteria found in anaerobic digesters. Wat. Res. 1, 147-155.

* TOUZEL J.P., ALBAGNAC G., 1982. Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC 3. FEMS Letters.

* TOUZEL J.P., ALBAGNAC G., 1985 (in press). Acetoclastic methanogens in anaerobic digesters. Proceedings of the DOE-ANL First Symposium on Biotechnological Advances in Processing Municipal Wastes for Fuels and Chemicals, MINNEAPOLIS, August 15-17, 1984.

* TOUZEL J.P., PETROFF D., ALBAGNAC G., 1984. Isolation and characterization of a new thermophilic Methanosarcina, the strain CHTI 55. Systematic and Applied Microbiology (in press).

* TRIVELDI L.S., RAO K.K., 1980. Cellulase induction in Aspergillus fumigatus M 126. Indian J. Exp. Biol.

* UEKI A., MIYAGAWA E., MINATO A., AZUMA R., SUTO T., 1978. Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digestor fluids. J. Gen. Appl. Microbiol. 24, 317-332.

* VAN SOEST P.J., 1963. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 46, 829.

* VAN SOEST P.J., 1979. Forages fiber and the rumen. Freeman, SAN FRANCICO, Ca.

* VAN VELSEN A.F.M., LETTINGA G., 1979. Effect of feed composition on digester performances. First Symposium on Anaerobic Digestion, CARDIFF 17-21st September.

* VERRIER D., MOLETTA R., ALBAGNAC G., 1983. Anaerobic digestion of vegetable canning wastewaters by anaerobic contact process : operational experience. Presented at the 3rd Anaerobic Digestion Symposium, BOSTON.

* VERRIER D., ROY F., FLORENTZ M., 1983. Two-stage anaerobic digestion of solid vegetable wastes : bench-scale studies. 3rd International Symposium on Anaerobic Digestion, 14-19 August, BOSTON, U.S.A.

* VOGELS G.D., KELTJENS J.J., HUTTE T.J., VAN DER DRIFT C., 1982. Coenzymes of methanogenic bacteria. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 258-264.

* WALKER D.J., HOPGOOD M.F., 1961. The hydrolysis of wheaten hay hemicellulose by a purified enzyme from rumen microorganisms. Aust. J. of Agri. Sci. 12, 651-660.

* WALTHER R., FIEBIGK, FAHLBUSCH K., CASPARI D., HIPPE H., GOTTSCHALK G., 1980. Growth of methanogens on methylamines. Proceedings of the 3rd Symposium International. SHEFFIELD U.K. 12-16 August.

* WHAITE R., JOHNSTON M.J., ARMSTRONG D.G., 1964. The evaluation of artificially dried grass as a source of energy for sheep. J. Agric. Sci. 62, 391.

* WIEMER P.J., ZEIKUS J.G., 1977. Fermentation of cellulose by Clostridium thermocellum in the absence and the presence of Methanobacterium thermoautotrophicum. Appl. Env. Microbiol. 33, p. 289-297.

* WISTLER R.L., RICHARDS G.R., 1970. Hemicelluloses. pp. 447-469 in W. Pigman and D. Horeton. Eds "The carbohydrates chemistry and biochemistry" Academic Press NEW YORK, LONDON.

* WOLIN M.J., 1974. Metabolic interactions among intestinal microorganisms. The American Journal of Clinical Nutrition 27, 1320-1328.

* WOLIN M.J., 1975. Interactions between H_2-producing and methane producing species. Dans Microbial production and utilisation of gazes. GöTTINGEN.

* WOODARD A.J., STAFFORD D.A., CALLERY A.G., 1974. Biochemical studies on accelerated treatment of thiocyanate by activated sludge using growth factors such as pyruvate. J. Appl. Bacteriol. 37, 277.

* YANG P.Y., 1981. Methane fermentation of hawaïen seaweeds. In : "Symposium papers : Energy from Biomass and Wastes V" D.L. Klass, J.W. Weatherly III (Eds), Inst. of Gas Technol., CHICAGO, Ill. 307.

