

50 376
1 987
13

N° d'ordre : 1378

x50376
1987
13

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR de 3ème cycle en BIOLOGIE et PHYSIOLOGIE VEGETALE

TAWFIKI HAJJI Khalid

INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA
FERMENTATION METHANIQUE ET LA PHYSIOLOGIE DES SOUCHES IMPLIQUEES
Rôle du rapport C/N/P, des cations alcalins et des oligoéléments



Soutenue le 28 janvier 1987 devant la Commission d'Examen

JURY

Président	: Monsieur	J. GUILLAUME
Rapporteurs	: Monsieur	G. ALBAGNAC
	Monsieur	R. TAILLIEZ
Examineurs	: Monsieur	A. SASSON
	Monsieur	B. FIEVET

SCD LILLE 1



D 030 320410 8

50376
1987
13

50376
1987
13

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur G. ALBAGNAC, Directeur de la Station de Technologie Alimentaire de l'INRA de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir aidé à poursuivre mes études dans les meilleures conditions. Je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie Monsieur J. GUILLAUME, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse.

Je remercie Monsieur F. TAILLIEZ, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie Monsieur A. SASSON, Professeur à l'Université de Rabat et Détaché Scientifique auprès de l'UNESCO, pour ses critiques, pour l'aide qu'il m'a apportée à chaque fois que je faisais appel à lui et pour avoir bien voulu juger mon travail.

Je remercie Monsieur B. FIEVET, Secrétaire Adjoint du Réseau International des Biotechnologies, de m'avoir donné les moyens de finir ce travail et d'avoir accepté d'être membre du jury.

J'ai pu bénéficier de l'expérience scientifique de Messieurs D. VERRIER, de J. P. TOUZEL et de J. L. ROUSTAN ainsi que de la compétence de l'ensemble des techniciens du laboratoire et en particulier de Messieurs J. JACQUEMONT, J. F. MIGDAL et J. P. LEPOUTRE et Mademoiselle F. FONTAINE. Je les en remercie tous vivement.

Il me reste à remercier tous mes amis de la Station de Technologie Alimentaire, et tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.



INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

	Pages
I. DIGESTION ANAEROBIE DE LA MATIERE ORGANIQUE	3
1. Hydrolyse ou acidogénèse	4
1.1. Généralité	-
1.2. Interactions bactériennes	-
1.3. Fermentation des oses	5
1.4. Fermentation des lipides	6
1.5. Fermentation des protéines	7
2. Acétogénèse avec production obligée d'hydrogène	8
2.1. Généralité	-
2.2. Microbiologie	9
2.2.1. Acétogénèse à partir de l'éthanol	-
2.2.2. Acétogénèse à partir des acides gras à longue chaîne	10
2.2.3. Bactéries sulfato réductrices	11
2.3. Conclusion	-
3. Méthanogénèse sensu stricto	12
3.1. Microbiologie	-
3.2. Biochimie de la production de méthane	13
3.2.1. Les coenzymes	14
3.2.2. Méthanogénèse à partir de l'acétate	16
3.2.3. Méthanogénèse à partir du mélange H_2-CO_2	17
3.2.4. Méthanogénèse à partir du méthanol	-
3.3. Synthèse des constituants cellulaires	18
3.3.1. Assimilation du carbone	-
3.3.2. Assimilation d'azote	19
3.3.3. Assimilation du phosphore et biosynthèse de l'ATP	23
4. Conclusion	25
 II. INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE DEROULEMENT DE LA FERMENTATION METHANIQUE	 27
1. Température	-
2. Ph	29

	Pages
3. Le rapport Carbone, Azote, Phosphore (C/N/P)	30
4. Besoins en éléments minéraux	31
4.1. Besoins en sulfate	-
4.2. Cations (Sodium, Potassium, Magnésium et Calcium)	33
5. Oligo éléments	35
5.1. Fer et Cobalt	36
5.2. Nickel	37
5.3. Molybdène	-
5.4. Sélénium	38
6. Métaux lourds	-
7. Composés toxiques	39
7.1. Ammonium	40
7.2. Sulfure	-
7.3. Oxydants	41

MATERIELS ET METHODES

I. TECHNIQUES ANALYTIQUES	42
Détermination analytique servant à l'évaluation des fermentations en pilote	
1. Matières sèches totales	-
2. Matières minérales	-
3. Matières organiques ou volatiles	-
4. Matières en suspension et matières volatiles en suspension	-
5. Carbone organique total	-
6. Azote total Kjeldahl et azote ammoniacal	43
7. Dosage de l'acide formique	-
8. Dosage du phosphore total	-
9. Dosage des éléments minéraux	-
II. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	44
1. Les acides gras volatils	-
2. Les gaz de fermentation	-

	Pages
III. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES	45
1. Cinétiques de fermentation en discontinu	-
2. Cultures anaérobies	-
3. Numération bactérienne	47
4. Observations microscopiques	48
IV. METHANISATION EN PILOTE DE LABORATOIRE	49
1. Fermenteurs	-
2. Procédé de fermentation et paramètre de fonctionnement	-
3. Substrats	-
4. Bilans de fermentation	50

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. INFLUENCE DU RAPPORT C/N SUR LA METHANOGENESE	51
1. Période du 29/01/1985 au 25/04/1985	-
1.1. Protocole expérimental	-
1.2. Résultats	-
1.3. Observations microscopiques et commentaires	52
1.4. Dénombrement bactérien (MPN)	53
2. Période du 02/05/1985 au 20/09/1985	54
2.1. Résultats	-
2.2. Observations microscopiques	55
2.3. Dénombrement bactérien (MPN)	-
2.3.1. Flores fermentatives	-
2.3.2. Bactéries méthanogènes	-
2.3.3. Bactéries acétogènes	56
2.3.4. Sulfato réductrices	-
2.4. Comparaison des deux essais	-
II. INFLUENCE DU C/N/P SUR UNE POPULATION MIXTE	58
1. Substrats	-
2. Inoculum	58
3. Dispositif expérimental	58

	Pages
4. Résultats	59
5. Observations microscopiques	60
6. Discussion et conclusion partielle	61
III. INFLUENCE DE QUELQUES EFFECTEURS SUR L'ACTIVITE D'UNE POPULATION MIXTE ACETOCLASTE	64
1. Protocole expérimental	-
2. Résultats	-
2.1. Effet du sulfate	65
2.2. Effet de la vancomycine	-
2.3. Effet de l'extrait de levure	-
3. Analyses microscopiques	-
IV. INFLUENCE DE L'AZOTE SUR UNE POPULATION MIXTE DEGRADATRICE DE FORMATE	67
1. Enrichissement mésophile en continu sur formate à 37 °C	-
2. Résultats	-
V. INFLUENCE DE L'AZOTE SUR LA CROISSANCE DE DEUX CULTURES PURES <u>Methanothrix soehngenii</u> ET <u>Methanosarcina mazei</u> EN BATCH	70
1. Influence du rapport C/N sur la croissance de <u>M. soehngenii</u>	-
1.1. Résultats	-
2. Influence du rapport C/N sur la croissance de <u>M. mazei</u> Mc.	71
2.1. Résultats	-
3. Discussion et conclusion partielle	72
4. Conclusion	74
VI. L'EFFET DU Na, K ET Mg SUR L'ACTIVITE D'UNE POPULATION MIXTE ACETOCLASTE	75
1. Protocole expérimental	-
2. Résultats	-
VII. INFLUENCE DE Na, K ET Mg SUR L'ACTIVITE DE <u>M. soehngenii</u>	79
1. Protocole expérimental	-

2. Résultats	Pages 79
3. Discussion	80
VIII. L'EFFET DU FER SUR L'ACTIVITE DE <u>M. soehngenii</u>	82
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	83
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	

INTRODUCTION

Parmi les sources des énergies renouvelables, la valorisation par fermentation méthanique de la biomasse humide est une filière biologique. donnant des rendements de conversion de 90 à 95 %. Cependant quand la fermentation méthanique a pour seul objectif de produire du méthane, il n'est pas toujours évident d'obtenir la rentabilité économique du procédé. En revanche, si elle est utilisée en plus à des fins d'épuration, le processus devient particulièrement intéressant. Les autorisations de rejet sont désormais contraignantes et le coût d'épuration par voie aérobie est une opération généralement coûteuse énergiquement et financièrement, l'élimination d'une tonne de DCO par procédé aérobie consomme 1100 KWH électriques.

La fermentation méthanique présente un grand avantage à cause de la production faible de la biomasse bactérienne, ce qui résout le problème du conditionnement et d'élimination des boues excédentaires. Et contrairement à l'épuration aérobie, le processus anaérobie traite des effluants souvent concentrés ayant un rapport C/N élevé.

Les acquis récents de la biochimie et de la microbiologie des digesteurs montrent en effet que les performances de la fermentation méthanique de substrats solubles se heurtent à deux limites biologiques essentielles qui sont : les faibles taux de croissance des populations méthanogènes et les activités spécifiques qui sont assez faibles. Cependant, lors des dix dernières années l'évolution des technologies provoquée par les perspectives d'application du traitement anaérobie aux effluants dilués a tenu ses promesses. L'introduction des procédés de secondes générations (réacteurs à cellules immobilisées) dans lesquelles la rétention de la biomasse bactérienne active est favorisée, constituent des techniques bien adaptées à la méthanisation des eaux résiduaires qui se développe dans les industries chimiques. Par contre, l'influence sur l'activité des flores méthanogènes de la composition physico chimique du milieu (azote - oligo éléments) reste un sujet très mal documenté. Une étude dans ce sens présente un intérêt appliqué, car à l'encontre des effluents agro-alimen-

taires, ceux générés par les industries chimiques présentent le plus souvent des carences nutritionnelles importantes vis-à-vis des bactéries anaérobies. Une dépollution en anaérobie efficace nécessite donc un rééquilibrage du rapport C/N ou l'apport d'oligo éléments aussi justement calculé que possible.

Dans ce contexte nous avons dans un premier temps étudié l'influence du rapport C/N/P sur la dynamique des espèces bactériennes présentes dans une population mixte adaptée à la dégradation d'un mélange d'acides gras volatils. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à déterminer les concentrations optimales des principaux éléments minéraux ayant un rôle physiologique important dans l'activité des flores méthanogènes.

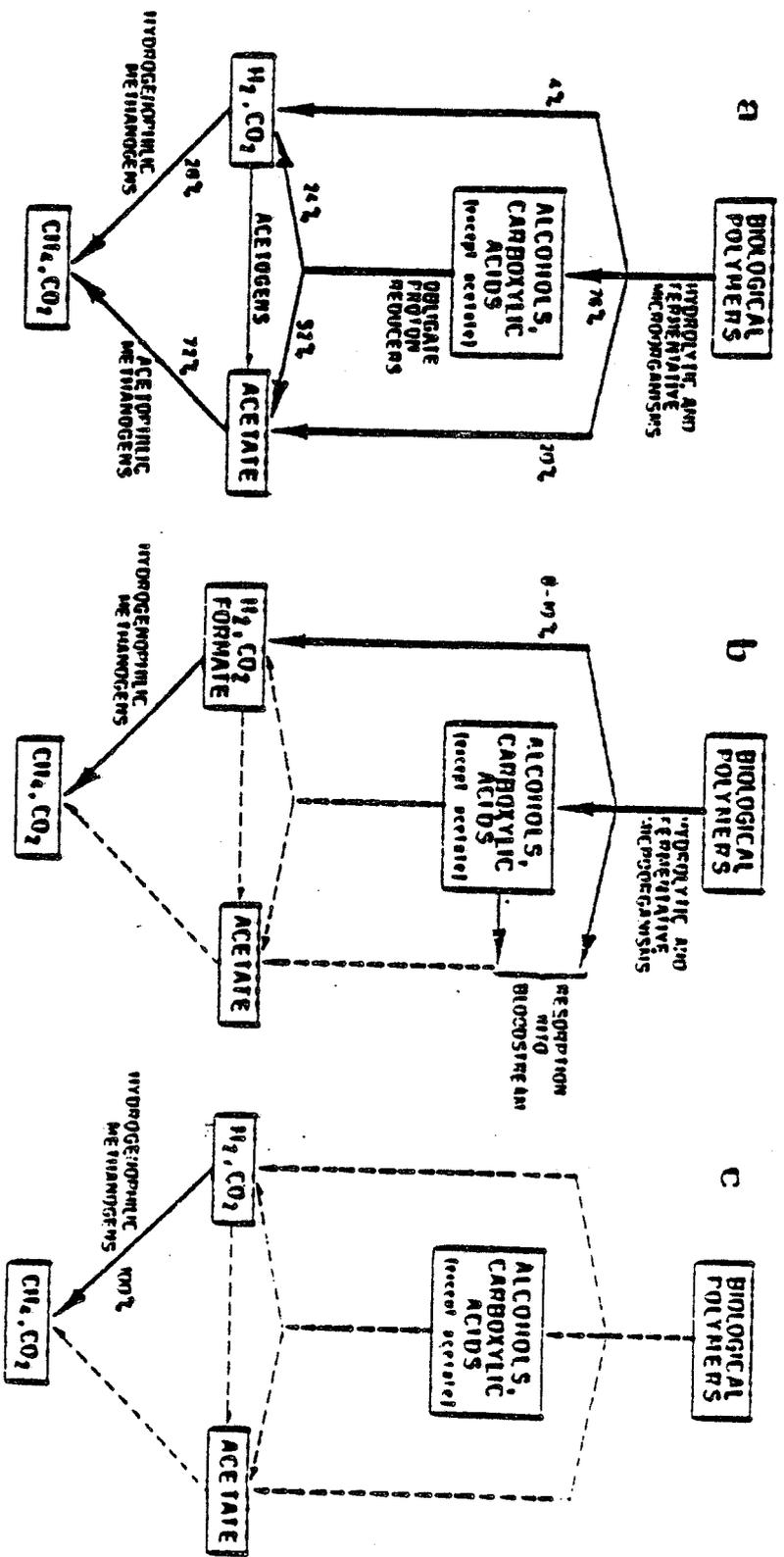


Fig 1 Flux des substrats dans les écosystèmes anaérobies

- a/ Digésteurs, Sédiments pauvres en sulfates
- b/ Rumen, Caecum
- c/ Ecosystèmes sources chaudes

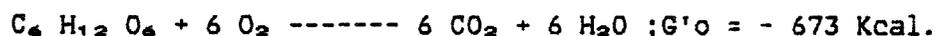
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DIGESTION ANAEROBIE DE LA MATIERE ORGANIQUE

La fermentation méthanique est un ensemble de processus biochimiques qui conduisent à la dismutation de la matière organique. Elle est réalisée par un ensemble complexe d'espèces bactériennes qui, sous certaines conditions physico chimiques bien précises (potentiel redox < - 350 mV, pH voisin de la neutralité), forment des associations stables (DUBOURGUIER et al., 1982). Contrairement à la dégradation aérobie, la fermentation méthanique permet de retrouver la plupart de l'énergie stockée dans le substrat dégradé.

Par exemple :

Une molécule de glucose fournit par voie aérobie du gaz carbonique et de l'eau selon la réaction.



En condition anaérobie, le glucose est dégradé de la façon suivante :



C'est donc près de 94 % de l'énergie qui est conservée par cette voie (GARCIA, 1983). Ce processus biologique a des applications industrielles importantes qui ont pour but la production d'énergie couplée à la dépollution de composés carbonés à très forte teneur en eau.

La fermentation méthanique s'accomplit naturellement dans les vases sédimentaires de milieux aquatiques, les sources chaudes, le tractus digestif de ruminants ou bien volontairement dans des installations de digestions destinées à épurer des eaux résiduaires. La figure 1 montre les différents types de flux carbone caractéristiques des principaux écosystèmes. Dans les sources chaudes (65 - 75 °C) la méthanogénèse a lieu à

Tableau I. Bactéries hydrolytiques isolées dans les écosystèmes méthanogènes et les métabolites produits correspondants

Substrats	Organismes hydrolytiques	Métabolites des bactéries
Cellulose	Bactéroides succinogenes Ruminococcus albus Ruminococcus flavefaciens Acetovibrio cellulolyticus Butyrivibrio fibrisolvens C. thermoceilum	Ethanol, acétate, butyrate, succinate propionate, H ₂ - CO ₂ Ethanol, lactate, acétate, H ₂ - CO ₂
Hémicelluloses	Bactéroides Eubacterium Ruminococcus Butyrivibrio Streptococcus C. Thermoceilum	Ethanol, acétate, butyrate, succinate propionate, H ₂ - CO ₂
Amidon	Bactéroides Lactobacillus Clostridium Clostridium thermohydrosulfuricum	Lactate, éthanol, acétate, H ₂ - CO ₂
Substances peptidiques	Streptococcus bovis Clostridium butyricum Clostridium thermohydrosulfuricum Ruminococcus	Méthanol, acétate, éthanol, lactate butyrate

Tableau II. Bactéries acidifiantes isolées dans les écosystèmes méthanogènes.

Type de fermentation	Genres ou espèces caractéristiques de la fermentation
Lactique	Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Bifidobacterium
Propionique Via acrylate Via succinate	Clostridium propionicum, Peptostreptococcus elsdenii Propionibacteriaceae
Mixte Butanedioïque	Entérobactéries Enterobacter Serriata
Butyrique	Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium, Butyrivibrio C. pasteurianum, C. kluyveri, C. butyricum C. thermosaccharolyticum

partir de l' H_2 géochimique et du CO_2 , dans le rumen intervient un phénomène d'absorption des acides gras volatils par la muqueuse intestinale et la production du méthane n'a lieu qu'à partir de H_2/CO_2 . Enfin dans l'écosystème digesteur, on distingue trois grandes phases biochimiques et la production de méthane provient de la réduction du gaz carbonique (30 %) et de la décarboxylation de l'acétate (70 %).

1. Hydrolyse ou acidogénèse

1.1. Généralité

La fermentation anaérobie des matières organiques complexes nécessite la présence des bactéries possédant des enzymes extracytoplasmiques capables d'hydrolyser les biopolymères en molécules transportables à travers les membranes. A part la lignine, presque toutes les macromolécules d'origine biologique sont susceptibles d'être dégradées en anaérobie (THAUER et al., 1984).

L'hydrolyse est réalisée par des espèces extrêmement diverses, mésophiles ou thermophiles, anaérobies strictes ou facultatives. A partir des polymères (glucidiques, protéiques, lipidiques), cette première phase aboutit à un mélange d'acides (acétique, lactique, proprionique, butyrique, etc.), de composés neutres (éthanol, méthanol), de produits gazeux (CO_2 , H_2) et d'ammoniaque.

Cette étape est réalisée par une population de 10^8 à 10^9 bactéries par ml (MAH et SUSSAN, 1967 ; HOBSON et al., 1974). Ces espèces principales possédant une activité hydrolytique sont rassemblées dans le tableau I. Il existe d'autres espèces réalisant seulement une fermentation tout à fait classique à partir des sucres simples. (tableau II).

1.2. Interactions bactériennes

* Au niveau de l'hydrolyse et de la fermentation, on assiste à des interactions bactériennes. En effet, sur le plan physiologique, on peut distinguer deux types métaboliques (DUBOURGUIER et al., 1982) :

- les bactéries dont le métabolisme n'est pas influencé par la pression partielle d'hydrogène (ex : bactéries homolactiques) et des espèces qui réalisent la décarboxylation du pyruvate sous l'action de la pyruvate formate lyase (ex : enterobactéries).

- les bactéries dont le métabolisme est influencé par la pression partielle d'hydrogène et qui produisent l'hydrogène via une hydrogène transférase. En culture pure, elles produisent un mélange d'acétate, de composés plus réduits (éthanol, acide lactique) et de l'hydrogène. Par contre, en co-culture avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène, le métabolisme est dévié vers la production exclusive d'acétate. C'est le cas de Clostridium thermocellum qui hydrolyse la cellulose en produisant de l'éthanol, du lactate, de l'acétate et de l'hydrogène. Par contre, une association de ce microorganisme avec Methanobacterium thermoautotrophicum fermente la cellulose en acétate et méthane de réduction (LE RUYET, 1984).

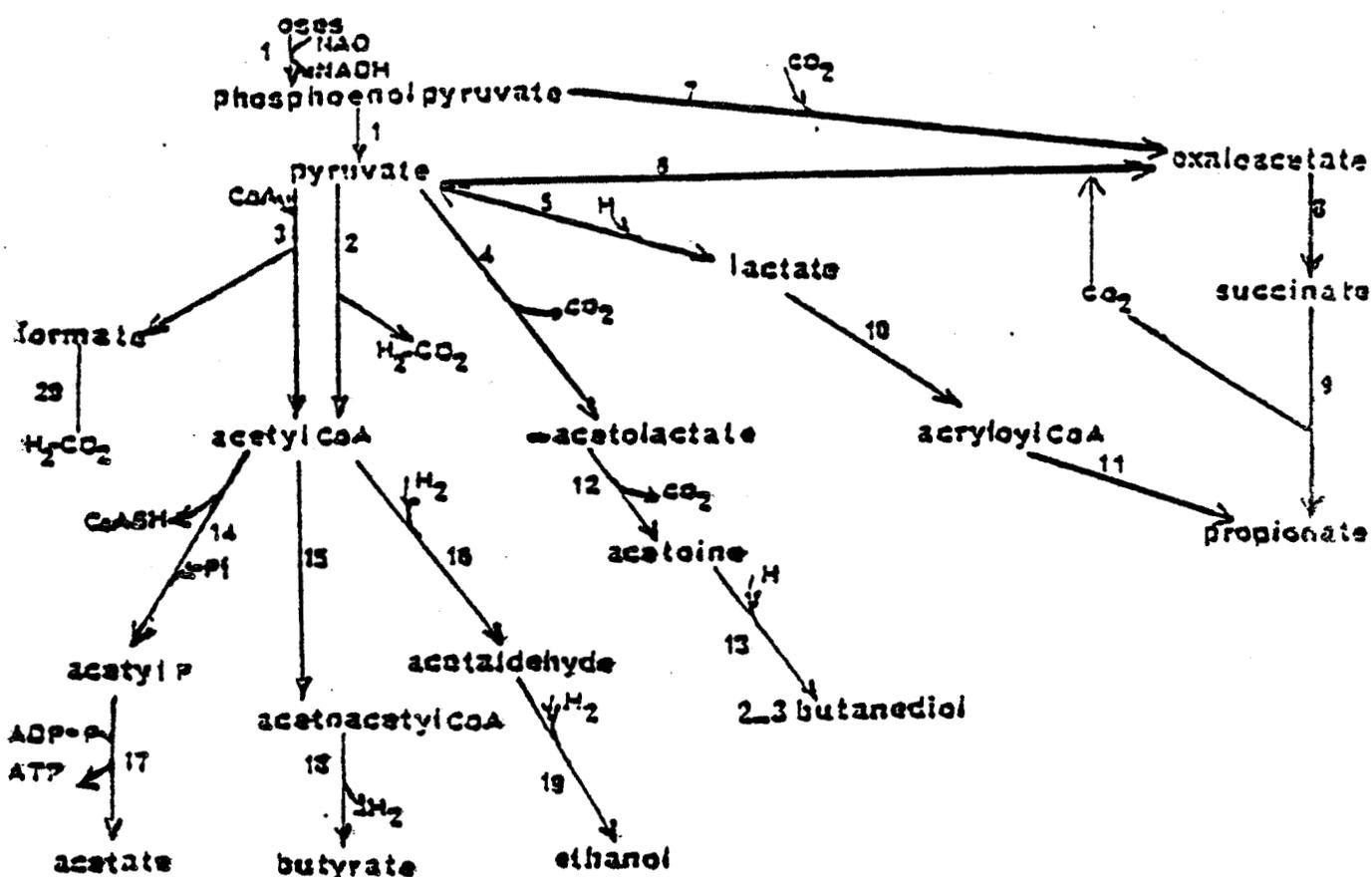
* Un autre cas est celui de l'hydrolyse de la cellulose par Acetivibrio cellulolyticus qui est inhibée par la pression partielle d'hydrogène. La co-culture avec Desulfovibrio sp permet de retrouver un taux de dégradation normal (LAUBE V.M. et al., 1981).

* De même, l'accumulation d'acétate dans le milieu diminue le rendement de dégradation de la cellule par Acetivibrio cellulolyticus qui n'est que de 4 à 5 g/l. Si l'acétate produit est utilisé par Methanosarcina barkeri, la co-culture peut dégrader jusqu'à 15 g/L du même polymère.

Tout cela montre le rôle fondamental des bactéries méthanogènes hydrogénophiles et acétoclastes dans la dégradation complète de la matière organique. Elles éliminent en permanence du milieu des composés dont l'accumulation est toxique pour l'ensemble de la communauté bactérienne.

1.3. Fermentation des oses

A l'exception des bactéries hétérolactiques qui utilisent la voie de la phosphocétolase, les bactéries anaérobies fermentent les hexoses par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS et les pentoses par la voie de WARBURG-



1. Enzymes Emden-Meyerhoff-Parnas.
2. Ferredoxine oxydoreductase.
3. Pyruvate formate lyase.
4. acetolactate synthase.
5. Lactate deshydrogenase.
6. Methyl malonyl CoA pyruvate transcarboxylase.
7. Phosphoenol pyruvate carboxylase.
8. Fumarate reductase.
9. Methyl malonyl CoA mutase, racemase, CoA transferase.
- 10.) Propionyl CoA deshydrogenase.
- 11.) CoA transferase.
12. acetolactate decarboxylase.
13. 2-3 butanediol deshydrogenase.
14. Phosphotransacetylase.
15. -ketothiolase.
16. Acetaldehyde deshydrogenase.
17. Acetate kinase.
18. CoA transferase.
19. Alcohol deshydrogenase.
20. Formate hydrogen lyase.



Fig 2 Différentes voies métaboliques des oses

DICKENS. (tableau III).

* Chez les anaérobies, la transformation du pyruvate en Acétyl CoA et dioxyde de carbone est réalisée par trois types de réactions qui sont :

- la réaction phosphoroclastique, catalysée par la pyruvate formate lysase ;
- la réaction thioclastique, catalysée par la pyruvate formate lysase ;
- la décarboxylation directe catalysée par une pyruvate décarboxylase.

La figure 2 regroupe les différentes voies métaboliques des oses. La réaction la plus répandue chez les anaérobies est la phosphoroclastique caractéristique du genre Clostridium. L'accepteur d'électrons est la ferredoxine dont le potentiel redox très bas ($E_0' = - 0,41 \text{ mV}$) permet le transfert des électrons sur les protons et la libération d'hydrogène.

* La formation de composés réduits (éthanol, lactate, propionate, butyrate, etc.) à partir du pyruvate et de l'Acétyl CoA permet aux bactéries dépourvues d'hydrogénase de régénérer les coenzymes réduits lors de la glycolyse et de la réaction phosphoroclastique.

La réduction de protons en hydrogène permet également la régénération de ferredoxine et de pyridines nucléotides réduites via une hydrogénase et une NADH ferredoxine oxydo réductase. Cette dernière a été mise en évidence chez Clostridium butyricum ; elle régule la production d'hydrogène et elle détermine le rapport acétate sur butyrate et l'efficacité thermodynamique de la fermentation (SAMAIN, 1983).

1.4. Fermentation des lipides

L'hydrolyse des glycérides en acides gras et glycérol est réalisée par des lipases exocellulaires. Parmi les bactéries lipolytiques, Anaerovibrio lipolytica est une des rares bactéries anaérobies dont l'activité lipolytique ait été étudiée de façon détaillée dans le rumen (HENDERSON, 1971). Le glycérol provenant de la lipolyse est fermenté par les bactéries lipolytiques. Après phosphorylation, il rejoint la voie d'EMBDEN-MEYEROFF au niveau de la dihydroxyacétone phosphate. Lorsque des 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'acétogénèse couplée à la production obligée d'hydrogène. C'est le cas de Synthrophomonas wolfei, une acétogène qui effectue l'oxydation des acides gras volatils ayant 4 à 8 atomes de carbone (Mc INERNEY et al., 1981) ou de S. sapovorans (ROY et al., 1985).

Les acides gras à longue chaîne sont oxydés en acides gras volatils courts par le mécanisme de la β oxydation. Deux atomes de carbone sont éliminés de l'acide en C_n et les produits résultants sont l'acide en C_{n-2}, l'acétate (Acetyl CoA) et quatre atomes d'hydrogène.

En anaérobie, ce mécanisme est thermodynamiquement défavorable et nécessite des conditions particulières liées à une pression en hydrogène très faible. Elle n'est réalisée qu'en présence obligatoire avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène comme Methanospririllum hungatei par exemple (ROY et al., 1985).

1.5. Fermentation des protéines

La protéolyse est réalisée par des espèces appartenant aux genres Clostridium, Peptococcus et Bacteroides. Les acides aminés qui en découlent sont transformés en acides gras volatils, gaz carbonique et ammoniacque par les mécanismes classiques, désamination, transamination et décarboxylation. Des numérations ont été faites sur des digesteurs traitant des effluants concentrés en protéines, le nombre de protéolytiques par ml est de $6,5 \cdot 10^7$. Quarante trois isolats ont été identifiés et classifiés qui sont : 18 Clostridia, 3 bacilles gram négatif, 8 Peptococcus anaerobus, 3 Bifidobacterium sp et une anaérobie facultative Staphylococcus sp (SIEBERT et al., 1969).

* Chez les Clostridium on rencontre l'une des deux fermentations des acides aminés qui est la réaction de STICKLAND qui consiste à fermenter deux acides aminés simultanément. L'oxydation de l'un (équation 1) est couplée avec la réduction de l'autre (équation 2) (DOELLE, 1975).

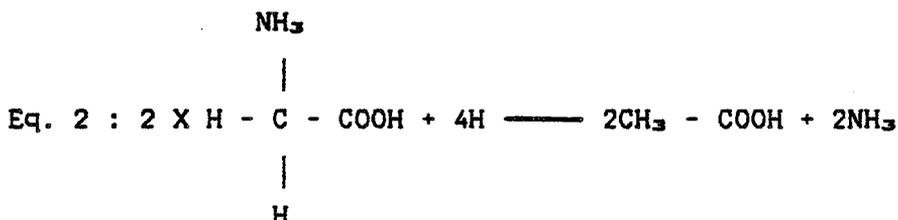
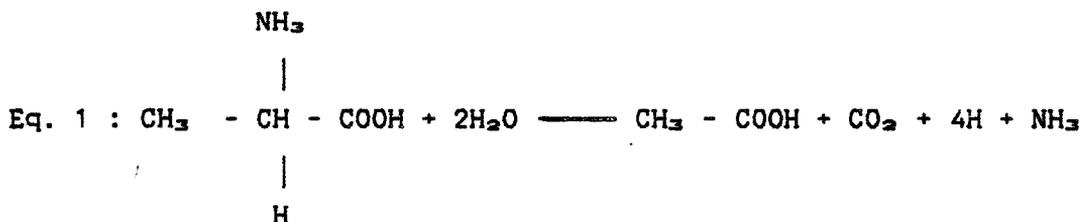


Réactions	G° en kJ/mole
Lactate — acétate + 2H ₂ + CO ₂	- 4,2
Ethanol — acétate + 2H ₂	+ 9,6
Butyrate — 2 acétate + 2H ₂	+ 48,1
Propionate — acétate + 3H ₂ + CO ₂	+ 76,1

Tableau IV. Thermodynamique de l'acétogène. (D'après THAUER et al., 1977)

Voie d'Embden Meyerhof	1 Hexose — 2 pyruvate + 2 NADH + 2 ATP
Voie de la phosphocétolase	1 Hexose — 1 pyruvate + 1 CO ₂ + 1 acétyl (P) + 3 NADH + 1 ATP 1 pentose — 1 pyruvate + 1 acétyl (P) + 1 NADH + 1 ATP
Voie de Warburg - Dikens	3 pentose — 5 pyruvate + 5 NADH + 5 ATP

Tableau III. Voies métaboliques utilisées par les anaérobies pour la dégradation des sucres.



Dans cette réaction, le glycolle est utilisé comme accepteur d'électrons. Par contre, la leucine et la valine qui sont dismutées respectivement en acide isovalérique et isobutyrique interviennent comme donneurs d'électrons.

2. Acétogénèse avec production obligée d'hydrogène

2.1. Généralités

Cette étape consiste à transformer les métabolites issus de la phase d'hydrolyse et de fermentation des polymères (lactate, éthanol, propionate, butyrate, valérate, acides gras à longue chaîne) en précurseurs directs du méthane (acétate et mélange gazeux H₂ - CO₂). La production de ces composés est influencée en particulier par le pH et la pression partielle d'hydrogène régnant dans le milieu. La déshydrogénation de ces composés est un processus qui dans des conditions standards est thermodynamiquement défavorable voire impossible (THAUER et al., 1977). Le tableau IV représente les variations d'énergie libre Go' de ces réactions de déshydrogénation.

Ces réactions deviennent exergoniques quand la pression partielle d'hydrogène devient faible, en particulier dans le cas de propionate, la pression partielle d'hydrogène nécessaire est très faible (9.10⁻⁵ atmosphère). C'est ce qui explique les difficultés de dégradation de ce

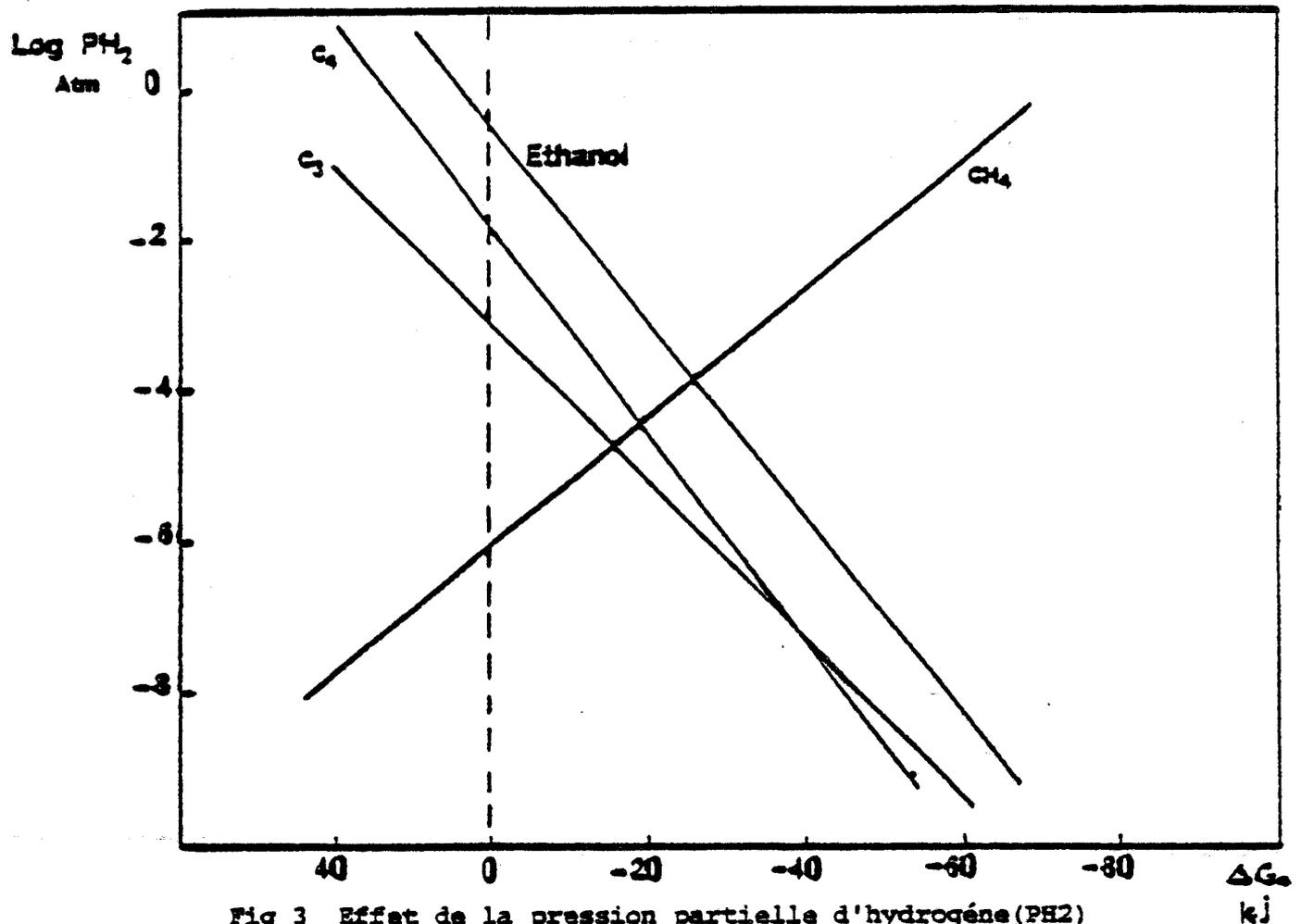


Fig 3 Effet de la pression partielle d'hydrogène (P_{H_2}) sur la variation d'énergie libre des réactions de dégradation de l'éthanol, butyrate et propionate en méthane

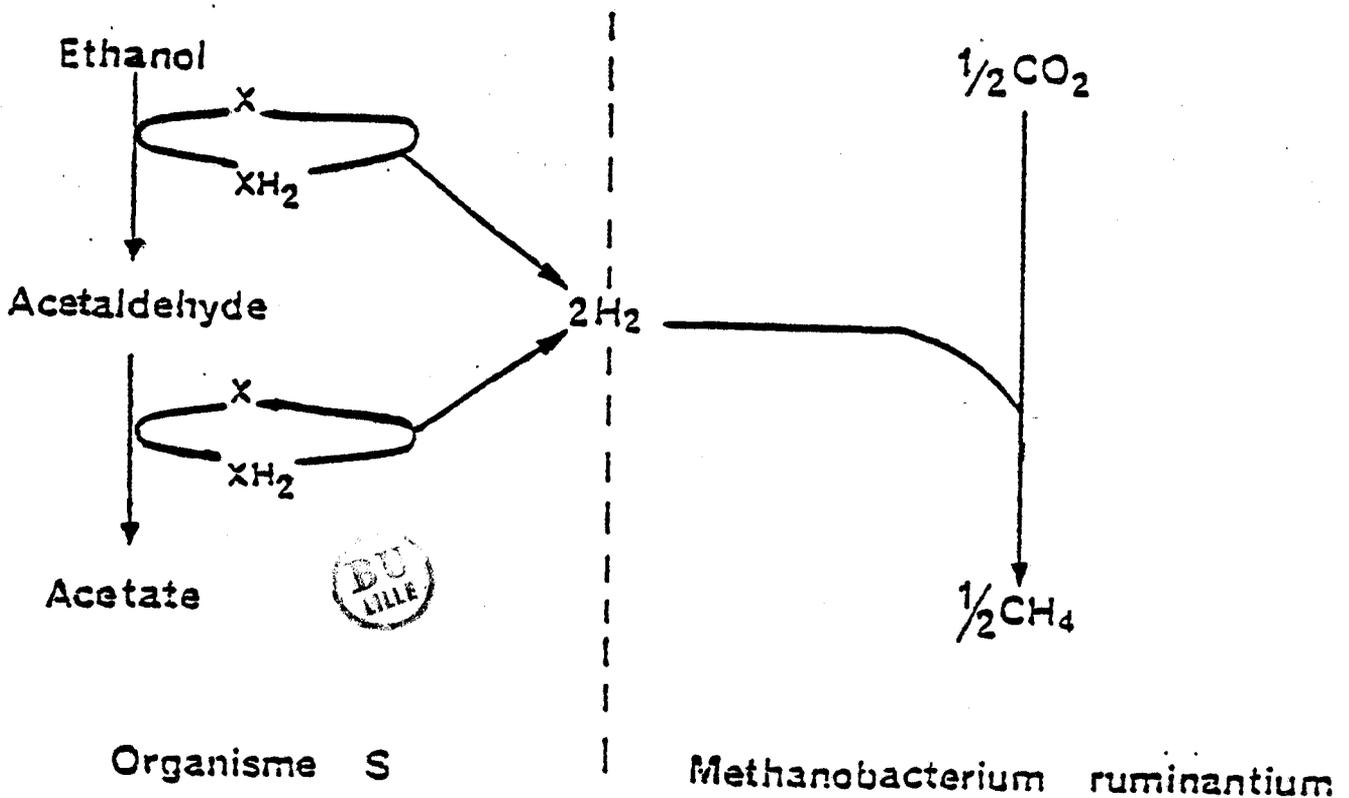


Fig 4 Acétogénèse à partir de l'éthanol par *Methanobacillus omelianskii*

composé dans les méthaniseurs. Les variations d'énergie libre G' en fonction de la pression partielle d'hydrogène sont présentées dans la figure 3.

* Les organismes qui réalisent ce type de réaction sont appelés "acétogènes obligées productrices d'hydrogènes" (OHPA). Ils sont étroitement spécialisés et, sauf exception, ils ne peuvent pas pousser en culture pure et doivent obligatoirement être associés à des bactéries utilisatrices d'hydrogènes. Elles peuvent être purifiées grâce à la technique du tapis qui consiste à incorporer dans le milieu d'isolement gélosé des bactéries utilisatrices d'hydrogènes (méthanogènes ou sulfato-réductrice en présence du sulfate). A côté des OHPA, les bactéries sulfato-réductrices qui possèdent une hydrogénase réalisent classiquement l'acétogénèse à partir du lactate et de l'éthanol en présence du sulfate ou en co-culture avec une bactérie méthanogène (DUBOURGUIER, 1982).

2.2. Microbiologie

Les bactéries de ce groupe très hétérogène ont en commun de ne pouvoir être cultivées qu'en co-culture avec une souche hydrogénéophile. Ce sont des acétogènes syntrophes obligatoires. Le tableau V regroupe les organismes acétogènes OHPA isolés et caractérisés.

2.2.1. Acétogène à partir de l'éthanol

La production du méthane à partir de l'éthanol laissait penser que l'organisme réalisant cette réaction n'est qu'une bactérie méthanogène particulière. En 1967, BRYANT et ses collaborateurs ont mis en évidence que Methanobacillus omelianskii dégradant l'éthanol en méthane est en fait l'association syntrophique de deux espèces différentes : l'organisme S qui transforme l'éthanol en acétate et en hydrogène et une bactérie méthanogène, Methanobacterium bryantii qui utilise l'hydrogène. La figure IV montre l'acétogène à partir de l'éthanol par M. omelianskii. L'organisme S purifié a été obtenu avec le pyruvate comme substrat qui le fermente en acétate, éthanol et CO_2 . Bien que cette souche ait été perdue, les acquis récents en microbiologie des syntrophes permettent de penser qu'elle est étroitement apparentée à Pelobacter venetianus (SCHINK et al., 1983).

Tableau V. Organismes acétogènes "OMPA" isolés en association avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène.

Organismes acétogènes producteurs d'hydrogène	Substrats	Métabolite de la monoculture	Bactérie utilisatrice d'hydrogène de l'association	Métabolite de la culture mixte	Référence
Organisme 9	Ethanol Pyruvate	- Ethanol, acétate	M. bryantii M. bryantii	acétate, CH ₄ acétate, CH ₄	Bryant et al. (1967) Reddy et al. (1972)
Desulfovibrio Desulfuricans, vulgaris	Ethanol Lactate Lactate	- - -	M. bryantii M. bryantii M. barkeri	acétate, CH ₄ acétate, CH ₄ CH ₄ , CO ₂	Bryant et al. (1977) Bryant et al. (1977) Mc. Inerney et al. (1981)
Syntrophomonas Wolfei	Butyrate Valérate	- -	M. Hungatei M. Hungatei	acétate, CH ₄ acétate, propionate, CH ₄	Mc. Inerney et al. (1981)
Syntrophobacter wolinii	Propionate Propionate	- -	Desulfovibrio + SO ₄ ²⁻ Desulfovibrio + M. Hungatei	acétate, CH ₄	Bonne et al. (1980)
Syntrophus buswelli	Benzoate	-	Desulfovibrio ou M. Hungatei	acétate, CH ₄	Mounfort et al (1982)

En 1981, BENBASSAT et al. isolent une acétogène thermophile qui est Thermoanaerobium brockii qui dans des conditions normales de culture fermente le glucose et le lactate ; cependant, en association avec une bactérie méthanogène (M. thermoautotrophicum) elle peut oxyder l'éthanol en acétate et hydrogène. Dans ces conditions, elle fonctionne comme une acétogène productrice d'hydrogène.

2.2.2. Acétogène à partir des acides gras à longue chaîne (AGLC)

Les acides gras linéaires à nombre pair de carbones sont dégradés en acétate, les acides impairs en acétate et propionate. Parmi les quelques bactéries acétogènes syntrophes et qui réalisent l'acétogénèse à partir des AGLC on distingue :

* Syntrophomonas wolfei (Mc INERNEY, 1981) est un bacille gram négatif non sporulé qui utilise les acides gras de C₄ à C₈. Son temps de génération est de 90 heures sur butyrate et valérate et 180 heures sur caproate à 35°C.

* Clostridium bryantii (STIEB et al., 1985) est une souche qui utilise les acides gras de C₄ à C₁₁. Son temps de doublement est voisin de 80 heures en co-culture avec Desulfovibrio ou M. hungatei. Ainsi les variations entre les substrats de ces bactéries portent sur la longueur de la chaîne carbonée de l'acide.

* La bactérie acétogène Syntrophomonas sapovorans, isolée par ROY et al. (1986), oxyde les AGLC par un mécanisme assimilé à la β oxydation. Cette souche utilise un très large spectre d'acides du butyrate au linoléate, seuls les acides à chaînes linéaires sont dégradés.

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

2.2.3. Bactéries sulfato réductrices

Les sulfato réductrices sont réparties en deux groupes : le premier groupe oxyde complètement les composés organiques en CO_2 et H_2S . Ces bactéries appartiennent aux genres : Desulfococcus, Desulfonema, Desulfosarcina. Le deuxième groupe qui joue un rôle important dans les digesteurs anaérobies. En présence de sulfate, les espèces constitutives oxydent incomplètement les composés organiques en acétate. En absence de sulfate, certaines peuvent se comporter en bactéries fermentatives dont le métabolisme peut être dévié vers une homo acétogénèse en présence de souches hydrogénophiles. C'est le cas de Desulfovibrio desulfuricans et vulgaris.

Plus récemment, on a pu montrer qu'il y a des sulfato réductrices assurant l'acétogénèse à partir des acides gras volatils et de l'acide benzoïque comme source de carbone et d'énergie (WIDDEL et al., 1982). En présence de sulfate, Desulfobulbus propionicus oxyde le propionate en acétate et utilise le mélange $\text{H}_2 - \text{CO}_2$. De même pour Desulfobulbus elongatus qui pousse sur un milieu contenant du propionate et du sulfate (SAMAIN et al., 1984).

2.3. Conclusion

Le métabolisme acétogénic "OHPA" se caractérise par une absolue dépendance de l'élimination de l'hydrogène par des bactéries utilisatrices comme les bactéries méthanogènes hydrogénophiles ou les bactéries sulfato réductrices en présence de sulfate. Les bactéries qui réalisent l'acétogénèse à partir des AGLC sont encore mal connues. Ce sont vraisemblablement des syntrophes obligées. 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.

3. Méthanogénèse sensu stricto

C'est un groupe tout-à-fait particulier qui assure la production du méthane en utilisant une gamme de substrats très limitée : acétate, $H_2 - CO_2$, formate, CO, méthanol et méthylamine. En général, dans les écosystèmes méthanogènes le flux de carbone passe principalement par l'acétate et hydrogène, gaz carbonique. Dans les digesteurs, le méthane produit provient à 70 % de la décarboxylation de l'acétate, les 30 % restant résultent de la réduction du gaz carbonique par l'hydrogène.

3.1. Microbiologie

Des études biochimiques fines, basées sur le catalogue des nucléotides libérés par l'action de la ribonucléase S, sur l'ARN ribosomal 16S, ont permis à WOESE et ses collaborateurs en 1978 de définir une nouvelle lignée, celle des archaebactéries, à côté des lignées connues des eubactéries et des eucaryotes. Outre les méthanogènes, les Archaebactéries comprennent deux autres groupes : les bactéries halophiles et les thermoacidophiles. Ces organismes possèdent en commun certaines caractéristiques qui les différencient très nettement des eubactéries :

- leur paroi cellulaire quand elle existe est dépourvue de peptidoglycane et d'acide muramique. Ces microorganismes se développent normalement en présence des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi ;
- leurs lipides membranaires sont des éthers du phythanol et du glycérol ;
- leurs ARN-polymérase ont des compositions en sous-unités et des sensibilités aux antibiotiques différents.

Au sein des Archaebactéries les méthanogènes ont aussi des caractères propres. Mis à part leur caractéristique première qui est la capacité de produire le méthane et le fait qu'ils soient anaérobies stricts EOS (Extremely Oxygen Sensitive), on trouve chez les méthanogènes et uniquement chez eux des molécules particulières. (Voir chapitre suivant).

Tableau VI. Les méthanogènes et leurs substrats
(Complété à partir de Balch et al., 1979)

ESPECES	SUBSTRATS POUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE METHANE
Methanobacterium formicicum Methanobacterium bryantii bryantii s.M.O.G. Methanobacterium thermoautotrophicum	H ₂ , formate H ₂ H ₂ H ₂
Methanobrevibacter ruminantum Methanobrevibacter arboriphilus arbor. s. AZ arbor. S. DC Methanobrevibacter smithii	H ₂ , formate H ₂ H ₂ H ₂ H ₂ , formate
Methanococcus vanniellii Methanococcus voltae	H ₂ , formate H ₂ , formate
Methanomicrobium mobile	H ₂ , formate
Methanogenium cariaci Methanogenium marisnigri	H ₂ , formate H ₂ , formate
Methanospirillum Hungatei Methanospirillum Hungatei s. GP 1	H ₂ , formate H ₂ , formate
Methanosarcina barkeri Methanosarcina barkeri s. 227 Methanosarcina barkeri s. W Methanosarcina barkeri s. UBS Methanosarcina barkeri s. Z	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , acétate
Methanosarcina mazei	Acétate, méthanol
Methanotrix soehngenii	Acétate

* En 1979, BALCH et ses collaborateurs consacrèrent une mise au point sur le groupe des méthanogènes qui sont représentés dans le tableau VI avec leurs substrats. Depuis lors, d'autres méthanogènes ont été isolés, et qui jouent un rôle écologique significatif dans les digesteurs mésophiles sont :

* Methanosarcina mazei, observé sous forme d'agrégats, a un temps de doublement minimal sur acétate de 24 heures. Ont été décrites :

- la souche S₄ isolée par MAH en 1980 ;
- la souche Mc₃ isolée par TOUZEL et al. en 1983 ;
- la souche Lyc isolée par LIU et al. en 1985.

