

50376
1985
91

THESE

présentée à

l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR - INGENIEUR
EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALE
par

FRANCIS ROY

Ingénieur Agronome de TOULOUSE

FERMENTATION METHANIQUE DES DECHETS GLUCIDIQUES SOLIDES ET DES LIPIDES.
EXPERIMENTATIONS EN FERMENTEURS PILOTES.

Caractérisation de bactéries anaérobies strictes réalisant la
 β -oxydation des acides gras à longues chaînes.

Soutenu le 17 Juin 1985 devant la commission d'examen

5 ex

Jury :

Président : Monsieur J. GUILLAUME

Rapporteurs : Messieurs M. FLORENTZ
G. ALBAGNAC

Examineurs : Messieurs F. TAILLIEZ
C. DIVIES



50376
1985
91

50376
1985
91

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un contrat industriel de formation par la recherche attribué par l'Association Nationale pour la Recherche Technique (ANRT 16 Avenue BUGEAUD 75116 PARIS) au G.I.E. Anjou Recherche (Centre de Recherche du Groupe Générale des Eaux, chemin de la digue, BP 76, 78600 MAISONS LAFFITTE).

Les travaux entrepris résultent d'une concertation entre le G.I.E. Anjou Recherche et la station I.N.R.A. de Technologie alimentaire (369 rue Jules GUESDE, 59650 VILLENEUVE D'ASCQ) et se rapportent à des domaines d'études intéressant à la fois les deux organismes précités.

Les expérimentations, dont les résultats suivent, ont été réalisées à la station de Technologie Alimentaire, laboratoire d'accueil.

Je remercie ces association, société et établissement d'avoir réuni les conditions matérielles qui m'ont permis de mener à bien ces recherches.



Je remercie Monsieur G. ALBAGNAC, Directeur de la Station INRA de Technologie Alimentaire, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir aidé à prolonger mes études par un contrat de recherche dont je mesure tous les avantages.

Je remercie Monsieur M. FLORENTZ, responsable de mes travaux vis à vis de la Société Anjou Recherche, d'avoir joué son rôle dans une atmosphère de collaboration à laquelle j'ai été très sensible.

Je remercie Monsieur J. GUILLAUME d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse et Messieurs F. TAILLIEZ et C. DIVIES d'avoir bien voulu juger mon travail.

Au cours de ces années passées à la Station de Technologie Alimentaire, Messieurs H.C. DUBOURGUIER, D. VERRIER, J.P. TOUZEL, E. SAMAIN, P. DEBEIRE et J.L. ROUSTAN ont participé à des degrés divers à mes recherches et ont été attentifs à mes questions et observations. Je les remercie de leur patience et j'espère avoir pu leur rendre, par mes résultats, quelques connaissances en échange de ce qu'ils m'ont enseigné.

Je remercie Mesdames M. LOONIS, C. ALBAGNAC, C. VASSEUR, M. KUBACZKA, Mademoiselle F. FONTAINE et Messieurs J.P. LEPOUTRE, J. JACQUEMONT et J.F. MIGDAL qui ont tous leurs empreintes dans mes expériences ou dans leur mise en forme et bien sur Madame J. DEHON qui par son intendance irréprochable nous prépare notre café quotidien nous évitant la somnolence.

Il me reste à saluer mes camarades étudiants en souhaitant que persiste l'ambiance amicale qui s'est installée au laboratoire.

PLAN

INTRODUCTION -1-

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE -3-

I - FERMENTATION METHANIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE -3-

1 - Acétogenèse à partir des matières organiques ou des intermédiaires de fermentation -3-

2 - Méthanogenèse -4-

a - Voies métaboliques -5-

b - Microbiologie de la méthanogenèse -5-

II - METHANISATION DES RESIDUS SOLIDES - DISCUSSION DE L'INTERET DES PROCEDES AVEC SEPARATION DES PHASES -7-

1 - Technologie des procédés industriels de méthanisation -7-

2 - Conditions et cinétiques d'hydrolyse des polymères glucidiques -9-

a - Biologie des bactéries hydrolytiques et fermentatives -10-

b - Influence des paramètres de culture sur la vitesse d'hydrolyse. Orientation de la fermentation par transferts facultatifs d'hydrogène -12-

3 - Principe de la séparation des phases -12-

4 - Application à la méthanisation des résidus solides -13-

a - Préliminaire -13-

b - Procédés deux phases -14-

III - METHANISATION DES LIPIDES -17-

1 - Rappels sur les réactions d'acétogenèse -17-

a - Considérations thermodynamiques -18-

a - 1 - Energie des réactions d'acétogenèse -18-

a - 2 - Energie des réactions de réduction de protons -19-

a - 3 - Couplage des réactions d'acétogenèse et de réduction de protons -19-

b - Microbiologie de l'acétogenèse -20-

b - 1 Utilisation de l'hydrogène -20-

b - 2 Oxydation des produits de fermentation -20-

2 - Métabolisme de l'oxydation anaérobie des acides gras à longues chaînes, saturés et insaturés -23-

a - Influence des acides gras à longues chaînes sur l'activité bactérienne

-24-

a - 1 - Effet bactériostatique -24-

a - 2 - Réversibilité de l'effet antibactérien -26-

a - 3 - Activation par les acides gras -26-

b - Voies d'acétogenèse à partir des acides gras à longues chaînes -26-

b - 1 - β -oxydation des acides gras linéaires saturés -27-

b - 2 - Biohydrogénation des acides gras insaturés -28-

3 - Conclusion sur la méthanisation des lipides -30-

IV - CONCLUSION GENERALE -31-

MATERIEL ET METHODES

I - METHODES ANALYTIQUES -33-

1 - Déterminations analytiques servant à l'évaluation des fermentations en pilote -33-

- a - Matières sèches totales
- b - Matières en suspension
- c - Demande chimique en oxygène
- d - Carbone organique total
- e - Azote total KJELDAHL -34-
- f - Sucres totaux
- g - Détermination des fractions glucidiques
- h - Matières grasses totales

2 - Techniques chromatographiques

- a - Acides gras volatils
- b - Ethanol -35-
- c - Dosage des acides gras à longues chaînes
- d - Gaz de fermentation -36-
- e - Acides organiques

II - TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES -36-

1 - Cinétiques de fermentation en discontinu

2 - Cultures anaérobies - Milieux de culture -37-

3 - Technique d'isolement -38-

4 - Numérations bactériennes

RESULTATS

A - METHANISATION EN DEUX ETAPES DE DECHETS SOLIDES DE CONSERVERIE -40-

I - SUBSTRATS -40-

II - DISPOSITIF EXPERIMENTAL -40-

III - RESULTATS -42-

1 - Methanisation de déchets de pelage de carottes par le procédé conventionnel -42-

2 - Liquéfaction et acidogenèse -43-

a - Obtention de la séparation des phases -43-

b - Influence du pH sur la liquéfaction des déchets de pelage de betteraves rouges -44-

c - Influence de la température et de la nature des résidus solides sur les performances de liquéfaction à pH 6,5 -44-

d - Influence du taux de dilution -46-

e - Devenir des fractions glucidiques de la matière organique - Numération bactérienne -47-

3 - Méthanisation des produits d'acidogenèse -48-

a - Mode de conduite du filtre -48-

b - Méthanisation de l'hydrolysate thermophile -49-

c - Méthanisation de l'hydrolysate mésophile -49-

4 - Méthanisation en deux étapes - Comparaison des procédés -50-

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION -51-

1 - Fermenteurs monoétapes -51-

2 - Etape de liquéfaction -51-

3 - Méthanogenèse -53-

4 - Procédés avec séparation des phases -53-

5 - Comparaisons des procédés - Conclusion -53-

B - METHANISATION DES LIPIDES ET ACIDES GRAS -56-

I - METHANISATION D'UN EFFLUENT INDUSTRIEL CHARGE EN MATIERES GRASSES -56-

1 - Caractérisation de l'effluent -57-

2 - Dispositif expérimental -57-

3 - Résultats de méthanisation -58-

a - Méthanisation en discontinu -58-

a - 1 - Potentialité de rendement en méthane -58-

a - 2 - Influence du calcium -58-

b - Méthanisation en continu des jus de cuisson -59-

b - 1 - Méthanisation en réacteur filtre anaérobie mésophile -59-

b - 2 - Méthanisation en réacteur contact thermophile -59-

* - Performances de méthanisation en continu -60-

* - Influence de la conduite en mode contact -60-

* - Activité spécifique de dégradation de l'acétate par la flore adaptée à
55°C -60-

* - Modification de l'équilibre fermentaire par arrêt de la
complémentation en calcium -61-

- * - Potentialités de réactivation de la méthanogenèse -62-
- b - 3 - Méthanisation en réacteur contact mésophile -62-
 - * - Résultats de méthanisation en continu -63-
- * - Activité méthanogène acétoclaste de la flore adaptée en mésophile -64-
- 4 - Dénombréments bactériens et observations microbiologiques -65-
 - a - Flore fermentative -65-
 - b - Bactéries méthanogènes -65-
 - c - Bactéries acétogènes -66-
 - d - Bactéries sulfatoréductrices -67-
- 5 - Discussion et conclusion -67-
 - a - Contrôle de la fermentation -67-
 - b - Evolution de la fermentation sans apport de calcium -68-
 - c - Comparaison des méthanisations mésophile et thermophile -68-
- Conclusion -69-

II - ETABLISSEMENT D'ENRICHISSEMENTS ANAEROBIES MESOPHILES UTILISANT LES ACIDES GRAS A LONGUES CHAINES -70-

- 1 - Enrichissements méthanogènes -70-
 - a - Influence du rapport acide gras/calcium -71-
 - b - Influence de la concentration en acides gras -71-
 - c - Tests d'additifs pour la levée de l'inhibition par les AGLC -72-
 - d - Evolution de la fermentation de l'acide stéarique en présence de sulfate -72-
- 2 - Obtention de cultures acétogènes -73-
 - a - Nature des bactéries enrichies -73-
 - b - Rôle du calcium -75-
- 3 - Caractérisation de bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène et utilisant les acides gras linéaires, saturés et insaturés -76-

a - Caractérisation de la souche syntrophe obligée utilisant l'acide oléique

-76-

a - 1 - Morphologie -76-

a - 2 - Substrats utilisés -77-

a - 3 - Conditions et cinétiques de croissance -77-

a - 4 - Influence de la souche hydrogénophile -78-

b - Culture acétogène utilisant l'acide stéarique -79-

4 - Discussion -80-

CONCLUSION ET PERSPECTIVES -84-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

I - NOMENCLATURE DES ACIDES GRAS LINEAIRES

II - VERRIER D., F. ROY and M. FLORENTZ. 1983. Two stage anaerobic digestion of solid vegetable wastes. Third Int. Symp. Anaerobic Digestion. BOSTON.

III - ROY F., G. ALBAGNAC and E. SAMAIN. 1985. Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long-chain fatty acids. Appl. Environ. Microbiol. 49,702-705.

AVANT PROPOS

Le lecteur dispose en annexe d'un tableau rappelant la nomenclature, les noms usuels et les formules générales des différents acides gras linéaires, saturés et insaturés. Dans le texte, la fonction d'une population bactérienne est souvent employée comme substantif (une acétogène au lieu d'une bactérie acétogène). La signification des abréviations et termes spécifiques utilisés, est donnée ci-après :

Acétoclaste : bactérie ou réaction consommant de l'acide acétique.

Acétogène : bactérie ou réaction produisant de l'acide acétique.

Acidification : baisse du pH dans une culture acidogène dont le pH n'est pas régulé ou tamponné.

Acidogène : bactérie ou réaction produisant des acides gras ou des acides organiques.

Acylglycérols : esters d'acides gras et de glycérol ; synonyme : glycérides.

A.G.L.C. : acides gras à longues chaînes.

A.G.V. : acides gras volatils.

A.P.O.H. : acétogène productrice obligée d'hydrogène ; synonyme : syntrophe obligée. L'appellation anglaise O.H.P.A. peut être employée par inadvertance.

Charge volumique : quantité de substrat introduite dans un réacteur par unité de volume et unité de temps.

Charge massique : Quantité de substrat introduite dans le digesteur par unité de M.V.E.S. (estimation de la biomasse bactérienne) et par unité de temps.

D.C.O. : demande chimique en oxygène.

D.O. : densité optique.

Hydrogénophile : bactérie consommant l'hydrogène moléculaire.

Liquéfaction : hydrolyse d'un substrat solide.

Méthanogène : bactérie ou réaction produisant du méthane.

M.E.S. : matières en suspension.

M.V.E.S. : matières volatiles en suspension.

M.S.T. : matières sèches totales.

M.V.T. : matières volatiles totales ; synonyme : matières organiques totales.

M.M.T. : matières minérales totales ; synonyme : cendres.

N.T.K. : azote total Kjeldahl.

N.am : azote ammoniacal.

N.P.P. : nombre le plus probable (ou M.P.N. : most probable number).

PH₂ : pression partielle d'hydrogène.

Polyosides : polymères glucidiques ; synonyme : polysaccharides.

Productivité en méthane : volume de méthane produit par unité de volume et unité de temps. Dans le cas des réacteurs en deux étapes, la productivité est calculée par rapport aux volumes utiles cumulés des 2 cuves de fermentation.

Triacylglycérols : molécule de glycérol estérifiée par trois acides gras ; synonyme : triglycérides, lipides neutres ou de réserve.

T.S.H. : temps de séjour hydraulique.

T.S.S. : temps de séjour des solides.

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

La fermentation méthanique contrôlée est un processus anaérobie de dismutation des matières organiques complexes en méthane et gaz carbonique réalisée par des populations bactériennes mixtes.

Malgré les espoirs fondés sur la méthanisation des matières organiques d'origine agricole (fumiers, pailles) pour la diminution de notre dépendance vis à vis des combustibles fossiles importés (LESAGE - 1952), la compétitivité de cette production d'énergie n'est pas encore assurée compte tenu de la dispersion des sources de matières premières et des coûts encore relativement bas des autres combustibles (SOURIE - 1982).

Le problème se pose différemment lorsque la matière organique est source de pollution et doit être décomposée et non rejetée dans le milieu naturel. La fermentation méthanique est alors un mode de traitement qui possède un certain nombre d'avantages par rapport à la technique d'épuration aérobie. Sans être exhaustif, citons : la possibilité d'épurer des rejets organiques dont le rapport carbone sur azote est élevé (supérieur à 20) et une faible production de biomasse bactérienne corrélée avec un très bon rendement de conversion (90% environ) de la matière organique dégradée, en un gaz valorisable.

En site industriel, ce mode d'épuration peut s'associer à la récupération des calories "bas niveau" des effluents et le gaz est utilisable directement, sans compression.

La faible synthèse de biomasse constitue cependant un inconvénient dans la mesure où le taux de renouvellement des bactéries est très lent, le processus de démarrage du fermenteur est long et le procédé est sensible aux déséquilibres de fermentation (ALBAGNAC - 1981, MOSEY - 1981).

L'introduction des procédés de seconde génération (filtre anaérobie, lit de boue, lit fluidisé) dans lesquels la rétention de la biomasse bactérienne active est favorisée, rend possible l'augmentation des charges volumiques des réacteurs, à charge massique constante. De plus, ces procédés supportent beaucoup mieux les surcharges organiques ou les modifications temporaires des paramètres de culture. Par contre, leur

utilisation est incompatible avec la présence, dans les eaux à traiter, d'une concentration élevée en matières en suspension (VAN DEN BERG - 1983, VERRIER - 1984).

Pour ces différentes raisons, la fermentation méthanique est bien adaptée à l'épuration des effluents à concentration élevée en carbone organique soluble générés par les industries agro-alimentaires.

L'épuration anaérobie y est conçue comme un moyen d'abattement de la demande chimique en oxygène. Un traitement aérobie de finition est généralement nécessaire pour éliminer la pollution carbonée résiduelle et l'ammoniaque. Les procédés ont dépassé le stade de l'expérimentation pilote et on dénombre plusieurs réalisations industrielles dans les conserveries, sucreries, industries de la pomme de terre. Dans une conserverie du Nord, le biogaz vient en remplacement d'environ 10% des besoins totaux en combustibles de l'usine.

Dans ses grandes lignes, la biologie de la méthanogenèse est actuellement bien connue, sauf en ce qui concerne l'acétogenèse à partir des acides de la série aliphatique (acides gras).

De plus, des rejets organiques sont actuellement non ou mal valorisés et les travaux qui ont été réalisés visent deux objectifs :

-1- Pour tenter de généraliser l'emploi des filtres anaérobies à des déchets organiques solides, ceux-ci sont traités par un procédé en deux phases (liquéfaction - méthanogenèse). L'étape de liquéfaction est plus particulièrement étudiée dans le sens d'une optimisation des paramètres de fermentation.

-2- Le cas des rejets chargés en matières grasses est plus original dans la mesure où la faisabilité elle-même de la digestion anaérobie de ce type d'effluent était à démontrer.

La connaissance du métabolisme des populations bactériennes impliquées dans ce processus est nécessaire et dans ce but nous étudions la dégradation anaérobie des acides gras à longues chaînes et les problèmes de toxicité qui leurs sont liés.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

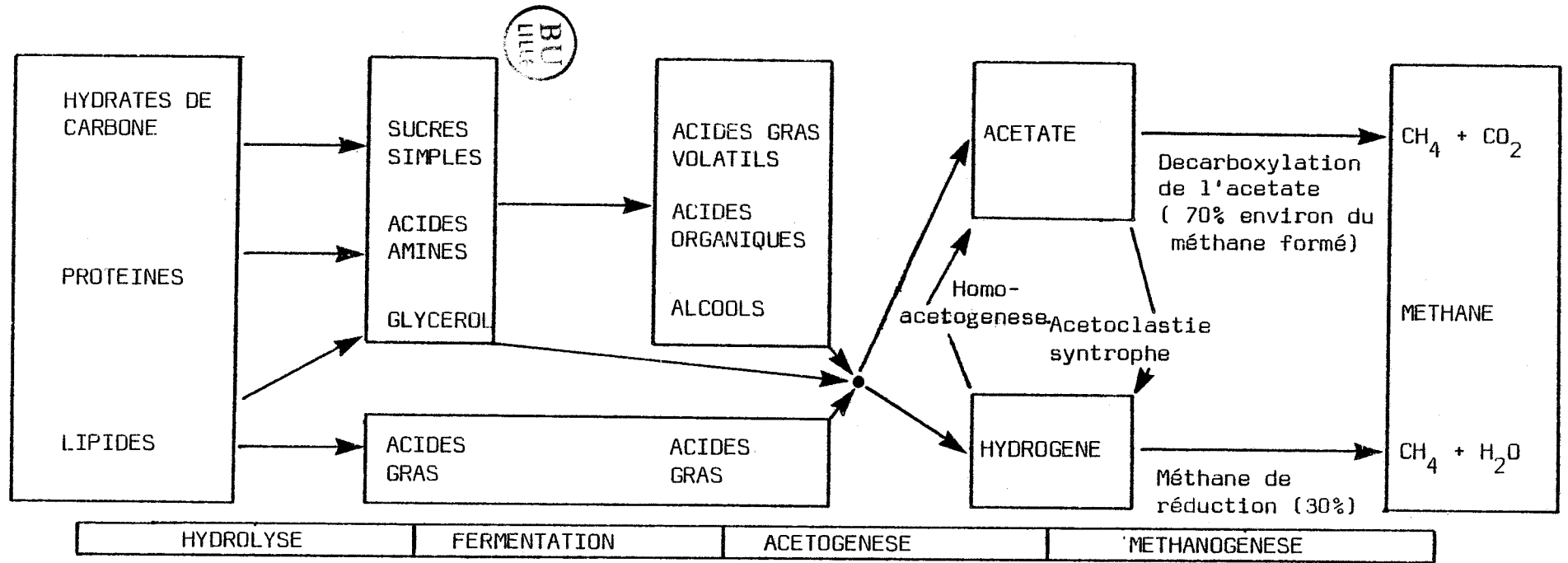


Figure 1. ETAPES DE LA DEGRADATION ANAEROBIE DE LA MATIERE ORGANIQUE EN MILIEU PAUVRE EN SULFATE.

(modifié à partir de Gujer - 1983)

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I - FERMENTATION METHANIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE

Selon un schéma classique, la digestion anaérobie complète de la matière organique est la résultante de 3 étapes métaboliques : l'hydrolyse et la fermentation des polymères, l'acétogénèse à partir des produits de fermentation et la méthanogénèse à partir de l'acétate et à partir de l'hydrogène (figure 1).

Le processus méthanogène joue un rôle fondamental dans les niches anaérobies par transformation des produits de dégradation de la matière organique, en méthane et gaz carbonique, gaz qui sont éliminés du milieu et réintègrent le cycle du carbone. Dans les digesteurs, les méthanogènes éliminent en permanence les composés toxiques vis à vis des bactéries anaérobies (protons, acides organiques) et contribuent au maintien du pH à une valeur optimale.

1 - Acétogénèse à partir des matières organiques ou des intermédiaires de fermentation.

Les substrats complexes polymérisés sont hydrolysés par voie enzymatique exocellulaire. Ces enzymes sont synthétisés et excrétés par les bactéries hydrolytiques et fermentatives qui assimilent les monomères ainsi libérés (sucres simples, acides aminés, glycérol) et les utilisent comme source de carbone et d'énergie pour leur développement. Les bactéries hydrolytiques sont généralement spécialisées dans l'utilisation d'un polymère précis : cellulolytiques, xylanolytiques, protéolytiques, lipolytiques, et une dépolymérisation complète résulte souvent de l'action d'un consortium enzymatique (cas de la cellulolyse).

Les monomères issus de l'étape d'hydrolyse sont transformés par les bactéries fermentatives, en fonction de leur potentiel enzymatique et des conditions du milieu, en composés organiques tels que acide lactique, éthanol, acides gras volatils. La production de ces composés est influencée en particulier par le pH et la pression partielle d'hydrogène régnant dans le milieu.

Les composés fermentaires sont ensuite dégradés par une étape d'acétogénèse avec production obligée d'hydrogène. C'est une étape clé dans la production des deux principaux substrats des méthanogènes : acétate et $H_2 - CO_2$. Les réactions d'acétogénèse oxydatives à partir des produits de fermentation sont thermodynamiquement réalisables lorsque la pression partielle d'hydrogène est très faible, condition qui peut être obtenue par transfert interspécifique d'hydrogène entre les bactéries acétogènes et les bactéries hydrogénophiles, méthanogènes, homoacétogènes, ou sulfatoréductrices en présence de sulfate.

2 - Méthanogénèse.

Les bactéries méthanogènes sont des bactéries anaérobies strictes que l'on rencontre dans les écosystèmes dont le potentiel redox est très bas, voisin de -350 mV. Dans les digesteurs de méthanisation, cette condition est obtenue par l'activité cumulée des populations anaérobies facultatives et sulfatoréductrices, qui éliminent toute trace d'oxygène et réduisent le milieu.

Les bactéries méthanogènes utilisent une gamme de substrats très limitée : acétate, $H_2 - CO_2$, formate, CO, méthanol et méthylamines. En général, dans les écosystèmes méthanigènes le flux carbone passe principalement par l'acétate et hydrogène - gaz carbonique. Les bactéries méthanigènes, avec les bactéries halophiles et thermoacidophiles, ont été récemment classées dans une nouvelle lignée, les Archéobactéries, qui s'ajoute aux lignées des Eubactéries et des Eucaryotes.

Les voies métaboliques qui permettent aux méthanigènes de tirer leur énergie des substrats précités sont originales et ne sont pas encore complètement élucidées (figure 2). En particulier, ces bactéries synthétisent des molécules spécifiques : le coenzyme M (acide 2-mercaptoéthane sulfonique) est un transporteur de groupement méthyl, le facteur F420 est un transporteur d'électrons à bas potentiel, le facteur MF430 qui est le cofacteur de la méthyl coM réductase et la méthanoptérine qui joue chez les méthanogènes un rôle dans le transport des groupements monocarbonés (ESCALANTE-SEMERANA - 1984).

Tableau 1.

THERMODYNAMIQUE DES REACTIONS DE METHANOGENESE (Thauer-1977)

- (1) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- \quad \Delta G^{\circ}' = -31,0 \text{ KJ/reaction.}$
- (2) $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \quad \Delta G^{\circ}' = +104,6 \text{ KJ/reaction.}$
- (3) $4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O} \quad \Delta G^{\circ}' = -135,6 \text{ KJ/reaction.}$

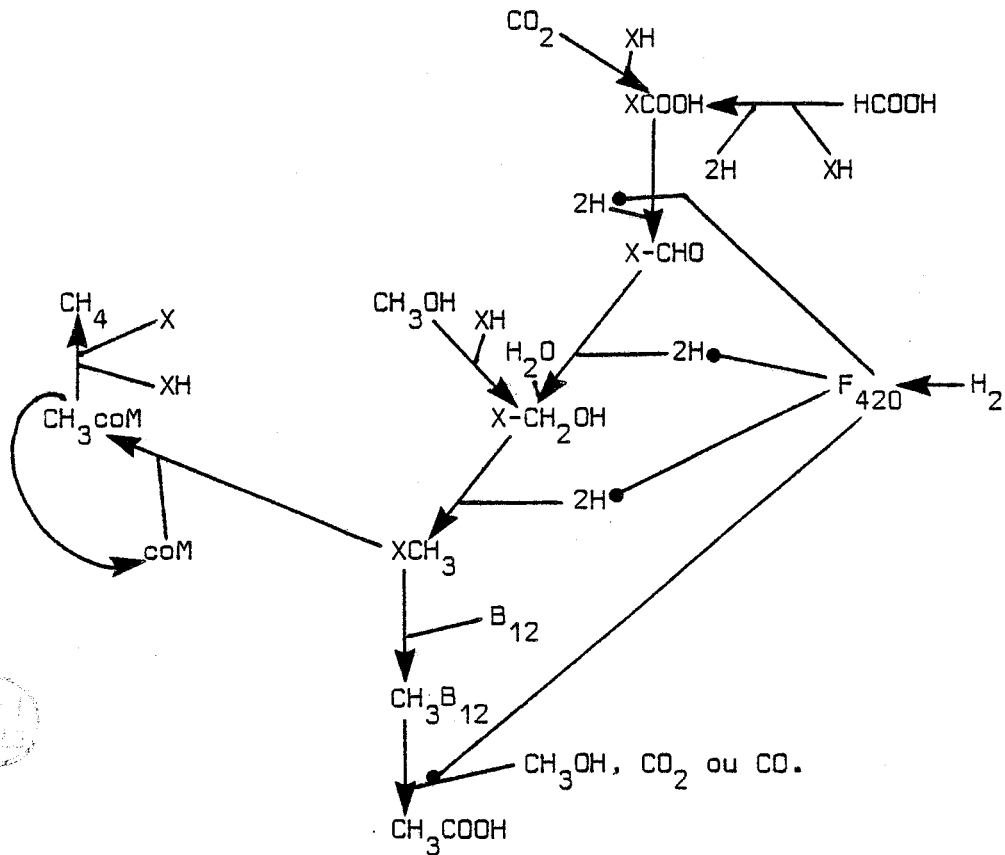


Figure 2.

REDUCTION DU CO₂ EN METHANE OU ACETATE PAR LES BACTERIES

METHANOGENES. (Zeikus-1980 ; Frea-1984)

La méthanogenèse peut être spécifiquement inhibée par addition de 2 - bromoéthanesulfonate de sodium, un analogue structural du coenzyme M qui bloque l'activité de la méthyl coM réductase (SMITH - 1981). Le facteur F420 est fluorescent dans sa forme oxydée. Cette propriété est utilisée pour la mise en évidence des méthanogènes lors de l'observation microscopique.

a - Voies métaboliques

Le schéma des voies de synthèse du méthane établi par BARKER en 1956 a été depuis complété mais non remis fondamentalement en question.

L'assimilation des composés monocarbonés pour la production de méthane (gain d'énergie) et d'acétate (molécule de base pour la synthèse des constituants cellulaires) permet la croissance autotrophe des bactéries méthanogènes.

La production de méthane à partir de l'acétate est moins énergétique que la voie de réduction du CO_2 utilisant l'hydrogène (réactions 1 et 3 du tableau 1). L'utilisation d'acétate marqué a montré que le méthane provient du groupement méthyl de l'acétate.

La production d'ATP par la voie de méthanogenèse acétoclaste est encore inexplicée : la réaction n'est pas suffisamment exergonique pour être couplée à la formation d'une liaison riche en énergie. La formation d'un gradient de protons permettrait l'accumulation d'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP.

b - Microbiologie de la méthanogenèse

Dans les écosystèmes naturels, la production de méthane a été observée dans une gamme de température allant de 4°C à 75°C. On distingue cependant des optima de température pour la croissance des bactéries méthanogènes : 1) mésophile, 35°C pour la méthanogenèse acétoclaste ou hydrogénophile, 2) thermophile, vers 55°C, pour la méthanogenèse acétoclaste, 3) thermophile vers 65°C pour la méthanogenèse hydrogénophile.

Tableau 2.

PARAMETRES CINETIQUES DE BACTERIES METHANIGENES. (Zehnder-1981; Petroff-1985)

	Ks mole l ⁻¹	TAUX DE CROISSANCE h ⁻¹	REND [†] . EN BIOMASSE/CH ₄ FORME g.mole ⁻¹	TAUX D'UTIL. DU SUBSTRAT moles.g ⁻¹ .h ⁻¹
METHANOGENESE HYDROGENOPHILE				
+Methanobrevibac- ter arboriphilus AZ -35°C-	5 10 ⁻⁶	0,012 à 0,058	2,44	0,12 (H ₂)
+Methanosarcina barkeri -35°C-			6,4 à 8,7	
+Methanobacterium thermoautotro- phicum -65°C-	80 10 ⁻⁶	0,23 à 0,69	6,4	0,43 (H ₂)
METHANOGENESE ACETOCLASTE				
+Méthanothrix soehngeni -35°C-	0,46 10 ⁻³	0,0032	1,4	1,62 10 ⁻³
+Methanosarcina barkeri -35°C-	5 10 ⁻³	0,02 à 0,06	1,6 à 2,7	1,4 10 ⁻³ à 8,5 10 ⁻³
+Methanosarcina chti 55 -55°C-	9 10 ⁻³	0,085	1,48	

BU
LILLE

Cependant, en opposition avec ces derniers points, ZINDER (1984) a récemment décrit une culture méthanogène acétoclaste (bactéries de type Methanothrix) ayant un optimum de croissance à 65°C et pouvant produire du méthane acétoclaste à 70°C, température à laquelle les bactéries fermentatives sont très peu actives.

Si l'on excepte quelques bactéries méthanogènes halophiles, la méthanogenèse se réalise à pH compris entre 6,5 et 8,0. La plupart des bactéries méthanogènes ont un pH optimum de croissance voisin de la neutralité.

Dans les digesteurs anaérobies, les 2 voies de méthanogenèse, hydrogénophile et acétoclaste, sont généralement réalisées par des populations méthanogènes différentes. Seules Methanosarcina barkeri et M. vacuolata utilisent les deux types de substrats mais on ne les rencontre qu'exceptionnellement dans les digesteurs (VOGELS - 1984). Parmi les méthanogènes hydrogénophiles, les thermophiles se distinguent par un temps de doublement nettement plus court : 1 à 2 heures pour Methanobacterium thermoautotrophicum à 65°C contre 5 à 10 heures pour Methanobrevibacter arboriphilus AZ à 35°C. Par contre, leurs constantes d'affinité pour l'hydrogène sont très voisines : K_s de 1 à 10×10^{-6} mole/l, ce qui explique que ces bactéries puissent maintenir des pressions partielles d'hydrogène très faibles dans les milieux anaérobies.

Les méthanogènes acétoclastes s'opposent aux précédentes par des caractéristiques cinétiques nettement différentes : les 2 acétoclastes mésophiles les plus représentées dans les digesteurs, Methanosarcina mazei (TOUZEL - 1983) et Methanothrix soehngenii ont des temps de doublement respectifs de 15 et 30 heures. Methanosarcina chiti 55 (PETROFF-1985), acétoclaste thermophile, a un temps de doublement de 3 à 4 heures à 57°C. Par contre, les constantes d'affinité pour l'acétate des acétoclastes thermophiles sont plus élevées (ZEHNDER - 1981). Signalons enfin que ZINDER (1984) a mis en évidence une coculture thermophile à 60°C oxydant l'acétate : une bactérie syntrophe dégrade l'acétate en association avec une hydrogénophile de type Methanobacterium. Le marquage de l'acétate montre que le méthane provient aussi bien du groupement méthyl que du groupement carboxyl de l'acétate (réactions 2 et 3 du tableau 1).

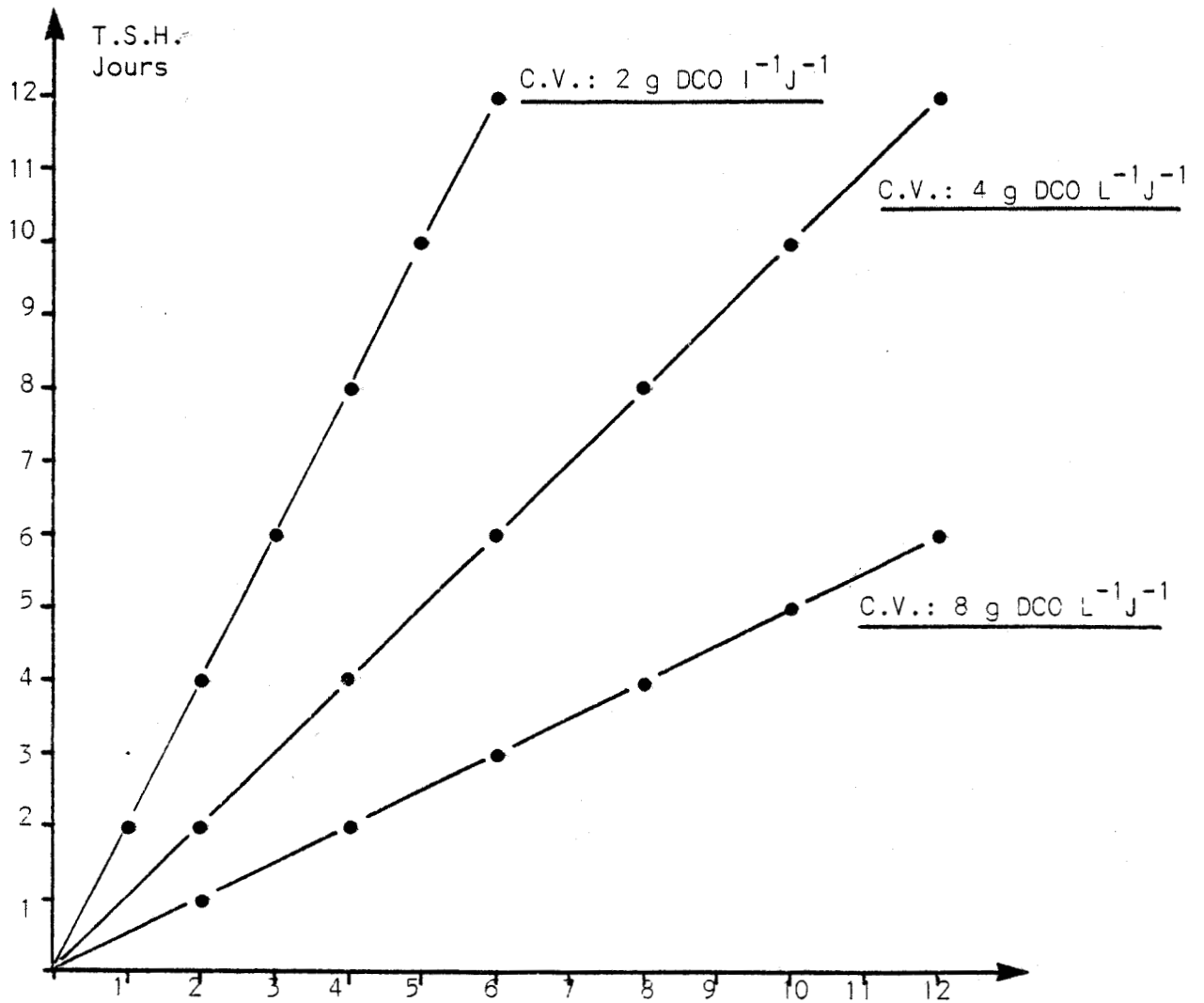


Figure 3.

Concentration de l'effluent -D.C.O.

Relation entre la concentration de l'effluent et le temps de séjour hydraulique dans le réacteur, en fonction de la charge volumique imposée à l'installation.

En conclusion, le gain énergétique par mole de méthane produite, beaucoup plus faible dans le cas de l'acétate, explique que les méthanogènes acétoclastes possèdent des vitesses et des rendements de croissance beaucoup plus faibles que leurs homologues hydrogénophiles (tableau 2).

II - METHANISATION DES RESIDUS SOLIDES. DISCUSSION DE L'INTERET DES PROCÉDES AVEC SEPARATION DES PHASES.

1 - Technologie des procédés de méthanisation industriels.

Le rendement en méthane d'un effluent d'I.A.A. est voisin de 250 à 300 litres de méthane par kg de D.C.O. dégradée.

Si l'on fixe la limite de productivité en méthane d'une installation à 1 mètre cube de méthane par mètre cube et par jour, valeur à partir de laquelle le procédé devient économiquement compétitif (VERRIER - 1984), la charge volumique réelle du réacteur doit atteindre 4 à 4,5 kg D.C.O. $m^{-3} \cdot j^{-1}$, en prévoyant un pourcentage d'élimination de la D.C.O. de 90%.

Lorsque la charge volumique à atteindre est fixée, le temps de séjour hydraulique dans l'installation est déterminé par la concentration en D.C.O. de l'effluent à traiter (figure 3).

Le procédé conventionnel est un réacteur monoétape brassé. Il se distingue par l'absence de moyen de rétention bactérienne et le temps de séjour des solides y est, en principe, égal au temps de séjour hydraulique. Ce mode de méthanisation est bien adapté aux substrats à forte teneur en matières sèches ou riches en résidus solides inertes (fumiers, ordures ménagères, drèches de brasserie) dans la mesure où la faible synthèse de biomasse bactérienne est compensée par un temps de séjour très long.

Les effluents d'I.A.A. sont souvent plus dilués et leur traitement par le procédé conventionnel ne permet pas d'atteindre des charges volumiques suffisantes: en effet, le temps de doublement de la population méthanigène fixe la limite inférieure du temps de séjour hydraulique.

Tableau 3.

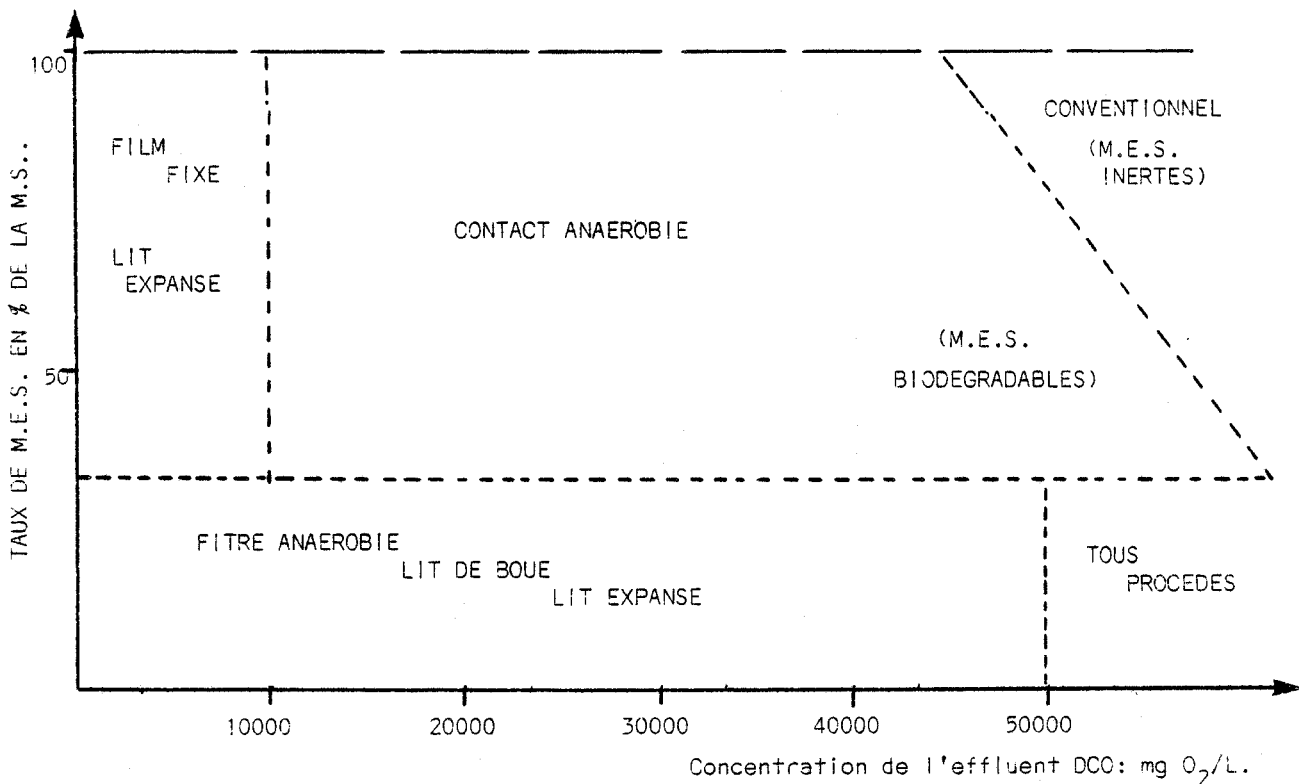
PERFORMANCES DE METHANISATION DES EAUX RESIDUAIRES DE
DISTILLERIES EN FONCTION DU TYPE DE PROCEDE UTILISE. (Bories-1982)

(DCO de l'effluent: 20 g O₂/L)

	MELANGE COMPLET	CONTACT ANAEROBIE	FILTRE ANAEROBIE
T.S.H. jours	10 à 14	7	4
CHARGE VOLUMIQUE g DCO/L.J.	2 à 3	4 à 6	10 à 12
CONCENTRATION DES BOUES g/L	5 à 15	20 à 30	60 à 90
CHARGE MASSIQUE g DCO/ g boues.J.	0,25	0,2	0,15
PRODUCTIVITE EN BIOGAZ. L/L.J.	1 à 1,5	2 à 2,5	5 à 6



Figure 4.



CHOIX DU PROCEDE DE METHANISATION EN RELATION AVEC LES CARACTERISTIQUES
DE L'EFFLUENT A TRAITER. (Albagnac-Verrier, 1983)

Les procédés de seconde génération ont été introduits en vue du traitement de ces effluents dilués. Dans ces réacteurs, la rétention bactérienne est favorisée et le temps de séjour des solides est dissocié du T.S.H.. C'est alors l'efficacité de la fixation et du piégeage de la biomasse bactérienne qui détermine les performances du digesteur, la charge volumique pouvant être augmentée sans dépassement de la charge massique maximale. L'amélioration des performances de méthanisation par les procédés de seconde génération est mis en évidence par les résultats du traitement anaérobie des eaux résiduaires de distilleries (BORIES - 1981, 1982) (tableau 3).

Ces procédés se caractérisent par la façon dont la rétention bactérienne est réalisée. Les moyens utilisés sont: (VAN DEN BERG - 1983) - La décantation de la biomasse éliminée dans l'effluent et son recyclage dans le fermenteur : type **contact anaérobie** ; - Le maintien de la biomasse active dans le réacteur par formation d'une qualité particulière de boues granulaires : type **lit de boue** (ou U.A.S.B.: upflow anaerobic sludge blanket) ; - La fixation des bactéries sur un support rigide, orienté ou en vrac. Lorsque le réacteur fonctionne en flux ascendant, la fixation est associée à la formation d'un lit de boue : **filtre anaérobie**. En fonctionnement en flux descendant, seule la fixation est privilégiée: réacteur à **film fixé** ; - La formation d'un film bactérien sur un support de faible granulométrie mis en suspension par un recyclage intense du milieu : **lit expansé** ou **lit fluidisé**.

Les effluents agro-industriels présentent des caractéristiques très variables: concentration en D.C.O., nature des matières organiques, taux de matières en suspension, et pour un substrat donné, les procédés ne sont pas tous interchangeables et en particulier un fort taux de M.E.S. inertes limite l'emploi des réacteurs filtres (colmatage du support). La difficulté réside dans le choix du procédé le mieux adapté aux caractéristiques de l'effluent.

Les correspondances substrats-procédés proposées, pour les digesteurs monoétapes, sont présentées sur la figure 4. Dans la pratique et pour un même procédé, les performances obtenues sont très variables. La qualité de l'effluent est en cause mais également certains choix technologiques tels que le taux de recirculation, le type de support, etc..(tableau 4). Des quelques exemples reportés sur ce tableau, il



Tableau 4.

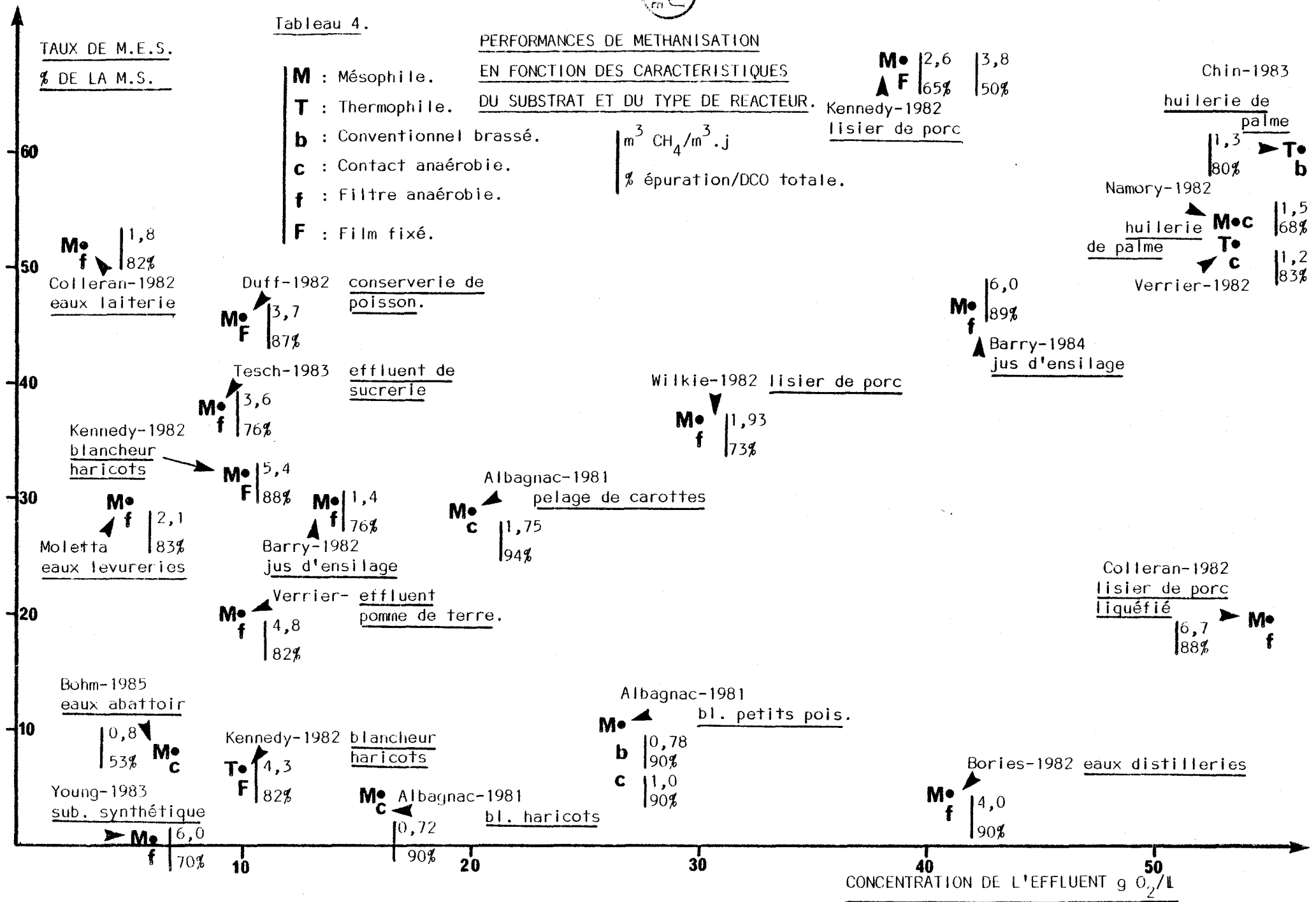
PERFORMANCES DE METHANISATION

EN FONCTION DES CARACTERISTIQUES
DU SUBSTRAT ET DU TYPE DE REACTEUR.

M° | 2,6 | 3,8
 $\blacktriangle F$ | 65% | 50%
 Kennedy-1982
 lisier de porc

$m^3 CH_4 / m^3 . j$
 % épuration/DCO totale.

M : Mésophile.
T : Thermophile.
b : Conventionnel brassé.
c : Contact anaérobie.
f : Filtre anaérobie.
F : Film fixé.



CONCENTRATION DE L'EFFLUENT g O₂/L

ressort que les essais thermophiles à 55°C en réacteurs à biomasse piégée ne présentent pas d'intérêt, tant pour la productivité en méthane que pour l'équilibre de la fermentation.

Le filtre anaérobie apparaît bien adapté à la méthanisation d'une large gamme d'effluents dont la pollution est principalement soluble.

Les déchets solides ou très riches en matières en suspension ne sont pas méthanisables directement par ce type de procédé.

Les déchets solides végétaux générés par l'agriculture et l'agro-industrie constituent un gisement de biomasse important.

Alors que le traitement des effluents d'I.A.A. par méthanisation associe les aspects épuration (diminution des taxes de pollution) et économie d'énergie, l'utilisation des déchets solides doit prouver sa rentabilité économique par la seule valeur des produits du traitement : en premier lieu le biogaz et dans une moindre mesure, les boues valorisables en tant que fertilisant organique. De plus, une partie de cette biomasse est déjà valorisée par compostage ou en aliments du bétail. Le détournement de ces utilisations vers la production de biogaz suppose que la rentabilité de l'opération soit démontrée. Ces déchets végétaux sont regroupés par leur structure physique et leur constitution biochimique principalement glucidique. Ils se distinguent cependant par une polymérisation très variable de cette dernière fraction.

2 - Conditions et cinétiques d'hydrolyse des polymères glucidiques

Ces polymères sont des homopolysides: amidon, cellulose, pectine et des hétéropolysides: hémicellulose. Le terme d'hémicellulose désigne un mélange hétérogène de polymères très variés (WEIL - 1979).

Dans les fibres végétales, la cellulose et les hémicelluloses sont souvent associées à un polymère aromatique complexe, la lignine.

Il est admis que, sans traitement chimique ou de dépolymérisation préalable, la lignine n'est pas accessible aux enzymes des microorganismes anaérobies (THAUER - 1984). De plus, la lignine, étroitement associée à la cellulose ("lignocellulose") en limite les possibilités d'hydrolyse enzymatique (ZEIKUS - 1980).

L'amidon, polyside de réserve glucidique des végétaux, n'est pas associé à la fraction lignocellulosique et est facilement hydrolysé par les amylases bactériennes.

a - Biologie des bactéries hydrolytiques et fermentatives.

Les travaux sur la sélection de souches cellulolytiques et hemicellulolytiques mettent en évidence deux zones de température dans lesquelles l'activité hydrolytique est optimale: 30-35°C (mésophile) et 60-65°C (thermophile).

Les pH optima de Clostridium sp.MC4, cellulolytique mésophile, et de Clostridium thermocellum TC11, cellulolytique thermophile, sont respectivement de 6,4 et 7,2 (LE RUYET - 1984).

Le temps de doublement de C. thermocellum cultivé à 65°C sur cellulose est voisin de 10 heures alors qu'il est de 2 heures sur cellobiose (ZERTUCHE - 1982) : la croissance des cellulolytiques est limitée par l'étape enzymatique de dépolymérisation du substrat.

b - Influence des paramètres de culture sur la vitesse d'hydrolyse.
Orientation de la fermentation par transferts facultatifs
d'hydrogène.

En culture pure, l'activité cellulolytique des hydrolytiques thermophiles est plusieurs fois supérieure à l'activité des mésophiles. Ces résultats sont confirmés par des expérimentations en réacteur de méthanisation : bien que n'étant pas à la température optimale de cellulolyse, la vitesse de dégradation de la cellulose en digesteur thermophile à 55°C est deux fois plus rapide qu'en mésophile à 35°C (PETROFF - 1983).

* Influence du pH.

L'utilisation de la cellulose par C. thermocellum TC11 est multipliée par un facteur 4 par régulation du pH à 7,4. A pH non régulé, le milieu s'acidifie et il y a inhibition de la croissance bactérienne et de la synthèse de cellulases.

* Influence de la pression partielle d'hydrogène.

Les souches bactériennes qui ne possèdent pas l'aptitude à régénérer les coenzymes réduits par excrétion d'hydrogène ne sont pas influencées par la PH_2 . Ce sont principalement les bactéries homo ou hétérolactiques.