* YOUNG J.C., Mc CARTY P.L., 1969. The anaerobic filter for waste treatment. J. Water Poll. Control Fed. 41, 5, R 160-R 173.

* ZEHNDER A.J.B., INGVORSEN K., MARTI T., 1982. Microbiology of methane bacteria. Anaerobic digestion. Second International Symposium on Anaerobic Digestion. TRAVEMüNDE, 6-11 September 1981.

* ZEIKUS J.G., WELLSTEIN A.L., KIRK T.K., 1982. Molecular basis for the biodegradative recalcitrance of lignin in anaerobic environments. FEMS Microbiol. Lett. 15, 193-197.

* ZILLIG W., STETTER K.O., 1980. Distinction between the transcription systems of Archaebacteria and Eubacteria. In : Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosomes (OSAWA S., OZEKI H., UCHIDA H., YURA T., eds) p. 252-538. Univ. of TOKYO Press, AMSTERDAM, NEW YORK, OXFORD Elsevier North Holland.

* ZILLIG W., STETTER K.O., SCHNABEL R., MADON J., GIERL A., 1982. Transcription in Archaebacteria. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 218-227.

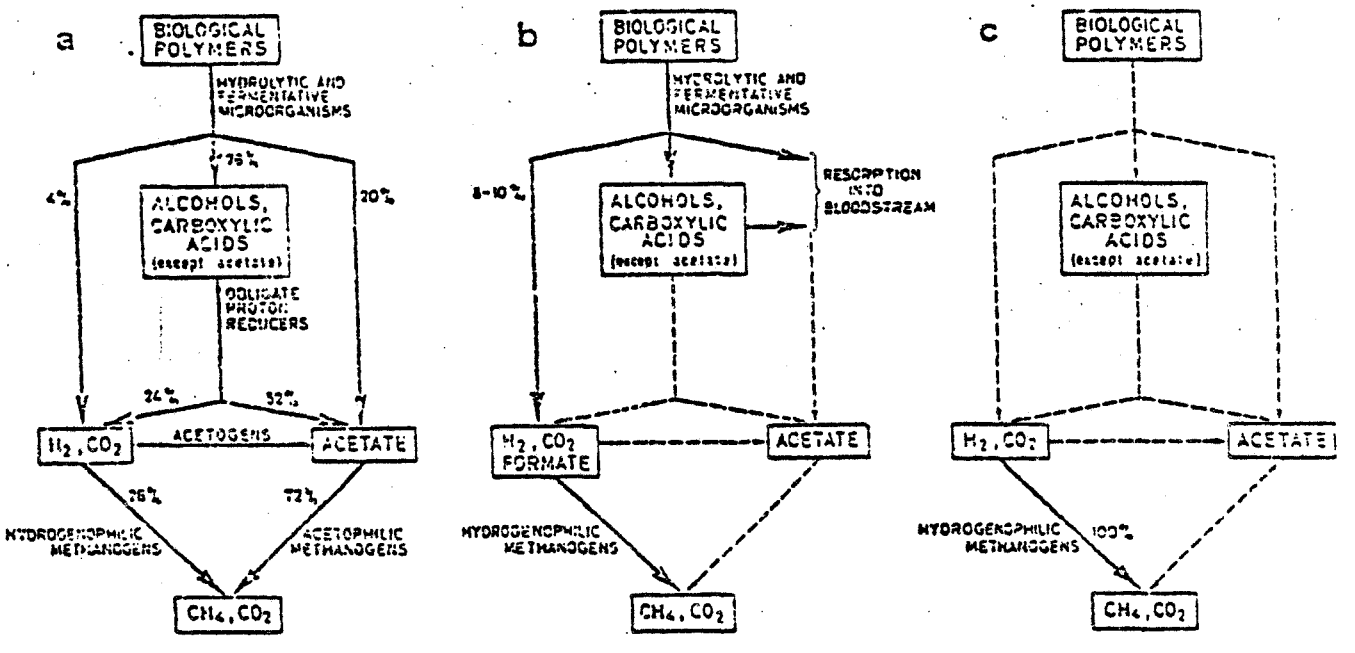
* ZINDER S.H., ANGUISH T., CARDWELL S.C., 1984 a. Effect of temperature on methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digestor. Appl. and Environ. Microbiol., April, p. 808-813, Vol. 47, N° 4.