* Methanotherix soehngenii, de forme filamenteuse caractéristique, croît apparemment très lentement avec un temps de doublement minima de 6 jours. Les souches isolées sont :

- Opfikon isolée par HUSER et al. en 1982 ;
- FE isolée par TOUZEL (communication personnelle).

A côté de Methanotherix soehngenii, PATTEL en 1984, isole une bactérie sous forme de batonnet à partir de boues d'égouts, l'isolat est classifié comme Methanotherix concilii Souche GP6.

Dans les écosystèmes thermophiles, les acétoclastes récemment isolés sont : Methanosarcina sp TM, (ZINDER et al., 1979) ; Methanosarcina sp, souche CHTI 55 (PETROFF et al., 1985) ; Methanotherix sp (ZINDER et al., 1984). Elles possèdent des temps de doublement plus courts et des constantes d'affinités plus élevées que leurs homologues mésophiles. Le tableau VII montre les principales méthanogènes avec leurs caractéristiques cinétiques.

3.2. Biochimie de la production de méthane

Au cours de cette étape, l'acétate est transformé en méthane et en bicarbonate (VAN DEN BERG et al., 1976). De plus l'hydrogène produit au cours des étapes acidogène ou acétogène peut être utilisé par les microorganismes méthanogènes pour réduire l'anion bicarbonate également en

méthane (TAYLOR et PIRT, 1977). La réduction du CO_2 en méthane et la transformation de l'acétate en méthane et CO_2 sont apparues récemment comme des phénomènes biologiques liés et non séparés comme on le croyait (GUNSALUS et WOLFE, 1977). Enfin, l'excédent d'anions bicarbonates, produits dans l'étape méthanogène pourrait servir à neutraliser les ions hydrogènes produits dans les étapes acidogènes et/ou acétogènes et à libérer le CO_2 que l'on trouve en mélange avec le méthane dans la phase gazeuse. L'étape de méthanogénèse agit ainsi comme un puits à électrons déplaçant l'équilibre des réactions d'oxydoréduction ayant lieu dans l'étape acidogène et accélère ainsi la cinétique globale de la dégradation de la matière organique (CHUNG, 1976 ; MINCHEN et al., 1977). Les méthanogènes renferment des coenzymes jamais rencontrés dans les autres espèces bactériennes.

3.2.1. Les Coenzymes

* Coenzyme M est le premier co-facteur spécifique mis en évidence chez tous les méthanogènes sauf Methanobrevibacter ruminantium. Il a été isolé par Mc BRIDE en 1971 et sa structure déterminée par TAYLOR et WOLFE en 1974. Il s'agit de l'acide 2-mercapto-éthane sulfonique ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}^{-3}$). Sa concentration est de l'ordre de 3-50 n mole/mg protéine chez les méthanogènes. Sa forme méthylée est le précurseur direct du méthane et sa réduction est catalysée par un complexe multienzymatique la methyl COM réductase (NAGLE et al., 1983).

Une variété de dérivé du COM a été synthétisée en substituant le groupement méthyl, pour étudier la méthanogénèse, peu de ces dérivés réagissent comme substrat pour la formation du méthane, par exemple l'hydroxyméthyl COM ($\text{OH-CH}_2\text{-S-COM}$) qui est réduit en méthane par les extraits cellulaires.

* Le facteur F 420 a été isolé en 1972 par CHEESMAN. Présent chez toutes les méthanogènes à un taux de 1,1 - 4,7 n mole/mg protéine total, il fluoresce à l'état oxydé et présente un pic d'absorption à 420 nm. Cela permet de détecter facilement les méthanogènes en microscopie d'épi-fluorescence en U.V.. Il a une structure similaire à celle d'une flavine et correspond à un dérivé 5-deazaisolloxazine (Figure 5). Son poids moléculaire est

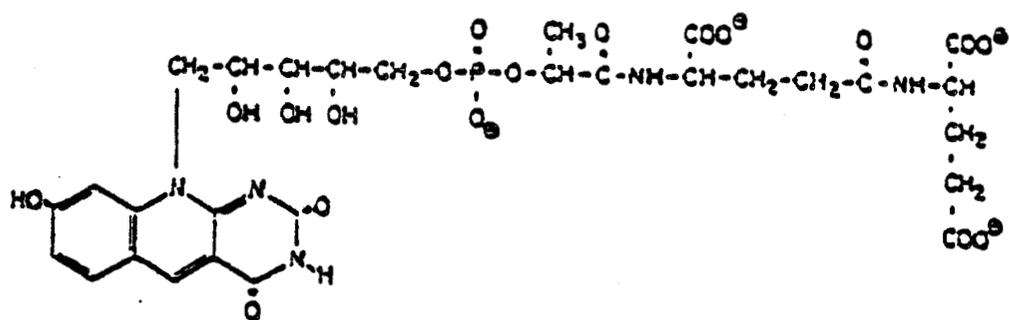


Fig 5 Structure du Coenzyme F420

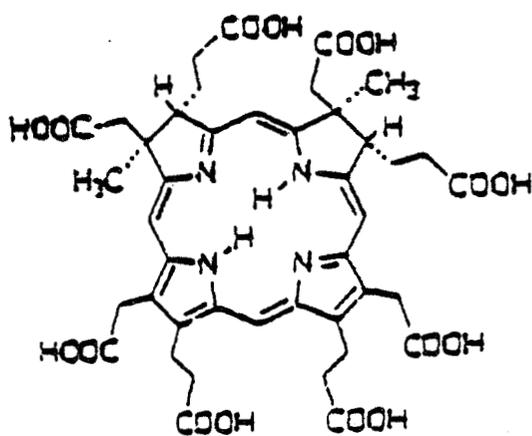


Fig 6A La sirohydrochlorine précurseur du F430

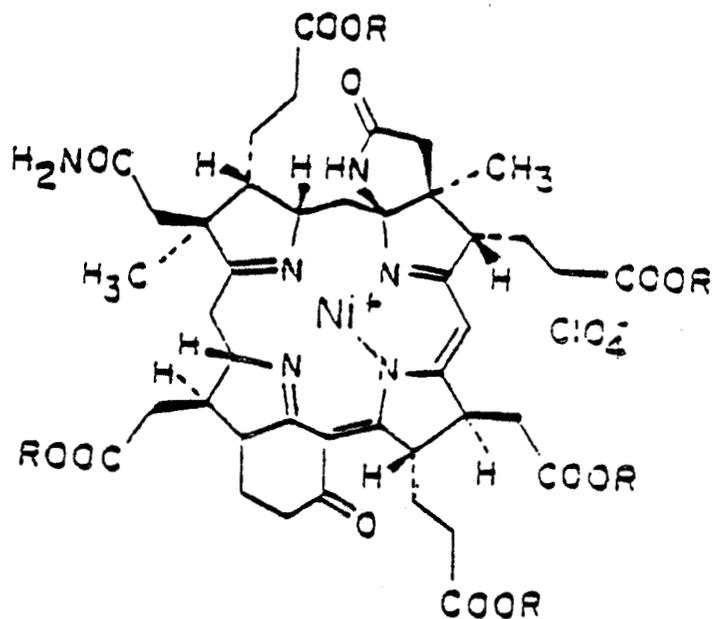


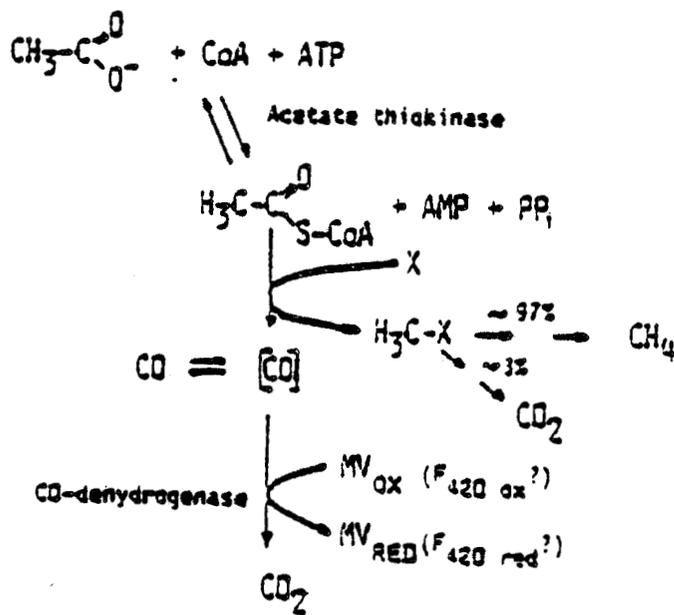
Fig 6B Structure du Cofacteur F430

de 843 (EIRICH et al., 1979). Le F 420 joue un rôle de transporteur d'électrons, son potentiel d'oxydo réduction est de -373 mV. Réduit par l'hydrogène via hydrogénase, il transfère les électrons sur NADP mais pas sur NAD en utilisant une enzyme NADP-F420 oxydo réductase (YAMAZAKI et al., 1980). Il intervient comme accepteur d'électrons provenant de l'hydrogène et du formate dans deux réactions catalysées par deux systèmes enzymatiques respectifs, l'hydrogénase et la formate hydrogène lyase (TZENG et al., 1975), et comme donneur d'électrons dans deux réactions de condensation du CO₂ au cours de la synthèse du carbone cellulaire (VOGELS et al., 1982).

* Le coenzyme F 430 observé chez M. thermoautotrophicum par GUNSALUS en 1978, est un composé jaune non fluorescent qui représente un maximum d'absorption à 430 nm. Il comporte une structure tetrapyrrolique avec du nickel. Cette conformation l'apparente aux composés biologiques comme la chlorophylle, hèmes, vitamine B 12 et suggère qu'il dérive comme eux de la sirohydrochlorine (DIECKERT et al., 1980), [Figure 6 (A, B)]. Le F 430 correspond au groupement prosthétique de la méthyl coenzyme M réductase. Il agit comme donneur d'électrons dans l'étape de réduction du méthyl Co M en méthane.

* Méthanoptérine, YFC et FAF. Des expériences avec ¹⁴CO₂ et ¹⁴CH₃OH ont montré qu'en plus des précurseurs des composés carbonés de la cellule (alanine, acide glutamique, acide asparatique) ou du méthane (CH₃-S-COM), un autre composé marqué se trouve présent et intervient comme intermédiaire dans la réduction du CO₂ en méthane (DANIELS et al., 1978). Le taux de ce co-facteur dans la cellule est de 150 à 200 mg/Kg de poids sec de la cellule. Sous la lumière U.V. il fluoresce en jaune. Il perd sa fonction de transporteur de carbone quand il est attaqué enzymatiquement et le produit résultant fluoresce en bleu en milieu acide entre pH 2 et 5 avec un maximum à pH 3,6 (VAN BEELEN et al., 1984). Récemment, un autre transporteur de carbone a été mis en évidence, le FAF (Formaldehyde Activating Factor). Il possède des propriétés identiques à celles du YFC et il s'agit de la tétrahydréméthanoptérine (ESCALANTE -SEMERANA et al., 1984).

D'autres dérivés de la méthanoptérine du YFC comme méthényl, hydroxyméthyl qui sont obtenus par un simple réarrangement moléculaire, sont des intermédiaires métaboliques entre le CO₂ et le méthyl Co M.



MV: Méthylviologène

Fig 7 Schéma métabolique de la réaction acéticlastique (d'après KOHLER et al, 1984).

Biotine, Thiamines, Acide folique et Acide pantothenique ont été rencontrés chez les méthanogènes (LEIGH, 1983). Ils peuvent intervenir dans la réduction de CO₂ en méthane, ainsi dans les réactions de transfert des groupements carboxyl ou d'autres groupements monocarbonés. La biotine est présente chez Mb thermoautotrophicum à un taux de 0,0003 n mole/mg protéine lui permettant d'assurer les voies de biosynthèse, son rôle est minime lors de la méthanogénèse. L'acide folique, rencontré à un taux de l'ordre de 0,04 à 0,1 p mol / mg protéine soit 80 à 400 fois plus faible que chez les eubactéries ; il intervient lors de la biosynthèse de quelques produits comme la sérine, les purines et la méthanoptérine. La thiamine et l'acide pantothenique ont des taux de l'ordre de 0,01 n mole/mg protéine. Ils interviennent lors de certaines voies de biosynthèse.

3.2.2. Méthanogénèse à partir de l'acétate

* Des expériences réalisées par MAH et al. en 1977 avec de l'acétate radioactif montrent que le méthane provient essentiellement du groupement méthyl de l'acétate suivant la réaction :



Les enzymes et le mécanisme d'incorporation au cycle par méthylation du Hs-COM ne sont pas connus. Cependant, la présence active d'une CO₂-deshydrogénase a été récemment démontrée chez les méthanogènes acétoclastes (KRZYCKI et al., 1984 ; KOHLER et al., 1984). Son rôle dans le catabolisme de l'acétate a permis de compléter le schéma métabolique de la réaction acétoclastique. (Figure 7).

* A partir des cultures enrichies, l'analyse microbiologique de la décarboxylation d'acétate a mis en évidence "un seul organisme" réalisant la réaction qui est Methanosarcina (SMITH et al., 1978) dont les paramètres cinétiques concordent avec ceux obtenus par LAWRENCE et al. (1969) cités par ZEHNDER (1982). Le tableau VIII résume les constantes cinétiques de la croissance à partir de l'acétate. Par ailleurs, dans la plupart des digesteurs où la concentration en acétate résiduel est très faible, Methanotherix pousse le moins lentement et devient dominante compte tenu de sa très forte affinité pour ce substrat. A l'inverse, Methanosarcina

Tableau VII. Principales caractéristiques cinétiques des bactéries méthanogènes
(D'après ZEHNDER et al., 1982) - (Complété d'après IOUZEL et ALBAGNAC, 1984)

	Substrat	K_s (moie/l)	μ max (h^{-1})	Y_s (g/moie)	r_s (moie/g.h)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (T = 65 °C)	H ₂	8×10^{-6}	0,23 - 0,69	1,6	(0,43)
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> AZ (T = 33 °C)	H ₂	-	0,058	0,61	0,12
<i>Methanobacterium formicicum</i> (T = 38 °C)	H ₂	-	-	0,42	-
<i>Methanobacterium bryantii</i> (T = 33 °C)	H ₂	-	-	0,6	-
<i>Methanosarcina barkeri</i> strain 227 (T = 36 °C)	H ₂	-	-	2,18	-
	acétate	5×10^{-3}	0,02 - 0,33	1,8 - 2,7	$1,4 - 8,5 \times 10^{-3}$
<i>Methanotherix soehngenii</i> (T = 35 °C)	acétate	$0,7 - 1 \times 10^{-3}$	0,01	1,4	$1,62 \times 10^{-3}$
<i>Methanosarcina bazei</i> (T = 35 °C)	acétate	$1,3 - 5 \times 10^{-3}$	0,02	= 2	-
<i>Methanosarcina</i> sp. CHII 55 (T = 57 °C)	acétate	$7,5 \times 10^{-3}$	0,09	= 2	-
<i>Methanosarcina</i> strain TH 1	acétate	$4,5 \times 10^{-3}$	0,06	= 2	-

K_s = constante d'affinité

μ max = taux de croissance maximum

Y_s = rendement de production de cellule par moie de substrat

r_s = activité spécifique de production de méthane par g de cellule.

BU
VILLE

Tableau VIII. Cinétiques de croissance de la méthanogénèse
à partir de l'acétate (D'après ZENHDER, 1982)

T °C	μ max J ⁻¹	Y Kg biomasse / Kg DCO	Ks mg DCO / l	Référence
35 30 25	0,34 0,24 0,24	0,04 0,054 0,050	165 356 930	Lawrance et Mc. Carty (1969)
35	0,44	0,05	250	Smith et Mah (1980)
37	0,11	0,023	28	zenhder et al. (1980)



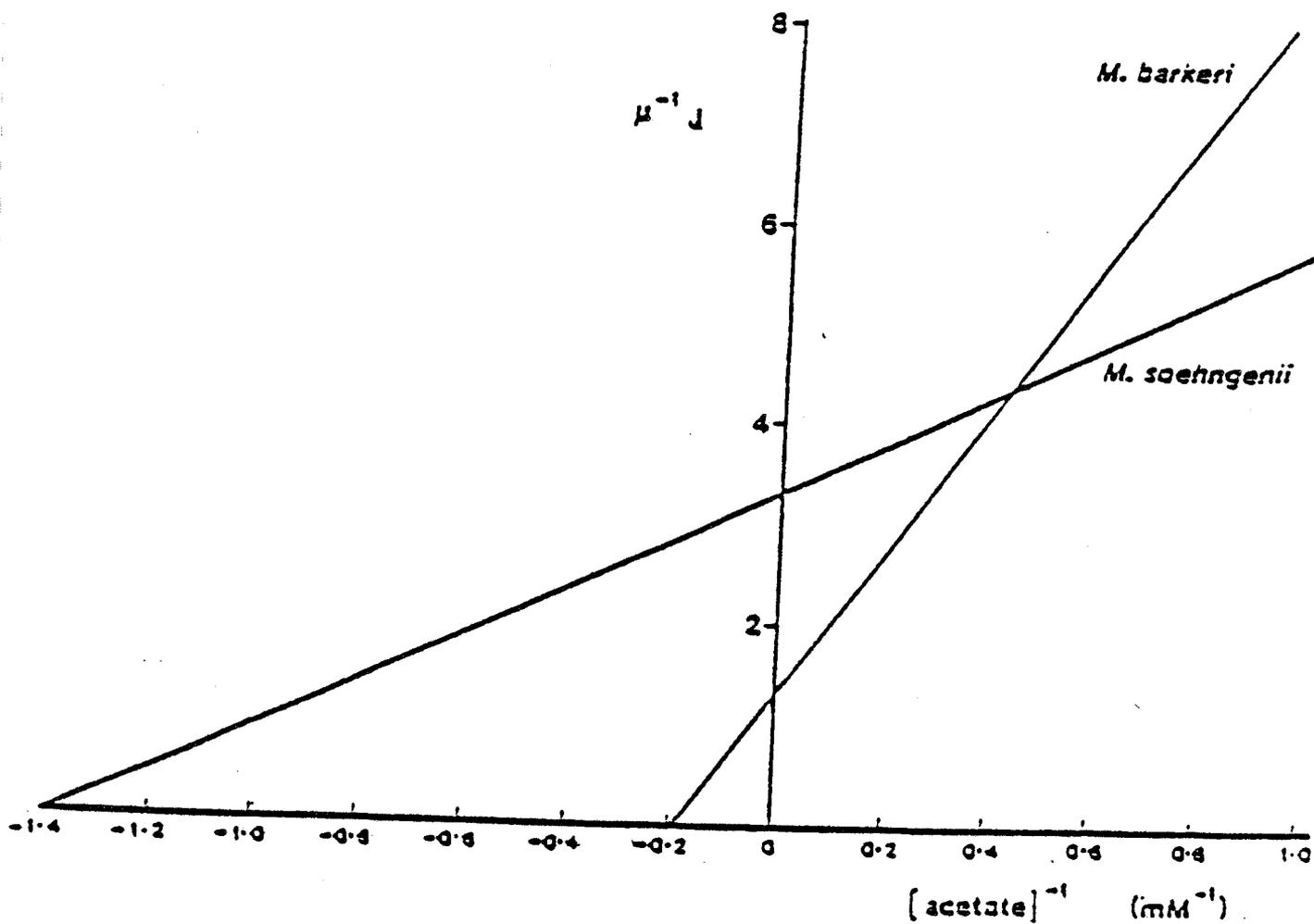


Fig 8 Dépendance du taux de croissance vis à vis de l'acétate par *Methanotrix soehngenii* et *Methanosarcina barkeri*

s'établit dans les digesteurs quand la concentration en acétate devient élevée. La figure 8 montre la dépendance du taux de croissance vis-à-vis de la concentration en acétate dans le milieu pour les deux organismes.

3.2.3. Méthanogénèse à partir du mélange H₂ - CO₂

La plupart des méthanogènes produisent du méthane à partir de l'hydrogène et le gaz carbonique suivant la réaction :



Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les différents mécanismes de la méthanogénèse à partir du CO₂ et de l'H₂. Parmi eux, et celui qui tient compte de l'ensemble de ces acquis, a été proposé par ESCALANTE-SEREMENA en 1984 (Figure 9). Le facteur CDR (Carbon Dioxide Reduction) ou méthanofurane est indispensable pour la méthanogénèse à partir du CO₂ (ROMESSER, 1982 a et b). Il intervient dans l'étape initiale de fixation et d'activation du CO₂. Sa concentration dans les cellules est de 0,3 n mol / mg protéine (LEIGH et al., 1984). En plus de l'enzyme méthyl COM réductase, l'ATP, Mg²⁺, ce co-facteur CDR est nécessaire à la réduction du CO₂ en CH₄, et l'effet RPG ne peut avoir lieu qu'en sa présence.

3.2.4. Méthanogénèse à partir du méthanol

La réaction ci-dessous représente la méthanogénèse à partir du méthanol.



La régénération de trois moles de CH₄ est obtenue grâce aux six électrons libérés lors de l'oxydation d'une mole de méthanol en CO₂. La méthylation du HS-COM à partir du méthanol est catalysée par la HS-COM méthyl transférase mis en évidence par SHAPIRO et al., 1980. Ce métabolisme du méthanol est modifié lorsqu'il est présent avec de l'acétate. Des études avec des éléments radioactifs indiquent que dans ce cas l'acétate est surtout oxydé en CO₂, ce qui libère 8 électrons par mole d'acétate au lieu de 6 électrons par mole de méthanol et permet la réduction de tout le

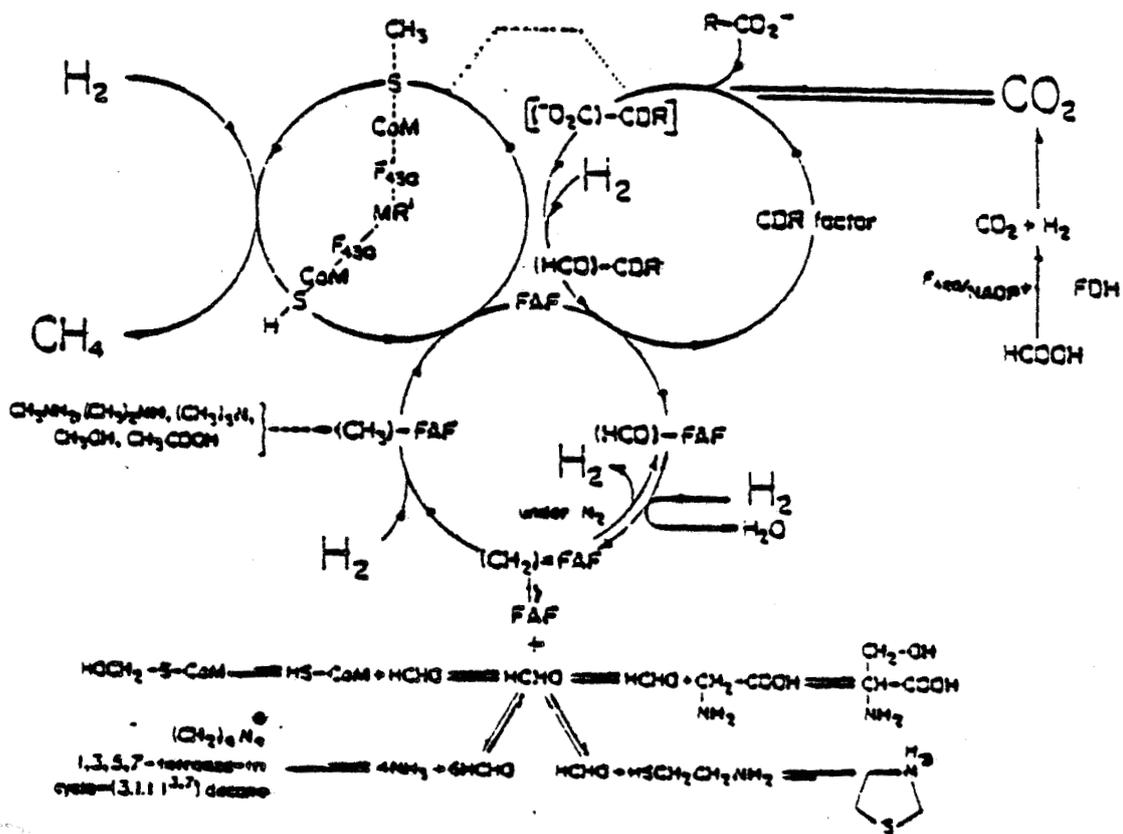


Fig 9 Schéma métabolique de la méthanogénèse à partir du mélange H₂/CO₂ (d'après ESCALANTE-SEREMENA et al, 1984)



méthanol en méthane. Le même bilan stoechiométrique est obtenu quand le méthanol se trouve en présence de l'hydrogène suivant la réaction :



Cette réaction est réalisée par Methanosphaera stadtmaniae qui peut seulement pousser sur méthanol (MILLER et al., 1985).

3.3 Synthèse des constituants cellulaires

3.3.1. Assimilation du carbone

La Figure 10 (A, B, C) montre les différentes voies de synthèse à partir des composés assimilables par les méthanogènes.

Cependant, chez les bactéries méthanogènes autotrophes (STUPPRICH et al., 1983), contrairement à ce qui se passe chez les photosynthétiques et les organismes chemiotroautotrophes, la fixation du CO₂ ne se fait pas par la voie classique (cycle de CALVIN) mais par une voie (Fig. 11) qui a été récemment décrite (FUCHS et al., 1982).

Chez la plupart des méthanogènes l' α -cétoglutarate est produit via le succinyl COA, chez les sarcines l' α -cétoglutarate est produit via l'isocitrate (DANIELS et al., 1984).

Chez Mb thermoautotrophicum (l'incorporation du CO₂) le modèle d'incorporation du CO₂ proposé par FUCHS et al., 1982, pour la biosynthèse de chaînes carbonées est représenté sur la Figure 12 ; le tableau IX regroupe les enzymes correspondants. On distingue trois réactions de fixation du CO₂ :

- sur l'acétyl COA, la réaction est catalysée par l'enzyme pyruvate synthase, le transporteur d'électrons et le F 420.
- sur le phosphoénol pyruvate, la réaction est catalysée par la phosphoénol pyruvate carboxylase.

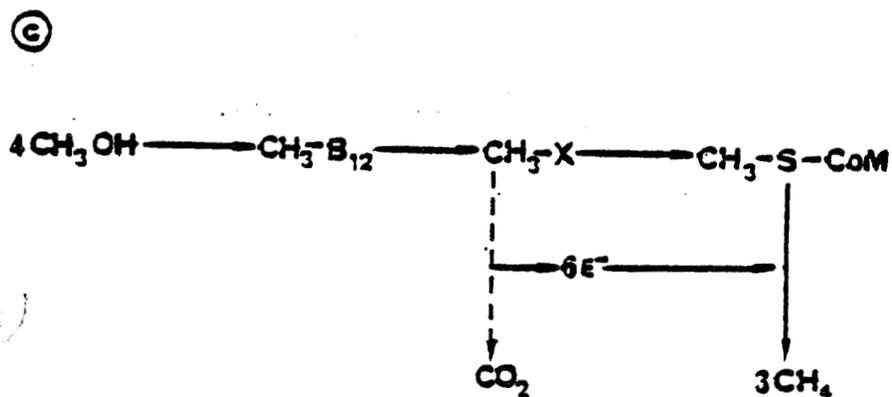
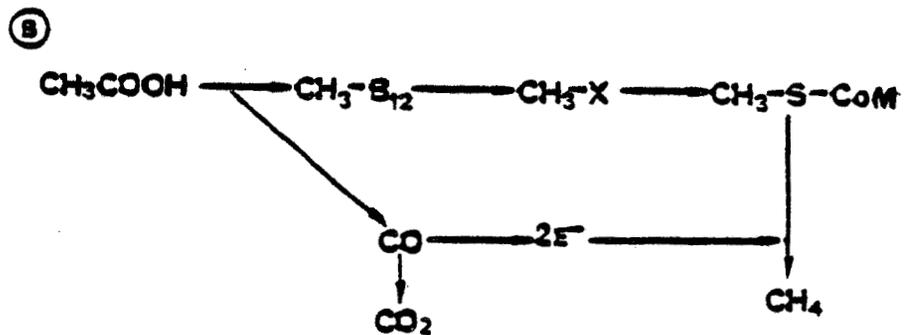
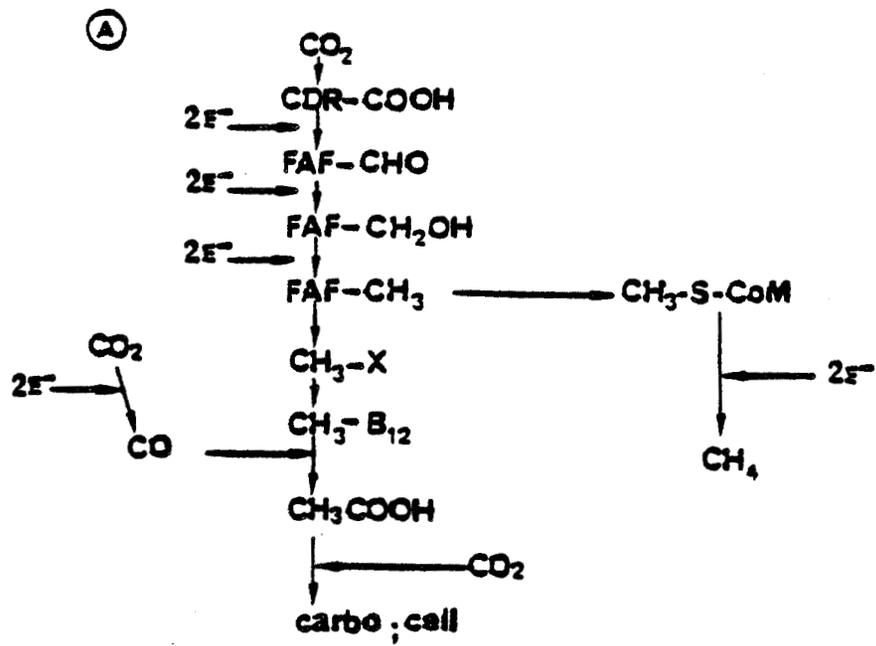


Fig 10 (A,B,C) La relation entre la méthanogénèse et la synthèse du matériel carboné de la cellule
 A- à partir du CO₂
 B- à partir de l'acétate
 C- à partir du méthanol

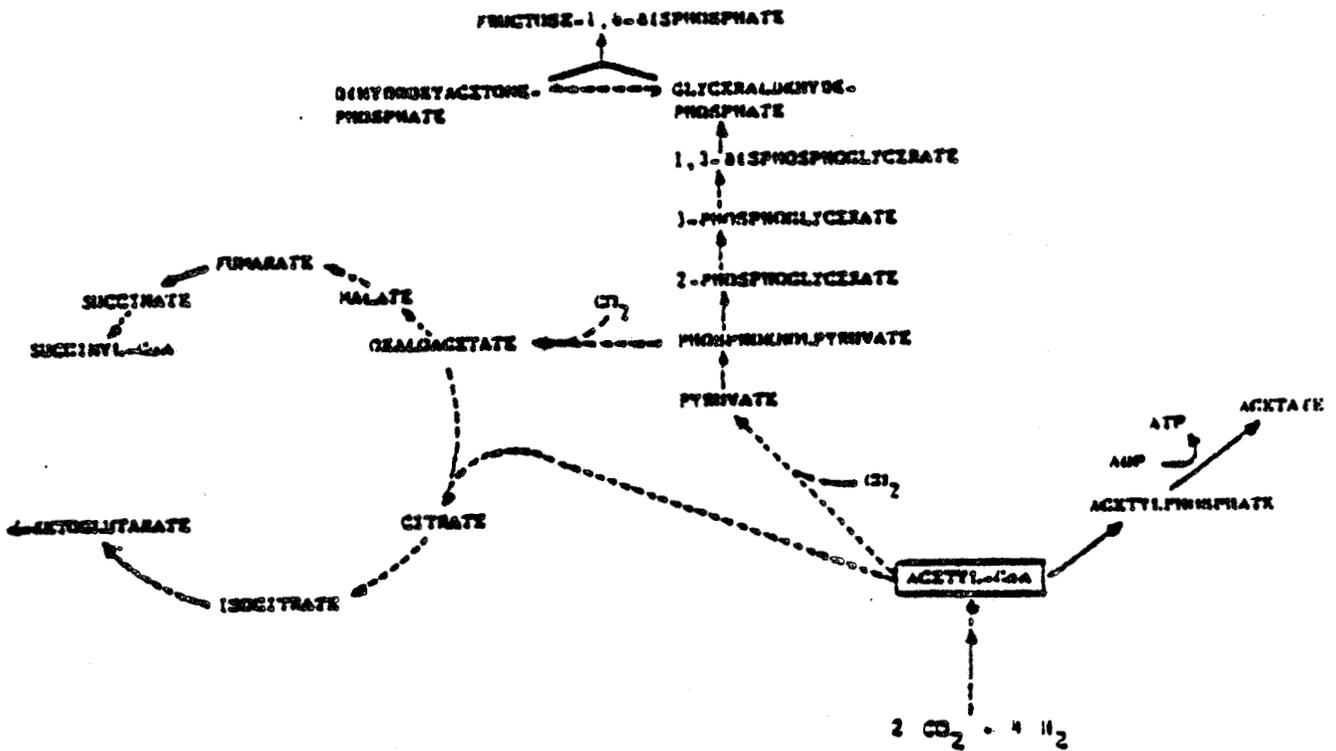


Fig 11 Voie d'assimilation de CO₂ chez les méthanogènes et acétogènes

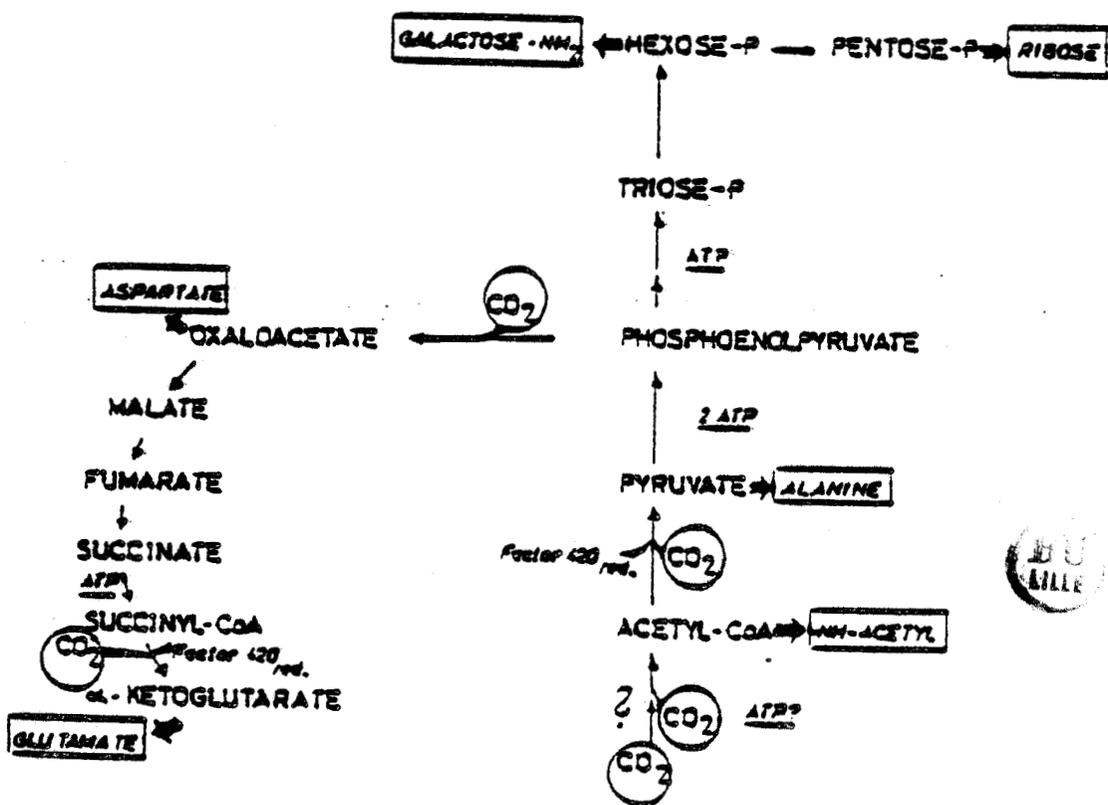


Fig 12 Assimilation du carbone chez *Methanobacterium thermoautotrophicum*

Tableau IX. Enzyme nécessaires à l'assimilation du CO₂ chez *Nb thermoautotrophicum*

Synthèse d'éléments carbonés	Enzyme
Composés en C ₃	E ₁ - Pyruvate synthase E ₂ - Phosphoénol pyruvate synthétase
Composés en C ₄ et C ₅	E ₃ - Phosphoénol pyruvate carboxylase E ₄ - Malate deshydrogénase E ₅ - Fumarase E ₆ - Fumarate réductase E ₇ - Succinyl COA synthétase E ₈ - α cétooglutarate synthase
Triosephosphate	E ₉ - Enolase E ₁₀ - Phosphoglycerate mutase E ₁₁ - Phosphoglycerate kinase E ₁₂ - Glyceraldehydephosphate deshydrogénase
Oxydation de l'hydrogène	F 420 - Hydrogénase F 420 - NADP oxydoréductase



- sur le succinyl CoA la réaction est catalysée par l' α céto-glutarate synthase avec la présence d'un transporteur d'électrons qui est le F 420.

La synthèse de composés intermédiaires à deux carbones tel que l'acétate se fait par condensation de deux composé monocarboné des $C_1 + C_1$ (KENEALY et al., 1982). Lorsque des bactéries sont cultivées sur acétate ou méthanol la voie de synthèse n'est pas connue. Compte tenu du rôle clef de l'acétyl CoA, on peut supposer une conversion directe acétate-acétyl CoA principalement et une oxydation en CO_2 pour régénérer simplement des équivalents réducteurs qui lui sont nécessaires (PETROFF, 1983). Par contre, des cultures de M. barkeri sur H_2/CO_2 , méthanol et acétate comme source de carbone ont montré que le pourcentage du poids des cellules provenant de $^{14}CO_2$, [^{14}C] méthanol et [^{14}C] acétate respectifs sont 36, 13,5 et 50,8 (ZEIKUS, 1983).

En 1983, EIKMANS et al. ont mis en évidence l'assimilation du propionate par trois bactéries méthanogènes (M. thermoautotrophicum, M. arboriphilus et M. barkeri) synthétisant l'isoleucine comme produit final. Deux voies d'assimilation du propionate sont proposées :

- le propionyl CoA après une condensation avec le CO_2 donne le 2- ceto-butyrate qui est un intermédiaire de la biosynthèse d'isoleucine ;
- le propionyl CoA réagit avec l'acétyl CoA en donnant le 2- méthyl-acéto-acétyl CoA qui est réduit en 2-méthylbutyryl CoA. Ce dernier est un intermédiaire dans la chaîne métabolique donnant le 2- méthyl-butyrate qui est un précurseur direct de l'isoleucine.

3.3.2. Assimilation d'azote

La biosynthèse des acides aminés chez les méthanogènes emprunte les mêmes voies que chez les eubactéries (DANIELS et al., 1984).

* Des travaux récents chez Methanobacterium omelianskii ont montré que l'Aspartate, l'Alanine, la Glycine, la Sérine, la Thréomine, la Lysine, la Methionine et la Valine sont synthétisés de la même manière que chez les eubactéries, par des réactions de transamination et désamination. Une

exception : la synthèse de Lysine chez M. thermoautotrophicum emprunte la voie de l'acide diaminopimélique catalysé par la dihydrodipicolinate synthase (BAKHJET, 1984).

L'isoleucine a aussi des voies de synthèse différentes chez les Archaeobactéries que chez les eubactéries. Trois voies de synthèse ont été mises en évidence chez les méthanogènes (BAKHJET et al., 1984) :

- au lieu que la Thréonine serve comme intermédiaire (voie normale de synthèse), l'acétyl COA et le pyruvate sont les précurseurs directs en empruntant la voie de l'acide citramalique (EIKMANNNS et al., 1983) ;
- le propionate du milieu de culture est incorporé dans l' α -cétobutyrate, en plus le C₂ du propionate apparaît exclusivement dans l' α -c de l'isoleucine (EKIEL et al., 1984) ;
- l'isoleucine est obtenue par une carboxylation du 2-méthylbutyrate (EIKMANNNS et al., 1983).

La Figure 13 schématise les différentes voies de synthèse de l'isoleucine chez les microorganismes.

* Fixation de l'azote ammoniacal : chez les méthanogènes, la source essentielle d'azote est l'ammoniaque (BRYANT et al., 1971 ; SCHAEFER et al., 1980 ; MURRAY et al., 1985). Quelques exceptions ont été mises en évidence par exemple M. thermoautotrophicum exige la présence de la leucine et l'isoleucine ; Methanococcus vanniellii utilise en plus de l'ammoniaque, les groupements aminés des bases puriques ou pyrimidiques (DEMOLL et al., 1986). Ainsi, chez le microorganisme, l'assimilation d' NH_3 conduit à la synthèse de trois composés qui sont des donneurs de groupements aminés dans les voies de synthèse des acides aminés. Ce sont l'acide glutamique, la glutamine et l'asparagine. Cependant, chez les archaeobactéries les mécanismes d'assimilations ne sont pas encore bien définis (ZEIKUS, 1977). Des études comparatives faites sur les méthanogènes, basées sur les activités enzymatiques, indiquent que les voies d'assimilation d' NH_3 chez les archaeobactéries sont les mêmes que celles des eubactéries (KENEALY et

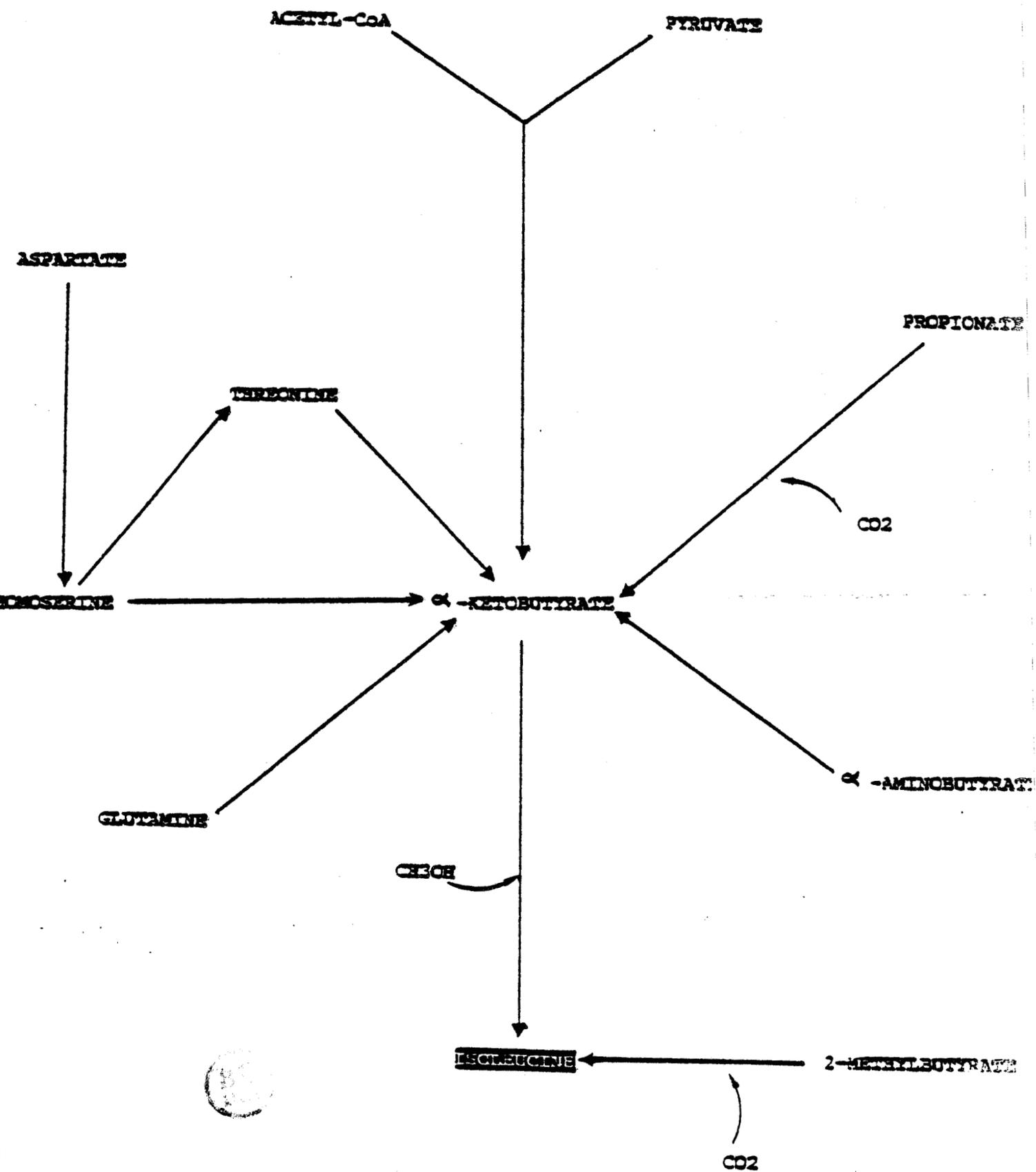
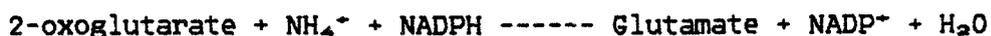


Fig 13 Voies de synthèses d'isoleucine utilisées par les microorganismes

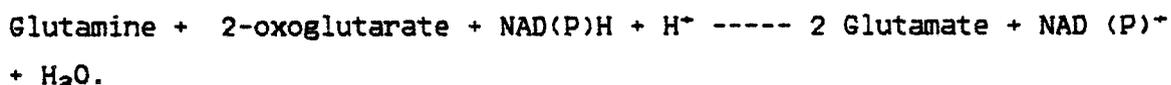
al., 1982).

En 1976, BROWN démontre que l'assimilation de l'ammoniaque par les bactéries fait intervenir deux voies qui sont :

* voie glutamate deshydrogénase (GDH)



* voie glutamine synthétase / glutamate synthase (GS / GOGAT) qui nécessite une mole d'ATP pour l'assimilation d'une mole d' NH_4^+ .



Récemment, KENEALY et al (1982) ont mis en évidence une autre voie d'assimilation d' NH_4^+ chez Mb thermoautotrophicum qui fait intervenir l'alanine déshydrogénase (ADH) en remplacement de la glutamate deshydrogénase. L'ADH a une activité et permet un rendement de croissance (g de cellule/mole de méthane) maximale quand la cystéine est présente dans le milieu comme source de soufre. Par contre, son activité est faible quand la bactérie est cultivée avec un excès d'ammoniaque.

En ce qui concerne la GDH et GS/GOGAT leurs activités sont fonction de la concentration en NH_4^+ dans le milieu, quand celle-ci est élevée la GDH est activée; par contre si la concentration en NH_4^+ est faible, c'est le système GS/GOGAT qui devient actif (SMITH et al., 1980). Chez certaines bactéries méthylophiles (Methylomonas methanica, Methylobacter vinelandii) on rencontre les deux systèmes enzymatiques, tandis que d'autres disposent seulement de systèmes GS/GOGAT. Cependant chez les acétoclastes, le rendement énergétique est quatre fois moindre que chez les hydrogénéophiles ; ainsi chez les méthylophiles ayant les deux systèmes, le rendement en biomasse n'est pas affecté quand elles sont cultivées en limitation d'azote. Par contre, celles qui ont un seul système (GS/GOGAT), voient leur rendement en biomasse diminuer dans un milieu limitant en azote car l'ATP sert à la fois pour assimiler l' NH_4^+ et pour assurer la synthèse de

composés indispensables pour la croissance. Des manipulations génétiques ont été faites sur le gène contrôlant le système GS/GOGAT de Methylophilus methylotrophus a été remplacé par le système glutamate déshydrogénase (GDH) d'E. COLI, les mutants cultivés sur méthanol ont un meilleur rendement en biomasse (7 %) que les souches sauvages (LARGE, 1983).

Peu d'études quantitatives ont été faites concernant l'influence d'un milieu limitant en azote sur l'activité des bactéries méthanogènes. BREUIL et al. (1980), RONNOW et al. (1982), ont constaté que chez M. thermophila TM₁ et M. thermoautotrophicum une concentration de 5 mM d' NH_4Cl diminue la vitesse de production de méthane et le taux de croissance des deux espèces. Par contre, les rapports C/N respectifs 4,9 et 4,5 n'ont pas été changés durant la période de croissance.