Par contre, l'activité fermentaire des souches possédant une hydrogénase est sensible à la PH_2 . Lorsque l'hydrogène est utilisé par une souche hydrogénéophile, la pression partielle d'hydrogène devient

suffisamment faible pour que les pyridines nucléotides réduites puissent être régénérées par transfert des électrons sur la ferredoxine par l'intermédiaire de la NADH-ferredoxine oxydoréductase puis excretion d'hydrogène par action d'une hydrogénase (transfert d'hydrogène interspécifique). Les voies métaboliques sont déplacées vers la production d'acétate avec un meilleur rendement énergétique et l'activité hydrolytique est favorisée (ZEIKUS - 1982).

Ainsi, Thermoanaerobium brockii est une bactérie hydrolytique thermophile qui fermente, à 65°C et pH 7,0, le glucose en éthanol, lactate, acétate et hydrogène. La fermentation du glucose par T. brockii est totalement inhibée par une P_{H_2} de 1 atmosphère, mais en présence de Methanobacterium thermoautotrophicum le glucose est dégradé en acétate et méthane de réduction (BEN BASSAT - 1981). En présence de la méthanogène hydrogèneophile, T. brockii oxyde l'éthanol en acétate avec production de méthane de réduction. La voie métabolique conduisant à la formation d'éthanol fonctionne alors en sens inverse (ZEIKUS - 1982).

De même l'association de Clostridium thermocellum et de M. thermoautotrophicum dégrade la cellulose principalement en acétate et méthane de réduction, alors qu'en culture pure, C. thermocellum fermente la cellulose en éthanol, lactate, acétate et hydrogène (LE RUYET - 1984).

En conclusion, la vitesse de dépolymérisation des polysides végétaux est augmentée si les conditions du milieu correspondent aux conditions optimales de croissance des bactéries hydrolytiques et lorsque les produits de fermentation, en particulier l'hydrogène, sont éliminés du milieu.

Cependant, les vitesses d'hydrolyse obtenues sur substrats purs (cellulose papier filtre par exemple) ne sont pas extrapolables directement aux substrats végétaux dont les différentes fractions glucidiques ne présentent pas la même accessibilité aux hydrolases bactériennes.

3 - Principes de la séparation des phases

Les différents procédés de méthanisation décrits précédemment sont de type monoétape: les différentes étapes de la digestion anaérobie de la matière organique s'y déroulent dans les mêmes conditions physicochimiques.

Cependant, à chaque étape du processus de méthanogénèse correspondent des conditions optimales précises de culture (pH, température, temps de séjour). Cette considération a conduit quelques auteurs à introduire le concept de séparation des phases dans le but d'optimiser séparément les paramètres de culture de chaque étape. Le maintien de chaque population acidogène et méthanogène dans son environnement optimal devait permettre d'accélérer la méthanogénèse, en assurant un meilleur équilibre des fermentations (contrôle de l'acidité volatile), tout en réduisant le volume total d'installation (GHOSH - 1975).

La séparation des phases a d'abord été tentée par dialyse ou addition d'inhibiteurs spécifiques. L'observation des cinétiques très différentes des phases d'acidogénèse et de méthanogénèse acétoclaste a rapidement conduit les auteurs à envisager la séparation des phases par ajustement des taux de dilution sur les deux fermenteurs (GHOSH - 1975, GHOSH - 1978, MASSEY - 1978). Il suffit que le temps de séjour dans le digesteur d'acidogénèse soit inférieur au temps de doublement des bactéries acétoclastes.

Dans l'optique d'optimiser les procédés en deux étapes, de nombreux travaux ont porté sur les conditions d'obtention des produits d'acidogénèse les plus intéressants pour la phase ultérieure de méthanogénèse (COUPLLET - 1979, JOERGENSEN - 1979, COHEN - 1979, DE LA TORRE - 1981, PIPYN - 1981, ZOETEMEYER - 1982).

Mais l'avantage biologique avancé pour justifier l'intérêt de la méthanisation en deux étapes a été remis en question à travers les travaux récents sur les syntrophies bactériennes et les transferts d'hydrogène en particulier (BRYANT - 1977, SAMAIN - 1982).

De plus, l'évolution technologique des procédés à biomasse fixée a permis d'augmenter la productivité des réacteurs monoétapes.

Les auteurs s'accordent pour reconnaître à la méthanisation en deux étapes un intérêt pour le contrôle de la fermentation, en particulier lorsque la charge organique de l'effluent est élevée (BORIES - 1980).

Cependant, lorsque les effluents à traiter sont compatibles avec une méthanisation directe en réacteur de seconde génération, l'avantage de la séparation des phases n'est pas démontré compte-tenu de la complexité accrue de l'installation (COHEN - 1983, VAN DEN BERG - 1983, LETTINGA - 1983).

4 - Application à la méthanisation des résidus solides.

a - Préliminaire.

Les caractéristiques physiques des substrats solides ou très chargés en matières en suspension font que leur méthanisation en une seule étape ne peut être réalisée qu'en réacteur de type brassé conventionnel. A partir de déchets solides ayant une teneur élevée en composés facilement hydrolysables (déchets de fruits et légumes, pulpes de betteraves) la productivité en méthane du procédé est limitée par la faible synthèse de biomasse méthanigène dans le digesteur. La diminution du temps de séjour hydraulique et l'augmentation de la charge volumique sont respectivement limitées par le temps de doublement des bactéries acétoclastes et par leur activité spécifique d'assimilation de l'acétate formé (KHAN - 1983).

La séparation des phases peut être un moyen de généraliser l'emploi des procédés à biomasse fixée à des substrats solides facilement fermentescibles dont l'étape de liquéfaction n'est pas limitante par rapport à l'étape de méthanogenèse acétoclaste.

La justification du procédé en deux étapes, dans le cas des déchets solides est essentiellement d'ordre technologique.

Le procédé consiste en une étape de liquéfaction-acidogenèse (L-A) suivie par une étape de méthanogenèse. La spécialisation des deux réacteurs est obtenue par contrôle cinétique (ajustement des T.S.H.) et par le choix des paramètres de culture qui empêchent le développement des bactéries acétoclastes dans la première étape et y optimisent la liquéfaction. En particulier, les deux phases peuvent être conduites à des températures différentes.

Par contre, la séparation au sens strict de la production de méthane n'est pas une finalité de ce type de procédé. En effet, le développement d'une population méthanogène hydrogénophile dans l'étape

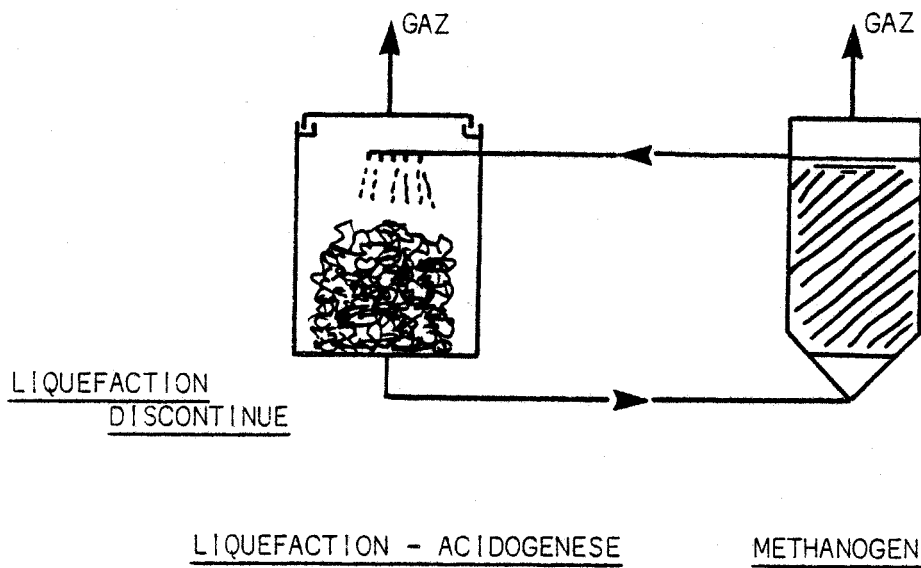
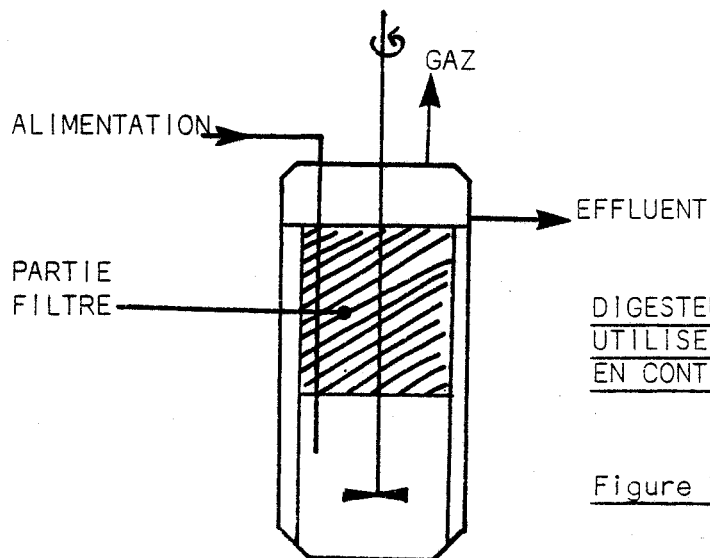
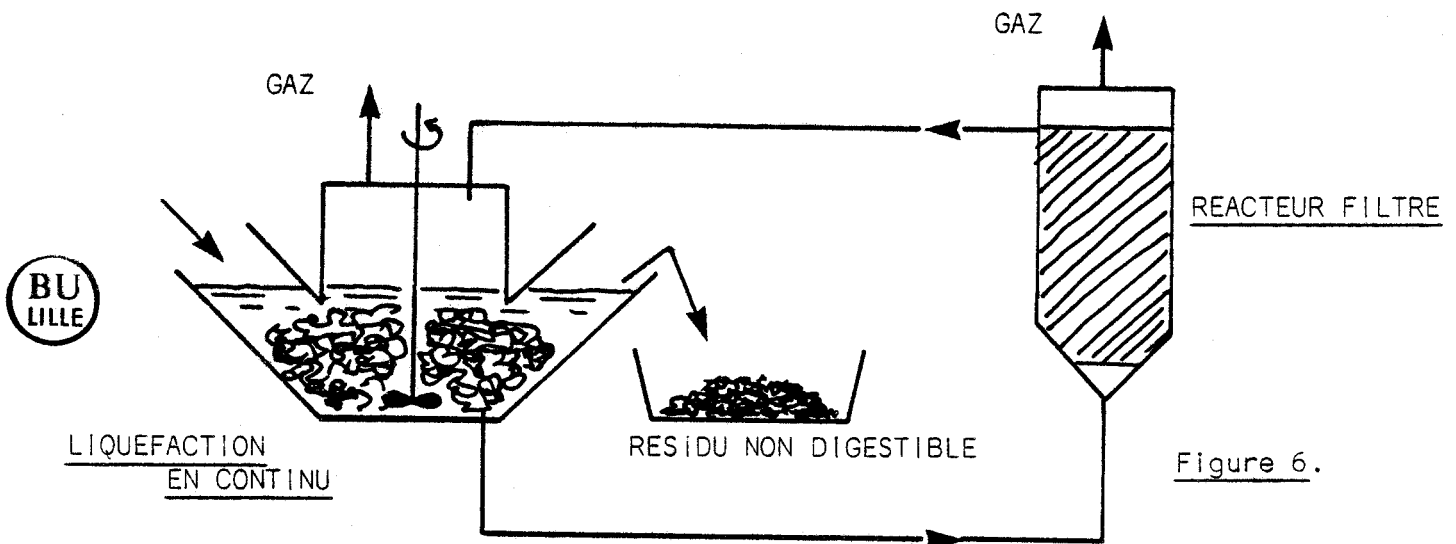


Figure 5.



de liquéfaction favorise la production d'acétate au détriment de composés plus réduits, dont la méthanogenèse est plus lente (propionate en particulier).

b - Procédés deux phases.

La valeur ajoutée de la méthanisation des rejets solides est réduite, le procédé doit donc allier la maximisation de la productivité en méthane avec un faible coût d'installation.

La méthanogenèse du substrat liquéfié et débarrassé des matières en suspension ne pose pas de difficultés compte tenu de l'acquis dans le traitement des effluents liquides.

* Etape de liquéfaction-acidogenèse.

L'hydrolyse est optimale dans des conditions de pH et de température qui ont été exposées plus haut. Dans les réalisations pilotes ou semi-industrielles décrites ces paramètres sont souvent mal contrôlés. L'étape de liquéfaction, dans le procédé proposé par RIJKENS (1982), est réalisée en discontinu : le réacteur est chargé en une fois (déchets de maraichage) et les jus d'acidogenèse sont entraînés par recyclage de l'effluent du réacteur de méthanisation (figure 5). Le système est simple, non agité mais présente plusieurs inconvénients. La production des composés fermentaires est très irrégulière et finalement, la méthanogenèse acétoclaste s'installe dans ce réacteur, mal conçu pour la collecte des gaz. Le pH n'est pas contrôlé: la liquéfaction en batch de déchets de tomates est ralentie par la chute du pH vers 3,5 (KOSTER - 1984). L'hydrolyse des polymères glucidiques est inhibée.

La liquéfaction, avec charge en continu et brassage du réacteur L-A a été expérimentée sur pulpes de betteraves (COHEN - 1983, LESCURE - 1984)(figure 6).

Le passage au mode continu permet d'adapter une population hydrolytique et fermentative stable. Le pH du réacteur L-A est tamponné par recyclage de l'effluent méthanisé, mais, sans addition d'agent neutralisant, le pH ne peut être relevé au delà de 5,5 en L-A.

L'avantage de la liquéfaction en continu est également la production d'un spectre de composés fermentaires stables au cours du temps, ce qui permet l'adaptation du réacteur de méthanisation à un substrat de composition constante.

* Résultats de méthanisation avec séparation des phases.

L'amélioration des performances de méthanisation des substrats insolubles par un procédé en deux phases est mis en évidence par les résultats suivants, obtenus en réacteurs pilotes mésophiles.

Dans un fermenteur deux phases monocuve (figure 7), KHAN (1983) obtient à partir de cellulose une productivité en méthane de 2 l/l.j., pour un temps de séjour de 6 jours. Le pilote dégrade 4,8 g de cellulose/l.j. Les performances respectives en réacteur mélangé sont: 0,25 l.méthane/l.j., T.S.H. de 28 jours, 0,7 g de cellulose dégradée/l.j. Malgré l'avantage net du procédé utilisé, celui-ci apparaît difficilement applicable aux substrats végétaux du fait de l'impossibilité d'éliminer les fibres non digestibles avant le passage sur la partie filtre.

Par le procédé conventionnel, la productivité en méthane à partir de boues organiques complexes est de 0,5 l/l.j., le pourcentage de réduction des matières volatiles est de 24% pour un T.S.H. de 13 jours. (GHOSH - 1983). Le même substrat, méthanisé par un procédé comportant deux réacteurs à lit de boue en série, conduit aux performances suivantes : productivité en méthane de 2,8 l/l.j., le pourcentage de réduction des matières volatiles s'élève à 61% pour des temps de séjour de 1,2 j. dans le réacteur de liquéfaction et de 4,4 j. dans le réacteur de méthanogénèse. Le pourcentage de méthane dans le gaz du réacteur de liquéfaction est de 34% mais cette production ne représente que 1 à 2% du méthane total produit. En phase d'acidogénèse, le pH est maintenu à 6,0 par le pouvoir tampon du substrat utilisé.

Conclusion : Bien que la séparation des phases ne se justifie pas d'un point de vue biologique, par la suppression de relations interspécifiques favorables au processus global, dans le cas des déchets solides non ou peu lignifiés, le procédé en deux étapes pourrait être un moyen d'améliorer la productivité de l'installation de méthanisation en améliorant l'étape limitante d'acétoclastie. Dans ce schéma, la production des substrats de la méthanogénèse doit être optimisée par une conduite appropriée de l'étape de liquéfaction.

Pour cela, certains points restent à préciser : ce sont l'influence du contrôle de pH sur l'étape de liquéfaction de substrats à faible pouvoir tampon et l'effet de la température sur la cinétique d'hydrolyse des polymères végétaux.

III - METHANISATION DES LIPIDES.

Plusieurs auteurs ont montré l'utilisation des acylglycérols soit par une population mixte anaérobie (HEUKELEKIAN - 1958) soit par des bactéries du rumen (HOBSON - 1960).

L'hydrolyse des glycérides en acides gras et glycérol est réalisée par des lipases exocellulaires. De nombreuses bactéries anaérobies facultatives ou anaérobies strictes présentent une activité lipolytique : Bacillus licheniformis, Clostridium sporogenes (BACQUES - 1983).

Anaerovibrio lipolytica reste cependant une des rares bactéries anaérobies dont l'activité lipolytique ait été étudiée de façon plus précise (HENDERSON - 1971). L'activité du surnageant de culture de A. lipolytica est mis en évidence dès le début de la phase exponentielle de croissance. Si le pH n'est pas contrôlé, l'activité lipolytique disparaît rapidement dès que le pH est inférieur à 6,3. La lipase purifiée hydrolyse les différents acylglycérols (di ou triglycérides) dont les acides gras possèdent plus de 12 carbones. Le pH optimum d'activité de la lipase est de 7,4.

Le glycérol provenant de la lipolyse est fermenté par les bactéries lipolytiques: après phosphorylation il rejoint la voie d'Embden - Meyerhoff au niveau de la dihydroxy acétone phosphate.

Lorsque les acides gras sont libérés dans le rumen, ils sont absorbés par le tractus digestif de l'animal. Dans les écosystèmes méthanogènes ils sont dégradés par une voie d'acétogenèse couplée à la production obligée d'hydrogène.

1 - Rappels sur les réactions d'acétogenèse avec production obligée d'hydrogène.

Les premiers auteurs pensaient que la dégradation des produits de fermentation en acétate et méthane pouvait être réalisée par des bactéries méthanogènes particulières. C'est le cas de Methanobacillus omelianski, un isolat anaérobie décrit par BARKER en 1956 et utilisant l'éthanol pour former acétate et méthane.

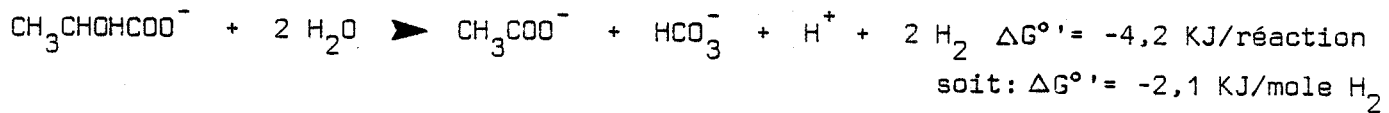
Il a été montré depuis que la gamme de substrats des bactéries méthanogènes est très restreinte : acétate, $H_2 + CO_2$, formate,

THERMODYNAMIQUE D'ACETOGENESE OXYDATIVE DE QUELQUES COMPOSES
ORGANIQUES - Variations d'energies libres standards à pH 7,0.

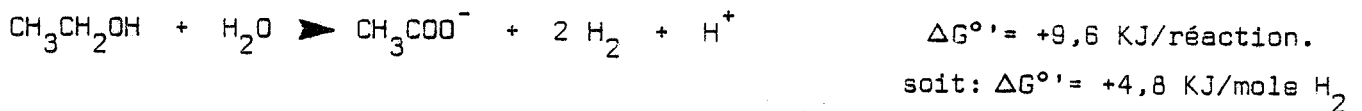
Tableau 5.

(Thauer - 1977)

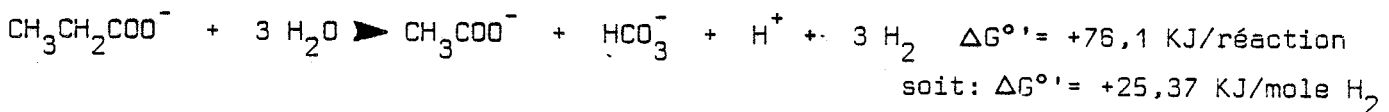
ACIDE LACTIQUE.



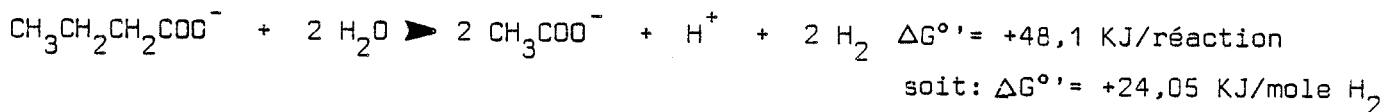
ETHANOL.



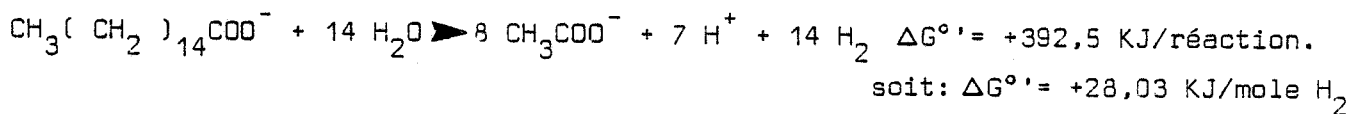
ACIDE PROPIONIQUE.



ACIDE BUTYRIQUE.



ACIDE PALMITIQUE.



méthanol. L'équipe de BRYANT a montré que M. omelianski était en fait l'association syntrophe d'un organisme "S" oxydant l'éthanol en acétate et d'une méthanogène Methanobactérium bryantii qui utilise les électrons par production de méthane de réduction (REDDY - 1972).

a - Considérations thermodynamiques

La caractéristique principale des réactions d'acétogénèse avec production obligée d'hydrogène est d'ordre thermodynamique : ces réactions peuvent se coupler à la synthèse d'ATP seulement lorsque l'hydrogène produit est éliminé efficacement du milieu (P_{H_2} voisine de 10^{-5} atm.). Biologiquement cette condition est obtenue par la coculture en présence d'une utilisatrice d'hydrogène, méthanogène en absence de sulfate, ou sulfatoréductrice.

a-1 Energie des réactions d'acétogénèse

Les thermodynamiques d'oxydation des composés organiques fermentaires en acétate et hydrogène sont très défavorables dans les conditions normales comme le montrent les variations d'énergie libre standard, à pH 7,0, des réactions correspondantes (tableau 5).

En prenant l'exemple de l'acide palmitique, si l'on fait intervenir les concentrations des réactants et des produits de la réaction d'acétogénèse, la variation d'énergie libre de la réaction devient :

$$\Delta G' = \Delta G_o' + RT \ln \frac{(CH_3COO^-)^8 P_{H_2}^{14}}{(CH_3-CH_2)_{14}-COO^-}$$

soit pour $T = 25^\circ C = 298^\circ K$; $pH 7,0$; $R = 8,34 \text{ J./mole.}^\circ C$.

$\Delta G' = 392,52 + 45,7 \text{ Log (acétate)} + 79,97 \text{ Log } P_{H_2} - 5,7 \text{ Log (palm)}$.

$\Delta G'$ en kJ par réaction (calculs à partir des données de THAUER-1977).

La variation d'énergie libre de la réaction d'acétogénèse de l'acide palmitique en fonction de la P_{H_2} est reportée sur la figure 8 et elle y est comparée aux variations d'énergies libres des réactions d'acétogénèse à partir du propionate, du butyrate et de l'éthanol (Mc INERNEY - 1980).

La variation d'énergie libre standard de la réaction de synthèse de l'adénosine triphosphate à partir de l'adénosine monophosphate est

$\Delta G_o' = 41,67 \text{ kJ/mole (AMP + ppi} \rightarrow \text{ATP + H}_2\text{O)}$.

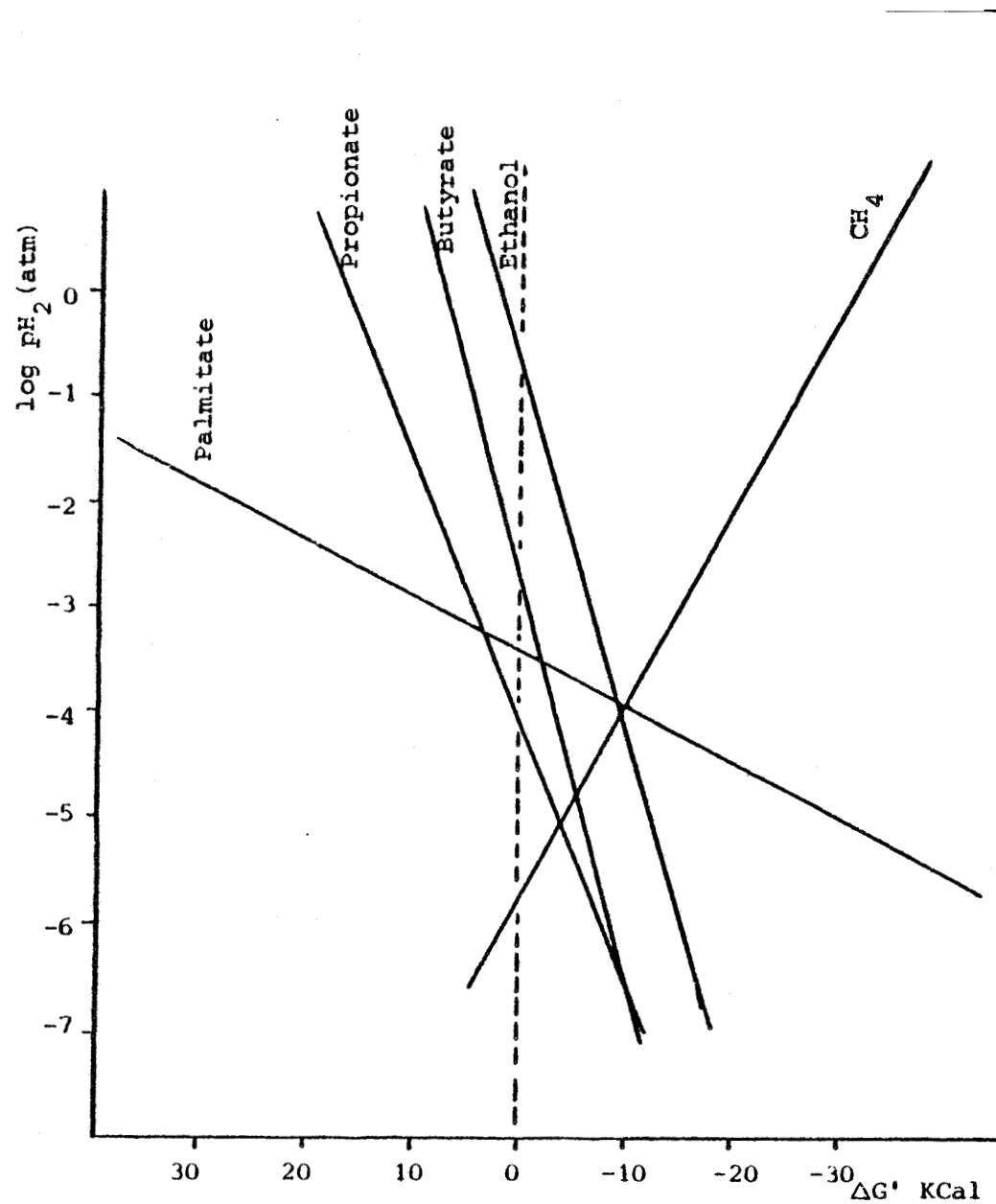


Figure 8 : Influence de la pression partielle d'hydrogène sur la variation d'énergie libre des réactions de dégradation de l'ethanol, du propionate, du butyrate et du palmitate et de formation de méthane de réduction.
(PH: 7,0; 25°C; concentrations:1mM; pCH₄:0,5atm; HCO₃⁻: 50mM)

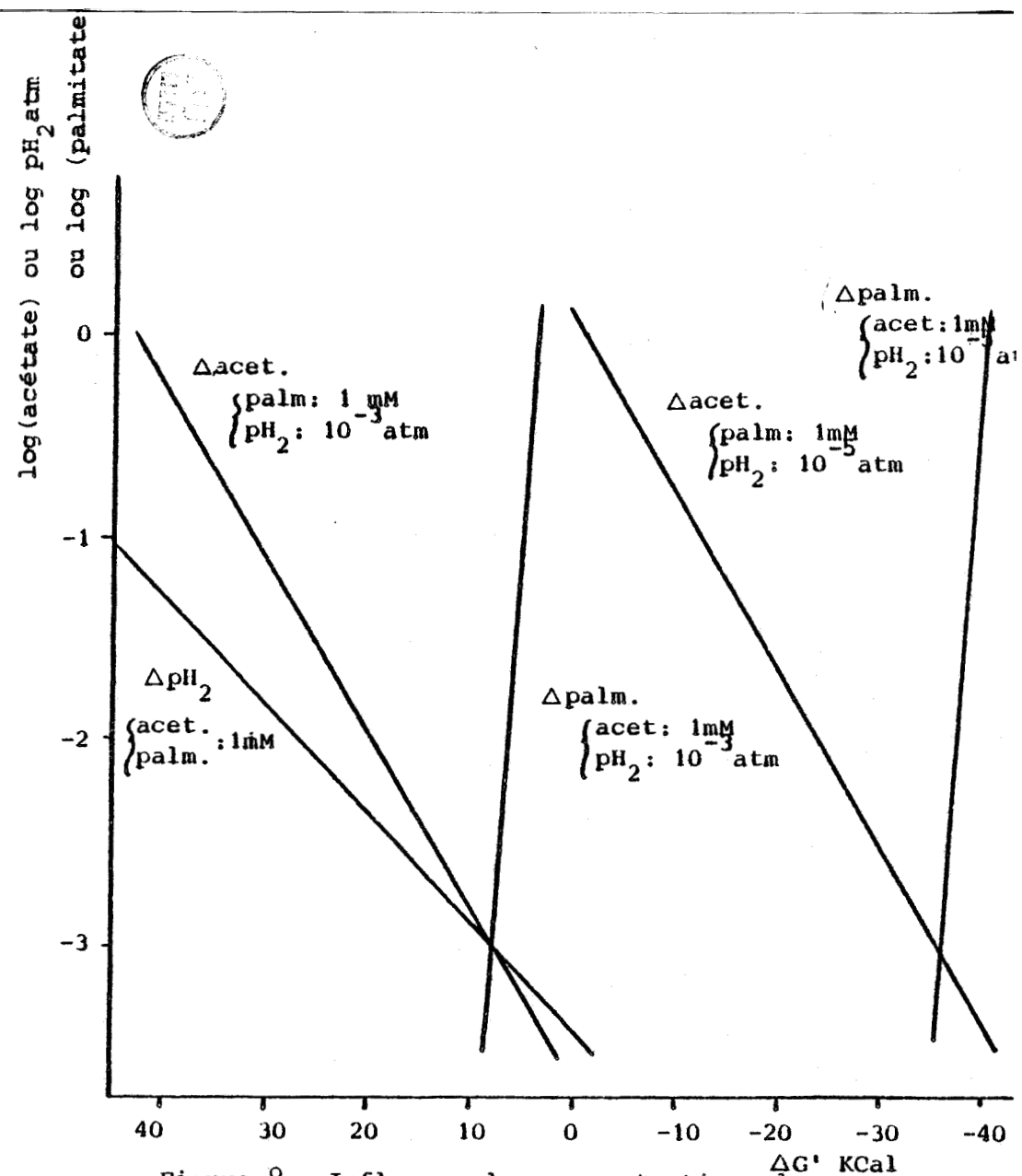


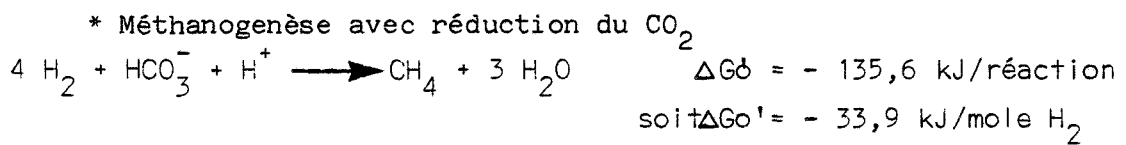
Figure 9 : Influence des concentrations des réactants et des produits lors de la dégradation de l'acide palmitique. (PH:7,0; 25°C)

Le couplage des réactions d'acétogénèse avec la synthèse d'ATP pour les besoins énergétiques bactériens n'est possible qu'à pression partielle d'hydrogène très faible (figure 8).

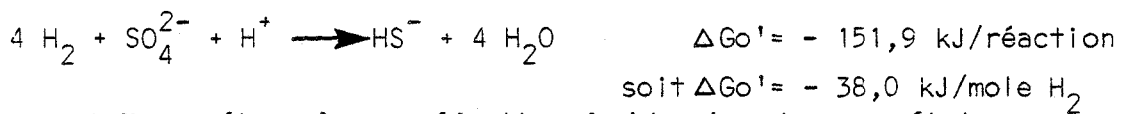
La figure 9 présente les influences respectives des concentrations en acétate et en palmitate (pour $P_{H_2} = 10^{-3}$ atm et $P_{H_2} = 10^{-5}$ atm) sur la variation d'énergie libre de la réaction d'acétogénèse de l'acide palmitique.

a-2 Energie des réactions de réduction de protons

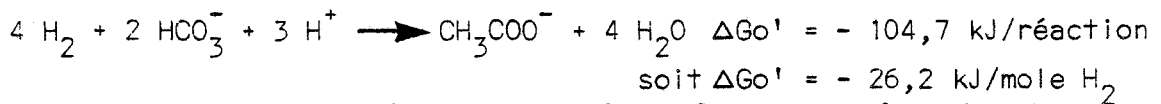
En anaérobiose et en absence de nitrate, les électrons sont utilisés pour réduire le CO_2 soit en méthane, soit en acétate ou, en présence de sulfate pour produire du sulfure.



* Sulfatoréduction :



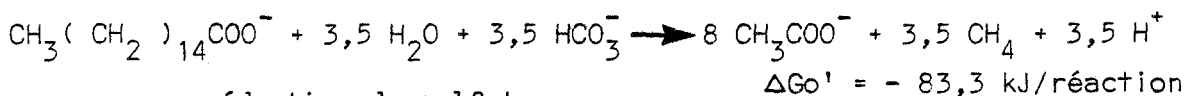
* Homoacétogénèse : réduction du bicarbonate en acétate



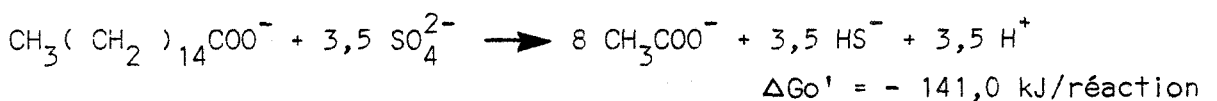
a-3 Couplage des réactions d'acétogénèse et de réduction de protons

Les réactions d'acétogénèse avec consommation de l'hydrogène deviennent, dans le cas de l'acide palmitique :

- avec production de méthane de réduction



- avec réduction de sulfate



Les réactions d'acétogénèse deviennent thermodynamiquement compatibles avec une synthèse couplée d'ATP. Le gain d'énergie pour la coculture réalisant l'acétogénèse reste cependant très limité.

De plus, pour approcher cette valeur théorique d'énergie disponible, le transfert de l'hydrogène produit par les bactéries acétogènes vers les bactéries hydrogénéphiles, doit être très efficace.

Dans les écosystèmes anaérobies, ces réactions sont possibles grâce à la très forte affinité pour l'hydrogène des bactéries méthanogènes ou sulfatoréductrices.

b - Microbiologie de l'acétogenèse.

La base des réactions d'acétogenèse est le transfert interspécifique d'hydrogène entre les bactéries oxydatives et les bactéries hydrogenophiles. Nous allons étudier plus en détail ces deux populations bactériennes.

b-1 Utilisation de l'hydrogène

* Methanogenèse. En absence de sulfate, l'hydrogène fermentaire est utilisé de façon prépondérante à la formation de méthane de réduction. Les types bactériens impliqués, leurs conditions de croissance, sont étudiés dans le chapitre sur la méthanogenèse (I-2).

* Homoacétogenèse.

Dans les écosystèmes méthanogènes, où elles sont en compétition avec les méthanogènes hydrogenophiles, les bactéries homoacétogènes jouent un rôle mineur sur la fixation de l'hydrogène et la production d'acétate. Cependant, leur capacité à être associées de façon syntrophe à une souche productrice d'hydrogène a été montrée (coculture de C. thermocellum avec Acetogenium kivui. LE RUYET - 1984).

* Sulfatoréduction

En présence de sulfate, l'hydrogène est utilisé préférentiellement par les bactéries sulfatoréductrices telle Desulfovibrio vulgaris pour réduire le sulfate en sulfure. Lorsque la concentration en sulfate devient limitante, méthanogenèse et sulfatoréduction sont en compétition pour l'utilisation de l'hydrogène et la méthanogenèse hydrogenophile n'est pas inhibée par la présence de sulfate et de sulfure dans le milieu (LUPTON - 1984).

b-2 Oxydation des produits de fermentation

En milieu anaérobie pauvre en sulfate, 3 groupes bactériens sont capables de réactions d'acétogenèse en coculture avec des souches méthanogènes hydrogenophiles. Ce sont : certaines bactéries sulfatoréductrices, les bactéries fermentatives dont le métabolisme peut être dévié vers la production d'acétate (paragraphe II-2) et les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (A.P.O.H.).

En présence de sulfate, non seulement l'hydrogène est utilisé de façon concurrentielle par les sulfatoréductrices mais certaines de ces bactéries sont capables en culture pure, soit de réactions d'acétogénèse, soit d'oxyder complètement les composés organiques en CO_2 et H_2S .

* Bactéries sulfatoréductrices

PFENNIG (1981) répartit les sulfatoréductrices en deux groupes :

- les bactéries appartenant au premier groupe oxydent complètement en CO_2 et H_2S de nombreux composés organiques et en particulier les acides gras ayant jusqu'à 14 atomes de carbone. Ces bactéries appartiennent aux genres Desulfococcus, Desulfonema, Desulfosarcina. Ces bactéries ne peuvent se développer sans sulfate et sont, pour la plupart, issues de milieux marins et exigent des taux de sodium élevés dans les milieux de culture ($12\text{gl}^{-1}\text{NaCl}$ pour Desulfonema limicola et $20\text{gl}^{-1}\text{NaCl}$ pour D. magnum - WIDDEL - 1983). Leur activité dans les écosystèmes méthanigènes est vraisemblablement très limitée.

- Les bactéries du second groupe jouent par contre un rôle important dans les digesteurs anaérobies : en effet, en présence de sulfate, ces bactéries oxydent incomplètement les composés organiques en acétate et sulfure mais de plus, en absence de sulfate, certaines de ces bactéries peuvent se comporter en bactéries fermentatives dont le métabolisme peut être dévié en acétogénèse en présence de souches hydrogénophiles.

Ainsi Desulfobulbus propionicus (WIDDEL - 1982 ; LAANBROEK - 1982) et Desulfobulbus elongatus (SAMAIN - 1982, 1984) oxydent, en présence de sulfate, le propionate, l'éthanol, le lactate en acétate et H_2S . En absence de sulfate, l'éthanol et le lactate sont fermentés en acétate et propionate. Les bactéries du genre Desulfobulbus peuvent donc être obtenues en culture pure, en milieu pauvre en sulfate. Par contre, les bactéries du genre Desulfovibrio, qui peuvent se développer de façon autotrophe sur $\text{H}_2 - \text{CO}_2$, ne peuvent être cultivées en culture pure en milieu sans sulfate. Mais ces bactéries (D. desulfuricans ou D. vulgaris) qui possèdent une hydrogenase, peuvent se comporter, en absence de sulfate, en acétogènes syntrophes en association avec des souches hydrogénophiles : la coculture Desulfovibrio + méthanogène hydrogénophile oxyde le lactate en acétate et méthane (Mc INERNEY - 1981).

Parmi les acides gras, seul le propionate est utilisé par les bactéries du genre Desulfohalobium. Les autres acides gras, ayant jusqu'à 18 atomes de carbone sont oxydés incomplètement en acétate et H₂S par des bactéries sulfatoréductrices (groupe des Sapovorans. WIDDEL - 1981) mais celles-ci ne sont pas caractérisées à l'heure actuelle et en particulier, on ne connaît pas leur aptitude à se comporter en acétogène facultative en absence de sulfate.

Certaines bactéries sulfatoréductrices peuvent donc avoir un comportement syntrophe. En absence de sulfate, ces dernières ne sont pas capables d'oxyder tous les composés fermentaires et en particulier les acides gras.

* Bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène

Les bactéries de ce groupe très hétérogène ont en commun de ne pouvoir être cultivées qu'en coculture avec une souche hydrogénophile. Ce sont des acétogènes syntrophes obligatoires.

Ces bactéries sont encore mal connues mais la notion de syntrophie obligatoire, à travers les travaux récents, n'apparaît pas limitée à quelques types bactériens et représente un phénomène important en particulier dans la dégradation anaérobie des acides gras. Les quelques bactéries acétogènes syntrophes caractérisées à ce jour peuvent être classées en trois groupes selon les substrats utilisés :

- Utilisation du propionate

Syntrophobacter wolinii (BOONE - 1980) sur propionate a un temps de doublement de 90h en coculture avec Desulfovibrio sp + SO₄ et un temps de doublement de 160h en coculture avec Methanospirillum hungatei. S. wolinii n'utilise aucun autre acide gras.

- Utilisation des acides gras linéaires ou ramifiés

Les acides gras linéaires à nombre pair de carbones sont dégradés en acétate, les acides impairs en acétate et propionate.

Les variations entre les substrats de ces bactéries portent sur la longueur de la chaîne carbonée de l'acide et sur les possibilités d'utilisation des acides ramifiés. Syntrophomonas wolfei (Mc INERNEY - 1981) est un bacille gram négatif non sporulé qui utilise les acides gras de C₄ à C₈. L'isohéptanoate est dégradé en isovalérate et acétate. Le temps de doublement de S. wolfei est de 54h en coculture avec M. hungatei. La souche NSF-2 de SHELTON et TIEDJE (1984) est très proche de S. wolfei. Elle utilise également le 2-DL méthylbutyrate.

Clostridium bryantii (STIEB - 1985) est une souche sporulante qui utilise les acides gras de C4 à C11 et le 2 méthylbutyrate. Le temps de doublement de C. bryantii est voisin de 80h en coculture avec Desulfovibrio ou M. hungatei. SHELTON et TIEDJE (1984) ont isolé une souche identique qui utilise l'isobutyrate en plus des acides gras de C4 à C6. LOROWITZ (1984) a récemment isolé une souche acétogène dégradant les acides gras saturés de C4 à C18. Elle est morphologiquement voisine de S. wolfei. Sa caractérisation n'est pas encore publiée. A ce jour, l'isolement de bactéries A.P.O.H. utilisant les acides gras longs insaturés (ie : oléate, linoléate) n'a pas été rapportée.

- Utilisation de l'acide benzoïque

Syntrophus buswelli (MOUNFORT - 1982,1984) fermente le benzoate en acétate et hydrogène. C'est une bactérie acétogène syntrophe vraie qui a un temps de doublement de 130h en association avec Desulfovibrio sp et de 170h avec M. hungatei. S. buswelli n'utilise que le benzoate parmi les différents acides gras.

Toutes ces bactéries sont mésophiles. Il est très vraisemblable cependant que leurs homologues thermophiles seront caractérisés dans les années à venir. Ces bactéries ont toutes un optimum de pH voisin de la neutralité. La biochimie et la microbiologie de la digestion anaérobie des acides gras à longues chaînes apparaissent peu documentées. Nous allons cependant nous efforcer, dans la partie suivante, de faire le point sur les hypothèses et les résultats concernant cette dégradation.

2 - Métabolisme de l'oxydation anaérobie des acides gras à longues chaînes, saturés et insaturés.

Les deux composés principaux issus de la lipolyse sont le glycérol et les acides gras. Si le glycérol est utilisé par les bactéries fermentatives, par contre, la thermodynamique de la réaction d'oxydation des acides gras en anaérobiose nous a montré que cette dégradation ne peut s'opérer qu'à P_{H_2} très faible, c'est-à-dire en présence de bactéries hydrogénophiles.

Le pourcentage de carbone que représentent les acides gras à longues chaînes dans les lipides neutres (huiles végétales par exemple) est voisin de 90 - 95 % : la transformation de la majeure partie du carbone

des lipides en composés substrats des méthanogènes ne peut se faire que dans les conditions de l'acétogénèse avec production obligée d'hydrogène (cqfd). SOHNGEN (1910) obtient une production de méthane à partir de savons de calcium d'acides gras en conditions anaérobies. C'est le choix des acides gras sous forme de savons de calcium qui lui a permis d'obtenir ce résultat. Nous allons voir, en effet, que la toxicité des A.G.L.C. sous forme libre, sur l'activité bactérienne est le premier problème à résoudre pour étudier leur dégradation anaérobie.

a - Influence des acides gras à longues chaînes sur l'activité bactérienne

a-1 Effet bactériostatique

De longue date, l'inhibition de l'activité biologique par les acides gras à longues chaînes a été utilisée de façon empirique (agents désinfectants). En anecdote, le cas du jeune lapin est significatif : de la naissance jusqu'au sevrage, l'estomac du lapin reste exempt de toute colonisation bactérienne. L'agent antibactérien présent dans le tube digestif est un mélange d'acides gras libres, octanoïque et décanoïque. Ces acides gras proviennent de la lipolyse des lipides du lait maternel par les lipases stomacales (CANAS - RODRIGUEZ - 1966). L'alimentation artificielle du jeune lapin par du lait de vache ne permet pas la production de ces acides gras bactériostatiques, ce qui entraîne le décès des jeunes non sevrés (FONTY - 1979, GOUET - 1979).

- concentrations inhibitrices

L'effet des A.G.L.C. sur des cultures pures de bactéries du rumen ou de bactéries méthanigènes a fait l'objet de quelques travaux dont nous pouvons tirer les points suivants :

La concentration en acides gras ajoutée à partir de laquelle la culture pure bactérienne a une activité réduite (concentration minimale inhibitrice) dépend : de la structure de la paroi bactérienne et donc de la coloration de Gram ; de la nature de l'acide gras utilisé ; des constituants du milieu pouvant interférer avec l'acide gras.

Pour une même souche bactérienne, les résultats sont toujours à relativiser par rapport aux conditions de culture.

Dans le rumen, l'addition d'acides gras affecte en premier lieu les bactéries cellulolytiques et les méthanogènes hydrogénophiles ce qui a pour effet une déviation du métabolisme vers la formation de propionate

(HENDERSON - 1973). L'addition de 2g/l (7mM) d'acide oléique dans des boues de digesteur anaérobie entraîne une inhibition complète de la méthanogenèse acétoclaste tandis que la méthanogenèse hydrogénéophile est seulement ralentie (HANAKI - 1981). La production de méthane par une culture pure de méthanogène hydrogénéophile (Methanobacterium ruminantium ou M. Moh) est réduite de 50 % par addition de 3 mM d'acide linoléique ou 1,8 mM d'acide linoléique (PRINS - 1972).

Parmi les acides gras linéaires saturés, l'acide laurique est le plus toxique (NIEMAN - 1954, GALBRAITH - 1971). Cependant, les acides insaturés sont nettement plus inhibiteurs. L'activité antibactérienne augmente avec le nombre de doubles liaisons de l'acide et les isomères de configuration cis sont plus actifs que les isomères trans. Ainsi, pour les acides gras linéaires à 18 atomes de carbone, le classement par ordre de toxicité croissante est : stéarique-élaïdique-oléique-linoléique-linolénique (DEMEYER - 1966).

Parmi les bactéries gram-positives, les bactéries du genre Bacillus sont inhibées par 0,05 mM de linoléate et par 0,1 mM de laurate ; les bactéries du genre Clostridium sont inhibées par 0,5 mM des mêmes acides. Par contre, les bactéries gram-négatives telles E. Coli ou Agrobacterium tumefaciens ne sont pas inhibées par 1 mM de ces acides. Les acides sont ajoutés sous forme de savon de sodium. Les esters de ces acides gras n'ont pas d'action toxique (GALBRAITH - 1971).

- hypothèses sur le mécanisme d'inhibition

La toxicité des A.G.L.C. est en premier lieu d'ordre physicochimique : les acides s'adsorbent sur les parois bactériennes ou réagissent avec les protéines de celles-ci pour empêcher les échanges milieu-bactéries. Le calcul suivant est rapporté par NIEMAN (1954) : 2×10^8 cellules de L. helveticus représentent une aire de membrane voisine de $3,3 \cdot 10^{10} \mu^2$. L'addition de 160 μg d'acide linoléique aux 10 ml de milieu de culture pourrait couvrir une surface, en couche monomoléculaire, de $1,75 \cdot 10^{11} \mu^2$ soit former environ 5 couches monomoléculaires autour des bactéries.

Les acides gras pourraient également altérer la structure de la membrane et désaccoupler la chaîne de transport d'électrons au niveau de deux types de protéines enzymatiques, les ATPases et les perméases (SHEU - 1972, HUNKOVA - 1978). Après incorporation dans les cellules, les acides gras libres pourraient intervenir sur les synthèses et les lyses cellulaires (NIWANO - 1984, HORTMANN - 1984).

a-2 Reversibilité de l'effet antibactérien.

Certains composés ont une action détoxifiante qui limite ou annule l'inhibition par les acides gras. Il faut signaler que si l'action de ces composés est dans certains cas très nette lorsqu'ils sont introduits dans le milieu avant les acides, par contre, la levée de l'inhibition après contact prolongé des bactéries et des acides gras n'est pas toujours démontrée (HANAKI - 1981).

Les détoxifiants agissent par 2 modes d'action :

- dans le premier cas, ce sont des sels minéraux ou des molécules organiques qui forment des complexes avec les acides gras longs. Les sels de calcium et de magnésium, le cholestérol ou la lecithine peuvent jouer ce rôle (GALBRAITH - 1971, EL HAG - 1972, HANAKI - 1981).

Le chlorure de calcium est le seul détoxifiant à avoir un effet très général sur tous les acides gras. L'effet du calcium est lié à la précipitation des acides en savon de calcium, très peu solubles (IRANI - 1960). La concentration en acides gras libres est alors ramenée artificiellement à une valeur très faible (ROY - 1985).

- dans le second cas, ce sont des supports sur lesquels s'adsorbent les acides gras et qui ont également pour effet de diminuer la concentration en acide gras libre. Ainsi, Eubacterium lentum, une bactérie du rumen réalisant la biohydrogénation, est inhibée par 10 mg/l d'acide linoléique. Le milieu est détoxifié par addition de 6 g/l de cervelle de boeuf séchée (EYSSSEN - 1984).

a-3 Activation par les acides gras.

A dose très faible (2 à 40 ppm), les acides gras insaturés à 18 atomes de carbone ont une action stimulante sur la croissance bactérienne. Les isomères cis sont plus actifs et l'effet décroît avec le nombre de doubles liaisons. L'acide gras agit comme un facteur de croissance. L'activation par le Tween 80 serait lié à la présence d'acide oléique dans cette molécule (NIEMAN - 1954).

b - Voies d'acétogénèse à partir des acides gras à longues chaînes.

L'étude biochimique de la dégradation anaérobie des acides gras à longues chaînes est un domaine de recherche pratiquement inexploré, et de nombreuses hypothèses sont encore à vérifier.

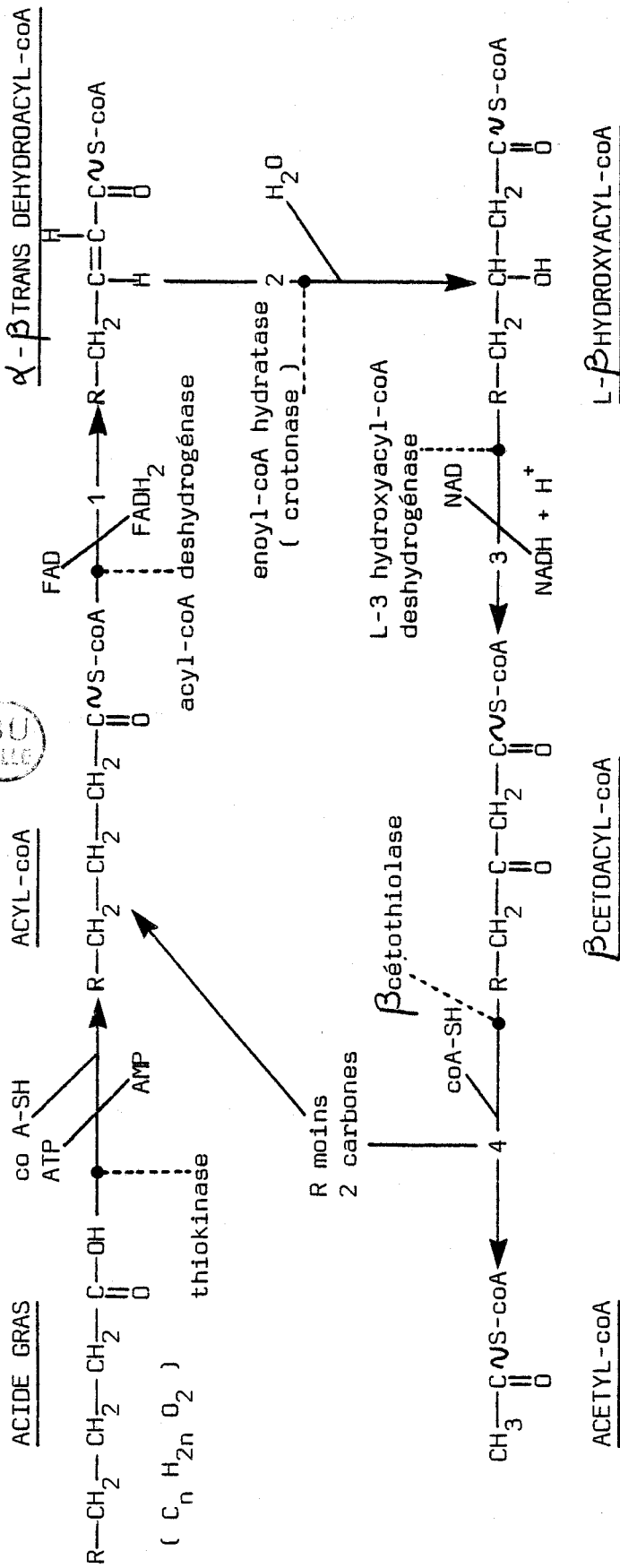


Figure 10. MECANISME DE LA β OXYDATION (Lehninger-1977)

Dans la cellule Eucaryote, l'utilisation des acides gras à longues chaînes est un processus intramitochondrial et se fait par le mécanisme de la β -oxydation, ou hélice de LYNEN. Si l'on admet une certaine analogie entre la mitochondrie et la cellule bactérienne, on peut supposer que la dégradation des acides gras à longues chaînes par les bactéries anaérobies pourra se faire par le même processus. De plus, cette hypothèse est accréditée par les travaux de JERIS (1965) et WENG (1976).

