

**UNIVERSITE DE PROVENCE
AIX-MARSEILLE I**

THESE

présentée par

Jean-Pierre GUYOT

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR-MENTION SCIENCES

(Biologie Cellulaire-Microbiologie)

**ETUDE DE QUELQUES INTERACTIONS
MICROBIENNES LORS DE LA DIGESTION
ANAEROBIE DE LA MATIERE ORGANIQUE
PAR DES CULTURES MIXTES
DEFINIES OU NATURELLES**

Soutenue le 11 octobre 1990 devant la Commission d'Examen

**MM. J.P. BELAICH
G. DUMENIL
J.L. GARCIA Président
R. MOLETTA Rapporteur
A.J.B. ZEHNDER Rapporteur**

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
1. Etude bibliographique	2
1.1. Le traitement anaérobie des eaux usées	3
1.2. Microbiologie des réacteurs anaérobies	12
1.2.1. Première étape de la digestion anaérobie	12
1.2.2. Seconde étape de la digestion anaérobie	15
1.2.2.1. Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène	15
1.2.2.2. Les bactéries homoacétogènes	19
1.2.2.3. Les bactéries sulfato-réductrices	20
1.2.3. Troisième étape de la digestion anaérobie	21
1.2.4. Régulation de la digestion anaérobie par l'hydrogène	27
1.2.4.1. Le transfert interspèce d'hydrogène	27
1.2.4.1.1. TIH et bactéries fermentatives	27
1.2.4.1.2. TIH et bactéries sulfato-réductrices	29
1.2.4.1.3. TIH obligatoire	31
1.2.4.2. Hydrogène et méthanogénèse à partir de l'acétate	32
1.3. Conclusion	33
2. Travaux sur publications	34
2.1. Méthanogénèse à partir du saccharose par un consortium microbien défini immobilisé	35
2.2. Production de méthane à partir de propionate par une culture mixte définie méthanogène	44
2.3. Méthanogénèse à partir du xylane par des cultures mixtes composées de <u>Cellulomonas</u> sp. associée à des méthanogènes et <u>Desulfovibrio vulgaris</u> : inhibition de la réaction acétoclastique par le formate	50
2.4. Production de méthane à partir du formate par une association syntrophique entre <u>Methanobacterium Bryantii</u> et <u>Desulfovibrio vulgaris</u> J. J.	57
2.5. Comparaison expérimentale de deux types de digesteurs anaérobies	61
2.6. Inhibition par le formate de la dégradation anaérobie par des boues granulaires de l'acétate	78
2.7. Evolutions des activités et populations microbiennes de boues granulaires provenant d'un réacteur UASB	84
3. Discussion générale	92
4. Conclusion générale	104
Bibliographie	107
Articles de l'auteur présentés dans le cadre de cette thèse	123

ABSTRACT

Study of some microbial interactions during anaerobic digestion of organic matter by defined or natural mixed cultures.

The use of natural or defined mixed cultures has allowed the study of some microbial interactions during anaerobic degradation of organic matter. Anaerobic defined mixed cultures were successfully immobilized with agar. Interspecies hydrogen transfer was demonstrated between E. coli and methanogens and between Desulfovibrio vulgaris and Methanosarcina bryantii from formate. During the study of methanation of xylan by defined mixed cultures, inhibition of methanogenesis from acetate by formate was demonstrated, these results were confirmed using granular sludge from an UASB reactor. With granular sludge from the same reactor, studies were performed in order to determine their quantitative microbial composition and the activities of anaerobic volatile acids (acetate, propionate) degradation. A general discussion about the ecological signification of hydrogenophilic methanogens able to use formate is presented, together with a critical analysis of the theory of formate interspecies transfer.

KEYWORDS: Anaerobic digestion, Methanogens, UASB reactor, Sulfatoreducing bacteria, Interspecies hydrogen transfer, Inhibition, Mixed cultures, Volatile fatty acids.

Avant-Propos

Cette thèse a été réalisée dans différents laboratoires, dans le cadre de mes activités comme chercheur ORSTOM. Nous pourrions la qualifier de thèse itinérante, car elle a été conçue au laboratoire de R.S. Wolfe à l'Université de l'état de l'Illinois (USA), poursuivie éphémèrement dans les laboratoires de l'IRCHA, Vert-le-Petit, pour aboutir, au gré des accords passés entre l'ORSTOM et l'Université de Provence, à Marseille dans les locaux de cette Université et finalement trouver son dernier havre à l'Université Autonome Métropolitaine, unité Iztapalapa, coopération oblige! Pour aussi pénibles qu'aient été parfois ces différents changements, les efforts nouveaux d'adaptations nécessités à chaque nouvelle affectation ont été autant de défis formateurs. Je peux affirmer que grâce à cette thèse j'aurai appris mon métier de chercheur, qui à l'ORSTOM ne consiste pas seulement à s'asseoir au coin d'une paillasse, mais aussi à utiliser au mieux ses connaissances de plomberie, d'électricité et de gestion des ressources (ou carences) humaines, financières, et techniques. Puisse une telle formation avoir encore cours et longue vie, car on y respire une certaine idée de l'aventure!...

Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements à M. Jean-Louis Garcia, chercheur ORSTOM et directeur de cette thèse, pour m'avoir aidé par sa compréhension et gentillesse tout au long de ce chemin.

Je remercie M. Jean-Pierre Belaich, professeur et directeur de la formation doctorale à l'Université de Provence, pour l'intérêt qu'il a bien voulu me manifester et pour l'excellence de son cours de troisième cycle d'énergétique microbienne, que j'ai eu le plaisir de suivre comme étudiant de D.E.A. en faculté de pharmacie (Marseille).

Je remercie M. Ralf Wolfe, professeur à l'Université de l'Illinois (Champaign-Urbana, USA): puisse t'il ne pas avoir à se repentir de m'avoir accueilli comme élève ORSTOM dans son laboratoire. A lui et son équipe, je dois ma formation actuelle et toute ma reconnaissance.

Je remercie M. Guy Albagnac et M. Henri-Charles Dubourguier, respectivement chercheur à l'INRA et professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, pour la gentillesse et l'attention que j'ai toujours reçues de leur part lors de mes débuts balbutiants dans cette science.

Je remercie tous mes collègues et amis mexicains du département de biotechnologie de l'Université Autonome Métropolitaine, unité Iztapalapa, en particulier M. Oscar Monroy et M. Adalberto Noyola, pour m'avoir donné l'opportunité de créer le premier laboratoire de microbiologie des anaérobies strictes existant au Mexique, et permis de réaliser une partie de cette thèse dans un contexte répondant aux finalités de l'ORSTOM.

Je remercie particulièrement mes professeurs du secondaire de l'Ecole Nationale de Chimie de Paris, et ceux du Lycée Fénelon de Paris (HX3), qui par leur dévouement m'ont donné le goût d'entreprendre des études supérieures. Je souhaite à beaucoup de jeunes de rencontrer des professeurs aussi extraordinaires.

Mes amitiés à Maurice Rimbault pour m'avoir recruté à l'ORSTOM, et donné ainsi l'opportunité d'exercer mes talents au sein de cette structure.

Un grand salut amical à Claude Paycheng qui a été parmi les pionniers de notre groupe ORSTOM de microbiologie des anaérobies, et nous a apporté une aide précieuse et indispensable lors de sa création.

J'exprime ma gratitude aux membres du jury, pour avoir bien voulu consacrer une partie de leur temps et de leur expérience à juger ce travail.

Je dédie ce travail à mon épouse, à mes enfants, à mon frère et aux copains.

INTRODUCTION

La digestion anaérobie est un phénomène d'une extrême complexité, dont la nature a ouvert de nombreuses voies de recherches en écologie microbienne, biologie moléculaire, physiologie microbienne, taxonomie, génie sanitaire, production d'énergie, biotechnologie, etc... Le phénomène en lui-même se déroule dans des écosystèmes d'une diversité extrême: sédiments marins et d'eau douce, milieux extrêmes thermophiles ou halophiles, tractus digestifs d'animaux supérieurs et inférieurs, sols, digesteurs anaérobies (Zeikus, 1977; Zehnder, 1980). Malgré cette diversité, le concept de digestion anaérobie peut s'énoncer en une théorie relativement unitaire, dont les variantes s'appliquent aux particularités des milieux étudiés: compétitions entre micro-organismes en fonction des accepteurs minéraux d'électrons présents (Zehnder, 1980; Kristjansson et al., 1982; Schohneit et al., 1982) et en fonction des conditions de milieu.

Les différentes crises énergétiques de cette dernière décade, ont incité les pouvoirs publics à appuyer les recherches concernant les productions alternatives d'énergie et l'utilisation de la biomasse. De ce fait, l'étude des bactéries anaérobies strictes impliquées dans le processus de digestion anaérobie a connu une grande impulsion. On a assisté ces dernières années à un désengagement financier des organismes impliqués dans ces financements et l'étude de la production de "biogaz" ne fait plus recette au laboratoire. Par contre, un regain d'intérêt s'est manifesté quant aux applications des potentialités des bactéries anaérobies strictes à l'épuration des eaux usées, au recyclage des ordures ménagères et à la désulfurisation des pétroles et charbons; il suffit pour s'en rendre compte de reconnaître l'importance du Symposium International de Digestion Anaérobie organisé à date régulière par l'IAWPRC (International Association on Water Pollution Research and Control) et de prendre connaissance du programme du dernier "Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals", organisé par le "Oak Ridge National Laboratory" sous les auspices du département de l'énergie des Etats-Unis d'Amérique.

L'étude bibliographique qui suit et les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse, seront essentiellement liés aux aspects microbiologiques de la digestion anaérobie, et en particulier dans la seconde partie de ce travail, à son application au traitement des eaux résiduaires, tant urbaines qu'industrielles. En effet, cette thèse sera structurée autour de deux perspectives complémentaires: (i) une étude plus fondamentale de l'écophysiologie microbienne de la digestion anaérobie, en utilisant comme modèles des cultures mixtes définies méthanogènes, un tel travail pouvant aboutir à des aspects appliqués, par exemple la production d'inocula sous forme de cellules immobilisées; (ii) une prolongation de cette première partie par l'étude des cultures mixtes non définies naturelles que sont les boues granulaires des réacteurs UASB.

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Le traitement anaérobie des eaux usées.

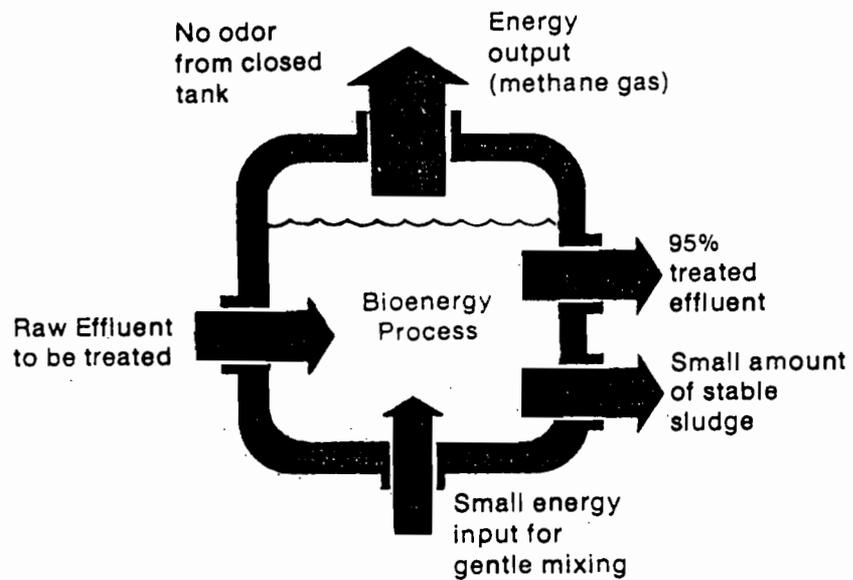
Le traitement anaérobie des eaux usées présente dans de nombreux cas des avantages supérieurs aux traitements aérobies conventionnels, tel celui des boues activées (Fig. 1). Avec les procédés aérobies 30 à 60 % de la DBO (Demande Biologique en Oxygène) entrante est convertie en biomasse, c'est-à-dire en boue qu'il faut ensuite coûteusement traiter; dans le cas des traitements anaérobies, la quantité de boue formée varie de 5 à 10 % de la matière organique entrante et la majeure partie de la charge organique est transformée en biogaz, mélange de méthane et de CO₂ essentiellement. Un second avantage important du traitement anaérobie est le bilan énergétique positif comparé à celui du traitement aérobie. En effet, dans le premier cas l'énergie dépensée pour agiter le milieu est moindre (ou parfois nulle) que dans le second où il faut agiter fortement le milieu pour son aération; de surcroît la digestion anaérobie de la matière organique produit du méthane, pouvant être utilisé pour le réchauffage du réacteur ou être converti en énergie électrique.

En raison principalement de ces considérations, le choix de la technologie anaérobie représente économiquement une bonne alternative par rapport aux procédés aérobies habituellement employés, ce qui est vrai pour les pays industrialisés l'est encore plus pour les pays en développement.

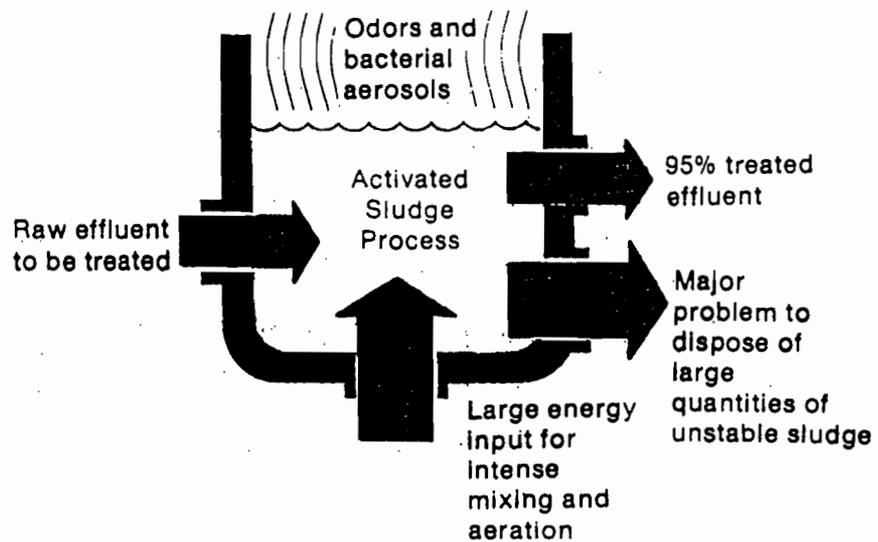
Les nombreuses améliorations apportées aux procédés de traitements anaérobies des effluents urbains et industriels, ont été dues aux progrès effectués dans la compréhension de la microbiologie de ces réacteurs. Progrès que les ingénieurs ont réussis à conceptualiser au niveau des dessins des réacteurs et de leur fonctionnement. Un des grands principes consiste en la différenciation du temps de rétention hydraulique (TRH) du temps de rétention cellulaire (TRC). En effet, le temps de génération de la biomasse impliquée dans ces procédés est excessivement long pour des processus industriels, ce temps étant essentiellement limité par les taux de croissance des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (OHPA) et les bactéries méthanogènes, ces bactéries étant décrites dans la partie microbiologique de cette étude.

De manière à retenir ou recycler la biomasse active dans les réacteurs et à diminuer autant que possible les TRH, afin d'avoir des procédés pouvant accepter des charges organiques élevées et opérant dans de meilleures conditions industrielles, les différentes configurations de réacteurs destinés au traitement anaérobie des eaux usées ont évolués. On peut actuellement compter trois générations de procédés (Speece, 1983).

Anaerobic



Aerobic



A comparison of anaerobic and aerobic processes.

Fig. 1 Comparaison des procédés anaérobies et aérobies.

La première génération comprend les procédés où la biomasse est en suspension, les plus primitifs sont la fosse septique et le réacteur Imhoff (Fig. 2). L'introduction de l'agitation a conduit à la configuration du réacteur infiniment mélangé où $TRH = TRC$. Sa principale application consiste dans le traitement des boues issues des usines de traitement aérobie par boues activées.

Une première amélioration a consisté ensuite à rajouter une cuve de décantation à la sortie du réacteur et à recycler la biomasse; dans ce cas on fait référence au procédé contact anaérobie. Les TRH sont de l'ordre de 5 à 10 jours et le TRC de 15 à 30 jours. Cette technologie est particulièrement souhaitable quand l'effluent contient des solides difficiles à digérer et sédimentant facilement. La table 1 donne quelques exemples des performances que l'on peut attendre de ce type de procédé.

La seconde génération fait appel à la rétention de la biomasse à l'intérieur du réacteur, sans nécessité de recirculation. On peut citer le filtre anaérobie (Young et McCarty, 1969) (Fig. 2, Table 2), qui est un réacteur rempli de supports naturels (cailloux) ou synthétiques (anneaux de PVC), le remplissage pouvant être ordonné ou au hasard. La limitation de ces procédés est essentiellement due à la présence de matières solides en suspension dans l'effluent à traiter, occasionnant l'obstruction des garnitures. Par contre, ces procédés à cellules fixées présentent en général une meilleure résistance à des effluents toxiques (Parkin et Speece, 1983) et une adaptation rapide à des variations dans l'alimentation (van den Berg et al., 1980).

Le réacteur tubulaire à pellicule fixée fut conçu par van den Berg et Lentz (1979) pour éviter l'accumulation de boue à l'intérieur du réacteur. Le réacteur peut être à flux ascendant ou descendant. Les supports utilisés peuvent être soit des tubes, soit des plaques, disposés de telle manière qu'ils créent des canaux verticaux. Les charges appliquées peuvent atteindre $30 \text{ Kg DCO/m}^3 \cdot \text{j}$.

Un autre procédé de seconde génération, développé par le groupe hollandais de Lettinga (Lettinga et al., 1980), est basé sur une auto-immobilisation de la biomasse sous forme de granules (boues granulaires) ayant de bonnes caractéristiques de décantation et une forte activité méthanogène. C'est le procédé à flux ascendant à lit de boue dit "UASB" (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (Fig.2, Table 3). Etant donné que ce réacteur ne nécessite pas de garniture intérieure pour adhérer la biomasse, il s'avère économiquement attractif, mais son succès dépend d'une bonne granulation de la biomasse. Par ailleurs, le procédé UASB est doté à sa partie supérieure d'un système de séparation gaz-liquide-solide, lequel évite ou limite la sortie de matière en suspension et favorise l'évacuation du gaz et la décantation des boues, les charges organiques appliquées pouvant atteindre des valeurs de $40 \text{ Kg DCO/m}^3 \cdot \text{j}$. pour des TRH de l'ordre de quelques heures et variant suivant la nature de l'effluent à traiter. Tout comme les filtres anaérobies, le réacteur UASB a reçu de nombreuses applications industrielles au niveau du traitement des effluents de l'industrie agro-alimentaire.

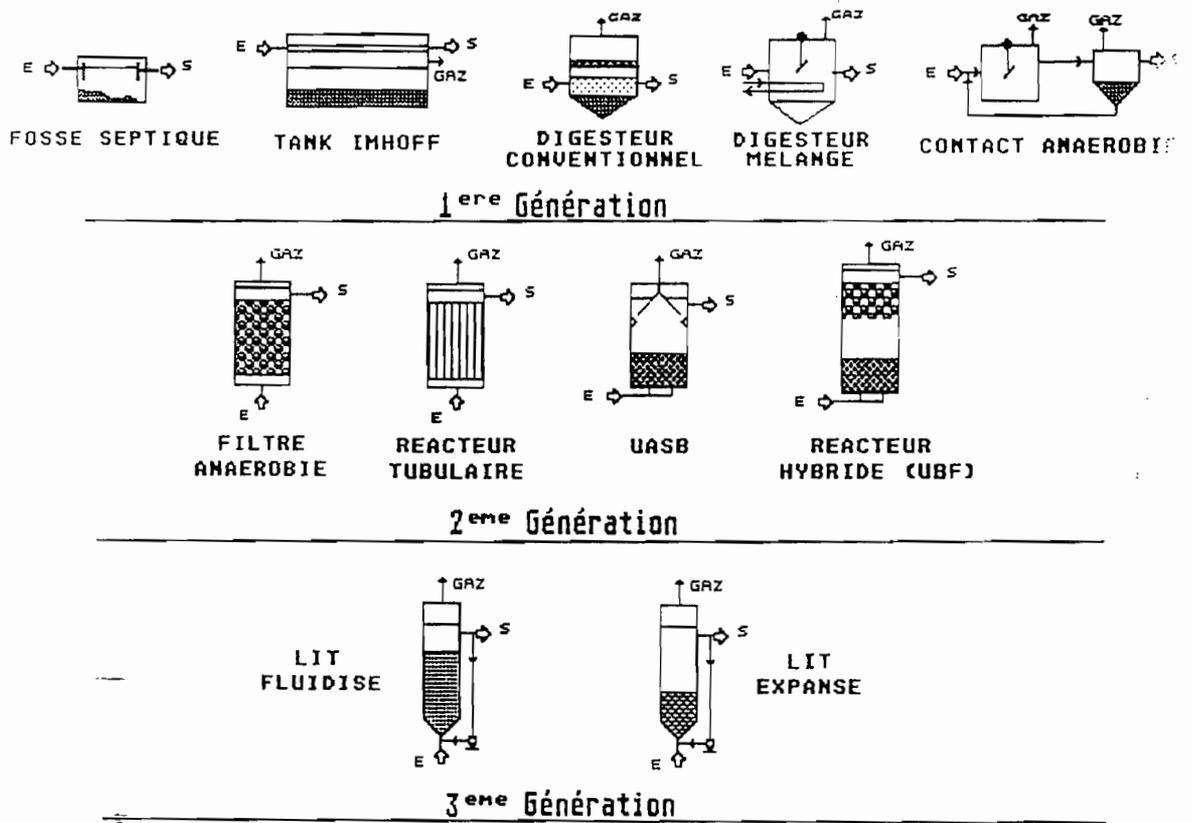


Fig. 2 Les différentes générations de digesteurs anaérobies destinés au traitement des eaux usées.

Table 1. Performances des réacteurs de type contact anaérobie.

EFFLUENT	CHARGE DE L'EFFLUENT (g/l)	MATIERE EN SUSPENSION (g/l)	VOLUME DU REACTEUR (l)	TEMPERATURE DU REACTEUR °C	CHARGE VOLUMETRIQUE (g/l.j)	RENDEMENT (DCO éliminée) %
Effluent d'emballage de viande	1,4 (SVT)	-	6-60	35	2-5	68-80
	1,5 (SVT)	0,8	22.10 ³	35	1,4-3,6	92-98
	1.7 (SVT)	0.8	2.6.10 ⁶	35	3	64
Effluent de conserverie	20 (DCO)	<5	5.10 ⁶	36-38	3	95
Effluent Industrie laitière	3 (DCO)	-	14.10 ³	35	1-2.5	55-70
Effluent Industrie betterave sucrière	4.7 (DCO)	<0.5	40	35-37	12-24	86-89
Effluent de blanchiment de haricot	20 (DCO)	<5	30	35	6.6	80
Boue d'égout synthétique	55 (DCO)	47	30	35	10	78

Remarque: DCO: Demande Chimique en Oxygène; SVT: Solides Volatils Totaux. Les charges volumétriques et les rendements sont donnés en DCO ou SVT, selon les unités utilisées pour la charge des effluents.