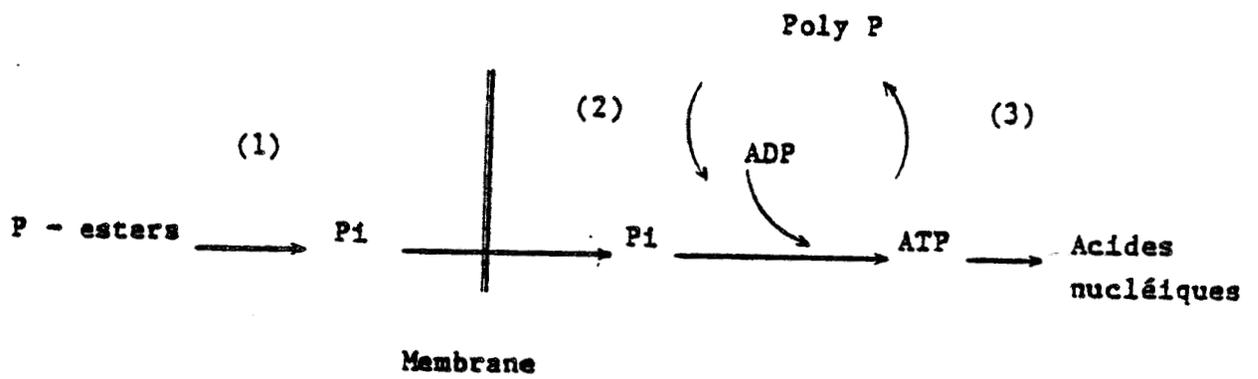
L'effet des concentrations élevées en azote sous forme ammoniacale a été étudié par plusieurs auteurs (WEBB et al., 1985 ; KOSTER et al., 1984 ; HILLS, 1979 ; et récemment SPROTT et al., 1986). Ce dernier a fait une étude comparative de l'effet du NH_4^+ sur l'activité de six souches méthanogènes. Parmi les souches, celle qui s'est révélée la plus sensible à une élévation de concentration est Methanotherix concilii. La concentration de 25 mM inhibe l'activité méthanogène. Cette inhibition est due simplement à une fluctuation des cations intracellulaires due à une sortie massive de K^+ et accumulation d' NH_4^+ à l'intérieur de la cellule (SPROTT et al., 1984). Par contre, cette inhibition peut-être levée en ajoutant des cations divalents, le plus efficace de ce point de vue est le calcium (Ca^{++}) à des concentrations comprises taux entre 20 et 40 mM de CaCl_2 (SPROTT et al., 1984).

* Azote moléculaire : le processus consiste en la réduction de la molécule d'azote en ammoniacque, selon la réaction :



La réaction est catalysée par une nitrogénase.

La découverte de la diazotrophie (fixation d'azote) chez quelques archaebactéries a conduit les chercheurs et les évolutionnistes à se poser



- (1) Phosphatase
- (2) Polyphosphate kinase
- (3) Polyphosphatase

Fig 14 Assimilation du phosphore à l'intérieur du cytoplasme
bactérien (prise de la thèse de FLORENTZ, 1982)



d'autres questions pour comprendre ce groupe qui forme un phylum à part. Les mécanismes d'assimilation ne sont pas encore connus ; récemment MURRAY et al. (1984) ont observé le même rendement en méthane chez M. barkeri Souche 227 poussant sur deux milieux, l'un ne contenant que l'azote moléculaire et l'autre contenant 20 mM d'azote ammoniacal. De même chez Methanococcus thermolithotrophicus a été mise en évidence par BELAY et al. (1984) l'utilisation de l'azote moléculaire. Cette bactérie possède une nitrogénase active à 64 °C, ce qui laisse penser que c'est une nouvelle enzyme.

3.3.3. Assimilation du phosphore et biosynthèse de l'ATP

L'accumulation du phosphore à l'intérieur de la cellule est régi par plusieurs facteurs, soit par carence d'un nutriment qui favorise l'assimilation du phosphore comme le potassium qui peut être remplacé par le sodium ou le magnésium (SCHÖNHEIT et al., 1983), ou bien lors d'une déficience en phosphore (FLORENTZ, 1982). La Figure 14 résume l'assimilation du phosphore dans la cellule bactérienne. Le stockage du phosphore dans les bactéries méthanogènes (méthanophosphogène) est le 2,3-Diphosphoglycérate cyclique qu'on rencontre chez M. thermoautotrophicum (SEELY et al., 1983, 1984) qui constitue une forme de réserve du phosphore en cas de déficience et rend possible une synthèse d'ATP lorsque le métabolisme énergétique de la cellule est perturbé. SAUER et al (1981), ARCHER (1985) montrent respectivement que la production d'ATP par M. thermoautotrophicum et M. barkeri dépend de l'hydrogène, autrement dit en absence de l'hydrogène, le taux d'ATP diminue et le pool de 2, 3-Diphosphoglycérate cyclique reste constant.

* La variation d'énergie libre de la réaction de décarboxylation de l'acétate n'est pas assez importante pour envisager la formation d'une liaison riche ou un mécanisme de synthèse par S.L.P. (Substrate-Level-Phosphorylation). Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la création du gradient de protons en absence de réduction en utilisant simplement la réaction de décarboxylation d'acétate.

- ZEHNDER et BROCK (1979) proposent que l'acétate non ionisé traverse la membrane puis est coupée en deux donnant méthane et bicarbonate. Compte

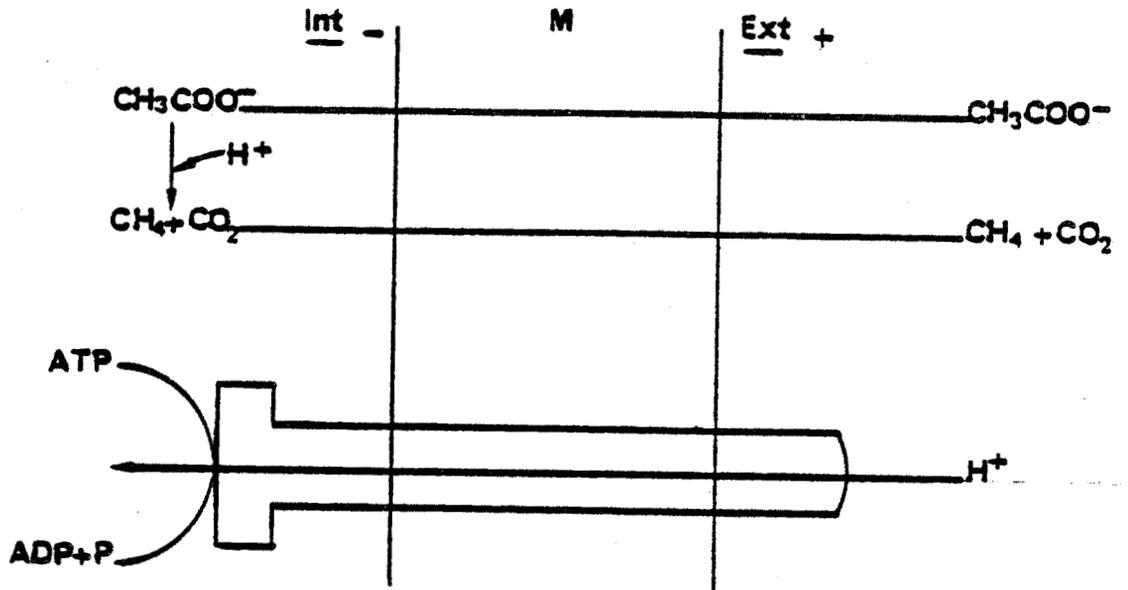


Fig 15 Synthèse d'ATP
(d'après l'hypothèse de ZEHNDER et BROCK 1979)

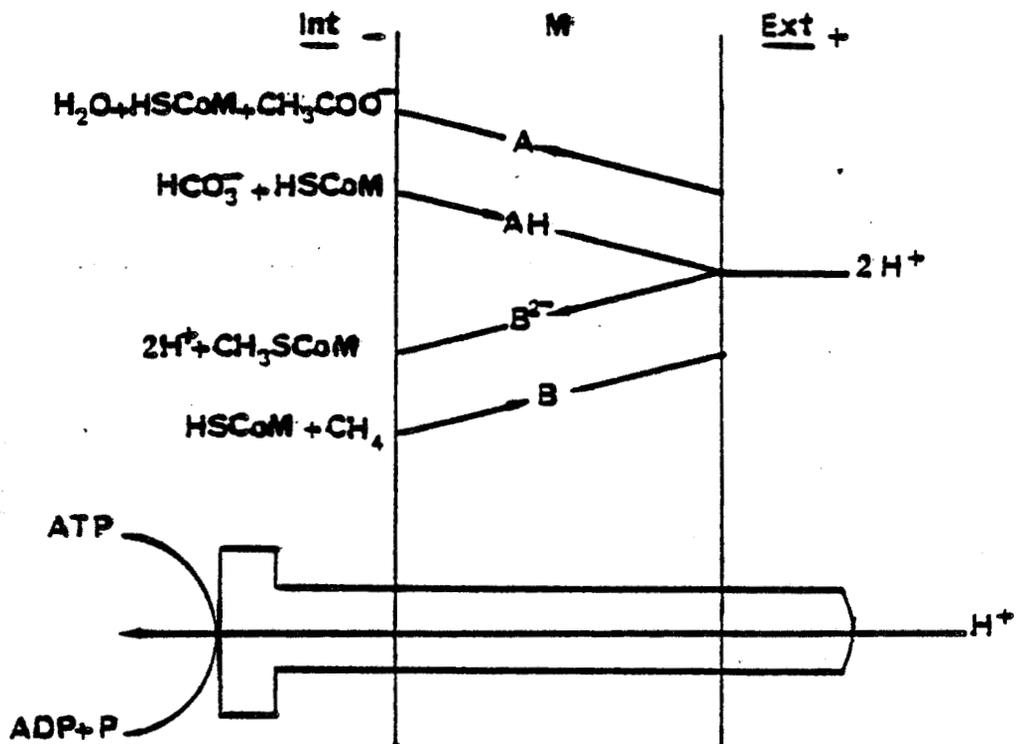


Fig 16 Synthèse d'ATP
(d'après l'hypothèse de WOLFE 1979)

tenu de différentes constantes d'acidité entre les ions acétate et bicarbonate, le pH de la cellule s'élève et le gradient de protons ainsi formé permet la synthèse de l'ATP (Figure 15).

- WOLFE (1979) suggère qu'une partie du groupement méthyl est dans une première étape oxydé et le transfert des électrons produits génère le gradient de protons. Les électrons sont ensuite retransférés sur le groupement méthyl et permettent sa réduction en méthane (Figure 16).

* La croissance autotrophe des bactéries méthanogènes sur H_2/CO_2 suggère que la formation de l'ATP est couplée avec la réaction d'hydrogénation par E.T.P. (Electron-Transport-Phosphorylation), c'est-à-dire au cours d'un transfert d'électrons dans une chaîne phosphorylante.

THAUER et al. (1977) ont proposé un modèle représentant le mécanisme de la synthèse d'ATP basé sur la théorie chimiosmotique de MITCHELL (1975). Le principe consiste en la création d'un flux de protons à travers une membrane sous l'action d'une hydrogénase et de transporteurs d'électrons appropriés (Figure 17). Au cours du transfert d'électrons, il s'établit entre les deux faces de la membrane une différence de potentiel et un gradient de pH. L'énergie libérée dite "Proton motive force" permet la formation de l'ATP (Figure 18). Le facteur F420 réduit pourrait intervenir comme transporteur d'électrons.

4. Conclusion

La conversion des matières organiques en méthane dans les écosystèmes naturels fait intervenir de nombreuses associations entre espèces bactériennes dont la variété va en décroissant du début à la fin de la chaîne métabolique. Parmi cette communauté, les bactéries méthanogènes qui assurent la stabilité de transformation des matières organiques en éliminant en permanence du milieu des métabolites dont l'accumulation est toxique (H_2 , proton, acétate). En plus, elles permettent de récupérer avec un très bon rendement (90 %) l'énergie contenue dans des substrats carbonés dilués.

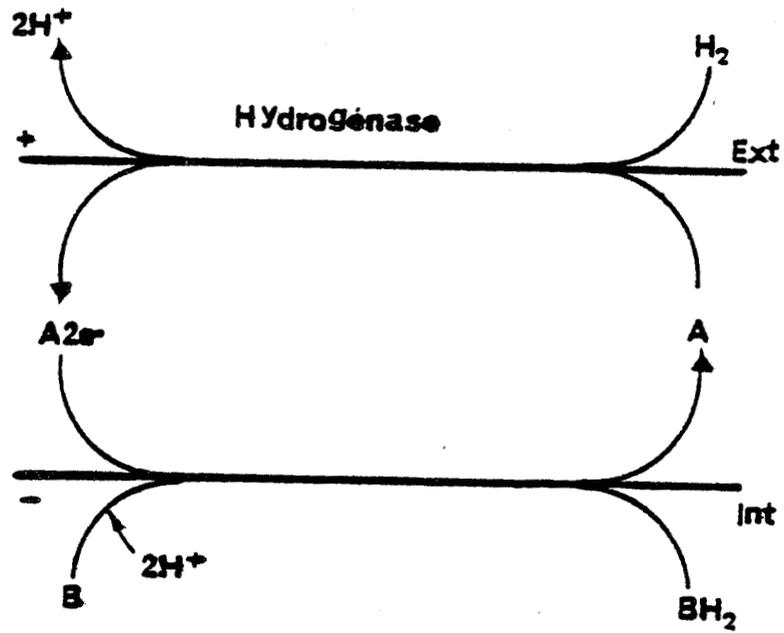


Fig 17 Création d'un gradient de protons chez la bacterie méthanogène selon un mécanisme E.T.P

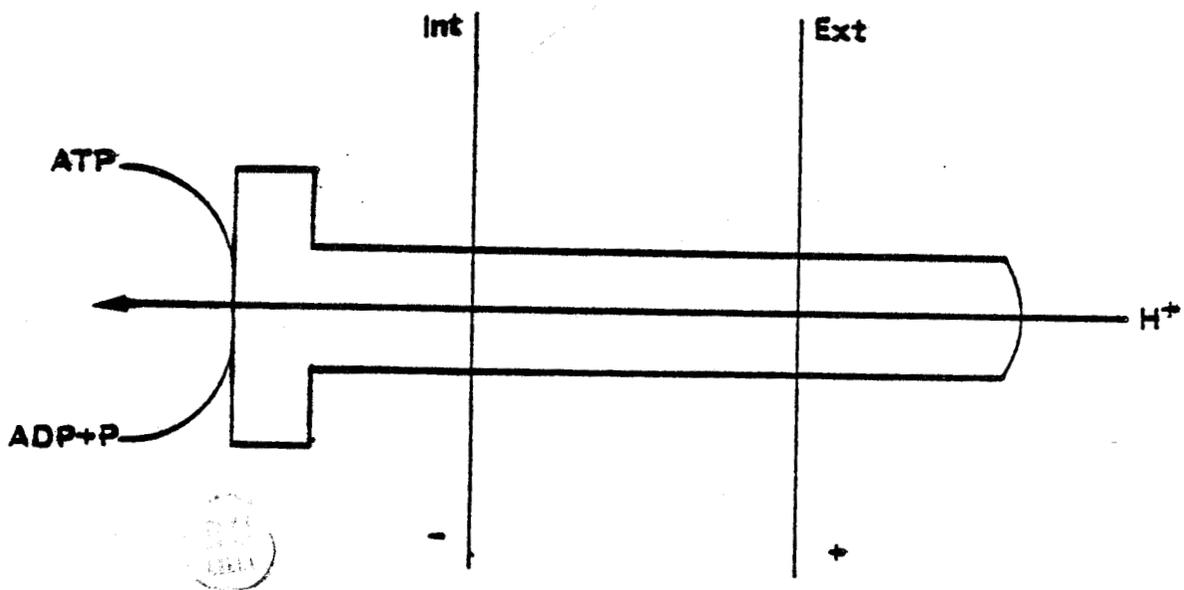


Fig 18 Synthèse d'ATP

Il faut aussi souligner le rôle primordial de la communauté acétogène grâce à son activité, elle régule le procédé global de conversion des composés organiques en méthane. Elle constitue la clef d'accroissements substantiels de la cinétique de production du méthane. Aux acétogènes s'ajoutent aussi les bactéries sulfato réductrices qui jouent un rôle comme acétogènes productrices obligées d'hydrogène dans les écosystèmes pauvres en sulfate.

II. INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE DEROULEMENT DE LE FERMENTATION METHANIQUE

Grâce aux acquis technologiques réalisés pendant ces dernières années, la fermentation méthanique des composés carbonés dilués est bien maîtrisée. Cependant, peu d'études ont été faites sur les besoins nutritionnels des différentes populations, en précisant les conditions d'environnement qui assurent l'efficacité du processus. Il s'agit d'optimiser ces conditions pour obtenir la croissance harmonieuse des différentes communautés bactériennes, et qui ont des exigences physiologiques très différentes. Pour cela il faut définir des conditions de cultures compatibles avec leur développements et de réussir plus particulièrement celles qui répondent aux exigences les plus strictes (méthanogènes en particulier, dont l'activité est primordiale pour le maintien de l'équilibre du système.

1. Température

La température est un paramètre très important lors d'une fermentation méthanique car elle influence profondément les conditions physico-chimiques du milieu. Ainsi lors d'une augmentation de température il se produit une diminution de la viscosité, une augmentation de la vitesse de diffusion, et de la solubilisation des composés organiques et inorganiques. Cela facilite le contact et l'accessibilité des molécules aux bactéries ou enzymes, et améliore les vitesses de réaction.

* Les travaux sur la microbiologie des souches cellulolytiques et hemicellulolytiques ont mis en évidence deux zones de températures dans lesquelles l'activité hydrolytique est optimale : une zone mésophile avec un optimum situé entre 35 et 40 °C et une thermophile entre 55 et 60 °C. La Figure 19 montre l'intensité de la méthanogénèse en fonction de la température. La variété des espèces bactériennes intervenant dans les deux cas est très large, que ça soit en thermophile ou en mésophile. Cependant, les voies métaboliques, les enzymes ainsi que les substrats catabolisés et les produits du métabolisme sont voisines. Les thermophiles se distinguent par des taux de croissance et les vitesses de réaction enzymatiques sont plus rapides (ZEIKUS, 1979).

* Ainsi pour l'hydrolyse de résidus solides, le traitement par procédé thermophile est un moyen intéressant pour obtenir une amélioration des vitesses d'hydrolyse de l'ordre de 4 à 5 fois. (GHOSH et KLASS, 1981). Des essais de fermentation de la cellulose de coton en batch, par des boues adaptées à la dégradation de polysubstrats en mésophile et thermophile montrent que la fermentation thermophile ne modifie pas le rendement de méthanisation obtenu par fermentation mésophile, mais elle double la vitesse d'hydrolyse. Ainsi l'hydrolyse n'est pas l'étape limitante de la fermentation comme c'est le cas en mésophilie, mais c'est l'utilisation de l'acétate par les bactéries méthanogènes dont l'activité est moins fortement accélérée par la température (PETROFF, 1983).

Il se dégage que le procédé thermophile est un moyen efficace pour le traitement des déchets (6,25 g MVT/l.j. en thermophile et 3,6-4,4 MVT/l.j. en mésophile). Mais le coût de l'opération peut devenir très onéreux si on ne dispose pas d'effluents chauds (VERRIER, 1984), et ce système de fermentation est très instable.

Technologiquement, cette instabilité d'hydrolyse et de méthanogénèse peut être surmontée en utilisant le procédé de séparation de phase dont la première est thermophile et la seconde est mésophile. Le procédé s'est révélé performant, car, d'une part, la stabilité du système était maintenue, d'autre part, le rendement de conversion de la matière organique est plus important que le procédé mono étape thermophile.

* Une fermentation méthanique en zone psychrophile 10 °C est envisageable après une adaptation des bactéries méthanogènes à des températures progressivement décroissantes.

* Dans le domaine mésophile, la vitesse d'hydrolyse maximale est à 35 °C. Par contre, MOSEY (1983) montre que le rendement des bactéries méthanogènes acétoclastes et des acétogènes dégradatrices du propionate n'est pas le même à l'intérieur de zone mésophile (Tableau X), il constate une diminution de rendement de 20 % en passant de 25 à 35 °C.

Tableau X. Influence de la température sur le rendement de la biomasse - (D'après Mosey, 1983)

Substrat	Température	Y (mg/mg)
Acétate	35	0,04
Acétate	30	0,054
Acétate	25	0,05
Propionate	35	0,042
Propionate	25	0,051
Butyrate	35	0,047
A.G.L.C.	35	0,12
A.G.L.C.	30	0,12
A.G.L.C.	25	0,12
Glucose	37	0,173

Tableau XI. Valeurs des différents couples acide/base à 25 °C (d'Après Frosteli, 1985)

Acide/base	P ka (25 °C)
$H_2CO_3 - HCO_3^-$	6,4
$NH_4^+ - NH_3$	9,3
$H_2S - HS^-$	6,9
$H_2PO_4^{2-} - HPO_4^{2-}$	7,2
Acide acétique)	4,8 - 4,9
propionique)	
butyrique)	



2. pH

Le contrôle et l'équilibre d'un écosystème anaérobie dépend de la valeur du pH qui est la résultante de deux facteurs, l'alcalinité totale et la concentration en acides gras volatils résiduels.

Ainsi, lors de la dégradation des glucides et des protéines, il y a libération d'AGVs, de cations (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , NH_4^+) et d'anions (bicarbonate, phosphate) et du CO_2 . L'équilibre entre tous ces éléments est nécessaire pour avoir un bon déroulement de la fermentation. Quand il y a production d'AGVs le système d'équilibre est déplacé. Le déplacement des bicarbonates vers le pouvoir tampon dans la plupart des digesteurs est assuré par les systèmes $\text{NH}_4^+ \text{HCO}_3^-$ essentiellement (Mc CARTY, 1964).

Le Tableau XI indique les valeurs des différents couples acide-base assurant le pouvoir tampon dans un écosystème anaérobie. Des études comparatives sur l'alcalinité totale (T.A.C.) montrent que la valeur admise comme suffisante pour la digestion anaérobie est de 2 à 3 g/l (Ca CO_3) (KOTZE, 1969). Le rapport AV/TAC permet d'avoir une idée sur l'équilibre d'une fermentation. Pour un bon déroulement, le rapport est égal à 0,2 et il ne doit jamais dépasser 0,4 :

TAC = Titre d'alcalinité mg Ca CO_3 /l

AV = Acidité volatile mg $\text{CH}_3 \text{COOH}$ /l

Le pH optimum de la méthanogénèse se situe entre 6,8 et 8 (BALCH et al., 1979) ou 6 et 8 (ZEHNDER et al., 1982) ; en dehors de ces deux intervalles, la méthanogénèse est simplement ralentie. La Figure 20 montre l'effet du pH sur l'activité d'une flore méthanogène mixte.

L'acétogénèse est assurée par les bactéries qui ont une activité maximale à pH 7,2 (Mc INERNEY et al., 1979). Par contre les bactéries acidifiantes sont moins strictes et peuvent se multiplier à pH acide (<4) mais l'optimum se situe entre 5,5 à 6 (ZOETMEYER et al., 1982).

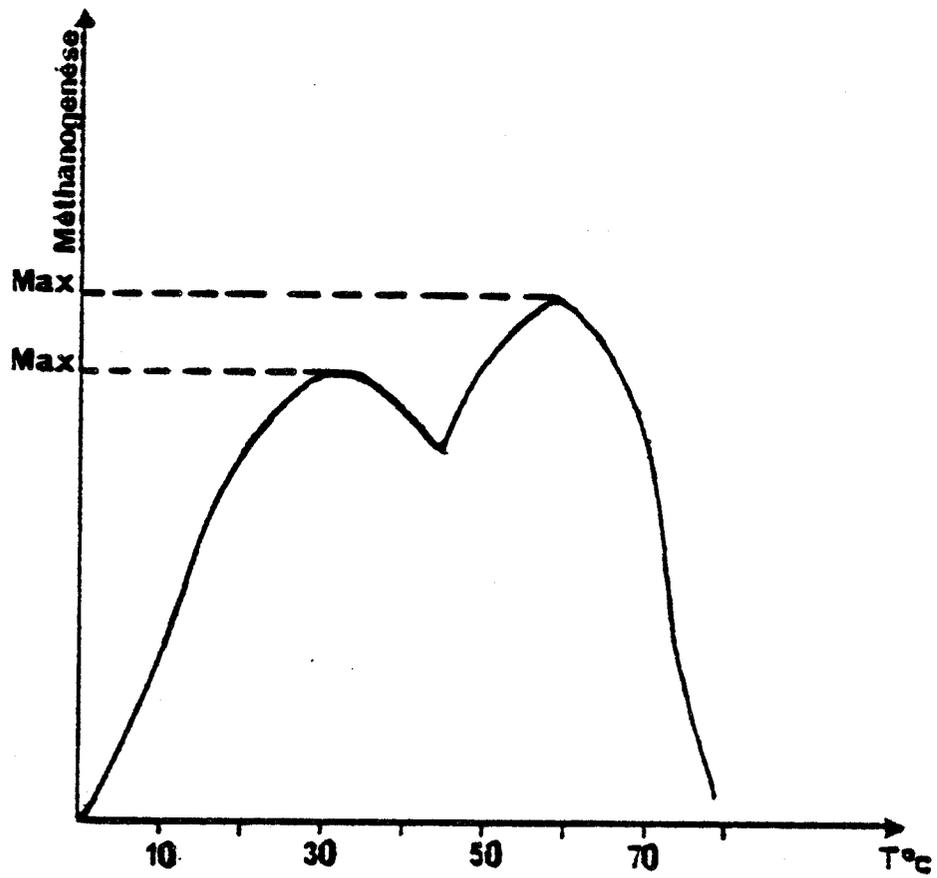


Fig 19 Influence de la température sur la méthanogénèse

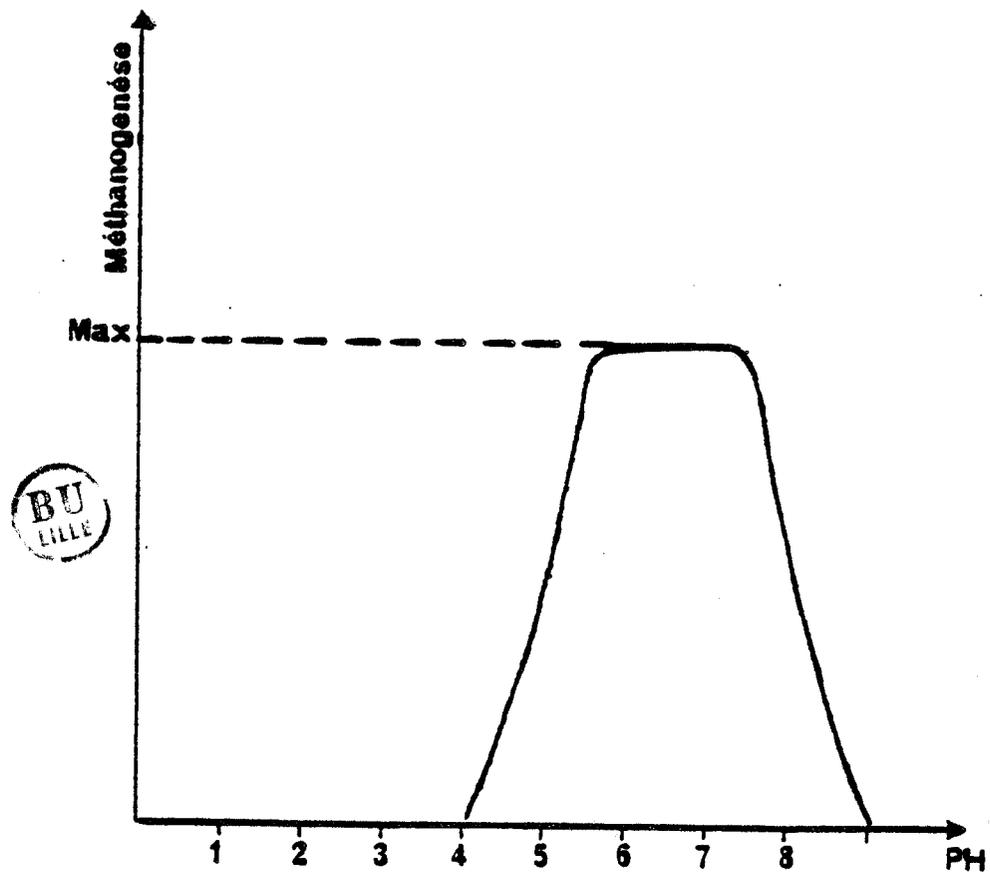
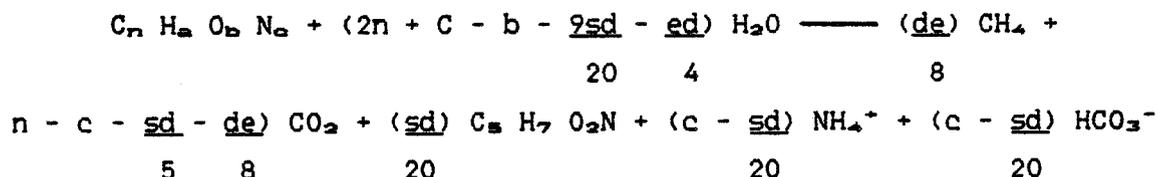


Fig 20 Influence du PH sur la méthanogénèse

3. Le rapport carbone, azote, phosphore (C/N/P)

Le contrôle d'azote et du phosphore pour un traitement anaérobie est très important. Il permet, d'une part, d'avoir un bon déroulement de procédé avec des rendements meilleurs de conversion de la biomasse en méthane (HILLS, 1979) ; d'autre part, d'éviter l'obtention d'effluents méthanogènes riches en ammoniacque ou phosphate réduits qui causent des phénomènes d'eutrophisation du milieu récepteur (LAGRANGE, 1979).

Ainsi l'apport de l'azote et du phosphore pour un effluent industriel peut être calculé à partir de l'équation stoechiométrique établie par Mc CARTY (1972) :



avec : $d = 4n + a - 2b - 3c$

s = fraction de biomasse synthétisée

$C_n H_a O_b N_c$ = formule empirique de la matière organique à traiter.

Celle-ci montre bien que la quantité d'azote nécessaire à la synthèse de biomasse bactérienne est plus faible en anaérobiose qu'en aérobie. Cet apport correspond à 10,5 % des matières volatiles en suspension, les besoins en phosphore sont approximativement de 15 % de l'apport en azote (SPEECE et Mc CARTY, 1964). Ainsi le rapport C/N/P ou DCO/N/P sert comme référence pour estimer les besoins nutritionnels, il convient de compléter ce dernier par deux autres paramètres : le rendement de production de biomasse et la charge massique. La Figure 21 montre la relation entre eux. HENZE et HARREMOES (1983), LETTINGA (1980) indiquent respectivement que les rapports DCO/N minimaux respectifs sont 350/7 et 350/5. Pour des charges inférieures à 0,5 Kg DCO/Kg MVES. Ce rapport peut atteindre des valeurs élevées de l'ordre de 1000/7 et même plus. Pour des charges plus élevées de 0,8 à 1,2 Kg DCO/Kg MVES, le rapport DCO/N est de 400/7, ce dernier est voisin de celui trouvé par VAN DEN BERG et LENTZ (1977) (420/7) pour différents déchets agro-alimentaires. La Figure 22 montre la relation entre

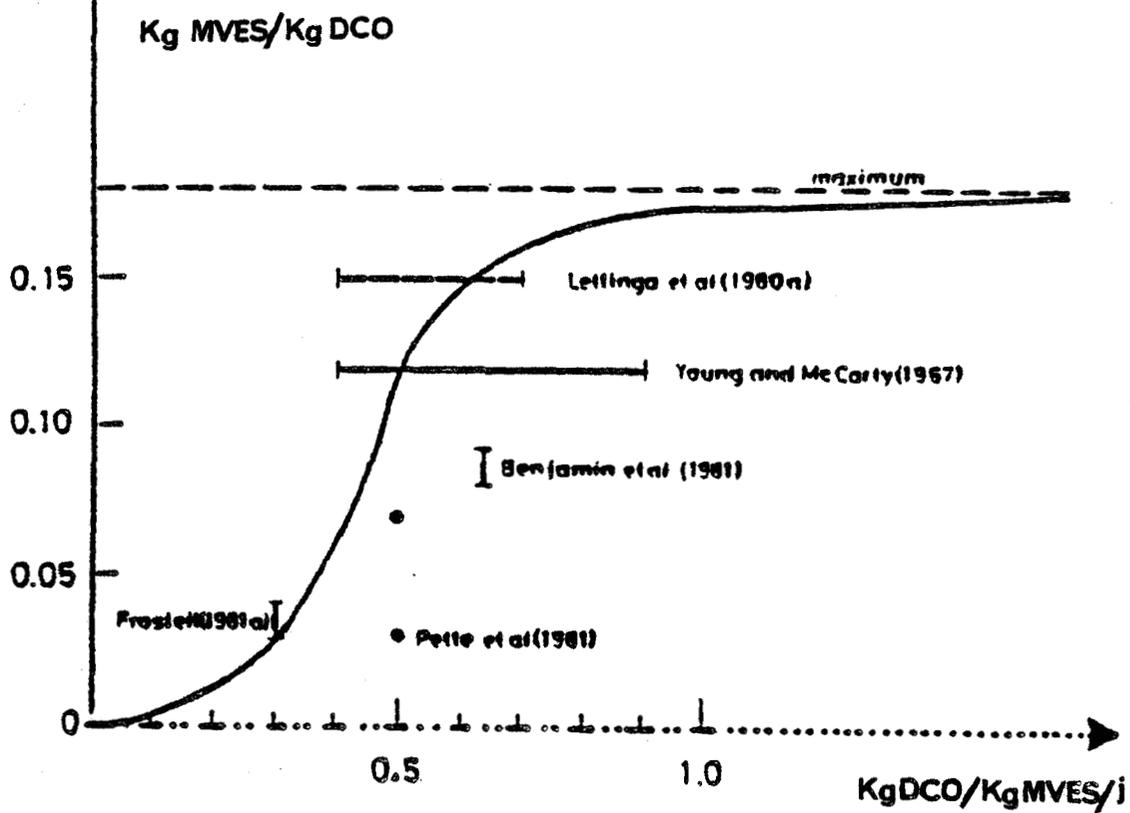


Fig 21 Relation entre le rendement en biomasse et la charge organique (d'après HENZE et HARREMOES 1983)

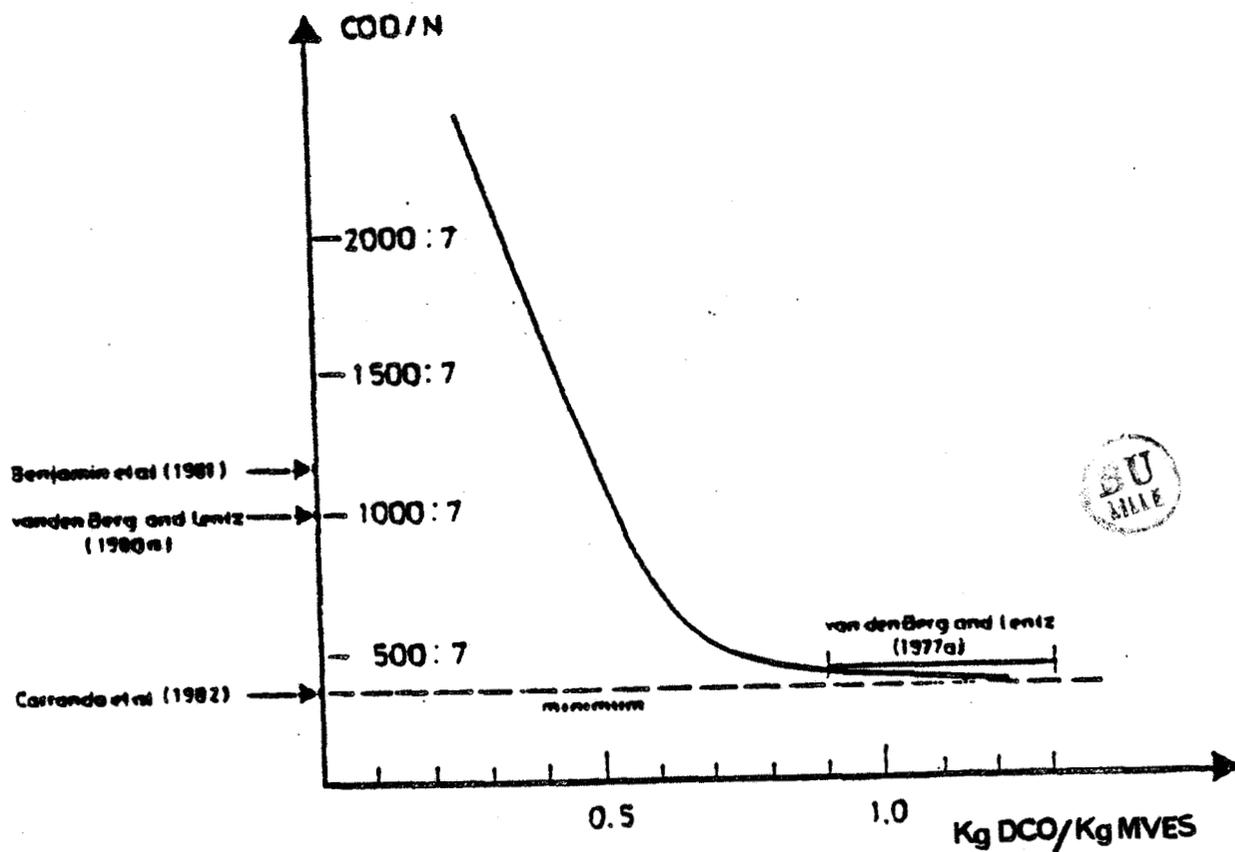


Fig 22 Relation entre le rapport DCO/N et la charge organique (d'après HENZE et HARREMOES, 1983)

Tableau XII. valeurs optimales du rapport
DCO/N/P des différents substrats
(D'après Mc. Garty, 1974)

Substrats	DCO/N/P optimum
Hydrogène	416/6,7/1
Acide acétique	1420/6,7/1
Acide propionique	451/6,7/1
Acide butyrique	338/6,7/1
A.G.L.C.	386/6,7/1
Glucides	246/6,7/1
Graisse	386/6,7/1



le rapport DCO/N et la charge organique. Les travaux de LETTINGA (1980) sur différents substrats montrent que pour une culture qui fermente un mélange d'AGVs, le rapport DCO/N correspond à 1000/5/1 et pour des substrats plus complexes comme les glucides, le rapport est de 350/5/1. Mc CARTY (1974) en se basant sur la composition moyenne d'une bactérie a calculé un rapport N/P qui est de 6,7 et a dressé un tableau des rapports DCO/N/P pour différents substrats. Le Tableau XII montre que les besoins en azote sont plus importants au fur et à mesure que le composé à fermenter à une charge polluante de plus en plus élevée. Cela s'explique par les exigences des espèces bactériennes rencontrées lors de la fermentation des différents composés. Ainsi en fermentant des glucides ou des lipides on établit une culture mixte contenant des bactéries qui représentent les différentes étapes de la digestion anaérobie. Les besoins en azote et phosphore sont plus importants que si l'on fermente de l'acide acétique qui constitue un précurseur direct du méthane et qui nécessite un seul type de bactérie (méthanogènes acétoclastes). Il apparaît qu'un déséquilibre entre le carbone et l'azote peut modifier l'activité des microorganismes. Cependant certains déchets agro-alimentaires et surtout les déjections animales sont riches en azote, leur traitement par voie anaérobie pose certains problèmes dus à l'accumulation d'ammoniaque, et c'est ce qui a mené certains auteurs à effectuer des mélanges de substrats (HABIG, 1985 ; WEBB, 1985) pour obtenir un bon déroulement du processus et une meilleure cinétique de production du biogaz.

4. Besoins en éléments minéraux

4.1. Besoins en sulfate

Le rôle joué par les sulfates dans les milieux anaérobies conditionne le type de flores rencontrées et la nature de la chaîne trophique. La dégradation de la matière organique peut emprunter soit la voie de la méthanogénèse ou bien celle de la sulfato réduction, selon que l'environnement proximal des bactéries est pauvre ou riche en sulfate.

- Dans les milieux pauvres ou épuisés en sulfate, la digestion anaérobie s'accomplit totalement jusqu'à la formation du méthane, le sulfate présent constitue après réduction en sulfure la source de soufre pour les autres bactéries.

- Dans les milieux riches en sulfate, la dégradation est accompagnée d'une réduction biochimique de l'ion sulfate qui occupe la place prépondérante d'accepteur d'électrons. Ce transfert énergétique assure une dynamique de croissance beaucoup plus performante pour les bactéries sulfato réductrices qui en bénéficient (SCHÖNHEIT et al., 1982).

Ainsi le contrôle de la teneur en soufre dans un écosystème paraît nécessaire pour deux raisons, l'une biologique et la deuxième écologique.

- Biologique pour le maintien des bactéries méthanogènes dans le système d'où une production de biogaz riche en méthane.

- Ecologique, pour éviter de rejeter dans la nature un gaz toxique qui est l'hydrogène sulfure et qui peut se présenter sous deux formes : dissous dans l'eau ou à l'état gazeux, toutes les deux étant fort polluantes (POSTGATE, 1979).

Les travaux de SPEECE et PARKIN (1983) effectués en batch ont permis de classer les composés soufrés présents dans un digesteur par ordre de leur toxicité :



Sur le plan qualitatif, les formes réduites telles que les sulfures sont préférentiellement utilisées par les méthanogènes (ZEIKUS, 1979 ; SCHERER et al., 1981). Des études faites sur trois souches pures : Methanospirillum hungatei, Methanobacterium MOH et Methanobacterium formicicum ont montré que les sulfures peuvent être substitués par les sulfates mais cela nécessite la présence du fer. La croissance maximale est obtenue avec un milieu contenant 1,5 mM de SO_4^- et des doses de FeCl_2 de l'ordre de 0,59 mM (PATEL et al., 1978). En présence de sulfate seul, l'optimum de croissance est obtenu avec des doses de l'ordre de 0,16 à 0,52

Tableau XIII. Composition des principaux métaux de quelques bactéries méthanogènes.
 Les valeurs sont exprimées en P.P.M. par rapport au matériel cellulaire lyophilisé : 10.000 P.P.M. = 1 g poids / poids.
 (D'après Scherer et al., 1983)

Espèces	Souches	Substrats	Na	K	S	P	Mg	Fe	Mn
<i>M. bryantii</i>	M.O.H.G.	H ₂ - CO ₂	7000	32500	5650	19500	1900	1350	150
<i>M. thermoautotrophicum</i>	Marburg	H ₂ - CO ₂	5650	54500	6350	26000	890	1500	110
<i>M. arboriphilus</i>	AZ	H ₂ - CO ₂	3650	52500	9900	28500	3900	1300	65
<i>M. smithii</i>	PB	H ₂ - CO ₂	9000	50000	7700	25500	2250	1100	95
<i>M. smithii</i>	PB	H ₂ - CO ₂	9000	50000	7700	25500	2250	1100	95
<i>M. vannielii</i>	SB	Na Formate	27000	7000	9200	25500	3650	-	70
<i>M. mazei</i>	S ₄	Méthanol	40000	7700	7850	11500	2900	720	95
<i>M. vacuolata</i>	1236	Méthanol	4450	4300	10500	9500	2800	4600	70
<i>Ms. barkeri</i>	MS	Méthanol	4450	4900	12000	11500	3400	1100	65
<i>Ms. barkeri</i>	227	Méthanol	4550	5400	10500	18000	5350	1200	60
<i>Ms. barkeri</i>	Wiesmoor	Méthanol	4850	9850	10500	16500	2850	1530	180
<i>Ms. barkeri</i>	Fusaro	Méthanol	5200	17000	11000	17000	3950	1800	130
<i>Ms. barkeri</i>	Fusaro	H ₂ - CO ₂	13000	7750	8400	12000	4300	1400	70

mM chez Methanobacterium thermoautotrophicum.

Les besoins en soufre sont de l'ordre de 2,6 % du poids sec d'après la stoechiométrie de la cellule $C_5 H_7 O_2 N_1 S_{0.1} P_{0.04}$. Il a été montré que chez M. ruminantium, le soufre incorporé dans l'acide 2-mercaptoéthane-sulfonique ($HS-CH_2-CH_2-SO_3$) constitue 4 % du soufre total, le pool le plus important de composés soufrés se trouve sous forme de cystéine et de méthionine, ainsi que d'autres composés de faible poids moléculaire qui occupent une large part (RONNÖW et al., 1982). VAN DEN BERG (1980) travaillant sur une culture enrichie obtient une croissance avec des concentrations en sulfate allant jusqu'à 12 mM. Il n'y a ni stimulation de la sulfato réduction ni inhibition de la conversion d'acétate en méthane. Des observations microscopiques faites simultanément ont montré que la flore méthanogène n'a pas été affectée.

4.2. Cations : (sodium, potassium, magnésium et calcium)

Les besoins des bactéries vis-à-vis des ions métalliques, cations, oligo éléments varient qualitativement et quantitativement avec la composition du milieu ; certains facteurs de l'environnement contribuent à ces variabilités se sont :

- le remplacement fonctionnel partiel ou total d'un ion par un autre ;
- l'apport excessif d'un ion essentiel sous l'effet d'un ion antagoniste ;
- le détournement de l'effet catalytique d'un métalloenzyme en présence d'un produit de la réaction ;
- la présence de composés organiques complexes dans le milieu capable de complexer les ions métalliques.

Outre ces variabilités, les méthanogènes forment un groupe spécial à cause de leurs besoins nutritionnels différents d'une espèce à l'autre et de leurs sources de carbone très limitées. Le Tableau XIII établi par SCHERER et al. (1983) résume la composition en éléments majeurs et en oligo-éléments de dix bactéries méthanogènes. Les grandes variations sont observées avec Na^+ et K^+ , tous les deux ont des fonctions physiologiques importantes et dans leurs taux cellulaires varient largement (0,3-4,0 %)

Tableau XIV. L'affinité de quelques méthanogènes vis-à-vis du sodium

Organismes	Source de carbone	Valeurs du K_s app. pour Na^+	μ (h^{-1})
<i>Mb thermoautotrophicum</i>	CO_2	1,1	0,43
<i>Mb bryantii</i>	CO_2	0,6	0,04
<i>Mb arboriphilicus</i>	CO_2	0,4	0,139
<i>Ms hungatei</i>	CO_2	0,5	0,03
<i>Ms barkeri</i>	CO_2	1,1	0,063
	$CH_3 OH$	1,1	0,073
	$CH_3 COOH$	1,0	0,023



pour Na^+ et (0,13-5,4 %) pour K^+ . On constate que chez les hydrogénophiles qui sont représentés dans les cinq premières lignes du tableau et qui appartiennent à l'ordre des Méthanobactériales, la concentration en Na^+ chez est plus faible que celle en K^+ . Par contre, chez les utilisatrices du formate (M. variellii) et les méthylotrophes qui appartiennent respectivement aux ordres des Méthanococcales et Méthanomicrobiales les concentrations en Na^+ et K^+ sont très variables.

En général, les microorganismes accumulent le K^+ et le Mg^{2+} et par un mécanisme actif excrètent le Na^+ , Ca^{2+} et H^+ . Par contre certaines des bactéries marines halophiles ou du rumen ont besoin du sodium pour croître (PERSKI et al., 1981). Pour certaines bactéries comme Halobacterium halobium et Escherichia coli, le transport actif de certains substrats est régi par un co-transport avec le sodium, c'est le cas par exemple du transport de l'acide glutamique (LANYI et al., 1979).

Le sodium et le potassium sont aussi importants pour la croissance. Ainsi la croissance et la production du méthane par M. thermoautotrophicum sont stimulés par le sodium, le KNa^+ apparent est approximativement de 1 mM. La stimulation de la cinétique de production de méthane est vraie même en resting cells pour lesquelles une concentration de 50 mM de Na^+ dans le milieu est recommandée (PERSKI et al., 1981). Une valeur voisine du KNa^+ (1, 1 mM) a été calculée par KODAMA (1976) lors de la croissance optimale de Pseudomonas stutzeri. La dépendance de la croissance de M. barkeri vis-à-vis du sodium a été étudiée en détail par PERSKI et al. (1982), le Tableau XIV résume l'effet du Na^+ sur quelques paramètres de certaines bactéries méthanogènes.