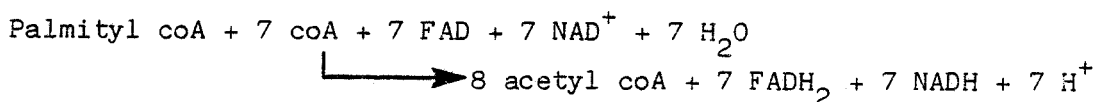
b-1 β -oxydation des acides gras linéaires saturés.

Celle-ci débute par une étape d'activation, ATP dépendante, de l'acide gras qui s'opère par estérification avec le groupe thiol du coenzyme A, par action d'une thiokinase. Les autres étapes enzymatiques se font sous la forme de ces thioesters du coA.

- étapes de la β -oxydation (WEIL - 1979, figure 10)

- 1) l'acylcoA est déshydrogéné sous l'action d'une acyl-coA déshydrogénase avec réduction d'un FAD et création d'une double liaison trans α - β .
- 2) il y a hydratation de la double liaison formée, par action d'une enoyl-coA hydratase (ou crotonase).
- 3) le dérivé β -hydroxylé de configuration L est déshydrogéné par la L- β hydroxyacylcoA déshydrogénase qui présente une stéréospécificité absolue pour la forme L, avec réduction d'un NAD.
- 4) l'acétylcoA-acétyl transférase (ou β -cétotiolase) catalyse la séparation d'une molécule d'acétylcoA, avec intervention d'un coenzyme A.

A la suite de ces 4 étapes enzymatiques, l'acylcoA de départ perd 2 atomes de carbone. L'acylcoA subit à son tour la β -oxydation jusqu'à décomposition complète en fragment de 2 carbones (acétylcoA), si l'acide gras de départ contient un nombre pair d'atomes de carbone. Lorsque l'acide possède un nombre impair d'atomes de carbone, la β oxydation conduit à la formation d'acétylcoA et de 1 propionylcoA. Le bilan de la β oxydation de l'acide palmitique est ainsi :



- régénération des coenzymes.

En anaérobiose, les coenzymes peuvent être régénérés par transfert des électrons vers la ferredoxine puis excrétion d'hydrogène par action d'une hydrogènase. La β -oxydation anaérobie des acides gras saturés est

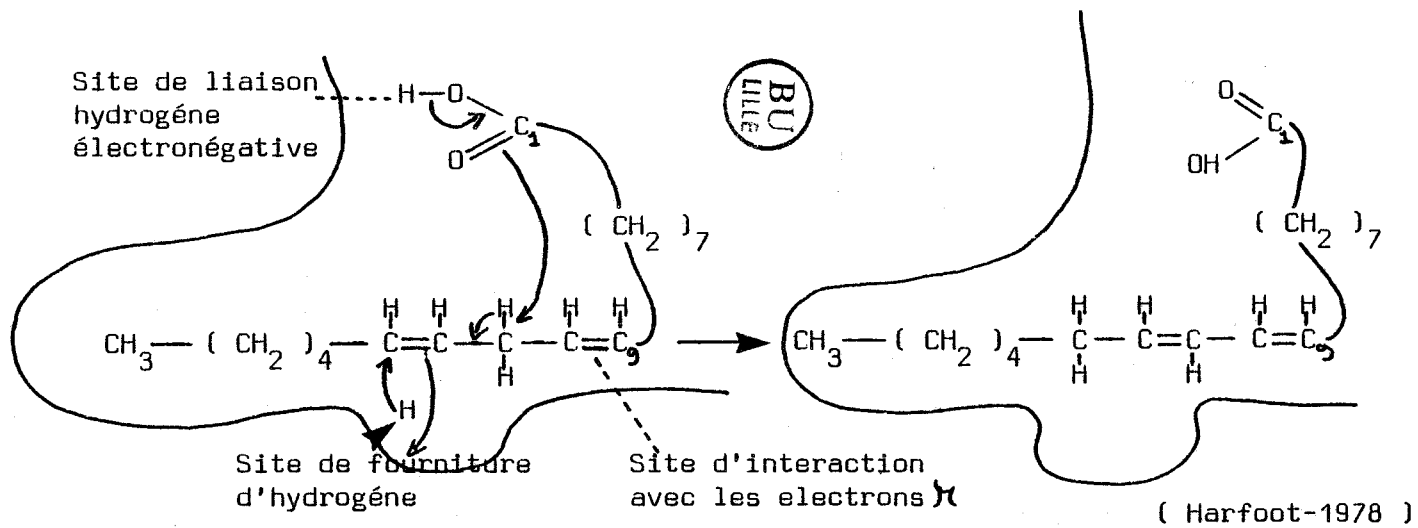


Figure 11.

VOIE PRESUMEE D'INTERACTION DU SITE ACTIF DE LA Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans ISOMERASE
SUR L'ACIDE LINOLEIQUE ET FORMATION DE L'ACIDE OCTADECADIENOIQUE C18:2;cis 9,trans 11.

donc une réaction d'acétogénèse avec production obligée d'hydrogène, et comme nous l'avons étudié précédemment, cette acétogénèse ne pourra se produire qu'à P_{H_2} très faible.

b-2 Biohydrogénation des acides gras insaturés.

L'utilisation des acides gras insaturés est possible selon deux mécanismes : soit, comme cela a lieu dans les mitochondries, les acides insaturés subissent la β oxydation sans hydrogénation préalable, soit ces acides sont d'abord hydrogénés par certaines bactéries anaérobies.

- hydrogénation préalable à la β -oxydation.

Les acides gras insaturés présents dans la ration des ruminants (en particulier l'acide linoléique dans les fourrages frais) sont hydrogénés dans le rumen (HARFOOT - 1978). D'après POLAN (1964), la biohydrogénation est un phénomène anaérobie strict et est inhibée par incubation des cultures en présence d'oxygène.

Voie métabolique : la biohydrogénation des acides gras di et tri insaturés à 18 atomes de carbone ne procède pas simplement par addition successive d'hydrogène sur les doubles liaisons mais débute par une étape d'isomérisation en une forme conjuguée de l'acide. L'isomérase réalisant cette transformation serait une enzyme intracellulaire. En effet, les activités isomérasique et hydrogénasique du jus de rumen sont extrêmement faibles.

L'isomérase présente une spécificité absolue pour le diène cis,cis et le transforme en isomère conjugué trans,cis (HARFOOT - 1978) - figure 11.

Le mécanisme d'hydrogénation ultérieure de l'isomère conjugué n'est pas clairement défini. Un grand nombre d'isomères intermédiaires sont produits (position des doubles liaisons et configuration stérique) - figure 12.

Transporteur d'hydrogène : sa nature n'est pas connue. L'apport d'hydrogène moléculaire n'augmente pas la vitesse d'hydrogénation (POLAN - 1964).

Souches bactériennes réalisant la biohydrogénation : si une culture mixte de bactéries du rumen hydrogène l'acide linoléique (α : C18:3,cis9.12.15 ou β : C18:3,cis6.9.12) en acide stéarique, il apparaît qu'aucune souche pure à capacité hydrogénatrice n'est capable à elle seule de réaliser la transformation complète du linoléique en stéarique.

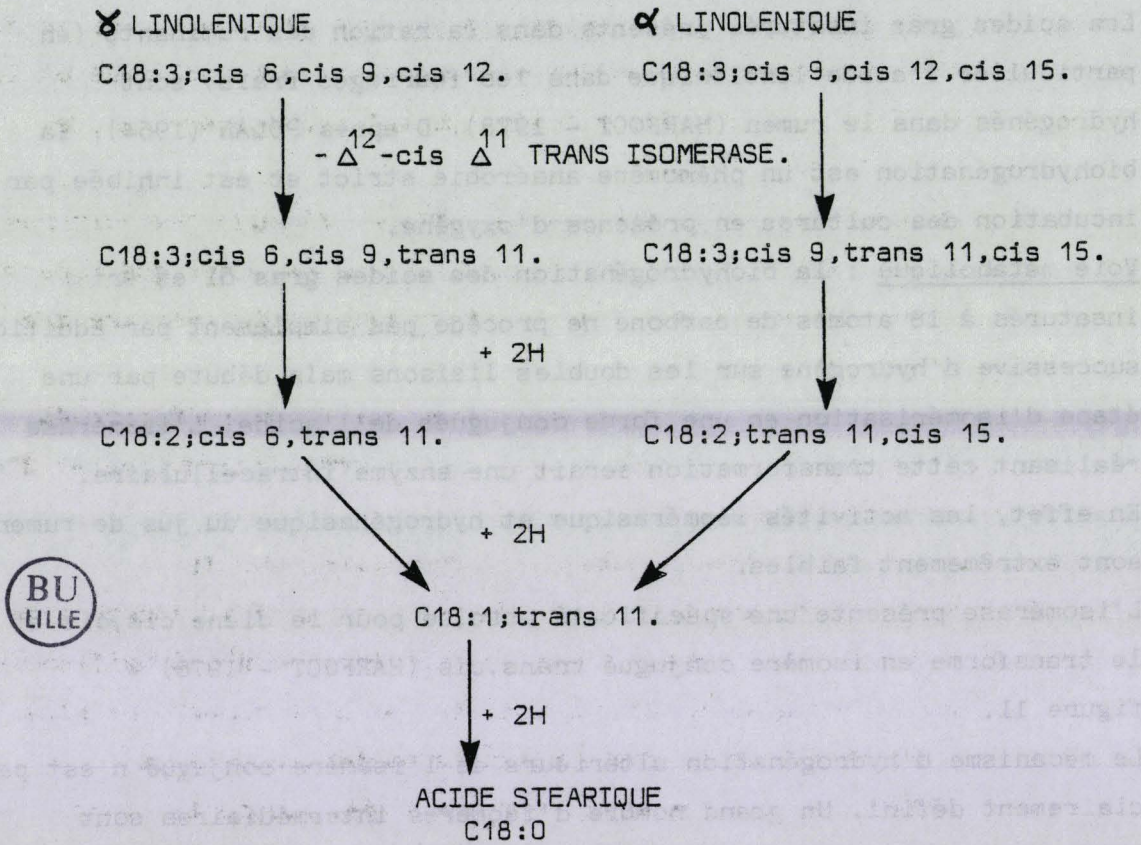


Figure 12.

VOIE METABOLIQUE PROBABLE DE LA BIOHYDROGENATION DE L'ACIDE LINOLENIQUE (d'après Harfoot - 1978 et Kemp - 1983)

EYSSEN (1982 et 1984) définit la transformation de l'acide linoléique (18:2,cis9.10) en acide trans vaccénique (18:1,trans11) comme une propriété de Eubacterium lentum, une bactérie anaérobie stricte assacharolytique du rumen.

KEMP (1983 et 1984) établit 2 groupes bactériens parmi les microorganismes du rumen à capacité biohydrogénatrice.

Dans le premier groupe, Ruminococcus albus et Butyrivibrio S2 n'hydrogènent pas les acides octadécénoïques et les acides linoléique et linoléinique sont transformés en transvaccénique.

Fusocillus babrahamensis P2/2, Fusocillus sp T344 font partie du second groupe. Elles transforment en acide stéarique l'acide linoléique et les acides octadécénoïques. L'acide linoléinique est hydrogéné en acide octadécénoïque cis 15 ou trans 15.

Cependant, sous certaines conditions de culture (mélange des cultures après croissance) KEMP obtient la production d'acide stéarique à partir d'acide linoléinique par la coculture de Butyrivibrio S2 avec une des bactéries du second groupe.

L'hydrogénation complète pourrait avoir lieu par l'intermédiaire du trans 11 octadécénoate (ac. vaccénique) qui pourrait faire l'objet d'un transfert interspécifique.

En conclusion, les différents auteurs s'interrogent sur la signification de la biohydrogénation réalisée par un faible nombre de bactéries du rumen. Il pourrait s'agir d'une réaction de détoxification vis à vis des acides gras insaturés ingérés par le ruminant. De plus, les acides gras constitutifs des structures bactériennes sont généralement saturés et ce pourrait être un moyen énergétiquement économique de production d'acides gras pour leur incorporation dans les cellules bactériennes.

Aucune référence bibliographique ne fait état d'une biohydrogénation préalable à la dégradation des acides gras en anaérobiose.

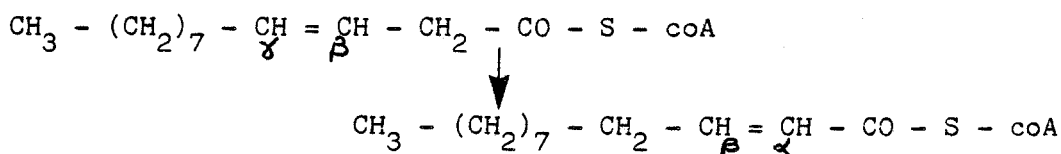
Cependant, l'acide oléique, l'acide gras insaturé le plus répandu, est très rapidement hydrogéné dans le rumen et pourrait être le précurseur direct du stéarate (HARFOOT - 1978).

- Utilisation directe des acides insaturés.

Dans les mitochondries, l'acide insaturé, sous forme activée commence à subir la β oxydation. Dans le cas de l'acide oléique, l'oleylcoA est transformée après 3 cycles en 3 acétylcoA et un acylcoA ayant une double liaison β - γ en configuration cis. L'acylcoA est transformé par

une réaction d'isomérisation en un acide gras ayant une double liaison trans α - β et la β -oxydation peut alors se poursuivre de façon classique.

Isomérisation :



Cependant, rien ne nous permet d'affirmer qu'une telle transformation puisse être réalisée par les bactéries acétogènes utilisant les acides gras à longues chaînes.

Conclusion :

Dans les deux cas, l'utilisation des acides gras insaturés fait intervenir des isomérases spécifiques et il n'est pas exclu que, dans les écosystèmes anaérobies, les acides insaturés puissent être en partie biohydrogénés par certaines bactéries et en partie utilisés directement par les bactéries A.P.O.H..

3 - Conclusion générale sur la méthanisation des lipides.

Les bactéries qui réalisent l'acétogénèse à partir des acides gras à longues chaînes sont encore très mal connues. Ce sont vraisemblablement des syntrophes obligées. Les bactéries sulfatoréductrices du groupe Sapovorans ne pourraient pas avoir un comportement de syntrophe en milieu pauvre en sulfate.

Lors de la digestion anaérobie des lipides, plus de 95 % du carbone organique, sous forme d'acides gras, est dégradé par une voie d'acétogénèse. L'étape d'acétogénèse est une phase "sensible" de la méthanisation des matières organiques. Même si le transfert interspécifique d'hydrogène se fait dans des conditions optimales, le gain d'énergie pour la croissance et la maintenance des bactéries acétogènes est très limité.

IV - Conclusion générale :

Cette analyse fait ressortir l'importance des réactions de transfert d'hydrogène sur la stabilité et la faisabilité des processus biologiques intervenant dans la méthanisation.

* Le transfert facultatif d'hydrogène entre les bactéries fermentatives et les bactéries méthanogènes, favorise les cinétiques d'hydrolyse et la déviation des voies métaboliques vers la production de précurseurs directs du méthane. Ainsi, on court circuite partiellement l'étape lente et sensible de l'acétogénèse à partir des acides gras volatils.

* Le transfert obligé d'hydrogène entre les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène et les bactéries hydrogénophiles, est un mécanisme clé dans l'utilisation des composés organiques réduits. Dans le cas où le transfert d'hydrogène est déficient, ces composés s'accumulent dans le milieu.

Ces considérations biologiques mettent en lumière l'avantage des procédés monoétapes où les transferts d'hydrogène sont favorisés. Lorsque la séparation des phases est envisagée dans un but technologique, ces possibilités de transferts interspécifiques doivent être conservées par un choix approprié des conditions de conduite de chaque étape.

Sur un autre plan, notons que les gains énergétiques pour les différentes populations bactériennes réalisant la méthanisation complète de la matière organique sont très différents et en particulier le gain d'énergie pour les bactéries A.P.O.H. est encore plus faible que le gain d'énergie pour les bactéries réalisant la méthanogénèse acétoclaste. A partir des acides gras, principaux constituants des lipides, la synthèse indispensable d'ATP ne peut se faire par le mécanisme de transfert de liaisons riches en énergie (S.L.P.) comme chez les fermentatives. Cela explique les faibles taux de croissance observés chez les syntrophes obligées et que l'étape d'acétogénèse avec production obligée d'hydrogène soit une étape limitante de la méthanisation au même titre que la méthanogénèse sensus stricto.

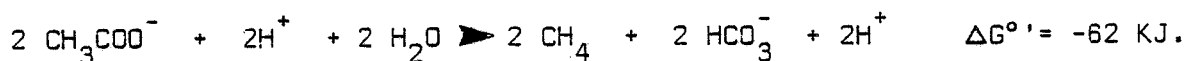
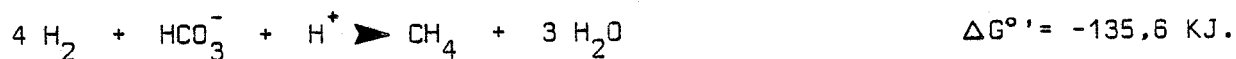
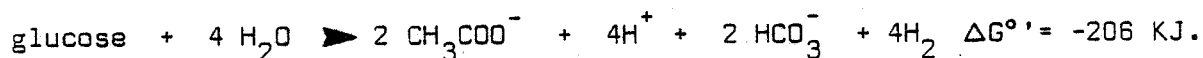
La faisabilité de la méthanisation des lipides se heurte donc à un faible taux de renouvellement de la population bactérienne et, de plus au problème de toxicité des acides gras à longues chaînes introduits

EQUATIONS THEORIQUES DE METHANISATION DE DEUX SUBSTRATS TYPES.

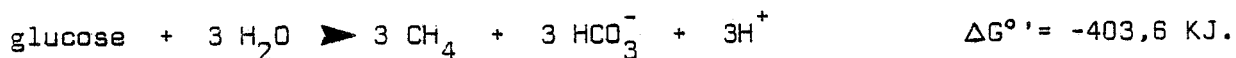
Tableau 7.

(1) CELLULOSE.

Cellulolyse: cellulose \blacktriangleright n glucoses.



Méthanisation complète:



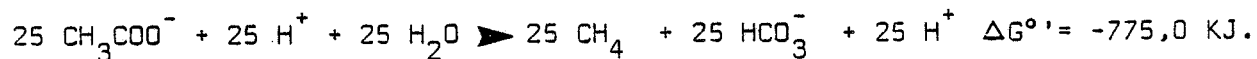
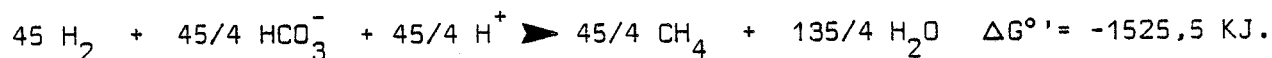
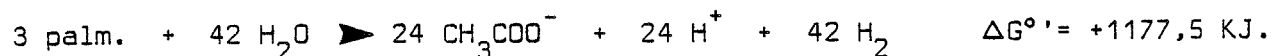
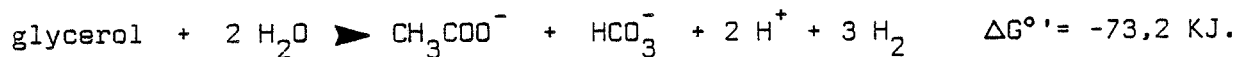
Pourcentages théoriques finals de méthane et CO_2 : 50% CH_4 ; 50% CO_2 .

Variation d'énergie libre standard à pH:7,0 pour 51 carbones-glucose:

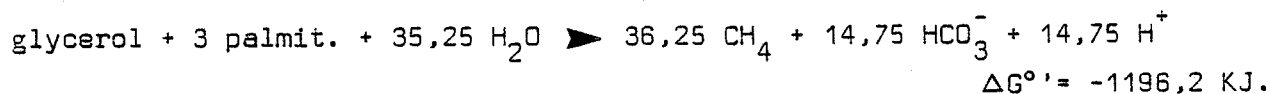
$$\underline{\Delta G^{\circ'} = -3430,6 \text{ KJ/51 moles carbone.}}$$

(2) TRIPALMITINE.

Lipolyse: tripalmitine \blacktriangleright glycerol + 3 palmitiques.



Méthanisation complète:



Pourcentages théoriques finals de méthane et CO_2 : 71% CH_4 ; 29% CO_2 .

Variation d'énergie libre standard à pH:7,0 pour 51 carbones-tripalmitine:

$$\underline{\Delta G^{\circ'} = -1196,2 \text{ KJ/51 moles carbone.}}$$

dans les milieux. La comparaison de deux substrats types, la cellulose et un triglycéride (tableau 7) mettent en lumière les différences que l'on peut attendre (taux de croissance des populations bactériennes, rendement de conversion en méthane) de leur fermentation méthanique.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

MATERIEL ET METHODES.

I - METHODES ANALYTIQUES

1 - Déterminations analytiques servant à l'évaluation des fermentations en pilote.

a - Matières sèches totales:

L'échantillon est séché à 105°C jusqu'à poids constant.

Matières minérales : Après séchage, le prélèvement est calciné au four à 550°C jusqu'à poids constant.

Matières organiques (ou volatiles) totales : Cette valeur correspond à la fraction éliminée au four à 550°C.

b - Matières en suspension et matières volatiles en suspension

Un volume connu de l'échantillon homogénéisé est filtré sur fibre de verre Wathman GF/C. Le filtre est ensuite traité selon le même protocole que pour les matières sèches.

c - Demande chimique en oxygène.

Détermination par la méthode au dichromate de potassium (Norme AFNOR T90 - 101). La mesure est utilisable pour des teneurs en chlorures inférieures à 3 g/l. Pour des teneurs en chlorure supérieures, il convient d'augmenter en proportion l'addition de sulfate de mercure.

d - Carbone organique total et carbone minéral.

L'échantillon organique est minéralisé en ampoule de verre scellée. Le carbone minéral (carbonate et CO₂ dissous) est dosé par spectrométrie infrarouge (Oceanography International). Le dosage du CO₂ est réalisé par dégazage en présence d'acide phosphorique.

e - Azote total KJELDAHL et azote ammoniacal.

L'azote ammoniacal est mesuré à l'électrode spécifique (Orion Research).

Le N.T.K. est obtenu par mesure d'azote ammoniacal à l'électrode spécifique après minéralisation de l'échantillon selon la méthode AFNOR.

f - Sucres totaux.

Méthode à l'antrone sulfurique : hydrolyse acide des sucres et transformation en dérivés du fulfural qui forment avec l'antrone des composés absorbants à 600nm. Résultat en mg d'équivalents glucose par litre.

g - Détermination des fractions glucidiques.

Les fractions "sucres solubles", "hemicellulose", "cellulose" et "lignine" sont déterminées par une méthode adaptée de CHESSON (DATTA - 1981).

h - Matières grasses totales.

Les lipides de l'échantillon sec sont extraits au soxhlet par l'éther diéthylique. Ils sont ensuite déterminés par gravimétrie. L'extrait lipidique peut être conservé pour analyse des A.G.L.C.

2 - Techniques chromatographiques.

a - Acides gras volatils.

Analyse par chromatographie en phase gazeuse des surnageants de centrifugation.

* Chromatographe Varian 3700, détecteur à ionisation de flamme avec injecteur automatique et intégrateur Varian CDS 111.

* Colonne acier inox 1/8 pouce x 2,5 m remplie (Chromosorb W.A.W., 100-120 mesh imprégnée de N.P.G.A. 25 % et H_3PO_4 2 %).

* Gaz vecteur azote saturé en acide formique (30ml/mn).

* Température de colonne : isotherme à 160°C ; injecteur et détecteur : 230°C.

* La quantification des AGV est réalisée par étalonnage externe.

b - Ethanol.

Les conditions opératoires sont identiques à celles utilisées pour les AGV à l'exception de la température de colonne qui est programmée à 100°C pendant 4 mn puis augmente de 30°C par minute jusqu'à 180°C.

c - Dosage des acides gras à longues chaînes.

La méthode suivante a été mise au point pour le dosage des A.G.L.C. dans les milieux de fermentation. Elle reste fiable, en particulier, lorsque la concentration en calcium est élevée. La méthode s'inspire de TOULLEC (1968), DEYMIE (1981), LEPAGE (1984), DAINTY (1984).

* Phase d'extraction : le prélèvement est acidifié par HCl 6 N (1/1-V/V) en flacon bouché et placé à 100°C, 1 heure. Une quantité connue d'acide pentadécanoïque (étalon interne) est ajoutée. Après refroidissement, 1 volume d'un mélange chloroforme-méthanol (2/1-V/V) est introduit dans le flacon qui est remplacé à 100°C, 1 heure. Le mélange est agité en discontinu. Après décantation, la phase chloroforme, rincée à l'eau distillée, est centrifugée puis évaporée à sec dans le tube de butylation, sur lequel on adapte un bouchon étanche.

* Phase de butylation : dans le tube contenant l'extrait lipidique séché, on ajoute 2 ml de mélange butylant (butanol-H₂SO₄ 5%). Les tubes sont placés 2 heures au four à 80°C. Après refroidissement, la phase butanol est neutralisée par 5 ml d'une solution à 5% de K₂CO₃. Le même protocole est utilisé pour la réalisation d'une gamme étalon à partir d'acides gras très purs. Les esters butyliques d'acides gras, présents dans la phase butanol, sont séparés par chromatographie en phase gazeuse.

* Chromatographe Girdel série 30, détecteur à ionisation de flamme.

* Colonne acier 1,8 m x 2mm ; support chromosorb W-AW,80 - 100 mesh, imprégnée de diéthylène glycol succinate (DEGS) : 28%.

- * Gaz vecteur azote : débit 30ml/mn
- * Température du four : isotherme à 185°C ; injecteur 220°C ; détecteur 260°C.

d - Gaz de fermentation.

Les gaz sont séparés par chromatographie gaz-solide.

* Chromatographe Pye Unicam muni d'un détecteur à conductivité thermique - Intégrateur Shimadzu ICR.1B.

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

* Gaz vecteur azote pour le dosage de $H_2 - CO_2 - CH_4$ ou helium pour le dosage de $N_2 - CH_4 - CO_2$. Débit du gaz : 50ml/mn

* Température du four : 50°C, injecteur 60°C, détecteur 100°C.

* Quantification par étalonnage externe. Les résultats sont exprimés en pourcentage de chaque gaz dans l'échantillon.

e - Acides organiques (lactate - succinate)

Analyse par chromatographie liquide haute performance.

* Chromatographe HPLC Waters Associates muni d'un injecteur automatique WISP.

* Colonne C 18 à compression radiale ; Solvant : tampon phosphate d'ammonium 10g/l à pH 3. Rinçage au méthanol eau (50/50 - V/V)

* Détecteur ultra violet : = 210nm

* Quantification par étalonnage externe.

II - TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

1 - Cinétiques de fermentation en discontinu.

Les fermentations anaérobies en discontinu sont réalisées en flacons bouchés et purgés à l'azote. Cette méthode est employée pour l'évaluation de l'activité de cultures mixtes (boues de digesteurs) ou de cultures pures. Dans ce dernier cas, les cultures sont maintenues en conditions stériles.

Le volume du flacon est fonction du nombre d'analyses nécessaires au suivi de la cinétique.

Après ensemencement, les flacons sont placés à l'étuve, à la température d'incubation. Les prélèvements de gaz et de liquide sont faits à la seringue, à travers le bouchon butyl. Le gaz est prélevé avec une seringue munie d'une valve étanche et injecté dans le chromatographe.

Moyennant un étalonnage par injection de quantités connues de méthane à la pression ambiante, cette technique fournit directement le volume de méthane produit (PETROFF - 1985).

La cinétique de production de gaz est calculée en tenant compte des prélèvements de gaz pour analyse et des prélèvements de milieu qui augmentent le volume mort et éliminent une partie du substrat.

2 - Cultures anaérobies - milieu de culture.

* Sources des microorganismes

Methanospirillum hungatei souche JF1 (DSM - 864) et Syntrophomonas wolfei souche Gottingen (DSM 2245.B) proviennent de la collection allemande. Desulfovibrio souche Madison a été fournie au laboratoire par le professeur J.G. ZEIKUS.

* Milieux et conditions de culture.

La technique de culture anaérobie de Hungate modifiée par MILLER et WOLIN (1974) est utilisée pour les enrichissements et les cultures de souches purifiées. Le milieu de base qui contient minéraux et vitamines (milieu CBBM - SAMAIN - 1982) est tamponné par addition de PIPES (acide piperazine diethane sulfonique) 50mM et le milieu est amené au pH désiré par addition de KHCO_3 sous gaz N_2/CO_2 (85/15), le milieu étant à la température prévue d'incubation. Pour les tests de pH supérieur à 7,1 le milieu est préparé sous gaz N_2 (100%). Le milieu est complété par addition de 0,3g/l d'extrait de levure et 2,5% de jus de rumen. Les milieux destinés aux dilutions en gélose sont autoclavés sans PIPES (brunissement en présence d'Agar). Le tampon, en solution concentrée est alors rajouté après l'autoclavage.

Les sources de carbone et la solution réductrice (cystéine HCl : 1,25%, Na_2S : 1,25%) préparées en solutions concentrées stériles en flacons bouchés sous atmosphère d'azote sont ajoutées stérilement au milieu après autoclavage. Les concentrations initiales en substrats sont précisées dans le texte.

Les acides gras à longues chaînes, non solubles dans l'eau, sont préparés en solutions concentrées de savon de sodium. Ces solutions, généralement figées à température ambiante sont réchauffées avant addition dans les milieux.

La solution concentrée de chlorure de calcium est ajoutée après addition du savon de sodium d'A.G.L.C. Il se forme alors un précipité homogène de savon de calcium. Sauf précision dans le texte, le chlorure de calcium est ajouté en quantité équimolaire à l'A.G.L.C.

Le milieu décrit est utilisé pour les enrichissements, les dilutions et numérations. Sauf indication contraire, le pH initial du milieu est de 7,1.

Les résultats cités résultent, pour la plupart, de l'observation d'au moins 2 cultures inoculées dans des conditions identiques.

3 - Technique d'isolement.

L'enrichissement est dilué par puissance de 10 en milieux liquides. Ces milieux sont utilisés pour l'inoculation (2%) en hotte anaérobie (Forma 1020) de tubes Veillon (9x160mm) dans lesquels est coulé le milieu gélifié par 0,6% d'Agar. Avant prise de la gélose, et pour les souches productrices obligées d'hydrogène, 10% d'une culture fraîche de M. hungatei ou de Desulfovibrio (en présence de 30 mM de Na_2SO_4) sont incorporés à la culture. Les tubes sont ensuite scellés à la paraffine et fermés par des bouchons cellulose.

Les tubes sont conservés droits à l'étuve. Les colonies sont prélevées par bris du tube, aspirées en conditions d'anaérobiose et repiquées en milieu liquide. Les tests de pureté reposent sur : l'ensemencement de milieux complexes BHI (brain heart infusion), l'observation microscopique des cultures après incubation, la gamme des substrats utilisés.

4 - Numérations bactériennes.

Les boues de digesteurs sur lesquelles sont réalisées les numérations sont homogénéisées au "Polytron" durant 5mn, sous courant d'azote. Les boues sont ensuite diluées en milieux liquides, en conditions stériles. 3 flacons sont inoculés pour chaque niveau de dilution et pour chaque substrat.

Après incubation et évaluation de la croissance, les résultats sont exprimés en fonction des tables statistiques de DE MAN (1975) - nombre le plus probable.

5 - Observations microscopiques.

En microscopie optique, les cultures sont observées à l'état frais ou après fixation au mélange gelose 1%, glutaraldehyde 1,25%.

Les observations en microscopie électronique à balayage sont faites après fixation des échantillons selon la technique utilisée par VERRIER (1984). Microscope à balayage Jeol JSM-35CF.

Nous remercions Monsieur G. PRENSIER (INSERM - U 142 VILLENEUVE D'ASCQ) pour la préparation et l'observation de cultures par microscopie électronique à transmission.

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N



NATURE ET COMPOSITION DES DECHETS DE LEGUMES UTILISES.

Tableau 1.

DECHETS DE LEGUMES	MATIERE SECHE ₋₁ g Kg ⁻¹	MATIERE ORGANIQUE gKg ⁻¹	DCO TOTALE g O ₂ Kg ⁻¹	CELLULOSE DANS LA MATIERE SECHE %	NTK g N.Kg ⁻¹
PELAGES DE BETTERAVES ROUGES	79,1	60,6	71,0	17,3	1,37
PELAGES DE CAROTTES	90,4	82,9	95,3	9,2	2,0
MELANGE DE DECHETS	103,7	92,5	104,5	19,1	2,9
HARICOTS VERTS	104,0	93,8		18,5	5,42

RESULTATS

A - METHANISATION EN DEUX ETAPES DE DECHETS SOLIDES DE CONSERVERIE

I - SUBSTRATS

Les déchets de légumes étudiés sont des résidus de pelage de carottes, de betteraves rouges ou d'éboutage de haricots verts.

Ils ont une teneur en matière sèche voisine de 100g/l et 70 à 80% des matières organiques sont des **glucides facilement hydrolysables** (sucres solubles + hémicelluloses). Ils diffèrent sensiblement par leur teneur en fibres lignocellulosiques non dégradables. Celle-ci est très faible dans les déchets de carottes et elle représente 10% des matières organiques de haricots (tableau 1).

Avant fermentation, les déchets sont broyés en fractions de moins de 5 mm (Broyeur K.S. Schnell). Ils sont ensuite répartis en sachets plastiques et stockés au congélateur à - 18°C.

II - DISPOSITIF EXPERIMENTAL. (figure 1)

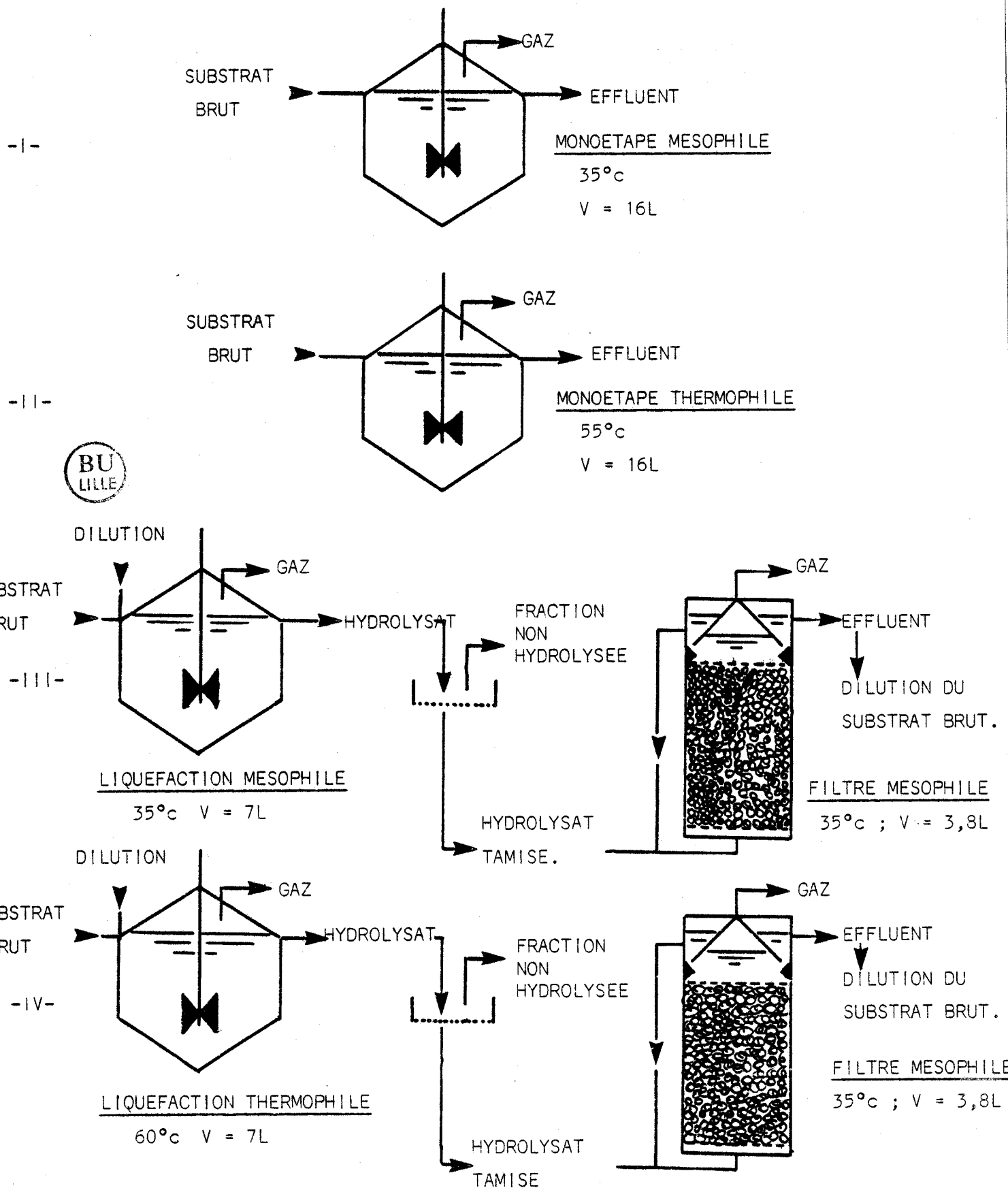
Les deux digesteurs monoétapes témoins sont de type infiniment mélangé. Ils ont un volume utile de 16l et sont alimentés une fois par jour. Les températures sont régulées à 35°C et à 55°C, optima mésophiles et thermophiles des méthanogènes acétoclastes.

Le dispositif en deux étapes se compose, pour la partie liquéfaction de deux réacteurs brassés de 6,5l de volume utile (Setric génie-industriel). Les températures des deux digesteurs sont respectivement régulées à 35°C et 60-65°C, qui sont les optima de croissance des bactéries hydrolytiques, mésophiles et thermophiles.

Les réacteurs sont faiblement agités (160 rpm). Le pH est mesuré en continu et il est régulé à une valeur prédéterminée, par addition de soude. Les deux réacteurs de liquéfaction-acidogenèse sont alimentés en semi-continu, une fois par jour : une fraction du contenu du fermenteur est prélevée par pompage et est remplacée par un volume équivalent de

DISPOSITIF EXPERIMENTAL.

Figure 1.



résidus solides additionnés d'effluent de sortie du méthaniseur et d'eau. Cette technique permet d'une part par le recyclage d'une partie de l'effluent méthanisé de limiter l'apport d'agent de neutralisation dans le réacteur d'acidogénèse et d'autre part, l'apport en proportion variable d'eau de dilution permet de fixer indépendamment la charge volumique et le temps de séjour hydraulique avec un résidu de teneur en matière sèche constante.

L'hydrolysats est tamisé (0,8 mm) et stocké à 4°C avant son introduction dans le méthaniseur. Le poids sec des matières grossières retenues sur le tamis est déterminé puis celles-ci sont éliminées.

La méthanisation des hydrolysats est réalisée sur un filtre anaérobie mésophile, de 3,8 l utile (volume occupé par le support) alimenté en flux ascendant. Le support est constitué d'anneaux de PVC de 1,5 cm de diamètre et dont le coefficient de vide est de 81%.

Le réacteur est alimenté en continu par pompe péristaltique. La partie occupée par le support est surmontée d'un séparateur gaz-effluent qui sert également de décanteur interne. La sortie d'effluent se fait par débordement (figure 1). Pour assurer l'homogénéité de la phase liquide et éviter l'apparition de chemins préférentiels, l'effluent est recyclé dans le méthaniseur. La fréquence optimale de recyclage est décrite par la suite.

* Les productions de gaz des différents réacteurs sont mesurées par compteur à impulsion (MOLETTA - 1982). Ce compteur peut être couplé à un enregistreur pour le suivi des cinétiques de production de gaz.

* Les fermenteurs mésophiles sont inoculés par les boues d'un digesteur de méthanisation industriel (conserverie). Les fermenteurs thermophiles sont inoculés par une population bactérienne adaptée à la méthanisation thermophile (55°C) d'un mélange de boues urbaines et de résidus solides. Le dispositif de laboratoire permet d'étudier les deux étapes de façon distincte. Il n'y a pas couplage direct entre le réacteur de liquéfaction et le réacteur de méthanogénèse. Dans notre dispositif expérimental, les temps de séjour hydraulique peuvent être régulés de façon indépendante dans les deux digesteurs.

METHANISATION MONOETAPE DE RESIDUS DE CAROTTES

Tableau 2.

	Thermophile 55°C	Mesophile 35°C
T.S.H. j.	13	22,8
Charge gMO/l j	6,25 (charge limite)	3,63 (charge limite : 4,4)
l biogaz/g MO	0,742	0,774
l CH ₄ /g MO	0,364	0,371
l CH ₄ /g DCO	0,316	0,323
l biogaz/l.j	4,64	2,81
l CH ₄ /l.j	2,27	1,35
pH moyen en fin de charge	7,18	7,13
% CH ₄ moyen en fin de charge	59	63
% CH ₄ moyen	49	48
<u>Résidu méthanisé</u>		
- MST (g/l) (% réduction)	23,12 (74,5)	16,8 (81,5)
- MVT (g/l) (% réduction)	14,0 (83,1)	10,8 (87,0)
- DCO totale (gO ₂ /l)	21,67 (77,3)	15,9 (83,3)
- DCO soluble (gO ₂ /l)	3,63	3,05

III - RESULTATS.

1 - Méthanisation des déchets de pelage de carottes par le procédé conventionnel.

Le but des essais utilisant le procédé infiniment mélangé est d'établir des valeurs témoins à l'aide d'un procédé classique bien adapté à la méthanisation des résidus solides étudiés.

Les charges volumiques maximales applicables aux fermenteurs thermophile et mésophile sont respectivement de 6,25 et 4,4 g de matière organique par litre et par jour. Ces taux de charges correspondent au début de l'accumulation de propionate résiduel. Dans les deux cas, les temps de séjour (13 et 23 jours) ne sont pas limitants pour la méthanogenèse à partir de l'acétate.

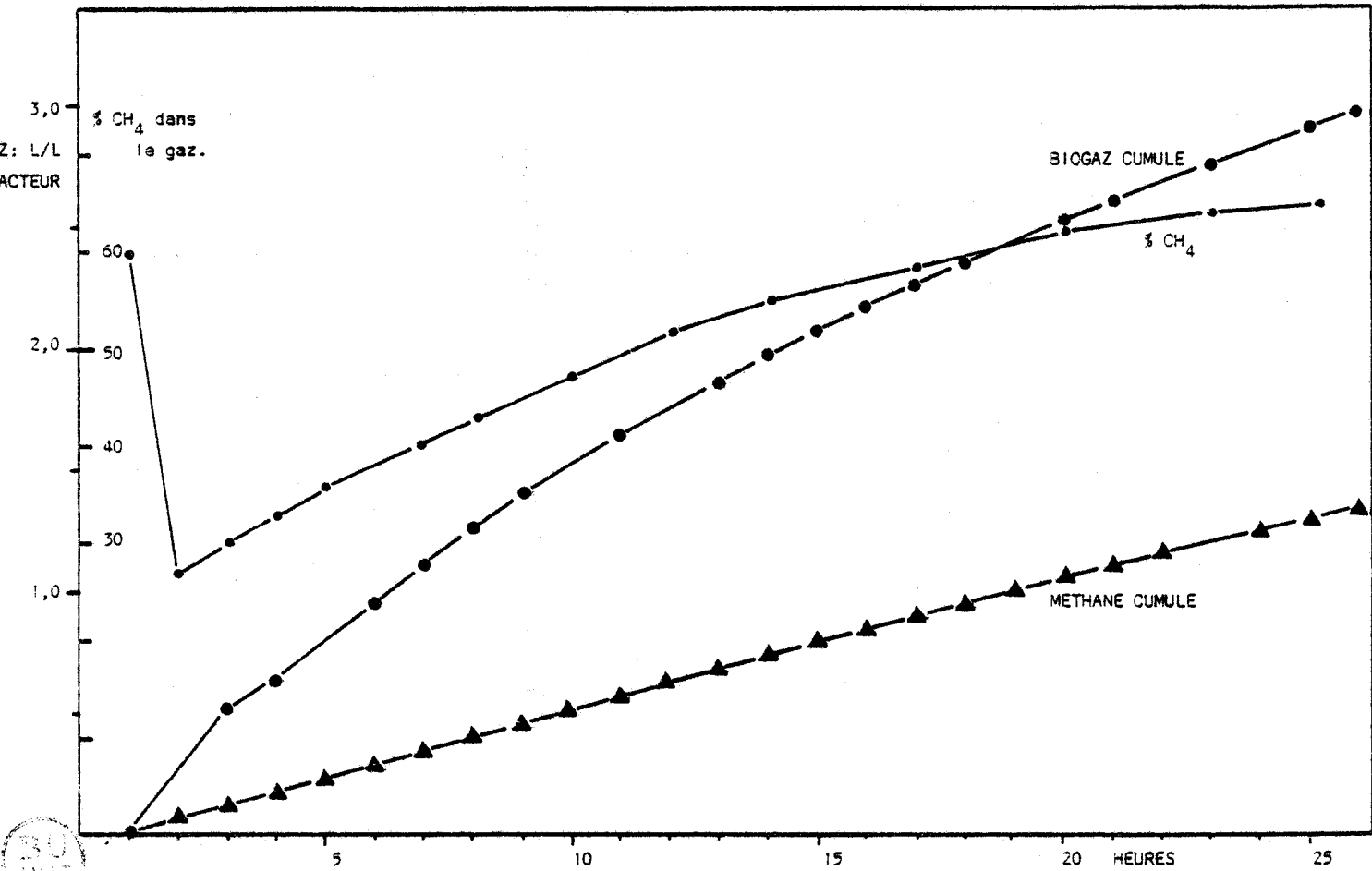
Les rendements de dégradation de la matière organique en méthane sont équivalents en mésophile et en thermophile : respectivement 0,371 et 0,364 l de méthane par gramme de matière organique introduite (tableau 2).

* Comportements cinétiques.

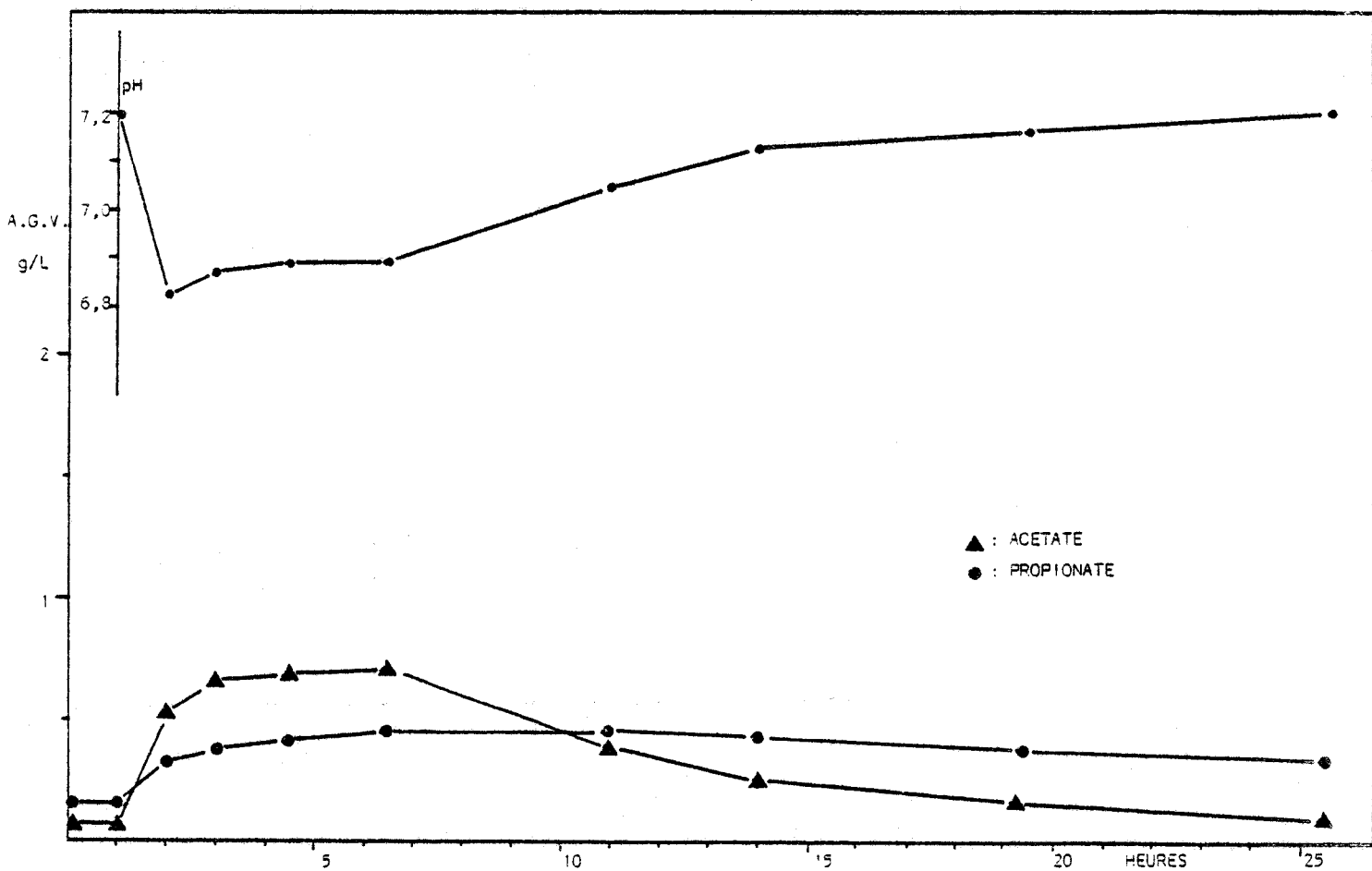
Le mode d'alimentation discontinu entraîne, entre deux apports, une évolution non équilibrée de la méthanisation.

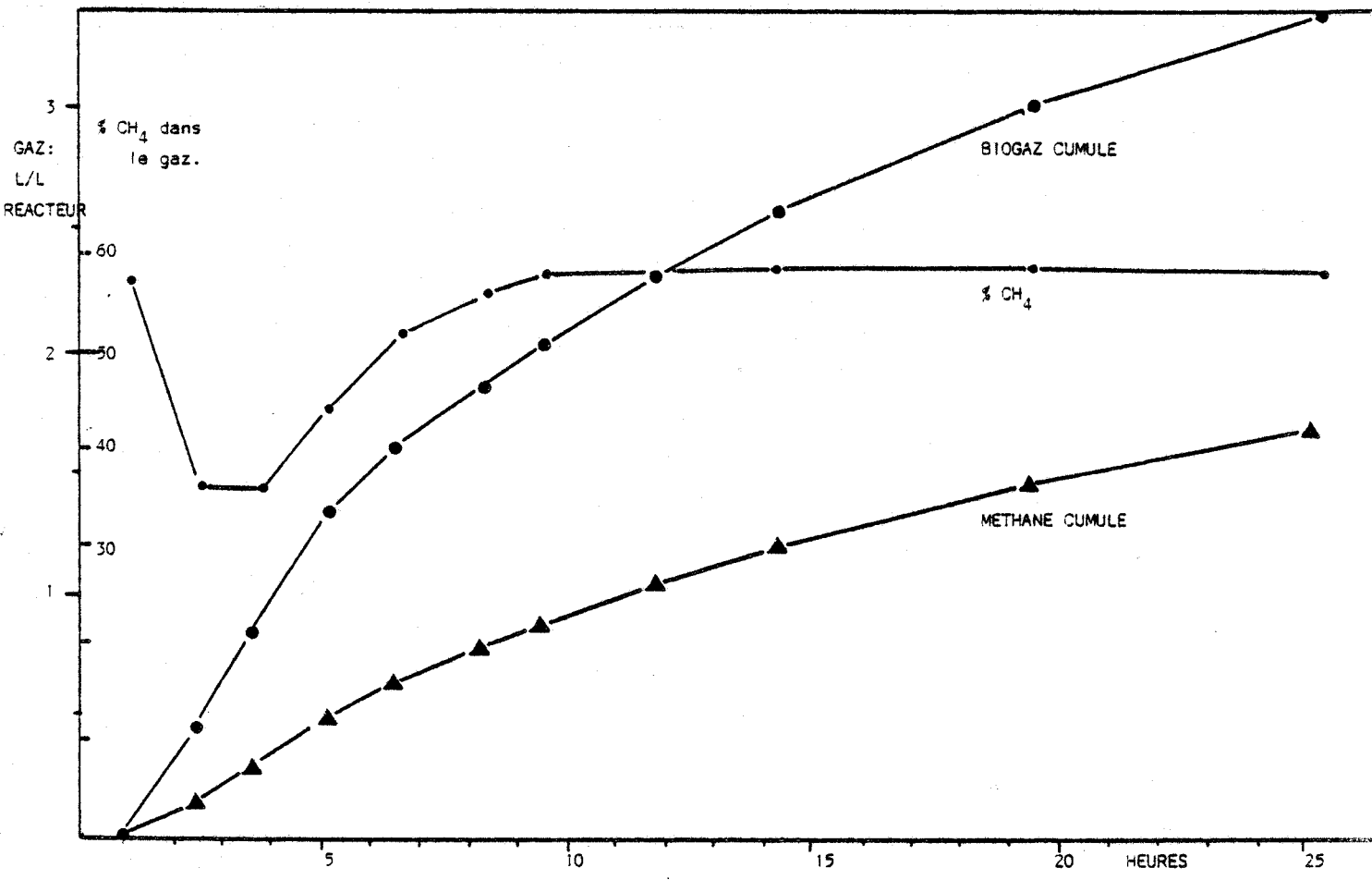
Les suivis sur 24 h des cinétiques de fermentation obtenues à 35 et à 55°C, lorsque les fermenteurs sont à leur charge maximale, sont présentés sur les figures 2 et 3. En thermophile, les étapes d'acidogenèse et de méthanogenèse acétoclaste sont accélérées, le procédé accepte une charge volumique supérieure. De plus, pour une accumulation transitoire d'acétate plus élevée, la baisse du pH est plus limitée qu'en mésophile ce qui permet de penser que le milieu est mieux tamponné.