Table 2. Performances des réacteurs du type "filtre anaérobie".

EFFLUENT	CHARGE DE L'EFFLUENT g DCO/l	MATIERE EN SUSPENSION g/l	VOLUME DU REACTEUR l	TEMPERATURE DU REACTEUR °C	CHARGE VOLUMETRIQUE g/l.d	RENDEMENT (DCO) %
Surnageant de lisier de porc	10-60	<10	3.6	30	5-19.6	69-93
Liqueur noire	1.4	-	12	37	1-5	40-90
Effluent synthétique d'amidonnerie	8.7	-	6.7	35	2.5-10	79-93
Effluent industrie pharmaceutique	16	-	14	37	0.4-3.5	94-98
Effluent industrie mollusques	0.4-0.5	<0.1	23	-	0.1-1.3	40-80
Effluent industrie du caoutchouc	0.4-12	-	1.07.10 ⁶	35	2.5-11	50-67
Eaux usées urbaines	0.2	-	7	-	0.1	60
	0.2	-	8	-	0.18	75
Effluent synthétique distillerie	3-6	-	400	30	4-16	50-90
Effluent contenant du phénol	0.6-1.2	-	1	35	<2	90

Table 3. Performances réacteur UASB.

EFFLUENT	CHARGE DE L'EFFLUENT g DCO/l	MATIERE EN SUSPENSION g/l	VOLUME REACTEUR l	TEMPERATURE °C	CHARGE VOLUMIQUE g/l.d	RENDEMENT (DCO) %
Effluent de blanchiment de haricots	5,2	0,52	2,7	30	8-10	90-95
	10	1-3	3-4	25	10-15	88-94
Effluent d'abattoir	1,5-2,2	0,75-1,1	30	20	6	91
				30	10	87
Eaux usées urbaines	0,2-0,9	<0,3	120	8-20	0,7-2,7	50-85
Effluent industrie sucrière (betterave)	1-2,6	-	8.10 ⁵	30	10	79,3
Effluent industrie choucroute	10-20	<0,6	2,7	30	8-9	88-93
Effluent synthétique d'amidonnerie	8,7	-	6,7	35	2,5-10	68-87
Effluent industrie chimique	14	0	3-4	35	12-30	73-82
Effluent industrie pomme-de-terre	2-5	-	6.10 ³	19	3-5	95
				30	15-18	95
Effluent distillerie	10	-	5.10 ³	35	10,7-16,9	45-65
	30	-	-	30	0-24	65-70

Malgré tout, le phénomène de granulation des boues n'est pas complètement maîtrisé, et rend le procédé UASB d'application difficile quand on ne dispose pas d'une source appropriée d'inoculum, telles les boues de purge d'un autre réacteur UASB en opération. Néanmoins certains effluents conduisent facilement à la formation de boues granulaires, tels ceux de l'industrie sucrière. Actuellement, les recherches basées sur la compréhension des mécanismes de la granulation ont été fécondes (Dubourguier et al., 1987, 1988), mais devant l'extrême complexité du problème, aucune théorie générale de la granulation n'est apparue à ce jour, et les données disponibles ne sont pas toujours bien corrélées entre elles. La production de boues granulaires tient lieu le plus souvent du savoir-faire empirique, que d'une véritable démarche scientifique: peu de personnes peuvent se vanter actuellement de pouvoir produire des boues granulaires à la demande.

Récemment est apparu un procédé hybride, combinant les avantages respectifs du réacteur UASB et du filtre anaérobie: le réacteur UBF (Upflow Sludge Bed-Filter) (Guiot et van den Berg, 1984). La partie inférieure consiste en un lit de boue granulaire et la partie supérieure contient un support solide, cette configuration permettant un usage plus rationnel du volume du réacteur.

Les procédés de troisième génération font appels à la fluidisation d'un lit microbien fixé sur un support synthétique ou naturel (Jewell et al., 1981) (Fig. 2, Table 4). Le réacteur à lit fluidisé se caractérise par une fluidisation du lit supérieure à 50%, et le réacteur à lit expansé par une fluidisation de l'ordre de 20%. La surface de contact du support est très grande (supérieure à 200 m²/m³) et l'agitation est importante, ce qui élimine les problèmes de transfert de substrat. Les TRH sont inférieurs à 12 heures. Par contre, ces réacteurs consomment plus d'énergie et sont d'une technicité d'opération supérieure aux précédents. Les charges applicables peuvent dépasser 40 Kg DCO/m³.j.

L'ensemble de ces procédés est largement applicable dans les pays industrialisés, mais il n'en est pas de même pour les pays en voie de développement où le choix d'une technologie devra tenir compte des capacités économiques du pays et de ses potentialités techniques. Ainsi pour des pays de l'Amérique Latine comme le Mexique ou la Colombie, ou d'autres pays de niveau similaire, les procédés de seconde génération apparaissent comme des alternatives de choix, essentiellement en raison de leurs coûts, de leur simplicité de mise en oeuvre, du minimum de personnel technique requis pour leur maintenance, et pour leurs performances connues sur un large éventail d'effluents.

Table 4. Performances de réacteurs à lit fluidisé.

EFFLUENT	CHARGE DE L'EFFLUENT g DCO/l	MATIERE EN SUSPENSION g/l	VOLUME DU REACTEUR l	TEMPERATURE DU REACTEUR °C	CHARGE VOLUMIQUE g/l.j	RENDEMENT % (DCO)
Lactosérum	10	-	0,5	35	10-20	87
	55	-	50	35	17-37	65-84
Filtrat de lactosérum	10-30	-	60	30-35	8-24	80-90
Eaux usées urbaines	0,15-0,3	<0,1	1	20	0,65-35	0-85
Liqueur noire	1,4	-	1	22	10	80
Effluent synthétique contenant de la cellulose	0,3-1,8	-	0,5	30	2	74-83
					8	40-83

1.2. Microbiologie des réacteurs anaérobies.

Malgré la diversité des procédés impliqués dans le traitement anaérobie des eaux usées, l'écologie microbienne de ces réacteurs est basée sur les mêmes principes fondamentaux, régissant l'organisation des communautés microbiennes impliquées dans le processus de la dégradation anaérobie de la matière organique. Des différences peuvent ensuite apparaître suivant les spécificités des procédés ou des effluents à traiter.

Dans les digesteurs anaérobies, la matière organique subit une dégradation en trois étapes (McInerney et Bryant, 1981) (Fig. 3) pour aboutir à la formation de méthane, de gaz carbonique, et de sulfure d'hydrogène suivant les teneurs en sulfate de l'effluent.

1.2.1. Première étape de la digestion anaérobie.

Cette étape correspond à l'hydrolyse des macromolécules en oligomères, qui à leur tour font l'objet d'une fermentation en acides mono- ou di-carboxyliques, alcools, amines, gaz carbonique et hydrogène. Cette étape a été amplement étudiée en ce qui concerne la cellulolyse (Le Ruyet, 1984; Ljungdhal et Eriksson, 1985) et l'hydrolyse des hémicelluloses (Le Ruyet, 1984) mais peu de données sont disponibles concernant la protéolyse et la fermentation des acides aminés dans les réacteurs anaérobies (Nagase et Matsuo, 1982; Ollivier, 1985)).

L'étude de cette première étape a donné lieu à l'isolement de nombreuses espèces nouvelles, essentiellement cellulolytiques (Ljungdhal et Eriksson, 1985), mais toute bactérie fermentaire anaérobie stricte ou facultative est susceptible d'agir à ce niveau.

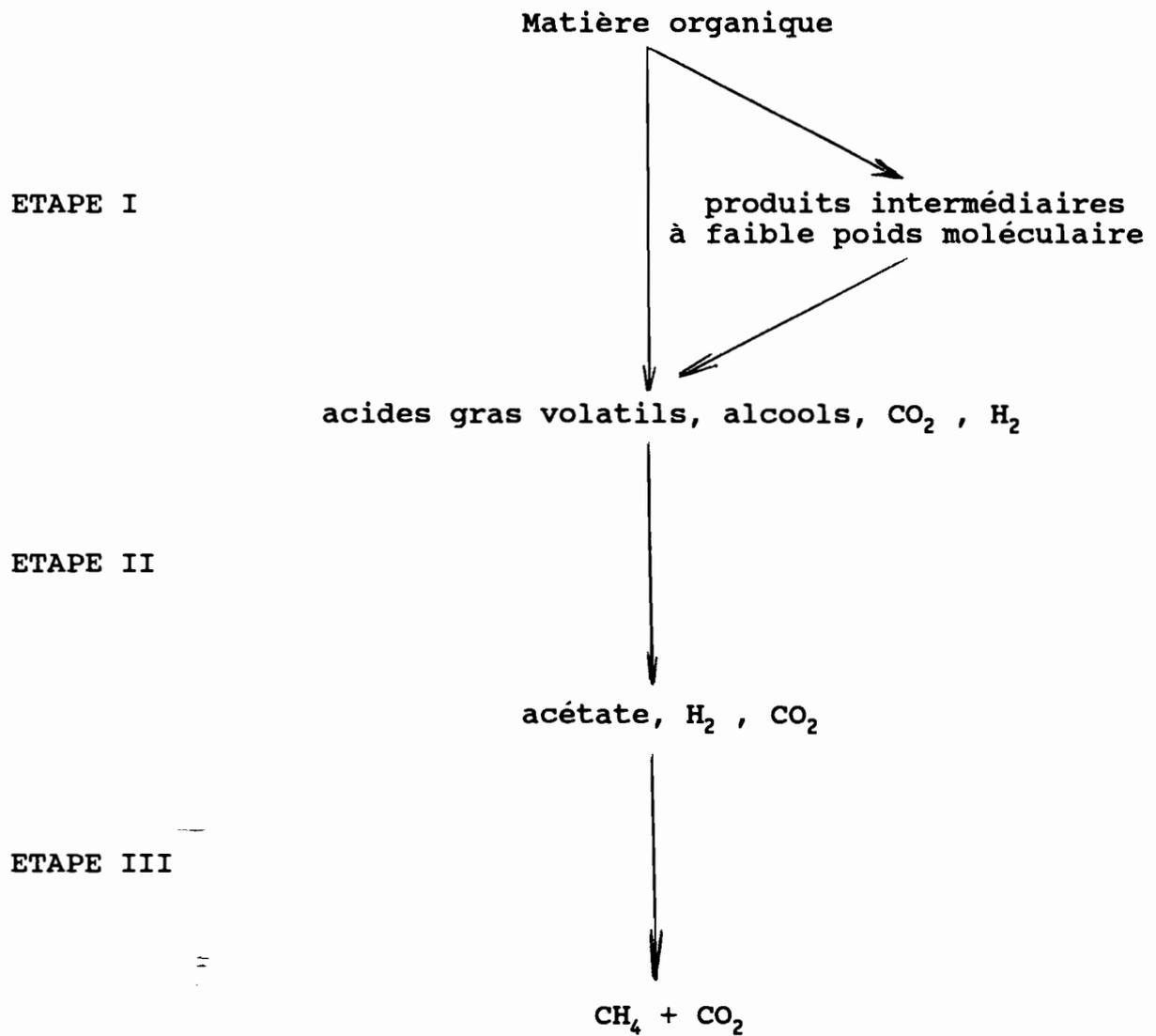


Fig. 3. Schéma de la dégradation anaérobie de la matière organique.

Par ailleurs, il convient de signaler que de nombreuses bactéries nouvellement découvertes sont capables de transformer des produits issus de la fermentation d'oses simples ou d'acides aminés, en composés directement utilisables par les bactéries de l'étape suivante. On peut citer à titre d'exemple Acetobacterium carbinolicum oxydant les alcools primaires aliphatiques de C3 à C5 en présence de gaz carbonique, en acide gras volatil correspondant (Eichler et Schink, 1984), Pelobacter acetylenicus (Schink, 1985) pouvant transformer l'éthanolamine, la choline, le 1,2-propanediol et le glycérol en acétate et éthanol, Ilyobacter polytropus fermentant le 3-hydroxybutyrate et le crotonate en acétate et butyrate, les acides maliques et fumariques en acétate, propionate et formate (Stieb et Schink, 1984). La découverte de ces bactéries particulières pourrait donner lieu à la définition d'une étape intermédiaire entre la première et la seconde, consistant en la transformation de certains produits à faible poids moléculaire, issus de la première étape, en substrats assimilables par la seconde (Fig. 3). Ce qui donnerait une vision plus complète du schéma général de dégradation anaérobie de la matière organique.

Cette première étape peut-être limitante quand des composés difficilement hydrolysables sont présents, tels des composés solides ou des substances de structure chimique particulière comme les dérivés des industries chimiques et pharmaceutiques. Actuellement l'étude de la dégradation anaérobie des composés aromatiques reçoit une grande attention, et de nombreux tests de biodégradabilité des différentes familles de ces composés permettent de définir l'applicabilité des traitements anaérobies aux effluents contenant ces molécules (Battersby et Wilson, 1989; Horowitz et al., 1982; Shelton et Tiedje, 1984; Wagener et Schink, 1987; Guyot et al., 1990). Ces substances requièrent parfois une longue adaptation des inocula et leur biodégradabilité peut être assujettie au co-métabolisme d'une autre molécule (Battersby et Wilson, 1989), ce qui rend dans ce cas l'application des procédés anaérobies particulièrement délicate. La compréhension de la microbiologie de la biodégradation de ces composés permettra certainement d'effectuer de grands progrès pour adapter ces procédés.

En ce qui concerne les substrats facilement hydrolysables, la surcharge d'un réacteur anaérobie conduit à une acidification du milieu et à une surproduction d'hydrogène par les bactéries fermentaires, provoquant une inhibition du procédé. La mesure de l'hydrogène est en général le paramètre qui permet de détecter rapidement des conditions opératoires mauvaises du réacteur, pouvant conduire à sa destabilisation (Harper et Pohland, 1985). L'augmentation de la teneur en hydrogène a des conséquences sur les étapes suivantes que nous étudierons plus en détail lors des paragraphes suivants. La diminution du pH a des répercussions directes sur les bactéries méthanogènes. Lors d'une étude sur l'action du pH sur la méthanogénèse, Attal et al. (1988) ont montré que dans un intervalle de pH de 5,4 à 7, l'utilisation de l'acétate par les bactéries acétoclastiques méthanogènes était fortement inhibée. Ces auteurs expliquent cette inhibition par le fait que la forme non-ionisée de l'acétate agit comme un agent de découplage, en

détruisant le gradient de pH intermembranaire et en modifiant le potentiel de membrane de la bactérie. En revanche, sur le même intervalle de pH, l'utilisation de l'hydrogène par les bactéries méthanogènes n'est pas affectée.

Par conséquent, le contrôle du démarrage d'un digesteur anaérobie, implique donc de ne pas mettre en conditions de surcharge la microflore de la première étape.

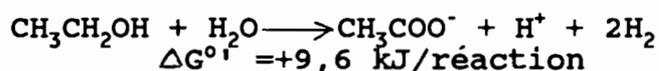
1.2.2. Seconde étape de la digestion anaérobie.

Cette étape pourrait être qualifiée de "clef de voûte" de l'édifice, car elle est le chemin obligé par lequel tous les produits de la première étape doivent passer afin d'être transformés en acétate, précurseur principal de la méthanogénèse dans les réacteurs anaérobies (Smith et Mah, 1966).

Les bactéries responsables de cette acétogénèse peuvent être classées en trois grands groupes: les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène ou OHPA selon la terminologie anglo-saxonne (Obligate Hydrogen Producing Acetogen), les bactéries homoacétogènes et les bactéries sulfato-réductrices.

1.2.2.1. Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène.

C'est grâce à la découverte de ce groupe de bactéries que le schéma de la méthanogénèse dans les digesteurs anaérobies a pu être résolu en trois grandes étapes (Bryant et al., 1967; McInerney et Bryant, 1981). Bryant et al. (1967) démontrèrent que Methanobacillus omelianskii, connu à l'époque pour transformer l'éthanol en présence de gaz carbonique en méthane et acétate, était en fait une association mixte syntrophique de deux bactéries: l'Organisme S oxydant l'éthanol en acétate et hydrogène, et une bactérie méthanogène utilisant l'hydrogène produit pour réduire le gaz carbonique en méthane. La formation d'hydrogène et d'acétate à partir de l'éthanol est énergétiquement défavorable:

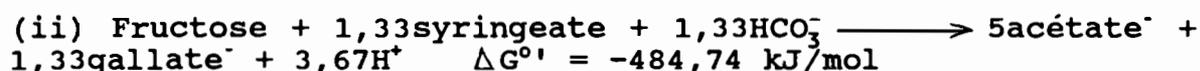
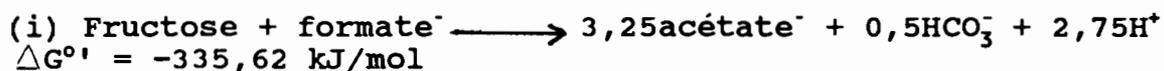


mais l'utilisation de l'hydrogène par la méthanogène rend la réaction globale thermodynamiquement favorable:



La croissance de l'Organisme S dépend donc de la présence d'une bactérie hydrogèneophile. Ce phénomène qui met le métabolisme d'une bactérie productrice d'hydrogène sous la dépendance d'une bactérie hydrogèneophile, a reçu le nom de transfert interspèce d'hydrogène. Les bactéries hydrogèneophiles peuvent être des bactéries méthanogènes

de pousser sur différents carbohydrates en absence d'un accepteur externe d'électrons. La particularité réside en ce que l'accepteur externe d'électron peut être soit une bactérie méthanogène, soit une des molécules suivantes: le formate, le 3,4,5,-triméthylbenzoate, le syringate, la vanilline, le vanillate, le cafféate et le férulate. Les équations suivantes illustrent certaines réactions réalisées par cette bactérie:



(iii) coculture avec Methanobrevibacter (réaction globale):

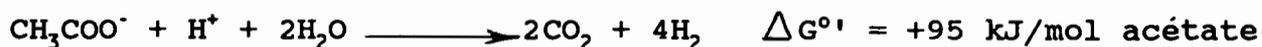


La demi-réaction réalisée par S. sucromutans est amplement exergonique:

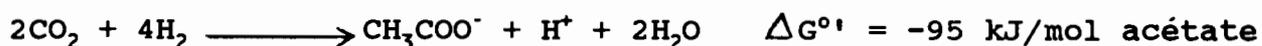


Ce n'est donc pas, à première vue, pour des raisons thermodynamiques que cette bactérie nécessite un accepteur externe d'électrons.

En 1984, Zinder et Koch ont reporté l'isolement d'une coculture capable de produire du méthane à partir de l'acétate, sur la base d'une oxydation syntrophique de l'acétate par transfert interspèce d'hydrogène. La bactérie responsable de l'oxydation de l'acétate réalise la réaction selon l'équation suivante:



Cette réaction devient exergonique quand la pression partielle en hydrogène est maintenue inférieure à $10^{-4,2}$ atm. La même bactérie est capable d'effectuer la réaction inverse en présence de fortes pressions partielles en hydrogène:



En raison de cette particularité, cette bactérie a reçu le surnom de "Reversibacterium (Thauer et al., 1989).

Les bactéries OHPA ont des temps de génération excessivement longs, par exemple S. wolinii en coculture avec Desulfovibrio sp. a un temps de génération de 87 heures, et en coculture avec Methanospirillum hungatei un temps de génération de 161 heures (Boone et Bryant, 1980). Ce qui rend l'isolement de ces bactéries fastidieux et, additionné à leur caractère syntrophique obligatoire, limite actuellement toute étude physiologique à leur sujet.

en absence de sulfate ou bien des bactéries sulfato-réductrices quand le milieu contient des sulfates. Nous verrons plus tard que ce phénomène a aussi des conséquences au niveau de la première étape de la digestion anaérobie.

Le transfert interspèce d'hydrogène et l'acétogénèse caractérisent essentiellement la seconde étape. On peut définir les bactéries OHPA comme étant des anaérobies strictes qui sur un substrat déterminé, de nature monomérique, produisent de l'acétate et de l'hydrogène, et dont la croissance et l'utilisation de ce substrat dépendent strictement de l'enlèvement de l'hydrogène du milieu.

Actuellement, très peu de bactéries OHPA ont été isolées. Il semblerait que cette étape aussi stratégique de la digestion anaérobie, soit commandée par un nombre restreint et très spécialisé de bactéries. Ce qui la rend encore plus vulnérable à une destabilisation.

Quatre espèces dégradant les acides gras ont été isolées en coculture avec des hydrogénophiles:

(i) Syntrophomonas wolfei (McInerney et al., 1981) qui oxyde les acides gras monocarboxyliques saturés de C4 à C8 en acétate et hydrogène pour les composés à nombre pair de carbones, et propionate et hydrogène pour les composés à nombre impair de carbones,

(ii) Syntrophobacter wolinii (Boone et Bryant, 1980) qui oxyde le propionate en acétate, gaz carbonique et hydrogène. récemment Mucha et al. (1988) ont confirmé que la dégradation du propionate passait par la voie du méthylmalonyl-CoA et ont proposé la voie métabolique montrée en Fig. 4,

(iii) Syntrophomonas sapovorans (Roy et al., 1986) qui oxyde les acides gras saturés de C4 à C18 et quelques acides gras insaturés,

(iv) Syntrophospora bryantii (Stieb et Schink, 1985; Zhao et al., 1990) qui oxyde les acides gras de C4 à C11.

A ce jour, il n'a été isolé et caractérisé qu'une seule espèce de bactérie OHPA capable d'oxyder en syntrophie le benzoate: Syntrophus buswellii (Mountfort, 1984) qui, sur la base de la molécule métabolisée, appartient aussi au groupe des bactéries de la première étape.

Il convient aussi de signaler que Pelobacter acetylenicus variété WoAcy 1 ne peut oxyder l'éthanol en acétate, qu'en présence de Acetobacterium woodii ou d'une bactérie méthanogène hydrogénophile (Schink, 1985). Cette bactérie a un "caractère OHPA" facultatif, selon le substrat sur lequel elle est cultivée.