En dépit des différentes constatations faites sur l'effet du sodium sur la croissance on remarque bien que l'effet quantitatif des cations varie largement selon le cation et l'organisme, tandis que l'effet qualitatif ne varie pas. Les Figures 23 (A,B) montrent l'effet du sodium sur le taux de croissance de deux bactéries méthanogènes, Methanococcus voltae et M. thermoautotrophicum ; la première nécessite un apport en sodium 100 fois plus élevé que la deuxième, pour une croissance optimale, les concentrations respectives sont de 500 et 5 mM. Cependant on assiste à des contradictions résultant d'après les travaux de SPOTT et al. (1981)

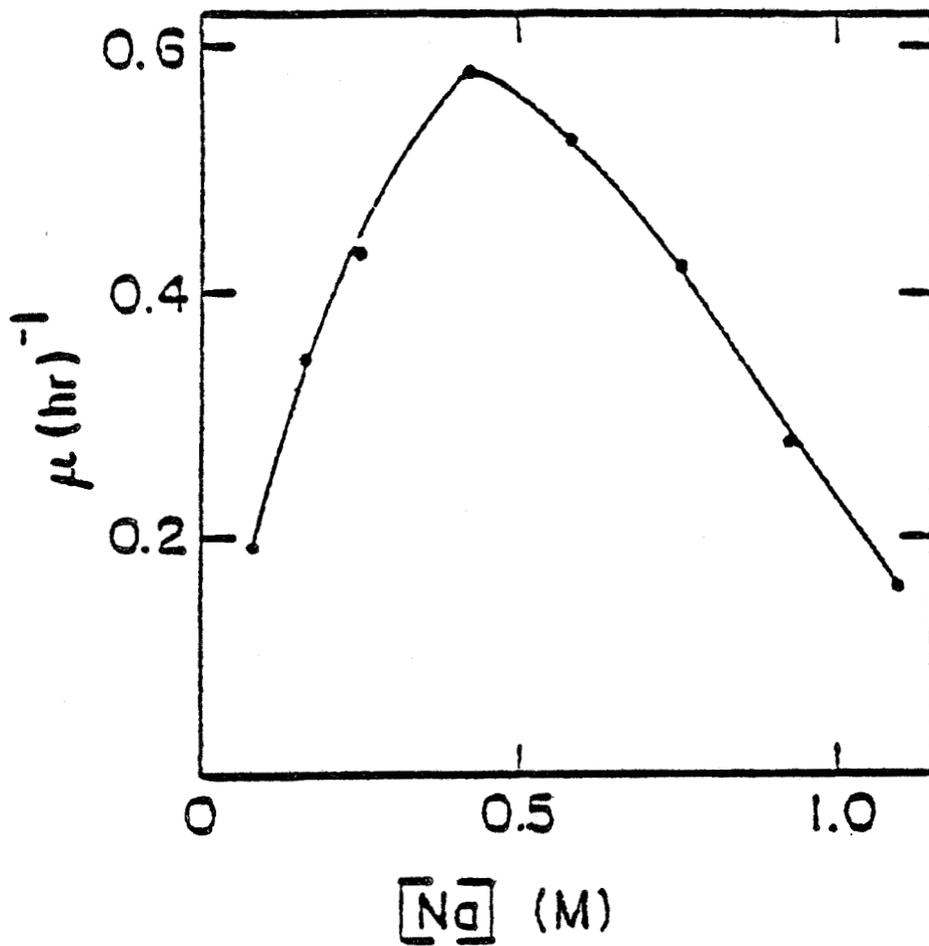


Fig 23A ; Effet du sodium sur le taux de croissance de *Mc.voltae*

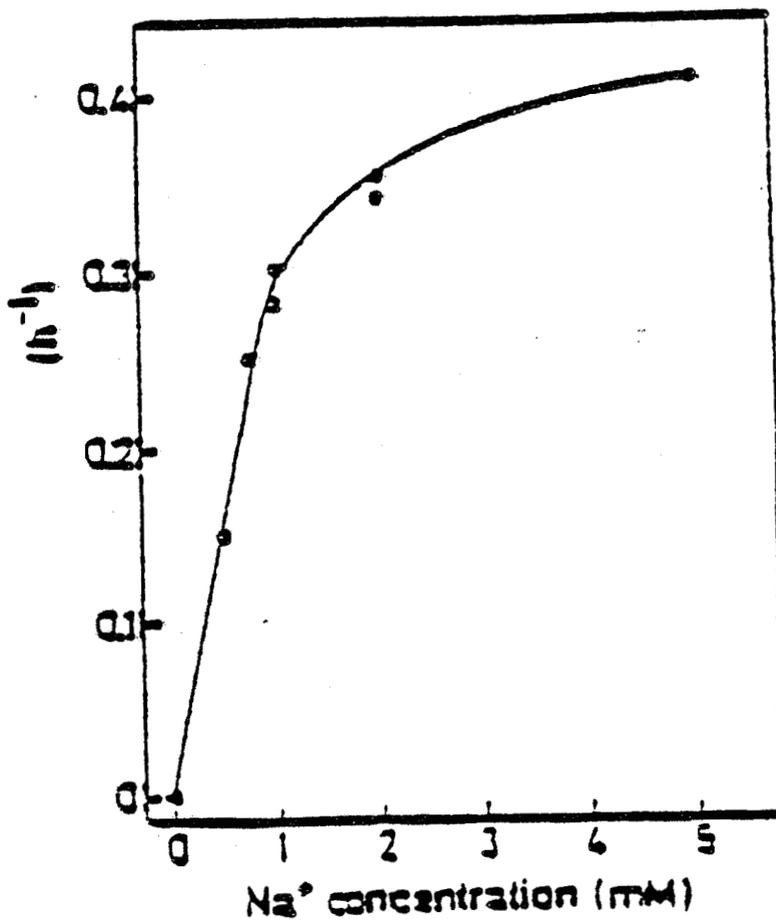


Fig 23B ; Effet du sodium sur le taux de croissance de *Mb.thermoautotrophicum*

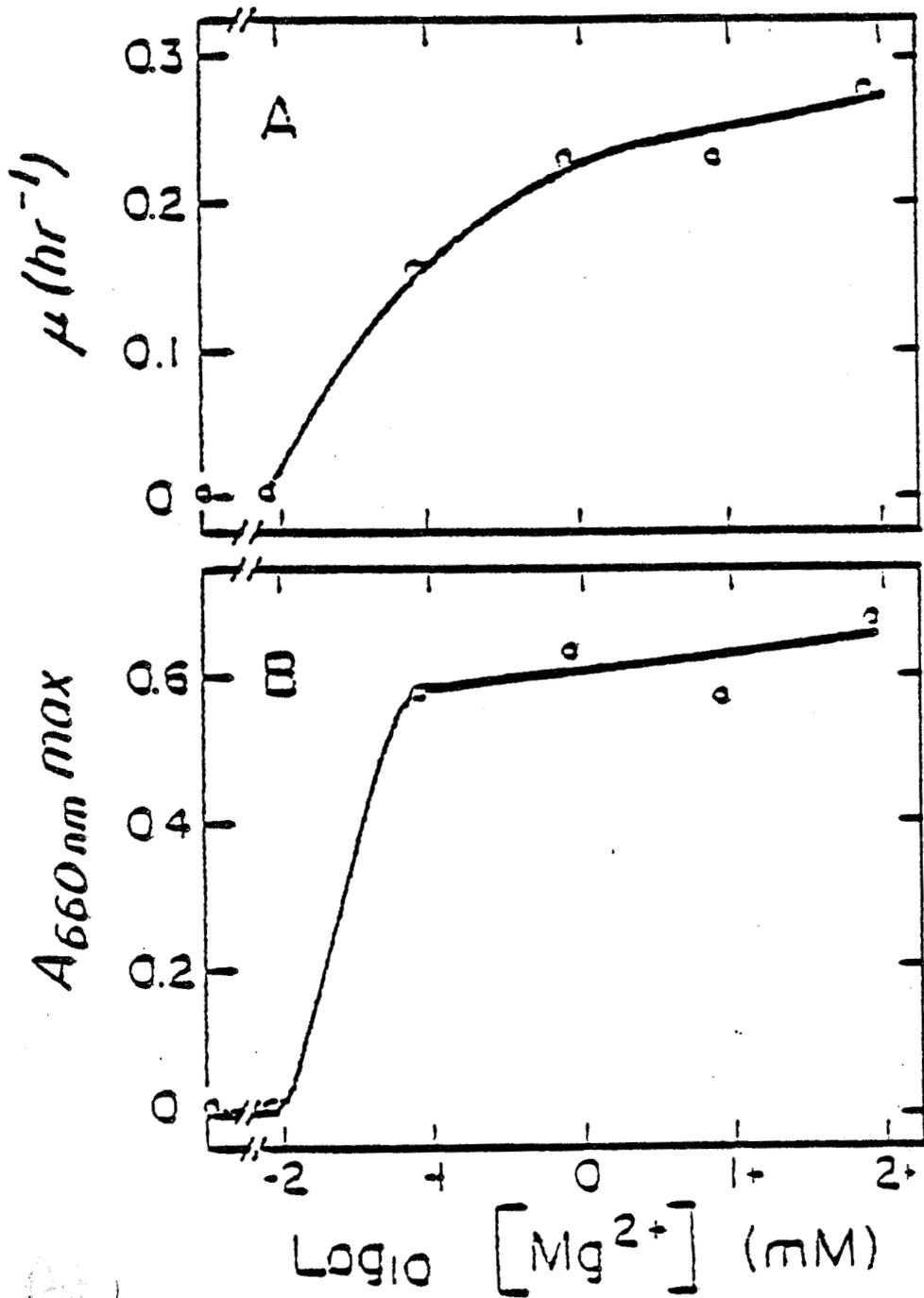


Fig 24 Effet du magnésium sur *Mc.voltae*

A/ Sur le taux de croissance

B/ Absorption finale

qui montrent qu'il n'y a pas d'effet similaire de Na^+ sur la croissance de Mb thermoautotrophicum et Ms hungatei. Ils estiment que les teneurs en Na^+ , K^+ et Mg^{2+} dans ces dernières dépendent des trois phases de croissance. Ainsi ils déterminent que la teneur intracellulaire en K^+ des cellules de M thermoautotrophicum (environ 780 mM) en phase exponentielle est de 5,4 fois plus élevée que celle de Ms hungatei et décroît graduellement quand les cultures entrent en phase stationnaire. Les deux bactéries concentrent le Mg^{2+} , dont la teneur augmente avec l'âge des cultures.

La Figure 24 montre l'effet du Mg^{2+} sur le taux de croissance de M. voltae. Le rôle du Mg^{2+} chez les méthanogènes est important, il intervient comme catalyseur de nombreuses réactions de biosynthèse et lors de la méthanogénèse. Un autre cation divalent ayant un rôle important est le calcium. Cependant, KANDLER et al. (1978) montrent que le calcium n'intervient pas comme un élément nutritionnel, mais la corrélation existe au niveau de la composition de la paroi cellulaire. Ainsi chez M. vanniellii dont la paroi cellulaire est composée de sous-unités protéiques, les besoins en calcium sont moindres que chez Ms. barkeri dont la paroi cellulaire est constituée par des hétéropolysaccharides.

Ces résultats mettent en évidence les mêmes tendances que celles observées par VERRIER et al. (1985) pour l'adhésion des bactéries sur un support en PVC (Chloridepolyvinyl), la quantité de bactéries fixée est multipliée par 5 à 6 fois en comparant l'essai contenant 200 mg Ca Cl_2 au témoin.

5. Oligo éléments

A cause de leur appartenance à un groupe phylogénique particulier et de leur temps de doublement faible, les méthanogènes ont des besoins nutritionnels différents et moindres que ceux des eubactéries. Grâce à l'évolution technologique, la traitabilité de plusieurs effluents par voie anaérobie est devenue possible, avec des rentabilités satisfaisantes, néanmoins des résultats négatifs subsistent pour certains effluents, cause de la non maîtrise des besoins nutritionnels des bactéries méthanogènes.

Ainsi pour certains effluents d'IAA riches en carbone tels que les vinasses le succès et le maintien de la digestibilité nécessite une complémentation minérale. VAN DEN BERG et al. (1971) suggèrent que pour avoir une bonne digestion, l'apport d'extrait de levure est nécessaire. La quantité minimale est de l'ordre de 1,5 Kg/m³ quelle que soit la charge et 5 Kg/m³ de milorganite ont le même effet que l'extrait de levure dont la fraction minérale s'est révélée significativement stimulatrice pour toutes les phases de la digestion anaérobie.

L'établissement d'une carte des besoins nutritionnels pour le bon fonctionnement d'un écosystème est difficile à cause des interactions très complexes entre les différentes espèces. Par exemple lors d'une accumulation d'AGV il est difficile de savoir si la déficience nutritionnelle affecte les acétogènes responsables de convertir les AGVs ou bien les méthanogènes responsables de l'élimination de l'hydrogène et l'acétate.

Il a été montré que quatre éléments sont indispensables pour les méthanogènes, ce sont : le fer, le cobalt, le nickel et le soufre (SCHERER et al., 1981 ; DIEKERT et al., 1981 ; HOBAN et al., 1979 ; SPEECE et al., 1983). D'autres éléments ont aussi un effet activateur sur la croissance et la production du méthane, les plus importants sont le Molybdène et le Sélénium (SCHÖNEIT et al., 1979 ; MURRAY et al., 1981 ; SPEECE, 1983).

5.1. Fer et cobalt

En 1964, SPEECE et al. ont montré que la méthanogénèse est stimulée par un faible apport du fer, mais la concentration optimale pour un bon déroulement du processus n'a pas pu être déterminée à cause des précipitations du fer en présence de carbonates et de phosphates. La Figure 25 montre l'effet du fer sur la conversion de l'acide acétique. HOBSON et al. (1974) ont remarqué que la conversion de l'acétate en méthane par une culture acétoclaste est stimulée en ajoutant du fer sous forme Fe cl₂ jusqu'à 20 mM avec un maximum entre 5 et 10 mM.

La production du méthane et la croissance des méthanogènes nécessitent aussi du cobalt. Par exemple, Ms Barkeri cultivée sur méthanol et H₂/CO₂ a

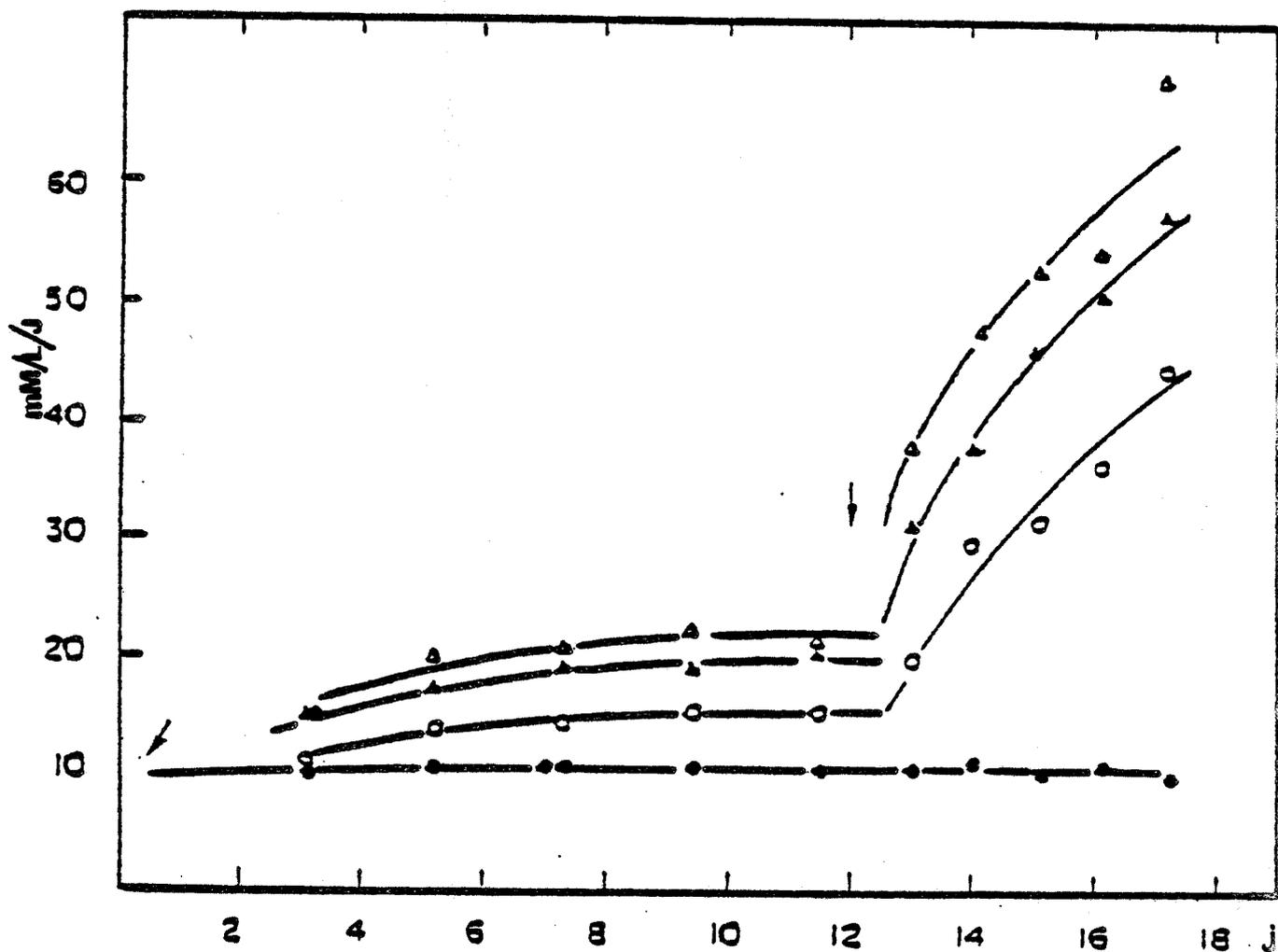


Fig 25 Variation du taux de conversion de l'acide acétique du à l'ajout du fer au début et après 12 jours (les moments d'ajout son indiqué par les flèches)

● - pas de fer; ○ - 1mM; ▲ - 2,5mM; △ - 5mM



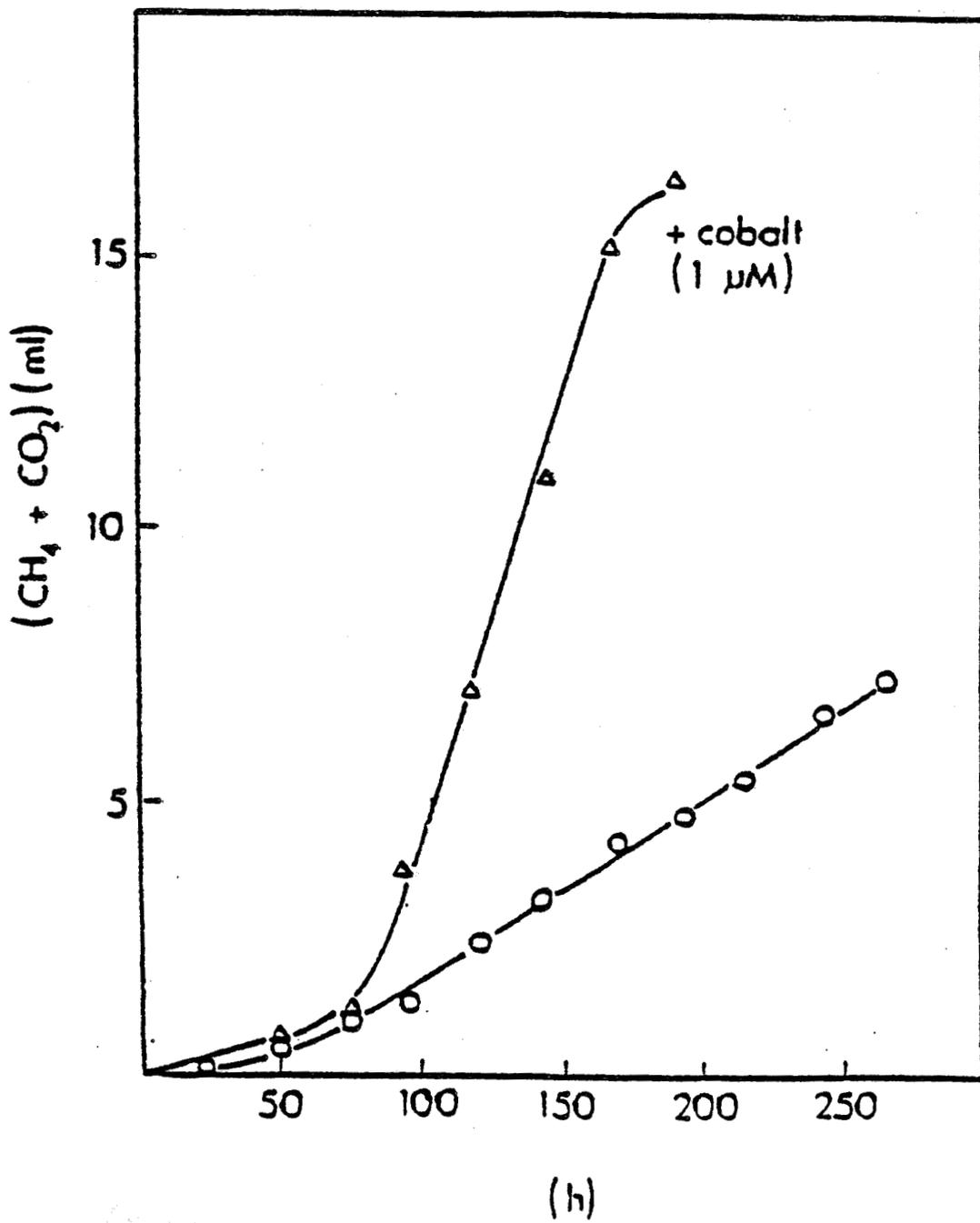


Fig 26 L'effet du cobalt sur la méthanogénèse par *Ms barkeri*

une croissance beaucoup plus faible en absence du cobalt qu'en présence de $1 \mu\text{M}$ de CoCl_2 . La Figure 26 montre l'effet du cobalt sur la synthèse de certains corrinoïdes comme le 5-hydroxybenzimidazolyl cyanocobinamide (Facteur III) qui est présent chez *Ms barkeri* avec un taux entre 0,1 à 0,2 mg/g de poids sec.

5.2. Nickel

Le nickel est l'oligo élément le plus important pour les méthanogènes. Les Figures 27 (A, B) montrent l'effet du nickel sur la croissance de *M. smithii* et *M. thermoautotrophicum* (KIRSOP, 1984). Le Tableau XV montre la teneur en nickel de quelques méthanogènes poussant sur un milieu contenant $5 \mu\text{M}$ Ni, concentration optimale pour la croissance de ces microorganismes (DIEKERT et al., 1981). Le nickel est nécessaire pour la méthanogénèse, c'est un constituant essentiel du co-enzyme F 430 (ELLEFSON et al., 1982). Par ailleurs, il stimule l'activité des hydrogénases chez *Desulfovibriogigas* et *M. thermoautotrophicum* (GRAF et al., 1981). Chez *M. bryantii* en plus des deux rôles cités ci-dessus, il empêche la lyse rapide des cellules après épuisement du substrat, il paraît donc que des protéines contenant du nickel jouent un rôle dans la synthèse ou la maintenance de la paroi cellulaire (JARRELL et al., 1982).

L'effet du nickel a été étudié sur une culture acétoclaste enrichie, l'ajout de 10 mg/l du NiCl_2 stimule la production de cellule, la concentration en MVES augmentant de 700 à 1700 mg/l en deux semaines. Pendant la même période la consommation d'acétate augmente elle aussi, et passe de 3 à 15 g/l/j.

5.3. Molybdène

L'effet du molybdène seul sur la croissance des méthanogènes et la production du méthane est nul. Par contre quand il est associé au nickel et au cobalt, son effet devient positif (Figures 28 A et B). Chez *Clostridium pasteurianum* le molybdène fait partie d'une métalloprotéine, la CO_2 -réductase, qui catalyse la réduction du CO_2 en formate. La croissance de *M. thermoautotrophicum* exige des concentrations relativement élevées en molybdène, car l'enzyme qui réduit le CO_2 est une molybdo-protéine.

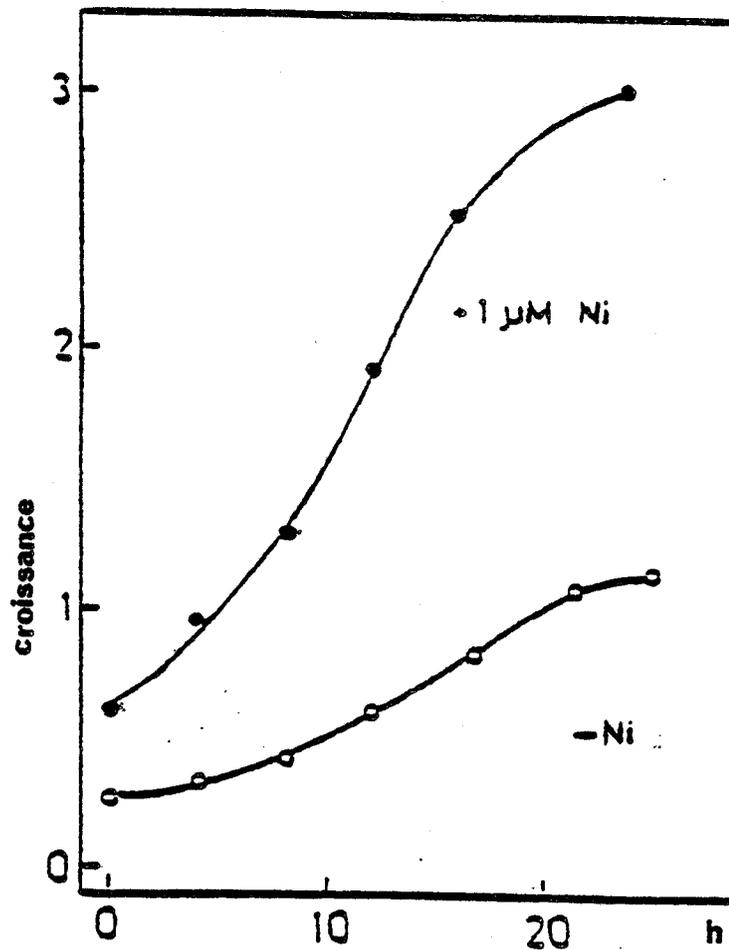


Fig 27 ,A; Effet du nickel sur la croissance de *Methanobrevibacter smithii*

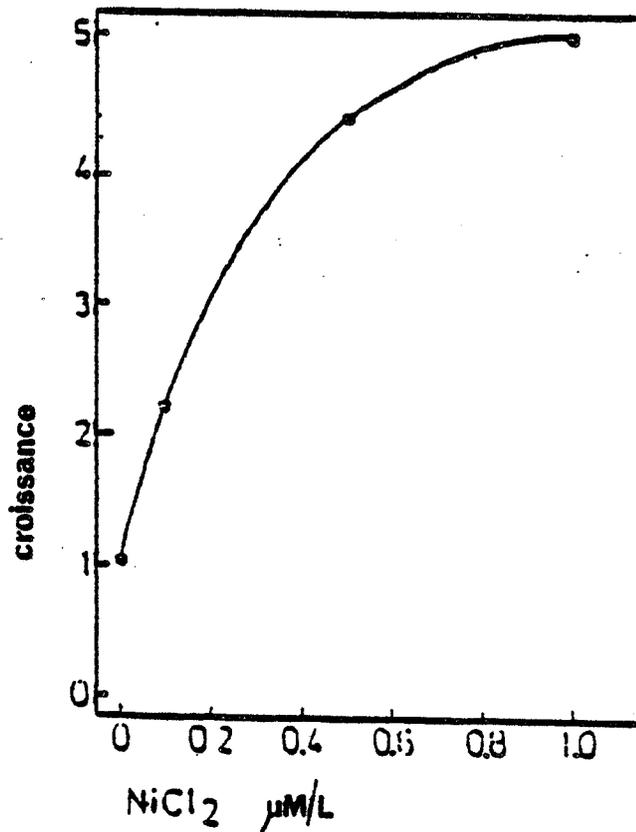


Fig 27 ,B; Effet du nickel sur la croissance de *Methanobacterium thermoautotrophicum*

(SCHÖNHEIT et al., 1979).

5.4. Sélénium

L'apport du sélénium stimule la croissance des bactéries méthanogènes comme le montre la Figure 29 qui résume l'effet du sélénium sur la croissance du Methanococcus vanniellii sur formate seul et formate sélénite. Les rendements en biomasse respectifs sont 0,76 et 1,1 g poids sec/l. Cette stimulation de la croissance est accompagnée par une élévation de l'activité d'une hydrogénase, le sélénium s'intégrant dans l'enzyme en formant un complexe (JONES et al., 1977, 1980). Le sélénium intervient aussi lors de la synthèse de coenzyme M, en remplaçant le soufre, la molécule obtenue est la suivante : $\text{CH}_3\text{-Se-COM}$ (DANIELS et al., 1984).

6. Métaux lourds

Ils provoquent des accidents de méthanisation lorsque leurs concentrations dépassent un certain seuil. Au sein du digesteur, il existe des mécanismes de protection contre l'inhibition par les métaux lourds, tels que :

- la précipitation de sulfures ; ce mécanisme n'intervient pas pour le chrome ;
- la précipitation de carbonates si le pH est suffisamment élevé (7,2 pour le cadmium et 7,7 pour le zinc par exemple). Ce mécanisme est surtout important pour le fer dont le carbonate précipite si le pH est supérieur à 6,4 ce qui peut permettre une libération de sulfure à partir du sulfure de fer. Les ions S^{2-} sont alors disponibles pour la précipitation des autres métaux ;
- la réduction des métaux à une valence inférieure, ce qui réduit les besoins en ions sulfure.

Puisque les agents qui neutralisent les ions métalliques réagissent de façon stoechiométrique avec tous les métaux lourds courants (à l'exception

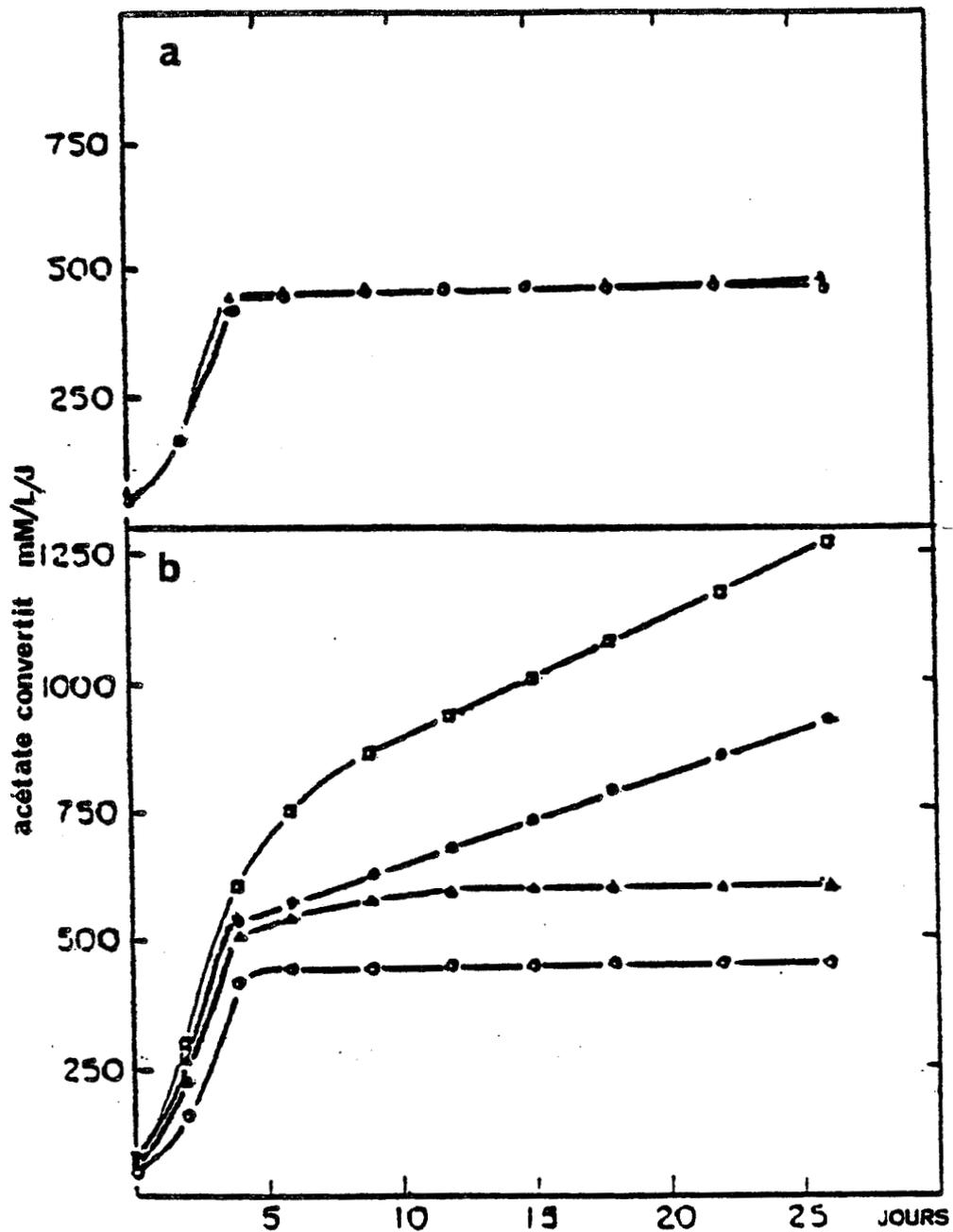


Fig 28 Effet du molybden sur l'activité d'une population mixte

a/ Δ pas de molybden
 ○ plus 50nM molybden

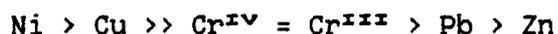
b/ ○ pas de molybden
 ▲ 50nM molybden plus 50nM cobalt
 ● 50nM molybden plus 100nM nickel
 ◻ 50nM molybden plus 50nM cobalt plus 100nM nickel

du chrome) il a été proposé par MOSEY (1976) d'exprimer la toxicité des métaux lourds par la formule :

$$k = \frac{\text{Fe}/27,9 + \text{Zn}/32,7 + \text{Ni}/29,4 + \text{Pb}/103,6 + \text{Cd}/56,2 + 0,67 \text{ Cu}/31,8}{\text{concentration en matière sèche}}$$

où 27,9 - 32,7 - 29,4 etc. sont les poids équivalents quand les métaux sont sous forme divalente et 0,67 est un facteur permettant de tenir compte de la réduction partielle du cuivre en cuivre cuivreux. Fe, Zn, Ni, etc. sont exprimés en mg/l, la concentration en matière sèche en Kg/l et k en meq/kg. Si le pH est supérieur à 6,4 ce qui est en principe, le cas dans un digesteur, le terme Fe/27,9 peut être supprimé, le fer étant précipité. Des résultats expérimentaux montrent que k peut servir à prévoir de façon acceptable la toxicité des métaux. Par exemple lorsque k dépasse 200 meq/kg la digestion anaérobie est perturbée.

La toxicité du chrome est fonction de sa concentration totale, lorsqu'elle dépasse 2,5 % de la matière sèche dans un digesteur, la fermentation est inhibée. HAYES et al. (1978) ont étudié la distribution et l'effet des métaux lourds sur la digestion anaérobie, ces travaux ont donné des résultats très voisins de ceux obtenus par MOSEY (1983). L'ordre de toxicité des différents métaux est :



Le Tableau XVI résume les seuils de toxicité des métaux lourds pour la digestion anaérobie.

7. Composés toxiques

Il paraît judicieux de discuter la toxicité d'un composé en parlant du seuil de toxicité que de la toxicité d'un composé, car presque toutes les substances sont toxiques pour les méthanogènes mais la concentration nécessaire varie d'une substance à une autre. Le Tableau XVII résume l'effet de quelques composés avec leur seuil d'inhibition (Henze et al., 1983).

Tableau XV. Proportions du nickel et F 430 chez certaines bactéries poussant sur milieu contenant 5 μ M Ni.

Organismes	Ni n Moie/g poids sec	F 430 n Moie/g poids sec
<u>Bactéries méthanogènes</u>		
M. thermoautotrophicum (Harburg)	1,1	800
M. thermoautotrophicum H)	-	643
M. smithii	680	307
M. vanniellii	290	227
M. hungatii	581	492
M. barkeri (sur méthanol)	ND	800
M. barkeri (sur acétate)	ND	800
<u>Bactéries acétoènes</u>		
C. thermoaceticum	250	< 10
A. woodii	400	< 10
E. coli	ND	< 10

Tableau XVI. Seuils de toxicité des métaux lourds pour la digestion anaérobie.

Métaux lourds	Concentrations inhibitrices mg/l	Concentrations toxiques limites mg/l
Cr III	130	260
Cr IV	110	420
Cu	40	70
Ni	10	30
Cd	-	> 20
Pb	340	> 340
Zn	400	600



Les relations structure moléculaire - toxicité de plusieurs composés pétrochimiques ont été étudiées à partir d'une culture acétoclaste (PARKIN et al., 1983 ; SPEECE, 1983 ; STUCKEY et al., 1980). Les résultats montrent qu'il y a une corrélation entre la structure moléculaire d'un composé et sa toxicité vis-à-vis des méthanogènes non acclimatés. Parmi les composés plus toxiques, il y a ceux qui ont un groupement aldéhyde, une double liaison ou qui sont substitués par un halogène.

La toxicité est aussi causée par des composés inorganiques qui sont eux aussi rencontrés dans des effluents et dont l'effet a été étudié sur l'activité d'une population mixte acétoclaste (sulfure, ammonium, oxydants).

7.1. Ammonium

En batch, l'augmentation de la concentration du NH_4^+ augmente le taux de toxicité vis-à-vis d'une population non adaptée. Par contre l'inhibition de la production du méthane est progressive quand un autre procédé est utilisé tel que le semi-continu ou le mono-étape infiniment mélangé. La Figure 30 montre la réponse d'une population acétoclaste vis-à-vis des différentes concentrations du NH_4^+ .

D'autres essais ont été réalisés avec des concentrations de l'ordre de 2400 mg/l d' NH_4^+ , les résultats montrent que la toxicité du NH_4^+ est réversible ; quand l'ammonium est supprimé dans le surnageant le système retrouve sa cinétique initiale de production du gaz.

7.2. Sulfure

Une concentration en sulfure de l'ordre de 50 mg/l ajoutée sous forme de Na_2S inhibe la production de méthane par une population non adaptée en batch. En continu et semi-continu, l'effet du S^{2-} de 100 à 500 mg/l induit une diminution de production de gaz suivie par une rapide reprise de production. Le rendement du système dépend de la concentration en sulfure. Jusqu'à 1500 mg/l de S^{2-} la toxicité est réversible, mais le retour à l'équilibre est plus lent qu'avec l'ammonium.

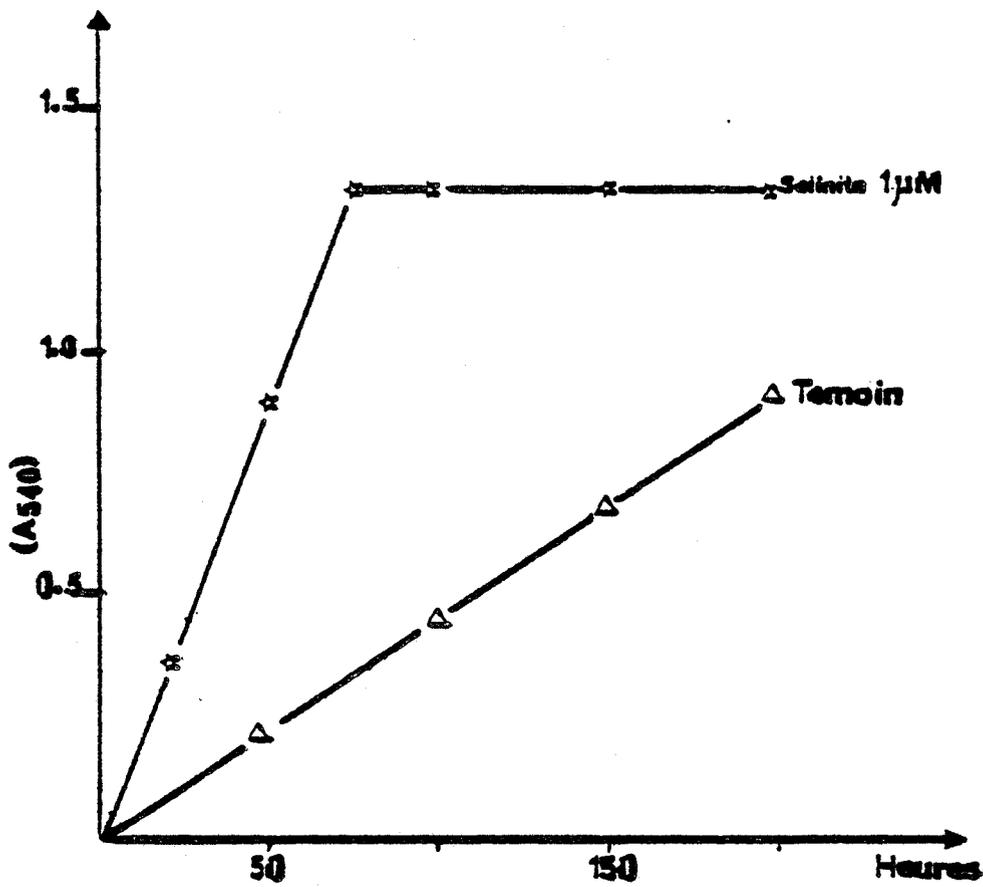


Fig 29 Effet du sélénite sur la croissance de *Methanococcus vannielii*

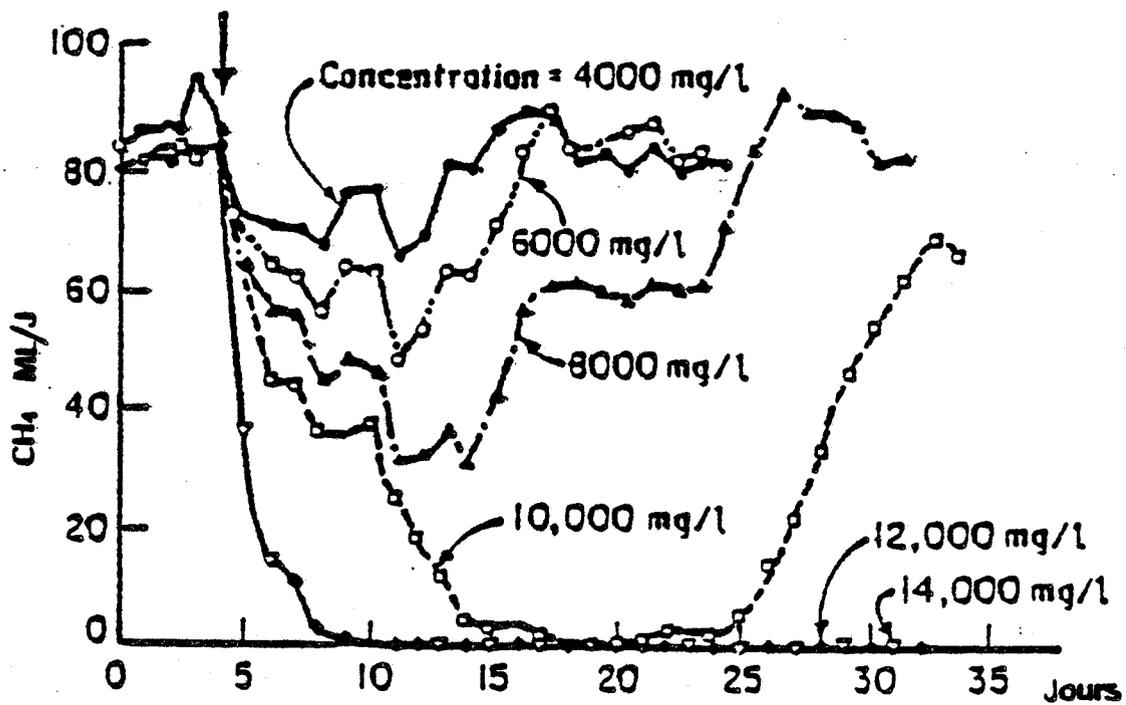


Fig 30 Réponse d'une population mixte acétoclaste à l'ammonium

Tableau XVII. Inhibition de la méthanogénèse par différents composés organiques .

Composé	Concentration	Effet
Acétylène	8 µM	Inhibition totale
Acide acrylique	12 mM	50 % d'inhibition
Acrylonitrile	4 mM	50 % d'inhibition
Aniline	26 mM	50 % d'inhibition
Catechol	24 mM	50 % d'inhibition
	0,2 - 0,4 Kg/m ₃	Pas d'inhibition
Chloro-1-propane	1,9 mM	50 % d'inhibition
Chloro-1-propène	0,1 mM	50 % d'inhibition
Cyanure	0,01 Kg/m ₃	Début d'inhibition
Formaldéhyde	0,04 Kg/m ₃	Début d'inhibition
	2,4 Kg/m ₃	50 % d'inhibition
	0,5 - 1 Kg/Kg NVES	Toxicité totale (mort des bactéries)
Furfural	0,5 Kg/m ₃	Inhibition
	2 Kg/m ₃	Inhibition totale
Nitrobenzène	0,1 mM	50 % d'inhibition
Phénol	26 mM	50 % d'inhibition
	0,2 - 0,4 Kg/m ₃	Pas d'inhibition



7.3. Oxydants

La présence d'oxygène dans un écosystème anaérobie, déstabilise le processus, le même effet a été observé avec des composés ayant un degré d'oxydation élevé tel que nitrate et le peroxyde d'hydrogène.

Dans le cas des effluents provenant d'une industrie de pectine, la concentration en nitrate peut atteindre 3-5 Kg NO_3^-/m^3 . Sans tenir compte de ce taux de NO_3^- , la digestion est mal menée, par contre, le système s'est stabilisé après introduction de l'effluent prédénitrifié.

MATERIELS ET METHODES

I. TECHNIQUES ANALYTIQUES

Détermination analytiques servant à l'évaluation des fermentations en pilote

1. Matières sèches totales (MST)

Une quantité connue d'échantillon est séchée à 105 °C jusqu'à poids constant.

2. Matières minérales (MM)

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

3. Matières organiques ou volatiles

Cette valeur correspond à la perte de poids constatée après passage au four à 550 °C.

4. Matières en suspension et matières volatiles en suspension

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

5. Carbone organique total (COT)

Dosage sur un appareil BECKMAN Modèle 915.

Le carbone minéral est dosé à 105 °C (Cm).

Le carbone organique total (COT) est dosé à 950 °C.

6. Azote total Kjeldahl et azote ammoniacal (NTK et NH₄)

L'azote ammoniacal est mesuré après distillation de l'échantillon au buchi. L'azote total est mesuré après minéralisation et distillation en conformité avec la norme AFNOR T 91 A - Doc. 25. Dans les deux cas, la concentration en azote est déterminée par un dosage titrimétrique avec l'acide sulfurique 0,1 N.

7. Dosage de l'acide formique

L'acide formique est dosé par une méthode colorimétrique (LANG et LANG). Un échantillon de 0,5 ml (min 50 µg de formate) est pris dans un volume de 1 ml d'une solution d'acide citrique (10 g dans 100 ml d'isopropomol), plus une goutte d'une solution d'acétate de sodium à 30 %, plus 3,5 ml d'anhydride acétique ; après deux heures à température ambiante, une coloration rosâtre se développe. La densité optique est lue à 515 nm.

8. Dosage du phosphore total

La teneur en phosphore total est déterminée par une méthode officielle de la C.E.E.. Un volume connu d'échantillon est minéralisé par voie sèche puis mis en solution acide. La solution est traitée par le réactif Vanado-molybdique. La densité optique de la solution jaune ainsi formée est mesurée au spectrophotomètre à 430 nm.

9. Dosage des éléments minéraux

Les analyses des éléments minéraux sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique PYE UNICAM SP 9. Quelque soit l'élément à analyser, une gamme étalon de 0;2;4;6;8 et 10 PPM est préparée à partir de solutions mères. Toutes les dilutions, même celles de l'échantillon à analyser sont faites dans une solution de chlorure de lanthane à 0,2 %. Celle-ci a pour but de réduire les interférences. Les concentrations sont déterminées grâce aux lampes spécifiques pour chaque élément. La concentration finale est la moyenne de trois déterminations.

II. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1. Les acides gras volatils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse des surnageants de centrifugation dans les conditions suivantes :

- * 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 de chromo-sorb W AW 100-200 mesh, imprégné de néopentyl glycol adipate et de 2 % d'acide phosphorique.
- * Gaz vecteur : azote 2 bars, 30 ml/min, saturé en acide formique.
- * Température de colonne : 175 °C.
- * Température d'injecteur et détecteur : 230 °C.
- * Débit d'hydrogène : 300 ml/min.
- * Débit d'air : 300 ml/min.

La quantification des AGVs est réalisée par étalonnage externe.

2. Les constituants des gaz de fermentation sont séparés par chromatographie gaz-solide.

- * Chromatographe PYE UNICAM muni d'un détecteur à conductivité thermique.
- * Colonne acier 4 mm x 3 m remplie de propak S.
- * Gaz vecteur azote pour le dosage de H_2 - CO_2 - CH_4 ou hélium pour le dosage N_2 - CH_4 - CO_2 . le débit du gaz est 50 ml/mn.
- * Température du four : 50 °C ; injecteur : 60 °C, détecteur : 100 °C.

La quantification est réalisée par étalonnage externe, les teneurs sont exprimées en pourcentages de chaque gaz dans l'échantillon.

III. 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. Après ensemencement, les flacons sont placés à l'étuve à la température d'incubation de 35 °C. Les prélèvements de gaz et de liquide sont faits à la seringue munie d'une valvé étanche et injectés dans le chromatographe. La cinétique de production de méthane se fait par rapport à un étalonnage par injection de quantités connues de méthane à la pression ambiante. Dans ces conditions, la formule $V_0 \times A \times K$ fournit directement le volume de méthane produit avec V_0 égal au volume de l'espace mort du flacon ; A, la surface du pic de méthane et K le coefficient de réponse du chromatographe (PETROFF, 1985).

La cinétique de production de gaz et le bilan de carbone sont calculées en tenant compte des prélèvements de gaz pour des analyses et des prélèvements de milieu qui augmentent le volume mort et élimine une partie du substrat.

2. Cultures anaérobies

La technique de culture anaérobie de Hungate modifiée par MILLER et WOLIN (1974) est utilisée pour les enrichissements et les cultures de souches pures. Le milieu de base utilisé est le BCYT (Tableau XVIII). Selon les expériences ce dernier subit des modifications ainsi :

2.1. Pour le C/N/P

La modification a été faite sur la solution réductrice dont on a éliminé la cystéine, la réduction du milieu a été faite par Na_2S , $9\text{H}_2\text{O}$ (12, 5 g/l).

2.2. Pour les essais Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺

Tous les composés qui apportent les trois éléments ont été éliminés du milieu de base et rajoutés lors de la préparation du milieu selon les concentrations désirées.

Le tampon carbonate a été réalisé au moyen de carbonate de lithium (1,48 g/l) pour pH : 7. La solution réductrice contient de la cystéine - HCl (12,5 g/l). Les concentrations initiales en substrats sont précisées dans le texte.

Après préparation, le milieu est porté à ébullition pour éliminer l'oxygène dissous puis refroidi et maintenu à 35 °C sous courant gazeux N₂-CO₂ (85-15 %). La quantité nécessaire de bicarbonate est ajoutée suivant le pH et la température d'incubation désirés.

Lorsque le tampon HEPES [acide 4-(2hydroxyéthyl) - 1 piperazine éthanosulfonique] est utilisé, le pH est ajusté à 6 avec de la soude (dans les essais Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺, la soude est remplacée par l'hydroxyde de lithium) après on ajoute le tampon carbonate. Le milieu est distribué dans des flacons sous courant gazeux (N₂-CO₂). Ceux-ci sont obturés par des bouchons butyl sertis avec une capsule en aluminium. Les milieux sont stérilisés pendant 20 minutes à 115 °C et conservés à température ambiante.

Tableau XVIII. Composition du milieu de base (BCYT) pour la culture de bactéries méthanogènes.

Pour un volume final de 1 litre :

Solution macro-minérale : 50 ml ; trace minérale : 10 ml .

Solution de vitamine : 10 ml ; NH_4Cl : 1 g ; yeast extract : 0,5 g trypticase : 0,5 g ;

Solution resazurine (0,2 %) : 1 ml ; KH CO_3 (pH : 7 ; pour 15 % CO dans le gaz) 2,1 g.

La solution macro minérale contient en g/l :

$\text{KH}_2 \text{PO}_4$: 6 ; NaCl : 12 ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1,6.