* ZINDER S.H., CARDWELL S.C., ANGUISH T., LEE M., KOCH M., 1984 b. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digestor. Methanothrix sp. as an important acetoclastic methanogen. Appl. and Environ. Microbiol., p.796-807.

* ZOETEMEYER R.J., 1982. Acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewaters. Thèse. Université d'AMSTERDAM.

ANNEXES

ANNEXE I



Flux des substrats dans les écosystèmes anaérobies - Zehnder et al. (1982).
(a) Fermenteurs, sédiments pauvres en sulfates
(b) Ecosystèmes gastro-intestinaux
(c) Ecosystème géothermique

ANNEXE II

Principales voies métaboliques de l'hydrolyse (PLANCHE I)
et de lacidogénèse (PLANCHE II).

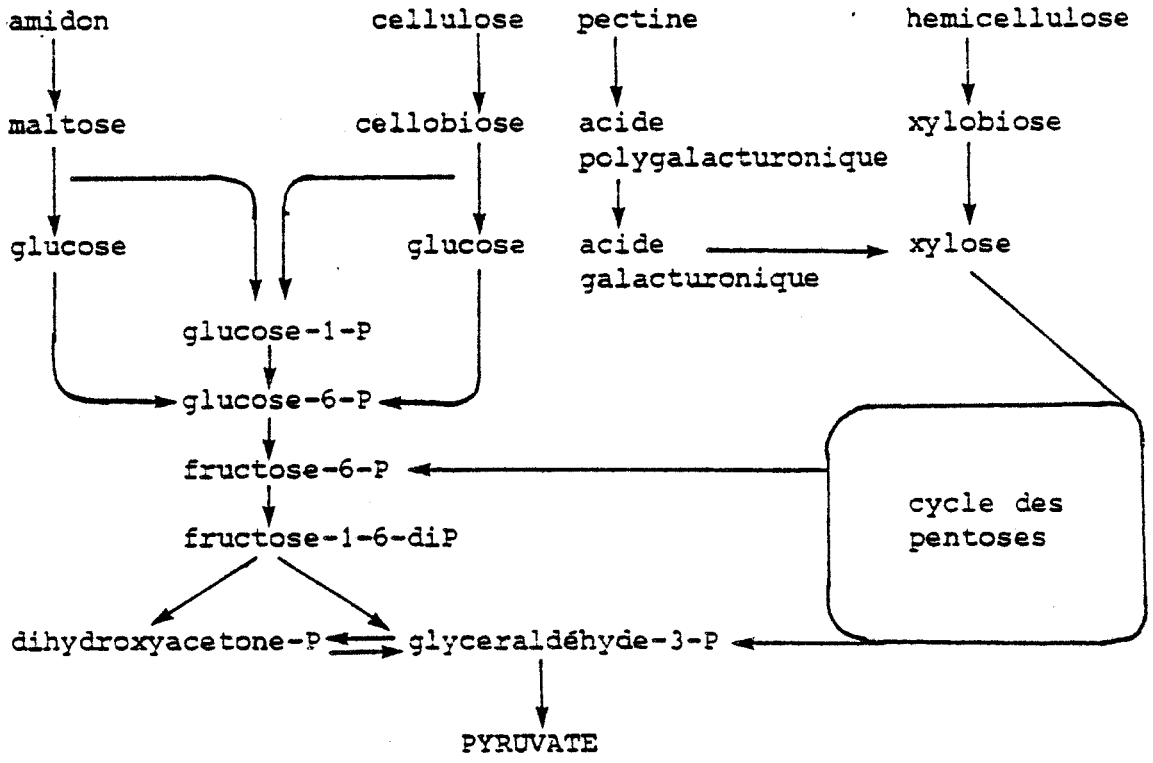


PLANCHE I

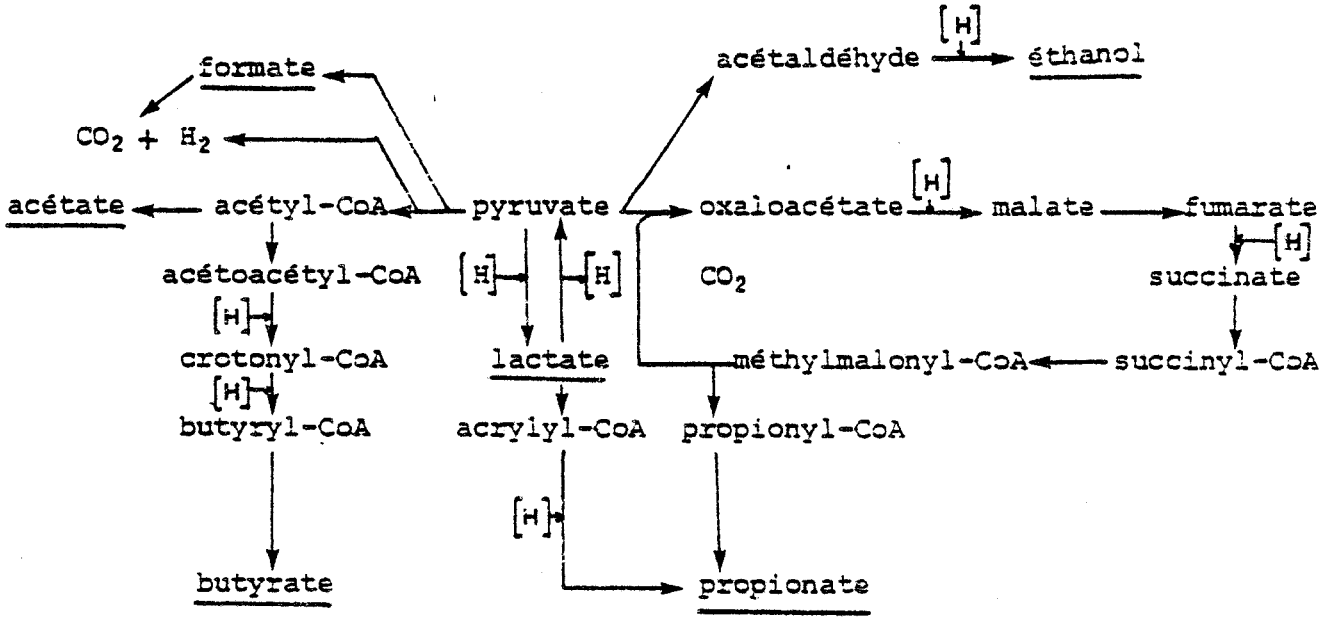
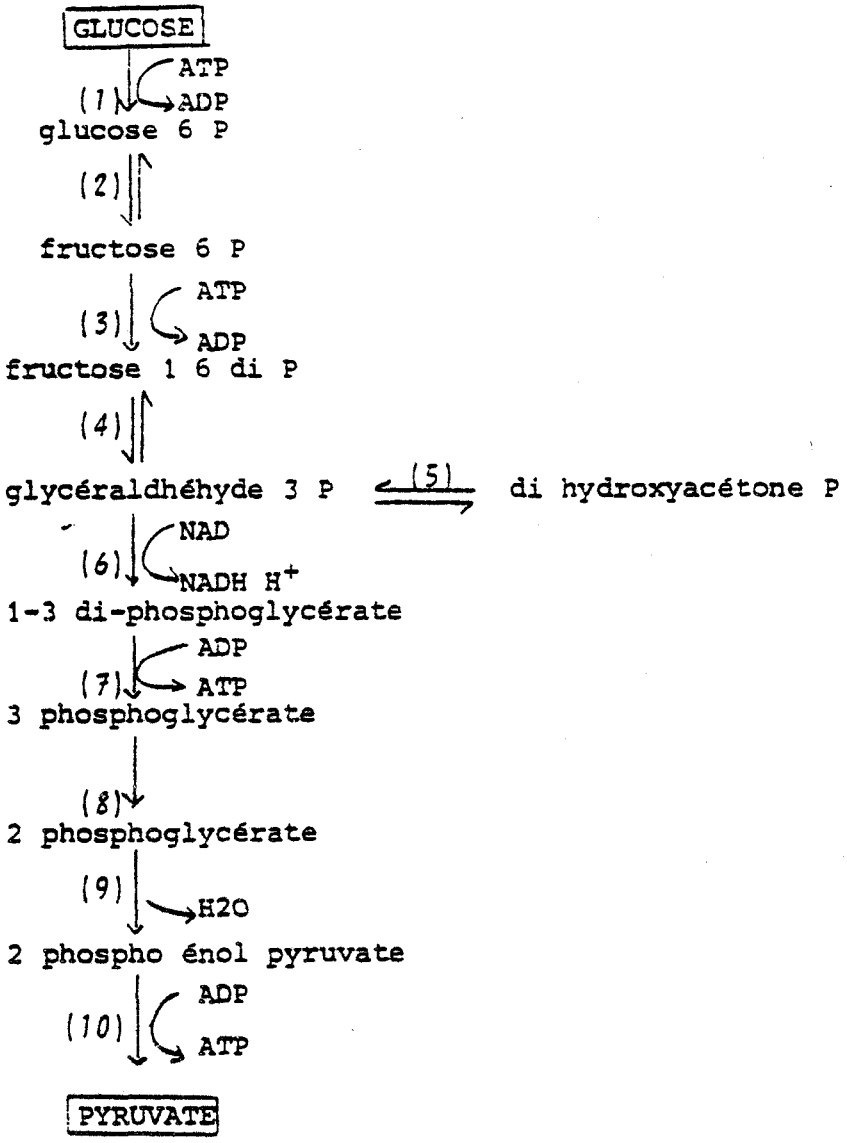