Dans les deux cas, l'augmentation de la charge volumique est limitée par l'accumulation de propionate. Aux deux températures, et pour les taux de charges maximaux, l'accumulation de propionate coïncide avec l'apparition d'hydrogène dans le gaz : 30 mn après l'alimentation, la P_{H_2} est de 2×10^{-4} atm. Après 90 mn, la P_{H_2} est inférieure au seuil de détection (10^{-5} atm), mais le propionate n'est pas dégradé.

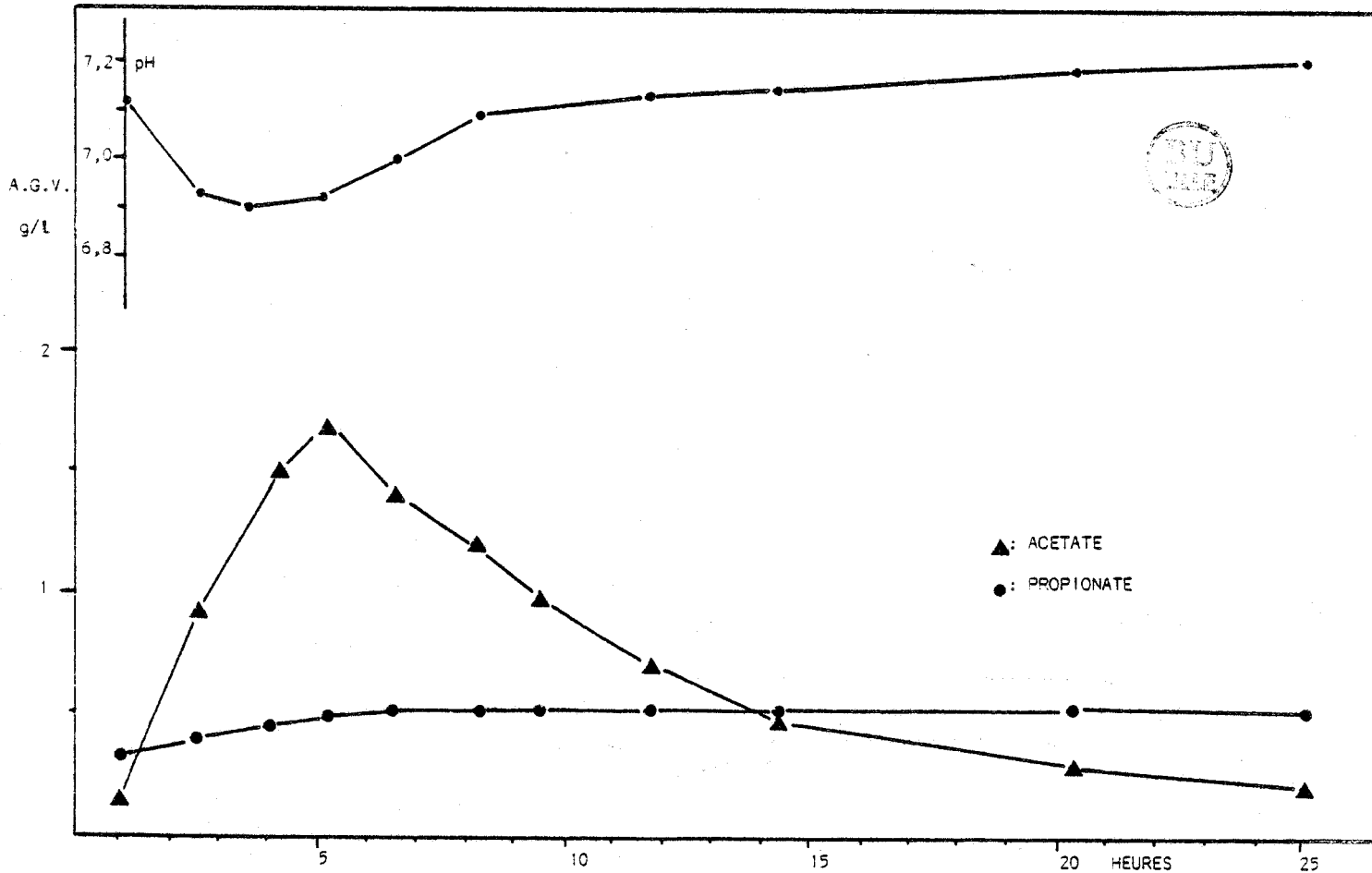


Dégradation d'une charge (4,4 g M.O./L) en réacteur monoétape mésophile. Figure 2.





Dégradation d'une charge (6,5 g M.O./L) en réacteur monoétape thermophile. Figure 3.



SYNTHESE DES RESULTATS DE LIQUEFACTION-ACIDOGENESE DE DECHETS SOLIDES.

: SUBSTRAT	pH	C.V. g M.O./L.j	T.S.H. j.	TEMP. °c	PROD. EN AGV g carbone/L.j	REND ^t AGV g carb./g M.O.	CH L/L.j	CH ^A L/g M.O.	CONCENTRATIONS DANS LE REACTEUR L-A g/L.						
									ACET.	PROP.	BUT.	ISOVA.	VAL.	CAPR.	ETHANOL.
MESOPHILE.															
BETT.	5,5	8,7 (2)	5,5	35	1,41	0,163	0	0	6,54	3,94	2,84	0	1,98	0,93	0
CAROTTE	6,5	12	2	35	2,36	0,197	0,49	0,041	5,42	2,3	2,77	0,16	0,92	0,2	0
HARICOT	6,5	14	2	35	2,91	0,208	0,71	0,051	9,6	1,5	2,52	0,15	0,8	0,1	0
HARICOT	6,5	14	4	35	2,72	0,194	0,84	0,06	16,52	3,27	5,78	0,39	0,92	0,1	0
THERMOPHILE.															
BETT.	5,5	8,7 (2)	4	60 ₁	1,34	0,154	0	0	6,0	0,2	4,0	0	0	0	1,5
CAROTTE	6,5	12	2	60 ₁	3,03	0,253	0,08	0,007	6,44	0,67	4,13	0,18	0	0	1,5
CAROTTE	6,5	17,8 (2)	2	60 ₁	4,25	0,272	0,04	0,002	9,81	1,15	5,04	0	0	0	2,5
CAROTTE	6,5	17,8 (2)	3,5	60 ₁	2,66	0,149	0,04	0,002	11,37	0,72	5,88	0,25	0	0	2,0
MEL. LEG.	6,5	14	3	60	2,16	0,152	0,86	0,06	12,9	0,8	0,93	0,1	0	0	0
MEL. LEG.	6,5	14	3	55	2,2	0,154	1,25	0,088	7,32	1,37	5,53	0,27	0	0	0
HARICOT	6,5	14	2	60	2,6	0,186	1,27	0,091	10	0,7	1,9	0,1	0	0	0
HARICOT	6,5	14	2	55	2,88	0,206	1,5	0,11	4,73	0,88	5,01	0,1	0	0	0

BETT.: pelages de betteraves rouges.

CAROTTE: pelages de carottes.

MEL. LEG.: mélange de déchets.

HARICOT: équeutage de haricots verts.

1: Pas de chauffage préalable de l'alimentation.

(2): Liquéfaction incomplète.

Tableau 3.

2 - Liquéfaction et acidogénèse.

L'évaluation de l'avancement de la liquéfaction est faite selon deux critères : le premier est difficilement quantifiable : la liquéfaction est considérée comme complète lorsque l'hydrolysate ne colmate pas au tamis (maillage 0,8 mm). Il ne subsiste alors que des fibres difficilement fermentescibles. Le second est la quantification par la production d'acides gras volatils, d'éthanol et de gaz.

Les proportions des différents composés dépendant des conditions de liquéfaction, cette valeur est ramenée en gramme de carbone contenu dans les produits d'acidogénèse et est exprimée en rendement de conversion de la matière organique ou en productivité par rapport au volume de réacteur. L'hydrolysate tamisé contient encore des fines particules en suspension. La mesure de ces matières en suspension dans les hydrolysats est difficile du fait de la viscosité du produit. Leur quantification est estimée à partir de la différence entre les analyses de DCO totale et de DCO soluble sur les effluents de liquéfaction.

a - Obtention de la séparation des phases.

A partir de boues méthanogènes placées dans le digesteur de liquéfaction, l'augmentation de la charge volumique entraîne rapidement l'accumulation de métabolites intermédiaires. Cela sous-entend qu'avec ce type de résidus, la vitesse d'hydrolyse de la plupart des fractions organiques n'est pas le facteur limitant le processus global de méthanogénèse.

La séparation des phases est obtenue par la limitation des réactions d'acétoclastie dans le réacteur de liquéfaction. L'inhibition de la méthanogénèse acétoclaste peut résulter : de la régulation du pH de liquéfaction à une valeur inférieure à l'optimum de pH des acétoclastes ; de l'application d'un temps de séjour hydraulique inférieur au temps de doublement des méthanogènes ; ou du choix d'une température de liquéfaction différente de la température optimale des acétoclastes : ce dernier paramètre est seulement utilisable en thermophilie, où les températures optimales des hydrolytiques (65°C) et des acétoclastes (55°C) sont différentes.

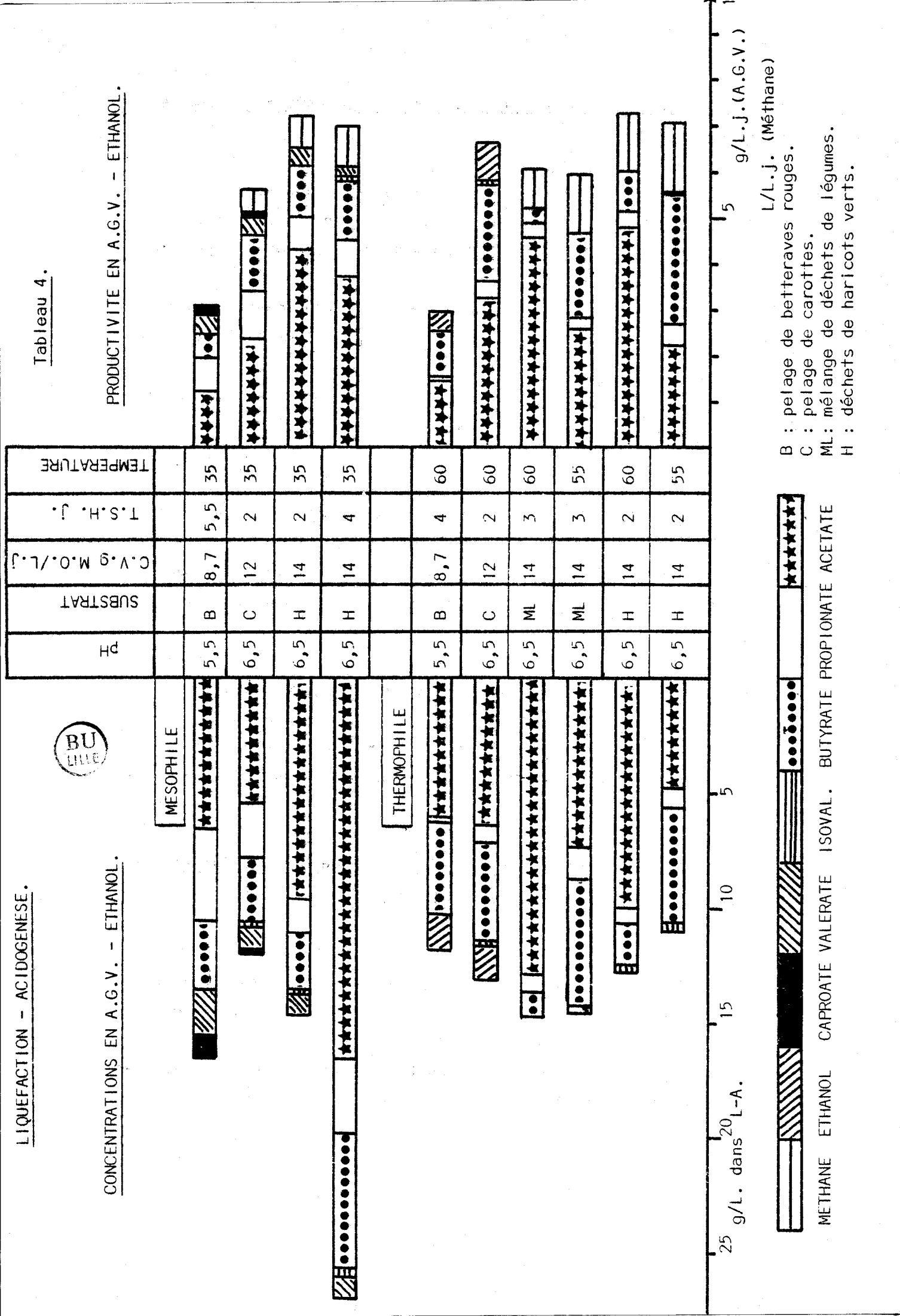
LIQUEFACTION - ACIDOGÈNESE.

CONCENTRATIONS EN A.G.V. - ETHANOL.



PRODUCTIVITE EN A.G.V. - ETHANOL.

Tableau 4.



b - Influence du pH sur la liquéfaction des déchets de pelage de betteraves rouges.

Sans contrôle de pH, celui-ci chute rapidement dans le réacteur d'acidogenèse pour se stabiliser à une valeur voisine de 4,0 avec production d'acide lactique. Le rendement de liquéfaction est très faible.

Le pH étant régulé à 5,5, pH optimum pour l'acidogenèse des sucres simples (ROY - 1982), la liquéfaction des déchets de betteraves est incomplète et les rendements en AGV sont faibles (tableaux 3 et 4).

En mésophile et en thermophile, le gaz produit ne contient pas de méthane, malgré l'apport d'effluent du filtre de méthanisation.

A pH 5,5 les acides organiques non volatils, lactate en particulier ne sont plus décelés dans les produits d'acidogenèse.

Après réensemencement du réacteur de liquéfaction et en régulant le pH au voisinage de la neutralité, le rendement de liquéfaction est fortement amélioré mais les équivalents alcalins nécessaires au contrôle du pH induisent un pH supérieur à 8,0 et une inhibition de la méthanogenèse dans le réacteur filtre de méthanisation.

Les meilleurs résultats sont obtenus en régulant à 6,5 le pH de liquéfaction. L'hydrolyse est équivalente et l'addition d'agent neutralisant n'induit pas d'inhibition de la méthanisation.

Les essais de liquéfaction à partir d'autres types de déchets, qui font l'objet des résultats suivants sont réalisés en régulant le pH à cet optimum de 6,5.

c - Influence de la température et de la nature des résidus solides sur les performances de liquéfaction à pH 6,5.

A pH 6,5 lorsque le substrat est uniquement dilué par de l'eau, la quantité de soude nécessaire à la régulation du pH (neutralisation des produits d'acidogenèse) est d'environ 2 à 3 mmole NaOH par gramme de matière organique introduite.

Les résultats de liquéfaction mésophile et thermophile sont reportés sur les tableaux 3 et 4.

LIQUEFACTION DES RESIDUS SOLIDES DE CONSERVERIE - BILAN DE CONVERSION
DE LA MATIERE ORGANIQUE INITIALE.

Tableau 5.

POURCENTAGES DU CARBONE ORGANIQUE INITIAL RETROUVE DANS LES PRODUITS.	DECHETS DE CAROTTES		DECHETS DE HARICOTS	
	MESOPHILE 35°C 2 j.T.S.H.	THERMOPHILE 60°C 2 j. T.S.H.	MESOPHILE 35° 2 j. T.S.H.	THERMOPHILE 60° 2 j. T.S.H.
<u>HYDROLYSAT :</u>				
- COMPOSES SOLUBLES	48	61,5	50,5	45,2
- MATIERES EN SUSPENSION (< 0,8 mm)	23,7	16,2	18,3	13,4
<u>GAZ :</u>				
- CO ₂	17,9	22,5	19,5	19,4
- CH ₄	5,3	0,9	6,6	11,8
REFUS AU TAMIS (> 0,8 mm)	1,0	1,0	10 à 15	10 à 15
BILAN CARBONE	95,9	102,1	104,9 - 109,9	99,8 - 104,8

BU
LILLE

* Liquéfaction des déchets de pelage de carottes.

- En mésophile, pour une charge volumique de 12 g M.O/l.j et un temps de séjour de 2 jours, la liquéfaction est complète, la fraction retenue au tamis est négligeable. Les produits d'acidogenèse sont des acides gras volatils de C2 à C6. Le gaz de fermentation est composé de CO₂ et CH₄ (77 et 23 %) et de traces d'hydrogène.

- En thermophile (60°C) et dans les mêmes conditions d'alimentation qu'en mésophile, le rendement d'acidogenèse est augmenté. Les produits d'acidogenèse sont principalement acétate, butyrate et éthanol. Le gaz contient CO₂, H₂ et CH₄ (68, 29 et 3 %). Le pourcentage de méthane augmente de 1 % après l'alimentation jusqu'à 20 % en fin de liquéfaction.

Au cours de ces essais, les déchets ont été introduits sans préchauffage préalable. Compte-tenu du volume important d'alimentation, il en résulte une baisse momentanée de la température dans le fermenteur (chute vers 40°C puis remontée progressive à 60°C en 1 h environ).

La comparaison des bilans de liquéfaction mésophile et thermophile des déchets de carottes, exprimés en pourcentage de conversion du carbone de la matière organique (tableau 5) donne un avantage au procédé thermophile en terme de conversion de la matière organique en intermédiaires de fermentation. De plus, qualitativement, les produits d'acidogenèse thermophile sont plus propices à la méthanogenèse.

* Liquéfaction des déchets de haricots verts.

- En mésophile, pour une charge volumique de 14 g de M.O/l.j et un temps de séjour de 2 jours, la liquéfaction est complète mais des fibres non digestibles sont retenues au tamis. La quantification de cette fraction non digestible est difficile du fait de la décantation des fibres dans le réacteur au moment du prélèvement.

En fonctionnement en mode brassé, ces fibres sont en suspension dans le réacteur.

On estime cette fraction retenue au tamis à environ 10 à 15 % de la matière organique introduite.

L'acétate est le principal produit d'acidogenèse. Le gaz se compose de CO₂ et CH₄ (74 et 26 %) et ne contient pas de traces d'hydrogène.

HYDROLYSE MESOPHILE DE DECHETS DE HARICOTS VERTS. (pH 6,5 ; TSH :2 j. ; C.V.: 14 g M.O./L.j)

EVOLUTION EN BATCH DE LA CONCENTRATION EN A.G.V. DANS LE FERMENTEUR.

Tableau 6.

		ACETATE	PROPIONATE	BUTYRATE	ISOVALERATE	VALERATE	CAPROATE	CARBONE TOTAL DANS LES A.G.V.
CONCENTRATIONS EN LIQUEFACTION CONTINUE.	g/L	9,6	1,5	2,52	0,15	0,80	0,1	
	carbone g/L	3,84	0,75	1,36	0,09	0,47	0,06	6,57
EVOLUTION EN BATCH SANS ALIMENTATION 7 JOURS.	g/L	10,66	1,96	3,29	0,38	0,47	0,05	
	carbone g/L	4,26	0,98	1,78	0,22	0,27	0,03	7,54
POURCENTAGE D'EVOLUTION		+11%	+30%	+30%	+150%	-41%	-50%	+14,8%

L'arrêt de l'alimentation du réacteur dont on suit l'évolution en batch montre que le gain en AGV formé à partir des matières organiques résiduelles est de 15 % après 7 jours (tableau 6).

- En thermophile, et pour un même taux de charge, la proportion de fibres non digestibles est identique.

Les déchets dilués sont préchauffés à 60°C avant leur introduction dans le réacteur de liquéfaction. Le choc de température lors de l'alimentation est supprimé. On constate la disparition de l'hydrogène dans le gaz de fermentation. Celui-ci se compose de CO₂ et CH₄ (62 et 38 %). L'acétate est encore le principal produit d'acidogénèse. Les bilans de liquéfaction (tableau 5) et les produits d'acidogénèse sont identiques aux deux températures. La productivité en méthane du réacteur thermophile est de 1,27 l/l.j contre 0,71 l CH₄/l.j en mésophile.

La diminution de la température, en thermophile, de 60°C à 55°C modifie sensiblement les produits de liquéfaction : la proportion d'acide butyrique est augmentée au détriment de la production d'acétate, malgré une production de méthane accrue.

Cela signifie qu'une partie du méthane est produite par des méthanogènes acétoclastes qui sont alors à leur optimum de température. Pour expliquer leur développement, le temps de séjour hydraulique étant de 2 jours, on doit admettre la fixation et la rétention de ces bactéries sur les fibres non digestibles en suspension dans le réacteur de liquéfaction et dont le temps de séjour moyen est supérieur au temps de séjour hydraulique.

d - Influence du taux de dilution

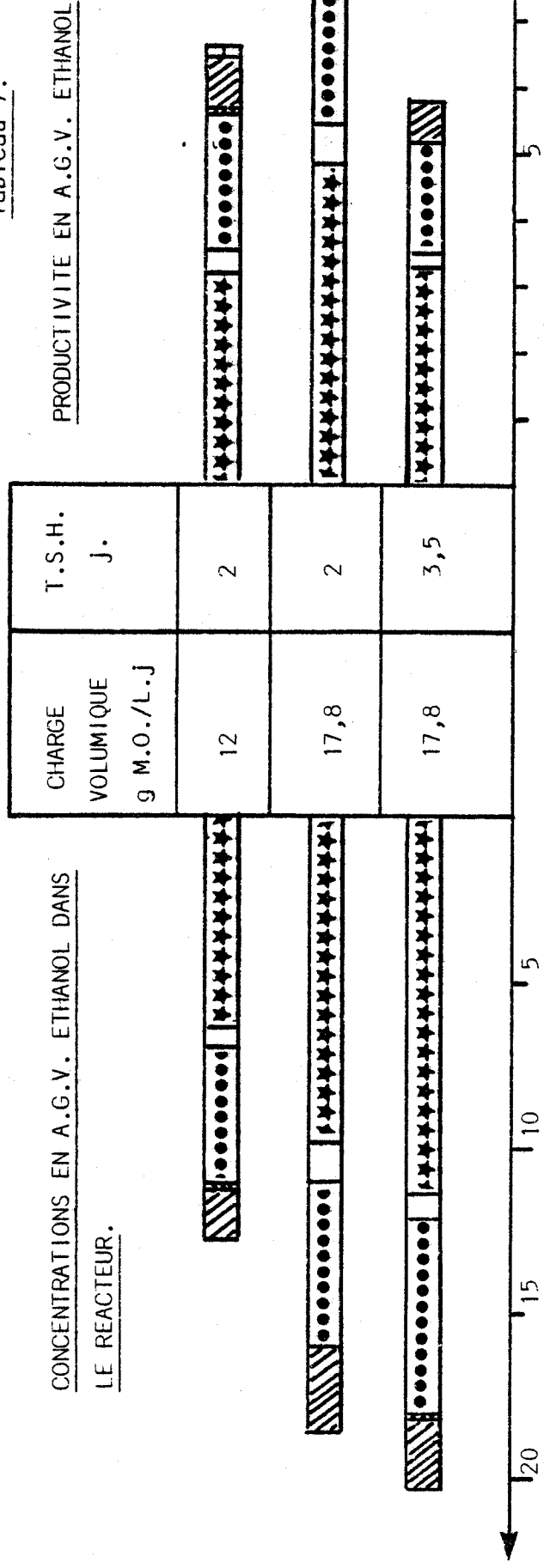
A charge volumique constante, le mode d'alimentation utilisé entraîne une augmentation des concentrations en produits d'acidogénèse dans le réacteur lorsque le taux de dilution est diminué.

En liquéfaction thermophile de déchets de carottes (60°C) et en l'absence de méthanogénèse de réduction (non préchauffage du substrat), pour un temps de séjour de 2 jours, le passage d'une charge volumique de 12 g de matière organique/l.j à une charge de 17,8 de M.O/l.j s'accompagne d'une augmentation de la productivité en AGV du système.



LIQUEFACTION THERMOPHILE : INFLUENCE DU TAUX DE CHARGE ET DU TEMPS DE SEJOUR
HYDRAULIQUE. (hydrolyse thermophile - 60°C ; pH 6,5 ; Pelage de carottes)

Tableau 7.



METHANE ETHANOL ISOVAL. BUTYRATE PROPIONATE ACETATE

L'hydrolysats devient difficile à tamiser (augmentation de la viscosité). Par contre, à charge volumique constante (17,8 g M.O/l.J.) l'augmentation du temps de séjour a un effet très défavorable sur la productivité du réacteur de liquéfaction et sur la conversion acidogène de la matière organique. La concentration en AGV - éthanol dépasse alors 20 g/l dans le fermenteur et des sucres non fermentés s'accumulent dans le milieu (1 g/l de sucres totaux).

Les proportions relatives des intermédiaires de fermentation ne sont pas modifiées (tableau 7).

En liquéfaction mésophile de déchets de haricots, pour une charge volumique de 14 g M.O/l.j, la diminution du taux de dilution, de $0,5j^{-1}$ à $0,25j^{-1}$ induit une concentration totale en AGV dans le digesteur de 27 g/l. La productivité en AGV est légèrement diminuée mais qualitativement, la liquéfaction reste complète et le gaz produit ne contient que CO_2 et CH_4 .

e - Devenir des différentes fractions glucidiques - Numération bactérienne.

La comparaison des fractions glucidiques des déchets bruts de haricots verts et des fibres non digestibles qui s'accumulent dans le réacteur de liquéfaction thermophile (60°C) montrent que ces dernières sont enrichies en "cellulose" et "lignine" et très appauvries en sucres solubles (tableau 8).

Un **dénombrement bactérien** sur la population de ce digesteur donne les résultats suivants :

<u>substrats :</u>	<u>nombre de bactéries par ml/types bactériens</u>
glucose	$11 \cdot 10^9$ fermentatives
xylane	$5 \cdot 10^9$ hemicellulolytiques
amidon	$11 \cdot 10^9$ amylolytiques
cellulose	$11 \cdot 10^{10}$ cellulolytiques
hydrogène	$9 \cdot 10^8$ methanogènes hydrogenophiles

Tableau 8.

COMPOSITIONS COMPAREES DES FRACTIONS SOLIDES AVANT ET APRES
HYDROLYSE (60°C, PH 6,5, 2j T.S.) (Methode de CHESSON)

(en % de la M.S.)	SUCRES SOLUBLES	HEMICELULOSES	CELLULOSE	"LIGNINE"
DECHETS DE HARICOTS	30	42	18,5	9,5
FRACTIONS SOLIDES RETENUES AU TAMIS	5,1	27,6	41,5	25,8

METHANISATION EN FILTRE ANAEROBIE MESOPHILE, DES HYDROLYSATS
MESOPHILE ET THERMOPHILE.

Tableau 9.

SUBSTRAT DE L'ETAPE DE LIQUEFACTION	THERMOPHILE (60°C) PELAGE DE CAROTTES	MESOPHILE (35°C) HARICOTS VERTS
CONCENTRATION DE L'HYDROLYSAT D.C.O. g O ₂ /L.	31,2	32,0
CHARGE VOLUMIQUE g DCO/L.j.	13,6	14,2
T.S.H. j.	2,3	2,25
PRODUCTIVITE EN METHANE L/L.j.	4,5	4,1
RENDEMENT EN METHANE. L/g DCO	0,33	0,29
% CH ₄ DANS LE GAZ	75	83
EFFLUENT:		
M.S.T.	9,95	8,82
M.V.T.	2,83	2,66
g/L. DCO tot.	3,9	3,2
DCO sol.	1,55	1,3
% EPURATION / DCO introduite	87,5	90

BU
LILLE

3 - Méthanisation des produits d'acidogénèse.

Durant deux périodes, les réacteurs de liquéfaction ont été maintenus dans des conditions stables (taux de charge, temps de séjour) afin de produire des hydrolysats de composition relativement constante pour l'alimentation de réacteurs filtres anaérobies mésophiles.

Ces deux périodes correspondent aux caractéristiques suivantes de l'étape de liquéfaction.

-1-

Thermophile 60°C

Pelage de carottes

Charge volumique : 12 g M.O./l.j

T.S.H. : 2 j

-2-

Mésophile 35°C

Eboutage de haricots

C.V. : 14 g M.O./l.j

T.S.H. : 2 j

Les compositions en AGV des hydrolysats respectifs sont données dans la partie précédente.

Etant donné le caractère volatil de certains des composés d'acidogénèse, les valeurs de taux de charge des filtres sont exprimées par rapport à la D.C.O.

Les concentrations moyennes en D.C.O. des deux hydrolysats sont les suivantes :

	D.C.O. totale g O ₂ /l	D.C.O. soluble g O ₂ /l
Thermophile carottes	31,2	24,7
Mésophile haricots	32,4	23,8

a - Mode de conduite du filtre

La production de gaz et la dégradation des composés fermentaires sont optimisées par l'adoption d'une recirculation réduite séquentielle du surnageant. Durant les périodes d'alimentation (durée 3 H 30) la recirculation est arrêtée, le réacteur fonctionne en mode piston.

L'alimentation est interrompue ensuite durant 30 minutes et pendant les 15 dernières minutes, la recirculation fonctionne pour homogénéiser le contenu du fermenteur et éviter la création de chemins préférentiels. Le taux de recirculation est d'environ 4 volumes de réacteur par 24 heures.

Par ce mode de recirculation, un effet lit de boue est favorisé et se superpose à l'effet film fixé.

b - Méthanisation de l'hydrolysats thermophile.

Les résultats de méthanisation en filtre de l'hydrolysats thermophile obtenu à partir des déchets de carottes ont fait l'objet d'une présentation (VERRIER - 1983) dont l'article d'accompagnement est inclus en annexe à ce mémoire.

Nous en rappellerons seulement les principales performances.

Une productivité maximale en méthane proche de 7 l CH₄/l.j est obtenue pour une charge volumique de 35 à 40 g DCO/l.j.

Le temps de séjour hydraulique est alors de 20 heures.

Pour une charge volumique moyenne de 13,6 g DCO/l.j, les aspects productivité en méthane (4,5 l CH₄/l.j) et rendement d'épuration (87,5 % d'élimination de la DCO totale introduite) sont équilibrés (tableau 9). Ce niveau de charge optimise la productivité du procédé en deux phases.

c - Méthanisation de l'hydrolysats mésophile.

La méthanisation en filtre de l'hydrolysats de déchets de haricots verts aboutit à des performances très voisines de celles obtenues avec l'hydrolysats thermophile. Pour une charge volumique de 14,2 g DCO/l.j, la productivité en méthane du filtre est de 4,1 l/l.j.

Le pourcentage d'élimination de la DCO totale introduite est de 90 %.

Les résultats de méthanisation en filtre mésophile sont résumés sur le tableau 9.

Rappelons qu'à des taux de charge voisins de 14 g DCO/l.j, la méthanisation dans le filtre est très stable à partir des deux substrats, la charge volumique maximale pouvant dépasser 30 g DCO/l.j.

PERFORMANCES COMPAREES DES PROCEDES DE METHANISATION DE DECHETS SOLIDES DE LEGUMES. Tableau 10.

SYSTEME	MONOETAPE MESOPHILE	MONOETAPE THERMOPHILE	DEUX ETAPES THERMO/MESO.	DEUX ETAPES MESO./MESO.	
SUBSTRAT	CAROTTES	CAROTTES	CAROTTES	HARICOTS	
CARACTERISTIQUES. RAPPORT VOLUMES	BRASSE 35°C	BRASSE 55°C	BRASSE 60°C + FILTRE 35° 47%/53%	BRASSE 35°C + FILTRE 35°C 51%/49%	
T.S.H. jours.	23	13	1: 2 2: 2,3	1: 2 2: 2,25	
C.V. ETAPE 1 g M.O./L.j.			12	14	
CHARGE VOL. PROCEDE g M.O./L.j.	3,6 (limite 4,4)	6,25	5,65	7,36	
CH ₄ ETAPE 1 L/L.j.			0,08	0,71	
PRODUCTIVITE EN CH ₄ L/L.j. PROCEDE.	1,35	2,27	2,39 ⁽¹⁾	2,0 ⁽¹⁾	2,39
% CH ₄ DANS LE BIOGAZ	48	49	75	83	60
RENDEMENT L CH ₄ /g M.O. INTRODUITE	0,37	0,36	0,42		0,325
% EPURATION / M.O. intro.	87	83	96	95,4 ⁽²⁾	

(1) CH₄ produit dans le filtre

(2) sans comptabiliser les fibres non digestibles éliminées entre les deux étapes.

4 - Méthanisation en deux étapes - comparaison des procédés.

La productivité du procédé deux étapes est maximale pour une productivité du filtre comprise entre 4 et 5 l CH₄/l.j (VERRIER - 1983) - annexe 2.

Les bilans de méthanisation par le procédé 2 phases, présentés sur le tableau 10 sont calculés en ajustant les valeurs de liquéfaction et de méthanisation pour tenir compte des volumes respectifs des deux réacteurs dans le système couplé optimal.

Le système deux étapes correctement dimensionné comporte alors deux fermenteurs de volumes utiles presque équivalents.

Le **taux d'épuration** du procédé deux étapes est calculé en considérant un recyclage de l'effluent épuré du filtre pour la dilution et la neutralisation de la première étape : le volume d'effluent évacué du système est alors égal au volume des déchets solides introduits.

Dans le cas des déchets de carottes, le calcul est correct.

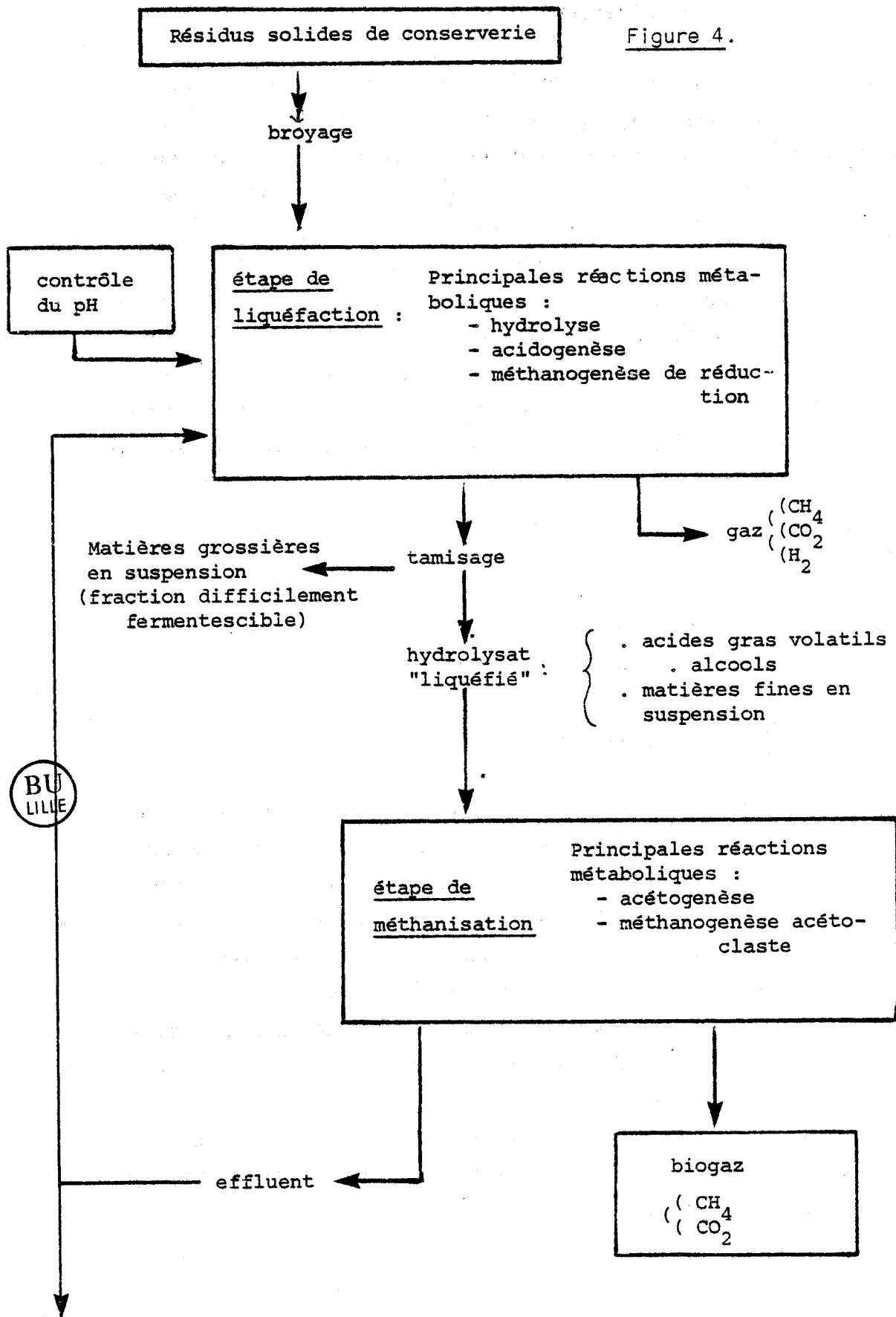
Par contre, dans le cas des déchets de haricots, ce calcul ne fait pas intervenir les fractions non digestibles qui ont été éliminées entre les deux étapes.

Ce dernier point explique le plus faible rendement de conversion de la matière organique en méthane des déchets de haricots par rapport au rendement obtenu pour les résidus de carottes (0,325 l CH₄/g M.O et 0,42 l CH₄/g M.O respectivement).

Le système en deux étapes présente, par rapport au procédé classique monoétape, des performances de productivité en méthane et d'utilisation du substrat très intéressantes (tableau 10).

En particulier, le procédé deux phases mésophile, à partir de déchets de haricots verts, est capable de performances supérieures au procédé monoétape thermophile de méthanisation des déchets de carottes, bien que ce dernier substrat contienne moins de fractions non digestibles. De plus, dans cette comparaison, les deux réacteurs du procédé avec séparation des phases ne sont pas à leurs taux de charge maximal, contrairement aux fermenteurs monoétapes.

Figure 4.



IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

1 - Fermenteurs monocétapes.

Aux deux températures, les possibilités de méthanisation des déchets de carottes sont limitées par l'accumulation de propionate. L'apparition du propionate coïncide avec la détection de traces d'hydrogène dans le gaz de fermentation juste après la charge (alimentation en semi continu). La pression partielle d'hydrogène serait alors trop élevée pour que la voie d'acétogénèse, à partir du propionate, soit thermodynamiquement possible d'où une limitation de la croissance et de l'activité des bactéries acétogènes.

L'apparition de propionate pour une charge volumique plus élevée en thermophile peut s'expliquer, soit comme cela a déjà été observé, par une synthèse plus faible de propionate par les populations acidogènes thermophiles, soit par une activité supérieure des méthanogènes hydrogenophiles thermophiles qui, par leur action sur la pression partielle d'hydrogène, favorisent les voies d'acétogénèse.

L'alimentation en continu des fermenteurs brassés éviterait le déséquilibre transitoire de la méthanisation et les taux de charge devraient pouvoir être sensiblement augmentés.

2 - Etape de liquéfaction.

Le terme d'hydrolyse, qui désigne la part de la matière organique solubilisée après liquéfaction est employé dans ces travaux dans un sens plus technologique. Elle est mesurée par la fraction ayant percolée au tamis de maillage 0,8 mm. Cet hydrolysate qui contient 15 à 20 % de fines matières en suspension, peut transiter sans risque de colmatage dans le réacteur de méthanisation (figure 4).

En opposition avec les résultats d'acidogénèse de sucres simples (ZOETEMEYER, VAN DEN HEUVEL - 1982), l'acidogénèse à partir des substrats polymérisés est très limitée à pH 5,5.

La régulation du pH à 6,5 apparaît être un bon compromis entre l'efficacité de l'hydrolyse, l'économie d'agent neutralisant et un faible développement des méthanogènes acétoclastes.

Le pH étant régulé à 6,5, les variations observées dans les produits d'acidogenèse et les rendements de liquéfaction peuvent être discutés en fonction du développement et de l'activité des bactéries méthanogènes hydrogenophiles dans les réacteurs d'hydrolyse, comme nous l'avions noté dans l'étude bibliographique.

Comme cela est observé en réacteur monoétape mésophile, une pression partielle d'hydrogène faible mais non négligeable limite la liquéfaction mésophile des résidus de carottes et les produits d'acidogenèse contiennent une proportion importante d'acides gras volatils à nombre impair de carbones, composés limitants pour l'étape de méthanogenèse.

Dans le cas de la liquéfaction des résidus de carottes, l'avantage du traitement thermophile est net malgré un faible développement de la méthanogenèse de réduction. La liquéfaction thermophile semble alors favorisée par une moindre sensibilité des bactéries hydrolytiques et fermentatives vis-à-vis de la pression partielle d'hydrogène, et de plus, les coenzymes réduits sont régénérés par formation de butyrate et d'éthanol plutôt que par formation de propionate. Cependant, cette P_{H_2} élevée limite sévèrement le rendement de liquéfaction lorsque les AGV totaux s'accumulent au-delà d'une concentration de 20 g/l dans le digesteur.

Par contre, l'avantage de la température disparaît lorsque la méthanogenèse hydrogenophile prend un développement significatif et fait chuter la pression partielle d'hydrogène dans les réacteurs de liquéfaction. Cette P_{H_2} très faible est obtenue lorsque l'hydrolyse des déchets végétaux produit des fibres non digestibles qui sont en suspension dans le milieu.

Il semble que ces fibres puissent servir de support aux bactéries méthanogènes dont la croissance est alors favorisée. Les productivités en acides et les produits d'acidogenèse sont alors très voisins en mésophile et en thermophile, et en particulier, la concentration en acides totaux dans le réacteur mésophile peut être augmentée jusqu'à 27 g/l sans limitation significative du rendement d'hydrolyse.

La présence de ces supports permet également le maintien de bactéries acétoclastes. A 60°C, ces bactéries ne sont pas à leur température optimale, mais lorsque la température est abaissée à 55°C, une partie de l'acétate est convertie en méthane, les phases sont mal séparées en terme d'acétoclastie. Par contre, à cette température, les

hydrogenophiles sont moins actives et les réactions d'acétogenèse sont partiellement inhibées : la proportion du butyrate augmente significativement dans les produits d'acidogenèse à 55°C. En mésophile, le développement plus lent des acétoclastes évite leur développement dans le réacteur de liquéfaction, malgré la présence de ces fibres. Le recyclage de l'effluent du filtre dans le réacteur de liquéfaction a un intérêt pour la réintroduction en première étape des agents neutralisants et donc une moindre consommation globale de ces produits. Mais outre cet avantage, le recyclage de l'effluent semble avoir un effet favorable sur la liquéfaction qui pourrait être lié au réensemencement en méthanigènes hydrogèneophiles ou à un apport de facteur de croissance pour les bactéries fermentatives.

3 - Méthanogenèse.

L'alimentation d'un réacteur filtre anaérobie mésophile par un substrat essentiellement soluble et dont la composition est stable, permet d'adapter la flore du fermenteur qui se spécialise dans les réactions d'acétogenèse et d'acétoclastie.

Les résultats obtenus sont très comparables à la méthanisation sur filtre de lisier de porc liquéfié (COLLERAN - 1982) ou de jus d'ensilage (BARRY - 1984).

Avec le type de support à fort coefficient de vide utilisé, les performances d'épuration et de productivité en méthane sont optimisées par le fonctionnement en flux ascendant avec un taux de recirculation réduit.

4 - Procédés avec séparation des phases.

La régulation du pH dans la première étape est un point essentiel du procédé. La neutralisation par l'effluent recyclé du filtre doit être complétée par contrôle du pH et addition d'agent neutralisant si nécessaire.

La séparation des phases ne s'entend pas en terme de production de méthane. Au contraire, la production de méthane de réduction en 1ère étape doit être favorisée pour améliorer les réactions d'hydrolyse et d'acétogenèse.

Dans ce sens, la présence dans le réacteur L.A de matières inertes en suspension qui constituent un support pour les méthanogènes hydrogèneophiles, a un effet très positif sur la liquéfaction mésophile en particulier et l'introduction de tels supports (paille broyée par exemple) ou le mélange avec des déchets de légumes fibreux lors de la liquéfaction mésophile de déchets très pauvres en fibres (carottes) pourrait améliorer le rendement global d'hydrolyse.

De plus, dans le système étudié, le choix de l'absence de couplage entre les deux cuves, qui nous a permis d'étudier séparément les deux étapes, constitue une limitation du procédé par augmentation de la concentration totale en acides dans l'étape de liquéfaction.

Le système avec séparation des phases pourrait être optimisé par le couplage des deux réacteurs avec élimination en continu des acides gras volatils en lère étape, vers le réacteur de méthanisation.

5 - Comparaison des procédés - conclusion.

La méthanisation des déchets solides a été étudiée en utilisant les systèmes monoétapes et avec séparation des phases.

Les avantages et inconvénients des deux types de procédés sont les suivants :

* Monoétape

- simplicité du procédé
- mauvaise tenue à la surcharge : accumulation de propionate.

* Séparation des phases

- système complexe nécessitant une neutralisation en lère étape.
- procédé très stable pouvant tolérer des pointes de surcharges élevées.
- rendement de conversion plus élevé de la matière organique.

Au laboratoire, et sans tenir compte des bilans thermiques, les procédés monoétape thermophile et avec séparation des phases sont les plus performants et sont comparables en terme de productivité en méthane et de charge admissible.

Pour envisager une application au stade industriel, le procédé monoétape mésophile paraît peu performant et les procédés incluant un réacteur thermophile pour la méthanisation de déchets froids (à température ambiante) ne sont pas compatibles avec le gain d'énergie nécessaire à la rentabilité du procédé.

Par contre, le procédé incluant deux étapes mésophiles pourrait s'intégrer dans une installation industrielle où le réacteur de liquéfaction, chauffé par les calories "bas niveau" disponibles, viendrait se coupler à un filtre anaérobie traitant les effluents liquides de l'usine.

Les conclusions de cette étude sont extrapolables aux résidus organiques solides dont l'étape d'hydrolyse n'est pas limitante par rapport à l'étape de méthanogenèse acétoclaste.

Par contre, ces résultats ne peuvent pas être utilisés pour discuter du traitement par méthanisation avec séparation des phases de déchets solides dont la teneur en matière organique difficilement fermentescible est élevée (résidus lignocellulosiques).

B - METHANISATION DES LIPIDES ET ACIDES GRAS

INTRODUCTION

Cette étude débute par un essai de faisabilité de méthanisation en continu d'un effluent industriel très chargé en matières grasses d'origine animale. L'étude pilote est réalisée en mésophile et en thermophile.

Les numérations bactériennes qui sont faites sur les populations enrichies aux deux températures, permettent d'évaluer l'importance, dans ces digesteurs, des souches acétogènes syntrophes dégradant les acides gras à longues chaînes.

Les phénomènes d'inhibition liés à la présence de ces acides, et les possibilités de détoxifier le milieu sont étudiées sur des cultures enrichies réalisant l'acétogénèse à partir des A.G.L.C.

De ces cultures d'enrichissement, nous avons isolé une souche acétogène dégradant l'acide oléique en association syntrophe avec une souche hydrogèneophile.

I - Méthanisation d'un effluent industriel chargé en matières grasses.

L'effluent provient d'une usine produisant des andouillettes selon un procédé traditionnel, à partir d'estomacs et d'intestins de porcs. Lors de la fabrication, deux tiers des matières premières sont évacuées sous forme de rejets dont la charge polluante est exclusivement protéique et lipidique. Les matières grasses représentent environ 60 % des matières organiques éliminées et non valorisées.

Cette concentration élevée en lipides constitue l'originalité du traitement anaérobie de cet effluent. Le rendement d'épuration est en effet conditionné par la résolution de problèmes technologiques, liés aux propriétés physicochimiques des lipides et microbiologiques, liés à la toxicité des acides gras à longues chaînes sur la croissance bactérienne et à la méconnaissance du métabolisme des bactéries dégradant ces mêmes acides en anaérobiose.

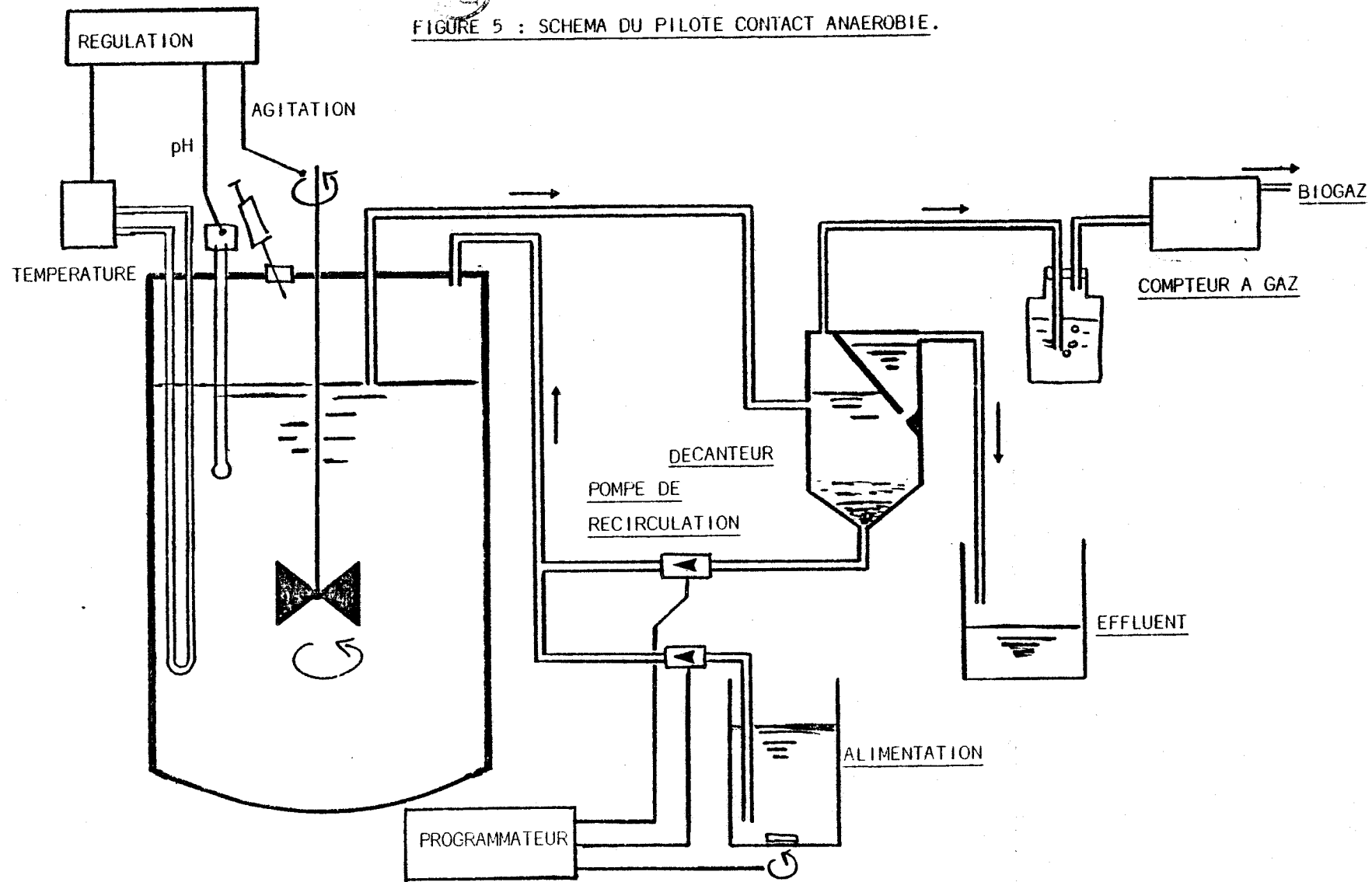


FIGURE 5 : SCHEMA DU PILOTE CONTACT ANAEROBIE.