La solution trace minérale contient en g/l :

Acide nitrilotriacétique (titriplex I) : 12,8 ; $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 1,35 ;
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,1 ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,024 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,1 ; ZnCl_2 : 0,1 ;
 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,025 ; H_3BO_3 : 0,01 ; $\text{Na}_2 \text{Mo O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,024 ; NaCl : 1 ;
 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,12 ; $\text{Na}_2 \text{Se O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,026 ;

L'acide nitrilotriacétique est dissous en premier dans 200 ml d'eau et le pH est ajusté à 6,5 avec KOH.

La solution vitamine contient en mg/l :

D (+) biotine : 2 ; acide folique : 2 ; pyridoxine - Hcl : 10 ;
riboflavine : 5 ; acide nicotinique : 5 ; thiamine - Hcl : 5 ; D (+)
panthothénate de calcium : 5 ; vitamine B12 : 0,1 ; acide P. aminobenzoïque
: 5 ; acide DL- α -lipoïque : 5.

3. Numération bactérienne

3.1. Technique du nombre le plus probable (MPN)

Les boues de digesteurs sur lesquelles sont réalisées les numérations sont homogénéisées ou "polytron" durant 5 mn sous courant d'azote. Les

boues sont ensuite diluées sériellement en milieux liquides, en conditions stériles. Trois 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 DEMAN (1975).

3.2. Numération après coloration par l'acridine orange

Après des dilutions sérielles (-1, -2, -3), un volume du tube (-3) est dilué au 1/10e (0,2 ml dans 1,8 ml d'eau distillée), le même volume est pris dans 0,2 ml d'acridine orange, on laisse agir 1 à 2 mn, après on filtre le tout sous vide sur une membrane nucléopore 0,2 μ qui a subi un traitement avec une solution de noir irgalan pendant 24 heures et on rince à l'eau distillée. La membrane est déposée sur lame avec une goutte d'huile à immersion puis on met la lamelle. Le comptage est réalisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Le nombre de bactéries par ml est exprimé grâce l'équation suivante :

$$N/ml = n \times 89,54 \times 10^4 \times f \quad \text{avec } n \text{ moy} = \text{nombre moyen de bactéries} \\ \text{comptées sur la diagonale du} \\ \text{réticule (grille) ;} \\ f = \text{facteur de dilution.}$$

4. Observations microscopiques

Les observations microscopiques à l'état frais sont réalisées avec un microscope Nacet NS 400 équipé d'un contraste interférentiel. La fluorescence du F 420 des bactéries méthanogènes est observée en épi-illumination (ultra violet). Les observations en microscopie électronique à balayage sont faites après fixation des échantillons selon la technique utilisée par VERRIER (1984) sur un microscope à balayage JEOL ; JSM 35 CF.

IV. METHANISATION EN PILOTE DE LABORATOIRE

1. Fermenteurs

Les essais de fermentation méthanique sont réalisés en fermenteurs de laboratoire de 0,5 , 1 et 16 litres. L'homogénéisation du milieu est assurée par un système d'agitation mécanique à pales en U dont la vitesse est variable. La régulation de température est obtenue par circulation d'eau chaude dans un serpentin en inox. Le volume de gaz produit est mesuré en continu par un compteur totaliseur Schlumberger ou bien un compteur à impulsions (MOLETTA et ALABAGNAC 1982).

Pour les pilotes de 0,5 et de 1 litre, l'agitation est assurée par un barreau aimanté. Les pilotes ont une double paroi qui permet la circulation de l'eau thermostatée à 35 °C.

2. Procédé de fermentation et paramètre de fonctionnement

La fermentation est réalisée selon le procédé mono-étape infiniment mélangé sans recyclage de la biomasse. L'alimentation est continue, la température est réglée à $35 \pm 0,5$ °C, le débit moyen de l'alimentation est de 1,2 l/J, la charge volumique est de 1,69 g DCO/l/j et le temps de séjour hydraulique de 13 j ce qui correspond à un taux de dilution de $0,08 \text{ j}^{-1}$.

Pour le démarrage, le pilote est rempli de boue de digesteur industriel provenant de la station d'épuration sucrière de Thumeries, la population microbienne est adaptée à la dégradation des acides gras volatiles.

3. Substrats

Le pilote est alimenté par un substrat synthétique, solution dont la composition est :

- acide acétique	5	g/l
- acide propionique	5	g/l
- Acide butyrique	5	g/l

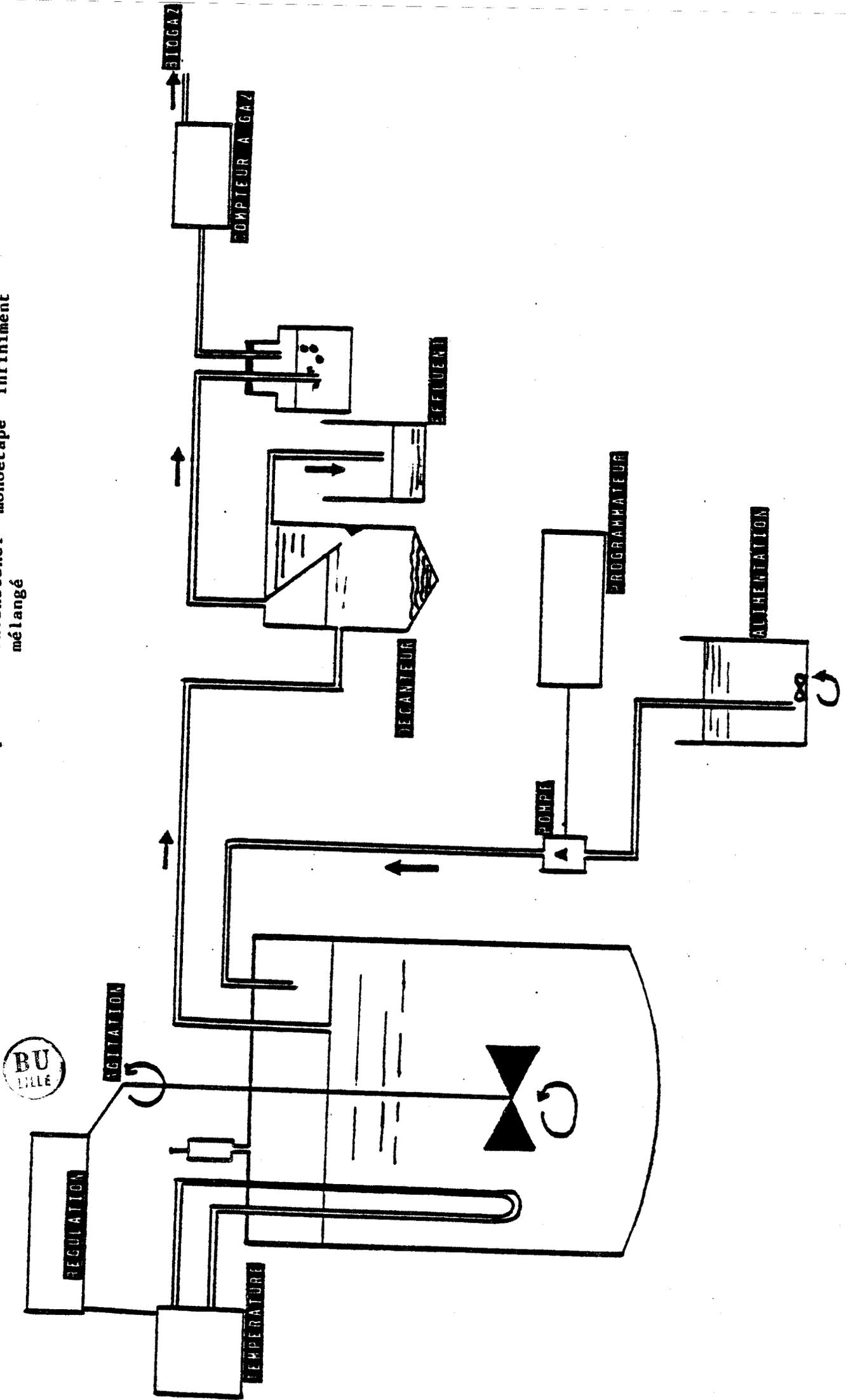
- KH_2PO_4	0,31 g/l
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,256 g/l
- NH_4Cl	1,112 g/l
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l

Le pH final est ajusté à 5 par addition de soude. Les proportions des différents composés ont été calculées de façon à avoir un rapport C/N/P de 100/5/1. Pour le rapport C/N/P/ de 100/0,7/1 le NH_4Cl a été éliminé de la solution. Lors des suivis faits avec les pilotes de 1 litre, la source de carbone était essentiellement de l'acide acétique 15 g/l.

4. Bilans de fermentation

Le suivi de la fermentation est réalisé à partir des bilans gaz, bilans matières et la stabilité du système qui est estimée principalement à partir de la concentration en acides gras volatiles résiduels et du pH.

Fig 1 schéma du pilote conventionnel monoétape infiniment mélangé



MVES, NTK et NH_4 . Leurs valeurs respectives à l'équilibre sont :

MES	2,4	g/l
MVES	1,08	g/l
NTK	410	mg/l
$\text{NH}_4\text{-N}$	350	mg/l
pH	≈	8
AGV	≈	0

Il faut noter que le pH légèrement alcalin n'a pas perturbé sensiblement la méthanogénèse. Par ailleurs la vitesse de dégradation des différents acides gras volatils par les bactéries n'a pas été variée pendant toute la période de fonctionnement. Les valeurs mesurées sont de : 281 mg/l/h pour l'acide acétique, 94 mg/l/h pour l'acide propionique et 150 mg/l/h pour l'acide butyrique. Le suivi des cinétiques de dégradation des AGVs a été effectué dans un réacteur de 500 ml avec régulation du pH à 7 et de la température à 37 °C. La Figure 2 montre l'évolution de la dégradation des différents acides gras volatils et de la production de méthane.

Le rendement en méthane était de 0,37 litre de méthane par gramme de DCO, celui de la biomasse est de 0,041 g MVES/g DCO. Des valeurs similaires ont été obtenues à partir de la méthanisation d'un mélange d'acides gras volatils par Henze et al. (1983) et Chiu-Yue Lin et al. (1986). L'azote bactérien déterminé par différence entre l'azote total initial et l'azote ammoniacal résiduel correspond à 60 mg/l d'où un rendement de 2,74 mg d'azote bactérien produit par gramme de DCO dégradé.

1.3. Observations microscopiques et commentaires

Les observations microscopiques, en contraste interférentiel et microscopie électronique à balayage durant la période de méthanisation révèlent une population mixte de deux espèces :

* la prédominante se présente sous forme de filaments annelés composés de cellules de quelques μm de long et d'environ 0,5 à 1 μm de diamètre. La structure de la surface, et les septa caractéristiques permettent de l'identifier avec une bactérie méthanogène acétoclaste, Methanothrix

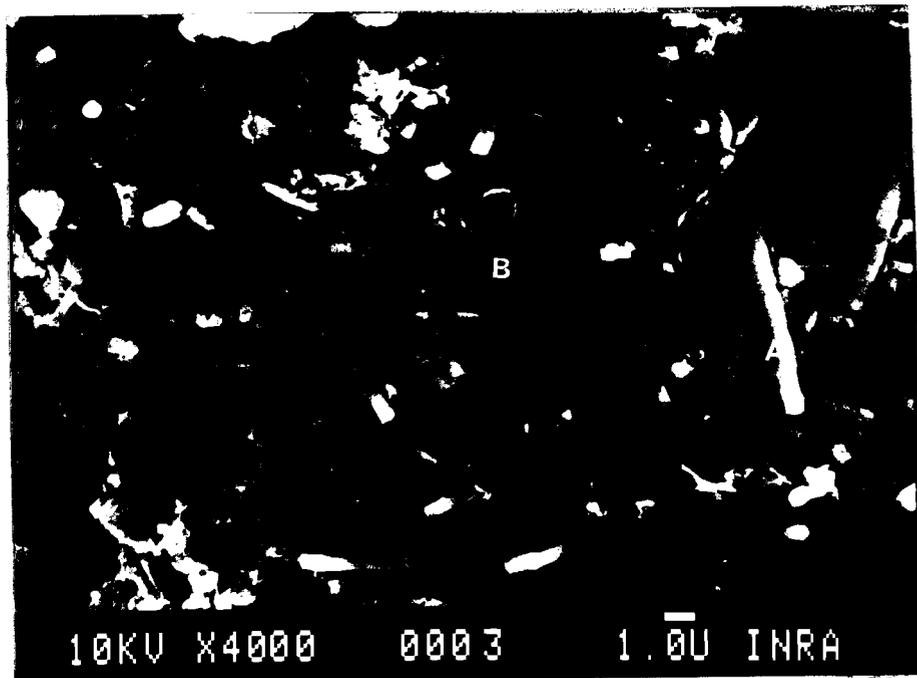
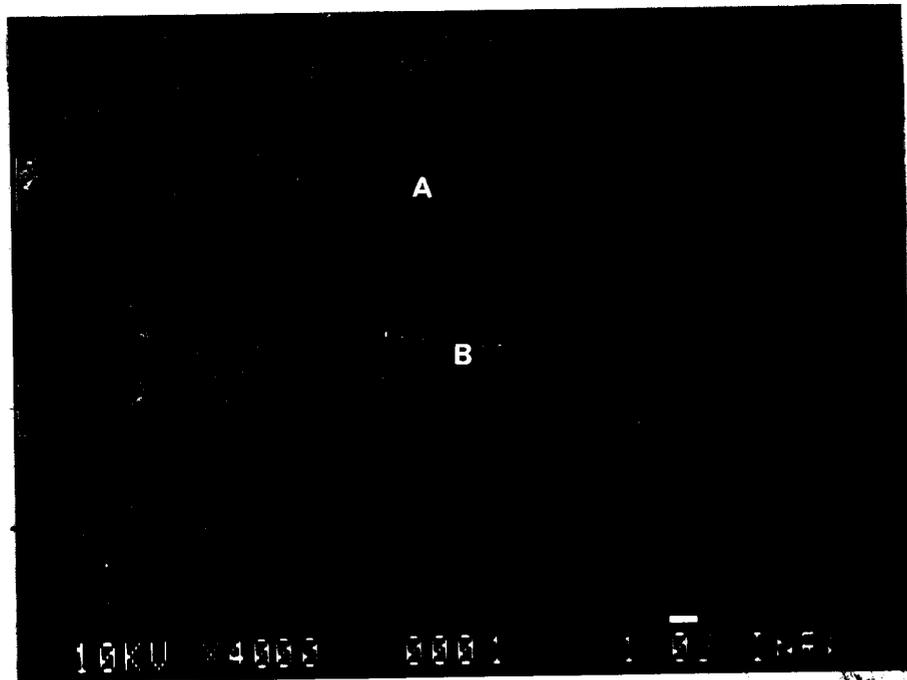


Fig (3;3bis) Aspect de la population mixte à l'état stationnaire de la première période

A/Methanotherix soehngenii

B/Sarcine

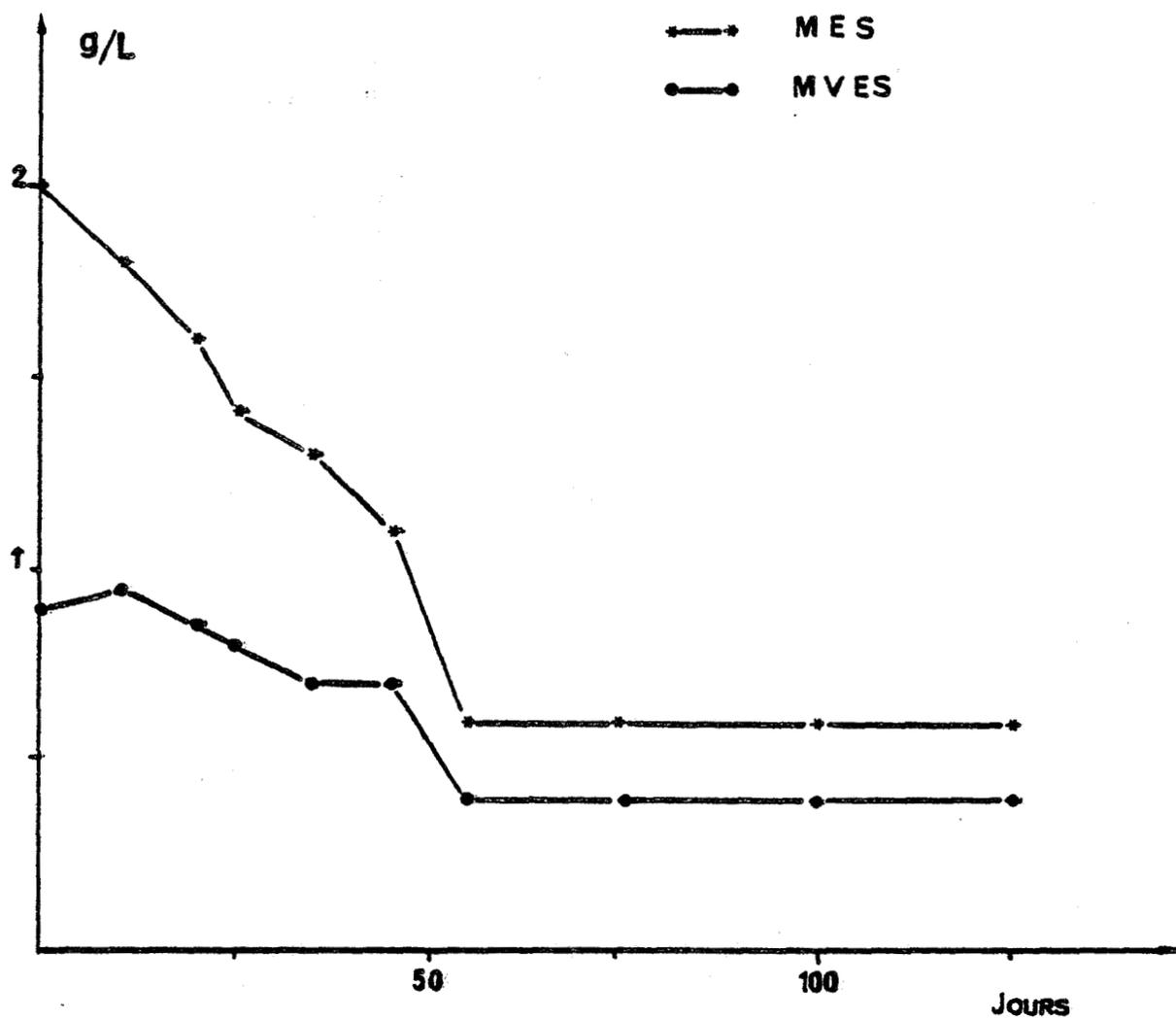


Fig 4 Evolution des matières en suspension et matières volatiles en suspension lors de la deuxième période (rapport C/N=140)



2. Période du 02/05/1985 au 20/09/1985

Rapport C/N = 140

Rapport C/N/P = 100/0,7/1

Lors de cet essai, aucun paramètre n'a été modifié, sauf la concentration en azote qui a passé de 354 à 54 mg/l. Parmi les deux sources d'azote $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ et $\text{NH}_4 \text{Cl}$, ce dernier a été éliminé. Le changement du rapport C/N/P a été réalisé en une seule fois en alimentant le réacteur avec le nouvel effluent.

2.1. Résultats

Les Figures 4 et 5 montrent l'évolution des matières en suspension (MES), des matières volatiles en suspension (MVES), de l'azote total Kjeldahl (NTK) et azote ammoniacal ($\text{NH}_4\text{-N}$) durant la période de l'essai, la méthanisation était stable, les teneurs en méthane et gaz carbonique étaient presque les mêmes qu'auparavant ; les proportions respectives sont 60 à 65 % et 40 à 35 %.

A partir du 73e jour, la production du biogaz a diminué. Les acides gras volatils commencent à apparaître dans le milieu, le pH diminue progressivement jusqu'à 5. Les Figures 6 et 7 montrent l'évolution de la production du biogaz et celle des AGVs. En cet état, les concentrations respectives en acide acétique, propionique et butyrique étaient de 1,65 ; 1,4 et 0,9 g/l. L'alimentation du pilote a été arrêtée et son contenu a été neutralisé en ajoutant de la soude ; 30 jours après, l'acide acétique et butyrique ont disparu du milieu et le propionique résiduel était à 1 g/l. Le Tableau III montre le bilan des différents paramètres au 73e jour.

Le rendement en biomasse est de 0,018 g MVES/g DCO. L'azote bactérien était de 23 mg/l d'où un rendement de 1,05 gramme d'azote assimilé par gramme de DCO dégradé. Avant la déstabilisation du processus, un bilan de carbone moyen établi sur 24 heures met en évidence (Tableau IV) que :

- le rendement de conversion du carbone en méthane est de 49 % ;
- le gaz carbonique gazeux représente 27 %, tandis que le carbone minéral (bicarbonate) équivaut à 3 % ;

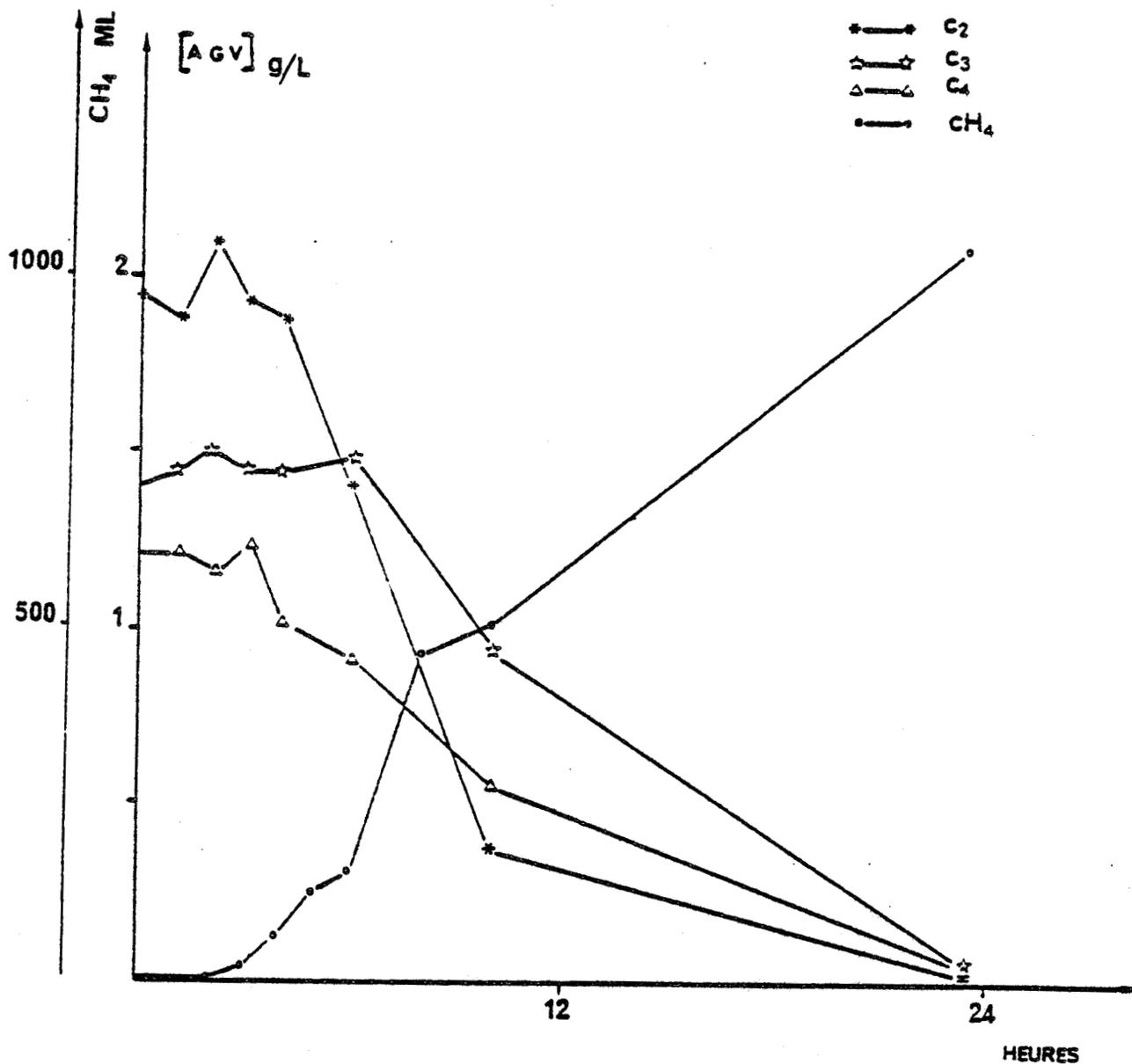


Fig 2 Cinétique de dégradation d'un mélange d'acides gras volatils par une population mixte adaptée en continu; PH=7; 35°C



Tableau I. Paramètres de fonctionnement du digesteur.

Charge volumique	1,69 g DCO/l/j
TSH	13 jours
Débit	1,2 l/j
Production du gaz	12,5 l/j
Efficacité volumique	0,8 l/l/j
Teneur en méthane	63 --- 65 %
Conversion ou épuration	≈ 100 %

Tableau II. Dénombrement bactérien après 40 jours d'adaptation de la population mixte.

Substrat	Nombre de bactéries par ml	Type de bactéries
H ₂ /CO ₂	910 ⁶	Méthanogènes hydrogénophiles
Formate	710 ⁶	Méthanogènes hydrogénophiles
Acétate	710 ⁶	Méthanogènes acétoclastes



soehngenii.

* des bactéries coccoïdes d'environ 1 µm de diamètre, la morphologie caractéristique de leurs agrégats et leur fluorescence en U. V. laisse penser qu'il s'agit de Methanosarcina.

A côté de ces deux dernières, il y avait d'autres espèces (bacilles, coques mobiles). Les Figures 3 et 3 bis montrent la morphologie et l'abondance des deux espèces méthanogènes présentes dans la population bactérienne présente dans le fermenteur à l'état d'équilibre.

1.4. Dénombrement bactérien (MPN) sur la flore du digesteur traitant un mélange d'acides gras volatiles. (Tableau II)

Des dénombrements bactériens ont été réalisés sur la flore du digesteur en mésophilie, adaptée à la dégradation des acides gras volatils. Après 40 jours d'adaptation, c'est-à-dire très près de l'état d'équilibre, les substrats testés permettent d'évaluer les différentes populations méthanogènes hydrogénophiles (H_2/CO_2 , formate) et acétoclastes. Les matières volatiles en suspension dans l'échantillon analysé étaient de 1,08 g/l.

Les méthanogènes hydrogénophiles sont significativement représentés dans le fermenteur, les utilisatrices d'hydrogène dominantes sont des bactéries sous forme de bacilles qui fluorescent en U.V. sur H_2/CO_2 et à partir de la dilution 10^{-5} jusqu'à 10^{-6} on observe des sarcines.

Les méthanogènes acétoclastes observées sont de deux types, des filaments courts parfois longs cloisonnés. Ces dernières appartiennent aux bactéries du genre Methanotrix. Accompagnant les Methanotrix, il y a des bactéries en amas, fluorescent en U.V. appartenant au genre Sarcine. Ces dernières dominent dans les milieux de dénombrement, contrairement à ce qui se passe dans le digesteur, c'est les Méthanotrix qui prédominent.

Tableau III. Valeurs de quelques paramètres après 73 jours de fonctionnement.

MES	0,6 g/l
MVES	0,41 g/l (69 %)
NIK	63 mg/l
NH ₄ - N	40 mg/l
PH	5
AGVs acétate	1,5 g/l
propionate	1,4 g/l
butyrate	0,9 g/l

Tableau IV. Bilan de carbone après méthanisation mésophile pour une charge de 7,1 g C/l et TSK de 13 jours PH = 7,1.

Biogaz 10,4 l/j		
CH ₄ 6,55 l	3,5 g	49 %
CO ₂ 3,64 l	1,95 g	27 %
Carbone minéral		
Bicarbonate	0,217 g	3 %
Carbone organique		
AGV résiduel	0,489 g	6,8 %
Biomasse	0,69 g	9 %
Total ...	6,846 g/l	94,8 %



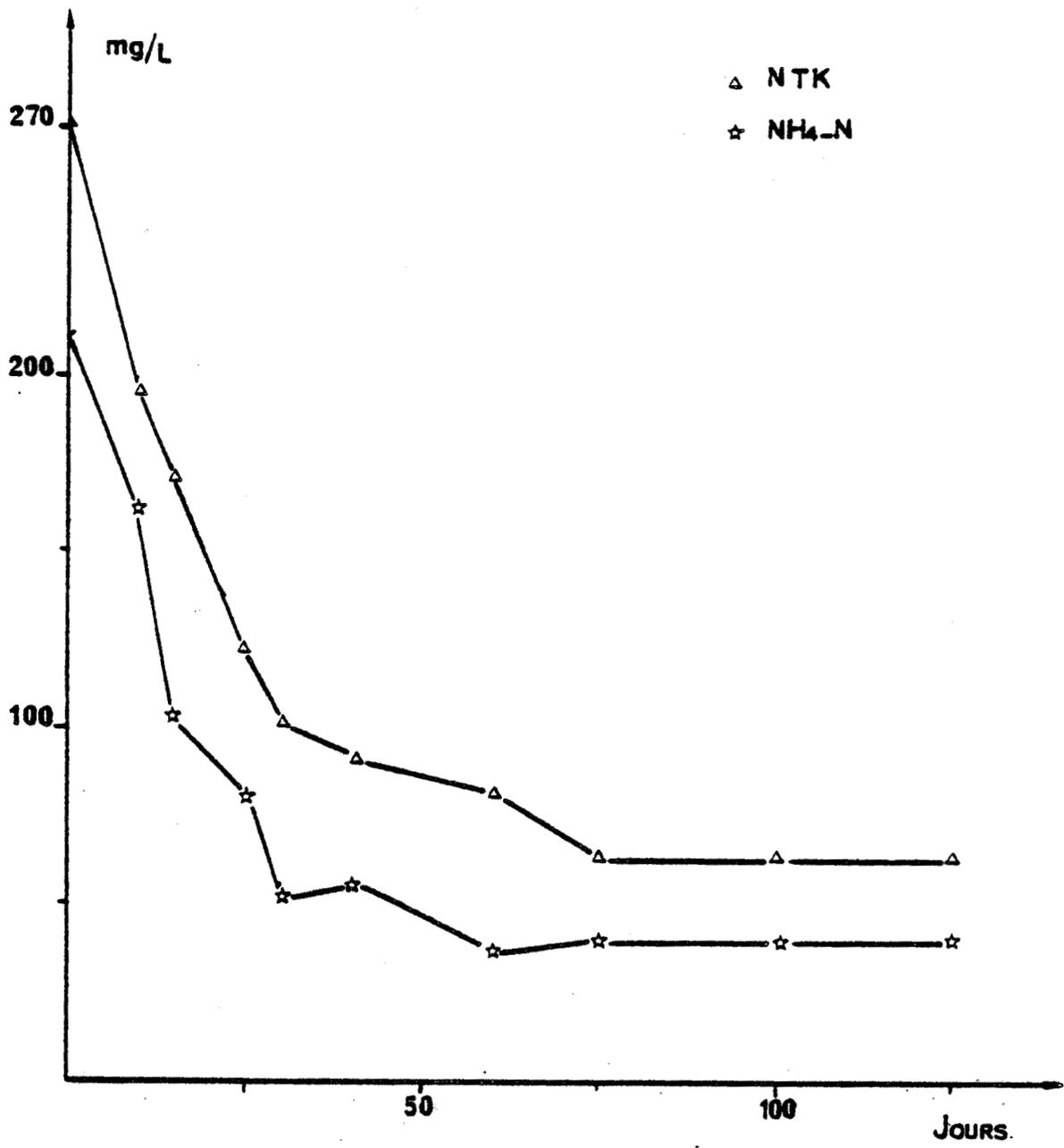


Fig 5 Evolution de l'azote total Kjeldahl et azote ammoniacal lors de la deuxième période



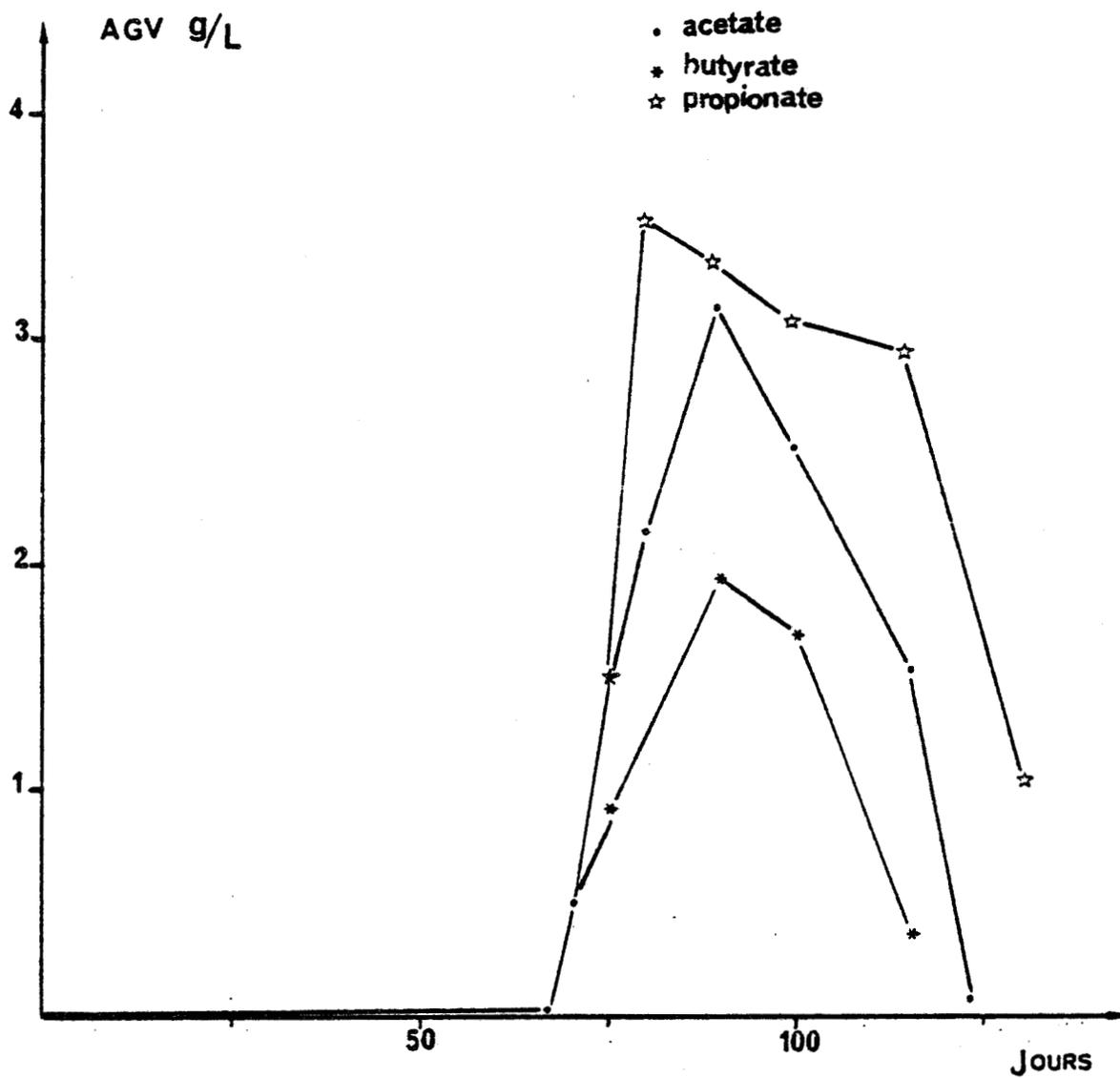


Fig 6 Evolution des AGVs résiduels au cours de la deuxième période



- le carbone organique résiduel (AGVs résiduels et biomasse) représentent 15,8 %.

2.2. Observations microscopiques

Lors de cette période des modifications ont été observées au niveau de la microflore. Contrairement aux observations faites lors de la première période, ce sont les sarcines qui dominent, les filaments qui correspondent à Methanothrix soehngenii ont presque disparu. La Figure 8 montre l'état des bactéries et leurs abondances prises au 54e jour du deuxième essai.

2.3. Dénombrement bactérien (MPN) sur la flore du digesteur - (Tableau V).

2.3.1. Flore fermentative

Les observations microscopiques révèlent la présence de coques, bacilles, vibrions. L'analyse des acides gras volatils montrent que le glucose a été dégradé en acétate, propionate, butyrate, jusqu'à la dilution 10^{-5} , au-delà le dosage montre qu'il y a du lactate.

2.3.2. Bactéries méthanogènes

Les méthanogènes hydrogénophiles sont mieux représentées que les autres bactéries, on dénombre dans l'écosystème $9 \cdot 10^6$ bact/ml sur H_2/CO_2 et $2 \cdot 10^7$ bact/ml sur formate. Les résultats du dénombrement des espèces hydrogénophiles ne sont pas significativement différents sur H_2/CO_2 et formate. Par ailleurs, la morphologie de ces microorganismes observée en épifluorescence U.V. permettent de penser qu'il s'agit avec une très forte probabilité de Methanobacterium formicicum.

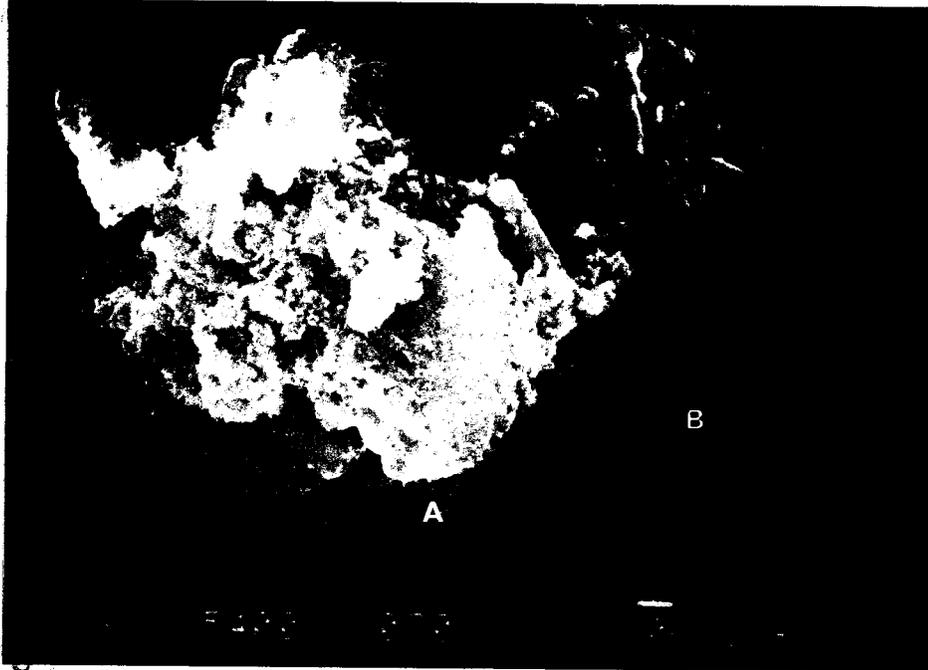
Les méthanogènes acétoclastes sont présentés en genre et en nombre de la même façon que la numération effectuée sur la première période. On rencontre des amas dominants, morphologiquement semblables à Methanosarcina mazei. En plus on observe des filaments cloisonés qui correspondent à Methanothrix soehngenii.

Tableau V. Dénombrement bactérien (MPN) lors de l'alimentation avec C/K/P est égale 100/0,7/1 et après un temps d'adaptation de 52 jours (4 fois TSE).

Substrat	Nombre de bactéries par ml	Type de bactéries
Glucose 25 mM	$11 \cdot 10^6$	Fermentatives
H ₂ / CO ₂	$9 \cdot 10^6$	Méthanogènes hydrogénophiles
Formate 50 mM	$2 \cdot 10^7$	Méthanogènes hydrogénophiles
Acétate 50 mM	$4 \cdot 10^6$	Méthanogènes acétociastes
Propionate 50 mM	$2 \cdot 10^6$	Syntrophes acétogènes
Butyrate 50 mM	$2 \cdot 10^6$	Syntrophes acétogènes
Acétate 30 mM + SO ₄ 30 mM	$9 \cdot 10^4$	Syntrophes acétogènes ou Sulfatoréductrices
Propionate 30 mM + SO ₄ 30 mM	$9 \cdot 10^3$	Syntrophes acétogènes ou Sulfatoréductrices
Butyrate 30 mM + SO ₄ 30 mM	$11 \cdot 10^4$	Syntrophes acétogènes ou Sulfatoréductrices



811



811

Fig 8 Aspect de la flore lors de la deuxième période
A/ Amas de sarcines engluées dans une gaine
B/ Methanothrix soehngeni

811

2.3.3. Bactéries acétogènes

Le nombre de bactéries dégradatrice de propionate et de butyrate, par ml de milieu, montre bien la présence assez importante d'une ou des flores syntrophes obligées associées aux méthanogènes. Cela paraît normal car dans le substrat on trouve comme source de carbone le propionate, le butyrate et l'acétate. Avec le propionate, on observe surtout des bacilles, des coques et des vibrions. Avec le butyrate, les examens microscopiques révèlent les mêmes bactéries qu'on rencontre sur le propionate.

L'analyse des AGV montre la production d'acétate jusqu'à la dilution 10^{-6} sur propionate et butyrate.

2.3.4. Sulfato-réductrices

En absence de sulfate, les bactéries acétogènes syntrophes produisent de l'hydrogène qui est en permanence consommé par les méthanogènes hydrogénéophiles. Par contre, en présence de sulfate, les AGVs sont utilisés par les sulfato-réductrices avec production de sulfure.

Les numérations montrent que les sulfato-réductrices capables d'oxyder partiellement les AGVs sont 10 à 100 fois moins nombreuses que les acétogènes productrices obligées d'hydrogène. Les observations microscopiques sur les tubes de dénombrement montrent la présence de vibrions qui sont très dominants et des bacilles morphologiquement semblables à ceux observés sur propionate et butyrate seuls.

2.4. Comparaison des deux essais (Tableau VI)

Au cours des deux essais, deux constantes interdépendantes ont diminué de moitié en fonction de la concentration en azote. Ce sont : le rendement en biomasse et la quantité d'azote assimilée par gramme de DCO; Certes, le résultat peut être dû à un effet de dilution du contenu du digesteur, mais d'après les analyses microscopiques, on constate un changement de l'inoculum qui contenait deux espèces de bactéries méthanogènes identifiées comme acétoclastes, dont l'une ayant une forme filamenteuse est presque absente après le deuxième essai. Ceci prouve bien que le rapport 140 n'est

Tableau VI. Composition de quelques paramètres importants lors des deux essais.

	C/N = 20 70e jour	C/N = 140 73e jour
Rendement de biomasse	0,041 mg NVES/g DCO	0,018
Azote bactérien	2,74 mg N bact./g DCO	1,05
PH	8	5
AGVs	-	+
NPN sur acétate	7 10 ⁶ bact./ml	4 10 ⁶ bact./ml
NPN sur formate	7 10 ⁷	2 10 ⁷ bact./ml
Teneur en méthane	63 ---- 65 %	55 ---- 65 %



pas favorable pour la culture de cette dernière en chémostat sachant qu'elle était l'espèce la plus dominante et physiologiquement la plus exigeante. La présence des acides gras volatils résiduels et en particulier d'acétate peut également expliquer la prédominance des formes sarcines par rapport aux formes filamenteuses. Cela est dû à leur constante d'affinité vis-à-vis de l'acétate qui est très faible pour les formes Sarcines (5 à 10 mM/l) et dont le taux de croissance est élevé (temps de doublement 36 à 75 heures) (MAH, 1980 ; SMITH et al., 1980 ; TOUZEL et al., 1983). Contrairement aux formes filamenteuses qui ont une grande affinité pour l'acétate (0,7 à 1 mM) mais un taux de croissance faible (temps de doublement 3 à 9 jours) (HUSER et al., 1982 ; TOUZEL et al., 1984).

Tableau VII. Composition minérale des différents rapports C/N/P.

	100/5/1	100/0,7/1	100/5/0,1	100/0,7/0,1
AGVs mg/l	15000	15000	15000	15000
XH ₂ PO ₄ mg/l	310	310	50	50
(NH ₄) ₂ SO ₄ mg/l	256	256	256	256
NH ₄ Cl ₂ mg/l	1112	0	1112	0
Mg Cl ₂ , 6H ₂ O mg/l	100	100	100	100



II. INFLUENCE DU C/N/P SUR UNE POPULATION MIXTE

1. Substrats

Les substrats utilisés sont des solutions synthétiques dont les compositions sont présentées sur le Tableau VII et qui sont stockés à + 4°C. Au début de l'expérience, la source du carbone était un mélange d'acides gras volatils (acide acétique, propionique et butyrique) 5 g/l de chaque. Après 55 jours, la source en carbone était essentiellement de l'acide acétique 15 g/l pour obtenir un enrichissement d'une population méthanogène acétoclaste sur le substrat qui provient d'une installation d'épuration industrielle et qui est adaptée à dégrader les AGVs.

2. L'inoculum

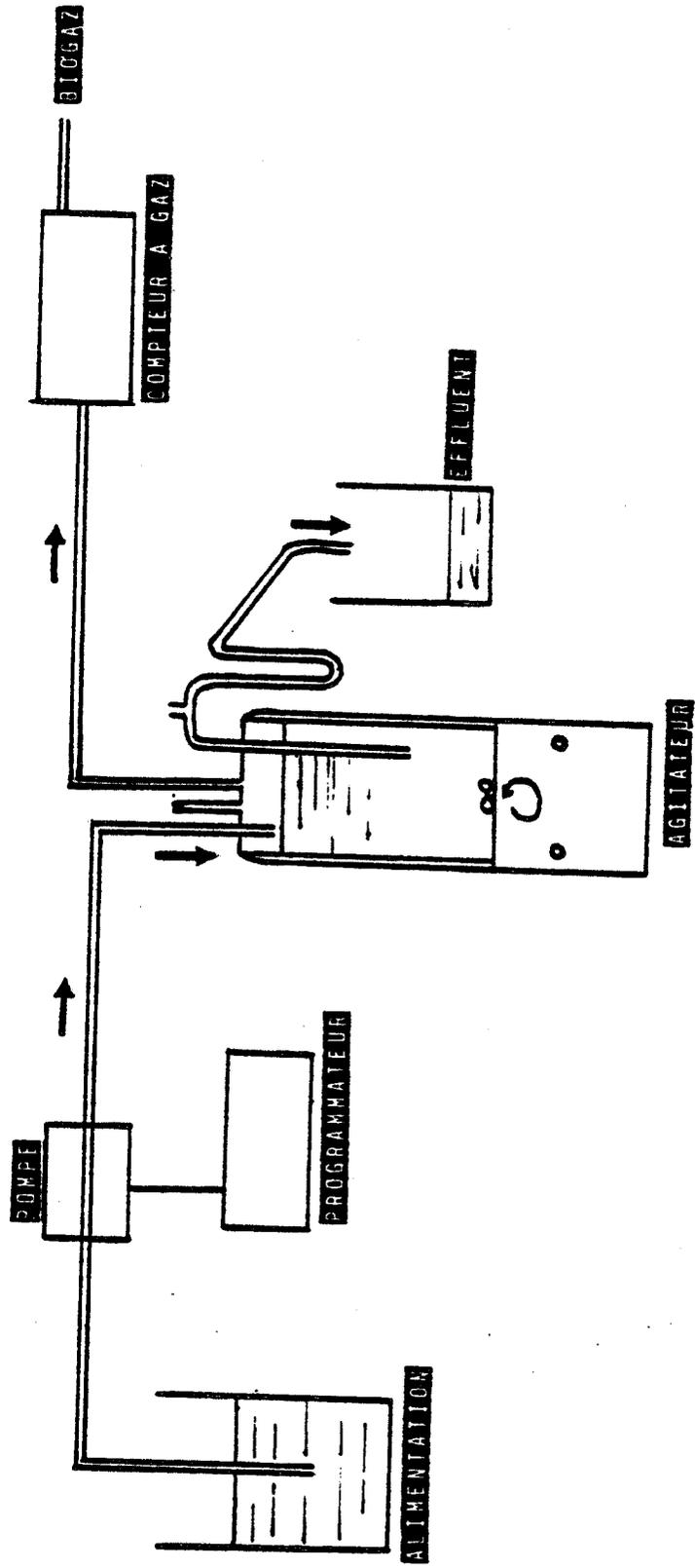
Ce sont des effluents provenant d'une installation d'épuration d'industrie sucrière, adaptés à la dégradation des AGVs. Les caractéristiques physico-chimiques sont :

MES	21,25	g/l	déterminé par filtration
MVES	5,312		(25 %)
NTK	739	mg/l	
NH ₄ -N	151	mg/l	
AGVs résiduels	-		
pH	7,8		

3. Dispositif expérimental

Les quatre digesteurs monoétapes sont de type infiniment mélangé (chémostat) (Fig. 9), leur volume utile est de 1 litre. Ils sont alimentés en continu grâce à une pompe Gilson reliée à un programmeur, le débit est de 76 ml par jour correspondant à une charge volumique de 1,14 g d'acide acétique par litre et par jour. Le temps de séjour hydraulique est de 13 jours, ce qui correspond à un taux de dilution de 0,07 j⁻¹, cette valeur est limite pour dégrader toute la charge. Les productions de gaz des

Fig 9 Schéma d'un pilote de laboratoire



différents réacteurs sont mesurées par un compteur à impulsions. Le tout a été installé dans une chambre thermostatée à 35 °C.

4. Résultats

L'évolution de certains paramètres (MES, MVES, NTK, $\text{NH}_4\text{-N}$) sont présentés sur les Figures 10 a et b et 11.

Pour un temps de séjour hydraulique de 13 jours, la fermentation est stable, le pH se stabilise spontanément près de la neutralité et la concentration en AGV résiduels est négligeable. Le passage à un TSH de 10 jours déstabilise le processus. Jusqu'au 70e jour, la production du biogaz était presque la même dans les quatre réacteurs (Fig. 12) avec des teneurs en méthane et gaz carbonique qui sont très voisines. Le Tableau VIII représente un bilan pendant la phase stationnaire, état estimé atteint après 70 jours de fonctionnement.