Il existe aussi un cas particulier qu'il nous semble difficile de classer dans le groupe des bactéries OHPA mais qui est capable de réaliser un transfert interspèce d'hydrogène. Cette bactérie, Syntrophococcus sucromutans (Krumholz et Bryant, 1986) est incapable

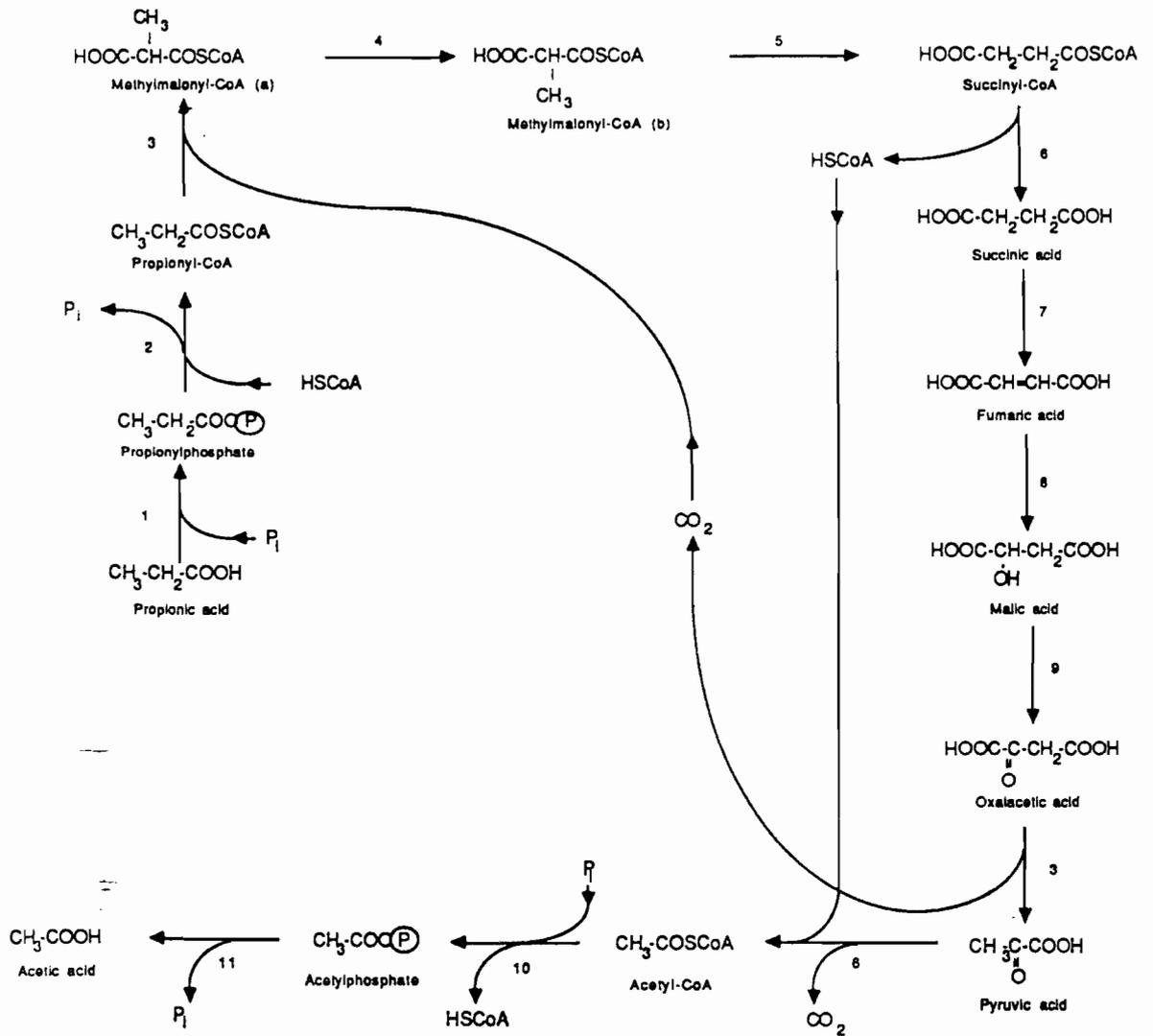


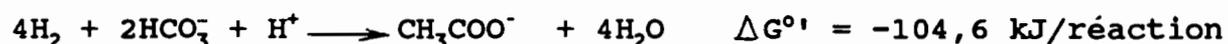
Fig. 6. Biochemical pathway of anaerobic degradation of propionate. (1) Propionate-kinase, (2) Phosphotransferase, (3) Methylmalonyl-CoA-pyruvat-transcarboxylase, (4) Methylmalonyl-CoA-racemase, (5) Methylmalonyl-CoA-isomerase, (6) HSCoA-transferase, (7) Succinate-dehydrogenase, (8) Fumarase, (9) Malate-dehydrogenase, (10) Phosphotransferase, (11) Acetate-kinase

Fig. 4 Voie métabolique de dégradation anaérobie du propionate.

Récemment, Beaty et McInerney (1987) et Zhao *et al.* (1990) ont respectivement démontré que S. wolfei et S. bryantii pouvaient être cultivés en culture pure sur crotonate, et plus prometteur pour le futur, Kaspar *et al.* (1987) ont réussi à découpler l'oxydation du butyrate de l'utilisation de l'hydrogène par M. hungatei, en utilisant la réduction d'oléfines par l'hydrogène produit par la bactérie OHPA en culture pure, en présence de catalyseurs d'hydrogénation. L'utilisation de cette nouvelle technique ouvrirait la voie à des études physiologiques et biochimiques, sur des cultures pures de bactéries OHPA.

1.2.2.2. Les bactéries homoacétogènes.

Ces bactéries sont capables de transformer le mélange hydrogène-gaz carbonique en acétate, selon l'équation suivante:



Elles peuvent aussi transformer des oses simples, tel le glucose, en acétate exclusivement. Chez certaines espèces, telle Eubacterium limosum (Genthner et Bryant, 1981, 1982), il existe la possibilité de produire de l'acétate et du gaz carbonique à partir de monoxyde de carbone.

Ce groupe de bactéries est connu depuis 1940 grâce à Wieringa qui isola Clostridium aceticum et Fontaine *et al.* (1942) qui isolèrent Clostridium thermoaceticum. Depuis de nouvelles espèces ont été décrites:

- Clostridium formicoaceticum (Andreesen *et al.*, 1970)
- Acetobacterium woodii (Balch *et al.*, 1977)
- Acetobacterium wieringae (Braun et Gottschalk, 1982)
- Acetogenium kivui (Leigh *et al.*, 1981)
- Acetobacterium carbinolicum (Eichler et Schink, 1984)
- Acetoanaerobium noterae (Sleat *et al.*, 1985)
- Acetothermus paucivorans (Dietrich *et al.*, 1988)
- Acetitomaculum ruminis (Greening et Leedale, 1989)

Par ailleurs, Ollivier *et al.* (1985) ont isolé une bactérie, Sporomusa acidovorans, pouvant réaliser une homoacétogénèse à partir du méthanol.

1.2.2.3. Les bactéries sulfato-réductrices.

Ce groupe de bactéries se caractérise par sa capacité à utiliser le sulfate comme accepteur final d'électrons (respiration sulfate). Il serait hors de propos de décrire exhaustivement ce groupe de bactéries constitué de nombreux genres et espèces, et l'on peut inviter le lecteur à consulter les excellentes revues de Pfennig et al. (1981) et de Widdel (1987) pour une description taxonomique détaillée. L'incidence de ce groupe dépend de la présence de sulfate dans l'effluent à traiter, ou de la capacité de certaines bactéries sulfato-réductrices à établir une relation de transfert interspèce d'hydrogène avec des méthanogènes hydrogèneophiles en absence de sulfate.

Néanmoins, les bactéries sulfato-réductrices (BSR) peuvent être globalement décrites sur la base de leur capacité à utiliser certains substrats, elles ont été ainsi divisées en deux groupes (Pfennig et al., 1981):

(i) les BSR du groupe I sont capables d'oxyder incomplètement le lactate en acétate et gaz carbonique et n'utilisent pas les acides gras volatils. La majorité des bactéries du groupe I sont capables d'utiliser l'éthanol. Les BSR les plus utilisées lors d'études physiologiques et biochimiques sont Desulfovibrio vulgaris et Desulfovibrio desulfuricans. Ces deux bactéries peuvent en absence de sulfate, d'établir un transfert interspèce d'hydrogène avec une méthanogène hydrogèneophile (Bryant et al., 1977; Traore et al., 1983),

(ii) les BSR du groupe II sont celles capables d'oxyder les acides gras volatils, et pour certaines le benzoate. Dans ce groupe il n'a pas été démontré de possibilité de transfert interspèce d'hydrogène, et il semblerait que les BSR utilisatrices d'acide gras, en absence de sulfate, ne peuvent pas se substituer aux bactéries OHPA. Par contre, en présence de sulfate, ces deux catégories de bactéries peuvent entrer en compétition pour les mêmes substrats. Ce type de compétition n'a pas été encore étudié.

Il convient de signaler qu'une compétition très forte existe entre les BSR et les méthanogènes pour l'utilisation de l'hydrogène et de l'acétate. Cette compétition dépendra essentiellement de la teneur en sulfate du milieu, et en cas de concentration non-limitante de sulfate, la sulfato-réduction prendra le dessus sur la méthanogénèse si l'environnement contient les BSR adéquates (hydrogèneophiles ou acétoclastes). Cette compétition s'explique par les affinités supérieures des BSR pour ces substrats (Kristjansson et al., 1982; Schonheit et al., 1982), et en ce qui concerne l'hydrogène, par la capacité qu'ont les BSR d'abaisser la concentration en hydrogène du milieu en-dessous d'un seuil limite (threshold level) qui en rend l'utilisation impossible par les méthanogènes (Lovley et al., 1982).

1.2.3. Troisième étape de la digestion anaérobie.

Cette étape représente le stade ultime de la dégradation anaérobie de la matière organique. Elle permet le recyclage de la matière organique en décomposition dans les environnements anaérobies, via la production de méthane et de gaz carbonique.

La méthanogénèse est considérée comme étant l'étape limitante de la digestion anaérobie, excepté quand des macromolécules d'hydrolyse difficile sont présentes dans l'effluent (Kaspar et Wuhrmann, 1978).

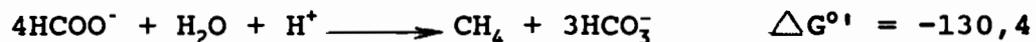
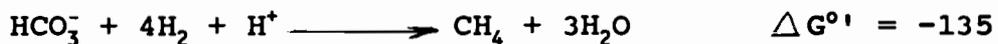
Les bactéries responsables de cette dernière étape sont appelées bactéries méthanogènes. De même que pour les bactéries sulfato-réductrices, il serait hors de propos de prétendre à une description taxonomique exhaustive de ce groupe. Ces bactéries peuvent avec profit être décrites sur la base de leurs caractéristiques trophiques et physiologiques.

Les bactéries méthanogènes sont anaérobies strictes, sensibles à l'oxygène, et exigent des potentiels d'oxydo-réduction inférieurs à -330 mV pour initier leur croissance (Zehnder, 1978). Longtemps, leur sensibilité à l'oxygène et leur exigence d'un milieu fortement réduit ont été une barrière à leur isolement. C'est à Smith et Hungate (1958) que l'on doit le premier isolement d'une bactérie méthanogène, grâce à l'introduction de l'usage de seringues hypodermiques pour les inoculations en anaérobiose, et à l'utilisation de milieux fortement réduits après que l'oxygène en eut été chassé. La plupart des méthanogènes poussent à des pH compris entre 6,5 et 7,5. Il existe des espèces mésophiles (la majorité) et thermophiles. Les particularités biochimiques (paroi, séquences nucléotidiques, métabolisme) de ces bactéries les ont fait classer dans un royaume différent des Eubactéries: celui des Archeobactéries, les Archeobactéries comprenant également des bactéries thermophiles extrêmes et des halophiles extrêmes.

Le point commun du métabolisme de ces bactéries est la réduction d'un groupe méthyl transporté par le coenzyme M (methyl-coM) en méthane (Rouvière et Wolfe, 1988); les électrons de l'étape réductrice peuvent être obtenus selon les espèces d'un spectre étroit de substrats: hydrogène, formate, méthanol, méthylamines, acétate, éthanol, propanol-2, cyclopentanol (Rouvière et Wolfe, 1988; Bleicher et al., 1989; Widdel, 1986). Par ailleurs, il a été découvert des coenzymes inhabituels caractérisant les bactéries méthanogènes: le coenzyme M, le facteur F_{430} , le méthanofurane, la tétrahydrométhanoptérine, le composant B ou N-7-mercaptoéthanoyl-O-phosphoro-L thréonine (HS-HTP) et le facteur F_{420} . Le F_{420} permet grâce à sa fluorescence de détecter les bactéries méthanogènes en microscopie à épifluorescence et de déterminer les activités des boues de digesteurs anaérobies (Gorris et al., 1988; Schulze et al., 1988). Ce facteur n'est pas spécifique des méthanogènes, il a aussi été décrit chez des espèces de Streptomyces en concentration moindre que chez les méthanogènes (Daniels et al., 1984). Additionnellement, les parois des bactéries méthanogènes ne

sont pas constituées de muréine mais se caractérisent par une certaine hétérogénéité dans leur composition. Ainsi les Methanobacteriaceae ont une paroi constituée d'un polymère dénommé pseudomuréine, se caractérisant par l'absence d'acide muramique et la présence d'acide N-acétyltalosaminurique, les bactéries de l'ordre des Methanococcales présentent une surface régulière composée de sous-unités protéiques et les membres de la famille des Methanosarcinaceae ont une paroi composée d'un hétéropolysaccharide acide contenant de la galactosamine, des oses neutres et des acides uroniques (Balch et al., 1979). La composition lipidique des méthanogènes est aussi particulière, car elles n'ont pas de lipides saponifiables mais un taux élevé de lipides polyisopréniques, représentés essentiellement par du phytanol (C20) ou du biphytanol (C40) formant des éthers de glycérol dans la fraction polaire, alors que la fraction apolaire est principalement représentée par du squalène (C30) (Balch et al., 1979).

Les bactéries méthanogènes n'utilisent qu'un nombre restreint de substrats, ce qui permet de les classer globalement en deux grands groupes trophiques: (i) les bactéries hydrogèneophiles non acétoclastes qui tirent leur énergie de la réduction du gaz carbonique par l'hydrogène, la plupart d'entre elles utilise le formate comme source d'énergie et de carbone. Les équations de méthanogénèse à partir de ces substrats sont les suivantes (les G° sont donnés en kJ/réaction), (Thauer et al., 1977):

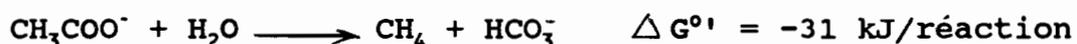


La figure 5 présente les différentes étapes de réduction du CO_2 en CH_4 telles qu'elles sont proposées par Rouvière et Wolfe (1988).

Les exemples les plus classiques de ces bactéries, et les plus utilisées dans le cadre d'études physiologiques et biochimiques sont:

- Methanobacterium formicicum (longs bâtonnets)
- Methanospirillum hungatei (longs filaments ou bâtonnets courbes)
- Methanobrevibacter sp. (petits bâtonnets)
- Methanobacterium thermoautotrophicum (espèce thermophile, longs bâtonnets ou filaments)
- Methanococcus sp. (cocci irréguliers).

(ii) le second groupe trophique, d'une importance extrême est constitué des bactéries méthanogènes acétoclastes qui ont toutes pour trait commun la capacité de produire du méthane à partir de l'acétate selon la réaction suivante:



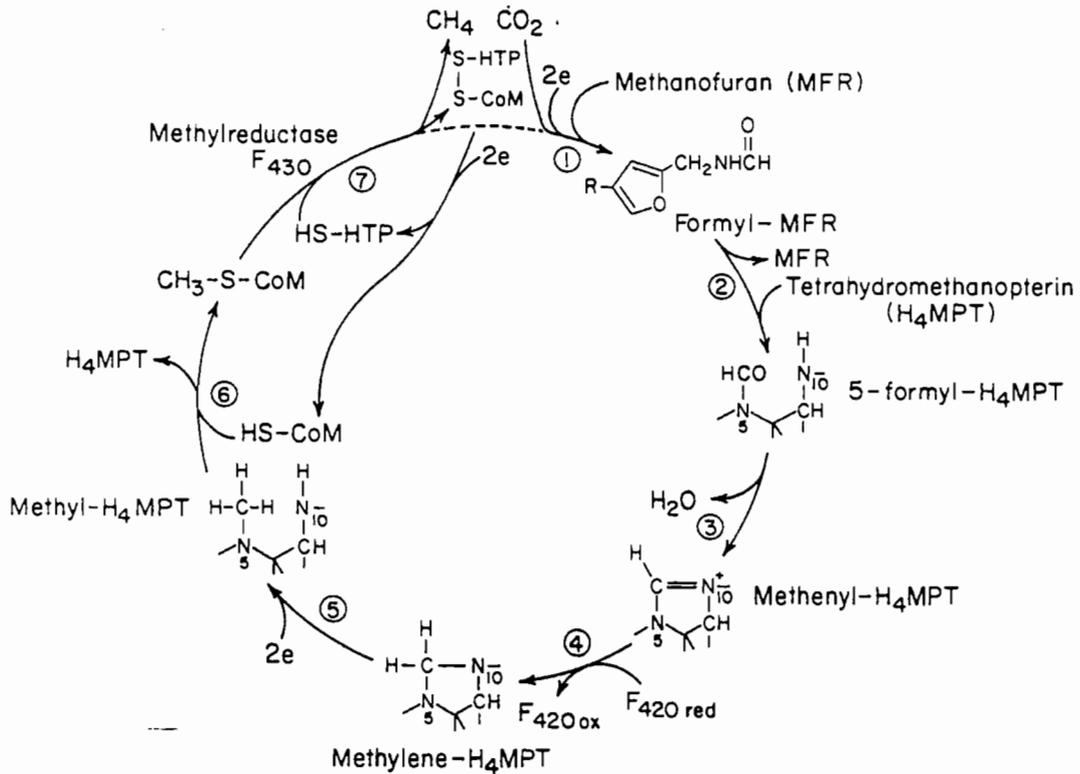


FIG. 2. Proposed cycle for the reduction of CO_2 to CH_4 . The C_1 unit indicated by the yellow dot is sequentially modified, reduced, and transferred in "bucket brigade" fashion bound to coenzymes. Only that portion of the molecule involved in C_1 attachment is shown for methanofuran and tetrahydromethanopterin. The heterodisulfide couples in an unknown manner Reaction 7 to Reaction 1.

FIG. 3. Proposed model for the methyl-coenzyme M methylreductase system. Reaction I, conversion of inactive methylreductase (C_i) to its active state (C_a) by reduction of Ni(II) to Ni(I) . Reaction II, (methylreductase) reduction of the methyl group of methyl-coenzyme M to methane by HS-HTP with the formation of a heterodisulfide. Reaction III, regeneration of HS-CoM and HS-HTP by reduction of the heterodisulfide; electrons may be provided by titanium III citrate or dithiothreitol, in the presence of B_{12} , or enzymatically by fraction A1 and H_2 .

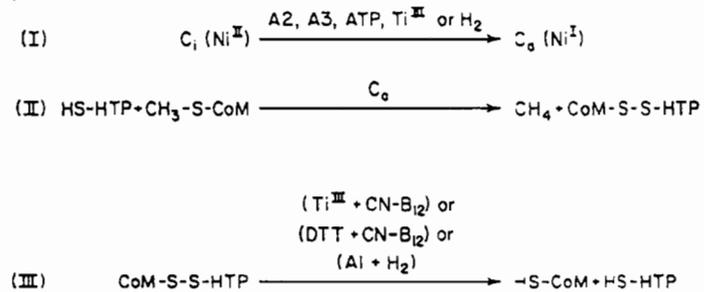


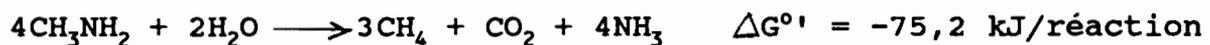
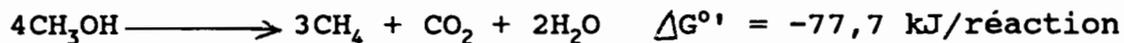
Fig. 5 Voie métabolique de réduction du CO_2 en CH_4 .

En 1989, dans une revue publiée par Thauer et al., paraît un schéma de la voie métabolique conduisant de l'acétate au méthane (Fig. 6). L'enzyme clef de cette voie étant la monoxyde de carbone déshydrogénase qui assurerait deux réactions:

- (i) le clivage de la liaison C-C de l'acétyl-CoA
- (ii) l'oxydation du monoxyde de carbone en dioxyde.

Cette enzyme est aussi l'enzyme clef de la plupart des bactéries anaérobies oxydant l'acétate; alors que chez les bactéries aérobies l'acétate est oxydé via le cycle de l'acide citrique.

La méthanogénèse à partir de l'acétate est fondamentale pour la digestion anaérobie car elle est à l'origine de 73% du méthane produit dans les digesteurs anaérobies (Smith et Mah, 1966). C'est dans ce groupe de bactéries méthanogènes que l'on trouve la plus large variété nutritionnelle, certaines espèces peuvent utiliser le méthanol, les méthylamines, et l'hydrogène (Mah et Smith, 1981):



Les espèces ayant le plus large spectre trophique appartiennent au genre Methanosarcina, dont la plus représentative est Methanosarcina barkeri. Les espèces de ce genre utilisent en général l'hydrogène à l'exception de certaines telle Methanosarcina thermophila. Par contre, les bactéries acétoclastes du genre Methanosaeta n'utilisent que l'acétate. Il convient de remarquer qu'aucune espèce des deux genres n'utilise le formate. Le travail présenté dans cette thèse développera quelques points relatifs à cette remarque, car l'hyperspécialisation trophique des bactéries méthanogènes amène à s'interroger sur sa signification écologique.

Le groupe des bactéries méthanogènes acétoclastes peut aussi se diviser en deux sous-groupes morphologiques et physiologiques:

- Les bactéries du genre Methanosarcina qui sont des pseudosarcines constituées d'unités grossièrement sphériques (Mah et Smith, 1981) ayant une faible affinité pour l'acétate: $K_s = 5 \text{ mM}$ pour M. barkeri 227 (Smith et Mah, 1978), et un temps de génération supérieur à celui des méthanogènes non acétoclastes: 16,6 heures pour M. mazei (Mah, 1980) et 30 heures pour M. barkeri (Smith et Mah, 1980).