1 - Caractérisation de l'effluent.

Dans l'usine, les points de rejets les plus polluants ont été échantillonnés et mélangés en fonction de leurs volumes respectifs afin de constituer un effluent standard type pour l'étude en pilote de laboratoire.

Dans la suite, l'appellation "effluent AT" désigne ce mélange de jus de cuisson d'andouillettes.

* Composition de l'effluent

- Matières sèches totales : 45,7 g/l
- Matières organiques totales : 31,9 g/l
- Matières minérales : 13,8 g/l
 - dont sodium 6,4 g/l
- Demande chimique en oxygène : 66 000 mg O₂ /l
- Azote total Kjeldahl : 2,26 g/l
- Azote ammoniacal : 0,3 g/l
- Matières grasses totales : 18,2 g/l
- Acides gras à longues chaînes : (qualitatif) myristique, palmitique, stéarique, oléique.

Au cours du stockage à 4°C, le pH de l'effluent se stabilise à 6,2. Les acides volatils formés représentent moins de 5 % du carbone initial de la matière organique et l'ammonification des protéines est très limitée. L'effluent ne contient pas d'acide lactique. Les rejets sont stabilisés par une inhibition de l'activité biologique qui peut être attribuée à la libération d'acides gras libres au cours d'une étape d'hydrolyse partielle des triglycérides.

En absence d'agitation, les matières grasses de l'effluent forment une phase en partie supérieure du liquide. A température ambiante, et dans un bac muni d'une agitation mécanique, l'effluent a l'aspect d'une émulsion homogène.

2 - Dispositif expérimental.

La méthanisation en continu de l'effluent "AT" est réalisée dans deux types de digesteurs :

- réacteur filtre anaérobie mésophile de 2,5 l de volume utile, alimenté en flux ascendant. Le support est constitué d'anneaux de PVC.

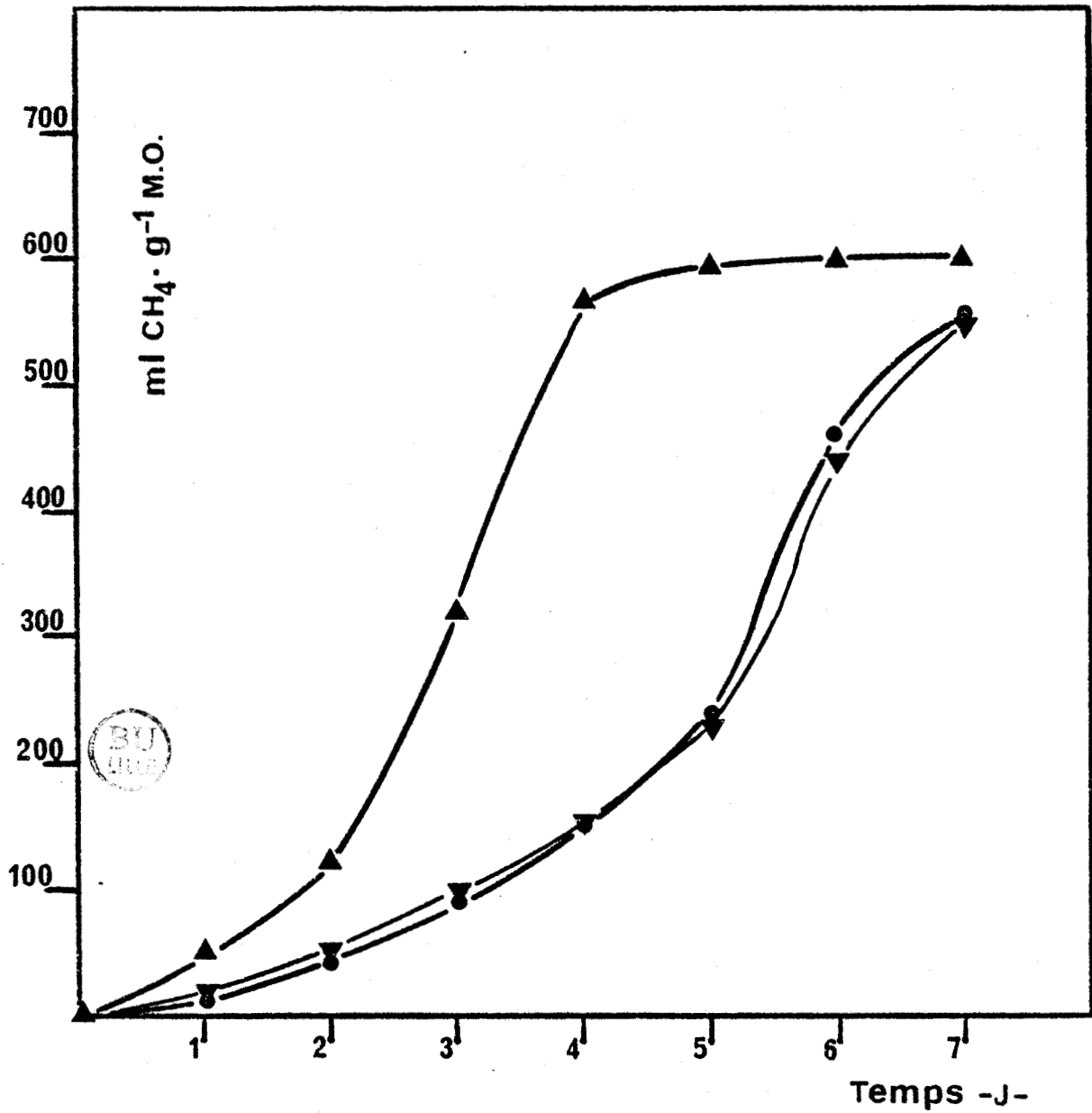


FIGURE 6 : Influence de l'addition de calcium sur la méthanisation en batch des jus de cuisson. (4 g de matière organique/L.)

(▼) Témoin sans calcium. (●) 20 mM Ca(OH)₂. (▲) 20 mM CaCl₂.

- réacteurs en mélange complet : la fermentation s'opère en réacteurs brassés de 7 l de volume total et de 5,5 l de volume utile (Setric génie industriel). La séparation gaz - effluent est réalisée dans un décanteur externe. Les pilotes peuvent être conduits en mode conventionnel ou en mode contact : dans ce cas, les boues décantées sont recyclées dans le digesteur (figure 5).

Les deux réacteurs sont chauffés à 35°C (mésophile) et à 55°C (thermophile). Les inocula sont des boues de digesteurs de laboratoire, mésophile et thermophile, sur résidus solides de légumes.

- Les fermentations en discontinu sont réalisées en flacons bouchés de 125 ml de volume total et qui contiennent 50 ml d'inoculum. Le pH est ajusté à 7,2 avant l'incubation.

3 - Résultats de méthanisation.

Dans l'étude bibliographique, nous avons vu l'influence du calcium en tant que détoxifiant des milieux contenant des acides gras à longues chaînes. En préliminaire à l'étude, nous étudions l'influence du calcium sur la dégradation anaérobie en batch des jus de cuisson.

a - Méthanisation en discontinu de l'effluent AT.

* Potentialité de rendement en méthane.

En présence de 15 mM de chlorure de calcium, la méthanisation en discontinu des jus de cuisson est obtenue à partir d'inocula non adaptés. Le rendement en méthane est de 650 ml par gramme de matière organique introduite, il est identique aux deux températures (moyennes de 3 répétitions en mésophile et en thermophile). La méthanisation en batch est achevée en 8 jours à 55°C et en 14 jours à 35°C.

* Influence du calcium.

Le calcium apportée sous forme d'un sel soluble (CaCl_2) lors de la dégradation en batch des jus de cuisson par un inoculum non adapté, augmente significativement la vitesse de production de méthane. Le temps de latence est diminué (figure 6).

Dans les mêmes conditions, l'apport de calcium sous forme de chaux ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) n'influe pas sur la vitesse de production de méthane par rapport au témoin sans calcium.

Tableau 11.

PHASES DE DEMARRAGE DE LA METHANISATION DES JUS DE CUISSON D'ANDOUILLETES EN REACTEUR
CONTACT THERMOPHILE (55°C)



	(1)	(2)	(3)	(4)
CONDITIONS D'ENSEMENCEMENT DU REACTEUR	BOUES THERMOPHILES 100%	BOUES THERMOPHILES 100% CaCl ₂ 20 mM.	BOUES THERMOPHILES 50% CaCl ₂ 20 mM	SANS REENSEMENCEMENT APRES L'ETAPE 3
CONCENTRATION EN DCO DE L' ALIMENTATION mg O ₂ /L.	66000	66000	66000	33000 (DILUTION 1/2)
APPORT DANS L'ALIMENTATION	0	0	CaCl ₂ 20 mM	CaCl ₂ 10 mM
OBSERVATIONS	ARRET DE LA PRODUCTION DE GAZ APRES UNE PERIODE EGALE A 1/2 TEMPS DE SEJOUR HYDRAULIQUE.	METHANISATION PUIS AUGMENTATION DES A.G.V. RESIDUELS. ARRET DE PRODUCTION DE GAZ APRES UNE PERIODE EGALE A 2 OU 3 T.S.H.	METHANISATION MAIS MAINTIEN D'UNE CC. ELEEVE EN A.G.V. RESIDUELS. IMPOSSIBILITE D' AUGMENTER LE TAUX DE CHARGE.	METHANISATION STABLE, TESTEE EN CONTINU SUR UNE PERIODE EGALE A 6 OU 7 T.S.H.

L'apport de chlorure de calcium améliore, en fermentation discontinue, la méthanisation d'un effluent riche en matières grasses.

Les expérimentations suivantes doivent montrer si l'apport de calcium est nécessaire dans un système alimenté en continu et dans lequel la concentration résiduelle en substrat est théoriquement très faible.

b - Méthanisation en continu des jus de cuisson.

b-1 Méthanisation en réacteur filtre anaérobie mésophile.

Dès le début de l'alimentation du digesteur par l'effluent "AT", on constate un envahissement du support par des mousses difficiles à réduire, ce qui entraîne une perte importante de volume utile et le colmatage des tuyaux. L'essai n'est pas poursuivi.

Par la suite, la méthanisation est conduite en réacteurs brassés afin d'améliorer l'homogénéisation du milieu et de diminuer la production de mousses.

b-2 Méthanisation en réacteur contact thermophile.

Le réacteur est thermostaté à 55°C et fonctionne en mode contact. Les différents essais de démarrage de la fermentation dans le but d'obtenir un équilibre de la méthanisation en continu des jus de cuisson sont résumés sur le tableau 11.

Finalement, la fermentation en continu est obtenue moyennant la dilution au 1/2 de l'effluent et la complémentation en continu par le chlorure de calcium (10 mM final). La teneur en matière sèche de l'alimentation est alors de 23 g/l et la concentration en DCO totale de 33 000 mg O₂ /l.

La méthanisation en continu des jus de cuisson se heurte à deux limitations :

- la présence d'acides gras à longues chaînes dans le milieu dont l'effet toxique ne disparaît pas par fermentation en continu.

La concentration en acides gras libres dans le digesteur est ramenée à une valeur très faible par addition de CaCl₂.

- la teneur en sodium qui est trop élevée, tout au moins pour la phase de démarrage du pilote, et doit être ramené par dilution à une valeur non inhibitrice pour une population bactérienne non adaptée.

Tableau 12.

RESULTATS DE METHANISATION DES JUS DE CUISSON EN REACTEUR

CONTACT THERMOPHILE - 55°C -

(effluent dilué au 1/2 - DCO : 33000 mg O₂/L.)

ADDITION	10 mM CaCl ₂ dans l'alimentation	15 mM CaCl ₂ dans l'alimentation
CHARGE VOL. g M.O./L.J.	2,2	2,0
TEMPS DE SEJOUR HYDRAULIQUE -j-	7,3	8,0
PRODUCTIVITE EN METHANE. L/L.J.	1,25	1,2
% CH ₄ dans le biogaz.	70,5	71,5
EFFLUENT :		
DCO g O ₂ /L.	1,72	2,03
MST g/L.	9,8	9,0
MOT g/L.	2,2	2,4
MMT g/L.	7,6	6,6
ACETATE g/L.	0,2	0,17
PROPIONATE g/L.	0,37	0,4
% EPURATION / M.O. INTRODUITE.	86,2	85,0
% EPURATION / DCO INTRODUITE.	94,8	93,8



METHANISATION THERMOPHILE, FONCTIONNEMENT EN REACTEUR BRASSE.

EVOLUTION DU CONTENU DU DECANTEUR.

Tableau 13.

	MATIERE SECHE TOTALE g/L.	MATIERE ORGANIQUE TOTALE g/L.	CENDRES g/L.
ALIMENTATION	22,2	15,4	6,8
PRELEVEMENT DANS LE DIGESTEUR	10,5	3,7	6,9
PRELEVEMENT DANS LE DECANTEUR	30,6	15,5	14,6
EFFLUENT APRES DECANTEUR	8,9	2,4	6,6

* Performances de méthanisation en continu.

Après dilution de l'effluent brut et une complémentation continue en chlorure de calcium (10 mM) dans l'alimentation, la charge appliquée au réacteur contact a été augmentée pour atteindre 2,6 g M.O./l.j..

Cependant, au-delà d'une charge volumique de 2,1 g M.O./l.j.

(4,3 g DCO /l.j), la concentration en acétate résiduel augmente dans l'effluent du digesteur.

Les résultats de méthanisation en continu des jus de cuisson sont reportés sur le tableau 12. L'augmentation de la concentration en CaCl_2 au-delà de 10 mM dans l'alimentation n'a pas d'influence sur les performances d'épuration.

* Influence de la conduite en mode contact.

Le pilote étant à un taux de charge de 2 g M.O./l.j., la recirculation entre le décanteur et la cuve de fermentation est arrêtée. Le décanteur est nettoyé et rempli d'eau. Après 10 jours de fonctionnement en mode brassé, le contenu du décanteur est échantillonné. Les analyses comparatives de l'alimentation, du contenu du digesteur, du contenu du décanteur et de l'effluent du pilote (tableau 13) mettent en évidence une bonne décantabilité des boues. L'effluent est significativement moins chargé que le contenu du digesteur. De plus, les boues décantées sont fortement minéralisées, vraisemblablement par précipitation du calcium sous forme minérale ou liée à la matière organique.

La réintroduction des boues décantées (retour en mode contact) a pour effet une amélioration des capacités d'épuration du fermenteur.

La concentration en acétate résiduel passe de 0,4 g/l à 0,18 g/l.

En plus des bactéries, une partie du calcium est également recyclée dans le fermenteur.

* Activité spécifique de dégradation de l'acétate par la flore adaptée à 55°C.

Les boues sélectionnées par la méthanisation continue thermophile servent d'inoculum pour la dégradation en discontinu d'acétate (sel de sodium) et de jus de cuisson.

Les vitesses de dégradation de l'acétate sont égales lorsque l'acétate est ajouté seul ou en présence d'effluent "AT" et de 20 mM CaCl_2 : 11,5 mg d'acétate dégradé par g de M.V.E.S. et par heure.

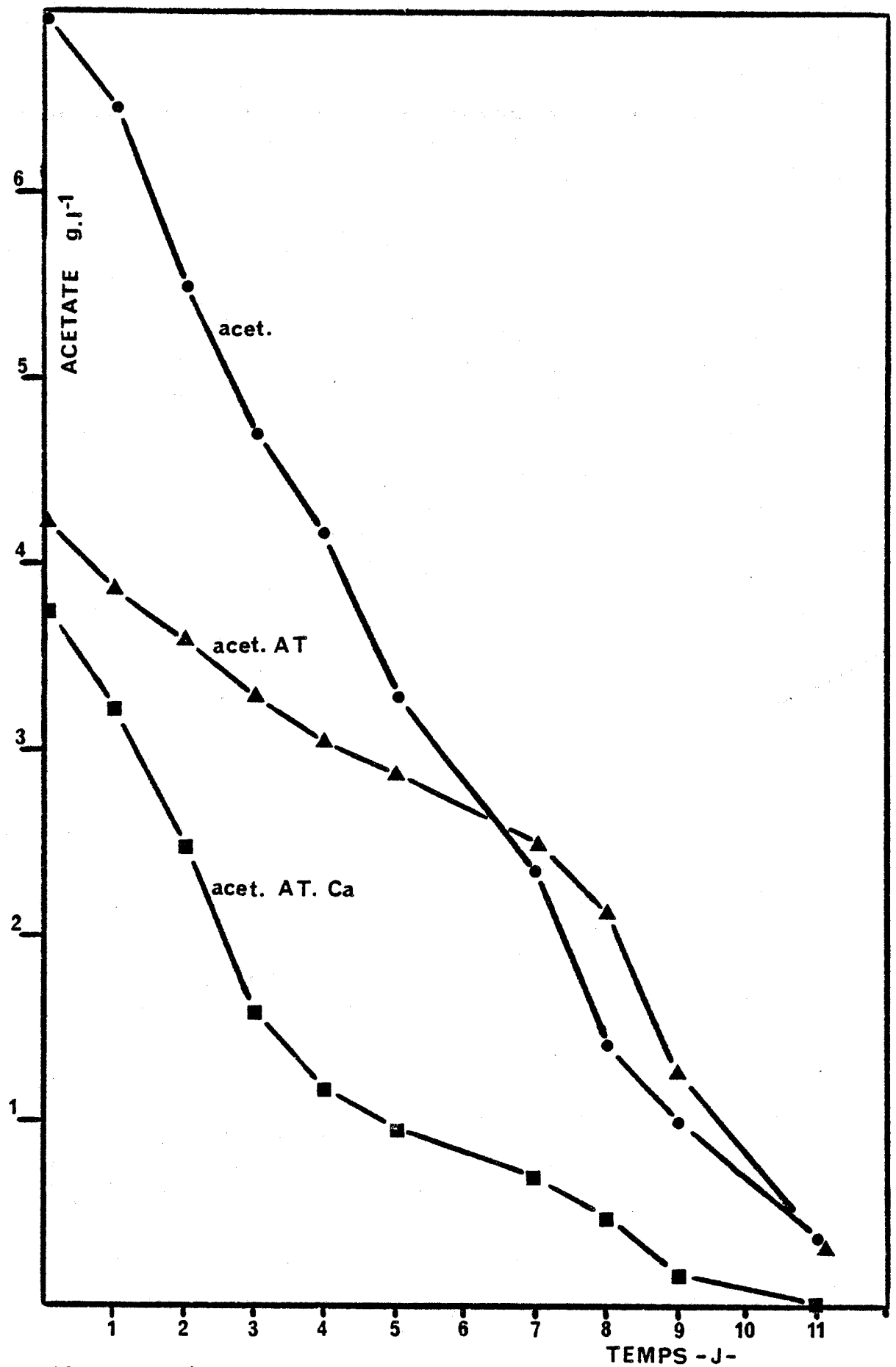


FIGURE 7 : Dégradation d'acide acétique à 55°C par la population adaptée sur jus de cuisson. (●) Acétate 6 g/L. (▲) Acétate 3 g/L.; "AT" 2 g M.O./L. (■) Acétate 3 g/L.; "AT" 2 g M.O./L.; CaCl₂ 20 mM.

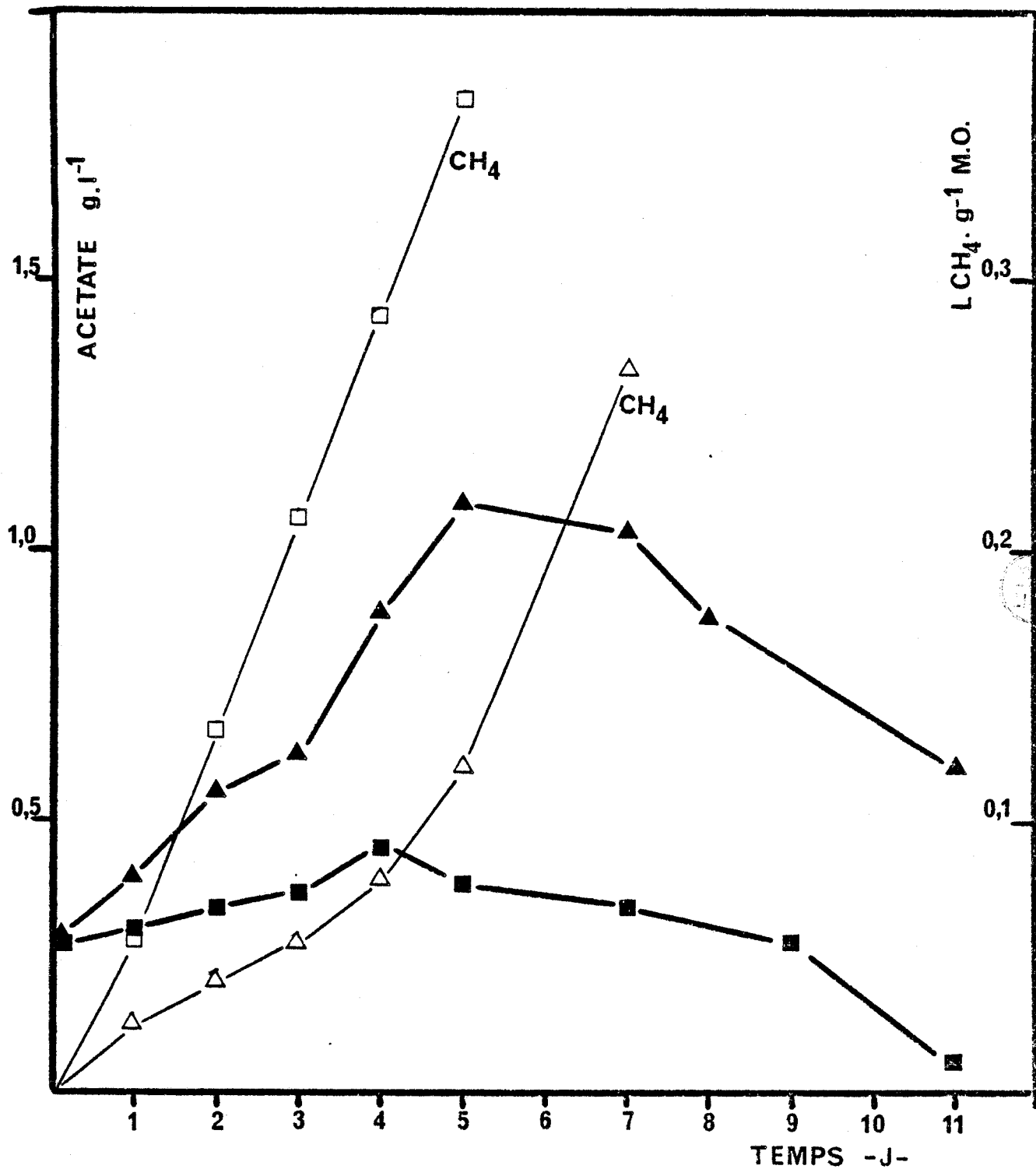


FIGURE 8 : Méthanisation en discontinu des jus de cuisson par un inoculum adapté à 55°C. (4 g de matière organique /L.)

(■-Acétate ; □CH₄): 20 mM CaCl₂. (▲-Acétate ; △CH₄): sans calcium.

Par contre, cette vitesse est seulement de 4,7 mg par g de M.V.E.S. et par heure lorsque le calcium n'est pas ajouté en plus des jus de cuisson (figure 7).

De même, les cinétiques de dégradation en batch des jus de cuisson par les boues thermophiles montrent que, sans apport supplémentaire de calcium, on observe une forte accumulation transitoire d'acétate et une phase de latence avant la production de méthane.

En présence de CaCl_2 20mM, l'acétate est utilisé au fur et à mesure de sa production, sans phase de latence (figure 8).

En thermophile et en fermentation continue, un apport de 10 mM de CaCl_2 dans l'alimentation du réacteur est suffisant pour déttoxifier le milieu. Par contre, en discontinu, ce taux de calcium est insuffisant et la méthanogenèse acétoclaste est partiellement inhibée en présence de 2 g/l de matière organique provenant des jus de cuisson.

* Modification de l'équilibre fermentaire par arrêt de la complémentation en calcium.

Le réacteur étant équilibré pour une charge volumique de 2,0 g M.O./l.j. avec addition de 15 mM CaCl_2 dans l'alimentation, l'apport de calcium est interrompu. Le premier déséquilibre apparent est l'augmentation de la concentration résiduelle en acétate. La production de gaz, la teneur en méthane et le pH n'évoluent pas. Après une période équivalente à 5 temps de séjour (temps de séjour hydraulique de 8 jours), le contenu du fermenteur prend un aspect laiteux. La productivité en méthane décroît alors graduellement mais le pourcentage de méthane dans le biogaz reste élevé (69,5 %) et le pH est de 6,9. Dans les AGV résiduels, à l'acétate et au propionate s'ajoutent l'isobutyrate, le butyrate, l'isovalérate, le valérate, l'isocaproate, le caproate.

70 jours après l'arrêt de la complémentation en calcium, la production de méthane s'annule. Les concentrations en acides gras volatils se stabilisent à des valeurs élevées : acétate 2,5 g/l, propionate 0,65 g/l, butyrate 0,20 g/l, isovalérate 0,3 g/l, mais toute la matière organique introduite n'est pas dégradée malgré un pH compatible avec l'activité des bactéries acidogènes (pH 6,9).

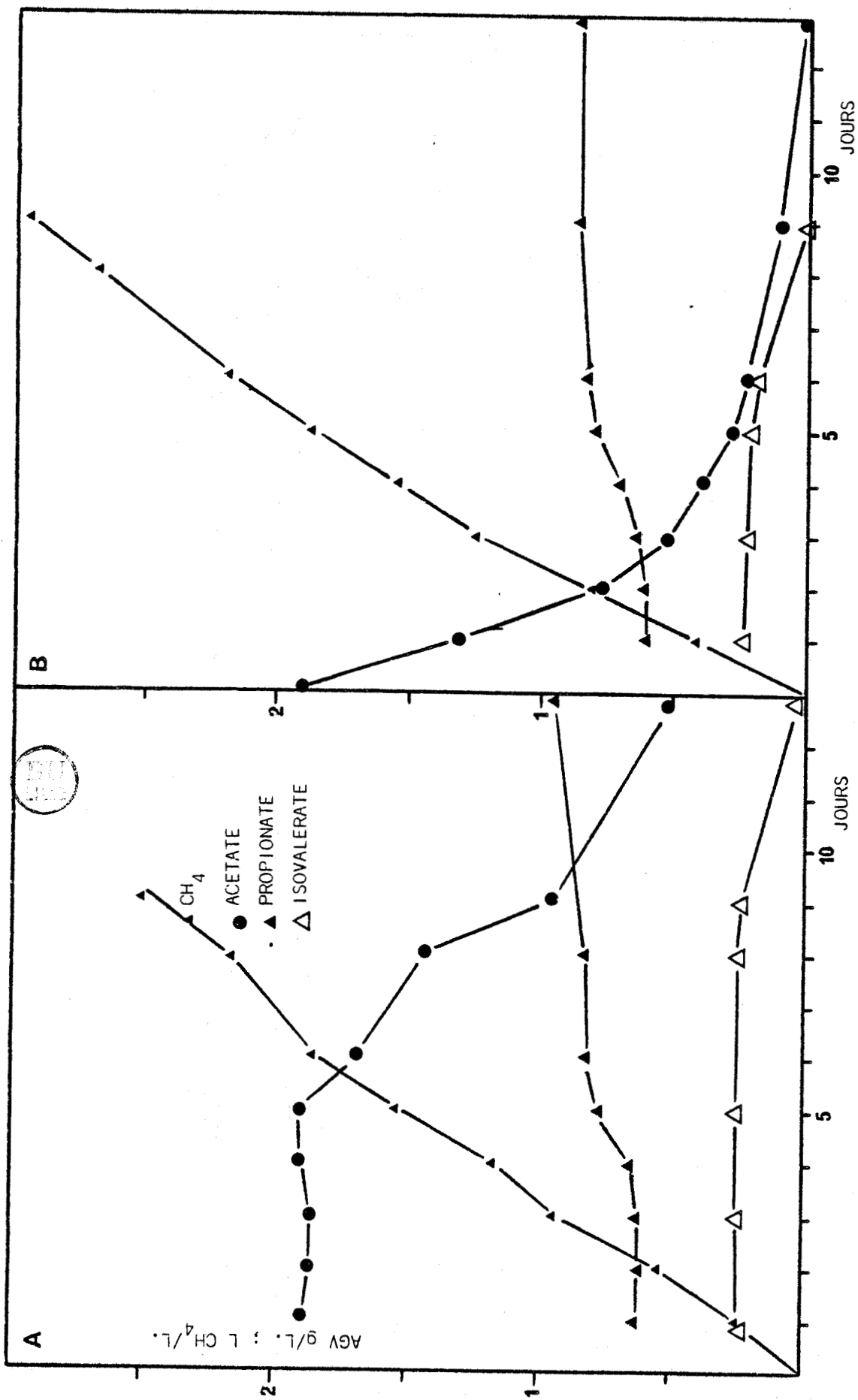


FIGURE 9 : Activité résiduelle en discontinu d'un prélèvement du réacteur thermophile, 50 jours après l'interruption des apports de calcium. A - aucune addition. B - + 20 mM CaCl₂.

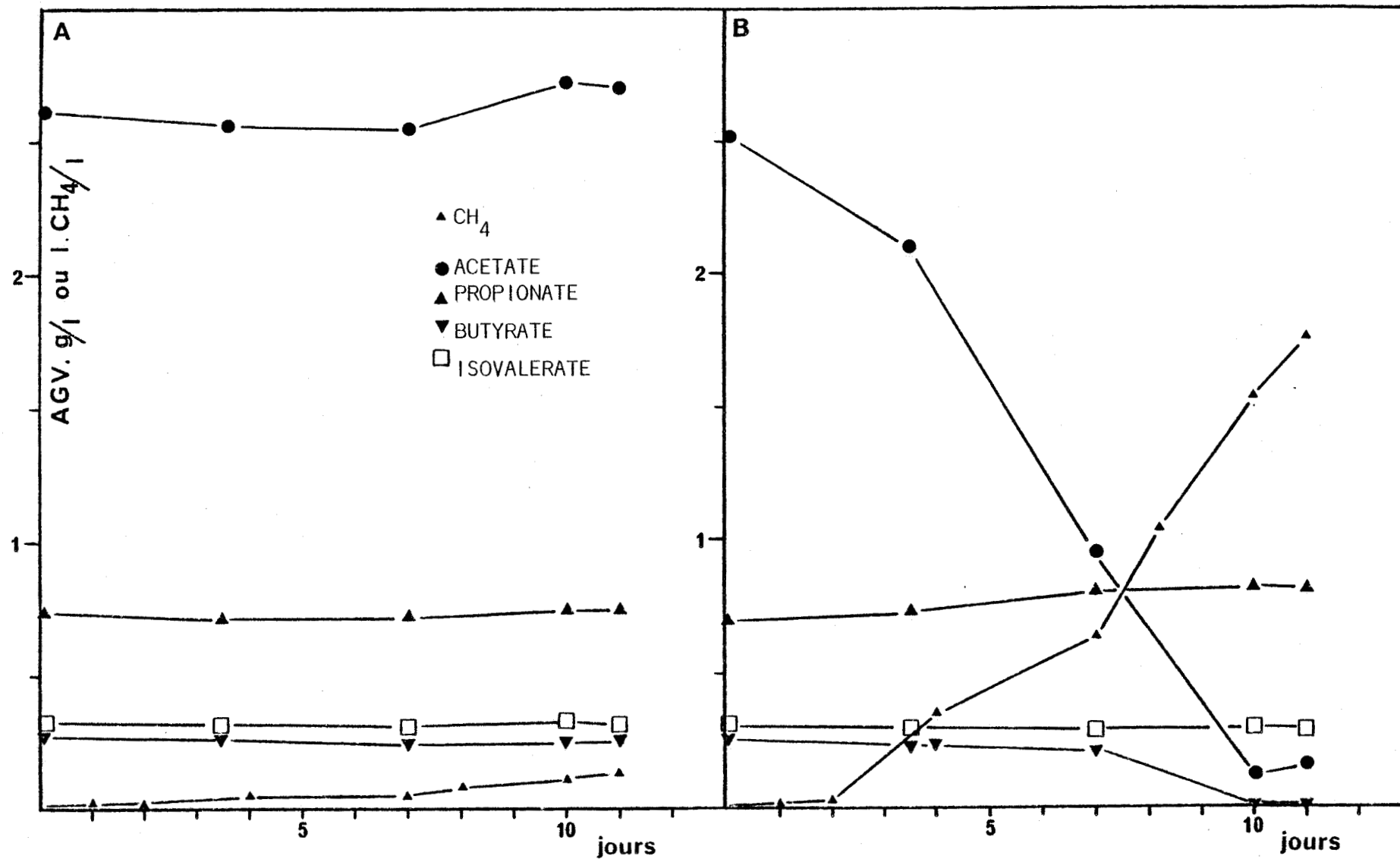


FIGURE 10 : Activité résiduelle en discontinu d'un prélèvement du réacteur thermophile, 70 jours après l'interruption des apports de calcium.
 A - aucune addition. B - + 40 mM CaCl₂.



* Potentialités de réactivation de la méthanogenèse.

Des prélèvements du contenu du digesteur thermophile sont réalisés 50 jours et 70 jours après l'interruption de la complémentation en calcium. Ces prélèvements sont répartis en flacons pénicilline, sans ajouts de substrat ni ensemencement, et on observe, en discontinu à 55°C, le devenir des acides gras volatils accumulés et la production de méthane.

- 50 jours après l'arrêt du calcium (figure 9).

Avec et sans ajout de calcium, en batch, les vitesses de production résiduelle de méthane sont équivalentes, mais en présence de 20 mM de CaCl_2 , la méthanisation s'accompagne de la dégradation rapide de l'acétate. Lorsque la concentration en acétate devient inférieure à 0,5 g/l, l'isovalérate et le valérate sont consommés et la concentration en propionate augmente. Ce dernier est dégradé très lentement. Sans addition de calcium, il y a dans un premier temps, production de méthane sans dégradation apparente des acides gras volatils : à ce stade, le réacteur a accumulé des acides gras volatils, mais également des acides gras à longues chaînes. La présence de ces acides gras limite l'étape de méthanogenèse acétoclaste.

- 70 jours après l'arrêt du calcium (figure 10).

Dans le réacteur contact, la méthanisation est presque nulle. En batch, sans addition de calcium, la production résiduelle de méthane est très faible et bien que les boues contiennent des matières organiques non dégradées, l'activité des bactéries fermentatives et acétogènes est presque totalement inhibée.

En présence de chlorure de calcium 40 mM, la méthanogenèse reprend après une période de latence de 2 jours et les AGV accumulés sont utilisés.

b-3 Méthanisation en réacteur contact mésophile.

Pour la phase de démarrage du pilote mésophile, nous avons considéré les résultats obtenus en thermophile sur la complémentation en calcium et le contrôle de la teneur en sodium comme acquis et non notablement modifiés par la différence de température.

RESULTATS DE METHANISATION DES JUS DE CUISSON "AT" EN REACTEUR

CONTACT MESOPHILE - 35°C -

Tableau 14.

INFLUENT :		
DCO g O ₂ /L.	20,0	31,0
MST g/L.	14,0	21,0
MOT g/L.	9,5	14,0
CENDRES g/L.	4,5	7,0
ADDITION DE CaCl ₂ mM	7,0	10,0
CHARGE VOLUMIQUE g M.O./L.J.	1,2	1,6
TEMPS DE SEJOUR HYD. J.	8,6	8,8
PRODUCTIVITE EN METHANE. L. CH ₄ /L.J.	0,9	1,1
% CH ₄ dans le gaz	74,0	73,0
EFFLUENT :		
DCO g O ₂ /L.	0,73	1,5
MST g/L.	6,6	10,0
MOT g/L.	0,9	2,0
CENDRES g/L.	5,7	8,0
ACETATE g/L.	0,03	0,05
PROPIONATE g/L.	0,01	0,01
% EPURATION/ M.O. INTRODUITE	90,5	86,0
% EPURATION /DCO INTRODUITE	96,3	95,2

BU
LILLE

Le digesteur est inoculé par 100 % de boues mésophiles auxquelles on ajoute 10 mM de CaCl_2 . Il est alimenté avec l'effluent brut dilué au demi, à 23 g/l de matières sèches totales, et complétement en continu en chlorure de calcium (10mM).

* Résultats de méthanisation en continu

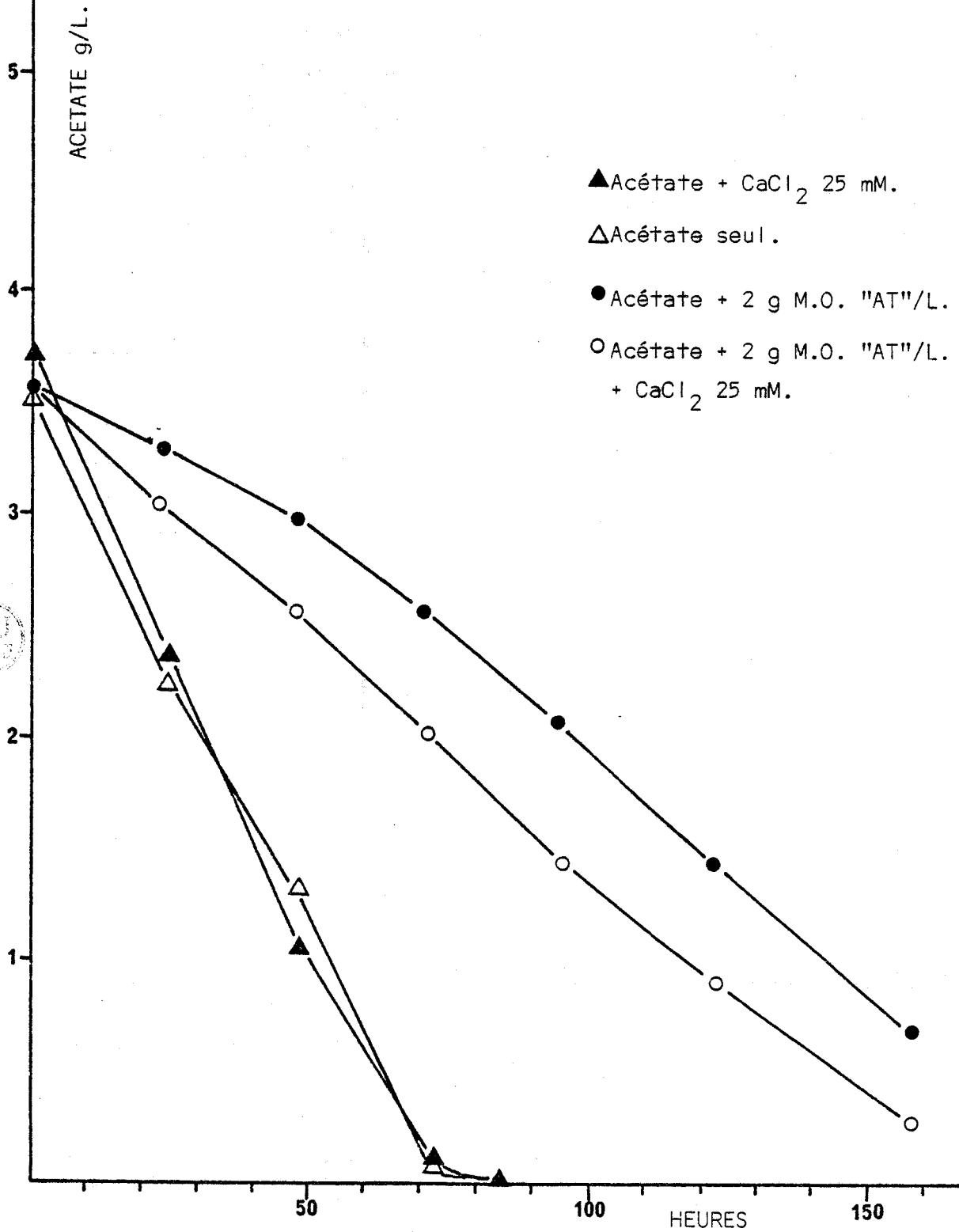
Après une courte phase d'adaptation en batch, les jus de cuisson sont pompés en continu vers le réacteur. Le démarrage de la méthanisation est rapide et les performances du pilote s'équilibrent en quelques jours après chaque augmentation du débit d'alimentation. Le taux de charge est progressivement porté à 1,3 g de matière organique/l.j après une période égale à 5 fois le temps de séjour hydraulique appliqué au fermenteur. Les résultats moyens obtenus avec l'effluent dilué au 1/2 sont reportés sur le tableau 14. L'efficacité de la décantation des boues qui avait été observée en thermophile est retrouvée à 35°C comme le montre la comparaison des résultats des analyses du contenu du réacteur et de l'effluent (fonctionnement en contact anaérobie) :

	Matières sèches g/l	Matières volatiles g/l	Cendres g/l
Contenu du réacteur mésoph.	15,3	4,8	10,5
Sortie après décanteur	9,8	1,8	8,0

Après cette période d'équilibre, la charge volumique a été augmentée à 2 g de M.O./l.j (4,4 g DCO/l.j). On constate alors une diminution de la productivité en méthane et une augmentation de la concentration en acétate résiduel (0,7 g/l). Ce déséquilibre a été attribué, en première analyse, à une sensibilité accrue des méthanogènes mésophiles vis à vis de la concentration en sodium. Le réacteur a été ensuite alimenté avec l'effluent dilué au 1/3 (matières sèches totales : 14 g/l ;

Dégradation d'acétate en discontinu par les boues adaptées en mésophile (35°C), avec et sans addition de jus de cuisson.

Figure 11.



DCO : 20 g O_2 /l). La charge volumique est maintenue à une valeur faible (0,5 g M.O./l.j) durant 15 jours, pour permettre au réacteur de restaurer ses capacités d'épuration, puis le taux de charge est progressivement augmenté. L'alimentation avec l'effluent dilué au 1/3 est maintenue durant une période égale à 5 temps de séjour hydraulique. Les performances moyennes d'épuration sont reportées sur le tableau 14. Malgré la dilution, le taux de charge ne peut cependant pas être augmenté au-delà de 1,6 - 1,7 g M.O./l.j., sans entraîner une augmentation importante de la concentration en acétate résiduel. Le temps de séjour hydraulique (6,5 j) reste compatible avec le traitement par le procédé contact. La limitation de la charge volumique n'est pas liée à la teneur en sodium mais pourrait être d'ordre biologique.

* Activité méthanogène acétoclaste de la population adaptée en mésophile.

La cinétique de dégradation de l'acide acétique par les boues mésophiles est très proche de celle observée en thermophile. L'activité spécifique de dégradation de l'acétate est de 14,3 mg par g de M.V.E.S. et par heure et l'apport de $CaCl_2$ n'a aucun effet sur la vitesse de méthanogenèse acétoclaste (figure 11).

Lorsque l'acétate est ajouté en mélange avec les jus de cuisson, la vitesse relative de disparition de l'acétate est significativement diminuée (6,2 mg par g de M.V.E.S. et par heure).

Par contre, alors qu'en thermophile l'apport de calcium en excès permettait de conserver la vitesse maximale d'acétoclastie (voir figure 7), en mésophile la dégradation simultanée en discontinu d'acétate et de jus de cuisson limite la vitesse de dégradation de l'acétate malgré un apport en excès de chlorure de calcium.

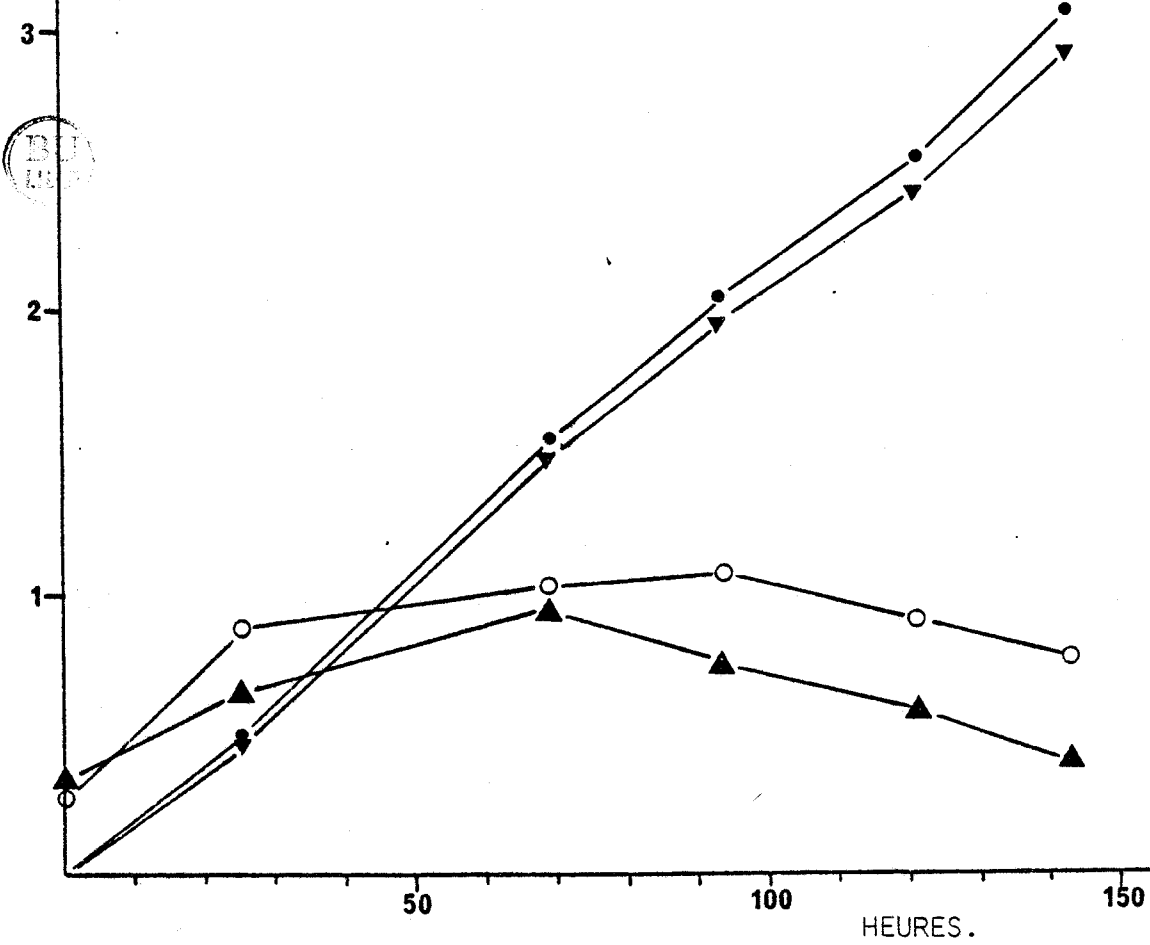
De même, cette limitation est retrouvée lors de la digestion en discontinu des jus de cuisson par les boues du digesteur mésophile : sans apport supplémentaire de $CaCl_2$, les cinétiques de méthanisation des jus de cuisson sont identiques à 35°C et à 55°C (figure 8 et 12). Mais par addition de calcium en excès, on ne retrouve pas, en mésophile, l'effet d'activation (ou de détoxification) de la méthanogenèse qui est observé en thermophile, bien que les boues des deux origines aient des concentrations en matières minérales égales, voisines de 10 g/l et que les complémentations en calcium dans les 2 réacteurs contacts soient identiques (10mM $CaCl_2$).

Dégradation en discontinu des jus de cuisson d'andouillettes
(4 g de matière organique/L.) par la population adaptée
en mésophile (35°C).

Figure 12.

▼ Méthane } CaCl₂ 25 mM.
▲ Acétate }
○ Méthane } pas de calcium.
● Acétate }

L. CH₄/L. boues ou g/L. Acétate.



4 - Dénombrements bactériens et observations microbiologiques.

Des dénombrements bactériens ont été réalisés sur les flores des deux digesteurs, mésophile et thermophile, adaptées à la dégradation des jus de cuisson d'andouillettes.

Les substrats testés permettent d'évaluer les différentes populations bactériennes sélectionnées dans les digesteurs. Les tableaux 15 et 16 présentent les résultats des numérations sur les boues des deux digesteurs. Dans les prélèvements destinés aux numérations, les matières volatiles en suspension sont respectivement de 2,3 et 5,3 g/l en thermophile et en mésophile.

a - Flore fermentative

Dans les deux digesteurs, ces bactéries utilisent le glycérol provenant de la lipolyse et la fraction protéique du substrat. L'activité protéolytique des bactéries thermophiles dénombrées sur glycérol a été vérifiée. La densité des bactéries fermentatives est équivalente aux deux températures.

b - Bactéries méthanogènes

* hydrogénophiles

Les méthanogènes hydrogénophiles sont significativement mieux représentées à 55°C (2×10^8 /ml) qu'à 35°C (9×10^6 /ml).

En thermophile, ces bactéries sont morphologiquement voisines de Methanobacterium thermoautotrophicum. En mésophile, les utilisatrices d'hydrogène dominantes sont des bactéries du genre Methanogenium, souvent rencontrées dans les milieux salins et qui auraient été sélectionnées dans le digesteur par la teneur élevée en sodium des jus de cuisson.

* Acétoclastes

Les méthanogènes acétoclastes sont représentées de façon égale aux deux températures. L'agglomération de ces bactéries en amas (sarcines) rend leur dénombrement peu significatif. L'addition de 4 mM de phénol est destinée à inhiber la croissance des bactéries du genre Methanothrix

DENOMBREMENT BACTERIEN (MPN) SUR LA FLORE DU DIGESTEUR

TRAITANT LES JUS DE CUISSON D'ANDOUILLETES.

Tableau 15.

-milieux pH = 7,1 ; 55°C ; M.V.E.S. des boues: 2,3 g/l -

SUBSTRAT	NOMBRE DE BACTERIES PAR mL	TYPES BACTERIENS
GLYCEROL 3 g/l	$2 \cdot 10^7$	PROTEOLYTIQUES
HYDROGENE	$2 \cdot 10^8$	METHANOGENES HYDROGENOPHILES
TRIPALMITATE 2 g/l + Ca 15 mM	$9 \cdot 10^3$	LIPOLYTIQUES
ACETATE 2,5 g/l	$2 \cdot 10^5$	METHANOGENES ACETOCLASTES
BUTYRATE 3 g/l	$5 \cdot 10^6$	ACETOGENES SYNTROPHES
BUTYRATE 3 g/l; SO ₄ 30 mM	$1 \cdot 10^7$ $2 \cdot 10^5$	ACETOGENES SYNT. SULFATOREDUCTRICES
STEARATE 3 g/l; Ca 15 mM	$2 \cdot 10^6$	ACETOGENES SYNTROPHES
STEARATE 3 g/l Ca 15mM; SO ₄ 30	$1 \cdot 10^7$ $2 \cdot 10^5$	ACETOGENES SYNT. SULFATOREDUCTRICES
PROPIONATE 3 g/l	$7 \cdot 10^3$	ACETOGENES SYNTROPHES
PROPIONATE 3 g/l; SO ₄ 30 mM	$4 \cdot 10^3$	ACETOGENES SYNTROPHES

(BRYANT, communication au laboratoire). Cependant ces filaments ne sont jamais observés. En thermophile, plusieurs morphologies de ces types bactériens coexistent dans le digesteur : sarcines, assimilables à Methanosarcina chti 55 (PETROFF - 1985), coques assemblés en grappes et bacilles. Un bacille thermophile acétoclaste provenant de la dilution -5 sur acétate est en cours de purification mais ses conditions de croissance sont encore mal définies. Le bacille utilise $H_2 - CO_2$ et acétate comme substrats de croissance, en présence de vancomycine. Il se distingue de la coculture syntrophe utilisant l'acétate décrite par ZINDER (1984), qui ne se développe pas en présence d'antibiotique. Un tel bacille acétoclaste a récemment été mis en évidence par AHRING (1984).

En mésophile dans les boues prélevées pour la numération, des sarcines morphologiquement semblables à Methanosarcina mizei (TOUZEL - 1983) sont les acétoclastes dominantes. Trois mois après cette numération, les formes sarcines typiques ne sont plus observées dans les boues du digesteur mésophile maintenu en alimentation continue avec ajout de calcium.

c - Bactéries acétogènes

En milieu pauvre en sulfate, les acides gras longs (stéarate, oléate) et le butyrate sont utilisés par des bactéries syntrophes obligées associées aux méthanogènes hydrogénophiles. Le dénombrement important des utilisatrices d'acides gras à longues chaînes est lié à la nature du substrat. Ces dernières bactéries sont également capables d'utiliser le butyrate (voir le chapitre suivant), ce qui explique les dénombrements similaires sur A.G.L.C. et butyrate.

En présence de sulfate, l'hydrogène produit par les acétogènes syntrophes obligées est utilisé préférentiellement par les bactéries sulfatoréductrices, dans les dilutions jusqu'où celles-ci sont présentes. On n'observe pas de bactéries sulfatoréductrices utilisant les acides gras (groupe des sapovorans) : les repiquages en milieu acides gras + sulfate mettent toujours en évidence l'association des syntrophes obligées et des sulfatoréductrices.