D'après le Tableau VIII, on constate que le premier fermenteur qui a commencé à accumuler les AGV est celui dont la concentration en MES est égale à 0,6 g/l. Cela s'est traduit par une diminution de production du biogaz progressive et une accumulation d'acétate de 2,18 g/l ; au 120e jour le pH atteint est de 6.

En ce qui concerne les fermenteurs II et III l'accumulation de l'acétate a commencé quand ces derniers ont atteint la concentration en MES de 0,6 g/l. Le fermenteur n° IV était le dernier dont la méthanogénèse s'est déstabilisée. Par contre, c'est le fermenteur qui a été le plus sensible à une augmentation de charge. La valeur des MES (1,5 g/l) est élevée par rapport à celle qu'on devait obtenir normalement. Cela est dû aux problèmes techniques qui se sont produits et qui ont causé des vidanges du digesteur, l'effluent était remis dans le fermenteur pour avoir un litre d'inoculum permettant de travailler dans les mêmes conditions.

Pendant la période de fonctionnement stable, les rendements en méthane dans les quatre digesteurs étaient les mêmes. Cependant celui de la biomasse diffère d'un réacteur à l'autre, il est le même dans le I et le

Fig 10A Evolution de l'azote ammoniacal dans les quatre chémostats pendant leurs fonctionnement

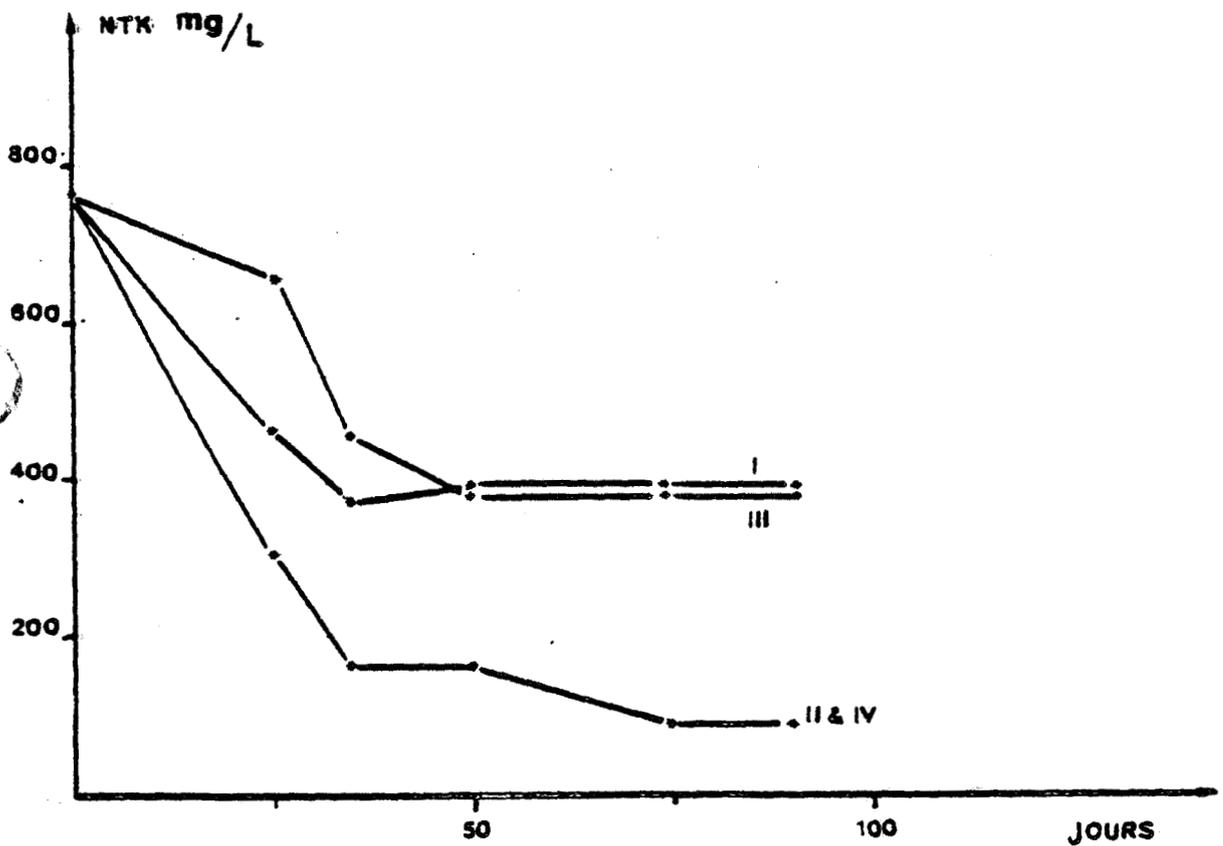
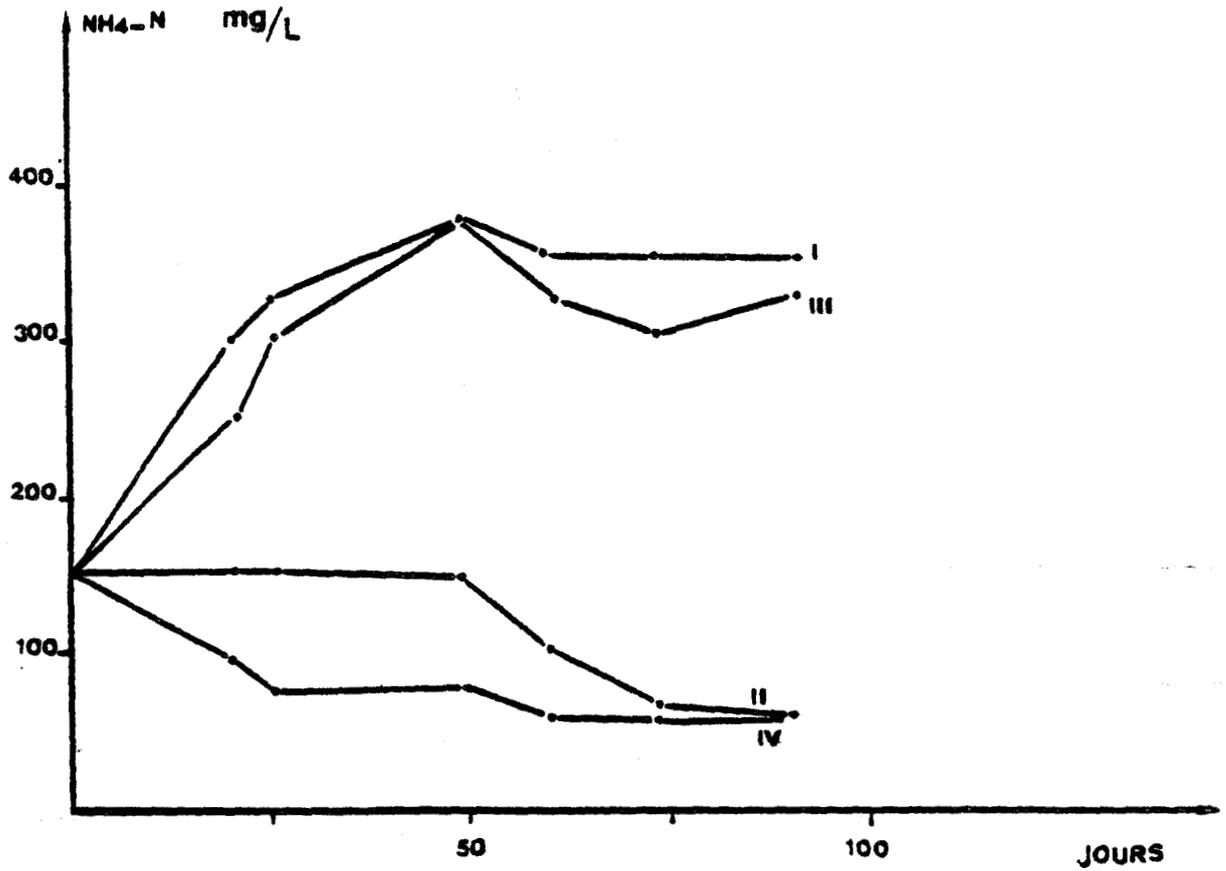


Fig 10B Evolution de l'azote total Kjeldahl dans les quatre chémostats pendant leurs fonctionnement

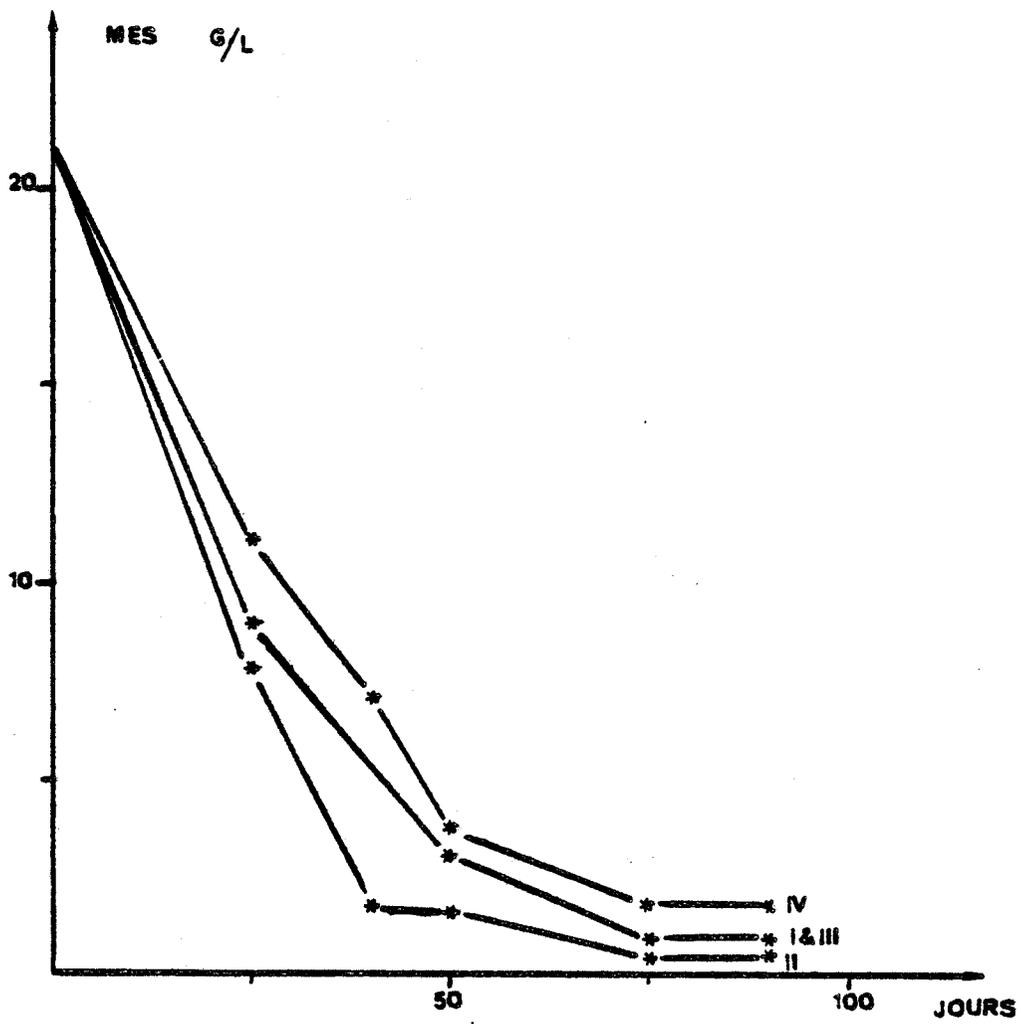


Fig 11 Evolution des matières en suspension dans les quatre chémostats



Tableau VIII. Valeurs des différents paramètres à l'état stationnaire des quatre chémostats.

	(I) 100/5/1	(II) 100/0,7/1	(III) 100/5/0,1	(IV) 100/0,7/0,1
NES (g/l)	0,88	0,6	0,97	1,5
NVES (x)	59	70	54	44
NVES (g/l)	0,52	0,42	0,52	0,66
Prod. gaz (ml/l)	456	456	456	456
% CH ₄ moy.	65 --- 63	60 --- 50	65 --- 63	60 --- 70
PH	7,1	7,1	7,4	7,4
NIX (ng/l)	364	84	350	70
NH ₄ ⁺ -N (ng/l)	322 --- 336	56	308	56
P. total (ng/l)	78	90	25	20
N bact. (ng/l)	42 --- 28	28	42	(14/500ml)
Rendement CH ₄ (ml / g DCO)	0,375	0,375	0,375	0,375
Rend. biomasse (g NVES/ g DCO)	0,0325	0,026	0,0325	(0,04)
Acétate (g/l)	0	0,43	0	0



III, par contre au niveau du réacteur II, il y a une diminution du rendement de 20 %. Concernant celui de réacteur IV, il devrait être égal à celui du II, cette augmentation peut être due à l'apport d'inoculum après les vidanges. Après accumulation d'AGV dans les quatre fermenteurs, on a passé en batch. La vitesse de conversion de l'acide acétique a diminué de moitié ; elle est passée de 1,14 gramme par jour à 0,67 gramme par jour (Fig. 13).

5. Observations microscopiques

Des observations microscopiques ont été faites au cours de l'expérience. Au démarrage, la population était hétérogène, il y avait des sarcines fluorescentes en U.V.. Il s'agit probablement de Methanosarcina mazei ; à côté on observait des filaments très abondants dont la morphologie ressemble à celle de Methanothrix soehngenii.

Au cours du temps, on a assisté à une disparition relative des filaments méthanogènes dans les fermenteurs, le II et IV qui, en fin d'essai, renferment essentiellement des bacilles.

En dépit de ces observations, on peut tirer trois remarques :

* Avec le milieu de culture utilisé, le déséquilibre de la fermentation observée lorsque le temps de séjour hydraulique est inférieur à 13 jours indique clairement que cette valeur est le temps de doublement maximal des méthanogènes utilisatrices d'acétate.

* Pour un écosystème naturel dont la population mixte est constituée essentiellement de Methanothrix, quand la concentration en acide acétique est limitante, le rapport C/N le plus favorable est de 20. Cette valeur permet le maintien et la croissance de cette bactérie. Par contre, les rapports 20 et 140 sont suffisants pour permettre la croissance des sarcines.

* enfin, la proportion du phosphore de 0,1 % par rapport au carbone paraît suffisante pour la croissance des deux bactéries.

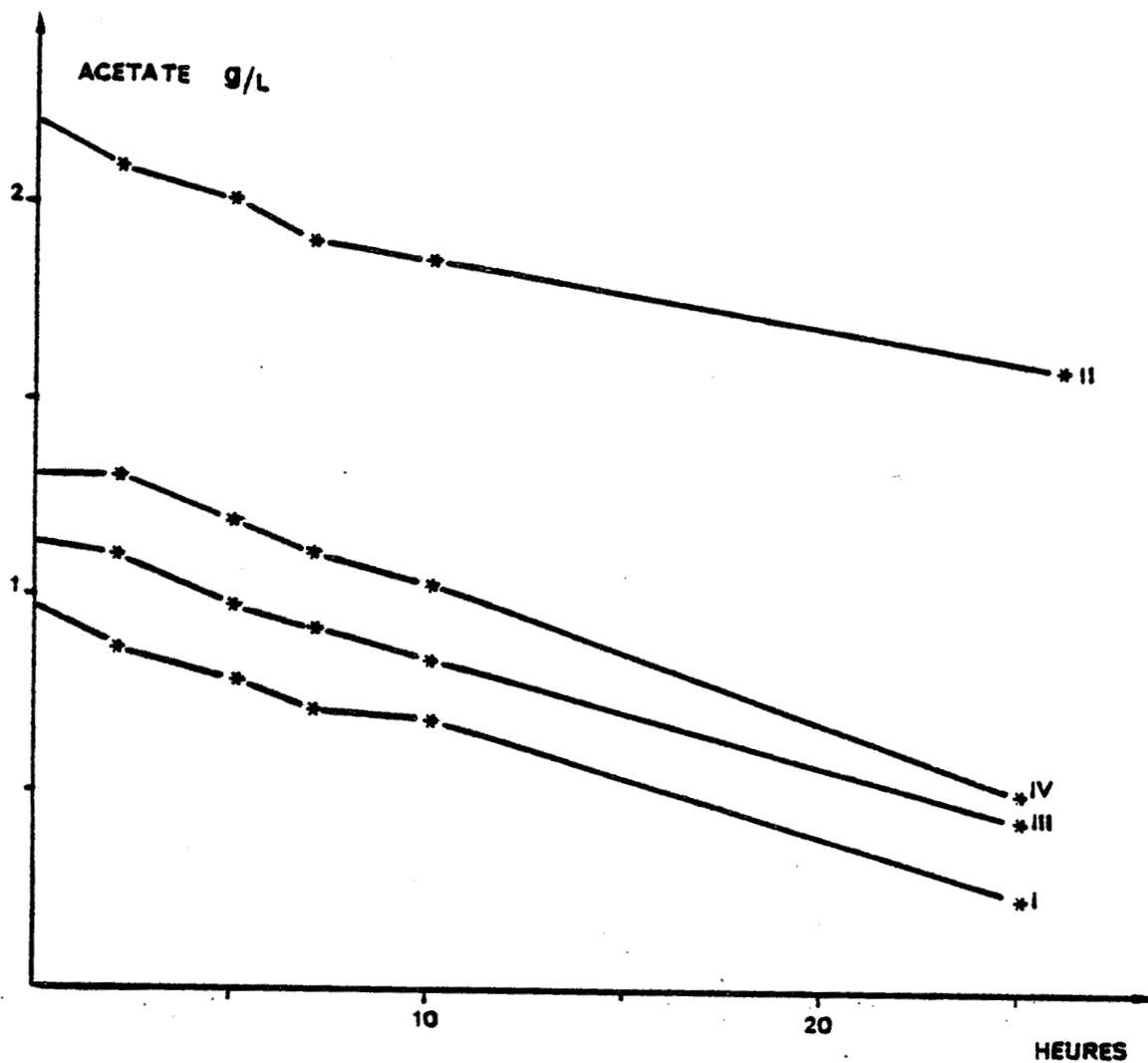


Fig 13 Cinétique de dégradation de l'acide acétique après passage en discontinu dans les quatre chémostats



6. Discussion et conclusion partielle

Les résultats obtenus à partir de la fermentation méthanique d'un mélange d'acides gras volatils, acide acétique, propionique et butyrique, 5 g/l de chaque, ou de l'acide acétique seul 15 g/l, par une population mixte montrent que la stabilité de l'écosystème et du processus dépendent entièrement de la concentration en azote présente dans le milieu. Ainsi pour les différents rapports étudiés (20 et 140), on constate une variation de certains paramètres physico-chimiques et cinétiques.

Parmi les paramètres physico-chimiques, une faible teneur en ammoniacale induit un pouvoir tampon du milieu de fermentation extrêmement réduit et le pH baisse rapidement à la moindre accumulation d'AGV. Ainsi pour des concentration en azote de 354 et 54 mg/l les valeurs respectives du pH final sont 8 et 5. Cette diminution du pH est due à une accumulation d'acides gras volatils d'où un arrêt ou un ralentissement de la méthanogénèse. Par contre, quand la source de carbone était essentiellement de l'acétate de sodium, on assiste à une accumulation de ce dernier, mais le pH n'a pas fluctué (7,1-7,4) et la méthanogénèse avait toujours lieu avec presque le même rendement en biogaz. Ce phénomène peut être expliqué par la dynamique de digestion anaérobie de l'acide acétique qui dépend de son équilibre entre la forme ionisée et non ionisée. Dans le milieu, quand l'équilibre est déplacé vers la forme non ionisée, il y a accumulation d'AGVs et chute du pH (MOLETTA et al., 1986).

Parmi les paramètres cinétiques, ceux qui ont varié d'une façon sensible sont la production de biomasse et l'incorporation d'azote dans les bactéries. Cela est vrai à partir d'un mélange d'AGV ou d'acétate seul. Les rendements de biomasse passent de 0,04 à 0,02 g MVES/g DCO pour les rapports respectifs 20 et 140.

La quantité d'azote incorporée dans la biomasse bactérienne diminue elle aussi de moitié lors des différents essais. Cependant les valeurs de l'azote bactérien quand la source de carbone est un mélange d'AGVs sont plus élevées que celles trouvées lorsque le substrat carboné est uniquement d'acide acétique. Elles sont respectivement de 60 à 42 mg/l pour le rapport

20 et de 23 à 28 pour le rapport 140. Cette différence s'explique par la présence de bactéries acétogènes et méthanogènes hydrogénophiles qui sont présentes quand on méthanise un mélange d'AGV et absentes lorsque le substrat est de l'acide acétique seul.

En plus de ces différences, s'ajoute la dynamique des populations qui semble régie par l'apport ou la suppression de l'azote. En ce qui concerne les méthanogènes acétoclastes, les analyses microscopiques de l'inoculum mettent en évidence deux espèces bactériennes, l'une ayant une forme filamenteuse, l'autre une sarcine. D'après les expériences, la prédominance en fin d'essai de l'une ou de l'autre, dépend de la concentration en azote. Ainsi avec le rapport 20 on observe les deux espèces avec une prédominance des formes filamenteuses. Par contre, avec le rapport 140, ce sont les sarcines qui se développent préférentiellement et les formes filamenteuses disparaissent progressivement.

Cependant, au cours des phases stationnaires, ni le nombre des bactéries acétoclastes par ml, ni le rendement en méthane n'ont été affecté par les rapports C/N étudiés.

En ce qui concerne l'effet du phosphore, deux concentrations ont été étudiées, 1 et 0,1 % par rapport au carbone. En comparant les croissances obtenues dans les deux chémostats (I et III) on constate que les deux concentrations ne donnent pas de résultats significativement différents. La proportion de 0,1 % du phosphore par rapport au carbone est suffisante pour satisfaire les besoins nutritionnels des bactéries lors de la méthanisation de l'acide acétique. Autrement dit, les deux bactéries acétoclastes concernées ne sont pas exigeantes vis-à-vis du phosphore, ou bien elles disposent de réserves qu'elles utilisent quand elles sont cultivées avec un milieu limitant en phosphore.

En conclusion, la vitesse de dégradation intrinsèque de chaque substrat est en fonction de sa nature et de sa composition chimique. Parmi les éléments nutritifs indispensables, l'azote constitue un élément essentiel pour le maintien des bactéries et sous sa forme ammoniacale contribue au pouvoir tampon du milieu qu'il faut contrôler. Cependant les

besoins en azote varient selon la concentration de la matière organique volatile, plus celle-ci est élevée, plus l'apport en azote doit être important.

Selon le mode de conduite du réacteur de méthanisation, on observe un équilibre différent entre les populations méthanogènes acétoclastes. Ainsi lorsque l'on cherche à maximiser le rendement de dégradation du substrat, cela nécessite une élimination aussi complète que possible de l'acétate dans le milieu et cela induit le développement du microorganisme qui possède la meilleure affinité pour ce substrat (Methanothrix). Ce sont les formes filamenteuses qui doivent être prédominantes ; nos résultats indiquent que des rapports C/N trop élevés peuvent induire un effet négatif sur la croissance de ce microorganisme.

Par contre, si l'on cherche la productivité spécifique des réacteurs, il est indispensable de maintenir une quantité élevée d'acétate résiduel. Dans ce cas, ces derniers assurent leur rôle même dans des milieux où le rapport C/N est élevé, tant que l'on maintient le pH aux alentours de la neutralité.

III. INFLUENCE DE QUELQUES EFFECTEURS SUR L'ACTIVITE D'UNE POPULATION MIXTE ACETOCLASTE

A partir de la population mixte acétoclaste enrichie, obtenue après les essais de l'influence du rapport C/N/P, des essais en discontinu ont été faits pour étudier l'influence d'autres substances antibiotiques, sulfate, extrait de levure. Nous nous sommes intéressés à l'influence de ces paramètres sur la production du biogaz, le taux de croissance et le rendement de la biomasse bactérienne. Deux séries d'essais ont été réalisés avec des rapports C/N de 20 et de 140.

1. protocole expérimental

Les essais ont été effectués dans des flacons de 500 ml contenant 100 ml du milieu BCYT. Ce dernier a subi les modifications indiquées plus haut pour avoir les rapports C/N désirés.

Les milieux ont été distribués sous N_2/CO_2 (85/15), tamponés par l'HEPES 80 mM, après autoclavage, ils ont été réduits avec $Na_2 S$ (2% v/v) et inoculés avec 5 % v/v par la population acétoclaste.

La source de carbone ajoutée dans les différents milieux était l'acétate de sodium à la concentration finale de 80 mM. Les concentrations en azote des différents milieux sont 16,8 ; 7 et 1 mM de $NH_4 Cl$.

2. Résultats

Pendant quinze jours de suivi, les bilans des différents essais ont été faits à partir d'analyses du biogaz. La croissance bactérienne a été estimée à partir des courbes de production de méthane en supposant une activité méthanogène proportionnelle à la croissance bactérienne. Le tracé des courbes en coordonnées semi-logarithmiques donne une représentation linéaire dont la pente est utilisée pour calculer les taux de croissance.

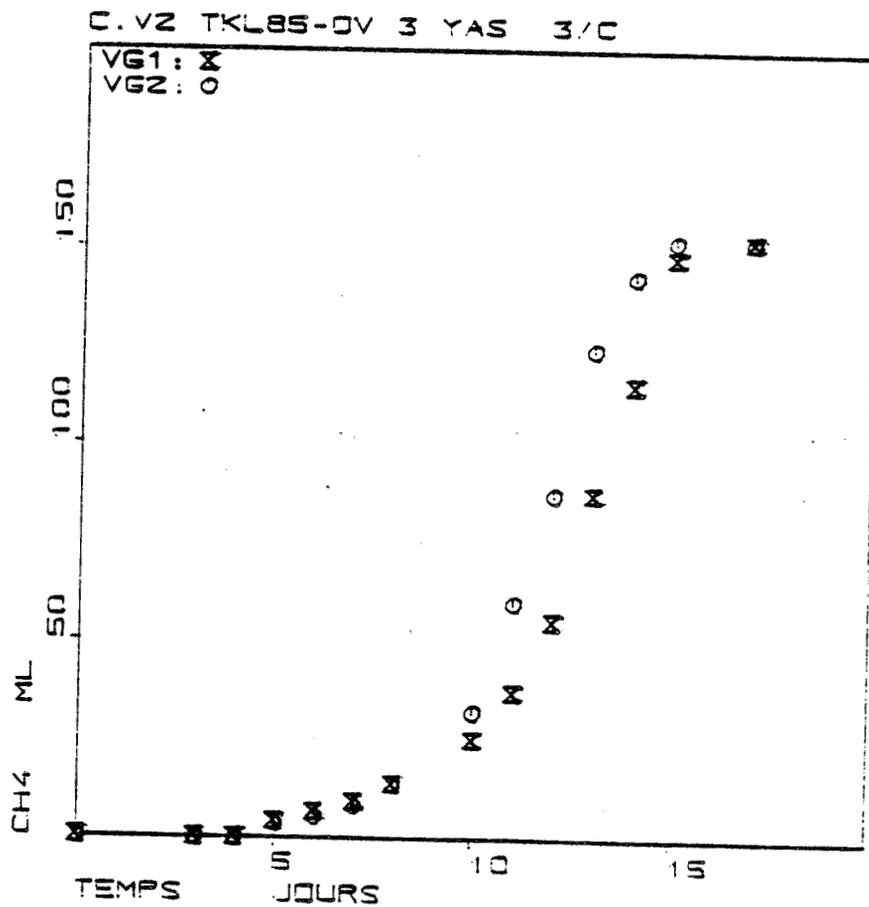
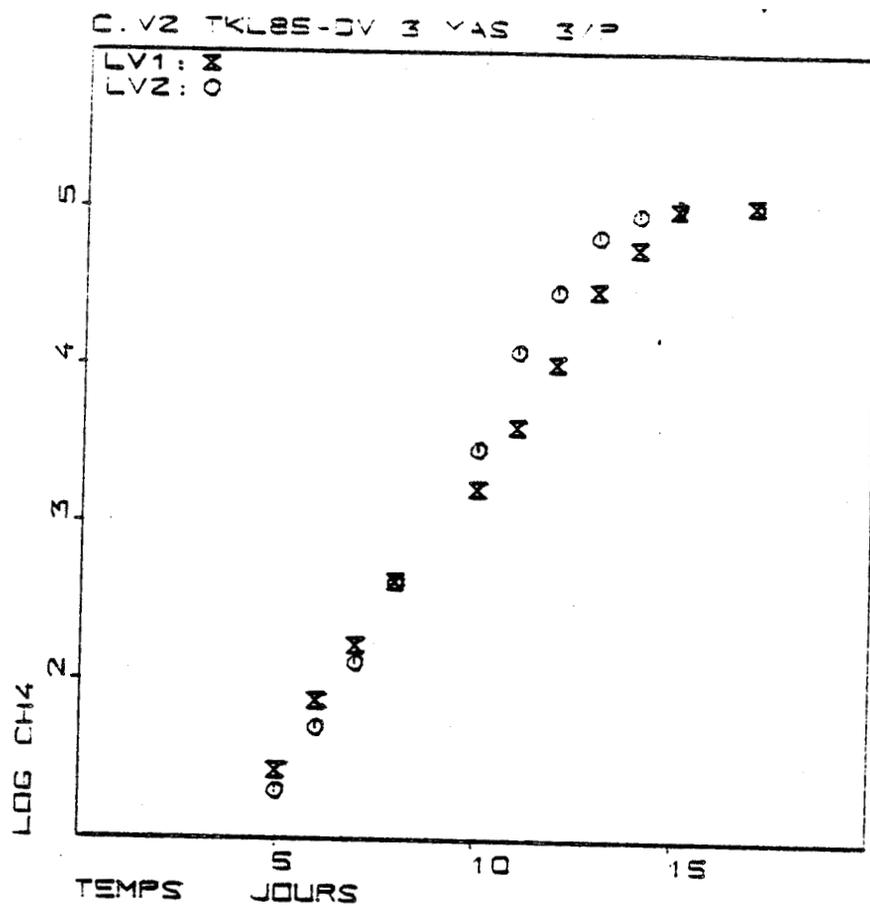


Fig 14 Méthanisation en batch avec un rapport C/N=6,6(BCYT) plus anti-biotique(200mg/l) plus sulfate(5mM de sulfate de sodium)

2.1. Effet du sulfate (Tableau IX et Figure 14)

L'apport de 5 mM de sulfate sous forme de $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ semble n'avoir aucun effet sur la production du méthane ni sur le rendement de production de la biomasse. Par contre, on remarque qu'il y a une légère augmentation du temps de doublement (4 heures, soit 11 %). Cette valeur n'est probablement pas significative car elle est du même ordre de grandeur que la dispersion sur la mesure.

2.2. Effet de la vancomycine (Figure 15)

L'ajout de 200 mg/l de vancomycine n'a pas influencé le taux de croissance ni le rendement de production de biomasse. Cependant, si on compare les deux courbes de production de méthane sur BCYT additionné ou dépourvu d'antibiotique, on constate que le démarrage de la méthanogénèse est plus rapide sur le dernier milieu (3 jours contre 5 jours). Cette différence peut être due à l'influence de la taille de l'inoculum, car il est difficile de prélever de façon reproductible à la seringue des populations bactériennes qui ont une tendance naturelle à la formation d'agrégats.

2.3. Effet de l'extrait de levure (Figure 16)

L'apport de 0,1 % d'extrait de levure stimule la production de méthane. Cette stimulation de l'activité bactérienne est due aux facteurs de croissance tels que : acides aminés, vitamines, acides gras ramifiés..., contenus dans l'extrait de levure (VAN DEN BERG et al., 1977).

3. Analyses microscopiques (Figures 17, a et b)

L'analyse microscopique de l'inoculum révélait qu'il y avait deux espèces de bactéries dominantes qui sont des coques dispersés et des batonnets identifiés de façon présomptive à Methanobacterium. On retrouve également d'autres types morphologiques non fluorescents. En fin d'essai, on peut voir dans tous les flacons des sarcines groupées en amas qui fluorescent en U.V. et visibles à l'oeil nu qui sont morphologiquement

Tableau IX. Valeurs de quelques paramètres cinétiques des différents essais en batch.

Essais	μ_1 J ⁻¹	μ_2 J ⁻¹	μ J ⁻¹	ID CH ₄ J	Y g NVEB/ g carbone
BCYT	0,46	0,53	0,495	1,4	0,151
BCYT + anti bio	0,46	0,43	0,445	1,55	0,153
BCYT + SO ₂ + AB	0,35	0,45	0,4	1,73	0,158
C/N = 20 + AB + YT	0,47	0,44	0,455	0,152	0,149
C/N = 20 + AB	0,419	0,42	0,419	1,65	0,145
C/N 140 + AB	0,36	0,35	0,355	1,95	0,139



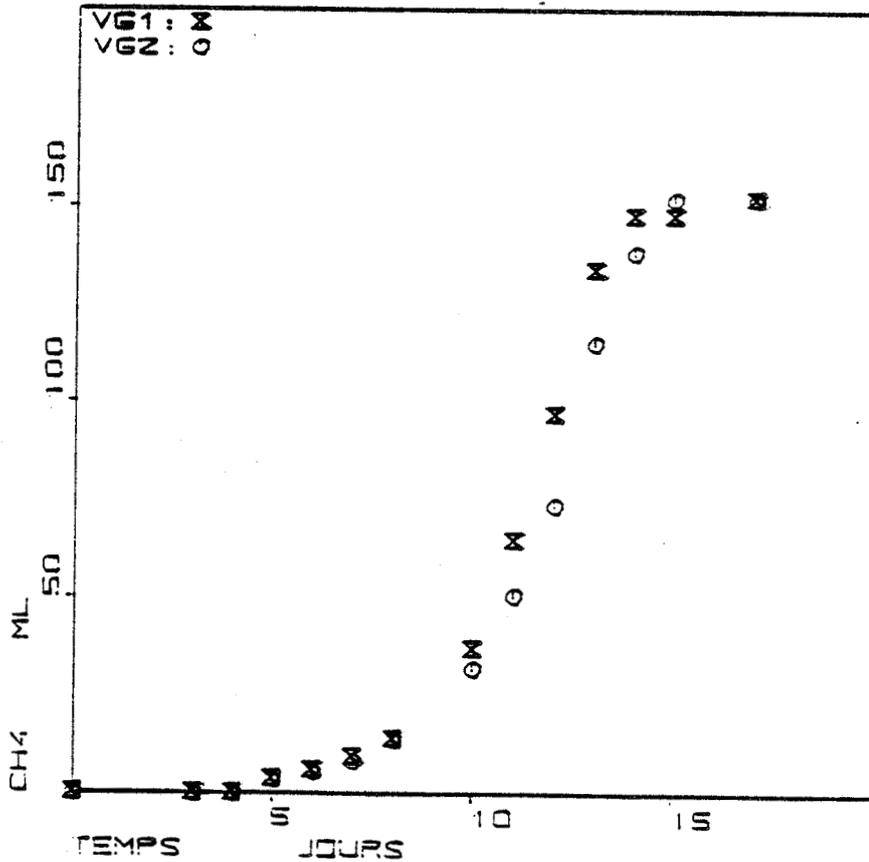
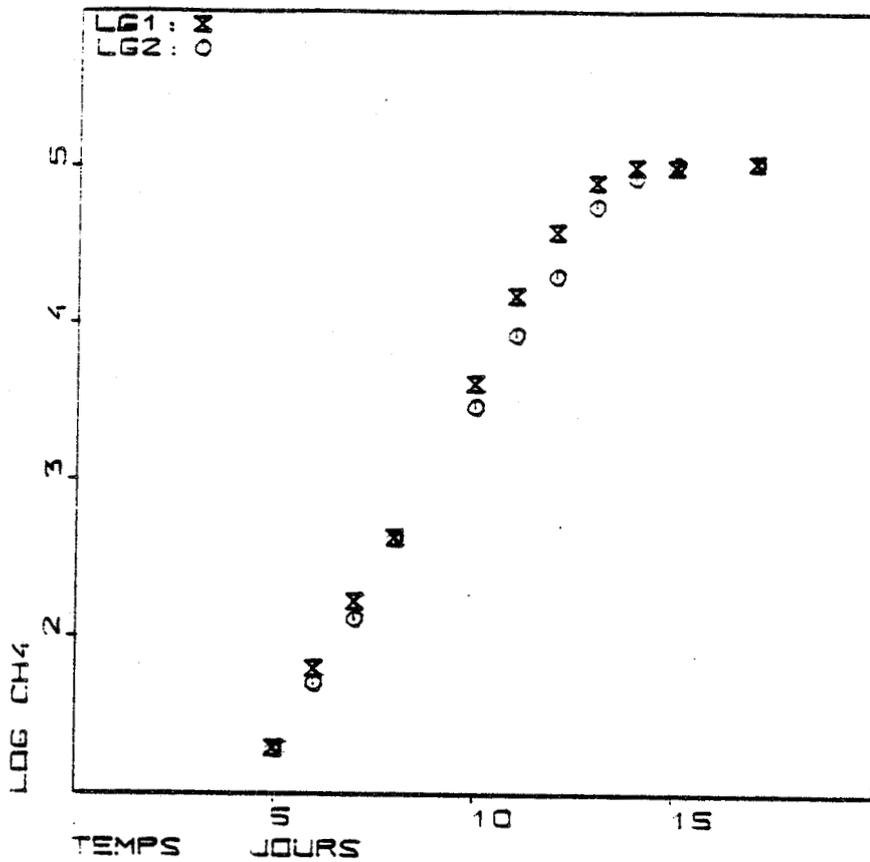


Fig 15 Méthanisation en batch avec un rapport C/N=6,6(BCYT) plus anti-biotique(200mg/l)

identiques à Methanococcus mazei, souche Mc₃ (TOUZEL et al., 1983).

L'observation en fin de culture du contenu des flacons relatifs aux essais contenant de l'antibiotique, montre qu'il y a peu de contaminants. Statistiquement on observe moins d'une bactérie par champ, c'est-à-dire moins de 10⁶ contaminants/ml.

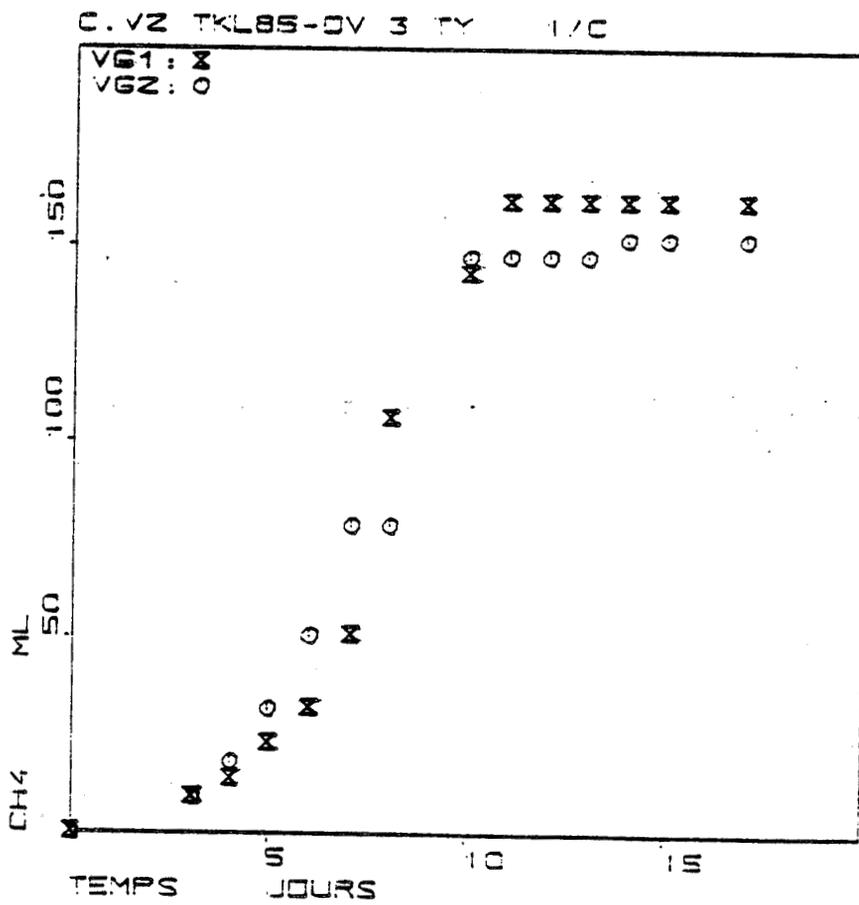
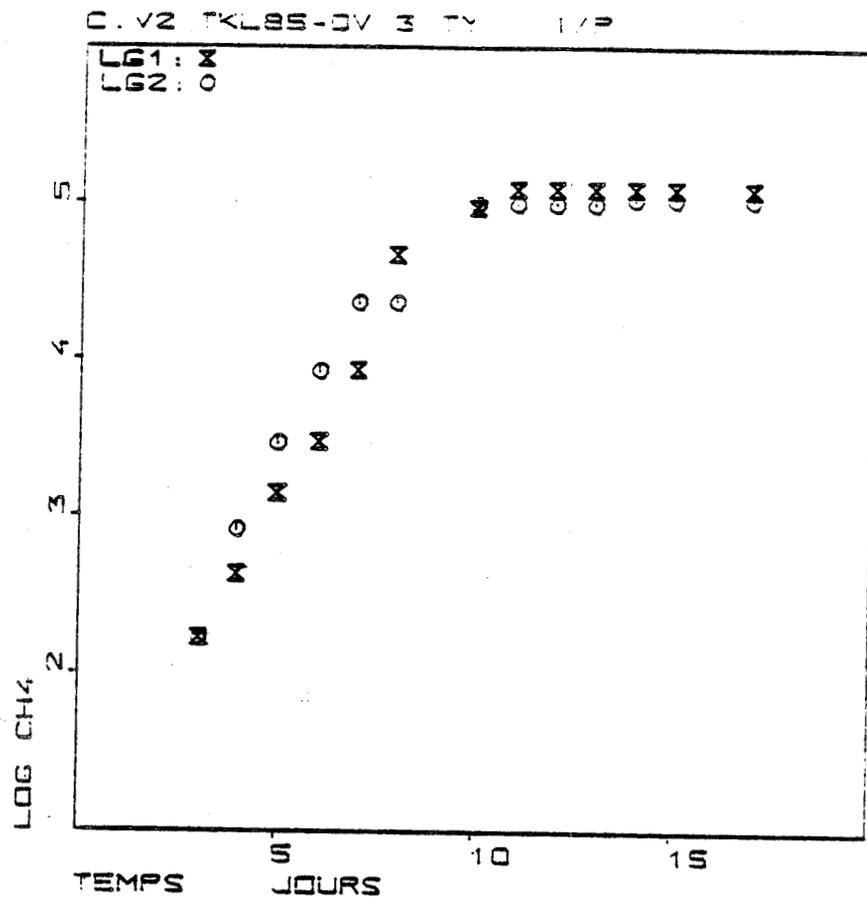


Fig 16 Méthanisation en batch avec un rapport C/N=6,6(BCYT)

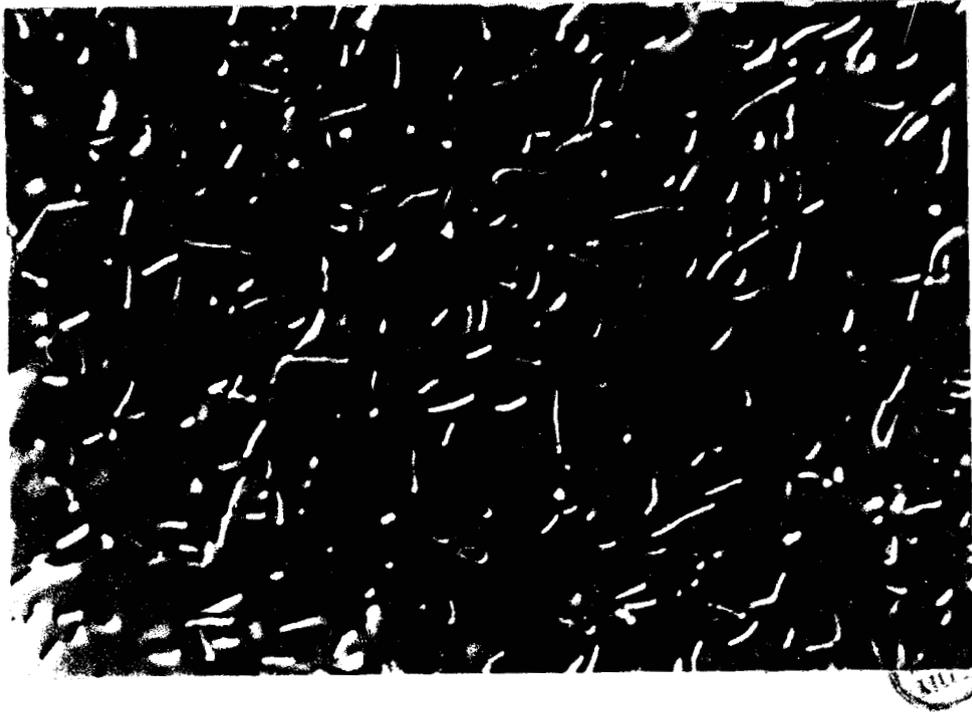


Fig 17(a) Morphologie de l'inoculum

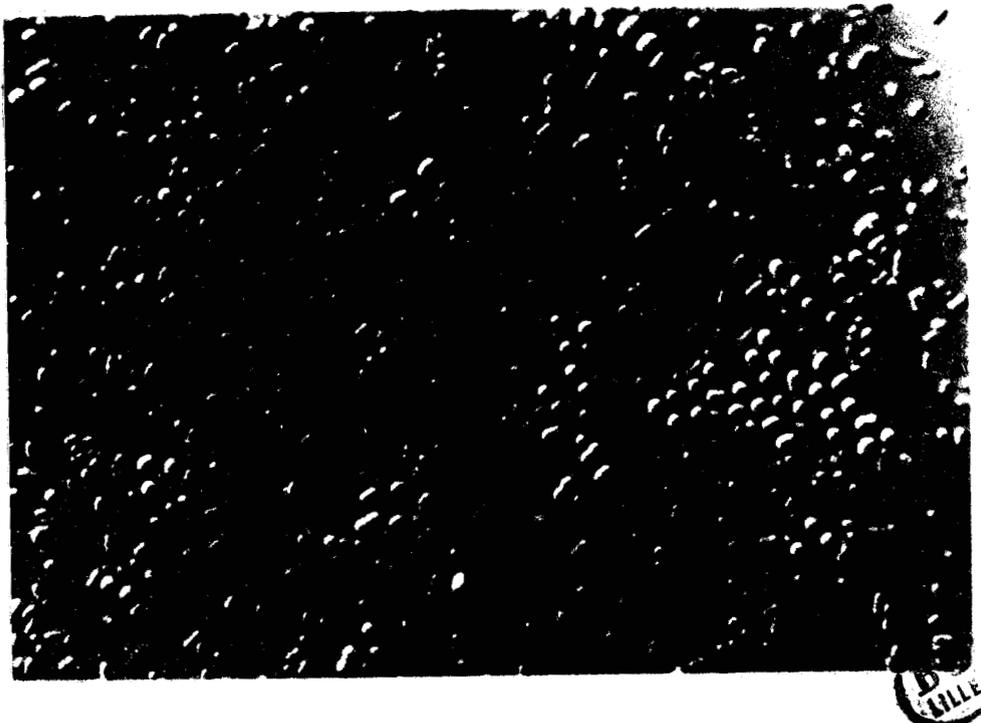


Fig 17(b) Morphologie de la population obtenue après méthanisation en batch

IV. INFLUENCE DE L'AZOTE SUR UNE POPULATION MIXTE DEGRADATRICE DE FORMATE (hydrogénophile) EN FED-BATCH

1. Enrichissement mésophile en continu sur formate à 37 °C

La concentration en formate du milieu d'alimentation est fixée à 10 g/l. Un fermenteur dont le pH est régulé à 7 contient 450 ml de boues de digesteur adaptées à la dégradation des acides gras volatils. Il est alimenté avec un temps de séjour hydraulique de 13 jours. Au départ, les espèces dominantes sont des sarcines et des filaments, il s'agit de M. mazei (Mc₃) et M. soehngenii. Après une période de trois mois d'adaptation de la population bactérienne avec une alimentation continue, le réacteur a conduit en semi-continu (Fed-batch) le transfert initial de l'inoculum qui a été réalisé dans des conditions anaérobies. La concentration en azote est le seul paramètre qui a été modifié en cours d'essai.

1.2. Résultats

Les observations microscopiques pendant toute la période de l'enrichissement ont révélé une disparition progressive de toutes les bactéries méthanogènes acétoclastes présentes dans l'inoculum du départ. Ces dernières ont été remplacées par deux autres bactéries méthanogènes qui fluorescent en U.V. L'une, filamenteuse, ressemble morphologiquement à Methanobacterium formicicum, espèce qui ne pousse pas sur acétate. L'autre se présente sous forme de batonnet et ressemble à Methanobrivibacter arboriphilicus. Les figures 18 (a et b) montrent la morphologie des deux bactéries. A côté de ces dernières, on observe aussi des coques très mobiles. Ces organismes décrits ont été maintenus pendant toute la période où l'alimentation contenait 345 mg par litre d'azote ammoniacal (54 mg/l sous forme (NH₄)₂ So₄ et 291 mg/l sous forme d'NH₄ Cl).