- Les bactéries du genre Methanosaeta. Ce genre nouvellement créé par Patel et Sprott (1990) à été initialement baptisé Methanothrix par Huser et al. (1982). La description originale de Methanothrix soehngenii, l'espèce type, est basée sur celle de la variété Opfikon^T (DSM 2139^T). Cette souche n'a jamais pu être purifiée et la culture disponible est contaminée par deux bactéries morphologiquement distinctes. En 1984, Patel reporta l'isolement d'une nouvelle espèce mésophile: Methanothrix concilii, qui avec deux autres espèces thermophiles: Methanothrix CALS-1 (DSM 3870) (Zinder et al., 1987) et Methanothrix thermoacetophila Z517^T (DSM 4774^T) (Nozhevnikova et

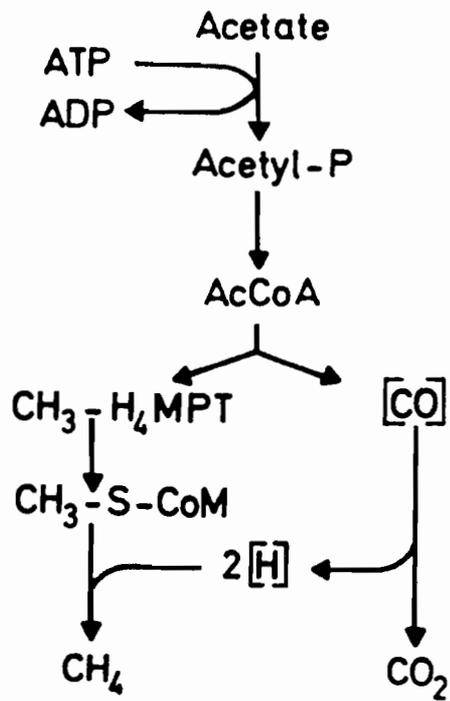


Fig. 6 Voie métabolique de la production de CH₄ à partir de l'acétate.

Chudina, 1985) représentent en réalité les seules espèces du genre à avoir été isolées et cultivées en culture pure. En 1988, Touzel *et al.* rejetèrent Methanotherix concilii comme nouvelle espèce et la reclassèrent comme étant une variété de Methanotherix soehngenii. Cette polémique a pris fin récemment avec la création d'un nouveau genre: Methanosaeta (Patel et Sprott, 1990), regroupant toutes les espèces préalablement décrites sous le nom de Methanotherix. Le rejet de l'appellation Methanotherix est basé sur l'application des règles du code international de nomenclature des bactéries (Lapage *et al.*, 1975), en effet la description de l'ex-espèce type Methanotherix soehngenii (variété Opfikon') ne repose que sur celle d'une culture mixte de plus d'une espèce (manquement à la règle 31a), et M. soehngenii n'a jamais été maintenue en culture pure (manquement à la règle 18a). Par conséquent, Methanosaeta concilii GP6 (Patel et Sprott, 1990) est devenue l'espèce type du genre Methanosaeta, elle a été déposée auprès de la DSM sous le numéro DSM 3671, auprès du "National Research Council of Canada" sous le numéro NRC 2989, auprès du "Oregon Graduate Center Collection of Methanogenic Archaeobacteria" sous le numéro OGC 69, et auprès de l'ATCC sous le numéro ATCC 35969. Le genre Methanosaeta inclut aussi les deux autres cultures pures thermophiles connues: Methanosaeta CALS-1 et Methanosaeta thermoacetophila variété Z517 (DSM 4774).

Il faut néanmoins reconnaître une importance historique à la description de Methanotherix soehngenii en 1982 (Huser *et al.*, 1982) qui a permis de présenter un nouveau groupe de bactéries méthanogènes acétoclastiques, dont le rôle écologique au sein des digesteurs anaérobies est des plus importants, et vient en complément de celui joué par les bactéries du genre Methanosarcina.

Les bactéries appartenant au genre Methanosaeta peuvent se présenter en longues chaînes de batonnets pouvant former des filaments se regroupant en paquets enchevêtrés, ce qui favorise leur détection visuelle à l'examen microscopique. Methanosaeta concilii se caractérise par un temps de génération plus long que ceux des Methanosarcina: de 65 à 70 heures, et une affinité pour l'acétate supérieure à celle des Methanosarcina: $K_s = 1,2$ mM (Patel et Sprott, 1990), cette affinité confère aux Methanosaeta un avantage écologique sur les Methanosarcina quand ces bactéries sont en présence de faibles concentrations en acétate. De plus, contrairement à certaines Methanosarcina, Methanosaeta n'est pas sensible à l'hydrogène.

La sensibilité des méthanogènes aux conditions de milieu (pH, Eh, oxygène) détermine les conditions d'opération des digesteurs anaérobies, le tout en relation avec la sensibilité à l'hydrogène des bactéries OHPA et de certaines méthanogènes acétoclastes. C'est ce rôle central joué par l'hydrogène qui sera abordé au chapitre suivant.

1.2.4. Régulation de la digestion anaérobie par l'hydrogène.

L'accumulation de l'hydrogène dans un digesteur anaérobie est toujours le signe d'un mauvais fonctionnement du réacteur (Harper et Pohland, 1985; Whitmore *et al.*, 1987). Il importe donc de comprendre les effets de l'hydrogène au niveau des différentes étapes de la digestion anaérobie, qui sans être le substrat principal de la méthanogénèse dans cet environnement, n'en joue pas moins un rôle fondamental.

1.2.4.1. Le transfert interspèce d'hydrogène.

Le transfert interspèce d'hydrogène peut se définir de la manière suivante: on appelle transfert interspèce d'hydrogène une relation syntrophique entre deux bactéries: une donneuse d'hydrogène et une bactérie hydrogèneophile, basée sur un échange d'hydrogène. Cet échange doit présenter obligatoirement un avantage pour la bactérie donneuse: soit lui permettre de métaboliser une molécule qui ne pourrait pas l'être en cas d'accumulation d'hydrogène, soit aboutir pour la bactérie donneuse, à une déviation du métabolisme en faveur d'une amélioration de son bilan énergétique, se traduisant par une augmentation de la production d'acétate au détriment de composés de degrés d'oxydations moindres, qui seraient produits en absence de transfert interspèce d'hydrogène.

Sur la base de cette définition on peut distinguer différents types de transferts interspèce d'hydrogène (TIH):

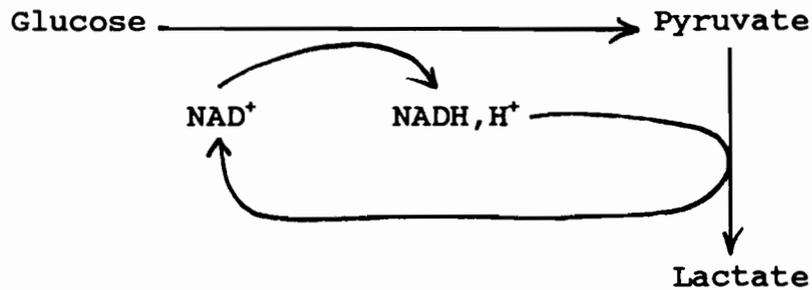
- TIH et bactéries fermentatives,
- TIH et bactéries sulfato-réductrices,
- TIH obligatoires.

1.2.4.1.1. TIH et bactéries fermentatives.

Lors de la fermentation des saccharides, les molécules de NADH, H^+ produites par oxydation du substrat sont réoxydées en NAD^+ par la réduction d'un intermédiaire organique produit à partir du substrat. Les produits de la fermentation sont des alcools et (ou) des acides (acides gras volatils, lactate, succinate, etc...). Ces produits appelés "electron sink" par les anglo-saxons, sont des "voies de garage" pour électrons. La réaction de régénération directe du NADH, H^+ est thermodynamiquement défavorable à pression partielle en hydrogène élevée, et l'hydrogène ne peut être formé dans les conditions naturelles qu'à partir des systèmes: pyruvate-ferredoxine oxydoréductase/déshydrogénase et formate-hydrogène lyase (Gottschalk, 1979). Par contre, à basse pression partielle d'hydrogène (inférieure à 0,001 atm), la production d'hydrogène à partir du NADH, H^+ devient thermodynamiquement possible. Par conséquent, dans les milieux où la pression partielle en hydrogène est maintenue très basse grâce aux bactéries hydrogèneophiles, les voies fermentatives sont déviées vers la formation d'hydrogène au détriment de celle de produits organiques

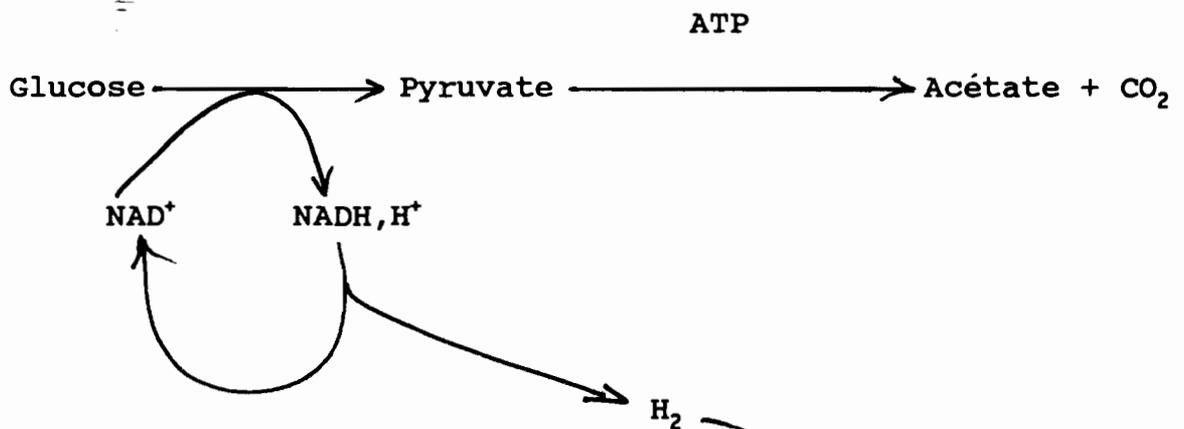
réduits, et au profit d'une augmentation de la production d'acétate et d'ATP provenant de la conversion de l'acétyl-coA en acétate (Gottschalk, 1979). L'exemple suivant illustre ce phénomène dans son principe.

Selenomonas ruminantium fermente le glucose en lactate selon les réactions simplifiées suivantes (Min C. et Wolin, 1977):



Quand cette bactérie est associée avec une méthanogène hydrogèneophile, telle que Methanobrevibacter ruminantium, la production de lactate est détournée en faveur de la production d'hydrogène et d'acétate selon le mécanisme suivant:

Selenomas ruminantium:



Methanobacterium ruminantium:



De nombreuses bactéries fermentatives appartenant à différents genres, associées avec une bactérie méthanogène hydrogèneophile, peuvent voir leur métabolisme modifié suivant le même mécanisme. L'avantage du transfert interspèce d'hydrogène dans ce cas, est une augmentation du rendement en acétate dès la première étape de la digestion anaérobie. L'inhibition du transfert interspèce à ce niveau n'empêcherait pas le processus de digestion anaérobie de se dérouler, mais le rendrait plus laborieux en raison de la nécessité de convertir en acétate, au niveau de la seconde étape, l'excédent de composés intermédiaires réduits.

1.2.4.1.2. TIH et bactéries sulfato-réductrices.

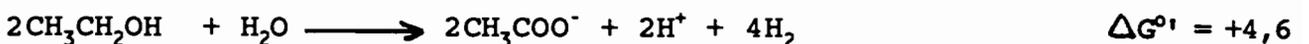
Les bactéries sulfato-réductrices sont capables d'oxyder en présence de sulfates, les produits issus de la première étape de la digestion anaérobie.

Il a été démontré pour des sulfato-réductrices du groupe I, que les mêmes réactions pouvaient être effectuées en absence de sulfate, à condition de coupler ces bactéries avec des méthanogènes hydrogèneophiles.

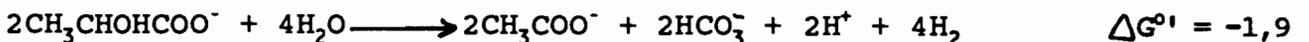
Ainsi, Bryant *et al.* (1977) ont démontré que *Desulfovibrio vulgaris* et *desulfuricans*, associés à *Methanobacterium* MoH, en présence de quantités négligeables de sulfate, pouvaient oxyder le lactate et l'éthanol en acétate avec production concomitante de méthane par la méthanogène.

Les équations des différentes réactions intervenant lors de la dégradation de ces substrats par la culture mixte sont:
(G° en kcal/réaction)

A. Ethanol sans accepteur d'électrons (BSR):



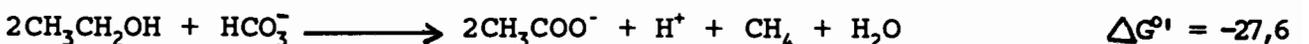
B. Lactate sans accepteur d'électrons (BSR):



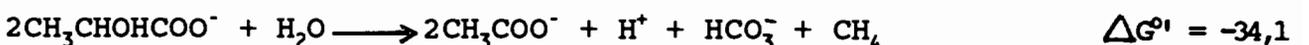
C. Méthanogénèse:



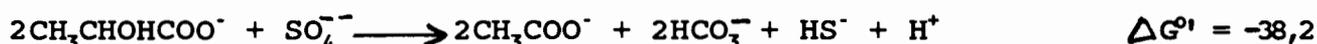
(A + C) Culture mixte:



(B + C) Culture mixte:



A titre comparatif, les équations des réactions réalisées par les BSR en présence de sulfates sont les suivantes:



Traoré et al. (1983) ont étudié plus en détail cette syntrophie en chemostat, en mettant en présence D. vulgaris avec M. barkeri. Il apparait que le rendement de croissance sur lactate ou pyruvate de D. vulgaris est supérieur en présence de sulfate, que lors du couplage de la BSR avec la méthanogène. Néanmoins, l'association BSR/bactérie méthanogène sur pyruvate en absence de sulfate permet à la BSR d'avoir un meilleur rendement de croissance que quand elle est cultivée seule dans les mêmes conditions.

Une possibilité de couplage originale a été démontrée par Cord-Ruwish et al. (1986). Il est connu que les BSR, excepté Desulfatamaculum nigrificans, ne dégradent pas les oses. La dégradation du fructose par une nouvelle espèce de Desulfovibrio en présence de sulfate a été récemment reportée par Ollivier et al. (1988). Cette même bactérie peut réaliser cette dégradation en absence de sulfates si elle est couplée à une méthanogène hydrogèneophile.

L'existence de transferts interspèce d'hydrogène entre certaines BSR et les bactéries méthanogènes explique ainsi la présence des bactéries sulfato-réductrices dans les milieux pauvres en sulfates.

Nous venons de décrire des transferts interspèce se faisant dans le sens BSR bactéries méthanogènes, il convient de signaler qu'en raison de la propriété qu'ont les bactéries du genre Methanosarcina de produire de l'hydrogène à partir de l'acétate (Lovley et Ferry, 1985) et du méthanol (Phelps et al., 1985), il a été démontré (Phelps et al., 1985) la possibilité d'un transfert interspèce d'hydrogène dans le sens bactérie méthanogène BSR sur ces substrats en présence de sulfate. M. barkeri étant la donneuse d'hydrogène et la BSR l'acceptrice. Cette possibilité de couplage est d'une extrême importance, car elle permettrait l'oxydation du méthanol et de l'acétate par les méthanogènes, en milieu riches en sulfate, en absence de compétition entre BSR et méthanogènes.

Jusqu'à ce jour, il n'a pas été démontré de possibilité de transfert interspèce d'hydrogène avec des BSR du groupe II. La dégradation anaérobie des acides gras volatils en absence de sulfate est donc réalisée exclusivement par les bactéries OHPA.

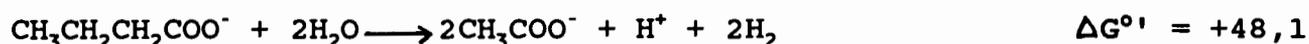
1.2.4.1.3. TIH obligatoire.

La dégradation des acides gras volatils, en absence de sulfate, ne peut se faire que grâce aux bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (OHPA) décrites ultérieurement. Les bactéries appartenant à ce groupe ne peuvent en aucun cas dans les milieux naturels dégrader l'éthanol, les acides gras volatils, et certains acides gras, en l'absence d'un accepteur microbien d'hydrogène, la bactérie hydrogèneophile pouvant être méthanogène ou sulfato-réductrice.

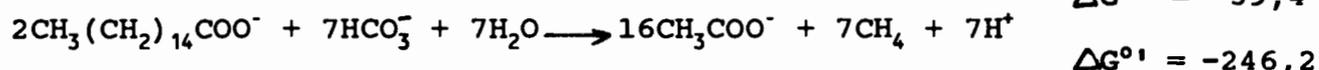
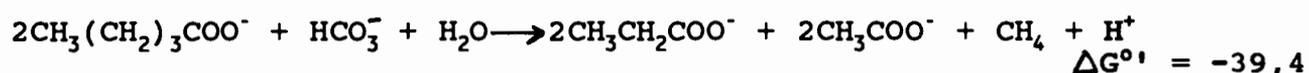
Les réactions réalisées par les OHPA ne sont thermodynamiquement pas possibles, si la pression partielle en hydrogène n'est pas maintenue inférieure à 10^{-1} atm pour l'éthanol, 10^{-3} atm pour le propionate, et 10^{-4} atm pour le butyrate.

Les équations des principales réactions réalisées par les bactéries OHPA sont les suivantes (kJ/réaction):

(i) en absence de bactéries acceptrices d'hydrogène:



(ii) en présence d'une bactérie méthanogène utilisatrice d'hydrogène:



Cette liste de réactions est particulièrement éloquente, et représente le passage quasi obligé du flux de carbone engendré par la dégradation anaérobie de la matière organique. Par conséquent, on conçoit aisément qu'une accumulation d'hydrogène dans un digesteur anaérobie conduise à son blocage, par inhibition des réactions réalisées par les bactéries OHPA.

Récemment Thiele et Zeikus (1988) ont décrit un nouveau type de transfert interspèce d'électrons, basé sur un échange de formate au lieu d'hydrogène et reposant sur les mêmes principes thermodynamiques. La théorie est séduisante, car elle accentue le rôle potentiel important que pourrait jouer le formate dans les écosystèmes anaérobies. Malheureusement, en dépit des affirmations

des auteurs, leur démonstration n'est pas satisfaisante car leurs expériences ont été effectuées avec des cultures mixtes naturelles non définies (flocs d'un réacteur anaérobie dégradant du lactosérum), et certaines de leurs conclusions ne prennent pas en compte ce point fondamental: aucune expérience de contrôle n'a été effectuée avec des cultures pures et des cultures mixtes définies. Boone et al. (1989) reprennent cette théorie et lui apportent un fondement théorique. Par le calcul ils démontrent que l'hydrogène ne diffuse pas suffisamment vite pour expliquer la vitesse de formation du méthane dans des milieux où les bactéries OHPA et méthanogènes sont dispersées, alors qu'un transfert interespèce de formate pourrait justifier les valeurs obtenues pour les digesteurs anaérobies. Néanmoins, hormis la démonstration d'une activité formate-déshydrogénasique chez S. wolfei, aucune preuve expérimentale n'est apportée par ces auteurs sur l'existence d'un transfert interespèce de formate, leurs travaux ne reposent pratiquement que sur des calculs théoriques. Il est au demeurant surprenant, qu'aucune mesure de formate n'ait été encore faite avec des cultures mixtes définies de bactéries OHPA et méthanogènes! Dans le cadre de la discussion générale de cette thèse, la validité de cette théorie sera discutée en relation avec les résultats présentés ici et ceux d'autres auteurs.

1.2.4.2. Hydrogène et méthanogénèse à partir de l'acétate.

Dans le groupe des Methanosarcina la capacité d'utiliser l'hydrogène est inégalement distribuée, mais pour toutes les espèces, l'utilisation de l'acétate est inhibée par une accumulation d'hydrogène (Baresi et al., 1978; Fergusson et Mah, 1983; Zinder et Mah, 1979; Ollivier et al., 1984). Par contre, l'utilisation de l'acétate par Methanosaeta concilii et l'ex-Methanothrix soehngenii n'est pas inhibée par une accumulation d'hydrogène (Zehnder et al., 1980; Patel, 1984).

Ces remarques conduisent à penser qu'une accumulation d'hydrogène dans un digesteur anaérobie, n'entraînera une inhibition marquée de la méthanogénèse à partir de l'acétate, que si la teneur en méthanogènes de type Methanosarcina est élevée par rapport à celle en Methanosaetae, ce qui peut expliquer les diverses observations contradictoires reportées, quant à l'effet d'une accumulation d'hydrogène sur la méthanogénèse à partir de l'acétate dans les boues de digesteurs anaérobies (Harper et Pohland, 1985; van den Berg et al., 1980).

Ce rôle de l'hydrogène sur la méthanogénèse à partir de l'acétate est à rapprocher de celui joué par le formate, ce point particulier fera l'objet d'une discussion dans le cadre de cette thèse.

1.3. Conclusion.

La complexité des interactions microbiennes évoquées précédemment rend l'étude de la digestion anaérobie particulièrement ardue. On a pu voir que limiter son champ d'étude à des groupes de micro-organismes représentatifs des différentes étapes, permettait de faire apparaître des relations physiologiques particulières. Ainsi, l'utilisation de cultures mixtes définies de bactéries anaérobies est une méthodologie qui permet de se placer dans des cas de figures déterminés et d'élaborer des modèles simplifiés qui, naturellement, devront être vérifiés au niveau du comportement des boues issues des digesteurs. Par ailleurs, il pourrait être envisagé d'utiliser de telles cultures mixtes définies comme inocula aux propriétés bien définies, mais une telle démarche semblerait économiquement peu justifiée dans le cas de la dégradation anaérobie de composés naturels facilement biodégradables (cellulose, hémicellulose, pectines, protéines, etc...) en raison de la disponibilité d'inocula naturels que représentent les boues de réacteurs en opérations. Par contre, l'adaptation ou la production d'inocula, en vue de la biodégradation anaérobie de composés chimiques difficilement biodégradables dans des conditions naturelles, tels de nombreux composés aromatiques, peut paraître une voie prometteuse.

2. TRAVAUX SUR PUBLICATIONS

**2.1. Méthanogénèse à partir
du saccharose par un consortium microbien défini.**

INTRODUCTION.

Nous avons pu constater lors de la précédente revue bibliographique, que la biodégradation anaérobie de la matière organique est l'affaire d'un consortium complexe de bactéries. L'étude de ce consortium peut être abordée de différentes manières:

(i) on peut étudier les boues de digesteur anaérobie comme un ensemble en tentant de définir leurs réponses à l'action de différents facteurs physico-chimiques, et leur comportement physiologique global. Le niveau d'action peut être choisi en fonction de la spécificité du groupe bactérien étudié, comme par exemple l'étude des activités méthanogénique in situ. Mais une telle approche ne permet pas de déterminer finement la nature des phénomènes mis en jeu,

(ii) l'isolement et l'étude des bactéries responsables d'une ou de plusieurs réactions particulières est sans nul doute indispensable, mais insuffisante pour expliquer l'ensemble des phénomènes régissant le fonctionnement harmonieux du système,

(iii) l'étude en cultures mixtes définies des bactéries isolées permet d'obtenir une bonne approximation des interactions microbiennes se produisant dans cet écosystème, et d'approcher le comportement des bactéries dans leur environnement. Elle permet de mettre en évidence des phénomènes qui ne pourraient pas l'être autrement, et d'en analyser les caractéristiques grâce à la simplification des structures de la communauté microbienne. Bien évidemment, les résultats d'une telle analyse doivent être confrontés aux données tirées de l'écosystème d'origine.