Les bactéries utilisatrices de propionate sont très mal représentées dans les deux populations. En mésophile, ce sont principalement des sulfatoréductrices du genre Desulfobulbus (SAMAIN - 1984).

Tableau 16.

DENOMBREMENT BACTERIEN (MPN) SUR LA FLORE DU DIGESTEUR MESOPHILE
ADAPTE SUR JUS DE CUISSON D'ANDOUILLETES.

-milieux pH 7,1 ; 35°C ; MVES des boues: 5,3 g/l.-

SUBSTRAT	NOMBRE DE BACT. PAR ml	TYPES BACTERIENS
GLUCOSE 3 g/l	$2 \cdot 10^7$	FERMENTATIVES
CASAMINO-ACIDES GELATINE 2 g/l.	$5 \cdot 10^7$	PROTEOLYTIQUES
HYDROGENE	$9 \cdot 10^6$	METHANOGENES HYDROGENOPHILES
ACETATE 3 g/l.	$2 \cdot 10^5$	METHANOGENES ACETOCLASTES
ACETATE + 4 mM PHENCL	$2 \cdot 10^5$	IDEM
OLEATE 3 g/l. + CaCl ₂ 15mM	$2 \cdot 10^6$	SYNTROPHES ACETOGENES
OLEATE 3 g/l. + Ca 15 mM + SO ₄ 30 mM	$5 \cdot 10^5$ $2 \cdot 10^5$	SYNTROPHES ACETOGENES SULFATOREDUCTRICES
BUTYRATE 3 g/l.	$5 \cdot 10^5$	SYNTROPHES ACETOGENES
BUTYRATE 3 g/l. + SO ₄ 30 mM	$5 \cdot 10^5$ $2 \cdot 10^5$	SYNTROPHES ACETOGENES SULFATOREDUCTRICES
PROPIONATE 3 g/l.	$4 \cdot 10^2$	SYNTROPHES ACETOGENES
PROPIONATE 3 g/l. + SO ₄ 30 mM	$5 \cdot 10^4$	SYNTROPHES ACETOGENES ou SULFATOREDUCTRICES

BU
LILLE

d - Bactéries sulfatoréductrices.

La concentration en sulfate dans les jus de cuisson est de 290 mg/l. Cette faible teneur permet le maintien dans le digesteur d'une population sulfatoréductrice sous-dominante. En présence de sulfate, ces bactéries s'expriment principalement par leur capacité à utiliser l'hydrogène, préférentiellement aux bactéries méthanogènes et parmi les acides gras, seul le propionate est oxydé incomplètement en acétate par la population sulfatoréductrice.

5 - Discussion et conclusion.

La méthanisation des jus de cuisson d'andouillettes qui contiennent 60 % de lipides dans la matière organique ne peut être réalisée en continu sans addition de chlorure de calcium. La chaux ne peut remplacer ce sel soluble de calcium. La quantité optimale de calcium nécessaire, en méthanisation continue, est voisine de 0,6 mmole de CaCl_2 par gramme de matière organique introduite. Cette concentration est inférieure à la concentration en A.G.L.C. théoriquement libérables à partir des lipides de l'alimentation. La nécessité de cette supplémentation indique une nette différence entre la vitesse de saponification et celle d'acétogénèse à partir des A.G.L.C.. Au-delà de cette valeur, la charge maximale admissible n'est pas augmentée. L'apport de calcium déttoxifie le milieu par précipitation des A.G.L.C. en savon de calcium. Les acides gras restent cependant utilisables sous cette forme.

La méthanisation est obtenue moyennant la réduction de la concentration en sodium à une valeur voisine de 3 g/l. Après dilution, la demande chimique en oxygène de l'effluent est encore voisine de 30 g O_2 /l et reste compatible avec le traitement en réacteur contact.

a - Contrôle de la fermentation.

Les paramètres de la méthanisation en continu des jus de cuisson sont très stables : le milieu est tamponné par les cations du milieu (Na en particulier et Ca apporté) et par l'ammoniaque produit par protéolyse des protéines du substrat, et le pH dans le réacteur reste constant même lors d'une accumulation de 3 g/l d'acides gras volatils. Ce pouvoir tampon élevé nous a conduit à choisir la concentration

résiduelle en acétate comme paramètre de contrôle de la stabilité de la méthanisation. En effet, le pH, la production totale de gaz et la concentration en méthane du gaz se modifient significativement lorsque les AGV et donc les acides gras à longues chaînes se sont accumulés dans le réacteur à des concentrations qui rendent la réversibilité de l'inhibition longue et incertaine compte-tenu du faible taux de renouvellement des bactéries acétogènes et acétoclastes.

b - Evolution de la fermentation sans apport de calcium.

Lorsque les rejets lipidiques sont introduits sans additifs dans le réacteur, et malgré leur utilisation par la flore bactérienne, la concentration résiduelle en A.G.L.C. libres est suffisante pour inhiber les méthanogènes acétoclastes qui sont parmi les espèces bactériennes les plus sensibles à la présence d'acides gras libres (GALBRAITH - 1971, HANAKI - 1981). Si le réacteur reste alimenté en continu, l'inhibition sur l'étape finale de la méthanogenèse se répercute sur la chaîne des réactions fermentaires et limite la dégradation des acides gras longs dont l'accumulation accélère le processus d'inhibition de l'activité biologique. La fermentation évolue transitoirement en acidogenèse mais les bactéries fermentatives et acétogènes sont à leur tour inhibées et le maintien de l'alimentation en continu aboutit au lessivage de la flore bactérienne du digesteur. Après un début d'inhibition par les acides gras, l'apport de CaCl_2 régénère l'activité bactérienne. Tout se passe comme si la fermentation reprenait à partir des bactéries restées viables, et le temps de latence est d'autant plus long que l'inhibition a été plus sévère.

c - Comparaison des méthanisations mésophile et thermophile.

Le résultat le plus inattendu est la différence d'influence du chlorure de calcium sur la dégradation en discontinu des jus de cuisson, en mésophile et en thermophile. A 55°C, l'apport de calcium en excès détoxifie le milieu, les acides gras longs sont précipités en savons de calcium. En mésophile, en présence de calcium à même concentration, la teneur en acides gras libres est également très faible et il est improbable que cette concentration soit suffisante pour inhiber les méthanogènes acétoclastes.

Par contre, cette inhibition partielle de la méthanogenèse acétoclaste en mésophile pourrait être due à la sensibilité de ces bactéries à la présence d'hydrogène moléculaire à faible concentration (BOONE, communication personnelle). Lors de la β -oxydation de l'acide stéarique, 16 moles d'hydrogène sont produites par mole d'acide gras dégradé. Cette inhibition n'apparaît pas en fermentation thermophile en discontinu. Il faut remarquer que dans les numérations, les méthanogènes hydrogénophiles sont environ 20 fois plus nombreuses à 55°C que leurs homologues mésophiles ce qui pourrait suffire à expliquer une pression partielle d'hydrogène suffisamment faible en thermophile pour éviter cette réduction d'activité des acétoclastes. Cependant, bien que se réalisant à des charges volumiques maximales différentes dans les deux réacteurs, mésophile et thermophile, ce phénomène biologique fixe les limites de la productivité en méthane : c'est la vitesse d'acétoclastie, limitée par la dégradation dans le même milieu des acides gras longs qui limite le processus global. A 55°C et 35°C, la vitesse d'acétogenèse, à partir des A.G.L.C., n'est pas limitante puisque dans les deux cas une surcharge organique entraîne une augmentation de l'acétate résiduel. En mésophile, cette interaction négative entre la dégradation des acides gras et de l'acétate pourrait même, en réacteur contact, conduire à un lessivage progressif des méthanogènes acétoclastes.

Conclusion

Les résultats de méthanisation donnent un léger avantage au procédé thermophile pour les performances de productivité en méthane et de charge volumique. Mais la plage de température de fonctionnement en thermophile est restreinte (de 55° à 60°C) et la dilution des rejets chargés et chauds pour diminuer la concentration en sodium dans le digesteur entraîne également une perte en calories récupérables pour le chauffage du réacteur. Pour une réalisation industrielle, le choix d'un réacteur mésophile est donc plus judicieux, mais le type de réacteur utilisé doit permettre une rétention optimisée des bactéries acétoclastes pour éviter le lessivage observé en réacteur contact anaérobie.

Moyennant l'utilisation du chlorure de calcium, le traitement par voie anaérobie des rejets de cuisson d'andouillettes, associant la dépollution et la production de biogaz, est bien adapté à ce type d'effluent et à son contexte industriel. Le méthane produit peut être utilisé en continu sur le site sans nécessiter une importante capacité de stockage.

Ces résultats constituent la première description de la faisabilité de la méthanisation d'un effluent industriel dont la fraction organique renferme plus de 50 % de lipides.

II - ETABLISSEMENT D'ENRICHISSEMENTS ANAEROBIES MESOPHILES UTILISANT LES ACIDES GRAS A LONGUES CHAINES.

Nous avons vu dans la partie bibliographique, la pauvreté de la documentation concernant la physiologie des bactéries anaérobies dégradant les acides gras à longues chaînes.

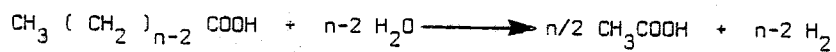
Nous avons donc mené, en parallèle aux études pilotes, des fermentations en discontinu d'acides gras afin d'enrichir des populations sur ces substrats pour pouvoir en tirer quelques enseignements sur les types bactériens responsables de la dégradation des A.G.L.C. et sur leurs conditions de croissance.

1 - Enrichissements méthanogènes.

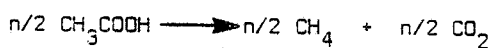
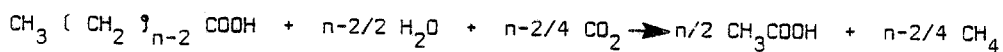
Lors de la première phase d'enrichissement, la méthanisation complète de savon de sodium d'acides gras a été obtenue par une inoculation massive avec des boues de digesteur urbain (MARQUETTE LEZ LILLE). Dès le transfert suivant (5 %) en milieu synthétique contenant le savon d'acide gras (2 g/l), la méthanisation fut très limitée. Le milieu, tamponné à pH 7,1 et incubé à 35°C réuni pourtant les conditions optimales de croissance des bactéries acétogènes utilisant les acides gras volatils, telle Syntrophomonas wolfei, et des méthanogènes. Le caractère inhibiteur des acides gras sous forme libre, dissimulé dans le cas d'un ensemencement massif était mis en évidence lors d'une inoculation réduite. Ce résultat met l'accent sur la signification incomplète des valeurs de concentrations minimales inhibitrices données dans la littérature.

Tableau 17.

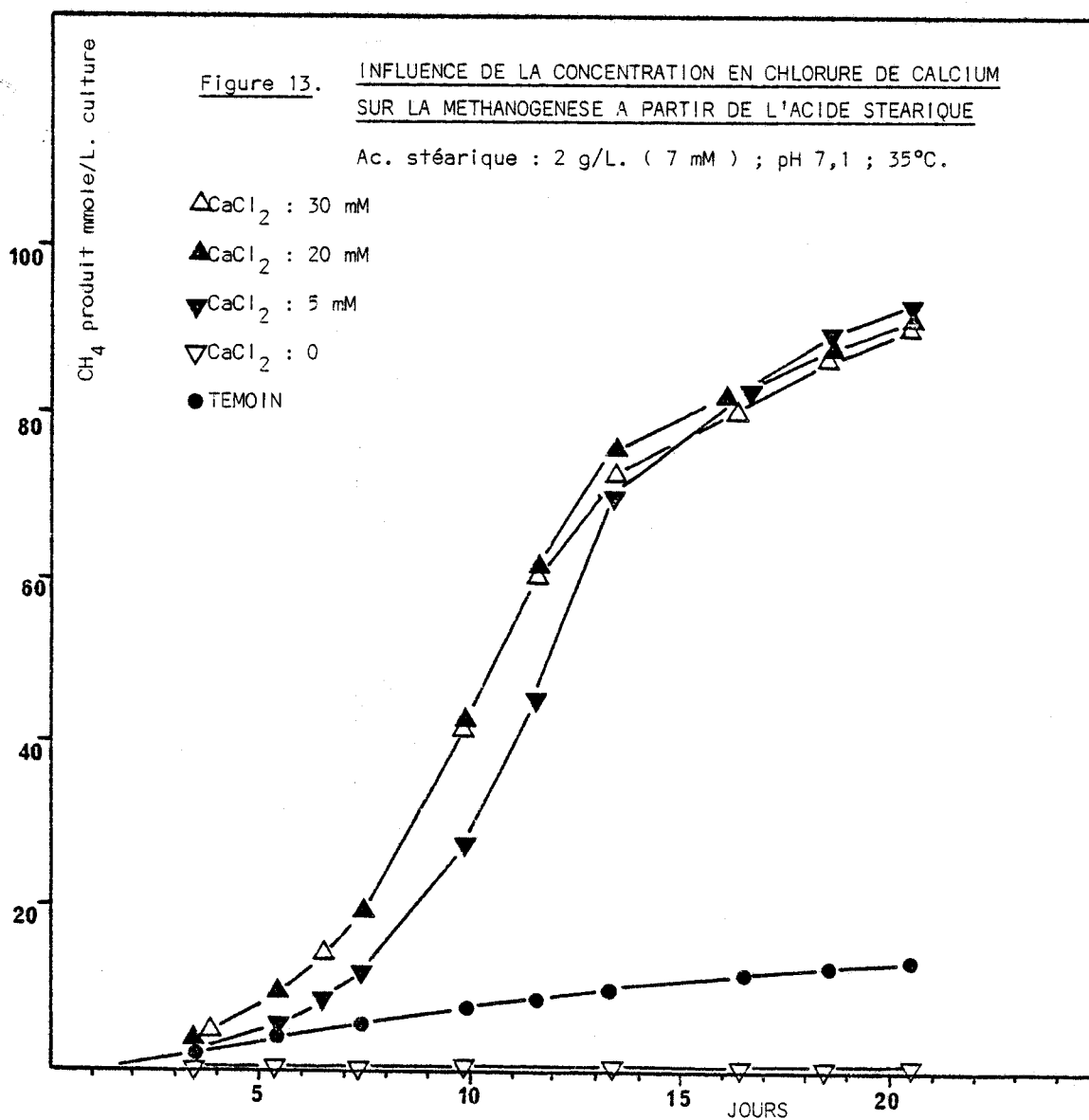
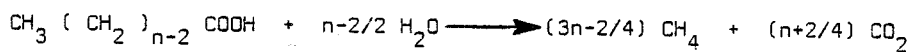
METHANISATION DES ACIDES GRAS SATURES: FORMULES GENERALES.



Acétogénèse avec production de méthane de réduction:



Methanogénèse:

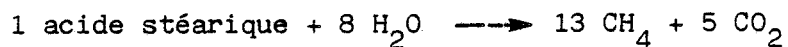


L'activité des enrichissements a été restaurée par addition de chlorure de calcium dans les milieux (HANAKI - 1981). Dans les flacons, le CaCl_2 est introduit après les acides gras longs et avant l'inoculum. Deux enrichissements parallèles sur acides stéarique et oléique ont été maintenus par transferts (inoculation 5 %) à des intervalles de 15 jours, en présence d'une concentration équimolaire de chlorure de calcium dans les milieux.

Dans ces enrichissements, les acides gras sont entièrement dégradés en méthane et gaz carbonique avec une légère accumulation transitoire d'acétate. Les équations théoriques de méthanisation des acides gras saturés sont données sur le tableau 17. Dans les résultats suivants, ces enrichissements servent d'inoculum pour les différentes expérimentations.

a - Influence du rapport acide gras/calcium.

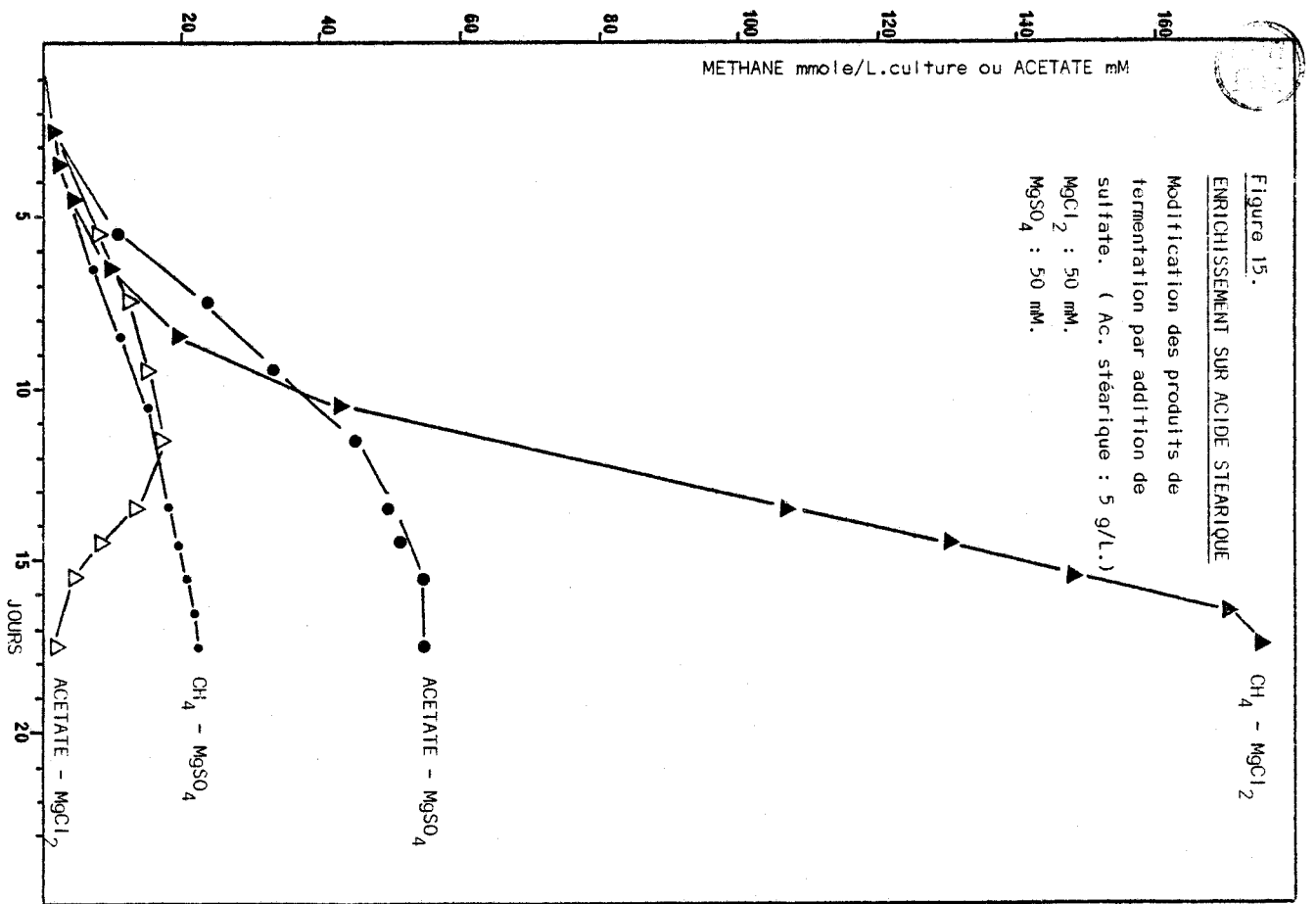
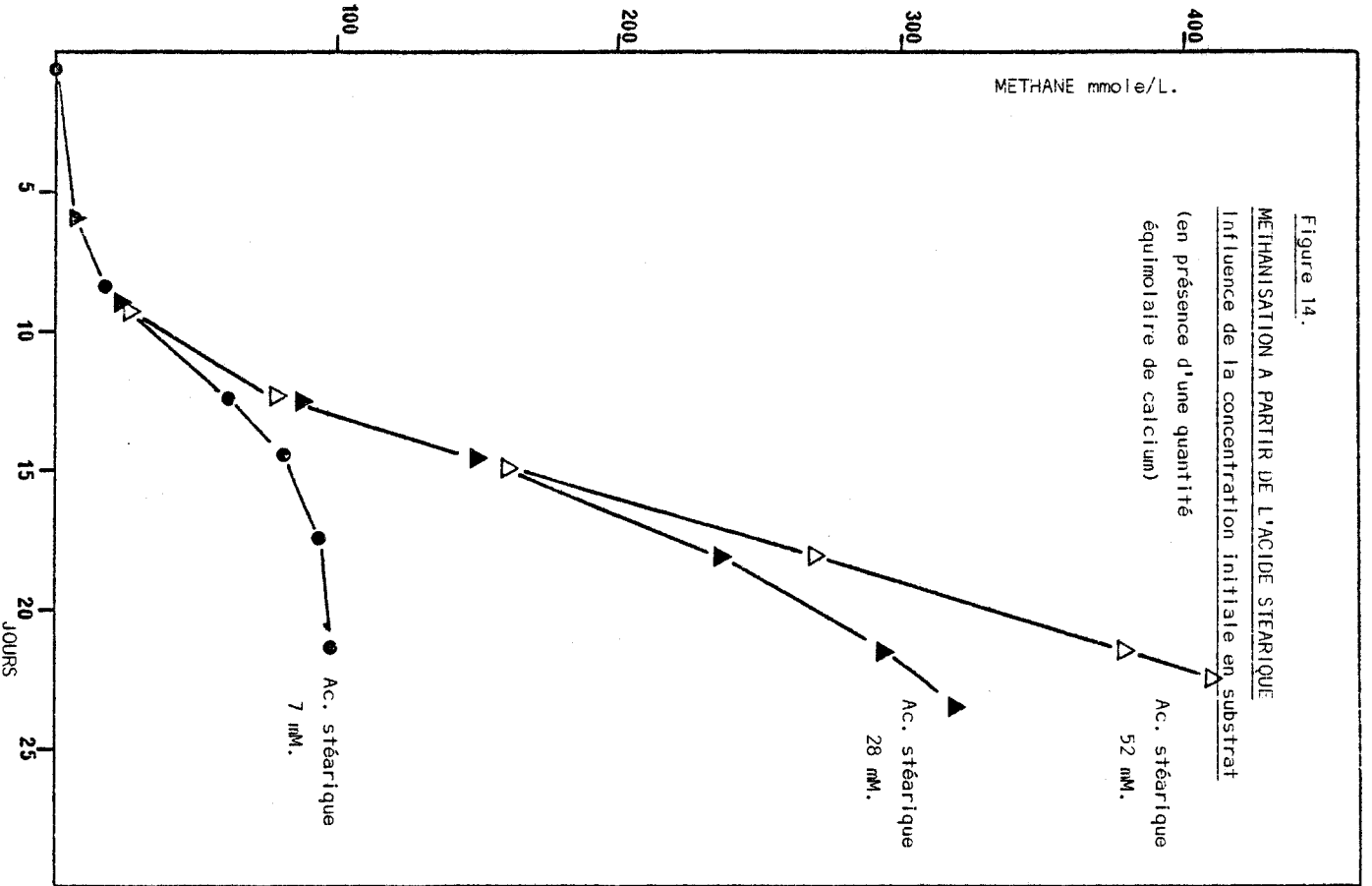
A partir d'une valeur seuil, l'apport en excès d'ions calcium n'améliore plus la vitesse de méthanisation du stéarate de sodium (figure 13). Le rendement en méthane corrigé de la production dans le témoin est proche du rendement théorique :



De plus, l'effet inhibiteur de l'acide gras apporté sous forme de savon de sodium est très net puisque la production de gaz dans le flacon sans ajout de calcium est nulle alors que le témoin sans substrat présente une méthanisation résiduelle.

b - Influence de la concentration en acide gras.

Moyennant la complémentation en chlorure de calcium de façon à conserver un rapport équimolaire entre les concentrations en acide gras et calcium, les concentrations en stéarate ou en oléate, dans les enrichissements respectifs ont pu être augmentées jusqu'à 15 g/l sans observer de limitation de croissance (figure 14). Une teneur en chlorure de calcium de 50 mM n'est pas inhibitrice.



c - Tests d'additifs pour la levée de l'inhibition par les A.G.L.C.

Les composés suivants ont été testés sur leur capacité à supprimer l'inhibition par les acides gras dans les milieux d'enrichissement. Ce sont : le chlorure de sodium (rôle du sodium), le chlorure d'ammonium (rôle du chlore), le chlorure et le sulfate de magnésium, la lécithine (dispersion des acides gras), le structol (agent tensio-actif).

Parmi ces additifs, seul $MgCl_2$ et $MgSO_4$ ont donné des résultats positifs dans les enrichissements sur stéarate et le magnésium peut y être substitué au calcium à même concentration. L'addition de lécithine en présence de chlorure de calcium n'améliore pas la vitesse de méthanisation et le structol à 1‰ est inhibiteur dans les enrichissements, même en présence de $CaCl_2$.

Dans les enrichissements sur acide oléique, aucun des agents testés ne peut se substituer au calcium pour la suppression de l'inhibition.

d - Evolution de la fermentation de l'acide stéarique en présence de sulfate.

Dans un enrichissement contenant 5 g/l d'acide stéarique détoxifié par le chlorure de magnésium (50 mM), la production finale de méthane correspond stoechiométriquement à la dégradation complète du stéarate. Lorsque l'apport de magnésium est fait sous forme de sulfate, les produits de fermentation sont modifiés (figure 15) : en présence de trois moles de sulfate par mole de stéarate, la production de méthane est limitée, il y a production d'hydrogène sulfuré et l'acétate s'accumule dans le milieu. La dégradation de l'acide gras n'est pas complète. Le sulfate à 50 mM n'est pas inhibiteur de la méthanogenèse acétoclaste. Par contre, la production d'hydrogène sulfuré par les sulfatoréductrices qui utilise l'hydrogène généré par la voie d'acétogenèse, entraîne une inhibition sévère de la dégradation de l'acétate.

Le sulfate étant limitant (la réaction d'acétogenèse du stéarate couplée à la sulfatoréduction utilise 3,5 moles de sulfate par mole de stéarate dégradé) la faible quantité de méthane produite provient soit de la réduction du CO_2 utilisant l'hydrogène après consommation totale du sulfate, soit de l'activité résiduelle des acétoclastes.

Dans les enrichissements méthanogènes dégradant le stéarate et l'oléate, au minimum trois types bactériens sont associés : les acétogènes syntrophes, les méthanogènes hydrogenophiles et les méthanogènes acétoclastes.

D'autres bactéries, telles les sulfatoréductrices utilisant l'hydrogène y sont également présentes. L'étude précise du métabolisme des souches acétogènes syntrophes utilisant les acides gras à longues chaînes passe par une étape de purification des enrichissements afin d'obtenir des cultures qui ne manifestent pas de phénomènes d'adaptabilité.

2 - Obtention de cultures acétogènes.

Après une dizaine de transferts successifs, les deux enrichissements ont été dilués sur couche mince de gélose (roll tube) en présence d'un tapis de Methanospirillum hungatei. Pour ces dilutions, les cultures ont été placées en présence de leurs substrats d'enrichissement complétés en chlorure de calcium. Après incubation, aucune croissance n'a été obtenue aussi bien sur acide oléique que sur acide stéarique.

Après l'échec de la purification par la technique du roll tube, les deux enrichissements ont été dilués en milieux liquides par la méthode utilisée pour les numérations, en présence de M. hungatei.

Dans les deux séries, les acides gras sont dégradés complètement en méthane jusqu'aux dilutions -7 sur oléate et -6 sur stéarate.

L'observation microscopique des populations bactériennes présentes dans ces flacons met en évidence la présence de méthanogènes acétoclastes ressemblant à Methanosarcina mazei dans la culture enrichie sur stéarate alors que sur oléate, les méthanogènes acétoclastes sont de type Methanothrix.

a - Nature des bactéries enrichies.

La dilution -7 sur oléate est la plus haute dilution où une croissance sur cet acide est observée. Les produits de fermentation de l'oléate y sont méthane et gaz carbonique. Par contre, sur stéarate, une croissance est mise en évidence jusqu'à la dilution -9. Dans les témoins sans acides gras, aucune croissance n'est observée à ces

dilutions. Dans le dernier flacon où l'acide stéarique a été utilisé, l'observation microscopique ne révèle plus de méthanogènes acétoclastes.

En plus de M. hungatei, bactérie aisément mise en évidence par sa morphologie et sa fluorescence en observation U.V., la culture renferme des bacilles courts mobiles, gram négatifs et non fluorescents, morphologiquement très proches de Syntrophomonas wolfei. Cette coculture dégrade l'acide stéarique en acétate et méthane de réduction mais présente une croissance sur milieu complexe BHI, ce qui met en évidence la présence de contaminants résiduels.

Dilutions en tubes fins.

Pour purifier les cultures, il est nécessaire d'obtenir la formation en milieu gélosé de colonies suffisamment distinctes afin de pouvoir les repiquer individuellement. Les cultures provenant des dilutions -9 sur stéarate et -7 sur oléate ont été diluées en utilisant la technique du tube fin où les colonies se développent en gélose profonde. Par rapport aux essais en roll tubes, cette technique favorise une anaérobiose plus poussée et un contact plus étroit avec le substrat qui, sous forme savon de calcium, ne diffuse pas dans le milieu gélosé. Le substrat utilisé est l'acide laurique qui forme un précipité plus homogène en présence de calcium. Les deux cultures ont été diluées en présence de tapis d'utilisatrices d'hydrogènes, méthanogènes (M. hungatei) ou sulfatoréductrice (Desulfovibrio).

Après 6 semaines d'incubation, des colonies diffuses ont été obtenues et sont visibles au centre de plages d'éclaircissement (planche photo, n° 1) dans les quatre séries de dilutions, à des niveaux supérieurs à la croissance dans les tubes témoins : à -7 pour l'enrichissement oléate en présence de M. hungatei ou de Desulfovibrio et pour l'enrichissement stéarate en présence de M. hungatei ; à -6 pour cet enrichissement en présence de Desulfovibrio. Toutes ces colonies repiquées en milieu liquide sur stéarate ou oléate, en respectant les substrats d'origine des enrichissements, génèrent des cultures acétogènes dégradant les acides gras à longues chaînes avec production de méthane de réduction ou d'hydrogène sulfuré.

Les méthanogènes acétoclastes ont été éliminées des deux enrichissements de départ, par simple dilution en milieu liquide et par dilution en tubes fins gélosés respectivement pour les cultures enrichies sur stéarate et oléate.

La culture réalisant l'acétogénèse de l'acide oléique est appelée **OM** lorsqu'elle est associée à *M. hungatei* et **OS** lorsqu'elle est associée à *Desulfovibrio* en milieu complétement en sulfate. De même, la culture dégradant l'acide stéarique en acétate et méthane de réduction ou en acétate et H_2S est dénommée **SM** ou **STS**.

La culture acétogène **OM** contient, en plus de *M. hungatei*, des bacilles courts mobiles, de morphologie très proche de celle des bacilles observés précédemment dans la culture **SM**.

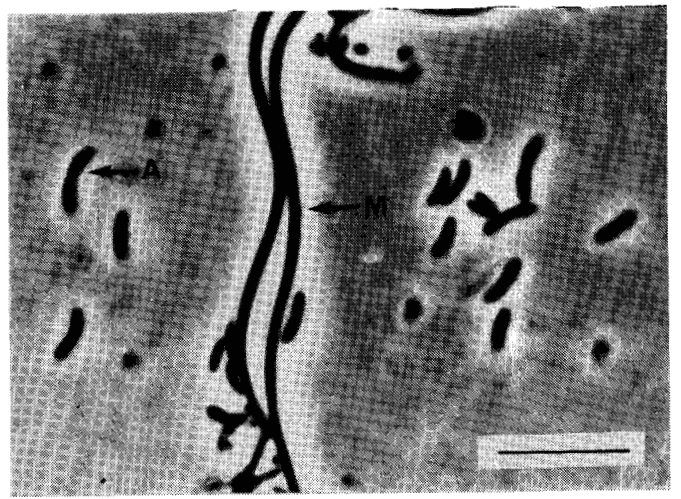
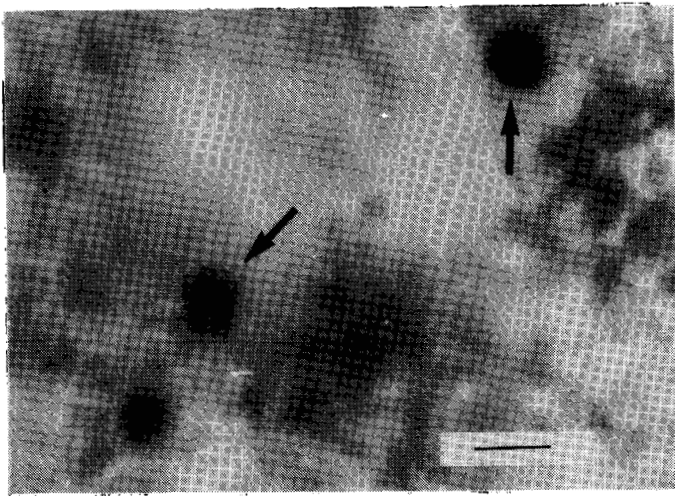
A ce stade, les cultures **OM** et **SM** sont pures selon les critères de non croissance sur milieu BHI et d'observations microscopiques. Lorsque le milieu est complétement en sulfate, il n'y a pas production d' H_2S ce qui montre que les cultures ne contiennent pas de sulfatoréductrices sous dominantes et de plus que les utilisatrices d'acides gras purifiées sont des syntrophes obligés. Les deux cultures ont des exigences de pH et de température voisines : pH : 7,1 et 35 - 40°C.

En plus de l'oléate, la culture **OM** dégrade immédiatement les acides gras linéaires saturés. Par contre, la culture **SM** utilise l'acide oléique avec un temps de latence de 10 jours environ.

b - Rôle du calcium.

Ce sont ces deux cultures acétogènes **OM** et **SM** qui ont été utilisées pour l'étude concernant l'influence du calcium sur la dégradation des acides oléique et stéarique. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication qui est placée en fin du mémoire (annexe 3).

Pour obtenir la dégradation de l'acide oléique, une quantité équimolaire de chlorure de calcium doit être ajoutée au milieu, alors que la dégradation de l'acide stéarique ne requiert qu'une concentration équivalente de calcium. Ces résultats, indépendants de la culture utilisée pour dégrader l'acide gras, sont discutés en fonction des constantes de solubilité des savons de calcium d'acides gras et de la toxicité des formes libres de ces acides qui, elle-même dépend de leur nature, saturée ou insaturée.



N° 1 : Colonies en gélose profonde de la culture acétogène associée à *Methanospirillum hungatei*.

Substrat : Laurate + CaCl_2 .

Grossissement X 10. Barre : 1 mm.

N° 2 : Coculture syntrophe OM sur

acide butyrique. A : organisme APOH;

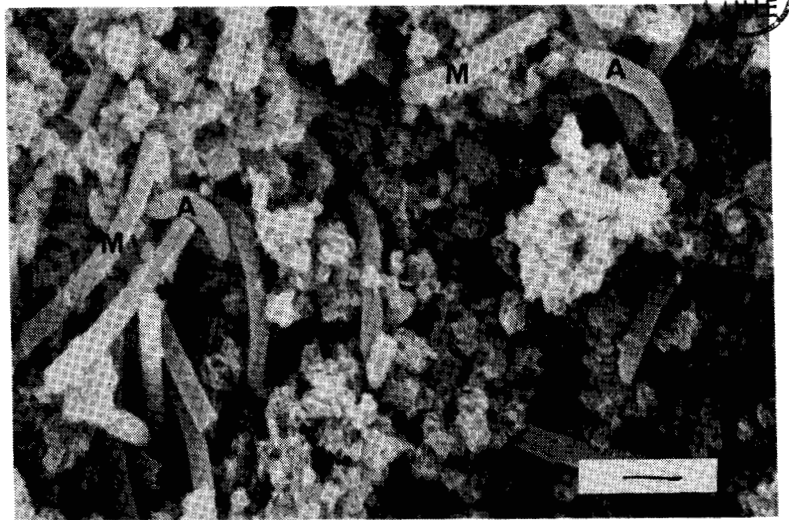
M : *M. hungatei*. Microscopie optique.

Grossissement X 3500. Barre : 5 μ .

N° 3 : Coculture acétogène OM sur acide oleique + CaCl_2 .

A : syntrophe APOH; M : *M. hungatei*

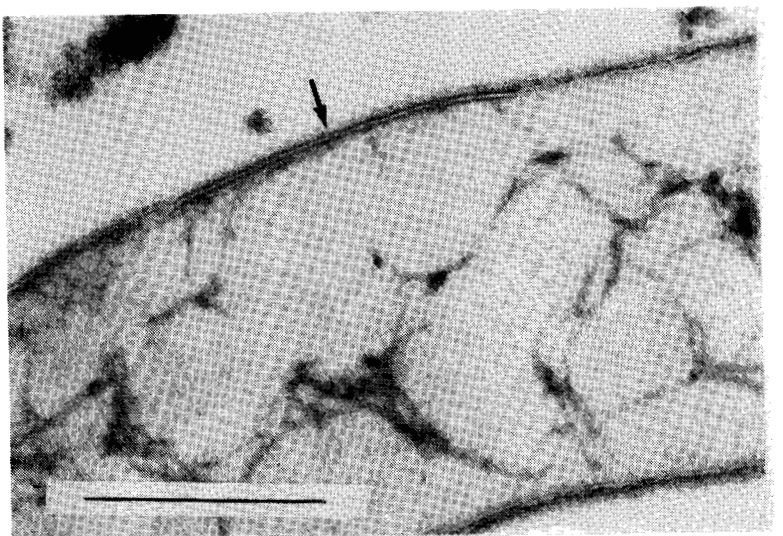
Grossissement X 7800. Barre : 1 μ .



- PLANCHE PHOTO -

N° 4 : Ultrastructure en microscopie électronique à transmission de la souche acétogène utilisant l'acide oleique.

Grossissement X 65000. Barre : 0,5 μ .



3 - Caractérisation de bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène et utilisant les acides gras linéaires, saturés et insaturés.

Avant les tests de caractérisation, les cultures acétogènes ont été diluées à nouveau en tubes fins, en milieu gélosé contenant du laurate de calcium, mais sans addition de bactéries hydrogénophiles.

De cette étape de dilution, les résultats suivants ont été obtenus : culture OM : à la dilution -5, des plages d'éclaircissement sont nettement distinctes, sans colonies visibles. Du prélèvement des centres de ces plages de lyse, repiqués en milieu liquide en présence d'oléate de calcium, la culture acétogène OM a été régénérée ; culture OS : les plages d'éclaircissement sont visibles jusqu'à la dilution -4. Par le même processus, une culture acétogène associée à Desulfovibrio a été régénérée ; culture SM : aucune colonies ni plages de lyse ont été obtenues ; cultures STS : de colonies distinctes observées à la dilution -4, nous avons obtenu, après repiquage en milieu liquide contenant du stéarate de calcium, une culture acétogène associée à Desulfovibrio.

a - Caractérisation de la souche syntrophe obligée utilisant l'acide oléique.

La coculture acétogène OM est une association syntrophe entre une bactérie APOH dégradant l'acide oléique et Methanospirillum hungatei.

a-1 Morphologie

La souche acétogène est un bacille mobile, anaérobie strict, les cellules sont légèrement incurvées (0,4 - 0,5 μ x 2 - 2,5 μ) - (planche, photo, n° 2 et n° 3). La coloration de Gram négative est confirmée par la structure de la membrane bactérienne en microscopie électronique à transmission (planche photo, n°4). La formation de spores n'est jamais observée et la croissance est inhibée par une élévation de température à 80°C pendant 30 minutes et malgré un réensemencement par M. hungatei.

Tableau 18.

SUBSTRATS DE LA CULTURE OM.

ACIDES GRAS (2 g/L.)	CONC. INITIALE mM	ACETATE mM	PRODUITS PROPIONATE mM	Méthane mmole/L.cult.
butyrique	22,7	39,7	0	10,7
valérique	19,6	17,8	14,3	8,1
héxanoïque	17,2	46,7	0	18,9
heptanoïque - Ca	15,4	35,8	12,7	15,5
octanoïque - Ca	13,9	46,2	0	18,7
caprique - Ca	11,6	62,2	0	25,6
undecanoïque -Ca	10,7	45,7	8,8	20,9
laurique - Ca	10,0	62,5	0	25,0
myristique - Ca	8,8	62,0	0	25,0
pentadécanoïque - Ca	8,2	31,2	3,9	9,1
palmitique - Ca	7,8	54,2	0	22,0
margarique - Ca	7,4	5,2	0	1,5
stéarique - Ca	7,0	6,8	0	1,3
oléique - Ca	7,1	57,5	0	19,7
élaïdique - Ca	7,1	55,2	0	21,9
linoléique - Ca	7,1	58,7	0	23,1

Ca : addition de CaCl_2 équimolaire.

Tableau 19.

Dégradation des acides gras par la coculture OM.

Pourcentages d'utilisation en fin de culture.

SUBSTRAT	% d'utilisation
BUTYRIQUE	99
OILEIQUE (1)	98
PALMITIQUE (1)	85
STEARIQUE (1)	5 à 10
STEARIQUE "technique" (1)	C16 : 85 C18 : 75
PALMITIQUE + STEARIQUE (1) (équimolaire)	C16 : 85 C18 : 30

(1) en présence de CaCl_2 équimolaire

a-2 Substrats utilisés

La culture syntrophe n'utilise pas le milieu complexe B.H.I. (test de contamination). Elle utilise les acides gras linéaires, pairs et impairs, saturés et insaturés ayant de 4 à 18 carbones. L'addition de calcium en tant que détoxifiant est nécessaire pour la dégradation des acides gras à plus de 6 carbones (tableau 18). Les acides gras à nombre pair de carbones sont dégradés en acétate et méthane de réduction, ceux qui ont un nombre impair de carbones sont décomposés en acétate, propionate et méthane de réduction.

Les autres acides gras linéaires testés mais non utilisés sont : acétique, propionique, linoléique, nonadécanoïque, arachidique, béhénique, érucique, lignocérique. Les acides gras ramifiés ou dérivés ne sont pas utilisés : isobutyrique, 2-DL méthyl butyrique, isovalérique, isocaproïque, isostéarique, β -hydroxybutyrique, DL-12 hydroxystéarique, 6 amino-caproïque, stéarique méthyl ester, pentadécanoïque méthyl ester.

De plus, la coculture OM n'utilise pas les triglycérides : tributyrine, tripalmitine, les sucres simples : glucose, fructose, xylose, les acides organiques : lactique, pyruvique, fumarique, succinique, malique et enfin : glycérol, 2-3 butanédiol, acétoïne, éthylène glycol, n dodecane. L'acide formique est utilisé par M. hungatei. Les monoalcools : éthanol, butanol -1 et propanol sont dégradés très lentement et les produits de fermentation sont respectivement acétate, butyrate ou acétate et propionate.

Remarque : l'acide stéarique ("technique", Merck) utilisé dans les cultures d'enrichissement est en fait un mélange équipondéral de palmitique et de stéarique (mise en évidence par dosage en chromatographie phase gaz des esters butyliques d'acides gras).

L'acide stéarique ("pour usage biochimique", Merck, 99 %) employé pour les tests de substrats est très mal dégradé par la bactérie syntrophe. Le tableau 19 présente les pourcentages d'utilisation des acides gras par la culture OM, en fonction du substrat.

a-3 Conditions et cinétiques de croissance

Les tests de pH et de température sont réalisés sur acide butyrique, substrat qui évite l'utilisation de calcium ; la croissance est mesurée par turbidimétrie. L'association bactérienne OM a une croissance optimale à pH voisin de 7,3, les limites de pH pour le développement de

Tableau 20. Culture OM : Tests d'accepteurs d'électrons.

Substrat butyrate 3 g/L.

: Modification des produits de fermentation.

	Acétate formé mmoles
	Méthane formé mmoles
Stoechiométrie théorique	4
Témoin	4,2
SULFATE 30 mM	4,08
SULFATE 30 mM + Desulfo- vibrio.	6,3
SULFITE 30 mM	Inhibition
THIOSULFATE 30 mM	3,95 (incomplet)
NITRATE 30 mM	4,55 (incomplet)
FUMARATE 30 mM	3,62

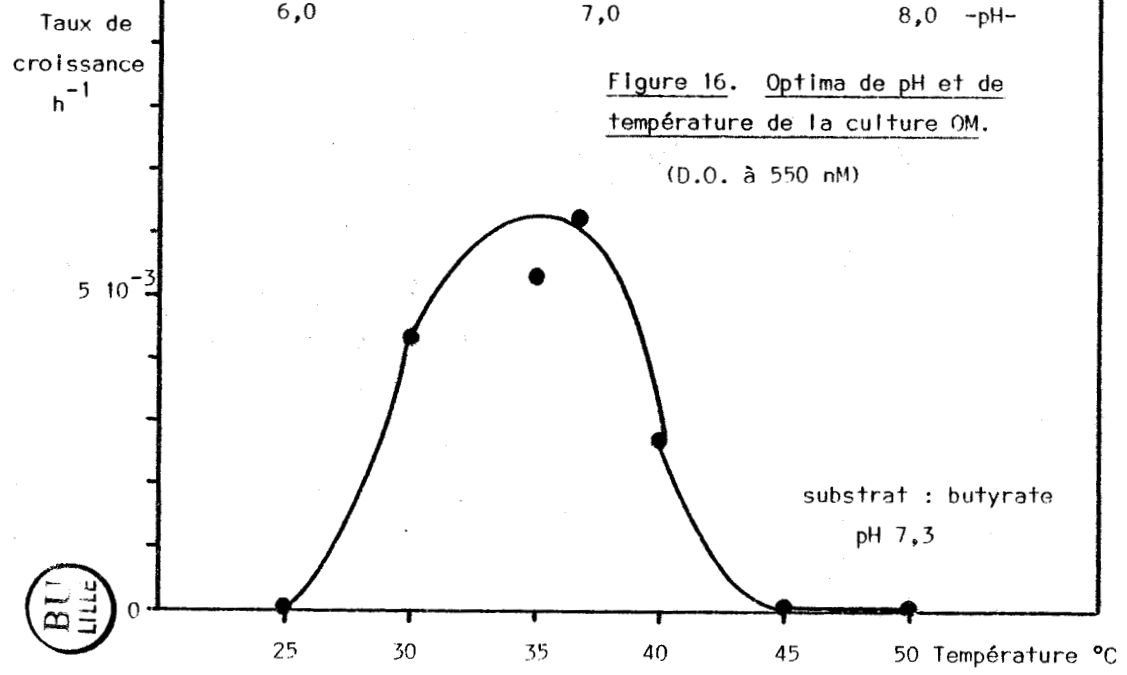
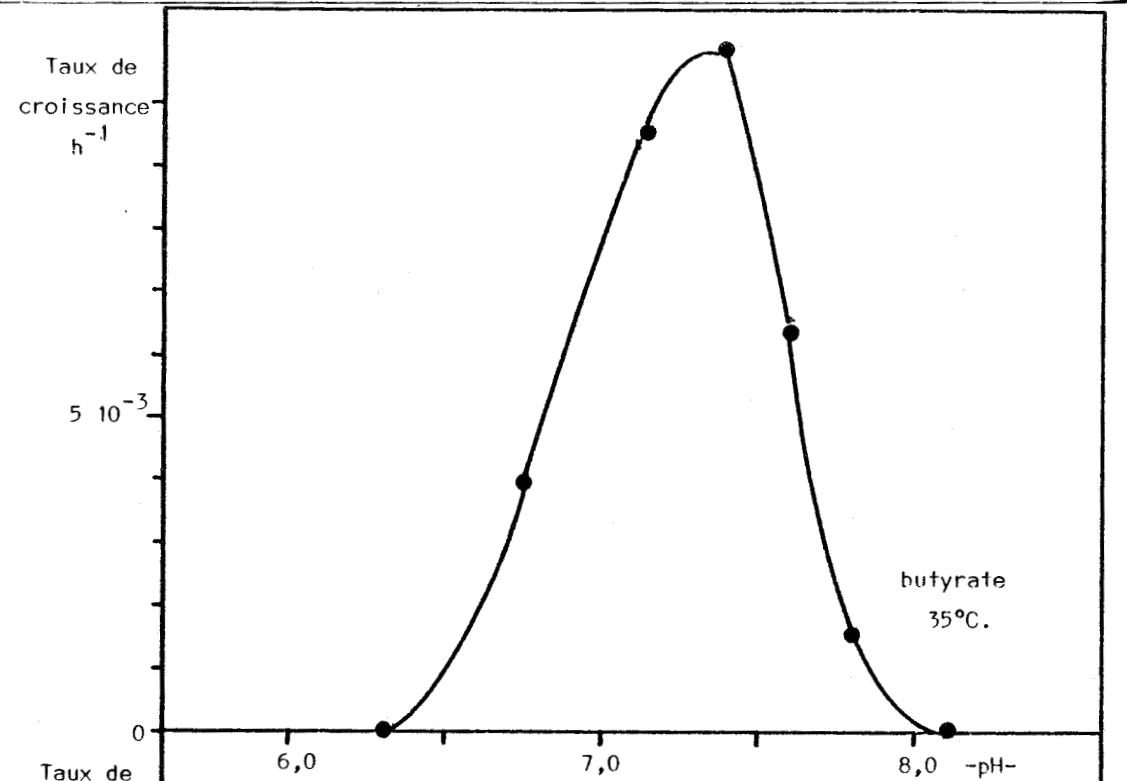


Figure 16. Optima de pH et de température de la culture OM.



la coculture sont 6,3 - 8,1. L'optimum de température est compris entre 35 et 40°C. La croissance de OM est possible dans la gamme de température 25 - 45°C (figure 16).

Sur milieu minéral, le temps de génération est très long. L'addition d'acides aminés et de vitamines favorise la croissance. Sur milieu minéral complétement en casaminoacides exempt de vitamines ou complétement en vitamines seules, les résultats sont identiques à ceux obtenus par utilisation du milieu minéral.

Tests d'accepteurs d'électrons

La culture est anaérobie stricte mais reste viable après une exposition d'une heure en flacon d'oxygène stérile, et sans réensemencement par M. hungatei. L'association OM n'accepte aucun des composés suivants comme accepteurs d'électrons : sulfate (30mM), thiosulfate (30mM), nitrate (30mM), fumarate (30mM). Le sulfite (30mM) est inhibiteur de la croissance (tableau 20).