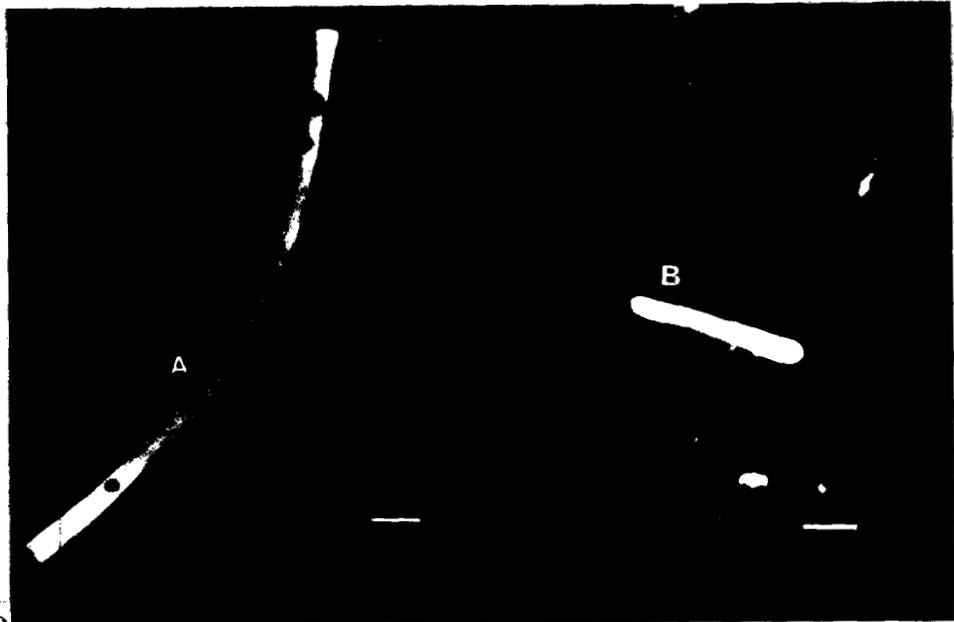


Fig 18(a et b) Morphologie des deux bactéries hydrogénéophiles obtenues après 3 mois d'adaptation sur formate

A/Methanobacterium formicicum

B/Methanobrivaracter arboriphilicus

A l'état stationnaire, les valeurs de quelques paramètres figurent dans le Tableau suivant :

MES	0,8	g/l
MVES	62 %	(0,434 g/l)
NTK	385	mg/l
NH ₄ -N	357	mg/l
Rdt de biomasse	0,14	g MVES/g DCO
Rdt d'azote bactérien	8,05	mg d'N bact/g DCO
Formate résiduel	≈	0
Dénombrement à l'acridine orange	5 10 ⁸	bact/ml

Lors du deuxième essai, l'alimentation ne contenait que 54 mg/l d'NH₄-N sous forme de (NH₄)₂ SO₄. Après 20 jours on a assisté à un arrêt total de la production du méthane et une disparition de toutes les bactéries fluorescentes en U.V. qui ont été remplacées par des microorganismes qui ont des formes très différentes (coque, batonnet, spirale). Il s'agit probablement des sulfato-réductrices. Peu de paramètres ont changé lors de cet essai, si ce n'est que les MES qui ont passé de 0,8 à 0,6 g/l et le nombre de bactéries par ml qui est passé de 0,5 10⁸ à 2,2 10⁹.

La levée de l'inhibition de la production de méthane et le retour à l'état initial sont possibles, car après une réalimentation avec un milieu contenant 345 mg/l d'NH₄-N, on a retrouvé dans le réacteur les mêmes espèces utilisatrices de formate et l'on a restauré la production de méthane.

On constate que la production de cellules et l'incorporation d'azote sont quatre fois plus élevée que celles des acétoclastes (FROSTEL, 1985; MOSEY, 1983 ; HENZE et al., 1983). Cela indique que les hydrogénéophiles ont plus besoin d'azote que les acétoclastes pour leur croissance. Dans les conditions de nos essais (10 g/l de formate), 345 mg/l d'azote ammoniacal sont amplement suffisants. Cependant, d'autres espèces moins exigeantes en azote se sont maintenues dans le réacteur alimenté avec un milieu renfermant 54 mg/l d'ammonium. Par contre les méthanogènes sont incapables de se développer significativement dans de telles conditions.

Une identification présomptive des microorganismes obtenus en présence de très faibles quantités d'azote permet de penser qu'il s'agit des sulfato-réductrices (TOUZEL et SAMAIN -Communications personnelles). Par ailleurs, des études menées par HOBSON et al. (1975) sur l'influence de l'azote ammoniacal sur l'activité de Methanobacterium formicicum ont montré qu'à pH égal à 7,1 et pour une concentration de 2471 mg/l d'azote ammoniacal, l'inhibition de production du méthane par cette souche est partielle et qu'elle est totale à partir de 3294 mg/l.

En conclusion, il est souhaitable, même obligatoire que la concentration en azote soit supérieure ou égale à 350 mg/l d'azote ammoniacal pour maintenir dans les méthaniseurs des bactéries méthanogènes hydrogénophiles. De telles conditions sont également favorables à la croissance de Methanothrix qui est l'utilisatrice d'acétate dont on doit privilégier le développement.

V. INFLUENCE DE L'AZOTE SUR LA CROISSANCE DE DEUX CULTURES PURES :
Methanothrix soehngenii ET Methanosarcina mazei EN BATCH

1. Influence du rapport C/N sur la croissance de Methanothrix
soehngenii

Quatre essais ont été étudiés (C/N = 140 ; C/N = 20 ; C/N = 20 + YE et Trypticase ; BCYT). Le milieu de référence (BCYT) a un rapport C/N de 6,6 et il est utilisé pour la croissance et le maintien en culture pure des méthanogènes.

Les milieux préparés ont été réduits avec Na₂ S (2 % v/v)ensemencés par 2 % v/v d'une culture pure de M. soehngenii qui a subi deux transferts sur des milieux à très faible teneur en azote (7 mM). Les incubations sont réalisées à 37 °C. et le bilan du suivi a été réalisé à partir de l'analyse du gaz produit.

1.1. Résultats [Tableau X, Figure 19 (a et b)]

Les meilleures croissances ont été obtenues sur BCYT en ce qui concerne la croissance et la production du méthane par la croissance et la production du méthane par Methanothrix, la concentration en azote dans cet essai est de 16,8 mM. Par ailleurs, la production du méthane diminue avec la concentration en azote. Pour une concentration de 7 mM même en présence d'extrait de levure et de trypticase, la production en méthane diminue de 40 % par rapport à celle obtenue sur le milieu de référence. En présence de 1 mM de chlorure d'ammonium aucune production de méthane n'a été observée.

Si on compare les deux essais réalisés avec des rapports C/N de 20, l'apport d'extrait de levure et de trypticase ont un effet positif sur la production du méthane.

D'après le Tableau X, on constate bien que la gamme des concentrations en azote testée n'affecte pas du tout le temps de doublement minimum de cette souche, calculé à partir des différentes productions du méthane. Par contre, la vitesse moyenne de conversion de l'acide acétique en méthane

Tableau X. Culture en discontinu de Methanothrix soehngenii. Temps de doublement minimum et production finale de méthane.

C/N	TD (CH ₄) (J)	CH ₄ produit sur 35 jours (ml)
6,6 (BCYT)	3,1	107
20	3,3	21,6
20 (+ YE + I)	3,4	77,7
140	Pas de croissance	-

Tableau XI. Culture en discontinu de Methanosarcina mazei. Temps de doublement minimum et production finale de méthane.

C/N	TD (J)	CH ₄ produit sur 15 jours (ml)
BCYT	1,57	113
20 (+ YE + I)	1,47	104
20	1,98	75
140	1,68	52



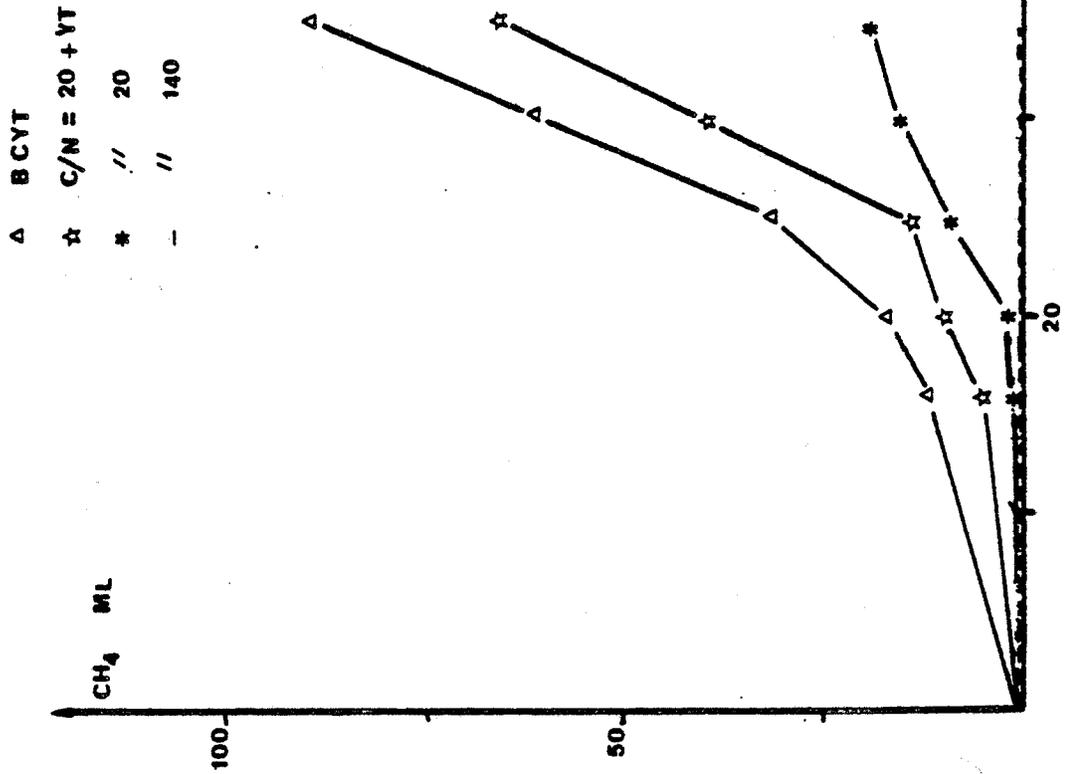


Fig 19 (a) Production du méthane par M. soehngeli en batch dans différents milieux

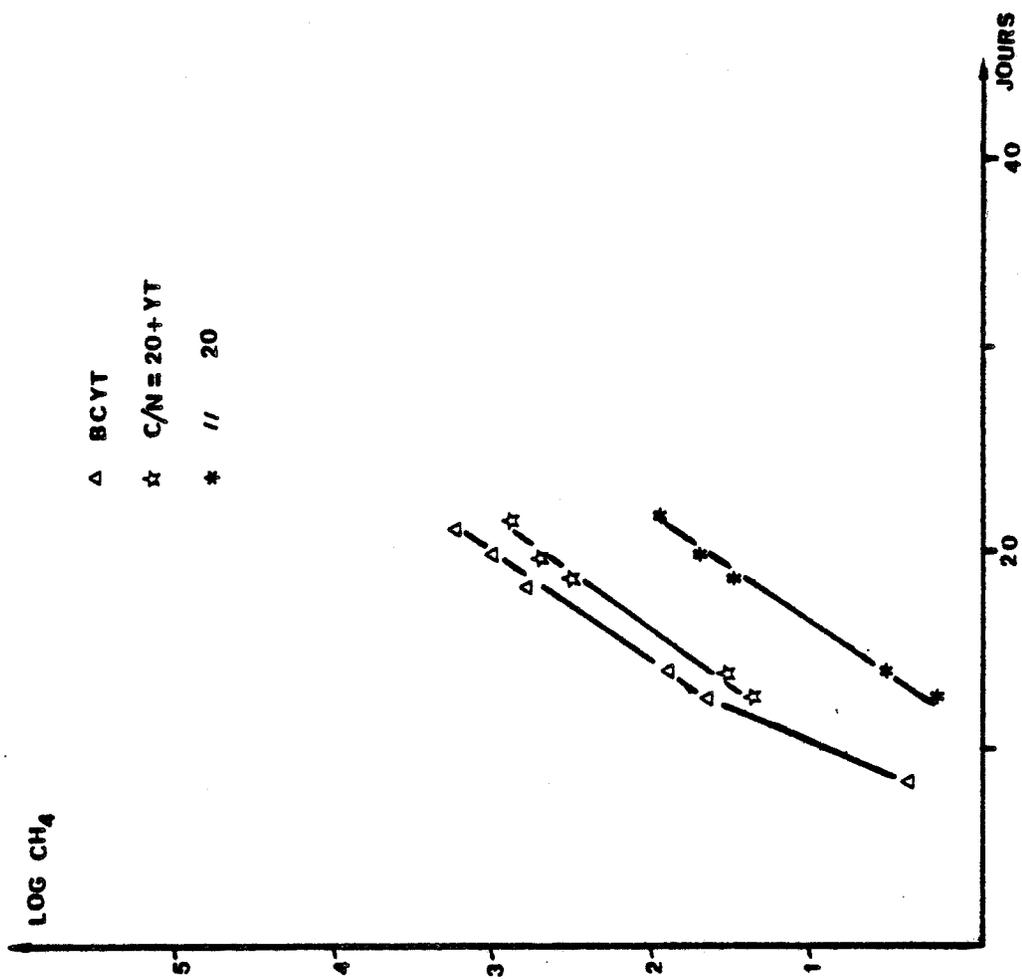


Fig 19(b) Tracé semi logarithmique de la production du méthane

et celle de production du méthane sont très influencées par la concentration en azote présente dans le milieu. La Figure 19 (a) montre bien l'effet de l'azote sur la cinétique de production du méthane.

Ainsi à partir de ces essais, on peut retenir que l'azote a une grande importance pour le maintien de la croissance et l'activité de Methanothrix soehngenii, surtout que celle-ci est la bactérie acétoclaste majeure que l'on souhaite maintenir dans la plupart des digesteurs industriels traitant des effluents d'agro-alimentaire et des déchets urbains. Par conséquent, le contrôle du rapport C/N lors de la digestion anaérobie d'un substrat soluble ou solide est nécessaire pour un bon déroulement du processus d'épuration.

Enfin, les meilleurs croissances ont été observées en présence de 16,8 mM d'ammonium. Cette valeur qui est presque la même que celle rapportée par SPOTT et al. (1986) ou PATTEL (1984). Ces auteurs soulignent qu'une activité et une croissance maximale nécessite de l'ordre de 20 mM d' NH_4Cl . En plus, ils indiquent également que pour une croissance et une production de méthane maximales en discontinu, l'apport de l'extrait de levure a un effet très positif.

2. Influence du rapport C/N sur la croissance de Méthanosarcina mazei souche Mc.

Le protocole expérimental et les rapports C/N sont les mêmes que ceux qui ont servi lors des essais avec Methanothrix soehngenii.

2.1. Résultats [Tableau XI - Fig. 20 (a et b)]

On constate une augmentation de la production de méthane au fur et à mesure que la concentration en azote dans le milieu augmente. Les temps de doublement calculés à partir de la phase exponentielle de la croissance dans les différents milieux sont moins parlant que la vitesse moyenne de production du méthane et de conversion de l'acide acétique (Figure 21). Cela est dû à la difficulté de prélever avec une seringue des granules dont la taille est voisine du mm.

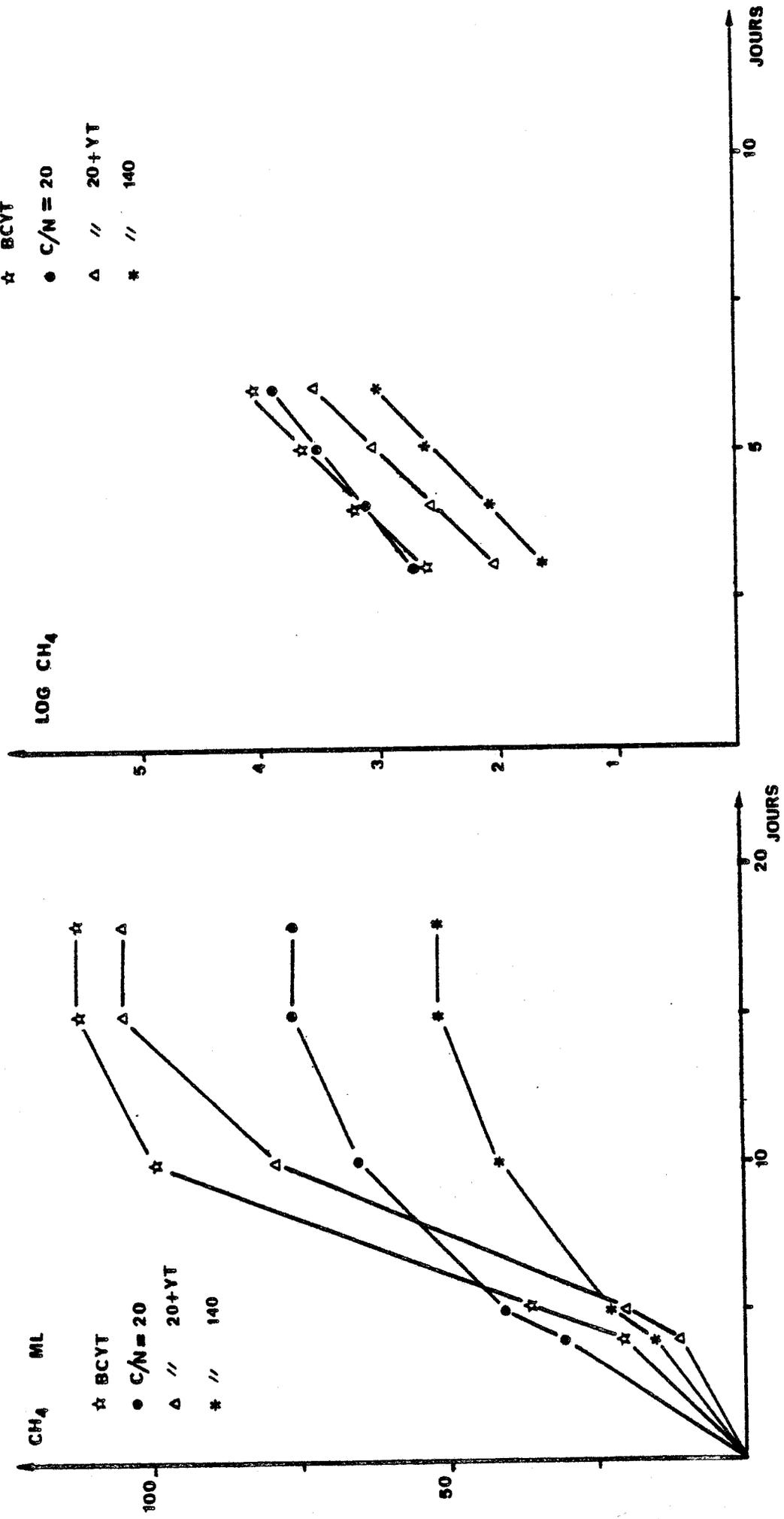


Fig. 20(a) Production du méthane par M. mazel souche MC3 en batch dans différent milieu

Fig. 20(b) Tracé semi logarithmique de la production du méthane



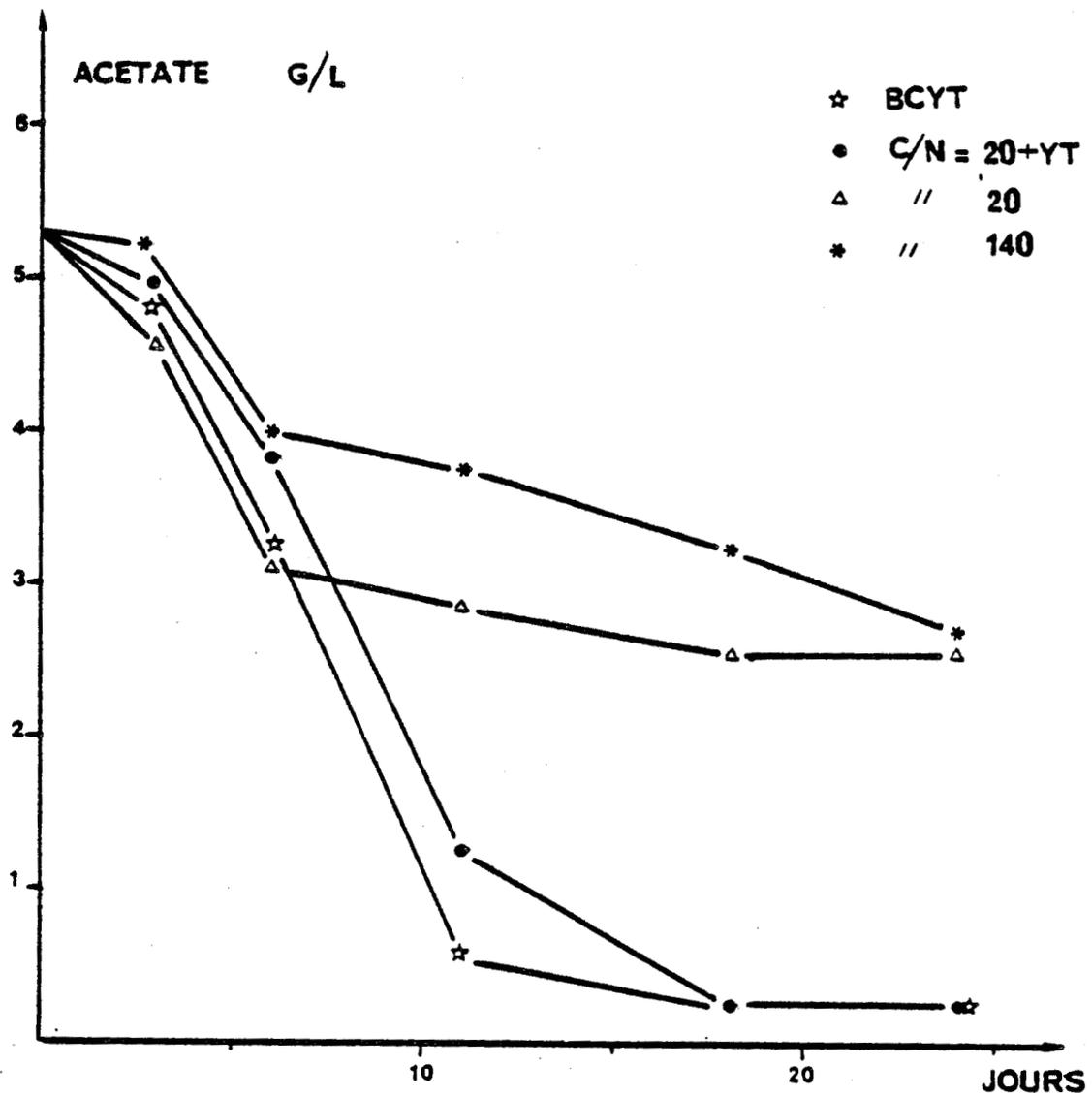


Fig 21 Cinétique de dégradation de l'acide acétique par M.mazei en fonction des différent rapport carbone/azote



La présence de l'extrait de levure et de la trypticase (à 0,5 % w/v) de chaque dans le milieu stimulent la croissance et la production du méthane. La vitesse de conversion de l'acide acétique en gramme par litre et par jour diminue en fonction des concentrations en azote étudiées. A partir de ces constatations, il est clair que l'apport d'azote dans le milieu de culture ainsi que l'extrait de levure sont bénéfiques pour la physiologie et la croissance des acétoclastes tels que M. mazei, souche Mc₃ et contrairement à M. soehngenii, il paraît que M. mazei est moins exigeante vis-à-vis de l'azote et que la concentration de 7 mM est suffisante pour son activité maximale.

3. discussion et conclusion partielle

En batch, les résultats des différents essais obtenus à partir d'une population quasiment acétoclaste et des cultures pures de Methanosarcina mazei, souche Mc₃ et Methanothrix soehngenii, souche FE, confirment bien les résultats obtenus lors des essais en procédé monoétape infiniment mélangé. En plus, les études nous ont apporté d'autres renseignements sur l'évolution de certains paramètres en fonction de la concentration en azote.

En ce qui concerne la population mixte acétoclaste, sa culture en discontinu, quelle que soit la concentration en azote, sélectionne préférentiellement des sarcines, les taux de croissance calculés à partir de la production de méthane le confirment. Cette sélection s'explique par les affinités différentes de ces deux organismes pour l'acétate.

Cependant l'azote influence bien le taux de croissance, la production de méthane, la vitesse de conversion de l'acétate et le rendement de biomasse, que ça soit en culture mixte ou en culture pure de M. mazei. L'apport des facteurs de croissance par l'extrait de levure stimule la production du méthane par cette souche. La culture pure de M. soehngenii en discontinu révèle que le taux de croissance maximal de cette dernière n'est pas influencé par les concentrations en azote, tout au moins dans la gamme étudiée.

Par contre, la vitesse moyenne de production de méthane, c'est-à-dire la quantité de substrat dégradée pendant la durée de l'incubation augmente avec la concentration en azote. Ceci est dû probablement à un meilleur pouvoir tampon du milieu en présence de concentrations élevées en NH_4^+ .

En batch, les croissances optimales des formes filamenteuses et des sarcines sont observées respectivement pour des concentrations en $\text{NH}_4 \text{ Cl}$ supérieures à 1,6 ou 7 mM/l.

Le but de nos études a été de déterminer les concentrations minimales compatibles avec une bonne activité des deux méthanogènes acétoclastes. Concernant les concentrations maximales inhibitrices, SPOTT et al. (1986) ont étudié l'effet de l'azote sur certaines souches pures. Parmi elles deux sont physiologiquement proches de nos microorganismes : Methanosarcina barkeri et Methanothrix concilii. La production du méthane de cette dernière est inhibée avec 25 mM d' $\text{NH}_4 \text{ Cl}$, par contre, M. barkeri est plus résistante à l'effet de l'azote, la concentration inhibitrice de la production du méthane est de l'ordre de 200 mM d' $\text{NH}_4 \text{ Cl}$.

Parmi les concentrations d'azoté étudiées, celles de 345 mg/l d'azote s'est révélée comme favorable pour le maintien de l'activité et de la croissance de la population mixte hydrogénéophile. Ce qui confirme les observations réalisées lors des essais de méthanisation d'un mélange d'AGV où toutes les populations sont présentes, méthanogènes acétoclastes, hydrogénéophiles et acétogènes OHPA, lorsque le milieu renferme 345 mg N/l. Les numérations bactériennes ont confirmé que les hydrogénéophiles étaient présentes à hauteur de $7 \cdot 10^6$ bactéries par ml et les acétogènes OHPA entre 10^6 bactéries par ml.

Cependant l'état de l'écosystème et de production du gaz sont complètement changés en passant de la concentration en azote de 345 mg/l à 54 mg/l. On a assisté à un arrêt total de la méthanogénèse, les analyses microscopiques en U.V. montrent que les deux espèces méthanogènes qui existaient ont disparu ; d'autres analyses montrent qu'il n'y a plus de formate résiduel. Ceci prouve qu'il y a des espèces dégradatrices de formate qui peuvent se développer en présence de 54 mg/l d'azote.

L'aspect de la population qui s'est établie lors de ce deuxième essai est complètement différent de la précédente, les espèces qui prédominent sont sous forme de coques et de batonnets, tous les deux très mobiles, il s'agit probablement de sulfato-réductrices qui ont remplacé les hydrogénophiles.

Les études de SPROTT et al. (1986) confirment que parmi les méthanogènes les hydrogénophiles sont plus exigeants vis-à-vis de l'azote. Ces derniers ont une activité optimale pour des concentrations comprises entre 100 et 200 mM d' $\text{NH}_4 \text{ Cl}$. Ce besoin en azote peut être dû à leur rendement de production de biomasse qui est quatre fois plus élevé que celui des acétoclastes. Ce paramètre est directement lié au gain énergétique réalisé par les microorganismes lors de la production d'une mole de méthane (possibilité théorique de synthèse d'une mole d'ATP à partir de CO_2/H_2 et de 0,25 mole à partir de $\text{CH}_3 \text{ COOH}$).

En dépit des différentes observations, on peut déduire qu'avec 54 mg d'azote et en présence de sulfate, les bactéries sulfato-réductrices entrent en compétition avec les hydrogénophiles. Cependant, l'absence du formate dans le milieu suggère deux hypothèses, ou bien le formate est pris par les sulfato-réductrices en produisant CO_2 et $\text{H}_2 \text{ S}$, ou bien il y a d'autres bactéries dégradatrices du formate (OHPA) qui peuvent se développer avec 54 mg/l d'azote.

4. Conclusion

Deux points se dégagent à partir de ces essais :

- * pour une même production de méthane, les hydrogénophiles sont plus exigeants vis-à-vis de l'azote que les acétoclastes ;
- * en présence de sulfate, et avec une concentration de 54 mg/l d'azote, les sulfato-réductrices prennent la place des hydrogénophiles.

En continu, le rapport carbone / azote (C/N) nécessaire au maintien de la stabilité de l'écosystème et au bon fonctionnement de la méthanogénèse est de 20. En dessous de cette valeur, tous les paramètres de

fonctionnement changent, l'aspect de la population microbienne assurant la production du méthane aussi.

D'autres auteurs (ROBINSON et al., 1984 ; VERRIER, 1984) ont étudié la dégradation d'effluents agro-alimentaires, de lisier de porc ou de substrats synthétiques en utilisant un procédé de deuxième génération (filtre anaérobie). Ils ont mis en évidence que les populations assurant la production du méthane sont Methanothrix et Methanosarcina, avec une prédominance de la forme filamenteuse (Methanothrix). Cette dernière a deux intérêts importants :

- * elle assure une très bonne élimination de l'acétate du milieu, ce qui augmente la vitesse de dégradation du substrat ;
- * la plus importante, c'est que dans les procédés (lit fluidisé, UASB, filtre anaérobie) ou on cherche à fixer les cellules sur un support ou à obtenir des agrégats à bonnes caractéristiques de décantation. Methanothrix remplit une fonction capitale dans la formation et la cohésion des biofilms.

Ainsi, il est évident que la prédominance ou le maintien de cette espèce est obligatoire dans l'écosystème. Cependant les concentrations faibles en azote défavorisent le maintien de cette espèce. Donc il est souhaitable qu'un rééquilibrage du rapport C/N des substrats déficients ait lieu avant sa digestion anaérobie.

Tableau XII. Composition des différents milieux nécessaires pour les trois éléments minéraux.

	Na (ng/l)	K (ng/l)	Mg (ng/l)
M ₁	Σ Na	Σ K ⁺	10
M ₂	20	Σ	50
M ₃	100	Σ	100
M ₄	Σ	20	50
M ₅	20	20	100
M ₆	100	20	10
M ₇	Σ	100	100
M ₈	20	100	10
M ₉	100	100	50



VI. L'EFFET DE Na, K, Mg SUR L'ACTIVITE D'UNE POPULATION MIXTE ACETOCLASTE

1. Protocole expérimental

Tous les essais ont été réalisés dans des flacons de plasma de 500 ml purgés avec de l'azote pour maintenir l'anaérobiose. Les éléments minéraux sont ajoutés sous forme de solutions concentrées 100 fois. Dans nos essais, on a choisi d'étudier l'effet de trois concentrations de chaque élément ce qui en théorie devrait nous conduire à préparer 27 milieux différents en permutant les différentes concentrations. Pour limiter le nombre d'essais on a choisi une méthode statistique appelé Technique de GRECO-LATIN (AUDEN et al., 1967) qui est rapide, économique. Elle permet de sélectionner et de comparer les composés un à un. Le Tableau XII montre la composition des neuf milieux nécessaires.

2. Résultats (Tableau XIII)

Après un suivi de 23 jours, le bilan du biogaz fait à partir des prélèvements de gaz journaliers figure sur le graphe 22, il montre l'évolution de la production du gaz des différents essais. L'interprétation statistique a été réalisée à partir des moyennes de la production de méthane et des temps de doublements. Parmi les concentrations étudiées, 100 mg/l de Na, 100 mg/l de K et 10 mg/l de Mg se sont révélées les plus favorables pour la production du méthane et la croissance des bactéries.

Sur le Tableau XII qui donne la composition des différents milieux, on observe que chaque concentration des minéraux testés est présente dans trois milieux. En calculant la moyenne des résultats obtenus sur ces trois milieux, on obtient les valeurs pour chaque minéral. Par exemple, pour calculer les valeurs correspondant au sodium on effectuera les calculs suivants :

$$100 \text{ Mg Na}^+ (3,09 + 1,58 + 1,838)/3 = 2,17 \text{ jours}$$

$$20 \text{ Mg Na}^+ (5,615 + 1,791 + 1,629)/3 = 3,011$$

$$\Sigma \text{ Na}^+ (6,709 + 2,329 + 2,123)/3 = 3,739.$$

Tableau XIII. Résultats obtenus des différents essais après 23 jours de méthanisation en discontinu.

	V CH ₄ (ml)	μ (J ⁻¹)	ID (J)
M ₁	5,56	0,10	6,76
M ₂	19	0,12	5,61
M ₃	70	0,22	3,095
M ₄	38	0,297	2,329
M ₅	125	0,38	1,791
M ₆	156	0,43	1,589
M ₇	53	0,32	2,123
M ₈	146	0,42	1,629
M ₉	169	0,37	1,83

C.V2 TK4-OV 3 NA+ 1/C

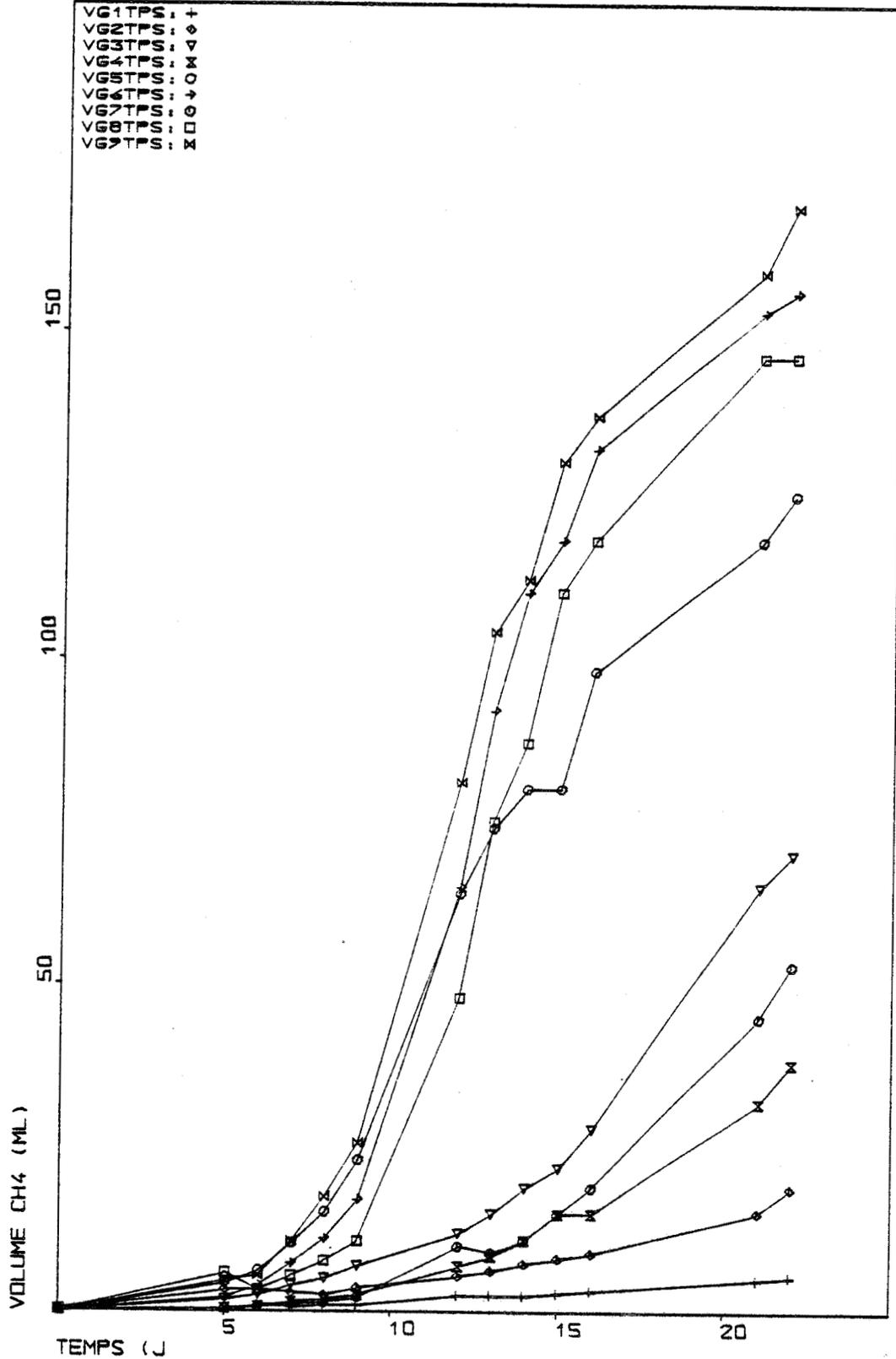


Fig 22 Cinétique de production du méthane sur différents milieux ,méthanisation en discontinue

C.V2 TK4-DV 3 NA+ 1/C

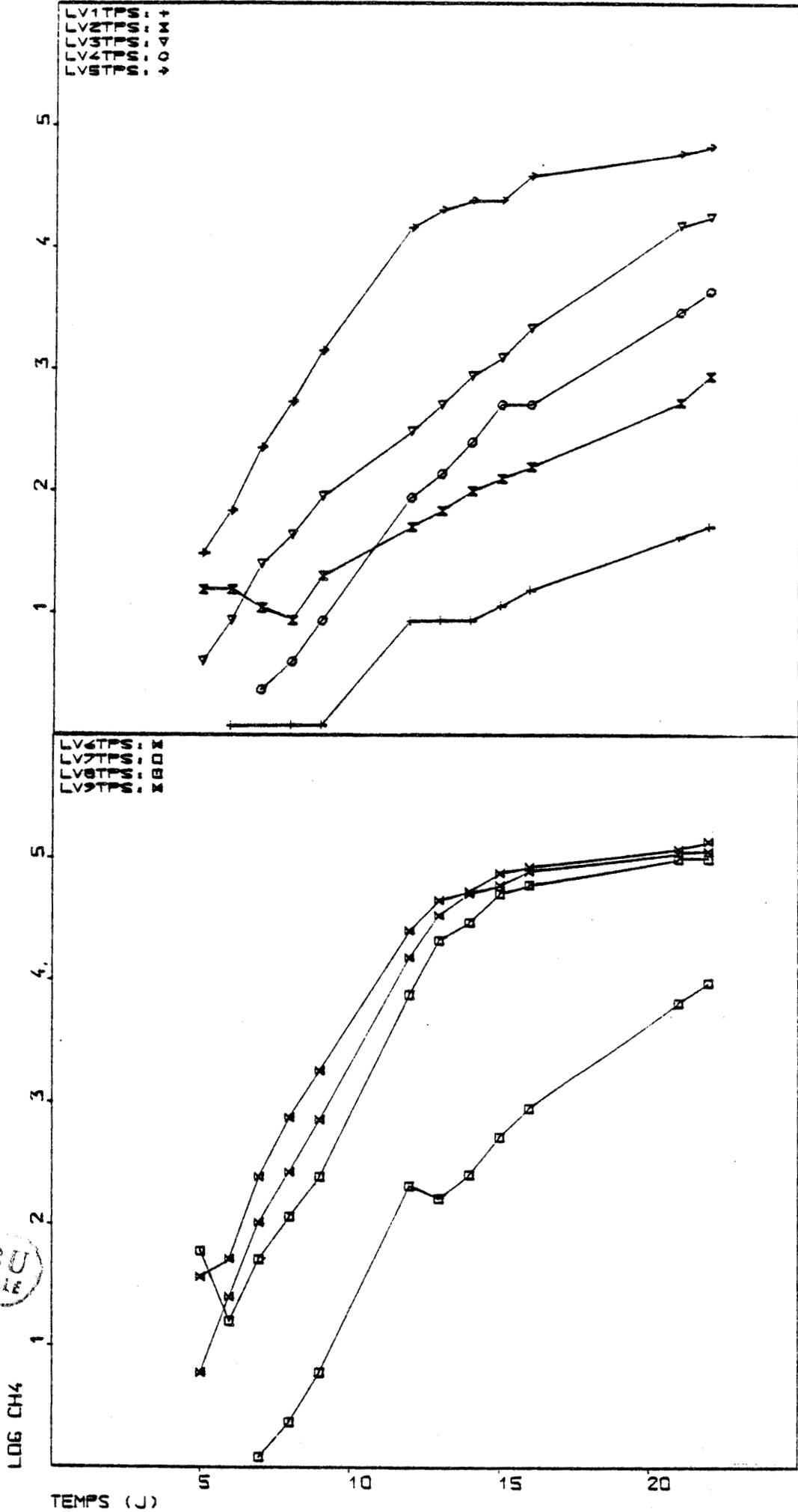


Fig 23 Tracés semi-logarithmiques des différentes productions de méthane.

Les conditions sont considérées comme optimales quand elles correspondent à la valeur la plus élevée si l'on s'intéresse à la production de méthane ou la plus faible si l'on prend en compte les temps de doublement.

Les taux de croissance sont calculés Figure 23 à partir de la partie exponentielle de la courbe de croissance. Les courbes de production de méthane sont reportées en coordonnées semi-logarithmiques. La pente de la droite obtenue fournit directement le taux de croissance.

Les valeurs obtenues à partir de ce premier essai peuvent ne pas être des concentrations optimales des trois éléments étudiés. Cependant, ce qui est intéressant c'est l'ordre d'importance des éléments étudiés vis-à-vis des bactéries. A partir des valeurs obtenues de la production du méthane et des taux de croissance on remarque que ces derniers augmentent avec la concentration en sodium et en potassium. L'effet du magnésium s'est révélé peu significatif.

Une analyse rigoureuse pour mettre en évidence l'élément dont l'effet est le plus important est difficile car il s'agit d'une population mixte acétoclaste. Les deux bactéries majeures qui la constituent appartiennent à l'ordre des Methanomicrobiales qui regroupe des bactéries dont les exigences vis-à-vis du sodium et du potassium varient beaucoup d'une espèce à une autre (Scherer et al., 1983). Cependant, si on compare les milieux 3 et 7, (le 3 contient 100 mg/l Na^+ et des traces de K^+ alors que le 7 contient des traces de Na^+ et 100 mg/l de K^+). Il apparaît que l'effet du potassium est plus important que celui du sodium sur l'activité de cette population acétoclaste (les temps de doublement sont respectivement de 3,09 et 2,1 jours).

L'effet inhibiteur ou activateur du potassium est de plus en plus important quand la concentration en sodium augmente dans le milieu, l'activité maximale dépend d'un équilibre du rapport Na/K.

A partir de ces observations, on a été amené à faire d'autres essais mais avec des gammes de concentrations plus élevées en potassium et sodium. Il faut noter que l'inoculum qui a servi pour ces derniers essais n'est

C.V2 TK4-DV 3 NA4 4/C

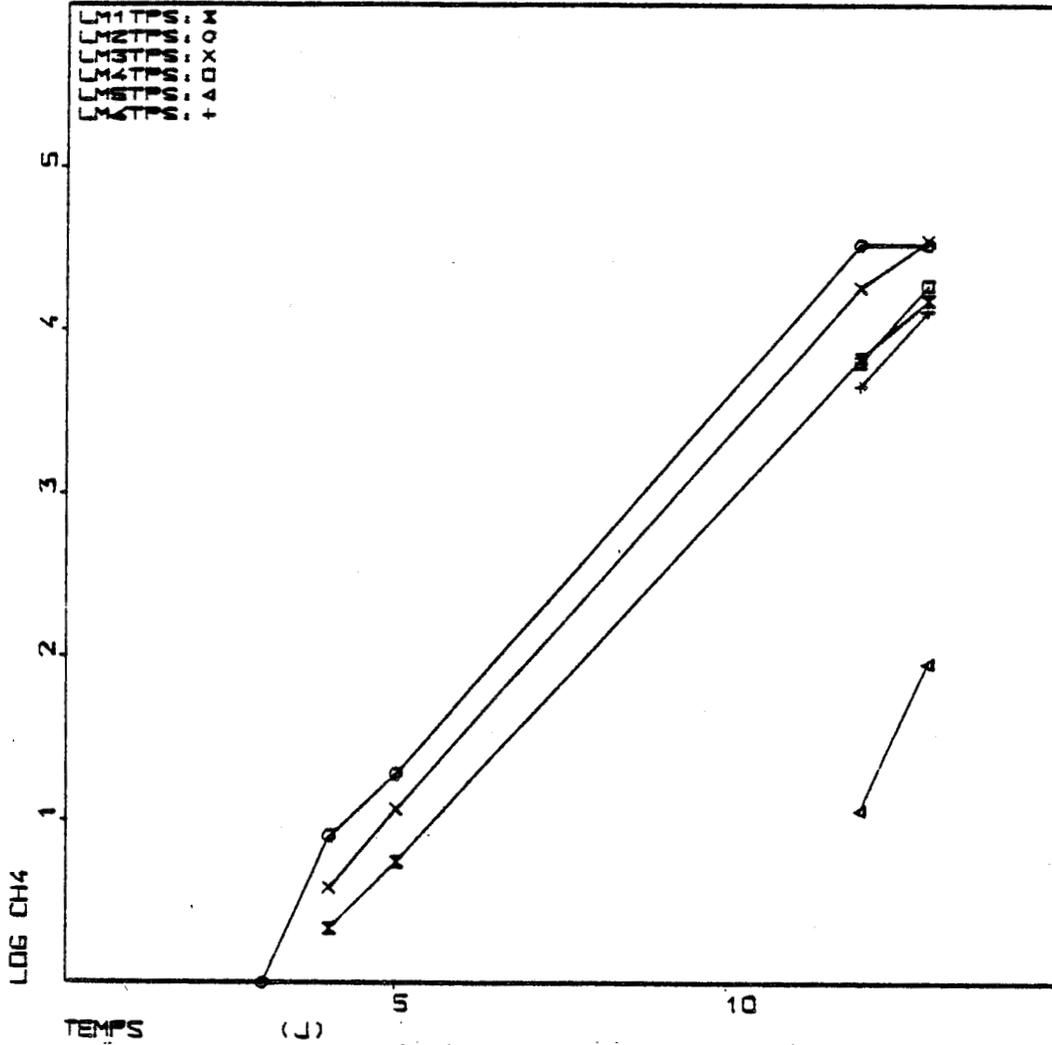


Fig 24(a) Tracé semi logarithmique du méthane produit dans différent milieux avec

$K=(20,50,100,200,500 \text{ et } 1000\text{mg/l})$
Na fixé à 200mg/l



Tableau XIV. Valeur des taux de croissance obtenus après méthanisation en discontinu.

Sodium (mg/l)	Potassium (mg/l)	μ (J-1)	TD (J)
200	20	0,32	2,16
200	50	0,34	2,03
200	100	0,36	1,92
200	200	0,52	1,33
200	500	0,55	1,26
200	1000	0,54	1,28
20	20	0,51	1,35
50	20	0,43	1,61
100	20	0,44	1,57
200	20	0,52	1,33
500	20	0,48	1,44
1000	20	0,53	1,3
20	100	0,4	1,73
50	100	0,52	1,33
100	100	0,48	1,44
200	100	0,43	1,61
500	100	0,43	1,61
1000	100	0,44	1,57



plus le même que celui qui a servi aux essais précédents. Ce sont des boues adaptées elles aussi à la dégradation des AGV, mais pour ce dernier essai, le milieu d'alimentation contenait de la chaux.

Le Tableau XIV et les Figures 24 (a, b et c) montrent la compositions des différents milieux et les résultats obtenus après 20 jours de suivi. D'après la production du méthane et les taux de croissance, l'effet du potassium se confirme, on constate (Figure 25) que le taux de croissance augmente en fonction de la quantité de potassium présente dans le milieu. La croissance maximale est obtenue entre 200 et 500 mg/l. Au-delà, la production du méthane, le taux de croissance ne sont plus influencés par la concentration en potassium, ce qui traduit l'absence d'effet inhibiteur dans la gamme de concentration testée. Par ailleurs, l'effet du sodium est moins évident, d'après le Tableau XIV et la cinétique de production du méthane, l'effet activateur du sodium est important quand la concentration en potassium est élevée. Autrement dit, l'effet activateur dépend du rapport Na/K ; ainsi pour une concentration donnée en sodium, le rapport doit être égal à 5.

Une activité de croissance et de production de méthane maximales ont été obtenues avec respectivement 500 et 100 mg/l de ces deux cations, le temps de doublement correspondant est de 1,6 jours, le volume du méthane obtenu après 13 jours est de 170 ml. Cependant des rapports de 200/50 et 100/50 ne donnent pas d'effets significativement différents, les temps de doublement obtenus avec les deux rapports sont 1,7 et 1,9 jours. Par contre la production moyenne du méthane est moins importante qu'avec le rapport 500/100, les volumes de méthane respectifs produits sur la même période (13 jours) sont 70 et 120 ml.