Lors des travaux présentés dans les articles suivants, nous avons choisi délibérément d'opter pour les voies d'études (i) et (iii).

Dans l'article intitulé: "Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia", nous avons entrepris d'élaborer et d'étudier un système modèle de culture mixte méthanogène définie, pouvant méthaniser un effluent artificiel contenant du saccharose à faible concentration. Nous avons recherché, par l'utilisation appropriée des souches bactériennes, à orienter le flux de carbone issu de la fermentation du saccharose, vers la formation intermédiaire d'acétate comme principal précurseur de la méthanogénèse, et à définir l'influence des différents micro-organismes utilisés. Une telle étude non seulement permet d'obtenir des informations sur les interrelations microbiennes, mais aussi de démontrer la possibilité d'employer une culture mixte définie immobilisée pour dégrader une substance déterminée. Il est clair que le substrat utilisé ne représente pas de difficulté particulière quant à son hydrolyse, mais un tel modèle peut servir de base pour élaborer une culture mixte pouvant utiliser des substances dont la biodégradation peut être problématique.

Lors de la parution de cet article, c'était la première fois que l'étude d'une culture mixte définie méthanogène se faisait en rapport avec l'usage d'une technique d'immobilisation de cellules. Un des avantages pratiques qui découle de cette immobilisation est de présenter l'inoculum sous une forme aisément manipulable et réutilisable, et de pouvoir envisager son utilisation ultérieure dans des procédés en continu. Les expériences en batch réalisées dans cette étude ont permis de comparer les performances respectives des cultures immobilisées et non-immobilisées.

La biomasse des réacteurs de seconde génération, tels le réacteur UASB ou le filtre anaérobie, ne se trouve pas dispersée en suspension homogène dans le milieu mais regroupée sous forme de granules ou d'un biofilm. Ainsi l'étude de cultures mixtes définies immobilisées permet d'avoir une approche plus réaliste des interactions microbiennes dans de tels systèmes, en prenant en compte les aspects engendrés par la promiscuité des cellules et les phénomènes de transfert de masse. La culture mixte immobilisée que nous présentons, peut aussi offrir un modèle d'étude pour comprendre ces différents aspects. Il semble évident qu'un regroupement spatial des bactéries, favorise une meilleure utilisation des produits issus de l'hydrolyse du substrat lors de la première étape, par celles des étapes suivantes. Ces thèmes seront développés lors des articles suivants et de la discussion générale.

Methanogenesis from Sucrose by Defined Immobilized Consortia

W. JACK JONES,* JEAN-PIERRE GUYOT,† AND RALPH S. WOLFE
Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801

Received 6 June 1983/Accepted 3 October 1983

A bacterial consortium capable of sucrose degradation primarily to CH₄ and CO₂ was constructed, with acetate as the key methanogenic precursor. In addition, the effect of agar immobilization on the activity of the consortium was determined. The primary fermentative organism, *Escherichia coli*, produced acetate, formate, H₂, and CO₂ (known substrates for methanogens), as well as ethanol and lactate, compounds that are not substrates for methanogens. Oxidation of the nonmethanogenic substrates, lactate and ethanol, to acetate was mediated by the addition of *Acetobacterium woodii* and *Desulfovibrio vulgaris*. The methanogenic stage was accomplished by the addition of the acetophilic methanogen *Methanosarcina barkeri* and the hydrogenophilic methanogen *Methanobacterium formicicum*. Results of studies with low substrate concentrations (0.05 to 0.2% [wt/vol]), a growth-limiting medium, and the five-component consortium indicated efficient conversion (40%) of sucrose carbon to CH₄. Significant decreases in yields of CH₄ and rates of CH₄ production were observed if any component of the consortium was omitted. Approximately 70% of the CH₄ generated occurred via acetate. Agar-immobilized cells of the consortium exhibited yields of CH₄ and rates of CH₄ production from sucrose similar to those of nonimmobilized cells. The rate of CH₄ production decreased by 25% when cysteine was omitted from reaction conditions and by 40% when the immobilized consortium was stored for 1 week at 4°C.

The degradation of carbohydrates to methane by defined mixed cultures has been studied by several investigators (8, 21, 26-28). Winter and Wolfe (27) studied the complete conversion of fructose to CH₄ and CO₂ with cocultures of *Acetobacterium woodii* and *Methanosarcina barkeri*. These authors also studied methane formation from glucose and fructose with different mixtures of *A. woodii* and various methanogenic bacteria (28). Winter (26) studied glucose degradation to CH₄ and CO₂ with various associations of *Bifidobacterium bifidus* or *Escherichia coli* as primary fermentative bacteria in association with *Desulfovibrio desulfuricans* and *M. barkeri*. Additional studies involving cellulose degradation by methanogenic mixed cultures have been reported (16, 18, 19, 25).

The immobilization of bacteria provides an attractive means of product separation from cellular material with retention of biocatalysts. However, few studies are available dealing with immobilized defined mixed cultures. Karube et al. (15) studied methane production by using agar-immobilized bacterial enrichments from digested sewage sludge, and Scherer et al. (22) studied methanol utilization by alginate-immobilized *M. barkeri*.

As a model system, we have constructed a mixed bacterial culture capable of sucrose degradation primarily to CH₄ and CO₂, with acetate as the key direct methanogenic precursor. In addition, we have studied the effect of immobilization on the performance of the defined consortium. This type of methanogenic consortium resembles mixed culture processes found in anaerobic environments such as sediments or anaerobic digestors (14, 23). Our experiments were designed specifically to test the ability of a consortium to carry out the biogenesis of methane in a nutrient-limited medium.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and growth conditions. The anaerobic techniques described by Hungate (12) and Balch et al. (1, 3) were used throughout this study. Bacteria were grown anaerobically in aluminum-seal culture tubes (18 by 150 mm) (Bellco Glass, Inc., Vineland, N.J.) or in 125-ml serum bottles (Wheaton Scientific Co.). *E. coli* ATCC 12435 was grown at 37°C under an atmosphere of N₂ in medium containing the following constituents (per liter of distilled water): yeast extract, 2.0 g; Trypticase (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), 2.0 g; K₂HPO₄, 10.0 g; mineral solution no. 2 (30), 10 ml; resazurin, 0.001 g. A filter-sterilized, O₂-free solution of sucrose was added before inoculation at a final concentration of 0.2% (wt/vol). *Desulfovibrio vulgaris* JJ, isolated from estuarine sediments, was grown at 37°C under an atmosphere of N₂-CO₂ (4:1) in a medium that contained the following constituents (per liter of distilled water): mineral solution no. 1 (1), 50 ml; mineral solution no. 2 (1), 50 ml; trace vitamin solution (30), 10 ml; FeSO₄ · 7H₂O, 0.1 g; Trypticase, 1.0 g; NaHCO₃, 4.0 g; Na₂SO₄, 2.8 g; cysteine · HCl · H₂O, 0.5 g; Na₂S · 9H₂O, 0.2 g. Sodium lactate was added at a final concentration of 40 mM. *A. woodii* ATCC 29683 was grown in M1 medium as described previously by Balch et al. (2). Fructose was added as substrate at a final concentration of 0.5% (wt/vol). *Methanobacterium formicicum* MF was grown at 37°C in medium 1 of Balch et al. (1) under 203 kPa of H₂-CO₂ (4:1). *M. barkeri* 227 was grown at 37°C under an atmosphere of N₂ in medium containing the following constituents (per liter of distilled water): mineral solution no. 1 (1), 40 ml; mineral solution no. 2 (1), 40 ml; FeSO₄ · 7H₂O, 0.002 g; resazurin, 0.001 g; trace mineral solution (30), 10 ml; vitamin solution (30), 10 ml; NiCl₂ · 6H₂O, 0.5 mg; Na₂SeO₄, 3.7 mg; yeast extract, 1.0 g; Trypticase, 1.0 g; sodium acetate, 8.0 g; cysteine · HCl · H₂O, 0.5 g; Na₂S · 9H₂O, 0.5 g. The medium was buffered with TES (*N*-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid) at a final concentration of 50 mM; the

* Corresponding author.

† Present address: Laboratoire de Microbiologie, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Paris, France.

pH of the medium was adjusted to 7.0 with NaOH.

Anoxic medium was prepared by boiling the medium without added reducing agents under a stream of N₂ or N₂-CO₂ (4:1) for 60 s. Reducing agents were added, the flask was stoppered, and the medium was dispensed inside an anaerobic glove box (Coy Manufacturing Co., Ann Arbor, Mich.). Media were sterilized by autoclaving at 105 kPa for 20 min.

Analytical procedures. Methane was analyzed in a Carle 9700 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a 2-m stainless steel column packed with 8% SF-96 on Chromosorb WHP (80/100 mesh) and operated at 150°C. The carrier gas was N₂ at a flow rate of 25 ml min⁻¹. CH₄ was quantitated by comparing the peak height with known standards. H₂ and CO₂ were analyzed with a Packard 7800 gas chromatograph equipped with thermal conductivity detectors and a 2-m Porapak Q (80/100 mesh) column operated at 120°C. The carrier gas was N₂ at a flow rate of 30 ml min⁻¹. All gas sampling was performed with a pressure-lock syringe (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, La.).

Acetate and ethanol were analyzed by gas chromatography as described for CH₄ determination, except that a 3-m column packed with SP-1000-1% H₃PO₄ on Chromosorb WAW (Supelco) was used for sample separation. Each liquid sample (1.0 ml) for organic acid and alcohol analysis was removed aseptically, centrifuged for 5 min at 10,000 × g to remove cells, and acidified with H₃PO₄ before injection; the recorded peak area was compared with known standards.

Glucose was determined colorimetrically* with glucose oxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) according to Sigma technical bulletin no. 510. Sucrose was assayed indirectly as glucose after treatment with invertase. The reaction was performed as described previously by Bergmeyer and Klotzsch (5), except that the amount of reactants was modified to adapt the method to small sample volumes (0.1 ml). Lactic acid was analyzed by the method of Hadzija (11).

Experimental conditions. The basal medium for mixed culture studies contained the following constituents (per liter of untreated ground water): vitamin solution (30), 10 ml; NiCl₂ · 6H₂O, 0.5 mg; resazurin, 0.001 g; TES, 11.0 g; cysteine · HCl · H₂O, 0.15 g. The medium, adjusted to pH 7.2 with NaOH, was prepared anaerobically under an atmosphere of N₂ and sterilized by autoclaving at 105 kPa for 20 min. Ground water from a well that provides untreated water for biological purposes was used as a source of trace minerals. Analysis of untreated ground water revealed the following inorganic composition (milligrams per liter): SO₄²⁻, 1.2; NO₃⁻, 1.5; total PO₄²⁻, 0.03; Fe³⁺, 1.0; Ca²⁺, 59.6; Mg²⁺, 23.7; NH₄⁺, 1.0; Na⁺, 37.0; total CO₃²⁻, 324. Mixed cultures were inoculated into medium contained in a 125-ml serum vial; the final reaction volume was 26 ml.

Bacterial cultures used for mixed culture experiments were harvested anaerobically at late-logarithmic phase by centrifugation at 15,000 × g for 15 min. Pelleted cells were suspended in an anaerobic wash solution that contained the following constituents (per liter of distilled water): NaCl, 7.0 g; TES, 11.0 g; cysteine · HCl · H₂O, 0.5 g; resazurin, 0.001 g. The pH of the solution was adjusted to 7.1 with NaOH before being made anoxic under N₂. After two washings, cells were resuspended in a small volume of wash solution, and a sample was removed for dry weight measurements. Each desired combination of washed cell suspensions was inoculated into a sealed serum vial that contained basal medium with 0.17 or 0.05% (wt/vol) sucrose. The final concentration of the bacterial components was as follows (in

milligrams [dry weight] per liter of medium): *E. coli*, 90; *A. woodii*, 70; *D. vulgaris*, 65; *M. formicicum*, 90; *M. barkeri*, 350. The appropriate gas atmosphere (N₂) was added after removal of the vial from the anaerobic glove box. Vials were incubated at 37°C with shaking unless otherwise indicated.

Procedure for immobilization of cells. Inside an anaerobic glove box, various combinations of washed cell suspensions were made and added to sterile, cooled (45°C) anoxic basal medium, supplemented with 1.5% (wt/vol) Noble agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). The solution was gently mixed, poured into a petri dish, and allowed to solidify and cool. Pellets (2.5 by 2.5 by 6 mm) of the solidified agar were prepared by extruding the gel through a stainless steel screen of specific mesh size. Each 125-ml serum vial with 20 ml of basal medium, supplemented with 0.05 or 0.17% (wt/vol) sucrose, received 6.0 g (wet weight) of the agar pellets. The serum vial was sealed with a butyl rubber stopper, flushed with N₂, and incubated at 37°C on a reciprocal shaker at 60 strokes min⁻¹.

Diffusion of sucrose. Sucrose diffusion through the agar matrix was measured according to the following procedure. Sucrose (0.2% [wt/vol] final concentration) was added to a sterile solution containing 1.5% (wt/vol) agar at 45°C, and the mixture was poured into a petri dish and allowed to solidify. Agar pellets, prepared by extruding the agar gel through a wire screen, were added to a flask containing glass-distilled water. Samples from the water phase were taken over a time period and assayed for sucrose diffusion from the agar pellets.

RESULTS

Sucrose fermentation by mixed cultures. Various combinations of *E. coli*, *A. woodii*, and *D. vulgaris* were cocultured to determine optimal conditions for the production of direct methanogenic precursors; the results are presented in Table 1A. The products of sucrose fermentation by the *E. coli* strain included acetate, ethanol, lactate, formate, CO₂, and H₂ (data not shown). Optimal acetate production occurred with the association of the three organisms (Table 1A); a shift in the final concentration of fermentation products from less ethanol and lactate formation to increased production of acetate was observed. These results are in agreement with previous observations (13, 18, 25, 31) and may be attributed to lactate oxidation to acetate by *D. vulgaris* or *A. woodii*, to ethanol oxidation by *D. vulgaris*, and to a shift in the fermentation pattern of *E. coli* toward increased production of oxidized compounds.

Combinations of *E. coli*, *A. woodii*, and *D. vulgaris*, in association with a hydrogenophilic methanogen (*M. formicicum*), exhibited significant increases in acetate production from sucrose (Table 1B) compared with consortia without *M. formicicum*. Acetate production was optimal when the consortium contained all four organisms. Optimal CH₄ production occurred when *M. formicicum* was cocultured with *E. coli* and *A. woodii*; in the absence of an acetophilic methanogen, the amount of CH₄ produced represented a 15% recovery of carbon from sucrose. In all mixed cultures tested with *M. formicicum*, insignificant amounts of ethanol or lactate accumulated as final products of sucrose fermentation.

Mixtures of *E. coli*, *D. vulgaris*, and *A. woodii* were cocultured in association with the acetophilic methanogen *M. barkeri*, and the results are presented in Table 1C. The major products detected were CH₄ and CO₂. In mixed cultures without *D. vulgaris*, some ethanol was detected as a final product; ethanol was significantly reduced in mixed

TABLE 1. Sucrose degradation by defined mixed cultures

Organisms ^a	Fermentation products ^b ($\mu\text{mol/ml}$)					% C as CH ₄
	Etha- nol	Lac- tate	Acc- tate	H ₂	CH ₄	
A.						
<i>E. coli</i>	8.3	4.0	11.2	0.3	0	
<i>E. coli</i> , <i>A. woodii</i>	7.0	0.6	12.0	0	0	
<i>E. coli</i> , <i>A. woodii</i> , <i>D. vulgaris</i>	2.0	ND ^c	12.8	0	0	
B.						
<i>E. coli</i> , <i>M. formicicum</i>	1.1		14.6	0	7.3	11
<i>E. coli</i> , <i>M. formicicum</i> , <i>A. woodii</i>	0.6	0.4	15.7	0	10.0	15
<i>E. coli</i> , <i>M. formicicum</i> , <i>A. woodii</i> , <i>D. vul- garis</i>	0.7	ND	17.1	0	7.4	11
C.						
<i>E. coli</i> , <i>M. barkeri</i>	2.2	0.4	0	0	15.5	23
<i>E. coli</i> , <i>M. barkeri</i> , <i>A. woodii</i>	2.0	ND	0	0	17.3	26
<i>E. coli</i> , <i>M. barkeri</i> , <i>A. woodii</i> , <i>D. vul- garis</i>	0.7	ND	0	0	27.0	40
D.						
<i>E. coli</i> , <i>A. woodii</i> , <i>D. vulgaris</i> , <i>M. formi- cicum</i> , <i>M. barkeri</i>	1.0	ND	0	0	28.4	42

^a Cultures were incubated at 37°C in basal medium for 10 days at an initial sucrose concentration of 0.19% (wt/vol).

^b Values do not represent a complete fermentation balance from sucrose; CO₂ and formate were not quantitated.

^c ND, Not detected.

cultures with *D. vulgaris*, indicating ethanol oxidation to acetate. Methane production was optimal when *M. barkeri* was cultured with *E. coli*, *A. woodii*, and *D. vulgaris*. The final amount of CH₄ produced represented a 40% recovery of sucrose carbon as CH₄ compared with a recovery of 11% when *M. formicicum* was cultured with *E. coli*, *A. woodii*, and *D. vulgaris*. Acetate was detected only in trace amounts as a final fermentation product in mixed cultures with *M. barkeri*.

The final mixed culture tested was a combination of both methanogens (*M. barkeri* and *M. formicicum*) in coculture with *E. coli*, *A. woodii*, and *D. vulgaris*. The final yield of CH₄ (28.4 mmol/liter of medium) was slightly higher compared with the same consortium without *M. formicicum* (27 mmol/liter) and represented a 42% recovery of sucrose carbon as CH₄. The final yield of CH₄ from sucrose degradation by the complete consortium (28.4 mmol/liter) represented an increase of 14% compared with the predicted yield (24.5 mmol/liter) calculated from data of the complete consortium without *M. barkeri* (Table 1B and D).

The kinetics of sucrose degradation by specific mixed cultures are presented in Fig. 1A and B. At a sucrose concentration of 5 mM, rates of CH₄ production were 133 $\mu\text{mol day}^{-1} 100 \text{ ml}^{-1}$ when *M. formicicum* was cultured with *E. coli*, *A. woodii*, and *D. vulgaris* (Fig. 1A), compared with 330 $\mu\text{mol day}^{-1} 100 \text{ ml}^{-1}$ when *M. barkeri* was cultured with *E. coli*, *A. woodii*, *D. vulgaris*, and *M. formicicum* (Fig. 1B). Acetate accumulated in the consortium without *M. barkeri* and reached a final concentration of 17.1 mM. In the consortium with *M. barkeri*, acetate was detected in low concentrations (5 mM) as an intermediate product during the

course of sucrose degradation, with final concentrations of less than 2 mM being detected.

Immobilization of mixed cultures. Agar was chosen as a matrix to test the effect of immobilization of the defined consortia on sucrose degradation to CH₄. Two different-size pellets of solidified agar were tested to determine the characteristics of sucrose diffusion through the agar matrix, and the results are presented in Fig. 2. As expected, the smaller pellets (2.5 by 2.5 by 6 mm), having a greater surface/volume ratio, exhibited faster sucrose equilibration with the suspending medium than the larger pellets (6 by 6 by 6 mm). An equilibrium of sucrose between the agar matrix and the suspending fluid was reached after 20 and 35 min, respectively, for the small and large pellets. The small-size pellets were used throughout this study for immobilized consortia.

The complete consortium, consisting of *E. coli*, *A. woodii*, *D. vulgaris*, *M. formicicum*, and *M. barkeri*, was immobilized with Noble agar and tested to determine the effect on sucrose degradation to CH₄. The results presented in Fig. 1D indicate that the rate of CH₄ production for the immobilized consortium (320 $\mu\text{mol day}^{-1} 100 \text{ ml}^{-1}$) and the total CH₄ produced (2,300 $\mu\text{mol} 100 \text{ ml}^{-1}$) were almost identical to the data obtained for the consortium of free cells (Fig. 1B). Thus, the agar-immobilization procedure did not affect the activity of the defined consortium. When Noble agar was substituted with Bacto-Agar (Difco) for immobilization, no differences in methanogenesis were noted.

Influence of *A. woodii* in defined consortium. To determine the importance of *A. woodii* on CH₄ production in the defined immobilized consortium, a comparison was made between the complete consortium and the consortium without *A. woodii*. At a sucrose concentration of 5 mM, the total CH₄ production for the consortium without *A. woodii* was

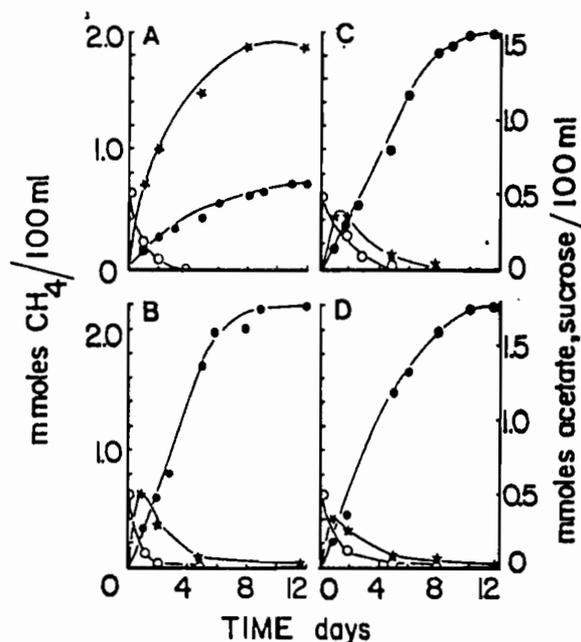


FIG. 1. Kinetics of sucrose degradation by defined mixed cultures. (A) Mixed culture of *E. coli*, *A. woodii*, *D. vulgaris*, and *M. formicicum*. (B) Mixed culture as in (A) with *M. barkeri*. (C) Agar-immobilized mixed culture of *E. coli*, *D. vulgaris*, *M. formicicum*, and *M. barkeri*. (D) Agar-immobilized mixed culture as in (C) with *A. woodii*. Symbols: O, sucrose; ●, CH₄; *, acetate. Cultures were incubated at 37°C with shaking in basal medium (0.17% [wt/vol] sucrose).

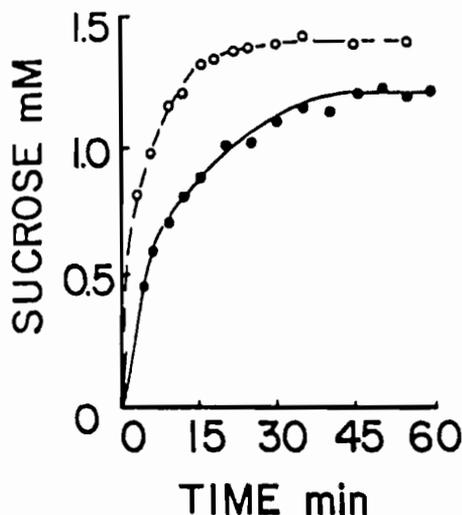


FIG. 2. Diffusion of sucrose through agar matrix. Pellets of solidified agar containing sucrose (0.5% [wt/vol]) were added to a solution of distilled water, and sucrose release was followed with time. Symbols: ●, agar pellets (6 by 6 by 6 mm); ○, agar pellets (2.5 by 2.5 by 6 mm).