PLANCHE II

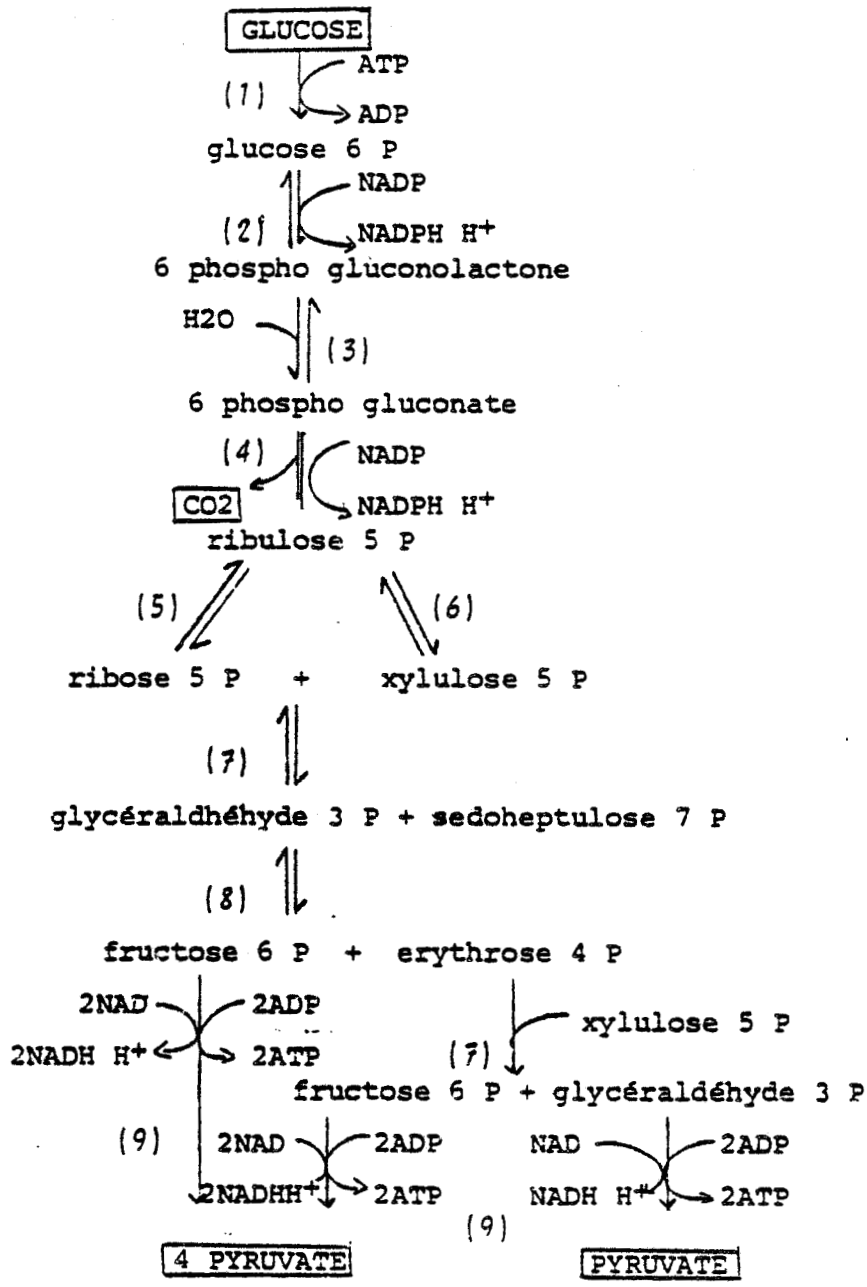
ANNEXE III



- DEGRADATION DES OSES PAR LA VOIE D'EMBDEN-MEYERHOF-

-PARTNAS: (1) *hexokinase*; (2) *phospho-glucose isomérase*; (3) *6-phospho-fructokinase*; (4) *fructose di phosphate aldolase*; (5) *triose phosphate isomérase*; (6) *glycéraldhéhyde 3 phosphate deshydrogénase*; (7) *3-phospho glycérate kinase*; (8) *phospho glycérate mutase*; (9) *énolase*; (10) *pyruvate kinase*.

ANNEXE IV



.- DEGRADATION DES OSES PAR LA VOIE DE WARBURG-DICKENS;

(1) *hexokinase*; (2) *glucose 6 P deshydrogénase*; (3) *lactonase*; (4) *6-phospho-gluconate deshydrogénase*; (5) *ribose phosphate isomérase*; (6) *ribulose-phosphate 3 épimérase*; (7) *transcétolase*; (8) *transaldolase*; (9) *enzymes de la voie E.M.P.*

ANNEXE V

CONSTANTES PHYSIQUES DU METHANE

-*-*-*-*-

Poids moléculaire	16,04
Température d'ébullition (à 1 atm.)	- 164.0°C
Température de congélation (à 1 atm.)	- 182.5°C
Densité à 0°C, 1 atm.	0,7172 kg/m^3
Capacité thermique à 15°C, 1 atm.	2,219 kJ/kg °C
Valeur calorifique à 15°C et 101,325 kla	37,71 MJ/m^3

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE LILLE

R E S U M E

-*-*-

La méthanisation des résidus végétaux pose deux problèmes essentiels : le choix d'une technologie de fermenteur et la recherche des conditions optimales d'activité des populations bactériennes. Il est bien établi que l'étape limitante est l'hydrolyse des composés cellulosiques et hémicellulosiques. Nous avons étudié la méthanisation, par le procédé conventionnel, de divers déchets végétaux : racines d'endives, feuilles de choux-fleurs, gazon, lentilles d'eau. La fermentation est stable pour des temps de séjour supérieurs à 15 jours, ce qui correspond à des charges volumiques de 2 à 5 grammes de matière volatile par litre et par jour, et des rendements compris entre 0,23 et 0,37 m^3 de méthane par kg de matière volatile. Par ailleurs, nous avons étudié l'adaptation de la flore à un changement brutal de substrat ou de température.

Enfin, le dénombrement bactérien indique une relation étroite entre la composition polysaccharidique du substrat et les espèces hydrolytiques dominantes.

Mots clés *: Adaptation - Anaérobie - Biogaz - Fermentation - Hémicellulolytique - Mésophile - Méthane - Résidus végétaux -*