C.V2 TK4-OV 3 NA3 3/C

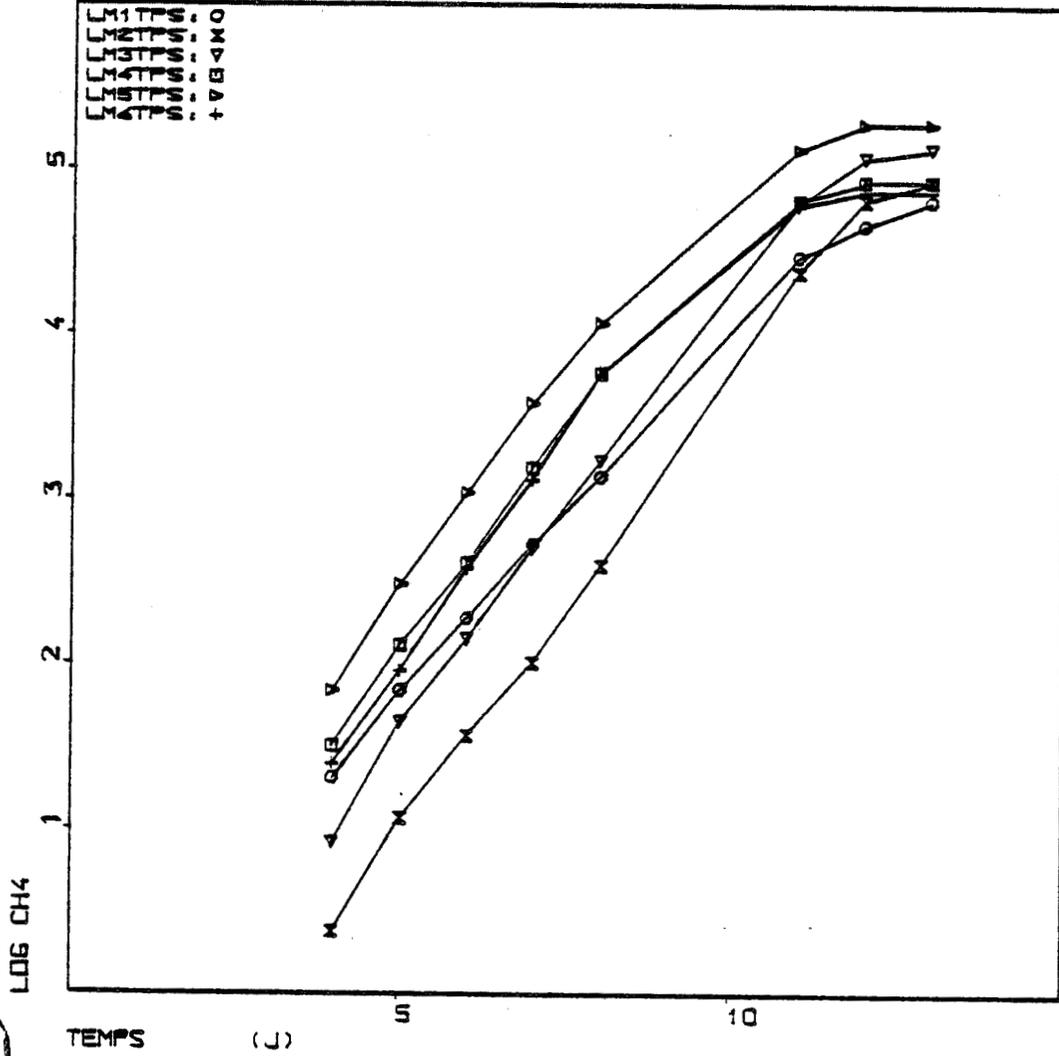


Fig 24(c) Tracé semi logarithmique du méthane produit dans différents milieux avec
 K fixé à 100mg/l
 Na=(20,50,100,200,500 et 1000mg/l)

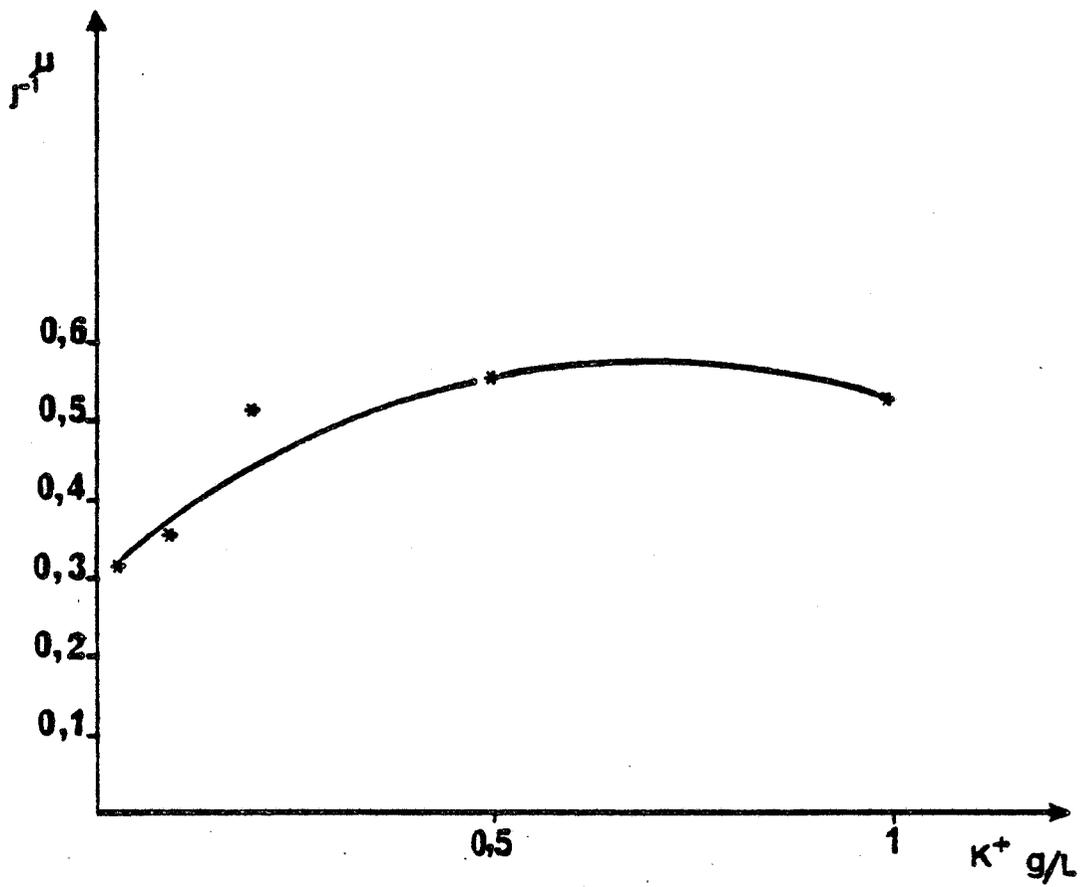


Fig 25 Taux de croissance d'une population mixte acétoclaste en fonction du potassium



Tableau XV. Composition des différents milieux de cultures.

Milieu	Sodium (mg/l)	Potassium (mg/l)	Magnésium (mg/l)
M ₁	100	100	10
M ₂	250	100	50
M ₃	500	100	100
M ₄	100	250	10
M ₅	250	250	50
M ₆	500	250	100
M ₇	100	500	10
M ₈	250	500	50
M ₉	500	500	100



VII. INFLUENCE DE Na, K et Mg SUR L'ACTIVITE DE Methanothrix soehngenii

1. Protocole expérimental

Tous les essais ont été effectués en batch dans des flacons plasma de 500 ml. Les bilans de la méthanisation sont faits à partir des prélèvements gazeux journaliers. Compte tenu des résultats précédents, nous n'avons retenu que la série d'essais effectués en présence des concentrations les plus élevées qui varient entre 100 et 500 mg/l pour le sodium et le potassium et entre 10 et 50 mg/l pour le magnésium.

Le Tableau XV montre la composition des différents milieux utilisés. Tous les milieux ont été préparés sous N_2/CO_2 (85/15 %), ensemencés à 2 % V/V et incubés à 37 °C. La source de carbone est l'acétate d'ammonium (50 mM), les milieux de cultures ont été tamponés à pH 7 avec l'HEPES (50 mM) et du carbonate du lithium (1,48 g/l) et réduits avec une solution de cystéine à 2 %.

2. Résultats

Le Tableau XVI résume les résultats obtenus après 30 jours de suivi ; on remarque qu'il est difficile de faire une analyse rigoureuse de la concentration optimale de chaque élément étudié, les différences ne sont pas trop significatives. D'après les calculs des moyennes des temps de doublement et de production de méthane sur une période de 23 jours, les interprétations statistiques permettent de dire que les meilleurs rendements sont obtenus avec des concentrations de :

- 250 à 500 mg/L de Na
- 250 à 500 mg/l de K
- 100 mg/l de Mg.

Par ailleurs on assiste à une amélioration du temps de doublement de la souche qui de 2,33 contre 3,4 jours obtenus avec un milieu de référence (BCYT). Cette amélioration correspond au milieu n° 9 contenant 500 mg/l de

Tableau XVI. Valeur des temps de doublement et des productions de méthane après 30 jours de méthanisation en discontinu.

Milieu	V CH ₄ (ml)	TD (J)
M ₁	86,94	4,77
M ₂	102,81	2,43
M ₃	107,87	2,54
M ₄	102,80	2,60
M ₅	103,86	2,52
M ₆	103,27	2,66
M ₇	101,20	2,83
M ₈	103,04	2,64
M ₉	102,58	2,33



Na et K et 100 mg/l de Mg.

Concernant le rapport Na^+/K^+ son effet est nettement moins accusé que sur la population mixte. Cela est net quand on compare les milieux M_3 , M_4 , M_5 où la concentration en sodium est fixée à 500 mg/l et où les concentrations en potassium sont 100, 250 et 500 mg/l ; les temps de doublements obtenus pour les trois milieux sont très voisins (2,54 ; 2,66 ; 2,33 jours).

3. Discussions

La méthanisation de l'acétate par une population mixte acétoclaste dépend des trois éléments minéraux étudiés, en particulier le sodium et le potassium (PATTEL et al., 1977 ; CALDWELL et al., 1974 ; SPROTT et al., 1981).

Ainsi la cinétique de dégradation de l'acide acétique et de la production du méthane sont très faibles en absence de Na^+ et K^+ ; il en est de même pour les taux de croissance, ils sont quatre fois moindres que ceux obtenus avec des concentrations de 100 mg/l de Na^+ et K^+ , les temps de doublement respectifs sont 6,76 et 1,83 jours.

Les meilleurs taux de croissance sont obtenus avec les rapports Na^+/K^+ voisins de 5. Ils correspondent à ceux des sarcines et les analyses microscopiques après la fin de la croissance montrent en effet une prédominance de ces microorganismes par rapport aux formes filamenteuses. Ceci est confirmé par l'étude de l'influence de Na^+ et K^+ sur la croissance de Methanothrix en culture pure.

L'influence du sodium et du potassium sur la production de méthane et la croissance des bactéries méthanogènes a été étudiée par plusieurs auteurs (PERSKI et al., 1981-1982 ; SPROTT et al., 1985). Ils déduisent que l'activité de certains méthanogènes est obligatoirement liée à la présence de ces deux cations.

Cependant leur rôle reste obscur, surtout celui du sodium ; l'hypothèse couramment retenue pour expliquer le rôle du sodium est l'existence d'un système de transport du sodium qui génère un gradient de proton (proton-motive-force). Ce dernier intervient lors de la synthèse de l'ATP mais aussi comme activateur au niveau d'une étape lors de la formation du méthane (PERSKI et al., 1982 ; DANIELS et al., 1984).

En ce qui concerne le potassium, son rôle a été mis en évidence dans plusieurs systèmes (chloroplastes, mitochondries...) lui aussi intervient lors de la synthèse d'ATP due au gradient de proton créé par une simple diffusion de K^+ ; en plus, chez les méthanogènes, il joue un rôle important dans la régulation du pH intra-cellulaire.

Donc un équilibre entre le potassium et le sodium est souhaitable pour un bon fonctionnement physiologique, une bonne production de biomasse, de méthane et la synthèse d'ATP (SCHONEIT et al., 1983 ; MOUNTFORT D. O., 1978).

Tableau XVII. Influence de la concentration en fer sur le taux de croissance de *M. soehngenii* et la production de méthane obtenue après 39 jours de culture en discontinu.

Fer (mg/l)	V CH ₄ (ml)	μ (J-1)	TD (J)
2	92	0,21	3,3
25	93	0,225	3,08
50	93	0,227	3,04
75	92	0,23	3,01
100	93	0,224	3,09



VIII. L'EFFET DU FER SUR L'ACTIVITE DE Methanothrix soehngenii

Les concentrations en fer des différents milieux sont 2 mg/l (BCYT) 25, 50, 75 et 100 mg/l, le fer a été ajouté au milieu de base sous forme de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Cependant juste après l'ajout du fer on a obtenu un précipité noir avec les sulfures qui ont servi pour la réduction du milieu. Les concentrations du fer restant en solution sont respectivement de 2 ; 22 ; 38 ; 56 et 58 mg/l.

Après 39 jours d'incubation, les productions finales en méthane et les temps de doublement obtenus figurent dans le Tableau XVII, les volumes correspondent à la moyenne des deux essais.

D'après le Tableau, il se dégage qu'à partir de nos conditions opératoires que l'apport du fer n'a aucun effet, ni sur la production finale du méthane, ni sur le taux de croissance de Methanothrix. Par ailleurs, la concentration de 100 mg/l ralentit le démarrage de la méthanogénèse, et que 2 mg/l sont amplement suffisants pour une activité optimale de cette souche.

Cependant plusieurs auteurs ont étudiés l'effet du fer sur l'amélioration de certains paramètres de fonctionnement d'un digesteur tel que la dégradation des acides gras volatils et leur conversion en méthane, le meilleur taux de conversion d'acide acétique (m mole/l/j) est obtenu avec 5 mM de $FeCl_2$ (VAN DEN BERG et al., 1980 ; PATTEL et al., 1978). Ce dernier double presque, il passe de 35 à 50 m molel/j quand on adjoint en plus 5 mM Na_2SO_4 dans le milieu de culture. En plus dans les écosystèmes concentrés en sulfate ou sulfure, le fer joue un rôle important, il précipite les sulfures solubles présents ou apparus par réduction des sulfates et détoxifie le milieu à l'égard des bactéries méthanogènes sensibles à un excès de sulfures (CAPPENBERG, 1974). En outre, le précipité de sulfure ferreux favorise l'environnement physico-chimique des bactéries anaérobies en éliminant du milieu de l'oxygène qui peut éventuellement y diffuser.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Avec un rapport C/N/P égal à 100/5/1, la méthanogénèse en chémostat monoétape à mélange complet, d'un mélange d'acides gras volatils, ou de l'acide acétique seul et de l'acide formique est stable. Les rendements en production de biomasse, les taux de croissance et la vitesse de conversion des précurseurs directs du méthane, sont optimales dans les conditions de fonctionnement utilisés (TSH = 13 J ; Cv = 1,69 g DCO/l/j).

Dans ces conditions, la méthanogénèse d'un mélange d'AGVs est stable grâce au fonctionnement normal des populations bactériennes présentes dans le réacteur, qui sont des acétogènes et des méthanogènes acétoclastes et hydrogénophiles. Parmi cette microflore, il faut souligner le rôle fondamental des deux dernières, qui assurent la stabilité de transformation des matières organiques en éliminant en permanence du milieu des métabolites dont l'accumulation est toxique.

Le maintien de tous les microorganismes assurant la dégradation de toute la charge organique appliquée nécessite une quantité de 2,74 mg d'azote par gramme de DCO dégradée. Le rendement de biomasse est de 0,041 g/g/DCO, ce qui est suffisant pour méthaniser un mélange d'AGV.

Cependant, celui pour assurer la méthanisation de l'acétate ou le formate seul est 4 fois plus élevé, il est de 0,18 mg MVES/g DCO. Cette différence de besoins en azote de rendement en biomasse est due aux différentes interactions intra et inter spécifiques de la flore présente dans l'écosystème.

Par ailleurs, avec les mêmes paramètres de fonctionnement et un rapport C/N/P de 140, la méthanisation du mélange d'acides gras volatils est instable. On assiste à une apparition d'acide acétique dans le milieu entraînant l'accumulation de propionate et de butyrate. Par ailleurs un équilibre des populations bactériennes différent est observé avec une

prédominance des formes sarcines. Ces observations ont été confirmées par des essais de méthanisation de l'acide acétique seul et du formate par des populations adaptées dont les rendements en biomasse sont deux fois plus faibles que ceux observés précédemment.

Dans nos conditions expérimentales (C/P compris entre 0,1 et 1 %) nous n'avons pas mis en évidence de déficience en phosphore.

A partir de ces différentes observations on peut estimer qu'un rapport C/N/P égal à 100/5/1 permet un développement optimal de tous les groupes trophiques nécessaires à une méthanisation stable. De plus pour des substrats suffisamment concentrés en carbone, la concentration en azote ammoniacal correspondant aux ratios ci-dessus assure au contenu du fermenteur un bon pouvoir tampon.

Parmi les acétoclastes étudiées, la croissance des formes sarcines est moins affectée par des concentrations faibles en azote que celle de Methanothrix. Par ailleurs les besoins en azote, pour une même production de méthane sont quatre fois plus importantes chez les hydrogénophiles. Cela est tout à fait logique puisque ces dernières produisent trois à quatre fois plus de biomasse bactérienne par mole de méthane dégagée. Enfin, que ça soit les acétoclastes ou les hydrogénophiles, nous n'avons observé aucune influence des concentrations en phosphore testées en ce qui concerne leur croissance.

Industriellement, les procédés de deuxième génération (contact anaérobie, filtre anaérobie...) ont atteint la maturité surtout le filtre anaérobie où les cellules sont immobilisées sur des supports inertes. En complément de ce travail qui s'est surtout intéressé à l'influence de la composition minérale du milieu sur le développement de microorganismes présents dans les écosystèmes méthanogènes, il serait souhaitable de vérifier si le rapport C/N/P optimum (100/5/1) favorise également la fixation de Methanothrix sur les supports classiquement utilisés.

Une fois de plus, l'optimisation de l'épuration par fermentation méthanique conduit au choix d'un compromis. En effet, nous avons clairement

montré que les méthanogènes ~~filamenteuses~~ nécessitent une teneur relativement importante en ammonium résiduel pour se développer préférentiellement. D'un autre point de vue, le rejet d'ammoniaque dans le milieu récepteur n'est pas souhaitable et les agences financières^V de l'azote. Si l'on cherche à atteindre une épuration maximale du carbone et de l'azote, il est évident que ce résultat ne sera pas obtenu par la mise en oeuvre de la seule méthanisation. Il faut donc dès le départ avoir l'approche globale qui insère la fermentation méthanique dans un procédé plus général faisant également intervenir la nitrification et la dénitrification biologiques .

* du bassin qui sont exigeantes vis à vis du rejet .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * **ARCHER D. B.** (1984)
Biochemistry of methanogenesis by mixed cultures.
Biochem. soc, 1-7.
- * **ARCHER D. B.** (1985)
Uncoupling of methanogenesis from growth of Methanosarcina barkeri by phosphate limitation.
Appl. Environ. Microbiol., 1233-1237.
- * **AUDEN J., CHURER J., NUESCH J., KNUSEL F.** (1967)
Some statistical methods in nutrient medium optimalization.
Path. Microbiol., 38, 858-866.
- * **BAKHJET N., FORNEY F. W., STANLY D. P., DANIELS L.** (1984)
Lysine biosynthesis in Methanobacterium thermoautotrophicum is by Diaminopimelic acid pathway.
Current Microbiol., 10, 195-198.
- * **BALCH W. E., FOX G. E., MAGRUM L. J., WOESE C. R., WOLFE R. S.** (1979)
Methanogens : reevaluation of a unique biological group.
Microbiol. Rev. 43, 2, 260-296.
- * **BELAY N., SPARLING R., DANIELS L.** (1984)
Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium.
Nature, 312, 286-288.
- * **BEN BESSAT A., LAMED R., ZEIKUS J. G.** (1981)
Ethanol production by thermophilic bacteria : Metabolic control of end product formation in Thermobacterium brockii.
J. Bact., 146, 192-199.
- * **BOONE D. R., BRYANT M. P.** (1980)
Propionate degrading bacterium Syntrophobacter wolinii sp. nov. gen. nov., from Methanogenic ecosystems.
Appl. Environ. Microbiol., 40, 3, 626-632.
- * **BREUIL C., PATTEL G. B.** (1980)
Composition of Methanospirillum hungatei GP1 during growth on different media.
Can. J. Microbiol., 26, 577-582.
- * **BROWN C. H.** (1976)
Nitrogen metabolism in bacteria and fungi, continuous culture application and new fields.
Ed. A.C.R. DEAN, D.C. ELLWOOD, C.G.T. EVANS, J. MELLING, 170-180.
- * **BRYANT M. P., WOLIN E. A., WOLIN M. J., WOLFE R. S.** (1967)
Methanobacillus omelianskii a symbiotic association of two species of bacteria.
Arch. Microbiol., 59, 20-31.

- * **BRYANT N. P., TZENG S. F., ROBINSON J. M., JOYNER A. E.** (1971)
Nutrient requirements of methanogenic bacteria.
Adv. Chem. Ser., 105, 23-40.
- * **BRYANT N. P., CAMPBELL L. L., REDDY C. A., CRABILL M. R.** (1977)
Growth of Desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂ utilizing methanogenic bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 27, 549-552.
- * **CALDWELL D. R., HUDSON R. F.** (1974)
Sodium, an obligate growth requirement for predominant rumen bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 27, 549-552.
- * **CAPPENBERG T. E.** (1974)
Interrelation between sulfate-reducing and methane-reducing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake, I. field observations.
Antonie Van Leeuwenhoek, 40, 285-295.
- * **CHEESMAN P., TOMS-WOOD A., WOLFE R. S.** (1972)
Isolation and properties of fluorescent compound factor 420 from Methanobacterium strain MoH.
J. Bact., 112, 527-531.
- * **CHIU-YUE LIN, KAZUAKI, SATO, TATSUYA NOIKE and JUNICHERO MATSUMOTO** (1986)
Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acid.
Wat. Res., 3, 385-394.
- * **CHUNG KING-THOR** (1976)
Inhibitory effects of H₂ on growth of Clostridium cellobioparum.
Appl. Environ. Microbiol., 31, 342-348.
- * **DANIELS L., ZEIKUS J. G.** (1978)
One carbon metabolism in methanogenic bacteria ; analysis of short term fixation products of ¹⁴C¹⁴O₂ and ¹⁴C¹⁴CH₃ OH incorporated into whole cells.
J. Bact., 136, 75-84.
- * **DANIELS L., SPARLING R., SPROTT G. D.** (1984)
The bioenergetics of methanogenesis.
Biochemica and Biophysica acta, 768, 113-163.
- * **DEMAN J. C.** (1975)
The probability of most probable numbers.
Europ. J. Appl. Microbiol., 1, 67-68.
- * **DE MOLL E., LIN TSAI** (1986)
Utilization of purines or pyrimidines as the sole nitrogen source by Methanococcus vannielii.
J. Bact., 681-684.
- * **DIEKERT G., JAENCHEN R., THAUER R. K.** (1980)
A biosynthetic evidence for a nickel tetrapyrrole structure of factor F 430 from Methanobacterium thermoautotrophicum.
FEBS Lett., 119 (1), 118-120.

- * **DIEKERT G., KONHEISER R. U., PICCHULLA K., THAUER R. K.** (1981)
Nickel requirement and factor F 430 content of methanogenic bacteria.
J. Bact., 459-464.
- * **DOELLE N. H.** (1975)
Bacterial metabolism.
New York Academic, 2nd Ed.
- * **DUBOURGUIER H. C., TOUZEL J. P., ALBAGNAC G.** (1982)
Progrès récents en méthanogénèse - 6e réunion des microbiologistes de l'INRA.
Murat le Quaire - 17-18 juin 1982.
- * **EIRICH L. D., VOGELS G. D., WOLFE R. S.** (1979)
Distribution of coenzyme F 420 and properties of its hydrolytic fragments.
J. Bact., 140, (1), 20-27.
- * **EIKMANN B., JAENCHEN R., THAUER R. K.** (1983)
Propionate assimilation by methanogenic bacteria.
Arch. Microbiol., 136, 106-110.
- * **EKIEL I., SMITH C. P., SPROTT D.** (1984)
Biosynthesis of isoleucine in methanogenic bacteria. A ¹³C NMR study.
Biochemistry, 23, 1683-1687.
- * **ELLEFSON W. L., WHITMAN W. B., WOLFE R.** (1982)
Nickel-containing factor F 430 : chromophore of the methylreductase of Methanobacterium.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 79, 3707-3710.
- * **ESCALANTE-SEMERANA J. C., RINEHART K. L., WOLFE R. S.** (1984 a)
Tetrahydromethanopterin a carbon carrier in methanogenesis.
J. Biol. Chem., 259, 9447-9455.
- * **ESCALANTE-SEMERANA J. C., LEIGH J. A., WOLFE R. S.** (1984 b)
New insights into the biochemistry of methanogenesis from H₂ and CO₂.
Proc., 4th Int. Symp. Microbial growth on C1 compounds.
Ed. R.L. CRAWFORD, R.S. HANSON, 191-198.
- * **FLORENTZ M.** (1982)
Contribution à l'élimination du phosphore des eaux usées par voie biologique.
Thèse de Docteur Ingénieur - Université de Nancy I.
- * **FROSTELL B.** (1985)
Process control in an anaerobic waste water treatment.
Wat. Sci. Tech., 17, 173-189.
- * **FUCHS G., STUPPRICH E.** (1982)
Autotrophic CO₂ fixation pathway in Methanobacterium thermoautotrophicum.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org. C₃, 277-288.
- * **GARCIA L. J.** (1983)
Fermentation méthanique.
Compte rendu des journées d'études d'ORSTROM, 2e session - Paris.

- * **GHOSH S., KLASS D. L.** (1981)
Advanced digestion process development for methane production from biomass-waste blends. Biomass as a non fossil fuel source.
Am. Chem. Soc., 13, 251-278.
- * **GRAF E. G., THAUER R. K.** (1981)
Hydrogenase from Methanobacterium thermoautotrophicum, a nickel containing enzyme.
FEBS Lett., 136, (1), 165-169.
- * **GUNSALUS R. P., WOLFE R. S.** (1977)
Stimulation of CO₂ reduction to methane by methyl coenzyme M in extracts of Methanobacterium.
Biochem. Biophys., Res. Comm., 76, 790-795.
- * **GUNSALUS R. P., WOLFE R. S.** (1978)
Chromophoric factor F 342 and F 430 of Methanobacterium thermoautotrophicum.
FEMS. Microbiol. Lett., 3, 191-193.
- * **HABIG C.** (1985)
Influences of substrate composition on biogas yields of methanogenic digesters.
Biomass, 8, 245-253.
- * **HAYES T. D., THESIS T. L.** (1978)
The distribution of heavy metals in anaerobic digestion.
J. Wat. Pollut. Cont. Fed., 61-72.
- * **HENDERSON C.** (1971)
A study of the lipase produced by Anaerovibrio lipolitica, a rumen bacterium.
J. Gen. Microbiol., 65, 81-89.
- * **HENZE M., HARREHOES P.** (1983)
Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors.
Wat. Sci. Tech. IAWPRC, 1-101.
- * **HILLS D. J.** (1979)
Effect of carbon : nitrogen on anaerobic digestion of Dairy manure.
Agr. Wast., 267-278.
- * **HOBAN D. J., VAN DEN BERG L.** (1979)
Effects of iron on conversion of acetic acid to methane during methanogenic fermentation.
J. Appl. Bact., 47, 153-159.
- * **HOBSON P. N.** (1974)
Anaerobic digestion of organic matter.
C.R.C., 4, (2), 131-191.
- * **HOBSON P. N., SHAW B. G.** (1975)
Inhibition of methane production by Methanobacterium formicicum.
Wat. Res., 10, 849-852.

- * **HUSER B. A., WUHRMAN K., ZEHNDER A. J. B. (1982)**
Methanotrix Soehngenii, gen. sp. nov. A new acetotrophic non hydrogen oxidizing methane bacterium.
Arch. Microbiol., 132, 1-9.
- * **JARRELL K. F., SPROTT (1982)**
Nickel transport in Methanobacterium bryantii.
J. Bact., 151, 1195-1203
- * **JONES J. B., STADTMAN T. (1977)**
Methanococcus vanniellii, culture and effects of Selenium and Tungsten on growth.
J. Bact., 130, 1404-1406.
- * **JONES J. B. (1980)**
Dependant and Selenium independant formate dehydrogenase of Methanococcus vanniellii.
J. Biol. Chem., 256, 656-663.
- * **KANDLER O., HELMUT KONIG (1978)**
Chemical composition of the peptidoglycan free cell walls of methanogenic bacteria.
Arch. Microbiol., 118, 141-152.
- * **KENEALY W. R. THOMPSON T. E., SCHUBERT K. R., ZEIKUS J. G. (1982)**
Ammonia assimilation and synthesis of alanine, Aspartate and glutamate in Methanosarcina barkberi and Methanobacterium thermoautotrophicum.
J. Bact., 1357-1365.
- * **KENEALY W. R., ZEIKUS J. G. (1982)**
One carbon metabolism in methanogens, evidence for synthesis of a two-carbon cellular intermediate and unification of catabolism and anabolism in Methanosarcina.
J. Bact., 932-941.
- * **KODAMA T., TANIGUCHI S. (1976)**
Sodium-dependant growth and respiration of a non halophilic bacterium Pseudomonas stutzeri.
J. Bact., 96, 17-24.
- * **KOHLER H. P. E., ZEHNDER A. J. B. (1984)**
Carbon monoxide dehydrogenase and acetate thiokinase in Methanotrix soehngenii.
FEMS. Microbiol. Lett., 21, 287-292.
- * **KOSTER I. W., LETTINGA G. (1984)**
The influence of ammonia nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge.
Agr. Wast., 9, 205-216.
- * **KOTZE J. P., THIEL P. G., HATTINGH W. H. J. (1969)**
Anaerobic digestion ; the characterization and control of anaerobic digestion.
Wat. Resc., 3, 459-494.

- * **KRZYCKI J. A., ZEIKUS J. G.** (1984)
Characterization and purification of carbon monoxide dehydrogenase from Methanosarcina barkeri.
J. Bact., 158, (1), 231-237.
- * **LAGRANGE J. R.** (1979)
Biométhane : II Principes - Techniques, Utilisation.
EDISUD / Energies alternatives
- * **LANYI J. K.** (1979)
The role of Na⁺ in transport process of bacterial membranes.
Biochemica and Biophysica acta, 559, 377-397.
- * **LARGE P. J.** (1983)
Methylotrophy and Methanogenesis.
Aspects of microbiology, (8), 76.
- * **LAUBE V. M., STANLEY M. N.** (1981)
Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by triculture of Acetivibrio cellulolyticus, Desulfovibrio, sp and Methanosarcina barkeri.
Appl. Environ. Microbiol., 42, (3), 413-420.
- * **LEIGH J. A.** (1983)
Levels of water soluble vitamins in methanogenic and non methanogenic bacteria.
Appl. environ. Microbiol., 45, (3), 800-803.
- * **LEIGH J. A., KENNETH L., RINE HART J. C., WOLFE R. S.** (1984)
Structure of methanofuran, the carbon dioxide reduction factor of Methanobacterium thermoautotrophicum.
J. Am. Chem. Soc., 106, 3636-3640.
- * **LE RUYET P.** (1984)
Hydrolyse et fermentation des polysides végétaux par les bactéries anaérobies. Isolement, caractérisation et étude physiologique de nouvelles espèces cellulolytiques et xylanolytiques.
Thèse de 3e cycle - Université des Sciences et Techniques de Lille.
- * **LETTINGA G.** (1980)
Anaerobic digestion for energy saving and production.
E.C. - Conference "Energy from Biomass" - Brighton, 4-7 November 1980.
- * **LIU Y., BOONE D. R., STEAT R., MAH R. A.** (1985)
Methanosarcina mazei Lyc. A new methanogenic isolate which produces a disaggregating enzyme.
Appl. Environ. Microbiol., 49, 608-613.
- * **MAH R. A., SUSSMAN C.** (1967)
Microbiology of anaerobic sludge fermentation, I. Enumeration of the non methanogenic anaerobic bacteria.
Appl. Microbiol., 16, 358-361.
- * **MAH R. A., HUNGATE R. E., OHWAKI K.** (1977)
Acetate, a key intermediate in methanogenesis. Microbial Energy Conversion.
Ed. SCHLEGEL / BARNEA, 97-106.

- * **MAH R. A.** (1980)
Isolation and characterization of Methanococcus mazei.
Current Microbiol., 3, 321-326.
- * **MC BRIDE B. C., WOLFE R. S.** (1971)
A new coenzyme of methyl transfert ; Coenzyme M.
Biochem., 10, 2317-2324.
- * **MC CARTY P. L.** (1964)
Anaerobic waste treatment fundamentals - Part I-IV.
Public works, 94, 107-112 ; 94, 123-126 ; 95, 91-94 ; 95, 95-99.
- * **MC CARTY P. L.** (1972)
Stoichiometry of biological reaction.
Int. I. Conf. "Toward a unified concept of biological waste treatment design". Atlanta. G.A. 1972.
- * **MC CARTY P. L.** (1974)
Anaerobic process.
Birmingham short course on Design Aspects of Biological Treatment.
IAWPR. 1974.
- * **MC INERNEY M. J., BRYANT M. P.** (1979)
Metabolic stages and energetics of microbial anaerobic digestion.
1st Int. Symp. on anaerobic digestion. Cardiff, 17-21 September.
- * **MC INERNEY M. J., BRYANT M. P., HESPELL R. B., COSTERON J. M.** (1981)
Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic fatty acid oxidizing bacterium.
Appl. Environ. Microbiol., 41, (4), 1029-1039.
- * **MILLER T. L., WOLIN M. J.** (1974)
A serum bottle modification of the HUNGATE technique for cultivating obligate anaerobes.
Appl. Microbiol., 27, 985-987.
- * **MILLER T. L., WOLIN M. J.** (1985)
Methanosphaera stadtmaniae gen. nov. sp. nov. : a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen.
Arch. Microbiol., 141, 11--122.
- * **MIN CHEN, WOLIN M. J.** (1977)
Influence of CH₄ production by Methanobacterium ruminantium on the fermentation of glucose and lactate by Selenomonas ruminantium.
Appl. Environ. Microbiol., 34, 756-759.
- * **MITCHELL P.** (1975)
Proton motive redox mechanism of the cytochrome b-c complex in the respiratory chain proton motive ubiquinone cycle.
FEBS. Lett., 56, 1-6.
- * **MOLETTA R., ALBAGNAC G.** (1982)
A gas meter for low rates of gas flow ; Application to the methane fermentation.
Biotechnol. lett., 4, 319-322.

- * **MOLETTA R., VERRIER D., ALBAGNAC G.** (1986)
Dynamic modelisation of anaerobic digestion.
Wat. Res., 20, 427-434.
- * **MOSEY F. E.** (1976)
Assessment of the maximum concentration of heavy metals in crude sewage which will not inhibit the anaerobic digestion of sludge.
Water pollut. control., 10-20.
- * **MOSEY F. E.** (1983)
Kinetic descriptions of anaerobic digestion.
Third Int. Symp. on anaerobic digestion - 14-19 August 1983 - Boston, Massachusetts, USA - (37-53).
- * **MOUNTFORT D. O.** (1978)
Evidence for the ATP synthesis driven by a proton gradient in Methanosarcina barkeri.
Biochem. Biophys. Res. commun., 85, 1346-1351.
- * **MOUNTFORT D. O., BRYANT P. N.**, (1982)
Isolation and characterization of an anaerobic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge.
Arch. Microbiol., 133, 249-256.
- * **MURRAY W. D., VAN DEN BERG L.** (1981)
Effects of Nickel, Cobalt and molybdenum on performance of methanogenic fixed-film reactors.
Appl. Environ. Microbiol., 502-505.
- * **MURRAY P.A., ZINDER S. H.** (1984)
Nitrogen fixation by a methanogenic bacteria.
Nature, 312, 284-286.
- * **MURRAY P. A., ZINDER S. H.** (1985)
Nutritional requirements of Methanosarcina sp. strain TM1.
Appl. Environ. Microbiol., 49-55.
- * **NAGLE D. P., WOLFE R. S.** (1983)
Component coenzyme M methylreductase system of Methanobacterium. resolution into four components.,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 2151-2155.
- * **PARKIN G. F., SPEECE R. E., YANG-CHIN J., KOCHER W.** (1983)
Response of methane fermentation systems to industrial toxicants.
J.W.P.C.F., 55, 44-53.
- * **PATTEL G. D., ROTH L. A.** (1977)
Effect of sodium chloride on growth and methane production of methanogens.
Can. J. Microbiol., 23, 893-897.
- * **PATTEL G. B., KHAN A. W., ROTH L. A.** (1978)
Optimum levels of sulfate and iron for the cultivation of pure cultures of methanogens in synthetic media.
J. Appl. Bact., 45, 347-356.

- * **PATTEL G. B.** (1984)
Characterization and nutritional properties of Methanotrix concilii sp. nov., a mesophilic acetoclastic methanogen.
Can. J. Microbiol., 30, 1383-1396.
- * **PERSKI H. J., MOLL J. THAUER K. R.** (1981)
Sodium dependence of growth and methane fermentation in Methanobacterium thermoautotrophicum.
Arch. Microbiol., 130, 319-321.
- * **PERSKI H. J., SCHONHEIT P., THAUER K. R.** (1982)
Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria.
FEBS Lett., 143, 323-326.
- * **PETROFF D.** (1983)
Fermentation méthanique de polysubstrats ; aspects cinétiques et microbiologiques.
Thèse de Docteur Ingénieur en microbiologie - Université Claude Bernard - Lyon I.
- * **PETROFF D., TOUZEL J. P., ALBAGNAC G.** (1985)
Isolation and characterization of a new thermophilic acetoclastic methanogen, the strain CHTI 55.
Syst. Appl. Bact., 6, 66-71.
- * **POSTGATE J. R.** (1979)
The sulfate reducing bacteria.
Ed. Cambridge University Press, 86-97.
- * **ROBINSON R. W., AKIN D. E., NORDSTEDT R. A., THOMAS M. V., ALDRICH H. G.** (1984)
Light and Electron microscopic examination of methane producing biofilms from anaerobic fixed bed reactors.
Appl. Environ. Microbiol., 48, (1), 127-136.
- * **ROMESSER J. A., WOLFE R. S.** (1982 a)
C.D.R. factor, a new coenzyme required for carbon dioxide reduction to methane by extracts of Methanobacterium thermoautotrophicum.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. orig. C., 271-276.
- * **ROMESSER J. A., WOLFE R. S.** (1982 b)
Coupling of methyl coenzyme M reduction with carbon dioxide activation in extracts of Methanobacterium thermoautotrophicum.
J. Bact., 152, (2), 840-847.
- * **RONNOW P. H., GUNNARSON L. A. H.** (1982)
Response of growth and methane production to limiting amounts of sulfide and ammonia in two thermophilic methanogenic bacteria.
FEMS Microbiol. Lett., 14, 311-315.
- * **ROY F., ALBAGNAC G., SAMAIN E.** (1985)
Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long-chain fatty acids.
Appl. Environ. Microbiol., 702-705.

- * **ROY F., SAMAIN E., DUBOURGUIER H. C., ALBAGNAC G.** (1986)
Syntrophomonas sapovorans sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. Arch. Microbiol., 142-147.
- * **SAMAIN E.** (1983)
Métabolisme des composés intermédiaires de la fermentation méthanique. Isolement et caractérisation des bactéries impliquées. Influence des conditions de cultures sur leur métabolisme.
Thèse de 3e cycle - Université des Sciences et Techniques de Lille.
- * **SAMAIN E., DUBOURGUIER H. C., ALBAGNAC G.** (1984)
Isolation and characterization of Desulfobulbus elongatus sp. nov., from a mesophilic industrial digester.
Syst. Appl. Microbiol., 219.
- * **SAUER F. D., ERFLE J. D., MAHADEVAN S.** (1981)
Evidence for an internal electrochemical gradient in Methanobacterium thermoautotrophicum.
J. Biol. Chem., 256, 9843-9848.
- * **SEELY R. J., KRUEGER R. D., FAHRNEY D. E.** (1983)
Cyclic -2,3- Diphosphoglycerate levels in Methanobacterium thermoautotrophicum reflect inorganic phosphate availability.
Biochemical and Biophys. Res. Comm., 116, (3), 1125-1128.
- * **SEELY R. J., FAHRNEY D. E.** (1984)
Levels of cyclic -2,3- Diphosphoglycerate in Methanobacterium thermoautotrophicum during phosphate limitation.
J. of Bact., 160, (1), 50-54.
- * **SCHEFER D. M., DAVIS C. L., BRYANT M. P.** (1980)
Ammonia saturation constants for predominant species of Rumen bacteria.
J. Dairy Sci., 63, 1248-1263.
- * **SCHERER P., SAHN H.** (1981)
Effect of trace elements and vitamins on the growth of Methanosarcina barkeri.
Acta Biotechn., 1, 57-65.
- * **SCHERER P., SAHN H.** (1981)
Influence of sulfure containing compounds on the growth of Methanosarcina barkeri in a defined medium.
J. Appl. Microbiol. Biotech., 12, 28-35.
- * **SCHERER P., LIPPERT H., WOLFE G.** (1983)
Composition of the major elements and trace elements of 10 methanogenic bacteria. Determined by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry. Biological trace element Research, 5, 149-163.
- * **SCHINK B., STIEB H.** (1983)
Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly gram-negative non sporeforming bacterium. Pelobacter venetianus sp. nov.
Appl. Environ. Microbiol., 45, 1905-1913.

- * **SCHONEIT P., MOLL J., THAUER R. K. (1979)**
Nickel, Cobalt and Molybdenum requirement for growth of Methanobacterium thermoautotrophicum.
Arch. Microbiol., 123, 105-107.
- * **SCHONEIT P.O., KRISTJANSSON J. K., THAUER R. K. (1982)**
Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out compete methanogens for acetate.
Arch. Microbiol., 132, 285-288.
- * **SCHONEIT P., PERSKI H. J. (1983)**
ATP synthesis driven by a potassium diffusion potential in Methanobacterium thermoautotrophicum is stimulated by Sodium.
FEBS Lett., 20, 263-267.
- * **SHAPIRO S., WOLFE R. S. (1980)**
Methyl coenzyme M, an intermediate in methanogenic dissimulation of C₁ compounds by Methanosarcina barkeri.
J. of Bact., 141 (2), 728-734.
- * **SIEBERT M. L., TORIEN D. F. (1969)**
The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sewage sludge.
Wat. resc., 3, 241.
- * **SMITH M. R., MAH R. A. (1978)**
Growth and methanogenesis by Methanosarcina strain 227 on acetate and methanol.
Appl. Environ. Microbiol., 870-879.
- * **SMITH M. R., ZINDER S. H., MAH R. A. (1980)**
Microbial methanogenesis from acetate.
Process Biochem., 15, (4), 34-39.
- * **SMITH C. J., HESPELL R. B., BRYANT M. P. (1980)**
Ammonia assimilation and glutamate formation in anaerobic Selmonas ruminantium.
J. Bact., 141, 593-602.
- * **SPEECE R. E., MC CARTY P. L. (1964)**
Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion.
In advances in waters pollution research, 2, 305-322.
- * **SPEECE R. E. (1983)**
Environmental requirements for anaerobic digestion of biomass. Advances of solar energy.
Ann. Rev. Res. Dev.
- * **SPEECE R. E., PARKIN G. F., GALLAGHER D. (1983)**
Nickel stimulation of anaerobic digestion.
Wat. Res., 17, 677-683.
- * **SPEECE R. E., PARKIN G. F. (1983)**
The response of methane bacteria to toxicity.
Technical session - 3rd Int. Symp. on anaerobic digestion, 14-20 August - Boston.

- * **SPROTT G. D., SHAW K. H., JARRELL K. F.** (1981)
K⁺, Na⁺ and Mg⁺⁺ content and permeability of Methanospirillum hungatei and Methanobacterium thermoautotrophicum.
Can. J. Microbiol., 27, 444-451.
- * **SPROTT G. D., SHAW K. H., JARRELL K. F.** (1984)
Ammonia/potassium exchange in methanogenic bacteria.
J. Biol. Chem., 259, 12602-12608.
- * **SPROTT G. D., SOWDEN L. C., COLYIN J. R., JARRELL K. F.** (1984)
Methanogenesis in absence of intracytoplasmic membranes.
Can. J. Microbiol., 30, 594-604.
- * **SPROTT G. D., SHAW K. H., JARRELL K. F.** (1985)
Methanogenesis and the K⁺ transport system are activated by divalent cations in ammonia treated cells of Methanospirillum hungatei.
J. Biol. Chem., 260, 9244-9250.
- * **SPROTT D. G., PATTEL G. B.** (1986)
Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria.
Syst. Appl. Microbiol., 7, 358-363.
- * **STIEB H., SCHINK B.** (1985)
Anaerobic oxidation of fatty acids by Clostridium bryantii sp. nov., a sporeforming obligately syntrophic bacterium.
Arch. Microbiol., 140, 387-390.
- * **STUCKEY D. C., OWEN W. F., MC CARTY P. L.** (1980)
Anaerobic toxicity evaluation by batch and semi-continuous assays.
J. Wat. Control. Fed., 52, 720-729.
- * **STUPPERICH E., HAMMEL K. E., FUCHS G., THAUER R. K.** (1983)
Carbon monoxide fixation into the carboxyl group of acetyl Coenzyme A during autotrophic growth of Methanobacterium.
FEBS Lett., 152, 21-23.
- * **TAYLOR C. D., WOLFE** (1974)
Structure and methylation of coenzyme M.
J. Biol. Chem., 249, 4879-4885.
- * **TAYLOR G. T., PIRT S. J.** (1977)
Nutrition and factors limiting the growth of a methanogenic bacterium Methanobacterium thermoautotrophicum.
Arch. Microbiol., 113, 17-22.
- * **THAUER R. K., JUNGER K., DECKER** (1977)
Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria.
Bact. Rev.; 41, (1), 100-160.
- * **THAUER R. K., MORRIS J. G.** (1984)
Metabolism of chemotrophic anaerobes, old views and new aspects.
The microbe, Part II, Procaryotes and eucaryotes.
Cambridge University Press.
- * **TOUZEL J. P., ALBAGNAC G.** (1983)
Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC₃.
FEMS Microbiol. Lett., 16, 241-245.

- * **TOUZEL J. P., ALBAGNAC G.** (1984)
Acetoclastic methanogens in anaerobic digesters.
Proc. of the 1st Symp. Minneapolis, 15 - 17 August 1984 ; 35-39.
- * **TZENG S. F., WOLFE R. S., BRYANT M. P.** (1975)
Factor 420 dependant pyridine nucleotide linked hydrogenase system of Methanobacterium ruminantium.
J. Bact., 121, (1), 154-191.
- * **VAN BEELEN P., STASSEN A. P. M., BOSCH J. W. G., VOGELS G. D. GUIJT W., HAASNOOT C. A. G.** (1984)
Elucidation of the structure of methanopterin, a coenzyme from Methanobacterium thermoautotrophicum using two dimentional nuclear-magnetic resonance techniques.
Eur. J. Biochem., 138, 563-571.
- * **VAN DEN BERG L. , LENTZ C. P.** (1971)
Food processing waste treatment by anaerobic digestion.
Natl. res. Concl of Canada, 15981.
- * **VAN DEN BERG L., PATTEL G. B., CLARCK D. S., LENTZ C. P.** (1976)
Factors affecting rate of methane formation from acetic acid by enriched methanogenic cultures.
Can. J. Microbiol., 22, 1312-1319.
- * **VAN DEN BERG L., LENTZ C. P.** (1977)
Food processing waste treatment by anaerobic digestion.
In proceedings of the 32nd industrial waste conference.
Purdue University, 252-258.
- * **VAN DEN BERG L., LAMB K. A., MURRAY W. D., ARMSTRONG D. W.** (1980)
Effects of sulfate, iron and hydrogen on the microbiological conversion of acetic acid to methane.
J. Appl. Bacteriol., 1-11.
- * **VAN VELSEN A. F. M., LETTINGA G.** (1979)
Effect of feed composition on digester performance.
1st Symp. on anaerobic digestion - CARDIFF, 17-21 September.
- * **VERRIER D.** (1984)
Méthanisation d'effluents agro-alimentaires en réacteurs à cellules fixées. Exemples d'applications et facteurs conditionnant la fermentation et la structure des biofilms.
Thèse de Docteur Ingénieur - Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.
- * **VERRIER D., ALBAGNAC G.** (1985)
Adhesion of anaerobic bacteria from methanogenic sludge onto inert solid surfaces.
Energy from biomass - 3rd E.C. Conference, 537-541.
- * **VOGELS G. D., KELTJENS J. T., HUTTEN J., VAN DER DRIFT C.** (1982)
Coenzyme of methanogenic bacteria.
Zbl. bakt. Hyg., I. Abt. orig. C₃, 258-264.

- * **WEBB A. R., HAWKES F. R.** (1985)
The anaerobic digestion of poultry, manure. Variation of gas yield with influent concentration and ammonium nitrogen levels.
Agri. Wastes, 14, 135-156.
- * **WIDDEL F., PFENNING N.** (1982)
Studies on dissimilatory sulfate reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by Desulfobulbus propionicus gen., nov., sp., nov.
Arch. Microbiol., 131, 360-365.
- * **WOESE C. R., MAGRUM L. J., FOX G. E.** (1978)
Archaeobacteria.
J. Mol. Evid., 11, (3), 245-252.
- * **WOLFE R. S.** (1979)
Methanogens a surprising microbial group.
Antonie Van Leeuwenhoeck, 45, 353-364.
- * **YAMAZAKI S., TSAI** (1980)
Purification and properties of 8-hydroxy-5 deazaflavin dependant NAD P⁺ reductase from Methanococcus vannielii.
J. Biol. Chem., 225, (3), 6462-6465.
- * **ZEHNDER A. J. B., BROCK T. D.** (1979)
Biological energy production in the apparent absence of electron transport and substrate level phosphorylation.
FEBS Lett., 107, (1), 1-3.
- * **ZEHNDER A. J. B., HUSER B.A., BROCK T. D., WUHRMANN K.** (1980)
Characterization of an acetate decarboxylating non hydrogen oxidizing methane bacterium.
Arch. Microbiol., 124, 1-11.
- * **ZEHNDER A. J. B., INGVORSEN K., MARTI T.** (1982)
Microbiology of methane bacteria. Anaerobic digestion. 2nd Inter. Symp. on anaerobic digestion - Travemunde, 6-11 September 1981.
Elsevier Biomedical Press, RFA.
- * **ZEIKUS J. G.** (1977)
The biology of methanogenic bacteria.
Bact. Rev., 41, 514-541.
- * **ZEIKUS J. G.** (1979)
Microbial population in anaerobic digesters.
1st Inter. Symp. on anaerobic digestion - Cardiff, 17-21 September.
- * **ZEIKUS J. G.** (1983)
Metabolism of one-carbon compounds by chemotrophic anaerobes.
Adv. Microbiol. Physiol., 24, 215-299.
- * **ZINDER S., MAH R. A.** (1979)
Isolation and characterization of a thermophilic strain of Methanococcus unable to use H₂-CO₂ for methanogenesis.
Appl. Environ. Microbiol., 38, (5), 996-1008.

- * ZINDER S. H., CARDWELL S. C., ANGUISH T., LEE M., KOCH (1984)
Methanogenesis in thermophilic (58°) anaerobic digester. Methanotrix sp
as an important acetoclastic methanogen.
Appl. Environ. Microbiol., 47, 796-807.

- * ZOETMEYER R. J.; VAN DEN HENVEL J. C., COHEN A. (1982)
PH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic
digester.
Water. Res., 16, 303-311.