2,000 $\mu\text{mol } 100 \text{ ml}^{-1}$ (Fig. 1C); the maximal rate of CH_4 production was 220 $\mu\text{mol day}^{-1} 100 \text{ ml}^{-1}$. These values are 13 and 30% less, respectively, compared with the results of the complete immobilized consortium (Fig. 1D). These results suggest that *A. woodii* significantly contributes to the pool of methanogenic precursors, either by the homoacetic fermentation of glucose or fructose or by the oxidation of lactate to acetate.

Effects of temperature, storage, and reducing conditions on immobilized consortia. Several temperatures in the mesophilic range of growth were tested to determine the effect of temperature on CH_4 production by the defined immobilized consortium. The rates of CH_4 production at 30 and 37°C at a sucrose concentration of 1.5 mM were similar (Fig. 3). At 25°C, however, a lag was noted before the onset of CH_4 production.

Pellets of the immobilized consortium were added to basal medium without sucrose and stored at 4°C under an atmosphere of N_2 for various lengths of time to determine the effect of cold storage on the activity of the consortium. Cold storage under N_2 in the absence of substrate significantly affected the rate of CH_4 production (Fig. 4). After 1 and 5 weeks of storage at 4°C, the rates of CH_4 production were 40 and 60% lower, respectively, compared with the rate of a consortium tested immediately after preparation (control).

The effects of anaerobiosis and reducing conditions on CH_4 production by the immobilized consortium were tested, using basal medium prepared in various ways (Table 2). In aerobically prepared basal medium without cysteine, no CH_4 production was detected after 10 days of incubation at 37°C. Aerobically prepared basal medium without cysteine, pre-reduced by axenic *E. coli* fermentation, was inoculated with the immobilized consortium, and the rate of CH_4 production was reduced by 40% compared with controls. When the aerobically prepared basal medium without cysteine was aseptically bubbled with sterile N_2 at a rate of 100 ml min^{-1} for 15 min, the immobilized consortium exhibited a 25% reduction in the rate of CH_4 production. When basal medium with cysteine was used in a similar experiment, no difference in the rate of CH_4 production was found compared with

standard anaerobically prepared basal medium with cysteine.

DISCUSSION

Methanogenesis from biopolymers in natural ecosystems occurs in three basic steps (29): fermentation, acetogenesis, and methanogenesis. The acetogenic step, for our purposes, is defined as intermediary reactions producing acetate, i.e., via oxidation of organic acids or alcohols to acetate, or oxidation of hydrogen and reduction of CO_2 to acetate. *E. coli* was chosen as the primary organism responsible for the first step in the bioconversion of sucrose to CH_4 because the mixed acid fermentation of sucrose by *E. coli* primarily yields direct methanogenic substrates (acetate, formate, H_2 , and CO_2) and indirect (ethanol, lactate) methanogenic precursors. *A. woodii* and *D. vulgaris* were chosen to fulfill the acetogenic step of the metabolic scheme; both bacteria are capable of lactate oxidation to acetate, although by different mechanisms. In addition, *A. woodii* may play an additional role in the production of methanogenic precursors by a homoacetic fermentation of hexose. Further, *D. vulgaris* oxidizes ethanol to acetate and reduces sulfate to sulfide; it is known that sulfide is required by most methanogens for growth and that reducing conditions are required for activity (6, 29, 32). The methanogenic step was effected by *M. barkeri* and *M. formicicum* to ensure optimal CH_4 production from several methanogenic substrates. As indicated by the results, optimal CH_4 production from sucrose was obtained by the complete consortium (*E. coli*, *A. woodii*, *D. vulgaris*, *M. barkeri*, and *M. formicicum*). At a sucrose concentration of 0.2% (wt/vol), ca. 42% of the sucrose carbon was recovered as CH_4 . An estimate of the percentage of CH_4 arising from acetate was made from the difference in CH_4 produced by the consortium in the presence and absence of *M. barkeri*, since *M. barkeri* was the sole acetate-degrading organism present. Calculations revealed that 70% of the CH_4 was produced from acetate, and this value is in good agreement with data from various ecological studies (14), indicating that our consortium may be representative of the type of mixed cultures found in natural fermentative-methanogenic habitats.

The performance of the constructed consortium was significant considering that conditions for bacterial growth were severely limited in our experiments. Only trace

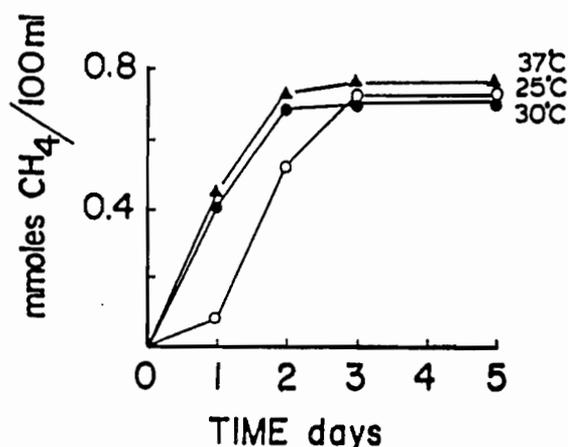


FIG. 3. Effect of incubation temperature on methanogenesis from sucrose (0.05% [wt/vol]) by the complete defined immobilized consortium (*E. coli*, *A. woodii*, *D. vulgaris*, *M. formicicum*, and *M. barkeri*). Symbols: ○, 25°C; ●, 30°C; ▲, 37°C.

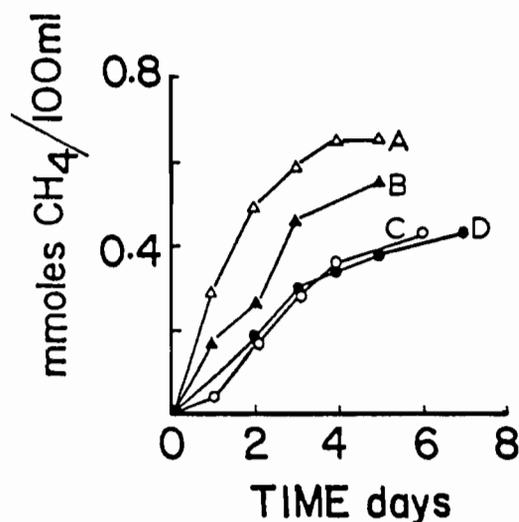


FIG. 4. Effect of storage time of the complete immobilized consortium on methanogenesis from sucrose (0.05% [wt/vol]). Agar pellets of the consortium were added to basal medium without substrate and stored at 4°C for 1 week (B), 3 weeks (C), and 5 weeks (D) before the addition of substrate and incubation at 37°C. (A) Control to which substrate was added immediately after preparation of the consortium.

amounts of essential growth nutrients, including sources of nitrogen and phosphorus, were provided through the addition of untreated ground water. In addition, dilute substrate concentrations were tested in most experiments. However, results of our studies indicated that the bacterial consortium was nevertheless efficient in the conversion of sucrose to CH₄ in growth-limiting medium.

There is much evidence to support the premise that interspecies H₂ transfer reactions, as first reported by Iannotti et al. (13), are important in the performance of our consortium. A dramatic shift in the levels of fermentation products of sucrose degradation by *E. coli* was noted when *E. coli* was cocultured with either methanogen. This phenomenon has been well documented with a variety of mixed cultures (7-9, 13, 18, 21, 31). The H₂-utilizing organisms *M. formicicum* and *D. vulgaris* also may play a role in the performance of acetate utilization by *M. barkeri*. It has been reported (4) that the presence of H₂ inhibited CH₄ production from acetate in enrichment cultures containing methanosarcina; if this is the case, then methanogenesis from

TABLE 2. Effects of anaerobiosis and reducing conditions on methanogenesis from sucrose^a

Condition	Total CH ₄ production (mmol/100 ml)	Maximal rate of CH ₄ (mmol day ⁻¹ 100 ml ⁻¹)
Anaerobic	0.8	0.4
N ₂ sparged ^b	0.8	0.4
N ₂ sparged ^c	0.5	0.3
Aerobic, <i>E. coli</i> pre-reduced ^d	0.5	0.25
Aerobic ^e	0	0

^a Pellets of the defined immobilized consortium (*E. coli*, *A. woodii*, *D. vulgaris*, *M. formicicum*, and *M. barkeri*) were added to basal medium (0.05% [wt/vol] sucrose), prepared as indicated, and incubated at 37°C with shaking for 10 days.

^b Medium gassed with N₂ at a flow rate of 100 ml min⁻¹ for 15 min.

^c Medium without cysteine.

acetate would be optimized if H₂ was removed by the H₂-consuming bacteria.

Several types of matrices for whole-cell immobilization have been investigated, including gels of agar (15, 20), carrageenan (24), alginate (17, 20, 22), gelatin (10), and polyacrylamide (15). Alginate and agar gels are experimentally desirable because of their ease of use and nontoxic characteristics. Agar immobilization of the defined consortium had no apparent effects on sucrose degradation, rate of CH₄ production, or final yield of CH₄ compared with nonimmobilized mixed cultures. With agar-immobilized consortia, the influence of *A. woodii* and *D. vulgaris* on CH₄ production from sucrose was evident, specifically at higher sucrose concentrations. Whereas both organisms significantly contributed to the pool of methanogenic precursors, *D. vulgaris* probably played an important role by production of sulfide. The use of immobilized bacterial consortia may prove to be an effective means of retaining specific biocatalysts within continuous-flow methanogenic systems.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. Gabriel for excellent technical assistance.

This work was supported by U.S. Department of Energy grant DE-AC02-80ER 10681.

LITERATURE CITED

- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43:260-296.
- Balch, W. E., S. Scherberth, R. S. Tanner, and R. S. Wolfe. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27:355-361.
- Balch, W. E., and R. S. Wolfe. 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:781-791.
- Baresi, L., R. A. Mah, D. M. Ward, and I. R. Kaplan. 1978. Methanogenesis from acetate: enrichment studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:186-197.
- Bergmeyer, H. U., and H. Klotzsch. 1965. Estimation of substrates, p. 99-102. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, Inc., New York.
- Bryant, M. P., S. F. Tzeng, I. M. Robinson, and A. E. Joyner. 1971. Nutrient requirements of methanogenic bacteria. *Adv. Chem. Ser.* 105:23-40.
- Bryant, M. P., E. A. Wollin, M. J. Wollin, and R. S. Wolfe. 1967. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.* 59:20-31.
- Chen, M., and M. J. Wollin. 1977. Influence of CH₄ production by *Methanobacterium ruminantium* on the fermentation of glucose and lactate by *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:756-759.
- Chung, K.-T. 1976. Inhibitory effects of H₂ on growth of *Clostridium cellulosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:342-348.
- Gianfreda, L., P. Parascandola, and V. Scardi. 1980. A new method of whole microbial cell immobilization. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11:6-7.
- Hadziija, O. 1974. A simple method for the quantitative determination of muramic acid. *Anal. Biochem.* 60:512-517.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes, p. 117-132. In J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press, Inc., New York.
- Iannotti, E. L., D. Kulkewitz, M. J. Wollin, and M. P. Bryant. 1973. Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: changes caused by interspecies transfer of H₂. *J. Bacteriol.* 114:1231-1240.

14. Jeris, J. S., and P. L. McCarty. 1965. The biochemistry of methane fermentation using ^{14}C -tracers. *J. Water Pollut. Control Fed.* 37:178-192.
15. Karube, I., S. Kuriyama, T. Matsunaga, and S. Suzuki. 1980. Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 22:847-857.
16. Khan, A. W. 1980. Degradation of cellulose to methane by a coculture of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:233-235.
17. Kierstan, M., and C. Bucke. 1977. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* 19:387-397.
18. Latham, M. J., and M. J. Wolin. 1977. Fermentation of cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the presence and absence of *Methanobacterium ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:297-301.
19. Laube, V. M., and S. M. Martin. 1981. Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by triculture of *Acetivibrio cellulolyticus*, *Desulfovibrio* sp., and *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:413-420.
20. Maddox, I. S., P. Dunnill, and M. D. Lilly. 1981. Use of immobilized cells of *Rhizopus nigricans* for the 11-hydroxylation of progesterone. *Biotechnol. Bioeng.* 23:345-354.
21. Schelfinger, C. C., B. Linehan, and M. J. Wolin. 1975. H_2 production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.* 29:480-483.
22. Scherer, P., M. Kluge, J. Klein, and H. Sahm. 1981. Immobilization of the methanogenic bacterium *Methanosarcina barkeri*. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1057-1065.
23. Smith, P. H., and R. A. Mah. 1966. Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.* 14:368-371.
24. Wada, M., J. Kato, and I. Chibata. 1981. Continuous production of ethanol in high concentration using immobilized growing yeast cells. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11:67-71.
25. Weimer, P. J., and J. G. Zeikus. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:289-297.
26. Winter, J. U. 1980. Glucose fermentation to methane and CO_2 by defined mixed cultures. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. C* 1:293-306.
27. Winter, J. U., and R. S. Wolfe. 1979. Complete degradation of carbohydrate to carbon dioxide and methane by syntrophic cultures of *Acetobacterium woodii* and *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* 121:97-102.
28. Winter, J. U., and R. S. Wolfe. 1980. Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. *Arch. Microbiol.* 124:73-79.
29. Wolfe, R. S., and I. J. Higgins. 1979. Microbial biochemistry of methane—a study in contrasts, p. 268-295. *In* J. R. Quayle (ed.), *International review of biochemistry*, vol. 21. University Park Press, Baltimore.
30. Wolin, E. A., M. J. Wolin, and R. S. Wolfe. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238:2882-2886.
31. Wolin, M. J. 1974. Metabolic interactions among intestinal microorganisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 27:1320-1328.
32. Zeikus, J. G. 1977. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41:514-541.

**2.2. Production de méthane à partir du propionate
par une culture mixte définie méthanogène.**

INTRODUCTION.

La formation d'acides gras volatils (AGV) est une étape intermédiaire de grande importance pour la digestion anaérobie. La conversion de ces acides est réalisée par un groupe particulier de bactéries: les bactéries OHPA. Lors d'une mauvaise opération d'un digesteur anaérobie conduisant à une destabilisation du procédé, ces acides s'accumulent. Le propionate est l'AGV qui nécessite pour son oxydation anaérobie les conditions de pression partielle en hydrogène les plus basses. Actuellement nous ne connaissons qu'un seul organisme isolé et caractérisé, capable de réaliser cette réaction: Syntrophobacter wolinii. En présence de sulfate, Desulfobulbus propionicus et elongatus (BSR du groupe II) peuvent utiliser le propionate comme source de carbone et d'énergie.

Les BSR du groupe I du genre Desulfovibrio sont capables d'établir, en absence de sulfate, une relation syntrophique avec les bactéries méthanogènes pour dégrader le lactate ou l'éthanol. Il est donc intéressant a priori de se poser la question de savoir si des BSR du groupe II, du genre Desulfobulbus peuvent établir une relation similaire en absence de sulfate, pour la dégradation du propionate. La réponse donnée par ce travail est négative, et par conséquent il n'y a pas actuellement d'alternative connue à l'oxydation du propionate par Syntrophobacter wolinii en absence de sulfate.

Néanmoins, on peut supposer qu'en présence d'un effluent riche en sulfate, les bactéries sulato-réductrices peuvent entrer en compétition avec les bactéries OHPA pour l'utilisation des AGV. Le problème majeur dérivant de l'utilisation des sulfates étant la formation et l'accumulation de sulfures d'hydrogène à des concentrations inhibitrices. Dans l'article intitulé: "Methane production from propionate by methanogenic mixed culture", une culture mixte définie capable de transformer complètement le propionate en méthane et gaz carbonique en présence de sulfate, est présentée. Cette conversion n'est seulement possible que si les sulfures produits sont piégés par du fer ferreux, empêchant ainsi l'inhibition de la méthanogène acétoclaste de la co-culture. Une telle observation a une conséquence pratique au niveau des réacteurs anaérobies traitant des effluents riches en sulfates, car l'addition de fer ferreux à ces réacteurs peut éviter d'éventuels problèmes par les sulfures libres.

FEM 02007

Methane production from propionate by methanogenic mixed culture

(Anaerobic digestion; propionate; methanogenesis; mixed culture; sulfide inhibition)

J.P. Guyot, I. Traoré and J.L. Garcia

Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3 Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3, France

Received 16 November 1984

Accepted 23 November 1984

1. SUMMARY

The association of *Desulfobulbus* sp. with *Methanosarcina barkeri* 227 was able to produce CH₄ from propionate in the presence of sulfate, if a sufficient amount of ferrous iron was added to the media in order to trap the soluble sulfides produced from sulfate. In the absence of ferrous iron, soluble sulfides inhibited the acetoclastic reaction. Attempts to cultivate *Desulfobulbus* sp. with H₂-utilising methanogenic bacteria in the absence of sulfate did not succeed.

2. INTRODUCTION

Anaerobic degradation of organic matter to CH₄ proceeds through the formation of volatile fatty acids (VFA) [1,2] which are in turn transformed to the major methanogenic substrates (acetate, H₂-CO₂) mainly by obligate hydrogen-producing acetogenic bacteria (OHPAB) [2–7]. Use of propionate, one of the major VFAs formed, is of interest. Furthermore, propionate accumulates under overload conditions which often lead to digester failure.

Two types of bacteria are known to perform incomplete propionate oxidation in anaerobic

environments: a sulfate-reducing bacterium *Desulfobulbus propionicus* [8] and an OHPAB *Syntrophobacter wolinii* [3]. In parallel to the microbiological characterizations of propionate degraders, some authors gave biochemical data on turn-over rates and pathways of propionate degradation [4–6]. Recently, evidence for the existence of two sub-groups of propionate users in a sulfate-limited digester was found by kinetic analysis [9]. The first sub-group, with a μ_{\max} of 0.0054 h⁻¹, was reported as being similar to *S. wolinii*, the second was a faster growing sub-group with a μ_{\max} of 0.05 h⁻¹, and not related to a known bacterium.

There are no reports to date of *D. propionicus* growing in syntrophic relation with hydrogenophilic bacterium in the absence of sulfate. A sulfate-reducing bacterium isolated in our laboratory, not identical to *D. propionicus*, has a μ_{\max} of 0.025 h⁻¹ while growing on propionate plus sulfate, and is able to use H₂ as electron donor. This paper describes attempts to create methanogenic cocultures of this propionate user with hydrogenophilic or acetoclastic methanogenic bacteria.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Organisms and growth conditions

The anaerobic techniques described by Hungate

[10] and Balch et al. [11,12] were used throughout this study. Bacteria were grown anaerobically in aluminium-seal culture tubes (Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ). *Methanobacterium formicicum* MF was grown at 37°C in the medium of Balch et al. under 30 psi of H₂-CO₂ (4:1). *M. barkeri* 227 was grown at 37°C under 5 psi of N₂-CO₂ (4:1) in the medium described elsewhere [13] but with the TES-buffer replaced by sodium bicarbonate (5 g/l).

Desulfobulbus sp. was isolated in our laboratory from a digester and grown at 30°C under 5 psi of N₂-CO₂ (4:1) in a medium containing the following constituents (per 1 distilled water): mineral solution no. 1 [12], 50 ml; mineral solution no. 2 [12], 50 ml; trace vitamin solution [14], 10 ml; trace mineral solution [14], 10 ml; NiCl₂·6H₂O, 0.5 mg; Na₂SeO₄, 3.7 mg; yeast extract, 0.1 mg; FeSO₄·7H₂O, 2 mg; resazurin, 1 mg; NaHCO₃, 5 g; NH₄Cl, 1 g; sodium propionate, 1 g; Na₂SO₄, 3 g.

Anoxic medium was prepared by boiling the medium without added reducing agents under a stream of N₂ for 60 s. Then cysteine-HCl·H₂O was added at 0.5 g/l and the medium was dispensed inside an anaerobic glove box (La Calhène, Bezons, France). Media were sterilized at 120°C for 20 min. Sterile Na₂S·9H₂O was added to each liquid culture before inoculation to a final concentration of 0.05% (w/v), except for the medium of *Desulfobulbus* sp. (final concentration 0.2 g/l).

3.2. Analytical procedures

Methane was analyzed in a Varian Aerograph 2700 equipped with a flame ionization detector and a 2 m stainless steel column packed with Porapak Q (80/100 mesh) and operated at 160°C. The carrier gas was N₂ at a flow rate of 20 ml/min. CH₄ was quantitated by comparing the peak height with known standards. Acetate and propionate were analysed by gas chromatography, using the same apparatus as for CH₄. A 1/8" × 2 m stainless steel column packed with 25% NPGA and 2% H₃PO₄ on Chromosorb WAW (80/100 mesh) was used. The carrier gas was N₂ saturated with formic acid at a flow rate of 30 ml/min and operated at 160°C.

Each liquid sample (1.0 ml) was removed

aseptically and 20 µl of H₃PO₄ (50% v/v) were added. Then the sample was centrifuged for 5 min at 10 000 × g to remove cells. The peak height was compared to known standards. Soluble sulfides were estimated according to a new method (F. Widdel and R. Cordruwisch, in press).

3.3. Experimental conditions

The basal medium used for all experiments was the same as described for the culture of *Desulfobulbus* sp., except for Na₂SO₄ and sodium propionate. Sulfate and propionate were added to final concentrations of 0.9 g/l and 0.6 g/l. All experiments were run in triplicate. Controls without substrates were made each time.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Bryant et al. [15] and McInerney and Bryant [16] described the coupling by interspecies H₂ transfer between *Desulfovibrio* sp. and an H₂-using methanogenic bacterium in a sulfate-free medium with lactate or ethanol as substrate. The propionate degrader, *Desulfobulbus* sp., is able to use H₂ as electron donor in the presence of sulfate. Therefore, the strain was tested for the ability to evolve hydrogen in a syntrophic association with the hydrogenophilic bacteria *M. formicicum* MF or *M. barkeri* 227. Attempts to couple these bacteria in a sulfate-free medium failed. Thus *Desulfobulbus* sp. cannot be a representative of the second sub-

Table 1

End products formed after different periods of incubation of two mixed cultures

mmol/l	6 days ^a	13 days ^a	13 days ^b
Propionate	0	0	6.24
Acetate	6.20	6.25	0
CH ₄	0	0	0
Total sulfides	nd ^c	5	nd

^a Association of *Desulfobulbus* sp. with *M. barkeri* 227 on propionate (6.24 mM) in presence of sulfate (6.3 mM).

^b Association of *Desulfobulbus* sp. with either *M. barkeri* 227 or *M. formicicum* MF on propionate (6.24 mM) without sulfate or other electron acceptor (all sulfate salts in the medium were replaced by their chloride equivalents).