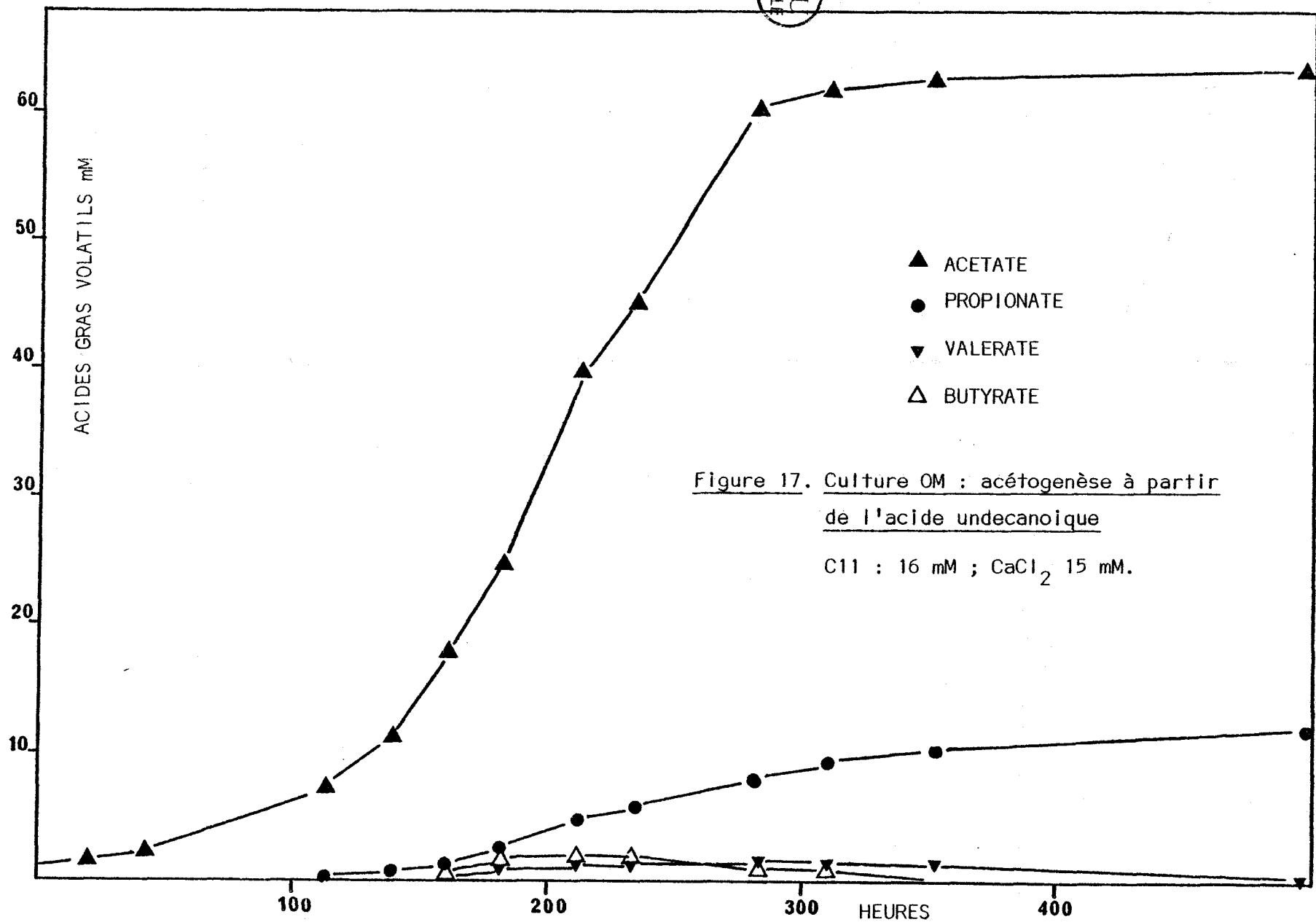
Cinétique de croissance

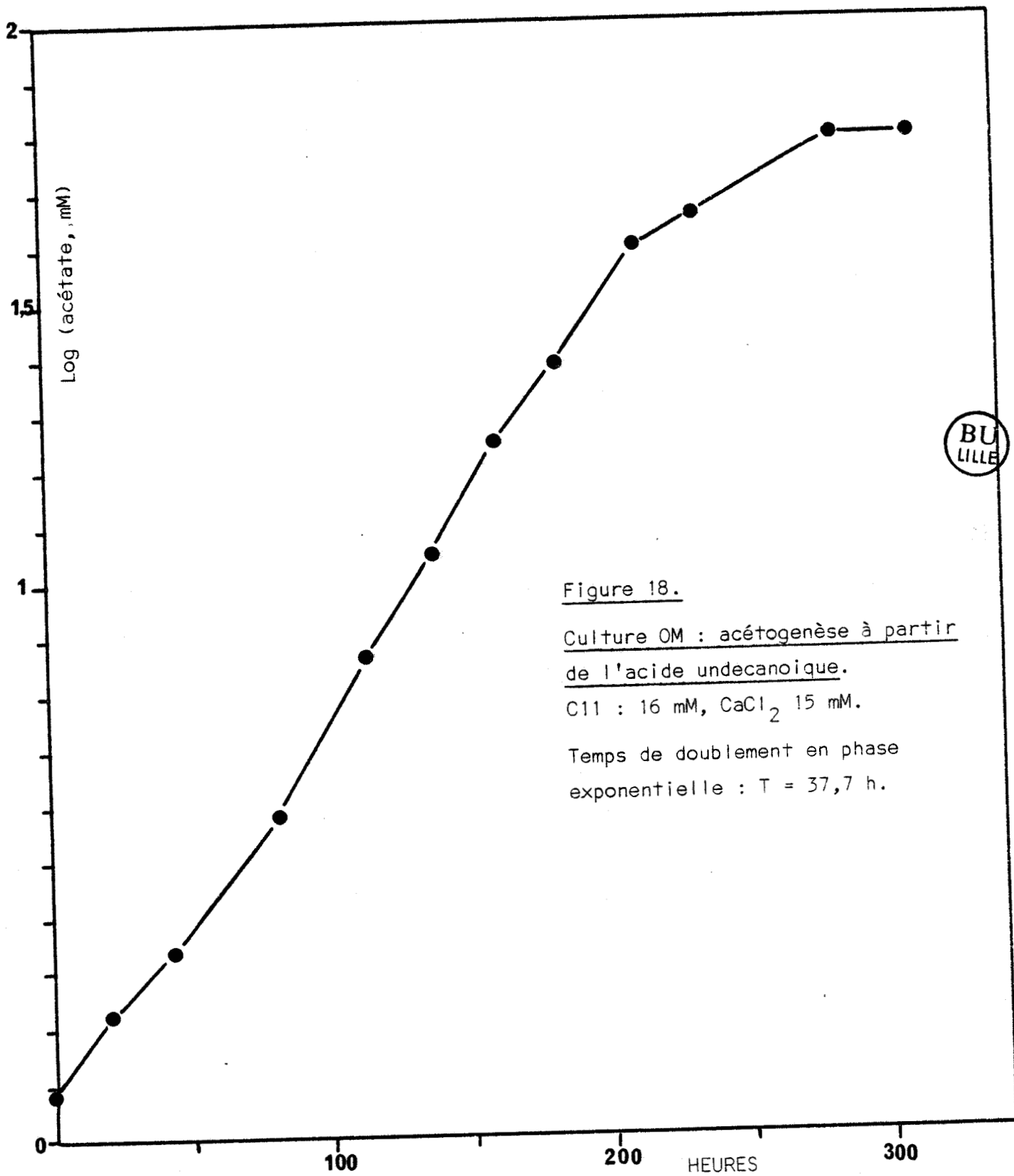
En faisant l'hypothèse d'une corrélation linéaire entre la croissance bactérienne et la production des métabolites (acétate et méthane), le taux de croissance de la coculture est estimé par le taux d'apparition des produits sur la partie exponentielle de la cinétique de fermentation. Le temps de doublement de la coculture est peu influencé par l'acide gras utilisé comme substrat : 27 heures sur acide butyrique, 30 heures sur acide myristique, 40 heures sur acide oléique (ROY - 1985). La cinétique de dégradation de l'acide undécanoïque par les culture OM ne met pas en évidence de phase de latence et la croissance est exponentielle (figures 17 et 18). Le temps de doublement de la coculture est de 38 heures. Acétate et propionate sont formés dans des proportions correspondant à la stoechiométrie théorique de dégradation de l'acide undécanoïque : $1 \text{ C}_{11} \rightarrow 4 \text{ C}_2 + 1 \text{ C}_3$. On observe une accumulation transitoire d'heptanoate, de valérate et de butyrate.

a - 4 Influence de l'accepteur d'hydrogène

Lorsque la culture syntrophe OM est inoculée en présence de Desulfovibrio et de sulfate (30 mM), le rendement en méthane est significativement diminué dès le premier repiquage : le flux

BU
LITE





d'hydrogène est orienté vers la production de sulfure. Après deux repiquages sur milieu sulfate, la production de méthane s'annule. Le temps de génération de la souche syntrophe réassociée à Desulfovibrio : OS, après trois repiquages sur milieu sulfate n'est pas significativement différent du temps de doublement de la souche syntrophe associée à M. hungatei : OM.

b - Culture acétogène utilisant l'acide stéarique.

La coculture STS qui provient de deux étapes de dilution en tubes fins est une association syntrophe entre une bactérie utilisant l'acide stéarique (voir la remarque précédente sur la qualité de l'acide utilisé) et Desulfovibrio qui utilise l'hydrogène. La culture associée à M. hungatei, SM n'a pu être régénérée après la seconde étape de dilution mais l'utilisatrice de stéarate de STS a été réassociée à M. hungatei en milieu liquide en absence de sulfate.

La souche syntrophe est morphologiquement voisine de la souche utilisant l'acide oléique et les conditions de croissance de OM et de STS sont identiques.

La culture STS n'utilise pas le milieu BHI + glucose. Les substrats dégradés sont les mêmes que ceux utilisés par l'association bactérienne OM, mis à part la non utilisation de l'heptanoate et de l'octanoate et la dégradation de l'acide oléique avec un temps de latence de 1 semaine environ.

Cependant, la coculture STS utilise également l'acétoïne (hydroxy 3 - butabone 2). Ce composé n'est pas utilisé par la souche de Desulfovibrio. Un contaminant du type Pelobacter a été mis en évidence, il dégrade l'acétoïne en éthanol, acétate, 2-3 butanediol et un composé détecté en chromatographie phase gaz mais non déterminé.

Ce Pelobacter n'utilise ni le butyrate, ni les acides gras à longues chaînes, que ce soit en culture pure ou réassocié à M. hungatei ou Desulfovibrio. Le substrat qui lui permet de se maintenir dans les milieux acides gras n'est pas défini et son élimination de la coculture STS n'a pu être obtenue.

4 - Discussion.

Dans les digesteurs alimentés avec l'effluent riche en lipides, les bactéries utilisatrices d'acides gras à longues chaînes sont dénombrées à un taux de 10^7 bactéries par millilitre, en mésophile et en thermophile. Ces bactéries sont des acétogènes productrices obligées d'hydrogène et en présence de sulfate, elles sont associées à une sulfatoréductrice utilisant l'hydrogène. Dans les dilutions et enrichissements, nous n'avons jamais mis en évidence de bactéries sulfatoréductrices du groupe des Sapovorans utilisant les A.G.L.C. en présence de sulfate ou capable de croître en syntrophie avec une méthanogène hydrogénophile.

Nous avons montré que la gamme des substrats de ces bactéries acétogènes syntrophes, tout au moins pour les bactéries isolées, s'étend des AGV aux A.G.L.C.. Ces souches bactériennes pourraient donc se maintenir dans les divers écosystèmes méthanogènes par leur capacité à réaliser l'acétogénèse à partir des acides gras volatils, intermédiaires de fermentation. L'aptitude à dégrader les glycérides ou les acides gras a été mise en évidence chez des boues de divers digesteurs méthanogènes dans lesquels ces composés ne sont pas les substrats carbonés dominants (exemple : réacteur monoétape sur résidus solides de carottes). Cela souligne le caractère ubiquiste des associations syntrophiques aptes à dégrader les lipides. Les souches acétogènes isolées, qui sont incapables de lyser les tryacylglycérols, ne possèdent pas la faculté de synthétiser des lipases et sont dépendantes des bactéries lipolytiques telle Anaerovibrio lipolytica. La dégradation des graisses n'est obtenue que par l'association de plusieurs types bactériens : lipolytiques, acétogènes et méthanogènes. Des concentrations élevées en acides gras à longues chaînes ont pu être utilisées pour les enrichissements et les cultures en discontinu grâce à l'emploi du chlorure de calcium. Sans utilisation de composés détoxifiants, les concentrations d'acides gras utilisées provoquent une inhibition complète de l'activité biologique. Parmi les divers composés testés pour leur potentialité de détoxification, seul le chlorure de calcium a une action suffisamment générale sur les divers acides gras. Le calcium agit par formation de savon d'acides gras très insolubles. Pour les acides saturés, un apport équivalente de calcium suffit à détoxifier le milieu. Dans le cas des acides insaturés, reconnus comme

très inhibiteurs, la quantité de calcium à ajouter doit être augmentée (rapport acide gras sur calcium inférieur à 1) afin de diminuer la concentration en acides gras libres jusqu'à une valeur inférieure au seuil de toxicité.

Les souches acétogènes syntrophes isolées dégradent les acides gras linéaires en acétate et hydrogène, lui-même utilisé par la souche hydrogénophile associée. Ces souches syntrophes sont capables de régénérer leurs coenzymes par excrétion d'hydrogène via une hydrogénase lorsque la pression partielle d'hydrogène est suffisamment faible. Les résultats obtenus sont en accord avec l'hypothèse de la β -oxydation : lors de la dégradation des acides saturés à nombre pair de carbone, le caproate apparaît transitoirement et lors de la dégradation de l'acide undécanoïque, une faible accumulation transitoire d'heptanoate et de valérate est observée et entraîne un décalage entre la production d'acétate et de propionate au cours de la cinétique de dégradation de l'acide gras. La présence d'acide butyrique lors de la dégradation de l'acide undécanoïque (C11) est contradictoire avec le mécanisme de la β -oxydation. Cependant, quelque soit l'acide gras utilisé, une faible concentration résiduelle en acide butyrique est souvent présente en fin de culture indiquant une voie possible de synthèse à partir de l'acétate formé.

L'accumulation d'acide acétique consécutive à l'utilisation de l'acide gras a théoriquement un effet défavorable sur la thermodynamique de la réaction d'acétogénèse. Dans les résultats obtenus, la dégradation des acides gras est complète et n'est pas limitée en fin de croissance par l'augmentation de la concentration en acide acétique.

On doit supposer que la souche de M. hungatei associée, impose dans le milieu une P_{H_2} suffisamment faible pour que les variations de concentration en acétate n'influent pas sur la vitesse de dégradation de l'acide gras.

Les acides gras à longues chaînes, tout comme les acides organiques pénètrent dans les cellules bactériennes sous forme acide libre où ils subissent la β -oxydation. La non utilisation des acides gras linéaires à plus de 18 carbones peut s'expliquer par les constantes de dissociation de leurs savons de calcium, trop faibles pour que la fraction acide libre soit significative. L'acide stéarique pur est très peu dégradé par la culture **OM**. La meilleure utilisation de cet acide,

lorsqu'il est en mélange avec l'acide palmitique, pourrait s'expliquer par la formation de savons plus accessibles mais les résultats ne nous permettent pas d'avancer d'hypothèses plus précises.

La présence d'intermédiaires de dégradation de l'acide undécanoïque (heptanoate, valérate) relargués dans le milieu en cours d'incubation, semble signifier que les acides gras peuvent, dans un premier temps, subir partiellement la β -oxydation avant d'être réassimilés et dégradés.

Les substrats des souches acétogènes isolées sont les acides gras linéaires saturés et insaturés. Les limitations à cette gamme sont : les acides gras à plus de 18 carbones, et le linoléate, acide gras triinsaturé. L'oléate et le linoléate sont utilisés et les deux hypothèses décrites dans la partie bibliographique peuvent être avancées pour expliquer l'utilisation de ces acides : soit, il y a hydrogénation par la bactérie syntrophe en préalable à la β -oxydation, soit l'acide est dégradé sous sa forme insaturée jusqu'à ce qu'une réaction d'isomérisation soit nécessaire à la poursuite de la β -oxydation.

L'absence de dégradation de l'acide linoléique s'explique par deux hypothèses : soit l'acide est trop inhibiteur, même à très faible concentration, soit comme cela a été observé dans le rumen où une bactérie seule ne peut hydrogéner complètement le linoléate en stéarate, la souche syntrophe serait incapable de réaliser cette transformation. Ce dernier point pourrait être confirmé par l'association en croissance sur acide linoléique de la culture **OM** avec une souche de Butyrivibrio. Cette bactérie hydrogène l'acide en un isomère monoinsaturé qui pourrait être utilisé par **OM**.

La phase de latence de la culture **SM** cultivée sur acide oléique aurait pu s'expliquer par une étape de synthèse d'enzymes nécessaires à l'hydrogénation du substrat, mais l'effet retard est conservé même après plusieurs repiquages de la culture sur acide oléique.

Les souches acétogènes syntrophes isolées présentent une étonnante spécificité de substrats : seuls sont utilisés les acides gras linéaires, pairs et impairs, saturés et insaturés avec les restrictions discutées précédemment. Le propionate n'est pas utilisé.

Cet acide gras constitue un cas à part dans la mesure où il n'est généralement pas dégradé par les bactéries syntrophes utilisant d'autres acides gras volatils, mais par des bactéries dont il est le principal substrat dans les digesteurs, telle Syntrophobacter wolinii (BOONE - 1980).

Les acides gras ramifiés ou hydroxylés, les méthylesters d'acides gras, les acides organiques ne sont pas utilisés. Les souches isolées se distinguent donc des souches décrites par SHELTON (1984) ou STIEB (1985) car elles n'utilisent ni l'isobutyrate, ni le 2-DL methylbutyrate. De plus, les souches isolées ne sont pas sporulantes. L'isoheptanoate, que Syntrophomonas wolfei (Mc INERNEY - 1981) dégrade en acétate et isovalérate n'a pas été testé, mais S. wolfei ne dégrade pas les A.G.L.C. en présence de calcium (résultats non cités).

Les limites de croissance de la coculture OM sont proches des limites décrites pour la souche JF1 de M. hungatei : optimum de pH entre 6,6 et 7,4, de température entre 30 et 37°C (FERRY - 1974).

De même, la présence d'acides aminés et de vitamines dans le milieu de croissance favorise le développement de M. hungatei (FERRY - 1977).

Les conditions de croissance de chacune des souches composant la coculture ne peuvent être précisées. Le temps de doublement de la culture OM est voisin de 40 heures sur les différents acides gras testés. Il est nettement plus court que le temps de génération de S. wolfei associé à M. hungatei sur butyrate (84 H). Lorsque S. wolfei est cultivé en association avec Desulfovibrio, le temps de doublement de la coculture est diminué (54 H). Par contre, dans nos résultats, la souche hydrogénéophile (méthanogène ou sulfatoréductrice) n'influe pas sur le temps de génération de la coculture.

La souche syntrophe de la culture OM possède les caractéristiques morphologiques et métaboliques des bactéries du genre Syntrophomonas dont S. wolfei est la seule espèce décrite.

Dans une publication en cours de rédaction nous proposons le classement de la bactérie qui a été isolée dans le genre Syntrophomonas et la création d'un nouveau nom d'espèce : Syntrophomonas bryantii en hommage à M.P. BRYANT qui est le premier à avoir introduit en microbiologie des anaérobies les notions de syntrophie et de transfert obligatoire d'hydrogène interspèces.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

CONCLUSION

Substrats

La méthanisation des résidus glucidiques et celle des lipides s'opposent sur bien des points. Les rendements de conversion des matières organiques en méthane obtenues lors de nos essais sont respectivement de 0,37 (glucides) et 0,65 (lipides) l. méthane par g. de matière organique. Ces valeurs confirment ce que l'étude bibliographique avait fait ressortir : les lipides, substrat très hydrogéné, sont transformés en méthane avec un très bon rendement de conversion mais sont également très avares à dispenser de l'énergie aux bactéries réalisant leur dégradation. De plus, d'un point de vue technologique, l'addition de chlorure de calcium est indispensable pour assurer la faisabilité de la méthanisation des acides gras à longues chaînes (problème de toxicité).

La séparation des phases d'hydrolyse et de méthanogenèse est un moyen efficace pour augmenter la vitesse de dégradation des résidus hémicellulosiques. En effet, lorsque la vitesse d'hydrolyse du substrat n'est pas limitante, l'avantage du procédé provient du maintien, dans un réacteur filtre deuxième étape, d'une biomasse méthanogène dont la capacité à dégrader les acides gras volatils est optimisée.

Par contre, la séparation des phases ne présente aucun intérêt pour la fermentation méthanique des lipides compte-tenu de l'accuité des problèmes de transferts obligés d'hydrogène entre les espèces bactériennes utilisant les acides gras à longues chaînes et de plus, les cinétiques d'acétogenèse à partir des acides gras et de méthanogenèse à partir de l'acétate sont comparables.

Température

A partir de déchets glucidiques polymérisés, on attribue généralement un avantage cinétique à l'étape d'hydrolyse thermophile. Dans nos résultats, nous avons constaté, en fonction des conditions de fermentation, un écart très variable entre les performances de méthanisation obtenues en mésophile et en thermophile. Ainsi, nous avons conclu à la supériorité du traitement thermophile pour la liquéfaction des déchets solides de légumes, au vue des

résultats sur déchets de pelage de carottes. Par contre, en utilisant un résidu de nature différente (haricots), les performances de liquéfaction quantitatives (rendement d'hydrolyse) et qualitatives (produits de fermentation) sont comparables à 35°C et à 60°C.

Il s'avère que, lorsque les réactions d'acétogenèse sont favorisées par une très faible pression partielle d'hydrogène, elle-même liée à une activation de la méthanogenèse de réduction, les résultats de méthanisation des déchets glucidiques ne présentent pas de différence par influence de la température. Lors de la méthanisation d'un substrat lipidique, les réactions d'acétogenèse sont une étape clé du processus. La remarque précédente explique que, en fermenteurs monoétapes où les transferts interspécifiques d'hydrogène sont favorisés, les résultats de méthanisation soient pratiquement inchangés par la conduite du pilote en mésophile ou en thermophile.

Pression partielle d'hydrogène

Si l'influence de la température est gommée lorsque les transferts interspécifiques d'hydrogène sont optimisés, à partir de substrats dont l'hydrolyse n'est pas limitante, les charges volumiques applicables aux réacteurs de méthanisation sont quand même limitées par le dépassement de la capacité des méthanogènes hydrogénophiles à maintenir une pression partielle d'hydrogène très faible : les coenzymes réduits produits au cours de la fermentation sont alors régénérés par d'autres voies métaboliques que celle aboutissant au dégagement d'hydrogène et en particulier par la voie de synthèse du propionate à partir de l'acétate et de l'hydrogène.

D'autre part, certains résultats nous laissent penser que la présence d'hydrogène moléculaire à faible concentration pourrait avoir un effet négatif sur la méthanogenèse à partir de l'acétate. Cette observation a été faite lors de la dégradation simultanée d'acides gras à longues chaînes et d'acide acétique mais ce résultat repose sur des différences de vitesses apparentes de dégradation d'acétate, en présence ou non d'AGLC, vitesses qui sont en fait la résultante des cinétiques d'utilisation et de néoformation de l'acide acétique. L'utilisation d'acétate marqué pourra nous permettre de comparer les vitesses réelles de consommation et de confirmer ou d'infirmer ce résultat.

Microbiologie

Dans les flores adaptées sur les substrats (glucides et lipides), la densité (10^7 bactéries par ml) et probablement la nature des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène sont comparables. A partir des lipides, ces bactéries convertissent la majeure partie du carbone organique en substrats des méthanogènes, tandis que sur substrat glucidique, leur rôle est d'éviter l'accumulation des intermédiaires de fermentation dans le milieu.

Dans les digesteurs méthanogènes traitant des déchets végétaux, les bactéries méthanogènes rencontrées classiquement sont des filaments de type Methanothrix ou des sarcines. Nous avons constaté l'absence, dans les réacteurs alimentés en continu par un effluent riche en lipides, de filaments acétoclastes et une prédominance des formes sarcines. Un bacille acétoclaste thermophile à également été enrichi sur un tel substrat. De plus, si en thermophile les méthanogènes hydrogénophiles sont d'un type classique morphologiquement voisin de Methanobacterium thermoautotrophicum, en mésophile les bacilles de type Methanospirillum, présents à l'origine dans les boues, ont été lessivés et les bactéries du genre Methanogenium prédominent. Deux pressions de sélection jouent sur la modification des flores des digesteurs alimentés par l'effluent lipidique : la présence des acides gras à longues chaînes et la minéralisation du milieu (sodium et calcium).

Bactéries acétogènes syntrophes

La dégradation complète des lipides en anaérobiose nécessite l'association minimale de quatre types bactériens : une telle culture modèle pourrait être reconstituée à partir de : Anaerovibrio lipolytica, Syntrophomonas bryantii, Methanospirillum hungatei et Methanosarcina mazei.

La bactérie acétogène syntrophe isolée, S. bryantii, oxyde les AGLC par un mécanisme assimilé à la β -oxydation. Cette souche APOH utilise un très large spectre d'acides, du butyrate au linoléate, mais seul les acides à chaînes linéaires sont dégradés.

La nécessité d'ajouter du calcium dans les milieux de culture pour lever l'inhibition par les acides gras longs à pour effet de diminuer la concentration en acides assimilables : quelque soit la concentration en acides gras initiale, si il y a apport stoechiométrique de calcium, la concentration en acides gras libres dépend directement de la constante de dissociation du savon de calcium. La vitesse de dégradation de l'acide, dans ces conditions, est liée, comme nous l'avons noté dans notre publication (annexe 3), à cette constante de dissociation et le temps de génération optimal de Syntrophomonas

bryantii est obtenu par culture sur acide laurique ou myristique, acides gras à longues chaînes pour lesquels la constante de dissociation des savons de calcium est plus élevée mais ne conduit pas à la libération d'une concentration en acides gras libres toxique pour la population bactérienne. L'isolement d'une bactérie acétogène syntrophe utilisant les acides gras à longues chaînes est une étape importante pour la poursuite des recherches sur le catabolisme de ces acides en anaérobiose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMSE A.D. and C.T.M. VELZEBOER. 1982.
Features of a Clostridium, strain CV-AA1, an obligatory anaerobic bacterium producing acetic acid from methanol. *Antonie van Leeuwenhoek*. 48:305-313.
- ADAMSE A.D., M.H. DEINEMA and A.J.B. ZEHNDER. 1984.
Studies on bacterial activities in aerobic and anaerobic waste water purification. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 50:665-682.
- AHRING B.K. and P. WESTERMANN. 1984.
Isolation and characterization of a thermophilic, acetate-utilizing methanogenic bacterium. *FEMS. Microbiol. Lett.* 25:47-52.
- ALBAGNAC G., J.P. TOUZEL et J.N. MORFAUX. 1981.
Epuration par fermentation méthanique des effluents de conserverie de légumes, étude en laboratoire. *Trib. Cebedeau*. 455:411-420.
- ALBAGNAC G. et D. VERRIER. 1983.
Méthanisation des effluents d'industries agro-alimentaires. *Biomasse actualités. Spécial n°2*:17-21.
- ALBAGNAC G., E. SAMAIN, H.C. DUBOURGUIER, F. ROY et J.P. TOUZEL. 1984.
Exemples d'interactions métaboliques dans les écosystèmes méthanogènes. Réunion des microbiologistes de l'INRA. Chantilly.
- ARCHER D.B. 1983.
The microbiological basis of process control in methanogenic fermentation of soluble wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 5:162-170.
- ASINARI DI SAN MARZANO C.M., R. BINOT, T. BOL, J.L. FRIPIAT, J. HUTSCHEMAKERS, J.L. MELCHIOR, I. PEREZ, H. NAVEAU and E.J. NYNS. 1981.
Volatile fatty acids, an important state parameter for the control of the reliability and the productivities of methane anaerobic digestions. *Biomass*. 1:47-59.
- BACQUES C., N. THI CUC, M. SERUSCLAT, A. DORIER and J.P. PERRET. 1983.
Etude in vitro de l'activité lipasique de souches bactériennes isolées de caecum de lapins sur la trioleine marquée au carbone 14. *Ann. Nutr. Metab.* 27:145-152.
- BAILIE A.G., T.D. WILSON, R.K. O'BRIEN, J.M. BEEBE and J.D. STUART. 1982.
HPLC analysis of underivatized fatty acids in margarines. *J. Chromatogr. Sci.* 20:466-470.
- BARRY M. and E. COLLERAN. 1982.
Anaerobic digestion of silage effluent using an upflow fixed bed reactor. *Agric. Wastes*. 4:231-239.
- BARRY M. and E. COLLERAN. 1984.
Silage effluent digestion by an upflow anaerobic filter. *Water Res.* 18:827-832.

- BEGASHET H. et M. FLORENTZ. 1985.
Développement de la filtration anaérobie sur matériau granulaire fin.
T.S.M. l'eau. 80^{ème} année n°2:93-95.
- BEN BASSAT A., R. LAMED and J.G. ZEIKUS. 1981.
Ethanol production by thermophilic bacteria: metabolic control of end
product formation in Thermoanaerobium brockii. J. Bacteriol. 146:192-
199.
- BOBICHON L. 1981.
Les limites de la voie microbiologique pour la production des grands
intermédiaires chimiques industriels. Annales des mines. Janv.
1981:57-62.
- BOENING P.H. and V.F. LARSEN. 1982.
Anaerobic fluidized bed whey treatment. Biotechnol. Bioeng. 24:2539-
2556.
- BOONE D.R. and M.P. BRYANT. 1980.
Propionate-degrading bacterium Syntrophobacter wolinii sp. nov. gen.
nov, from methanogenic ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 40:626-
632.
- BOONE D.R. 1984.
Propionate exchange reactions in methanogenic ecosystems. Appl.
Environ. Microbiol. 48:863-864.
- BORIES A. et J. MAUGENET. 1979.
Intérêts de la fermentation anaérobie appliquée aux eaux résiduaires à
forte concentration en carbone. C. R. Acad. Agric. 5:453-460.
- BORIES A. 1980.
Fermentation méthanique avec séparation des phases acidogène et
méthanogène appliquée au traitement des effluents à forte charge
polluante (distilleries). Ann. Technol. Agric. 29:509-528.
- BORIES A. 1981.
Méthanisation des eaux résiduaires de distilleries. Trib. Cebedeau.
456:475-483.
- BORIES A., J. RAYNAL and J.P. JOVER. 1982.
Fixed film reactor with plastic media for methane fermentation of
distilleries waste waters. Energy from biomass:567-571. Second E.C.
conference, Berlin.
- BOULENGER P., B. VERSPRILLE, K.C. PETTE et R.J. ZOETEMEYER. 1982.
Digestion méthanique des effluents. Application du procédé Biothane
U.A.S.B. en sucreries-distilleries. Ind. Alim. Agric. 7-8:565-569.
- BRATBAK G. and I. DUNDAS. 1984.
Bacterial dry matter content and biomass estimations. Appl. Environ.
Microbiol. 48:755-757.
- BREURE A.M. and J.G. VAN ANDEL. 1983.
Hydrolysis and acidification of gelatine. (poster) A.W.W.T.
Noordwijkerhout, Netherlands.

- BRONDEAU P. et Ph. GIRARDON. 1982.
Procédé Biopural. Traitement par filtre anaérobie des effluents liquides de l'industrie agro-alimentaire et de l'élevage. Energy from biomass: 565-566. Second E.C. conference. Berlin.
- BRONDER M., H. MELL, E. STUPPERICH and A. KROGER. 1982.
Biosynthetic pathways of Vibrio succinogenes growing with fumarate as terminal electron acceptor and sole carbon source. Arch. Microbiol. 131:216-223.
- BRYANT M.P. 1977.
Experiments on syntrophic formation of methane by mixtures of non methanogenic bacteria with H₂-utilizing methanogenic bacteria. Summary of results obtained in the laboratory of N. PFENNIG, institute for microbiology, Göttingen, sept. 1976- feb. 1977.
- BRYANT M.P. 1979.
Microbial methane production. Theoretical aspects. J. Anim. Sci. 48:193-201.
- CANAS-RODRIGUEZ A. and H.W. SMITH. 1966.
The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits. Biochem. J. 100:79-82.
- CENNI F., G. DONDO and F. TOMBETTI. 1982.
Anaerobic digestion of tannery wastes. Short communication. Agric. Wastes. 4:241-243.
- CHIN K.K. and K.K. WONG. 1983.
Thermophilic anaerobic digestion of palm oil mill effluent. Water Res. 17:993-995.
- CHYNOWETH D.P., S. GHOSH and M.L. PARCKER. 1979.
Anaerobic processes. J.W.P.C.F. 51:1200-1214.
- COHEN A., R.J. ZOETEMEYER, A. VAN DEURSEN and J.G. VAN ANDEL. 1979.
Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation. Water Res. 13:571-580.
- COHEN A., A.M. BREURE, J.G. VAN ANDEL and A. VAN DEURSEN. 1980.
Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose. 1-Maximum COD-turnover rate during continuous operation. Water Res. 14:1439-1448.
- COHEN A. 1983.
Two phase digestion of liquid and solid wastes. In: Third international symposium on anaerobic digestion. Boston-1983.
- COHEN A., W.A.A. KOEVOETS and R.J. ZOETEMEYER. 1983.
Fast anaerobic digestion of solid vegetable wastes on semi-technical scale. (poster) In: Anaerobic waste water treatment- Noordwijkerhout, Netherlands.
- COLLERAN E, M. BARRY, A. WILKIE and P.J. NEWELL. 1982.
Anaerobic digestion of agricultural wastes using the upflow anaerobic filter design. Process. Biochem. Mar. 1982:12-17.

- COUPLET P. et G. ALBAGNAC. 1978.
La digestion anaérobie. Application aux industries agro-alimentaires.
Ann. Technol. Agric. 27:533-564.
- COUPLET P., G. ALBAGNAC et J.N. MORFAUX. 1979.
Digestion anaérobie en deux étapes des effluents de type agro-
alimentaire. Etude sur pilote de laboratoire. Tri. Cebedeau. 425:111-
122.
- CSEH T., L. CZAKO, J. TOTH and R.P. TENGEDY. 1984.
Two phase anaerobic fermentation of liquid swine waste to methane.
Biotechnol. Bioeng. 26:1425-1429.
- DAIGGER G.T. and C.P.L. GRADY. 1982.
The dynamics of microbial growth on soluble substrates. Water Res.
16:365-382.
- DAINTY R.H., C.M. HIBBARD and R.A. EDWARDS. 1984.
Cellular fatty acids of *Streptobacteria* isolated from vacuum packaged
meats. System. Appl. Microbiol. 5:233-240.
- DATTA R. 1981.
Acidogenic fermentation of lignocellulose. Acid yield and conversion of
components. Biotechn. Bioeng. 23:2167-2170.
- DATTA R. 1981.
Acidogenic fermentation of corn stover. Biotechn. Bioeng. 23:61-77.
- DE BAERE L.A., M. DEVOCHT, P. VAN ASSCHE and W. VERSTRAETE. 1984.
Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic
associations. Water Res. 18:543-548.
- DOELLE H.W. 1975.
Bacterial metabolism. Second edition. Academic Press.
- DE LA TORRE I. and G. GOMA. 1981.
Characterization of anaerobic microbial culture with high acidogenic
activity. Biotechn. Bioeng. 23:185-199.
- DE MAN J.C. 1975.
The probability of most probable numbers. Europ. J. Appl. Microbiol.
1:67-68.
- DEMEYER D.I. and H.K. HENDERICKX. 1967.
The effect of C:18 unsaturated fatty acids on methane production in
vitro by mixed rumen bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 137:484-497.
- DEYMIE B., J.L. MULTON et D. SIMON. 1981.
Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-
alimentaires. Tome 4: Analyse des constituants alimentaires. Technique
et Documentation. Paris.
- DIJKHUIZEN L. and W. HARDER. 1984.
Current views on the regulation of autotrophic carbon dioxide fixation
via the Calvin cycle in bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 50:473-487.

- DUBOURGUIER H.C., J.P. TOUZEL et G. ALBAGNAC. 1982.
Progrès récents en méthanogenèse. Rapport de synthèse, INRA T.A. de
Villeneuve d'Ascq.
- DUFF S.J.B. and K.J. KENNEDY. 1982.
Effect of hydraulic and organic overloading on thermophilic downflow
stationary fixed film (DSFF) reactor. *Biotechnol. Lett.* 4:815-820.
- DUFF S.J.B. and L. VAN DEN BERG. 1982.
Treatment of fish processing waste using the downflow stationary fixed
film (DSFF) reactor. *Biotechnol. Lett.* 4:821-826.
- EIKMANN B., R. JAENCHEN and R.K. THAUER. 1983.
Propionate assimilation by methanogenic bacteria. *Arch. Microbiol.*
136:106-110.
- EL HAG G.A. and T.B. MILLER. 1972.
Evaluation of whisky distillery by products. 4: The reduction in
digestibility of malt distillers grains by fatty acids and the
interaction with calcium and other reversal agents. *J. Sci. Fd. Agric.*
23:247-258.
- ESCALANTE-SEMERANA J.C., J.A. LEIGH and R.S. WOLFE. 1984.
New insights into the biochemistry of methanogenesis from H₂ and CO₂.
Proc. 4th. Int. Symp. Microbial. Growth on Cl Compounds. Ed. R.L.
CRAWFORD, R.S. HANSON.:191-198.
- EYSSEN H. and A. VERHULST. 1984.
Biotransformation of linoleic acid and bile acids by Eubacterium
lentum. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:39-43.
- FEILDEN N.E.H. 1983.
The theory and practice of anaerobic digestion reactor design. *Process.*
Biochem. Oct. 1983:34-37.
- FERNANDES X. and F.E. MOSEY. 1983.
Monitoring of hydrogen concentration of biogas. A.W.W.T.
Noordwijkerhout. Netherlands.
- FERRY J.G., P.H. SMITH and R.S. WOLFE. 1974.
Methanospirillum, a new genus of methanogenic bacteria, and
characterization of Methanospirillum hungatii sp. nov.. *Int. J. Syst.*
Bacteriol. 24:465-469.
- FERRY J.G. and R.S. WOLFE. 1977.
Nutritional and biochemical characterization of Methanospirillum
hungatii. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:371-376.
- FINCK J.D. et G. GOMA. 1983.
Les principes fondamentaux des mécanismes. *Biomasse actualités. Spécial*
n°2:5-11.
- FONTY G., Ph. GOUET and Y. RIOU. 1979.
Effect of milk composition on the gastrointestinal microflora of
artificially reared young rabbits. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*
19:567-571.

- FREA J.I. 1984.
Methanogenesis: its role in the carbon cycle. In: Microbial chemoautotrophy. W.R. STROHL and O.H. TUOVINEN Eds.:227-253. Ohio State University Press.
- FULCO A.J. 1983.
Fatty acid metabolism in bacteria. Prog. Lipid. Res. 22:133-160.
- GALBRAITH H., T.B. MILLER, A.M. PATON and J.K. THOMPSON. 1971.
Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergo-calciferol and cholesterol. J. Appl. Bact. 34:803-813.
- GHOSH S., J.R. CONRAD and D.L. KLASS. 1975.
Anaerobic acidogenesis of wastewater sludge. J.W.P.C.F. 47:30-45.
- GHOSH S. and D.L. KLASS. 1978.
Two phase anaerobic digestion. Process. Biochem. Apr.1978:18-24.
- GHOSH S., A. SAJJAD, M.P. HENRY and R.A. BLEAKNEY. 1983.
Two stage upflow anaerobic digestion of concentrated sludge. Biotechn. Bioeng. 13:351-370.
- GOLDBERG I. and C.L. COONEY. 1981.
Formation of short chain fatty acids from H₂ and CO₂ by a mixed culture of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41:148-154.
- GOUET Ph. and G. FONTY. 1979.
Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19:553-566.
- GRAU P., P.M. SUTTON, M. HENZE, S. ELMALEH, C.P. GRADY, W. GUJER and J. KOLLER. 1982.
Recommended notation for use in the description of biological wastewater treatment process. Water Res. 16:1501-1505.
- GUJER W. and A.J.B. ZEHNDER. 1983.
Conversion process in anaerobic digestion. Wat. Sci. Tech. Copenhagen. 15:127-167.
- HANAKI K., T. MATSUO and M. NAGASE. 1981.
Mechanism of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. Biotechn. Bioeng. 23:1591-1610.
- HARFOOT C.G. 1978.
Lipid metabolism in the rumen. Prog. Lipid. Res. 17:21-54.
- HENDERSON C. 1971.
A study of the lipase produced by Anaerovibrio lipolytica, a rumen bacterium. J. Gen. Microbiol. 65:81-89
- HENDERSON C. 1973.
The effects of fatty acids on pure culture of rumen bacteria. J. Agric. Sci. Camb. 81:107-112.

- HEUKELEKIAN H. and P. MUELLER. 1958.
Transformation of some lipids in anaerobic sludge digestion. *Sewage and ind. Wastes*. 30:1108-1120.
- HOBSON P.N. and S.O. MANN. 1961.
The isolation of glycerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* 25:227-240.
- HOBSON P.N. and B.G. SHAW. 1976.
Inhibition of methane production by Methanobacterium formicicum. *Water. Res.* 10:849-852.
- HORTMANN L. and H.J. REHM. 1984.
Inhibitory effect of undecanoic acid on the biosynthesis of long-chain fatty acids in Mortierella isabellina. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:139-145.
- HUNKOVA Z. and A. FENCL. 1978.
Toxic effects of fatty acids on yeast cells: possible mechanisms of action. *Biotechn. Bioeng.* 20:1235-1247.
- IRANI R.R. and E.F. CALLIS. 1960.
Metal complexing by phosphorus compound. 2: Solubilities of calcium soap of linear carboxylic acids. *J. Phys. Chem.* 64:1741-1743.
- JANSEN K., R.K. THAUER, F. WIDDEL and G. FUCHS. 1984.
Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formate, carbon dioxide, carbon monoxide and acetate assimilation by Desulfovibrio baarsii. *Arch. Microbiol.* 138:257-262.
- JERIS J.S. and P.L. Mc CARTY. 1965.
The biochemistry of methane fermentation using C¹⁴ tracers. *J.W.P.C.F.* 27:178-192.
- JOERGENSEN M.H. 1978.
Anaerobic formation of volatile acids in a chemostat. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6:181-187.
- KEFFORD B., S. KJELLEBERG and K.C. MARSHALL. 1982.
Bacterial scavenging: utilization of fatty acids localized at a solid-liquid interface. *Arch. Microbiol.* 133:257-260.
- KEMP P. and D.J. LANDER. 1983.
The hydrogenation of ω -linolenic acid by pure cultures of two rumen bacteria. *Biochem. J.* 216:519-522.
- KEMP P. and D.J. LANDER. 1984.
Hydrogenation in vitro of ω -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130:527-533.
- KENNEDY K.J. and L. VAN DEN BERG. 1982.
Anaerobic digestion of piggery waste using a stationary fixed film reactor. *Agric. Wastes.* 4:151-158.

- KENNEDY K.J. and L. VAN DEN BERG. 1982.
Stability and performance of anaerobic fixed film reactors during hydraulic overloading at 10-35°C. *Water Res.* 16:1391-1398.
- KHAN A.W., S.S. MILLER and W.D. MURRAY. 1983.
Development of a two phase combination fermenter for the conversion of cellulose to methane. *Biotechn. Bioeng.* 25:1571-1579.
- KING T. and J.G. ZEIKUS. 1981.
Comparison of extracellular cellulase activities of Clostridium thermocellum LQRI and Trichoderma reesei QM 9414. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:231-240.
- KNOL W., M.M. VAN DER MOST and J. DE WAART. 1978.
Biogas production by anaerobic digestion of fruit and vegetable waste. A preliminary study. *J. Sci. Fd. Agric.* 29:822-830.
- KOSTER I.W. 1984.
Liquefaction and acidogenesis of tomatoes in an anaerobic two-phase solid-waste treatment system. *Agric. Wastes.* 11:241-251.
- KUGELMAN I. and P.L. Mc CARTY. 1965.
Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. *J.W.P.C.F.* 37:97-116.
- LAANBROCK H.J. and N. PFENNIG. 1981.
Oxidation of short chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Arch. Microbiol.* 128:330-335.
- LAANBROEK H.J., T. ABEE and I.L. VOOGD. 1982.
Alcohol conversions by Desulfobulbus propionicus Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch. Microbiol.* 133:178-184.
- LEIGH J.A., F. MAYER and R.S. WOLFE. 1981.
Acetogenium kivui, a new thermophilic hydrogen oxidizing acetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* 129:275-280.
- LEPAGE G. and C.C. ROY. 1984.
Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lip. Res.* 25:1391-1396.
- LE RUYET P. 1984.
Hydrolyse et fermentation des polyosides végétaux par les bactéries anaérobies. Thèse de Docteur-Ingénieur en biologie et physiologie végétale. Université des Sciences et Techniques de LILLE 1.
- LE RUYET P, H.C. DUBOURGUIER and G. ALBAGNAC. 1984.
Thermophilic fermentation of cellulose and xylan by methanogenic enrichment cultures: preliminary characterization of main species. *System. Appl. Microbiol.* 5:247-253.
- LESAGE E. et P. ABIET. 1952.
Gaz de fumier. Dernières techniques de production et d'utilisation. La diffusion nouvelle du livre. Paris.

- LESCURE J.P. et P. BOURLET. 1982.
Fermentations méthaniques. Sucrerie Française. avr.1982:127-131.
- LESCURE J.P. et P. BOURLET. 1984.
Bioconversion de pulpes de betteraves et de refus de lavoir. Ind. Aliment. Agric. 101:601-607.
- LETTINGA G., A.F.M. VAN VELSEN, S.W. HOBMA, W. DE ZEEUW and A. KLAPWIJK. 1980.
Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechnol. Bioeng. 22:699-734.
- LETTINGA G., L.W. HULSHOFF POL, W. WIEGANT, W. DE ZEEUW, S.W. HOBMA, P. GRIN, R. ROERSMA, S. SAYED and A.F.M. VAN VELSEN. 1983.
Upflow sludge blanket process. Third Int. Conf. Anaerobic Digestion. Boston.
- LOEHR R.C. and J.C. ROTH. 1968.
Aerobic degradation of long chain fatty acid salts. J.W.P.C.F. 40:385-403.
- LOROWITZ W.H. and M.P. BRYANT. 1985.
Anaerobic syntrophic bacterium that degrades long-chain fatty acids. Communication personnelle d'une publication à paraître.
- LUPTON F.S. and J.G. ZEIKUS. 1984.
Physiological basis for sulfate-dependent hydrogen competition between sulfidogens and methanogens. Curr. Microbiol. 11:7-12.
- Mc CARTY P. 1964.
Anaerobic waste treatment fundamentals. 3:Toxic materials and their control. Public Works. Nov. 1964:91-94.
- Mc INERNEY M.J., M.P. Bryant and N. PFENNIG. 1979.
Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. Arch. Microbiol. 122:129-135.
- Mc. INERNEY M.J. and M.P. BRYANT.1980.
Metabolic stages and energetics of microbial anaerobic digestion. First int. symp. anaer. digest. Stafford.
- Mc INERNEY M.J. and M.P. BRYANT. 1981.
Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of Methanosarcina barkeri and Desulfovibrio species and effect of H₂ on acetate degradation. Appl. Environ. Microbiol. 41:346-354.
- Mc. INERNEY M.J., M.P. BRYANT, R.B. HESPELL and J.W. COSTERTON. 1981.
Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 4:1029-1039.
- MACKIE R.I. and M.P. BRYANT. 1981.
Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. Appl. Environ. Microbiol. 41:1363-1373.

- MASSEY M.L. and F.G. POHLAND. 1978.
Phase separation of anaerobic stabilization by kinetic control.
J.W.P.C.F. 50:2204-2222.
- MILLER T.L. and M.J. WOLIN. 1974.
A serum bottle modification of the HUNGATE technique for cultivating obligate anaerobes. Appl. Microbiol. 27:985-987.
- MOLETTA R. and G. ALBAGNAC. 1982.
A gas meter for low rates of gas flow: application to the methane fermentation. Biotechnol. Lett. 4:319-322.
- MORFAUX J.N., G. ALBAGNAC et J.P. TOUZEL. 1981.
Epuraton par fermentation méthanique des effluents de blancheur de petits pois. Sciences des aliments: 1:293-313.
- MOSEY F.E. 1981.
Anaerobic biological treatment of food industry waste waters. Wat. Pollut. Control. 80:273-291.
- MOUNFORT D.O. and M.P. BRYANT. 1982.
Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. Arch. Microbiol. 133:249-256.
- MOUNFORT D.O., W.J. BRULLA, L.R. KRUMHOLZ and M.P. BRYANT. 1984.
Syntrophus buswellii gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:216-217.
- NAMORY M., D. VERRIER et G. ALBAGNAC. 1982.
Etudes des possibilités d'épuration des effluents d'huileries de palme par fermentation méthanique mésophile. Rapport d'étude INRA V.A.
- NIEMAN C. 1954.
Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. Bacterial Rev. 18:147-163.
- NIWANO M., E. MIRUMACHI, M. URAMOTO and K. ISONO. 1984.
Fatty acids as inhibitors of microbial cell wall synthesis.(note). Agric. Biol. Chem. 48:1359-1360.
- NORRMAN J. and B. FROSTELL. 1977.
Anaerobic wastewater treatment in a two-stage reactor of a new design. P.I.W.C. Purdue University:387-395.
- NOVAK J.T. and D.A. CARLSON. 1970.
The kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. J.W.P.C.F. 42:1932-1943.
- PANKHANIA I.P. and J.P. ROBINSON. 1984.
Heavy metal inhibition of methanogenesis by Methanospirillum hungatei GP1. FEMS. Microbiol. Lett. 22:277-281.
- PATEL G.B., L.A. ROTH, L. VAN DEN BERG and D.S. CLARK. 1976.
Characterization of a strain of Methanospirillum hungatei. Can. J. Microbiol. 22:1404-1410.

- PETROFF D. 1983.
Fermentation méthanique de polysubstrats. Aspects cinétiques et microbiologiques. Thèse de Docteur-Ingénieur en microbiologie. Université Claude BERNARD. Lyon 1.
- PETROFF D., J.P. TOUZEL and G. ALBAGNAC. 1985.
Isolation and characterization of a new thermophilic acetoclastic methanogen, strain CHTI 55. Syst. Appl. Bacteriol. Sous presse.
- PFENNIG N., F. WIDDEL and H.G. TRUPER. 1981.
The dissimilatory sulfate reducing bacteria. The prokaryotes, vol.1, chap.74, Springer verlag.
- PIPYN P. and W. VERSTRAETE. 1981.
Lactate and ethanol as intermediates in two phase anaerobic digestion. Biotechn. Bioeng. 23:1145-1154.
- POLAN C.E., J.J. Mc NEIL and S.B. TOVE. 1964.
Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. J. Bacteriol. 88:1056-1064.
- PRINS R.A., C.J. VAN NEVEL and D.I. DEMEYER. 1972.
Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 38:281-287.
- REDDY C.A., M.P. BRYANT and M.J. WOLIN. 1972.
Characteristics of S organism isolated from Methanobacillus omelianskii. J. Bacteriol. 109:539-545.
- REINSCH J., C. ROJAS and J.T. Mc FARLAND. 1983.
Kinetic methods for the study of the enzyme systems of β -oxidation. Arch. Biochem. Biophys. 227:21-30.
- RIJKENS B.A. 1982.
Two phase process for the anaerobic digestion of solid wastes. First results of a pilot-scale experiment. Energy from biomass. Berlin. Second E.C. conference:572-580.
- RITTMANN B.E., A.M. ASCE, C.E. STRUBLER and T. RUZICKA. 1982.
Anaerobic filter pretreatment kinetics. J. Environ. Engin. Div. A.S.C.E.108:900-912.
- ROY F. 1982.
Etude des phases d'acidogenèse et de méthanogenèse de la méthanisation thermophile des sucres simples. Mémoire de D.E.A. Université des Sci. et Techn. de LILLE 1.
- ROY F., D. VERRIER and M. FLORENTZ. 1983.
Importance of the liquefaction step in a two stage methanisation process of solid cannery vegetable wastes.(poster) A.W.W.T. Noordwijkerhout. Netherlands.
- ROY F., G. ALBAGNAC and E. SAMAIN. 1985.
Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long-chain fatty acids. Appl. Environ. Microbiol. 49:702-705.

- ROZZI A. and W. VERSTRAETE. 1981.
Calculation of active biomass and sludge production vs waste composition in anaerobic contact process. Trib. Cebedeau. 455:421-427.
- SALANITRO J.P. and P.A. MUIRHEAD. 1975.
Quantitative method for the gas chromatographic analysis of short chain monocarboxylic and dicarboxylic acids in fermentation media. Appl. Microbiol. 29:374-381.
- SAMAIN E., G. ALBAGNAC, H.C. DUBOURGUIER and J.P. TOUZEL. 1982.
Characterization of a new propionic acid bacterium that ferment ethanol and displays a growth factor dependent association with a gram-negative homoacetogen. FEMS Microbiol. Lett. 15:69-74.
- SAMAIN E. 1983.
Métabolisme des composés intermédiaires de la fermentation méthanique. Isolement et caractérisation des bactéries impliquées: influence des conditions de culture sur leur métabolisme. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle. Biochimie, Université des sci. et techn. de LILLE 1.
- SAMAIN E., H.C. DUBOURGUIER and G. ALBAGNAC. 1984.
Isolation and characterization of Desulfobulbus elongatus sp. nov., from a mesophilic industrial digester. Syst. Appl. Microbiol. 5:391-401.
- SAYED S., W. DE ZEEUW and G. LETTINGA. 1984.
Anaerobic treatment of slaughterhouse waste using a flocculant UASB reactor. Agric. Wastes. 11:197-226.
- SCHRAA G. and J. JEWELL. 1984.
High rate conversions of soluble organics with a thermophilic anaerobic attached film expanded bed. J.W.P.C.F. 56:226-232.
- SHELLER W.A. 1982.
Commercial experience with a plug flow anaerobic digester for the production of biogas from agricultural and food processing wastes. Energy from Biomass. Second E.C. conference. Berlin:492-496.
- SCHINK B. and M. STIEB. 1983.
Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, Pelobacter venetianus sp. nov.. Appl. Environ. Microbiol. 45:1905-1913.
- SHELTON D.R. and J.M. TIEDJE. 1984.
Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol. 48:840-848.
- SHEU C.W. and E. FREESE. 1972.
Effects of fatty acids on growth and envelop proteins of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 111:516-524.
- SHIAN S., M. CHANG, Y. YE and W. CHANG. 1979.
The construction of simple biogas digesters in the province of Szechwan, CHINA. Agric. Wastes. 1:247-258.

- SLEAT R., R.A. MAH and R. ROBINSON. 1985.
Acetoanaerobium noterae gen. nov., sp. nov.: an anaerobic bacterium that forms acetate from H₂ and CO₂. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:10-15.
- SMITH M.R., S.H. ZINDER and R.A. MAH. 1980.
Microbial methanogenesis from acetate. Process Biochem. 15:34-39.
- SMITH M.R. and R.A. MAH. 1981.
2-bromoethanesulfonate: a selective agent for isolating resistant Methanosarcina mutants. Curr. Microbiol. 6:321-326.
- SOHNGEN N.L. 1910.
Sur le role du méthane dans la vie organique. Recueil des travaux chimiques des Pays Bas et de la Belgique. 29:238-274.
- SOURIE J.C. 1982.
La fermentation méthanique des fumiers bovins. Procédés discontinus. Aspects économiques. Séminaire méthane INRA LILLE.
- STAFFORD D.A. 1982.
The effects of mixing and volatile fatty acid concentrations on anaerobic digester performance. Biomass 2:43-55.
- STAFFORD D.A. 1983.
A novel high rate anaerobic digester capable of receiving low and high strength solids in waste feeds. Biotechnol. Lett. 5:639-642.
- STIEB M. and B. SCHINK. 1985.
Anaerobic oxidation of fatty acids by Clostridium bryantii sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. Arch. Microbiol. 140:387-390.
- SWELL L., E.C. TROUT, H. FIELD and C.R. TREADWELL. 1956.
Occurrence and nature of a fecal phosphorus-containing lipid. J. Biol. Chem. 223:743-750.
- SWITZENBAUM M.S. 1983.
Anaerobic fixed film wastewater treatment. Enz. Microb. Technol. 5:242-250.
- TEMPER U., J. WINTER and O. KANDLER. 1982.
Methane fermentation of wastes at mesophilic and thermophilic temperatures. Energy from Biomass:521-525. Second E.C. conference, Berlin.
- TESCH W., K. SCHNEIDER and R. BACHOFEN. 1983.
Performance of an anaerobic filter for purification and methane production from wastewater of a sugar refinery. Process Biochem. janv. 1983:34-37.
- THAUER R.K., K. JUNGERMANN and K. DECKER. 1977.
Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41:100-180.