^c not determined.

Table 2

CH₄ production by *M. barkeri* 227 at 30°C from sodium acetate (1 g/l)

	mmol CH ₄ /l/day	final CH ₄ mmol/l
A	0.85	6.6
B	0.85	6.6
C	0.80	6.8

A, acetate only; B, in presence of Na₂SO₄ (6.3 mM); C, in presence of sodium propionate (6.24 mM).

group of propionate users reported by Heyes and Hall [9].

CH₄ could also be produced from propionate by the coculture *Desulfobulbus* sp. and *M. barkeri* 227. Under those conditions propionate was converted to acetate plus CO₂, and no CH₄ was evolved (Table 1). A pure culture of *M. barkeri* 227 was used to test for inhibition of the acetoclastic reaction by either propionate or sulfate. No inhibition was found (Table 2), thus the inhibition was believed to be caused by sulfides. The association was therefore grown in a medium supplemented with an excess of iron sulfate, to trap soluble sulfide as FeS.

After 10 days of incubation, all propionate was converted to acetate and CO₂, and the acetate to CH₄ and CO₂. No soluble sulfide was detected (Table 3; Fig. 1). So, in digesters or other anaerobic ecosystems, where acetate is not limiting [17], such a pathway for propionate degradation could be expected. The anaerobic environment must contain sufficient amounts of sulfate and iron, or other metallic ions able to trap soluble sulfide.

Table 3

End products formed by the association *Desulfobulbus* sp. - *M. barkeri* 227 grown on propionate (6.2 mM) plus sulfate (6.3 mM) with 6.5 mM of FeSO₄·7H₂O

mmol/l	6 days	10 days
Propionate	0	0
Acetate	3.07	0
Sulfides	nd ^a	0
CH ₄	3.05	6.20

^a nd, not determined.

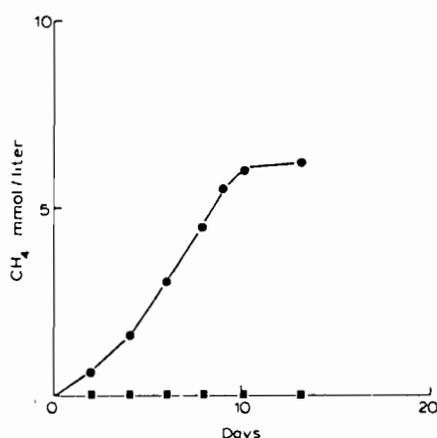


Fig. 1. Methane production by the association *Desulfobulbus* sp. and *M. barkeri* 227 grown on propionate and sulfate, in the presence of 6.5 mM FeSO₄·7H₂O ●, or in the absence of iron ■.

Furthermore, even when trapped as FeS, sulfide is probably still available to methanogens, as shown by Scherer et al. [18] with *M. barkeri* grown on methanol. The fact that iron must be added in order to avoid sulfide inhibition is supported by, and appears to explain, the results obtained by Van Den Berg et al. [19], who noted that the addition of 5 mM of ferrous chloride to a fermenter, fed with bean-blanching waste, greatly stimulated the acetate conversion.

In the literature there is a lack of data about relative cell numbers of sulfate-reducing bacteria and OHPAB using propionate in digesters working with different types of waste. Nevertheless, the activity of bacteria such as *D. propionicus* in anaerobic digesters is probably of little importance in comparison to OHPAB activity. Thus, according to the data of Heyes and Hall [9], other OHPAB with faster growth rates than *S. wolinii* must be present.

REFERENCES

- [1] McCarty, P.L., Jeris, J.S. and Murdoch, W. (1963) *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 35, 1501.
- [2] McInerney, M.J., Bryant, M.P. and Pfennig, N. (1979) *Arch. Microbiol.* 122, 129-135.
- [3] Boone, D.R. and Bryant, M.P. (1980) *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 626-632.

- [4] Kaspar, H.F. and Wuhrmann, K. (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 1-7.
- [5] Koch, M., Dolfing, J. Wuhrmann, K. and Zehnder, A.J.B. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1411-1414.
- [6] Mackie, R.I. and Bryant, M.P. (1981) *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1363-1373.
- [7] Zehnder, A.J.B. (1978) in *Water Pollution Microbiology* (Mitchell, R., Ed.) Vol. 2, pp. 349-376, Wiley, New York.
- [8] Widdel, F. and Pfennig, N. (1982) *Arch. Microbiol.* 131, 360-365.
- [9] Heyes, R.H. and Hall, R.J. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 710-715.
- [10] Hungate, R.E. (1969) in *Methods in Microbiology* (Norris, J.R. and Ribbons, D.W., Eds.) Vol. 3B, pp. 117-132, Academic Press, New York.
- [11] Balch, W.E. and Wolfe, R.S. (1976) *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 781-791.
- [12] Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, J., Woese, C.R. and Wolfe, R.S. (1979) *Microbiol. Rev.* 43, 260-296.
- [13] Jones, W.J., Guyot, J.P. and Wolfe, R.S. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1-6.
- [14] Wolin, E.A., Wolin, M.J. and Wolfe, R.S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2882-2886.
- [15] Bryant, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A. and Crabill, M.R. (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1162-1169.
- [16] McInerney, M.J. and Bryant, M.P. (1981) *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 346-354.
- [17] Schonheit, P., Kristjansson, J.K. and Thauer, R.K. (1982) *Arch. Microbiol.* 132, 285-288.
- [18] Scherer, P. and Sahm, H. (1981) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 28-35.
- [19] Van Den Berg, L., Lamb, K.A., Murray, W.D. and Armstrong, D.W. (1980) *J. Appl. Microbiol.* 48, 437-447.

2.3. Méthanogénèse à partir du xylane par des cultures mixtes composées de Cellulomonas sp. associée à des méthanogènes et Desulfovibrio vulgaris J.J.

INTRODUCTION.

Nous avons étudié précédemment la méthanisation d'un disaccharide et d'un acide gras volatil. De nombreux auteurs se sont penchés sur la dégradation anaérobie de la cellulose, aucun n'a utilisé les hémicelluloses comme substrat modèle pour des cultures définies méthanogènes. Les hémicelluloses représentent une fraction non négligeable de la biomasse végétale et peuvent être retrouvées, comme leurs dérivés d'hydrolyse: le xylose, dans différents effluents.

Il était donc intéressant d'élaborer et d'analyser une culture mixte, capable de transformer le xylane en méthane, selon le même principe que celui utilisé pour constituer celle pouvant méthaniser le saccharose. La différence entre ces deux cultures consiste essentiellement dans le fait que Cellulomonas, la bactérie xylanolytique utilisée, ne produit pas d'hydrogène. Ce qui élimine un facteur et permet de simplifier l'analyse des rapports inter-microbiens. Selon les résultats obtenus, contrairement à E. coli, Cellulomonas ne peut pas établir de transfert interspèce d'hydrogène avec les bactéries méthanogènes.

Ce travail est un bon exemple des services rendus par l'utilisation de cultures mixtes définies, pour l'étude de l'écophysiologie de la digestion anaérobie, car l'analyse des résultats des cultures mixtes établies avec Cellulomonas a été fructueuse, étant donné qu'elle a permis de mettre à jour l'existence de deux phénomènes nouveaux:

- l'inhibition de la réaction méthanogénique à partir de l'acétate par le formate,
- la possibilité d'un transfert interspèce d'hydrogène entre une BSR et une méthanogène à partir du formate.

Ces deux phénomènes sont démontrés dans le cadre de l'article présenté et des suivants.

FEM 02386

Role of formate in methanogenesis from xylan by *Cellulomonas* sp. associated with methanogens and *Desulfovibrio vulgaris*: inhibition of the aceticlastic reaction

(Methanogenesis; xylan; formate; defined mixed culture; inhibition)

J.P. Guyot

ORSTOM, Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, 3 Place Victor-Hugo, 13331 Marseille Cédex 3, France

Received 23 September 1985

Accepted 9 December 1985

1. SUMMARY

Different methanogenic defined mixed cultures, including *Cellulomonas* sp. strain ATCC21399 as a hydrolytic and fermentative bacterium, were used to show that methane production could proceed from larchwood xylan as well as from cellulose. Via the different mixtures of bacteria used, the role of formate is described. It is shown that formate inhibits methanogenesis from acetate by pure cultures of aceticlastic methanogens.

2. INTRODUCTION

The anaerobic degradation of organic matter on a laboratory scale has been studied using glucose and cellulose degradation [1-6]. Cellulose (and therefore glucose) accounts for a high percentage of the composition of biomass [7], but relatively little reference has been made to the other important substrate, hemicellulose, and its main product of hydrolysis, xylose [8]. Hemicellulose is not only an important component of plant cell-walls, but may represent one of the main residues of the different industries processing wood or biomass [7,9].

This paper reports on the production of methane from xylan, using defined mixed cultures of bacteria involved in the anaerobic digestion of organic matter. An attempt is made to point out the importance of formate, as shown by the use of mixed and pure cultures.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Organisms and growth conditions

The anaerobic techniques described by Hungate [10], Balch and Wolfe [11] and Balch et al. [12] were used throughout this study. Bacteria were grown anaerobically in aluminium-seal culture tubes (Bellco Glass, Vineland, NJ, U.S.A.). *Methanobacterium formicicum* MF was grown at 37°C under 5 psi of N₂-CO₂ (4:1) in the medium of Balch et al. [12]. *Methanosarcina barkeri* 227 was grown at 37°C under 30 psi of H₂-CO₂ (4:1) and *Methanosarcina thermophila* at 55°C, under 5 psi of N₂-CO₂ (4:1) in the medium described by Jones et al. [13], except that TES-buffer was replaced by bicarbonate buffer (4 g/l). *Desulfovibrio vulgaris* J.J. was grown at 37°C, as previously described [13].

Cellulomonas sp. strain ATCC21399 was grown

at 30°C under 5 psi of N₂-CO₂ (4:1) in the following medium: mineral solution No. 1 [12], 50 ml; mineral solution No. 2 [12], 50 ml; trace vitamin solution [12], 10 ml; trace mineral solution [12], 10 ml; FeSO₄ · 7H₂O, 0.002 g; resazurin, 0.001 g; NH₄Cl, 1 g; xylan from larchwood (Sigma), 2 g; NaHCO₃, 7 g; yeast extract, 0.1 g; biotrypcase, 0.1 g; cysteine-HCl, 0.5 g. Anoxic medium was prepared as previously described [13].

Cellulomonas sp. strain ATCC21399 was used as a hydrolytic and fermentative bacterium able to produce acetate, ethanol and formate from xylan. Methanogenesis was expected from different mixtures of *Cellulomonas* and methanogenic bacteria such as: *Ms. barkeri* 227 as an acetoclastic methanogen, *Mb. formicicum* MF as a formate user.

In some experiments, *D. vulgaris* J.J. was added in methanogenic mixed cultures. This bacterium was able to degrade formate and to produce acetate from ethanol either in the presence or absence of sulfate on the basis of an interspecies hydrogen transfer [14].

3.2. Analytical procedures

Methane and acetate were assayed as previously described [15]. Ethanol was assayed using the same conditions as for CH₄. Formic acid was determined colorimetrically according to the method of Sleat and Mah [16]. Each liquid sample was prepared as previously described [15].

3.3. Experimental conditions

The basal medium used for all experiments was the same as described for *Cellulomonas* cultivation. In experiments containing both *D. vulgaris* and *Ms. barkeri* in the presence of sulfate, an excess of divalent iron was added to the medium to prevent inhibition of the acetoclastic reaction by high levels of soluble sulfides [15]. Xylan was added at the concentrations indicated. Experiments were performed in 60-ml serum bottles each containing 20 ml of medium. All experiments were made in triplicate and two controls without substrates were run for each experiment. Vials were incubated at 30°C except when specified.

For the sake of simplicity, associations of bacteria are designated as follows: C, *Cellulomonas*

sp.; D, *D. vulgaris*; F, *Mb. formicicum*; B, *Ms. barkeri*; e.g., association CDB contained *Cellulomonas* sp., *D. vulgaris* and *Ms. barkeri*.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Two sets of experiments were done at 1 g/l and 5 g/l of xylan. Methane production at 1 g/l of xylan leveled off after 11 days of fermentation for the association CDB in the presence of sulfate (Fig. 1), and after one week for the others (Fig. 1). At 5 g/l, fermentation was completed after a longer period, ranging between 20 and 40 days (Fig. 2). At this concentration, there was a long lag phase with CF we could not explain in terms of the adaptation of *Mb. formicicum* to the use of formate since this bacterium was pregrown on formate.

Maximum methane production was obtained with the association CDB in presence of sulfate at 1 g/l and 5 g/l of xylan, respectively 8 μmol/ml and 50 μmol/ml. In these conditions, methane

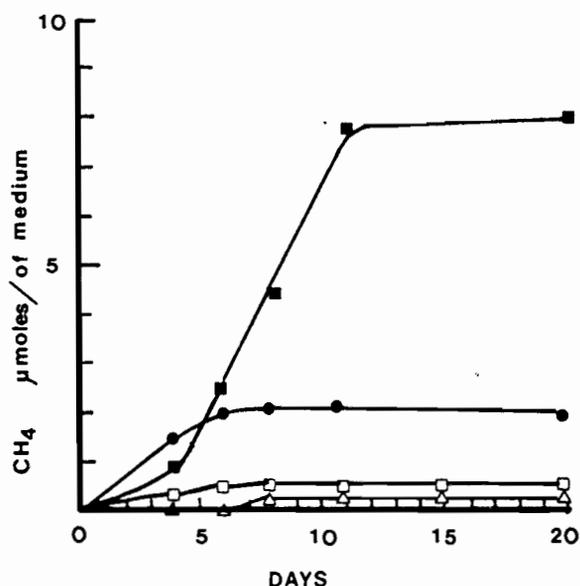


Fig. 1. Methane production from xylan (1 g/l) by different defined mixed cultures: Δ—Δ, CB; □—□, CF; ●—●, CDF in sulfate-free medium; ■—■, CDB in sodium sulfate and iron sulfate-containing medium (Na₂SO₄, 2 g/l; FeSO₄ · 7H₂O, 4 g/l).

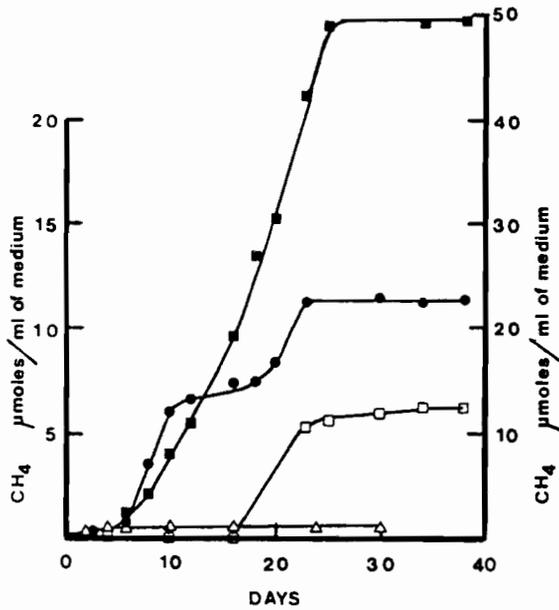


Fig. 2. Methane production from xylan (5 g/l). The left scale is for the following associations: □—□, CF; △—△, CB; ●—●, CDF in sulfate-free medium. The right scale is for: ■—■, CDB in sodium sulfate and iron sulfate-containing medium (Na_2SO_4 , 2 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g/l).

production from xylan followed the commonly acknowledged pathways [17]: hydrolysis and acidogenesis by *Cellulomonas* sp., acetogenesis by *D. vulgaris* and methanogenesis by *Ms. barkeri* 227.

No 2-step kinetic reactions were observed for the association CDF in sulfate-free medium at 1 g/l of xylan (Fig. 1), contrary to the result obtained at 5 g/l with the same association (Fig. 2). Nevertheless, at 1 g/l, a 2-step kinetic reaction could be obtained in the earlier stage of fermentation. Such a pattern could be explained, either as a sequential use of formate and then ethanol by *D. vulgaris* in association with *Mb. formicicum* on the basis of an interspecies hydrogen transfer, or by the use of formate first by *Mb. formicicum* alone and then the oxidation of ethanol by the association of the sulfate reducer and the methanogen.

At the end of the experiment at 1 g/l of xylan, no formate or ethanol was detected, and almost stoichiometric amounts of CH_4 were produced (Table 1) assuming the following ratios:

Table 1

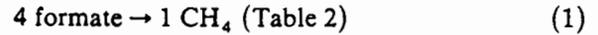
End-products formed at 1 g/l of xylan by different associations of bacteria (see text)

	Formate (mM)	Acetate (mM)	Ethanol (mM)	CH_4 ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)
CF	0	6.1	2.2	0.6
CB	2.4	5.6	2.3	0.3
CDF- SO_4^a	0	8	0	2.0
CDF+ SO_4^b	0	nd ^c	nd	0
CDB+ SO_4^b	0	0	0	8.0

^a In sulfate-free medium.

^b In medium plus sulfate (Na_2SO_4 , 2 g/l) and iron sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g/l).

^c nd, Not determined.



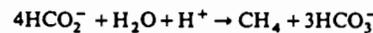
The use of formate by interspecies hydrogen transfer between *D. vulgaris* and *Mb. formicicum* could be a matter of controversy as the methanogen is a formate user (association CF, Table 1). Nevertheless, an alternative route could be suggested, i.e., carbon flow through formate in a sulfate-depleted environment, as described in Table 2.

In a medium containing an excess of sulfate, no CH_4 was produced by the association CDF, but all

Table 2

Alternative pathways for anaerobic formate uptake in sulfate-depleted environment

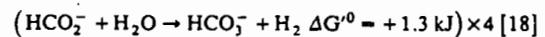
1. Direct use of formate by *Mb. formicicum*



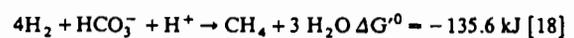
$$\Delta G'^0 = -130.4 \text{ kJ [18]}$$

2. Use of formate by interspecies hydrogen transfer:

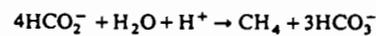
(i) half reaction completed by *D. vulgaris*



(ii) half reaction completed by *Mb. formicicum*



(iii) sum of these reactions



$$\Delta G'^0 = -130.4 \text{ kJ [21]}$$

the formate was used (Table 1). This would suggest that *D. vulgaris* displayed a higher affinity for formate than did *Mb. formicicum*. Therefore, in a way similar to the use of hydrogen in presence of sulfate [19], sulfate-reducing bacteria and formate-using methanogens seem to compete for formate. Thus, the presence of sulfate in anaerobic environments (e.g., anaerobic digestors, sediments) would divert the following compounds from direct methanogenesis to sulfatoreduction: hydrogen [19,20], acetate [21] and formate.

Another phenomenon was apparent the results (Table 1, Fig. 1): after several trials, methanogenesis from xylan never occurred when the association CB was used; only a very small amount of methane was produced and acetate was scarcely degraded (Table 1), even after a long period of incubation (one month). However, using the association CDB in the presence of sulfate (Table 1) or in its absence (Fig. 2), methanogenesis from acetate was not inhibited. The end-product formed by CB in the liquid phase were formate, acetate and ethanol (Table 1). Ethanol was not suspected to be an inhibitor at 2 mM, since the aceticlastic reaction had worked well in previous experiments, where ethanol appeared as an end-product in defined mixed cultures using *Ms. barkeri* 227 [13].

On the other hand, as with ethanol, formate did not accumulate when the association CDB was used in the presence of sulfate. Unless an unknown product responsible for this inhibition was used by the sulfate reducer, formate is suspected to be a direct inhibitor of the aceticlastic reaction.

Formate was shown to be an inhibitor of methanogenesis from acetate by Baresi et al. [22] but this work was done with an enrichment culture, so an indirect effect could be the explanation.

To demonstrate the direct inhibition of the aceticlastic reaction by formate, experiments with pure cultures of methanogens were performed. As shown in Fig. 3, methanogenesis from acetate by *Mb. barkeri* 227 is inhibited by formate.

It appears (Fig. 3) that the extent of inhibition depended on the formate concentration in relation to a fixed concentration of acetate (2 g/l). The rate and the amount of methane decreased with increasing formate concentrations (Fig. 3). In neither case was hydrogen detected. To make cer-

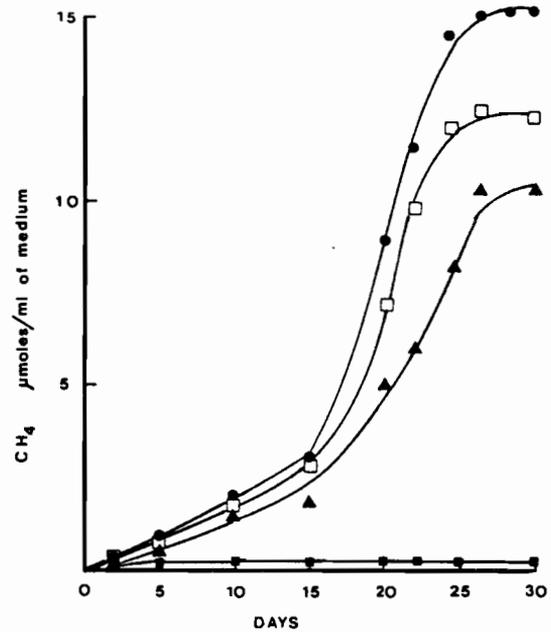


Fig. 3. Effect of different sodium formate concentrations upon methanogenesis of trihydrated sodium acetate (2 g/l), by *Ms. barkeri* 227 cultivated at 37°C: ●—●, 0 mM; □—□, 1.25 mM; ▲—▲, 2.5 mM; ■—■, 20 mM.

tain that this inhibition is not a feature peculiar to the mesophilic strain, experiments with an aceticlastic thermophilic methanogen, *Ms. thermophila*,

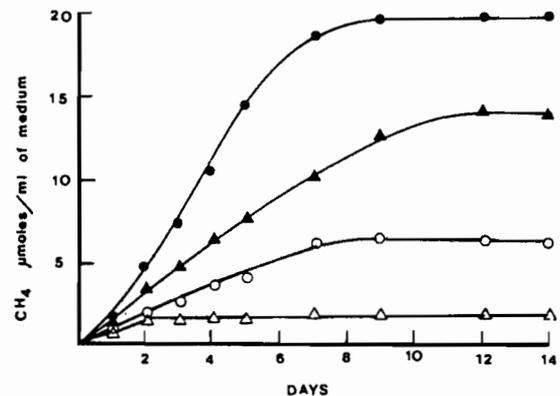


Fig. 4. Effect of 10 mM sodium formate on thermophilic methanogenesis of trihydrated sodium acetate by *Ms. thermophila* cultivated at 55°C: ●—●, Acetate 4 g/l, formate 0 mM; ○—○, acetate 4 g/l, formate 10 mM; ▲—▲, acetate 2 g/l, formate 0 mM; △—△, acetate 2 g/l, formate 10 mM.

were performed with 4 g/l and 2 g/l of trihydrated sodium acetate. As shown in Fig. 4, methanogenesis from acetate is inhibited by formate under thermophilic conditions. At a constant formate concentration, the extent of the inhibition depended on the acetate concentration (Fig. 4). Furthermore, the rate and total amount of evolved methane decreased to 0 (Fig. 4) and hydrogen was not evolved.