- THAUER R.K. and J.G. MORRIS. 1984.
Metabolism of chemotrophic anaerobes: old views and new aspects.
The microbe, part 2. Prokaryotes and eukaryotes. Cambridge university
Press.
- THERKELSEN H.H. and D.A. CARLSON. 1979.
Thermophilic anaerobic digestion of a strong complex substrate.
J.W.P.C.F. 51:1949-1964.
- TOULLEC R., J.FLANZY et J. RIGAUD. 1968.
Dosage des lipides des fécès. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 8:281-
289.
- TOUZEL J.P., E. SAMAIN, G. ALBAGNAC et J.N. MORFAUX. 1981.
Microbiologie des digesteurs anaérobies de l'épuration des eaux
résiduelles. Ind. Alim. Agric. 98:833-842.
- TOUZEL J.P. and G. ALBAGNAC. 1983.
Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC3. FEMS
Microbiol. Lett. 16:241-245.
- VAN DEN BERG L. and K.J. KENNEDY. 1981.
Support materials for stationary fixed film reactors for high rate
methanogenic fermentations. Biotechnol. Lett. 3:165-176.
- VAN DEN BERG L. and K.J. KENNEDY. 1982.
Comparison of intermittent and continuous loading of stationary fixed
film reactors for methane production from wastes. J. Chem. Tech.
Biotechnol. 32:427-432.
- VAN DEN BERG L. and K.J. KENNEDY. 1983.
Comparison of advanced anaerobic reactors. Third Int. Conf. Anaerobic
Digestion. Boston.
- VED H.S., E. GUSTOW, V. MAHADEVAN and R.A. PIERINGER. 1984.
Dodecylglycerol. A new type of antibacterial agent which stimulates
autolysin activity in *Streptococcus faecium* ATCC 9790. J. Biolog. Chem.
259:8115-8121.
- VERRIER D., J.N. MORFAUX, G. ALBAGNAC and J.P. TOUZEL. 1982.
The french programme on methane fermentation. Biomass. 2:17-28.
- VERRIER D. et G. ALBAGNAC. 1982.
Etude des possibilités d'épuration des effluents d'huileries de palme
par fermentation méthanique thermophile. Rapport d'étude, INRA V.A.
- VERRIER D., F. ROY and M. FLORENTZ. 1983.
Two stage anaerobic digestion of solid vegetable wastes: bench scale
studies.(poster). Third Int. Symp. Anaerobic Digestion. Boston.
- VERRIER D. 1984.
Méthanisation d'effluents agro-alimentaires en réacteurs à cellules
fixées. Exemples d'applications et facteurs conditionnant la formation
et la structure des biofilms. Thèse de Docteur-Ingénieur présentée à
l'E.N.S.I.A.A. Villeneuve d'Ascq.

- VERSTRAETE W., L. DE BAERE and A. ROZZI. 1981.
Phase separation in anaerobic digestion: motives and methods. Trib. Cebedeau. 453:367-375.
- VOGELS G.D., C. VAN DER DRIFT, C.K. STUMM, J.T.M. KELTJENS and K.B. ZWART. 1984.
Methanogenesis: surprising molecules, microorganisms and ecosystems. Antonie van Leeuwenhoek. 50:557-567.
- WENG C.N. and J.S. JERIS. 1976.
Biochemical mechanisms in the fermentation of glutamic and oleic acids. Water Res. 10:9-18.
- WEIL J.H. 1979.
Biochimie générale. 3^{ème} édition. Masson éditeur.
- WELLINGER A, R. FISHER, V. LEHMANN et J.M. BESSON. 1981.
Production de biogaz à partir de lisier bovin et porcin dans des exploitations agricoles suisses. Trib. Cebedeau. 455:429-436.
- WIDDEL F. and N. PFENNIG. 1981.
Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. 1: Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of Desulfobacter postgatei gen. nov., sp. nov.. Arch. Microbiol. 129:395-400.
- WIDDEL F. and N. PFENNIG. 1982.
Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. 2: Incomplete oxidation of propionate by Desulfobulbus propionicus gen. nov., sp. nov.. Arch. Microbiol. 131:360-365.
- WIDDEL F., G.W. KOHRING and F. MAYER. 1983.
Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. 3: Characterization of the filamentous gliding Desulfonema limicola gen. nov., sp. nov. and Desulfonema magnum sp. nov.. Arch. Microbiol. 134:286-294.
- WILKIE A., G. FAHERTY and E. COLLERAN. 1982.
The effect of varying the support matrix on the anaerobic digestion of pig slurry in the upflow anaerobic filter design. In: Energy from Biomass. Second E.C. conference. Berlin.
- WINTER J.U. and C.L. COONEY. 1980.
Fermentation of cellulose and fatty acids with enrichments from sewage sludge. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn. 11:60-66.
- WOLFE R.S. 1979.
Biochemical pathways and control. In: First Int. Symp. Anaerobic Digestion . Cardiff.
- YOUNG J.C. and M.F. DAHAB. 1983.
Effect of media design on the performance of fixed-bed anaerobic reactors. Wat. Sci. Tech. Copenhagen. 15:369-383.
- ZEHNDER A.J.B., K. INGVORSEN and T. MARTI. 1981.
Microbiology of methane bacteria. In: Anaerobic Digestion 1981. Elsevier Biomedical Press.

- ZEIKUS J.G. 1979.
Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. Enzy.
Microb. Technol. 1:243-252.
- ZEIKUS J.G. 1980.
Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. Ann. Rev.
Microbiol. 34:423-464.
- ZEIKUS J.G. 1981.
Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion. In: Anaerobic
Digestion 1981. Elsevier Biomedical Press.
- ZERTRUCHE L. and R.R. ZALL. 1982.
A study of producing ethanol from cellulose using Clostridium
thermocellum. Biotechn. Bioeng. 24:57-68.
- ZINDER S.H., S.C. CARDWELL, T. ANGUISH, M. LEE and M. KOCH. 1984.
Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester:
Methanotherix sp. as an important acetoclastic methanogen. Appl.
Environ. Microbiol. 47:796-807.
- ZINDER S.H., T. ANGUISH and S.C. CARDWELL. 1984.
Effects of temperature on methanogenesis in a thermophilic (58°C)
digester. Appl. Environ. Microbiol. 47:808-813.
- ZINDER S.H. and M. KOCH. 1984.
Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a
thermophilic syntrophic coculture. Arch. Microbiol. 138:263-272.
- ZOETEMEYER R.J., A.J.C.M. MATTHIJSSEN, J.C. VAN DEN HEUVEL, A. COHEN and
C. BOELHOVER. 1982.
Anaerobic acidification of glucose in an upflow reactor. Biomass
2:187-199.
- ZOETEMEYER R.J., J.C. VAN DEN HEUVEL and A. COHEN. 1982.
- pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic
digester. Water Res. 16:303-311.
- ZOETEMEYER R.J., P. ARNOLDY, A. COHEN and C. BOELHOVER. 1982.
Influence of temperature on the anaerobic acidification of glucose in a
mixed culture forming part of a two-stage digestion process. Water Res.
16:313-321.

A N N E X E S

ACIDES GRAS A LONGUES CHAINES, SATURES ET INSATURES.

NOMBRE DE CARBONE : NOMENCLATURE : NOM USUEL : FORMULE GENERALE : MASSE MOL. : TEMP. FUSION :

C1	methanoique	formique	CH_2O_2	46	-
C2	ethanoique	acétique	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	60	-
C3	propanoique	propionique	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$	74	-
C4:0	n butanoique	butyrique	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	88	-6,5°C
C5:0	pentanoique	valérique	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$	102	-34,5°C
C6:0	n hexanoique	caproique	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$	116	-4°C
C7:0	heptanoique	-	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2$	130	-10°C
C8:0	n octanoique	caprylique	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$	144	16,3°C
C9:0	n nonanoique	pelargonique	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2$	158	12,5°C
C10:0	n decanoique	caprique	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$	172,3	31,3°C
C11:0	n undecanoique	-	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$	186,3	27,6°C
C12:0	n dodecanoique	laurique	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	200,3	44,0°C
C13:0	n tridecanoique	-	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2$	214,4	41,3°C
C14:0	n tetradecanoique	myristique	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	228,4	57,2°C
C15:0	n pentadecanoique	-	$\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$	242,4	52,4°C
C16:0	n hexadecanoique	palmitique	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	256,4	62,9°C
C16:1	9 hexadecenoique	palmitoleique	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$	254,4	-
C17:0	n heptadecanoique	margarique	$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$	270,5	61°C
C18:0	n octadecanoique	stéarique	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	284,5	69°C
C18:1	cis-9 octadece.	oleique	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	282,5	13,4°C
C18:1	cis-6 octadece.	petroselenique	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	282,5	-
C18:1	trans-9 octadece.	elaidique	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	282,5	45°C

ACIDES GRAS LINEAIRES - SUITE:

NOMBRE DE CARBONE : NOMENCLATURE : NOM USUEL : FORMULE GENERALE : MASSE MOL. : TEMP. FUSION :

C18:1	11 octadécénoïque	vaccénique	$C_{18}H_{34}O_2$	282,5	7°C
C18:2	cis-9,12 octadécadi.	linoléique	$C_{18}H_{32}O_2$	280,5	-
C18:3	cis-9,12,15 o.trié.	linoléinique	$C_{18}H_{30}O_2$	278,5	-
C18:3	cis-6,9,12 o.trié.	γ linoléinique	$C_{18}H_{30}O_2$	278,5	-
C18:3	9,11,13 octadécatri.	éléostéarique	$C_{18}H_{30}O_2$	278,5	-
C19:0	nonadécanoïque	-	$C_{19}H_{38}O_2$	298,5	68,6°C
C20:0	n eicosanoïque	arachidique	$C_{20}H_{40}O_2$	312,5	73,5°C
C20:1	eicosénoïque	gadoleique	$C_{20}H_{38}O_2$	310,5	-
C20:4	5,8,11,14 e.tétra.	arachidonique	$C_{20}H_{32}O_2$	304,5	-
C21:1	hénéicosanoïque	-	$C_{21}H_{42}O_2$	326,5	73,5°C
C22:0	n docosanoïque	béhénique	$C_{22}H_{44}O_2$	340,6	79,9°C
C22:1	docosénoïque	érucique	$C_{22}H_{42}O_2$	338,6	33,5°C
C23:0	tricosanoïque	-	$C_{23}H_{46}O_2$	354,6	78,5°C
C24:0	n tétracosanoïque	lignocérique	$C_{24}H_{48}O_2$	368,6	84,2°C
C24:1	cis-15 tétracosé.	nervonique	$C_{24}H_{46}O_2$	366,6	39°C
C26:0	n hétéacosanoïque	cérotique	$C_{26}H_{52}O_2$	394,6	88°C
C28:0	n octacosanoïque	montanique	$C_{28}H_{56}O_2$	422,6	90,4°C
C30:0	n triacontanoïque	mélissique	$C_{30}H_{60}O_2$	450,6	93°C

TWO-STAGE ANAEROBIC DIGESTION OF SOLID VEGETABLE WASTESBench-scale studies

D. VERRIER (*), F. ROY (**), M. FLORENTZ (**)

(*) INRA Station de Technologie Alimentaire
369, rue Jules Guesde
59650 VILLENEUVE D'ASCQ - France

(**) ANJOU RECHERCHE
52, rue d'Anjou
75008 PARIS - France

INTRODUCTION

This study compares single and two-stage digestion of vegetable waste from a cannery in northern France. The wastes consist of carrot parings, rich in hemicellulose and simple sugars.

Composition of the carrot parings

Dry matter g.kg ⁻¹	Volatile matter g.kg ⁻¹	Total COD g O ₂ .kg ⁻¹	% cellulose in the D.M.	TKN g N.kg ⁻¹
90.4	82.9	95.3	9.2	2.0

MATERIALS AND METHODS

. The two single-stage digesters are of the completely mixed type, have a 16 l volume, and are fed semi-continuously every day. The temperature is regulated at 35°C in one and 55°C in the other. These temperatures are the optimum mesophilic and thermophilic respectively for acetoclastic methanogenic bacteria.

. In the two-step process, the organic matter is first liquefied and then gazedified in a second methanization reactor. The system consists of:

- two completely mixed liquefaction reactors (7 l useful volume) regulated at 60°C and 35°C (optimum for growth of thermophilic and mesophilic hydrolytic bacteria). In these semi-continuous reactors with detention times shorter than the generation time of acetoclastic methanogenic bacteria, the phases have to be separated between the two steps. For this purpose the substrate to be

liquefied is partly diluted with the treated effluent of the second stage filter.

The withdrawn hydrolysate is strained (0.8 mm), and the fraction composed of coarse suspended solids is removed.

- an anaerobic upflow mesophilic (35°C) filter reactor (2.5 l useful volume ; PVC ring support; vacuum coefficient: 81 %). This reactor is continuously fed with the strained hydrolysate from the first stage. The filter's supernatant is recycled at its base (1 fermenter volume recycled in 20 mn per 4 h cycle).
- . The different digesters are inoculated with sludge from urban digesters.
- . The parameters used for the monitoring of the pilots are the following:
 - total dry matter, total volatile matter
 - total COD, soluble COD
 - volatile fatty acids - alcohols
 - organic acids (lactic; succinic)
 - total sugars
 - TKN, ammonia N
 - gas volume, composition

RESULTS

. Single-stage processes

The main results are summarized in Table I. The limit loads are those at which propionic acid begins to accumulate.

. Liquefaction study

When not controlled, pH drops rapidly. At pH 4.0 the metabolic reactions are oriented towards the production of lactic acid at a very low rate.

For a pH above 5.5, the results of the liquefaction of vegetable wastes show that the only soluble compounds present in the hydrolysate are volatile fatty acids (VFA) and ethanol. Neither simple sugar nor succinic or lactic acids were detected. The monomers produced by hydrolysis are rapidly transformed by acidogenesis and the quantity of VFA and alcohols present indicates the state of progression of the hydrolysis.

At pH 5.5, liquefaction is not very performant and is identical in the mesophilic or thermophilic state (37 % of the carbon in the initial organic matter is transformed into VFA -ethanol).

At pH 6.5, hydrolysis is significantly better in the thermophile state (61% of the carbon of the volatile matter added ends up in the VFAs-ethanol as against 48% in mesophile).

In this pH range the low rate of synthesis of propionic acid in thermophilic liquefaction is remarkable (as compared with the total carbon contained in the VFAs formed at pH 6.5: 5% propionic acid in thermophile versus 21% in mesophile state).

During hydrolysis at pH 6.5, the gas produced in the mesophile state is composed of CO₂ + CH₄ (77%, 23%) and in the thermophile mainly of CO₂ + H₂ (68%, 29%, 3% CH₄). This difference is due to the high sensitivity of thermophilic methanogenic bacteria using hydrogen for slight variations in temperature, in particular when feeding. This explains why the spectrum of the thermophilic acidogenesis products contains more reduced compounds (ethanol, butyrate).

. Methanization stage

With the same loading rate, semi-continuous methanization of the thermophilic hydrolysate is more performant than that of the mesophilic hydrolysate (figure 1). This difference is related to the mesophilic hydrolysate's propionic acid content.

1 CH₄ / 1 reactor

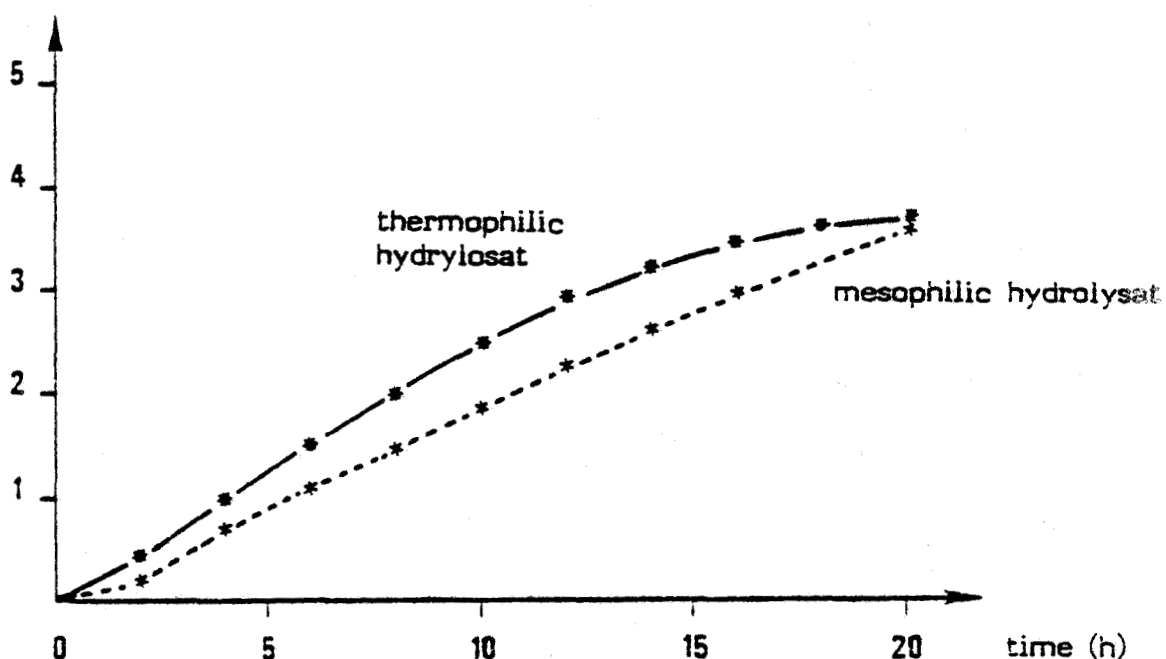


Fig. 1 : Production of methane from mesophilic and thermophilic hydrolysates in a mesophilic filter

Figure 2 shows the methane production of the filter continuously fed with the strained thermophilic hydrolysate as a function of the ingoing COD load. The hydrolysis conditions: 60°C, 12 g VM l⁻¹ d⁻¹, 2-day hydraulic detention time, pH 6.5.

By progressively increasing the load, high productivity levels were attained (7 m³ CH₄ m⁻³ d⁻¹), and for a productivity of 4 to 5 m³ CH₄ m⁻³ d⁻¹, purification remains significant (with reference to the raw substrate: 96% removal efficiency with respect to the volatile matter).

productivity
 $\text{CH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$

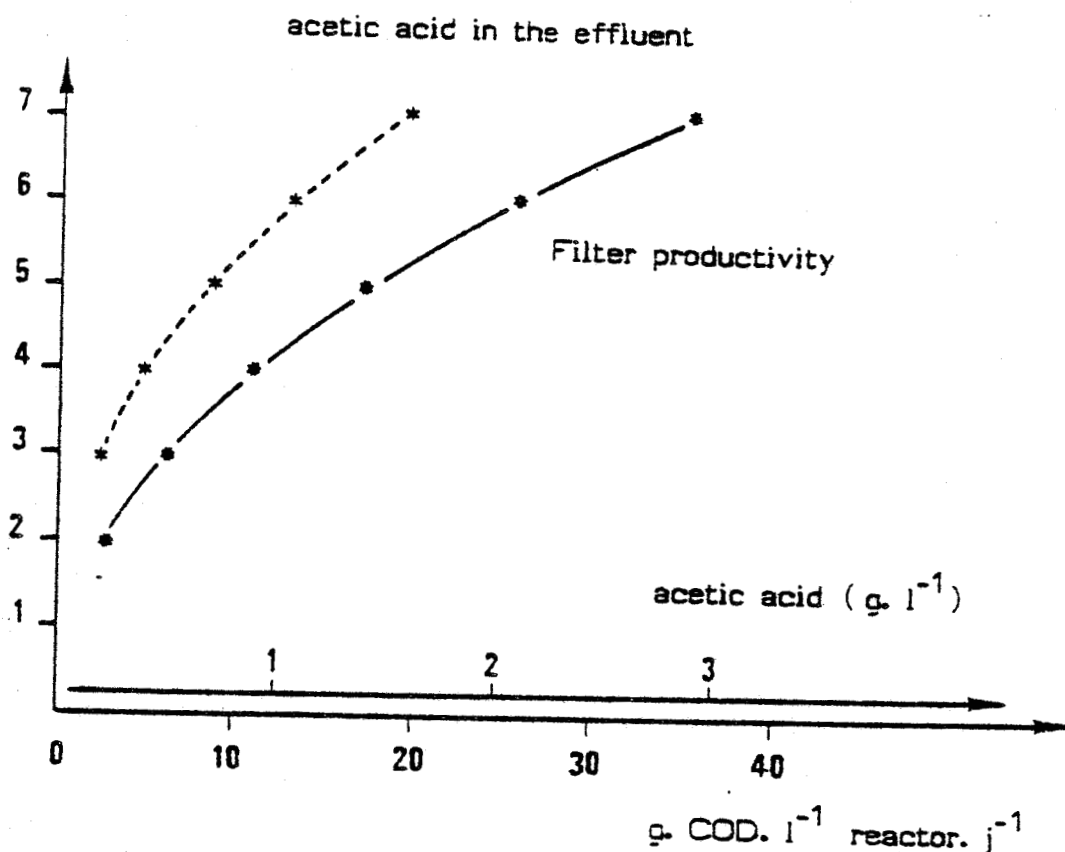


Fig. 2 : Methane production versus load applied

Two-stage process

The productivity of the two-stage system has to take account of the total reactor volume used. Figure 3 shows the methane production of the process with respect to the gas production in the filter, itself related to a known volume of hydrolysate.

The highest productivity ($2.4 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) is obtained with a two-stage system in which the ratio of the volume of the first reactor to the filter's useful volume is 0.9.

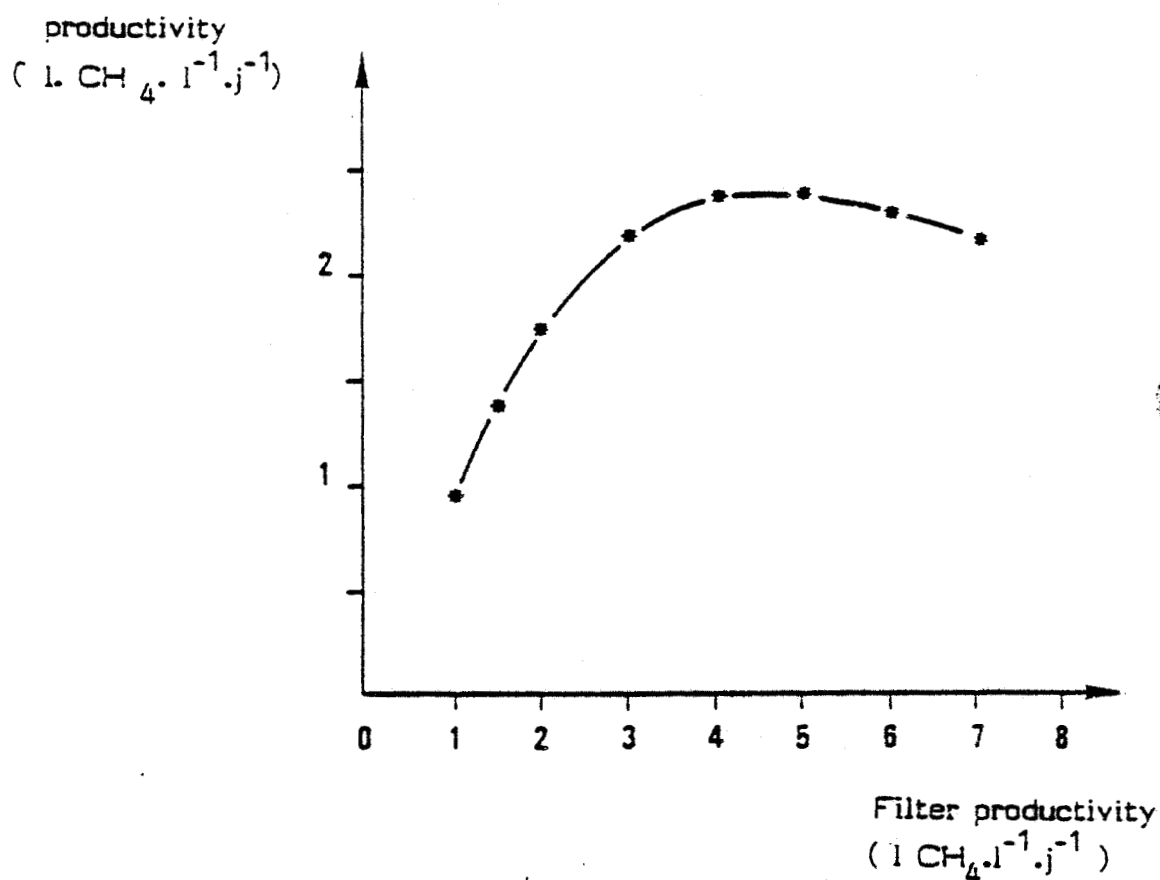


Fig. 3 : Process' CH₄ productivity versus gas production in the filter

DISCUSSION

The advantage of a single stage thermophilic process with regard to the applied load is due to the low level of synthesis of proprionic acid at this temperature.

. Liquefaction

During the liquefaction stage three types of main metabolic phenomena are selected : hydrolysis, acidogenesis and reducing methanogenesis use hydrogen. Regulating pH at 6.5 is favorable to the hydrolysis reactions, and the recycling of the methanized effluent allows to limit the quantity of neutralizing agent entering into the process. The feeding mode entails an onset of inhibition of the reactions by the accumulated volatile fatty acids.

In the pH conditions favoring hydrolysis (6.5), the influence of temperature is significant and favors thermophilic digestion. Moreover, the liquefied thermophilic substrate is advantageous for methane production owing to its low propionate concentration.

The term liquefaction, which designates the part of the dissolved organic matter after hydrolysis, is in fact used here in the more practical sense and applies to the fraction having percolated through the 0.8 mm strainer and able to transit in the methanization reactor without any risks.

. Methanization

In the second stage filter fed for the most part with VFAs the acetogenesis and methanogenesis reactions occur in a privileged fashion. It is therefore important that the composition and pH of the hydrolysate not be subject to sudden changes with time so that the sensitive acetogenesis reactions will not be perturbed.

The loading applied to the continuously-fed filter can reach 40 kg COD/m³/d with the filter's productivity remaining very high, but the purification efficiency is greatly reduced and the overall productivity declines.

With the type of high vacuum coefficient support used, the purification performances and the filter's productivity are maintained with a reduced recirculation (70% of the filter volume recycled/24 h).

. Comparison of the three systems

A comparison of the two single-stage processes shows the superiority of thermophilic digestion in terms of methane production and the admissible load. The purification performances are approximately equal. The thermophilic process is therefore particularly suited when it can be associated with a low level calorie recovery to heat the reactor.

The two most efficient systems (single-stage thermophilic and two-stage thermophilic-mesophilic) have similar productivity rates and heating needs. The choice will therefore be made on the basis of other criteria:

Single-stage thermophilic stage

- . simplicity of the process
- . fairly low purification efficiency (83% with respect to VM)
- . bad reaction to overloading: accumulation of propionic acid

Two-stage: thermophilic-mesophilic

- . highly stable process able to withstand high peak loading
- . high purification efficiency (96% with respect to VM)
- . the more complex treatment in two reactors requires neutralization in the first stage.

The two-stage system can be improved through the study of a continuous coupling of the two reactors (neutralization and extraction of the fatty acids formed).

TABLE I

COMPARISON OF PERFORMANCES OF VARIOUS METHANIZATION
PROCESSES ON CARROT RESIDUE SUBSTRATES

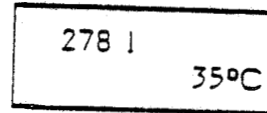
SYSTEM	SINGLE-STAGE MESOPHILIC	SINGLE-STAGE THERMOPHILIC	TWO-STAGE
Features	Stirred reactor 35° C semi-continuous	stirred reactor 55° C semi-continuous	1 : stirred reactor 60° C semi-continuous 2 : filter reactor 35° C continuous Volume ratio : 1 : 47% 2 : 53%
Hydraulic retention time, d	23	13	1 : 2 2 : 2.3
Load g OM l ⁻¹ d ⁻¹	3.6 (max. load: 4.4)	6.25 (max. load)	12 g (reactor 2) 5.65 g (2 stages)
CH ₄ l.l ⁻¹ d ⁻¹	1.35	2.27	2.39 *
% CH ₄ in the biogas	48	49	75 *
% of purification with respect to O.M.	87	83.1	96.6
% of purification with respect to total COD	83.3	77.3	95.9

* biogas produced only in the filter

BU
LILLE

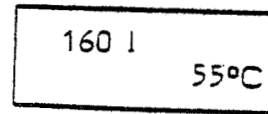
1 kg of organic matter (carrot peels) per day

Single-stage mesophilic



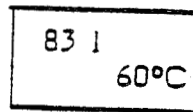
375.3 l CH₄.d

single-stage thermophilic

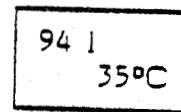


363.2 l CH₄.d

two-stage



+



423 l CH₄.d⁻¹



Influence of Calcium Addition on Growth of Highly Purified Syntrophic Cultures Degrading Long-Chain Fatty Acids

FRANCIS ROY,^{1†*} GUY ALBAGNAC,² AND ERIC SAMAIN²

Anjou Recherche, Chemin de la Digue, 78600 Maisons Laffitte,¹ and Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire 369, Rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve D'Ascq,² France

Received 17 October 1984/Accepted 19 December 1984

Two highly purified syntrophic associations resulting in acetogenesis from stearate (SM) and oleate (OM) were obtained from the sludges of a sewage digester. In both cases, *Methanospirillum hungatei* together with short, motile, gram-negative, nonfluorescent rods morphologically similar to *Syntrophomonas wolfei* were identified by microscopic examination. Besides growing on volatile fatty acids (butyrate through caproate), both cultures grew on oleate (C_{18:1}) and numerous even-numbered, saturated long-chain fatty acids (LCFA [decanoate through stearate]). In addition, during growth on LCFA, supplementation of the culture media with calcium chloride was an absolute requirement. The sole difference between the associations was observed when SM and OM cultures were transferred from a stearate to an oleate medium. The SM culture needed 10 days before starting to degrade oleate, whereas the OM culture grew immediately, but the OM culture also grew immediately when transferred to stearate medium. Saturated LCFA degradation occurred in the presence of equinormal amounts of calcium (fatty acid/Ca ratio, 2). On the other hand, OM degradation only took place in the presence of an equimolar amount of calcium (fatty acid/Ca ratio, 1). These observations are discussed by considering the solubility constants of LCFA as calcium salts and the toxicity of the free acids against microorganisms.

In methanogenic environments, long-chain fatty acids (LCFA) can be completely degraded to methane and carbon dioxide (6, 9, 12, 25). However, these compounds exhibit acute toxicity against anaerobes when their concentrations exceed a few millimoles per liter, so on a technological level, methanogenesis from LCFA is only possible in continuously fed digestors (17) in which the dilution rate is kept sufficiently low to allow the complete degradation of these compounds. The toxicity of LCFA against pure or mixed cultures appears more pronounced as the compounds become longer and more unsaturated (2, 3, 16). In addition, the sensitivity of bacteria is related to their cell wall structure, with gram-positive species and methanogens being more easily inhibited than gram-negative organisms (8, 20, 23). Fortunately, the addition of calcium reverses the inhibition of bacterial growth in batch cultures, mainly by forming insoluble salts and increasing interfacial tension (4-6).

In sewage digestors, LCFA degradation first proceeds via a β -oxidation mechanism (12, 25) leading to acetate with reductive methane. Modern concepts of anaerobic microbiology indicate that this acetogenesis is carried out by syntrophic associations of obligate hydrogen-producing bacteria and hydrogenophilic methanogens (14). In such low-sulfate media, several syntrophic associations between *Desulfovibrio* sp. and methanogens can result in an acetogenic fermentation of lactate and ethanol. However, there is no report of a syntrophic association involving a hydrogen scavenger and one of the LCFA-degrading sulfate reducers isolated so far (18), i.e., *Desulfonema magnum*, *Desulfonema limicola*, and *Desulfosarcina variabilis*. Until recently, *Syntrophomonas wolfei* (13) was the sole pure obligate hydrogen-producing bacteria that was known to oxidize fatty acids, but two other bacteria have been isolated (22),

one of them morphologically similar to *S. wolfei* and the other spore forming. However, their activities are restricted to short, saturated substrates (butyrate through caproate or octanoate).

We report in this paper the establishment of highly purified syntrophic associations degrading LCFA to acetate and reductive methane. The positive effect of calcium salt additions upon LCFA oxidation in batch cultures was demonstrated.

MATERIALS AND METHODS

Sources of microorganisms. *Methanospirillum hungatei* (DSM 864) and *S. wolfei* Göttingen strain (DSM 2245B) were obtained from the German Culture Collection.

Media and conditions for growth. The anaerobic technique of Hungate as modified by Miller and Wolin (15) was used for enrichments and routine subcultures. The basal medium containing minerals and vitamins (21, 24) was buffered with PIPES [piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)] (50 mM) and was further supplemented with yeast extract (0.3 g/liter) and rumen fluid (5%, vol/vol). Sterile stock solutions (10%, vol/vol) of fatty acid sodium salts were added aseptically to the autoclaved medium, and the subsequent addition of calcium chloride resulted in the formation of a heavy and fluffy precipitate, unless precise equimolar amounts (15 mM) of calcium and LCFA were used. Incubations were run at 35°C and pH 7.1 under an N₂/CO₂ (85:15) gas phase.

Enrichments were established by 10 successive transfers (5%, vol/vol) at 2-week intervals.

Dilution shake cultures were incubated in glass tubes (9 by 160 mm), in the presence of 0.6% agar. The media were inoculated inside an anaerobic glove box (FORMA 1020) with the simultaneous addition of an active, growing culture of *M. hungatei* (10%, vol/vol).

Analytical methods. Growth was estimated by monitoring acetate and methane production. Gas and volatile fatty acids

* Corresponding author.

† Present address: Institut de la Recherche Agronomique Station de Technologie Alimentaire, Villeneuve D'Ascq, France.

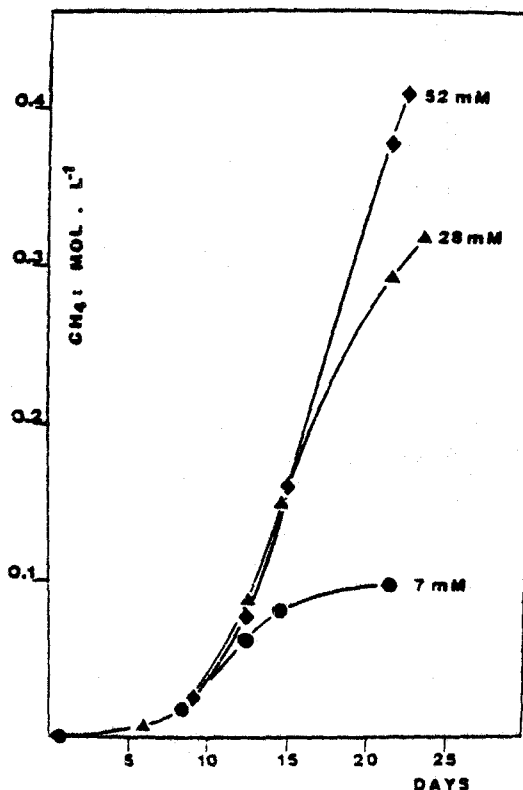


FIG. 1. Methane production from stearate by an enrichment culture in the presence of equimolar amounts of calcium. Control values were subtracted.

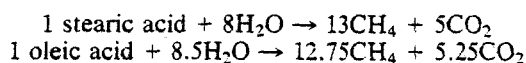
were determined by gas chromatography as previously described (24).

LCFA butyl esters were separated and quantified by using a stainless-steel column (1.8 m by 2 mm) packed with 28% diethylene glycol succinate on silanized Chromosorb W-AW (80-100 mesh).

Calcium was determined by atomic absorption on a PYE-UNICAM SP9 spectrophotometer, and *O*-phosphate was determined by the ascorbic acid method. Carbonates were assayed on an Oceanography International infrared carbon analyzer.

RESULTS

Establishment of highly purified acetogenic cultures degrading stearate and oleate. Two anaerobic media, one with stearate (10 mM) and one with oleate (10 mM) as main carbon and energy sources, were inoculated with sludges from a sewage digester in Marquette-Lez-Lille, France. In batch cultures, fatty acid degradation never occurred in the absence of calcium. Equimolar additions of calcium chloride allowed good growth even when stearate and oleate concentrations up to 50 mM were reached (Fig. 1). Methane and carbon dioxide were the only end products evidenced, but a transient accumulation of acetate was sometimes observed. Experimental values were close to those of theoretical stoichiometries:

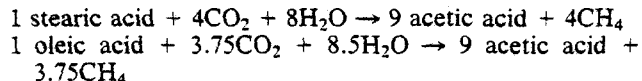


Microscopic examination of wet mounts revealed the presence of acetoclastic methanogens morphologically similar to *Methanosarcina mazei* (24) in the stearate enrichment culture. On the other hand, *Methanothrix*-like filamentous

organisms were observed to be the prevailing methanogens in the oleate culture. After 10 successive transfers, both enrichment cultures were diluted based on the most-probable-number technique and incubated in the presence of *M. hungatei*. After 2 months, the highest dilutions permitting significant growth were 10^9 and 10^7 , from the stearate and the oleate enrichment cultures, respectively. Control cultures minus LCFA did not show growth at these dilutions.

In the last tube showing positive degradation of stearate, no acetoclastic methanogens were observed. The prevailing organisms were *M. hungatei*, identified by its morphology and its autofluorescence under epi-illumination, and short, curved, motile, gram-negative, nonfluorescent rods. This culture, named SM, degraded stearate to acetate and reductive methane and was used for further studies. Similar morphologies were also observed by Lorowitz and Bryant (personal communication) in enrichment cultures degrading stearate. On the other hand, filamentous methanogens were still present in the tube corresponding to the 10^7 dilution of the oleate enrichment culture. This culture was further purified by the dilution agar shake culture technique. Incubation was performed for 6 weeks in the presence of *M. hungatei*. Clearing zones with diffuse centers were observed up to the 10^7 dilution. Careful examination showed that this center was made of numerous tiny, round colonies. One of these colonies, which degraded oleate to acetate and methane, was transferred in liquid medium inside the anaerobic glove box (OM culture). Besides *M. hungatei*, the OM culture also contained short, curved rods very close in morphology to those observed in the SM culture.

These cultures, OM and SM, did not contain acetophilic methanogens and degraded oleate and stearate by the following stoichiometries:



Growth properties of SM and OM cultures. Optimal conditions for growth of these two highly purified cultures were a pH of 7.1 and a temperature of 35 to 40°C. Both cultures degraded the following compounds without any lag: butyrate, valerate, caproate, and even saturated fatty acids (decanoate through octadecanoate). No growth was observed on glucose, acetate, propionate, heptanoate, octanoate, and triglycerides. Cultivation on valerate resulted in the accumulation of acetate and propionate in the medium. When transferred from saturated fatty acids to oleate medium, SM and OM cultures exhibited quite different behaviors. The latter grew immediately on this unsaturated fatty acid; however, the SM culture degraded oleate after a 10-day lag. No hydrogen sulfide was observed when the medium was supplemented with sulfate (20 mM); furthermore, bromoethanesulfonic acid (1 mM) inhibited both methanogenesis and fatty acid degradation.

Effect of calcium on the growth of SM and OM cultures. As already observed for the first enrichment and purification steps, no growth of SM and OM cultures on 15 mM LCFA concentrations occurred unless the medium was supplemented with calcium chloride. Saturated fatty acids with even numbers of carbons from decanoate to stearate were degraded when the ratio of fatty acid (millimoles added) to calcium (millimoles added) (FA/Ca) was maintained at less than 2. With these substrates, LCFA toxicity could be reversed by equinormal addition of calcium, and a shorter doubling time (Table 1) was observed on dodecanoate (lauric acid). No calcium requirement was evidenced during growth

TABLE 1. Doubling time of the OM culture growing on various fatty acids^a

Substrate ^b	Calcium concn (mM) added	Doubling time (h)
Butyric acid (C ₄)	0	27
Lauric acid (C ₁₂)	15	30
Myristic acid (C ₁₄)	15	30
Oleic acid (C _{18:1})	15	40
Stearic acid (C ₁₈)	15	45

^a Growth was estimated on the logarithmic sequence of CH₄ production.

^b Concentration, 4 g of substrate per liter.

on short-chain fatty acids ranging from butyrate to caproate. This was checked by two successive transfers to avoid a possible contamination by residual LCFA or calcium present in the initial culture. Surprisingly, acetogenesis from oleate (Fig. 2) required at least an equimolar addition of calcium (FA/Ca, 1). Chemical analyses of stearate and oleate precipitates were undertaken to check a possible concurrent precipitation of calcium inorganic salts. Both precipitates were composed mainly of the fatty acids associated with calcium and phosphate; only trace amounts of carbonate were evidenced. Typical contents per 100 mg (dry weight) were as follows: 93 mg of stearate, 6 mg of Ca, and 1 mg of PO₄ (FA/Ca, 2); and 88 mg of oleate, 10 mg of Ca, and 2 mg of PO₄ (FA/Ca, 1). Despite quite different FA/Ca ratios, chemical analyses indicated only minor differences between the precipitates. Consequently, the concentrations of soluble calcium in the stearate and oleate media were 0.1 mM (FA/Ca, 2) and 3 mM (FA/Ca, 1), respectively, and in all cases more than 50% of the total phosphate ions remained in the culture supernatant. Concentrations of residual LCFA in the culture supernatant were smaller than the detection threshold of the gas-chromatographic technique.

DISCUSSION

Without calcium chloride addition, the high toxicity of LCFA with more than seven carbon atoms resulted in a

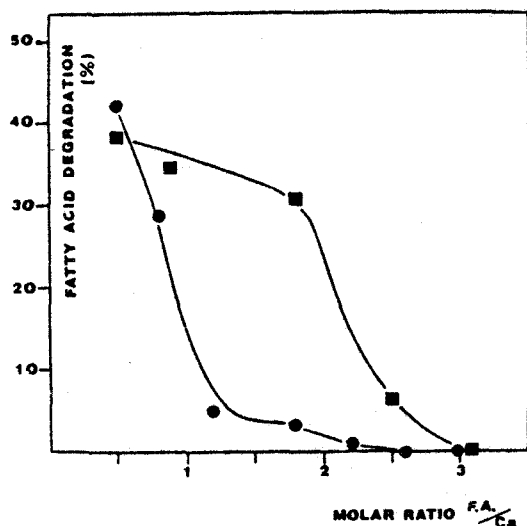


FIG. 2. Degradation of 10 mmol of oleate (●) and stearate (■) per liter by the OM consortium for various FA/Ca molar ratios. The extent of LCFA degradation was calculated from acetate and reductive methane productions after 9 days of incubation. Control values were subtracted. Percents degradation were calculated from acetate production based on the stoichiometries indicated in the text.

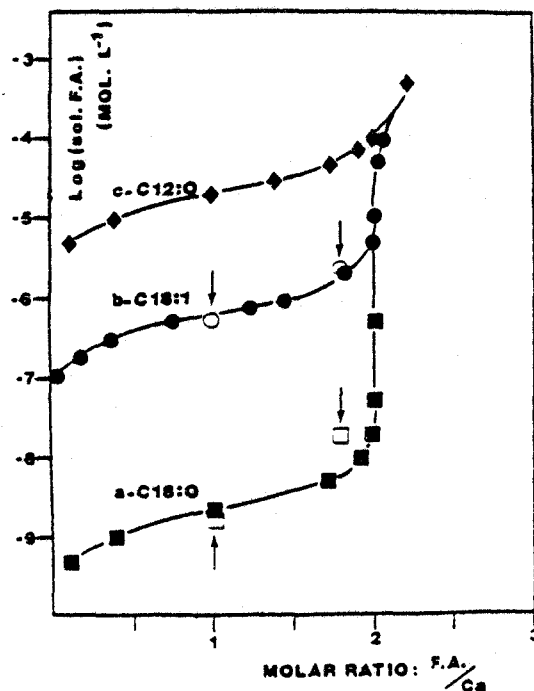


FIG. 3. Theoretical LCFA concentration in the culture supernatant (sol. F.A.) as a function of the molar ratio of total LCFA to calcium (FA/Ca), the total LCFA concentration being 15 mM. Values were calculated by the following equation:

$$FA/Ca = 2 / \left(1 + \frac{2 K_{sp} - SFA^2}{SFA^2 \times FA} \right)$$

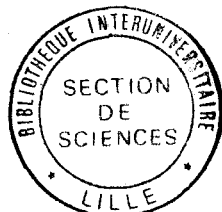
where K_{sp} is the solubility product constant of the fatty acid calcium salts and SFA is the LCFA concentration in the culture supernatant. Arrows indicate actual values calculated from experimental determination of calcium in the supernatant.

complete inhibition of the growth of SM and OM cultures. After calcium addition, chemical analyses indicated very low precipitation of phosphate and carbonate; on a dry-weight basis, more than 95% of the precipitates were fatty acid calcium salt. Thus, calcium effect can be discussed by considering the solubility product constant (K_{sp}) of LCFA calcium salts. The theoretical concentrations of LCFA remaining in solution as a function of the FA/Ca ratio (Fig. 3) were calculated from the K_{sp} values reported in the literature (11). Actual concentrations were calculated from the results of calcium determination in the culture supernatant (plotted on Fig. 3). Stearate in the supernatant lies between 10^{-4} and 10^{-8} mol/liter for FA/Ca ratios ranging from 2.04 to 1.92 (Fig. 3a). Since experimentally no inhibition was evidenced with FA/Ca ratios lower than 2 and total inhibition was observed with FA/Ca ratios slightly higher than 2, even a careful adjustment of this ratio does not allow an experimental determination of an inhibition threshold. In the presence of stoichiometric amounts of calcium (FA/Ca, 2), the actual oleate and tetradecanoate concentrations in the supernatant were almost identical (2.3 μ M) and 130 times higher than the soluble stearate concentration (18 nM). Under such experimental conditions, inhibition of bacterial growth was observed only with oleate. This observation confirmed the results of previous works (3, 16, 17, 20) reporting a higher toxicity of unsaturated LCFA. In our experimental conditions (substrate, 15 mM), the soluble oleate concentration has to be maintained below 0.7 μ M by at least an equimolar addition of calcium salt.

Stability of morphology and immediate degradation of various saturated fatty acids indicate that SM and OM cultures have quite a wide range of substrates for growth. However, they appear dependent on lipolytic bacteria (10) such as *Anaerovibrio lipolytica* (7) for the splitting of acylglycerol. The acetate-to-methane ratios obtained after degradation of even numbered fatty acids are in good agreement with the stoichiometric balance of the β -oxidation mechanism. This is confirmed by the formation of propionate and acetate from valerate. From the present results, it is clear that the two purified cultures are syntrophic associations of LCFA-degrading acetogens together with *M. hungatei*. The stearate and the oleate organisms look very similar to *S. wolfei* (13), but they can be easily distinguished from this obligate hydrogen-producing bacteria, which is unable to perform acetogenesis from LCFA even in the presence of equimolar amounts of calcium (data not shown). Up to now only a minor difference was evidenced between SM and OM cultures when stearate-grown cells were transferred to oleate. Finally, further purification and characterization of the two organisms are being achieved to describe their taxonomic position and their physiological properties.

LITERATURE CITED

- Boone, D. R., and M. P. Bryant. 1980. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 626-632.
- Canas Rodriguez, A., and H. W. Smith. 1966. The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits. *Biochem. J.* **100**:79-82.
- Demeyer, D. I., and H. K. Henderickx. 1967. The effect of C_{18} unsaturated fatty acids on methane production in vitro by mixed rumen bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **137**:484-497.
- El Hag, G. A., and T. B. Miller. 1972. Evaluation of whisky distillery by products. VI. The reduction of digestibility of malt distillers grains by fatty acids and the interaction with calcium and other reversal agents. *J. Sci. Food Agric.* **23**:247-258.
- Galbraith, H., T. B. Miller, A. M. Paton, and J. K. Thompson. 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergo calciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* **34**:803-813.
- Hanaki, K., T. Matsuo, and M. Nagase. 1981. Mechanism of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:1591-1610.
- Henderson, C. 1971. A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **65**:81-89.
- Henderson, C. 1973. The effects of fatty acids on pure culture of rumen bacteria. *J. Agric. Sci.* **81**:107-112.
- Heukelekian, H., and P. Mueller. 1958. Transformation of some lipids in anaerobic sludge digestion. *Sewage Ind. Wastes* **30**: 1108-1120.
- Hobson, P. N., and S. O. Mann. 1961. The isolation of glycerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* **25**:227-240.
- Irani, R. R., and E. F. Callis. 1960. Metal complexing by phosphorus compound solubilities of calcium soap of linear carboxylic acids. *J. Phys. Chem.* **64**:1741-1743.
- Jeris, J. S., and P. L. McCarty. 1965. The biochemistry of methane fermentation using ^{14}C tracers. *J. Water Pollut. Control Fed.* **27**:178-192.
- McInerney, M. J., M. P. Bryant, R. B. Hespell, and J. W. Costerton. 1981. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:1029-1039.
- McInerney, M. J., M. P. Bryant, and N. Pfennig. 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch. Microbiol.* **122**:129-135.
- Miller, T. L., and M. J. Wolin. 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **27**:985-987.
- Nieman, C. 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **18**:147-163.
- Novak, J. T., and D. A. Carlson. 1970. The kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. *J. Water Pollut. Control Fed.* **42**:1932-1943.
- Pfennig, N., F. Widdel, and H. G. Trupper. 1981. The dissimilatory sulfate reducing bacteria, p. 926-940. *In* M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trupper, A. T. Balous, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes*—1981. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Polan, C. E., J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriol.* **88**:1056-1064.
- Prins, R. A., C. J. Van Nevel, and D. J. Demeyer. 1972. Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **38**:281-287.
- Samain, E., G. Albagnac, H. C. Dubourguier, and J. P. Touzel. 1982. Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor dependent association with a gram negative homoacetogen. *FEMS Lett.* **15**:69-74.
- Shelton, D. R., and J. M. Tiedje. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:840-848.
- Sheu, C. W., and E. Freese. 1972. Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **111**:516-524.
- Touzel, J. P., and G. Albagnac. 1983. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC₃. *FEMS Lett.* **16**:241-245.
- Weng, C. N., and J. S. Jeris. 1976. Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Res.* **10**:9-18.



RESUME

FERMENTATION METHANIQUE DES DECHETS GLUCIDIQUES SOLIDES ET DES LIPIDES. EXPERIMENTATIONS EN FERMENTEURS PILOTES.

Isolement et caractérisation de bactéries anaérobies strictes réalisant
la β -oxydation des acides gras à longues chaînes.

Des déchets solides de légumes facilement fermentescibles sont digérés dans un procédé avec **séparation des phases**. La liquéfaction des résidus solides dans une première étape permet d'utiliser un réacteur filtre mésophile pour la méthanisation de l'hydrolysate. La liquéfaction est optimale à pH 6,5 et dépend de la teneur en fibres lignocellulosiques des déchets. Lorsque l'activité des bactéries méthanigènes hydrogène-philiques est optimale, les rendements et produits d'acidogénèse des liquéfactions mésophile (35°C) et thermophile (60°C) sont équivalents.

Le procédé deux étapes mésophiles peut atteindre une productivité de 2,4 L CH₄/L.J, ce qui lui donne un net avantage par rapport au procédé mono-étape conventionnel, mais sa complexité accrue rend sa conduite plus délicate.

La méthanisation en continu d'un effluent industriel dont les matières organiques renferment **60% de lipides** est obtenue en réacteur contact moyennant le contrôle de la teneur en sodium et l'ajout de CaCl₂ dans l'alimentation. Les productivités obtenues sont respectivement de 1,25 et 1,1 L méthane/L.J en thermophile et en mésophile, pour un taux d'épuration des matières organiques de 86%.

Dans les populations adaptées aux deux températures (35 et 55°C) on dénombre 2.10⁶ **bactéries acétogènes syntrophes** utilisant les acides gras à longues chaînes par millilitre. Des enrichissements mésophiles de ces bactéries syntrophes ont été obtenus par utilisation du chlorure de calcium qui détoxifie les milieux en précipitant les acides gras en savons de calcium très insolubles. Une bactérie acétogène utilisant l'acide oléique a été isolée et purifiée, en coculture avec Methanospirillum hungatei. C'est la première caractérisation d'une bactérie anaérobie utilisant les acides gras longs linéaires saturés et insaturés (**stéarate, oléate**) et nous proposons le nom Syntrophomonas bryantii.

- MOTS CLEFS : Fermentation, Anaérobie, Mésophile, Thermophile, Séparation des phases, Déchets solides, Lipides, Acides gras, Inhibition, Syntrophie, Syntrophomonas bryantii.