From these data, it is now clear that formate was responsible for the inhibition of methanogenesis in the mixed culture CB (Table 1); clearly, further studies need to be carried out on the inhibitory role of formate on anaerobic fermentations.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are given to J.L. Garcia for having provided help and support throughout this work, and to J. Morlon for having reviewed this paper.

REFERENCES

- [1] Bauchop, T. and Mountfort, D.O. (1981) *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 1103-1110.
- [2] Bharati, L., Baulaigue, R. and Matheron, R. (1982) *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3*, 466-474.
- [3] Khan, A.W. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 233-235.
- [4] Khan, A.W. and Trottier, T.M. (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1027-1034.
- [5] Latham, M.J. and Wolin, M.J. (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 297-301.
- [6] Min, C. and Wolin, M.J. (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 756-759.
- [7] Nussbaum, R. (1983) *Biofutur* 11, 33-42.
- [8] Timell, T.E. (1967) *Wood Sci. Technol.* 1, 45-70.
- [9] Du Toit, P.J., Olivier, S.P. and Van Bijon, P.L. (1984) *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1071-1078.
- [10] Hungate, R.E. (1969) in *Methods in Microbiology*, Vol. IIIB (Norris, J.R. and Ribbons, D.W. Eds.) pp. 117-132. Academic Press, London.
- [11] Balch, W.E. and Wolfe, R.S. (1976) *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 781-791.
- [12] Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. and Wolfe, R.S. (1979) *Microbiol. Rev.* 43, 260-296.
- [13] Jones, W.J., Guyot, J.P. and Wolfe, R.S. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1-6.
- [14] McInerney, M.J. and Bryant, M.P. (1981) *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 346-354.
- [15] Guyot, J.P., Traoré, I. and Garcia, J.L. (1985) *FEMS Microbiol. Lett.* 26, 329-332.
- [16] Sleat, R. and Mah, R.A. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 884-885.
- [17] McInerney, M.J. and Bryant, M.P. (1981) in *Biomass Conversion process for Energy and Fuels*, (Sofer, S.S. and Zaborsky, O.R., Eds.) pp. 277-296. Plenum, New York.
- [18] Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977) *Bacteriol. Rev.* 41, 100-180.
- [19] Kristjansson, J.K., Schönheit, P. and Thauer, R.K. (1982) *Arch. Microbiol.* 131, 278-282.
- [20] Lovley, D.R., Dwyer, D.F. and Klug, M.J. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1373-1379.
- [21] Schönheit, P., Kristjansson, J.K. and Thauer, R.K. (1982) *Arch. Microbiol.* 132, 285-288.
- [22] Baresi, L., Mah, R.A., Ward, D.M. and Kaplan, I.R. (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 186-197.

2.4. Production de méthane à partir
du formate par une association syntrophique entre
Methanobacterium bryantii et Desulfovibrio vulgaris.

INTRODUCTION.

Deux hypothèses sur le rôle du formate ont été formulées précédemment. La première relative au rôle inhibiteur du formate sur la réaction acétoclastique réalisée par les bactéries du genre Methanosarcina, hypothèse que nous avons démontrée, la seconde relative à la possibilité d'un transfert interspèce d'hydrogène à partir du formate, entre une BSR et une méthanogène. C'est cette dernière hypothèse qui est vérifiée et démontrée dans l'article suivant.

A cet effet, une BSR a été couplée avec une méthanogène hydrogénophile non utilisatrice de formate, en présence de formate comme seule source de carbone et d'énergie.

Methane Production from Formate by Syntrophic Association of *Methanobacterium bryantii* and *Desulfovibrio vulgaris* JJ

JEAN-PIERRE GUYOT* AND ALAIN BRAUMAN

Laboratoire de Microbiologie and Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, Université de Provence, 13331 Marseille Cedex, France

Received 15 May 1986/Accepted 19 September 1986

Coculture of a sulfate-reducing bacterium, when grown in the absence of added sulfate, with *Methanobacterium bryantii*, which uses only H₂ and CO₂ for methanogenesis, degraded formate to CH₄. A pure culture of *Desulfovibrio vulgaris* JJ was able to produce small amounts of H₂. Such a syntrophic relationship might provide an additional way to avoid formate accumulation in anaerobic environments.

It was previously shown that formate can inhibit the acetoclastic reaction in the presence of *Methanosarcina barkeri* 227 or *Methanosarcina barkeri* subsp. *thermophila* (5). In the same paper, a hypothesis was postulated that formate could be transformed to CH₄ in sulfate-depleted environments through interspecies hydrogen transfer.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) cannot use formate as an energy source without electron acceptors, as for ethanol or lactate. The use of ethanol or lactate by SRB in sulfate-depleted environments is possible only through an interspecies hydrogen transfer to produce methane (3, 10). This paper reports the production of methane in the absence of added sulfate by coupling an SRB with a hydrogenophilic bacterium unable to use formate.

Techniques described by Hungate (7) and Balch et al. (1, 2) were used throughout this study. *Desulfovibrio vulgaris* JJ, isolated from estuarine sediments, was a gift of W. J. Jones, University of Georgia. *Methanobacterium bryantii* DSM 863 was purchased from the DSM Collection, Göttingen, Federal Republic of Germany.

D. vulgaris JJ was cultivated at 37°C in a previously described medium (8), except that formate was used as substrate (20 mM) with 5 mM sulfate. *D. vulgaris* was inoculated at the end of the exponential phase to obtain the lowest residual concentration of sulfate in the inoculum. *Methanobacterium bryantii* DSM 863 was cultivated at 37°C in medium 1 of Balch et al. (1), in the presence of H₂-CO₂ (80:20).

All experiments were carried out in triplicate in 60-ml serum bottles, each containing 20 ml of the Balch et al. (1) medium 1 prepared without sulfate. It was checked that *Methanobacterium bryantii* was unable to produce methane from formate in pure culture under the experimental conditions used. Formate was determined colorimetrically as described by Lang and Lang (9). Liquid samples (0.5 ml) for formate analysis were removed aseptically, acidified with 10 µl of H₃PO₄ (50%), and centrifuged at 12,000 × g for 10 min. Methane was analyzed as previously described (6). Hydrogen was analyzed with a Girdel chromatograph equipped

with a thermal conductivity detector, using a 1.80-m Carbosphere (60/80 mesh; Interchim, France) column operated at 85°C. Gas sampling was done with a gastight pressure lock syringe.

After 90 h of incubation, *D. vulgaris*, when inoculated in a medium without sulfate but in the presence of formate, produced 3.7 µmol of H₂ per ml of liquid phase without any detectable growth. This value was very low compared with the theoretical amount of hydrogen (17.5 mmol) which could be evolved from the added formate. The coculture of *D. vulgaris* and *Methanobacterium bryantii* produced methane from formate (Fig. 1: in part I of Fig. 1, 17.5 mmol of formate was converted to 2.5 µmol of CH₄ per ml of liquid phase after 40 h of incubation. The yield, compared with the expected methane production (4HCO₂⁻ → 1CH₄), was 57%. The hydrogen needed to produce this amount of methane was 10 µmol/ml of liquid phase, calculated from the equation 4H₂ + HCO₂⁻ + H⁺ → CH₄ + 3H₂O (13). This was much higher than the amount of hydrogen produced by *D. vulgaris* alone. After 80 h of incubation, 17.5 mmol of formate was added (Fig. 1, part II), and 20 h later all formate had been

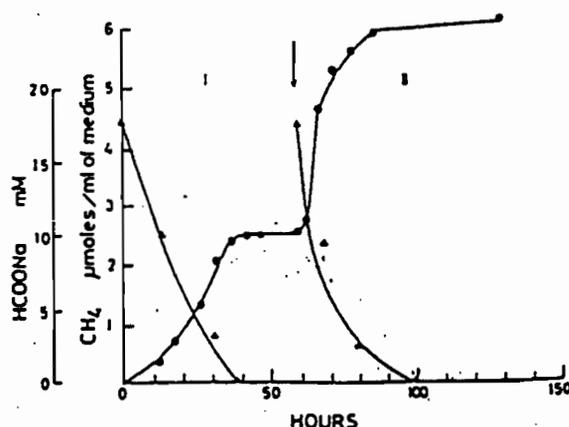


FIG. 1. Methane production from formate in the absence of added sulfate by the coculture of *D. vulgaris* JJ and *Methanobacterium bryantii*. (I) CH₄ production from 17.5 mmol of formate added at the beginning of the experiment; (II) CH₄ production from 17.5 mmol of formate added 60 h later. Symbols: ●, CH₄; ▲, formate.

* Corresponding author.

† Present address: Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Iztapalapa, 09340 Mexico DF.

TABLE 1. Different reactions by which formate can be transformed in anaerobic environments

Reaction	Reducing microorganisms	Reference
$4\text{HCO}_2^- - \text{SO}_4^{2-} - \text{H}^+$ $- 4\text{HCO}_3^- - \text{HS}^-$	SRB	13
$\text{HCO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2$ $- \text{HCO}_3^-$	<i>Escherichia coli</i>	5
$4\text{HCO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CO}_2^-$ $- 2\text{HCO}_3^-$	<i>Acetobacterium woodii</i>	
$4\text{HCO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ $- \text{CH}_4 + 3\text{HCO}_3^-$	<i>Methanobacterium formicicum</i>	13

utilized, producing 3.5 μmol of methane per ml of liquid phase, demonstrating that formate can be used to produce methane through interspecies hydrogen transfer. The level of CH_4 produced, compared with the expected value, was 75%. The fact that this value is higher than the former percentage of 57% might be due to residual sulfate, which might divert a small part of formate toward sulfate reduction at the beginning of the experiment.

The results indicate that formate could be converted to methane, by interspecies hydrogen transfer between SRB and hydrogenophilic methanogens, as follows: (i) half reaction completed by SRB, $4\text{HCO}_2^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2$ ($\Delta G^\circ = +5.2$ kJ) (13); (ii) half reaction completed by *Methanobacterium bryantii*, $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ ($\Delta G^\circ = -135.6$ kJ); and (iii) sum of these reactions, $4\text{HCO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{HCO}_3^-$ ($\Delta G^\circ = -130.4$ kJ). Since formate, like hydrogen, can be produced by various microorganisms in anaerobic environments, then besides the strategies already known (Table 1), a new one to prevent formate buildup would be available. In sulfate-depleted environments, conversion of formate might be achieved through interspecies hydrogen transfer between SRB and methanogens, as for lactate or ethanol (3, 10). In such environments, methanogens using formate and SRB coupled to methanogens using H_2 could act as an efficient buffering system to prevent formate accumulation, since formate can inhibit some acetoclastic methanogens (5). From this point of view, the extreme specialization of the microflora in an anaerobic digester is remarkable: the hydrogen- and formate-using methanogens which could be coupled to SRB from one part and the acetoclastic methanogens unable to use formate from another part. Such a specialization is of great interest, since acetate is the major methane precursor in such environments (12).

Furthermore, the results described above could support a

hydrogen-cycling mechanism for formate metabolism by SRB, as proposed by Odom and Peck (11). Since hydrogen from formate can be evolved by *D. vulgaris* for use through interspecies hydrogen transfer to produce methane, one might think that in the presence of sulfate, hydrogen too could be evolved by *D. vulgaris* for sulfate reduction and then, according to this mechanism, enough energy would be available through a proton gradient for the synthesis of ATP.

LITERATURE CITED

- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43:260-296.
- Balch, W. E., and R. S. Wolfe. 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-COM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:781-791.
- Bryant, M. P., L. L. Campbell, C. A. Reddy, and R. Crabill. 1977. Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H_2 -utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1162-1169.
- Gottschalk, G. Bacterial fermentations, p. 195. In M. P. Starr (ed.), *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag, New York.
- Guyot, J. P. 1986. Role of formate in methanogenesis from xylan by *Cellulomonas* sp. associated with methanogens and *Desulfovibrio vulgaris*: inhibition of the acetoclastic reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:149-153.
- Guyot, J. P., I. Traure, and J. L. Garcia. 1983. Methane production from propionate by methanogenic-mixed culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 26:329-332.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes, p. 117-132. In J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press, Inc., New York.
- Jones, W. E., J. P. Guyot, and R. S. Wolfe. 1984. Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1-6.
- Lang, E., and H. Lang. 1972. Spezifische Farbreaktion zum direkten Nachweis der Ameisensäure. *Z. Anal. Chem.* 260: 8-10.
- MacInerney, M. J., and M. P. Bryant. 1981. Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina burkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H_2 on acetate degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:346-354.
- Odom, J. M., and H. P. Peck. 1984. Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:551-592.
- Smith, P. H., and R. A. Mah. 1966. Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.* 14:363-371.
- Thauer, R. K., K. Jungerman, and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41:100-180.

**2.5. Comparaison expérimentale de
deux types de digesteurs anaérobies.**

INTRODUCTION.

Les travaux présentés dans les articles suivants, analysent quelques aspects de la microbiologie des boues granulaires provenant de réacteurs de type UASB, alimentés avec un milieu synthétique contenant de l'acétate et du propionate comme substrats. Il apparaît nécessaire de présenter les réacteurs à partir desquels ces boues ont été prélevées, ce que fait l'article suivant sur une base comparative avec un autre type de réacteur: le réacteur tubulaire à pellicule fixée.

Le milieu synthétique utilisé dans cette étude, simule un effluent ne présentant pas de difficulté particulière dans le cadre d'un traitement anaérobie. Il a été utilisé pour permettre une étude comparative des 2 réacteurs mentionnés, afin d'évaluer techniquement ces deux procédés au laboratoire, avant d'en réaliser l'application à échelle réelle au Mexique. Ces réacteurs correspondent aux critères requis pour une application dans un pays en développement tel le Mexique: simplicité relative de conception et d'opération, main-d'oeuvre et maintenance réduite, coûts inférieurs aux installations aérobies classiques et bilan énergétique positif. La problématique mexicaine est liée à la crise économique traversée par ce pays, et au désastre écologique que représente la détérioration des ressources en eau. En 1985, le Ministère de l'Ecologie et de l'Urbanisme Mexicain a estimé que 17,5% des 160 m³/s d'eaux résiduaires rejetées au Mexique recevaient un traitement, dont 9,5% avec l'efficacité espérée...

La comparaison de ces réacteurs nous a permis d'évaluer les conditions et le temps requis pour leur démarrage. Un des grands défauts des digesteurs anaérobies consiste en des périodes de démarrage très longues, liées à l'adaptation de la biomasse et, dans le cas qui nous intéresse, au temps de formation des boues granulaires ou du biofilm. Pour cette raison, l'origine des boues et la nature de l'effluent employé sont de grande importance.

Les réacteurs étudiés présentent des caractéristiques tout à fait classiques, et les résultats obtenus lors de ces travaux ont permis l'installation d'un petit pilote de 110 l, opérant avec les eaux résiduaires de l'Université Autonome Métropolitaine d'Iztapalapa (UAM-I) (Mexique). Dans le cadre d'un projet CEE, des pilotes de 5 m³ et de 50 m³ sont en cours d'installation à la UAM-I afin de servir pour des opérations de démonstration. L'étude que nous présentons, a permis d'acquérir le savoir-faire de base nécessaire (vis-à-vis des conditions d'opération) pour leur fonctionnement.

Proceedings of the 1st National Symposium on Environmental Engineering.
1988. Mexico D.F., Mexico. UNAM-I.I. (ed.)

EXPERIMENTAL COMPARISON OF TWO TYPES
OF AVANCED ANAEROBIC REACTORS.

A.Noyola, J.P. Guyot and O. Monroy.

Universidad Autonoma Metropolitana de Iztapalapa (UAM-I)
Departamento de Biotecnologia
Apartado Postal 55-535
09340 Mexico D.F., MEXICO.

ABSTRACT.

The Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) and the fixed film reactors (F.F.) had been compared at the laboratory scale, using a synthetic wastewater as effluent containing acetic and propionic acids as substrates. The UASB reactor developed an highly active biomass: 9.3 Kg COD/Kg VSS.d for substrate consumption and 3.46 l CH₄/g VSS for methane production. Such specific rates indicate the reactor was operated near saturation with a high COD removal efficiency (94%). The determination of the VSS content of the fixed film reactor allows to calculate lower rates. Both reactors were able to treat efficiently this type of effluent up to volumetric organic loads of 15 Kg COD/m³.d. The scaling up of both reactors will have to look carefully for an appropriate liquid distribution at the reactor bottom.

INTRODUCTION.

The advances performed in the field of anaerobic digestion over the last decade, has transformed this technique to treat urban and industrial waste waters, into an attractive alternative (Speece, 1983).

The number of units to process anaerobically industrial waste waters has increased quickly in Europe (Hulsoff Pol *et al.*, 1988; Segura 1983). In Brazil (Vieira and Souza, 1986) and Colombia it is intended to apply the advanced anaerobic reactors to the treatment of urban waste waters. In Mexico, in spite of the numerous advantages of these processes, there are very few experimental works done with them (Mejia and Magaña, 1986; Monroy and Noyola, 1986; Young *et al.*, 1987).

This work presents the experimental results obtained at laboratory scale, with the following anaerobic reactors: upflow sludge anaerobic blanket (UASB) digester and tubular fixed film (F.F) reactor. These reactors will be fed with a synthetic waste water. These processes fulfill the requirements for being applied in Mexico, and they have proved to be operative in other developing countries. However, in spite of their industrial development, it is still necessary to perform intensive research efforts, to understand the complexity of the microbial relationship which together with reactor design determine their efficiency. Particularly, the production and the control of well adapted anaerobic inoculum is still a major problem, mainly in relation with the production of granular sludge and degradation of recalcitrant compounds.

This study is a part of a larger research program, which tries to define an appropriate technology, which will be used to face up to the problem of water pollution in Mexico.

MATERIAL AND METHODS.

EXPERIMENTAL SET-UP.

The experiment had been performed using two reactors of each type (UASB, F.F.) named: UASB 1 and 2, F.F. 1 and 2 operated at 33°C. The reactors were made with acrylic columns of 9.6 cm of diameter and 1 m of height.

The UASB reactors (UASB 1 and UASB 2) (Fig. 1a) have a useful volume of 4.5 lt. The fixed film reactors (F.F 1 and F.F 2) (Fig. 1b) were packed with PVC tubing (1/2" diameter) and contained each 21 tubings of 67 cm of height, with a relationship area/volume of $221 \text{ m}^2/\text{m}^3$. The F.F. reactors had a useful volume of 4.75 lt. The reactors had been fed using peristaltic pumps and a synthetic waste water containing acetate and propionate as substrates (Table 1). The gas was collected in columns filled with an acidified brine.

START-UP.

Two different inocula were used: a fresh cow manure and an activated sludge from a secondary settler of an aerobic urban waste

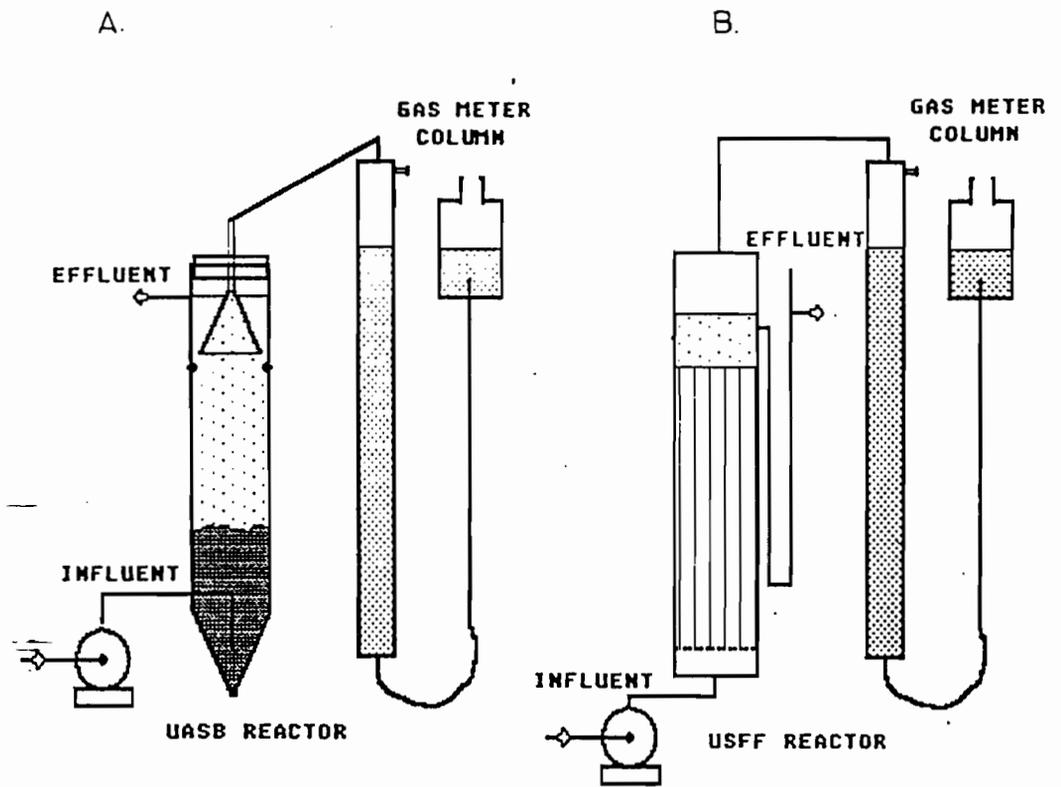


FIG. 1 SCHEMATIC DIAGRAM OF THE LABORATORY REACTORS

water treatment plant. The fresh cow manure was used to inoculate UASB 1 and F.F 1, the activated sludge was used for UASB 2 and F.F. 2. Both inocula were adapted anaerobically: the fresh cow manure was allowed to stay one month in the Khan *et al.* (1979) medium, and the activated sludge was processed according to Arias and Noyola (1987). In both case 2 l of sieved inoculum (mesh. 0.96 mm) and 2 l of synthetic medium (Table 1) were introduced in the reactors and recirculated 10 days. At the end, the F.F. reactors were purged to remove the sludge in excess.

Table 1. Composition of the synthetic waste water used to feed the anaerobic reactors.

COMPOUNDS	CONCENTRATION
CH ₃ COONa	5 g/l
CH ₃ CH ₂ COOH	1 ml/l
NH ₄ Cl	660 mg/l
NaHCO ₃	600 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	250 mg/l
K ₂ HPO ₄	130 mg/l
KH ₂ PO ₄	100 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	200 mg/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	100 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	14 mg/l
Mo, Mn, Cu, Zn, Al, Ni, Co	
tap water	
COD	5 to 5.2 g/l

OPERATION OF THE REACTORS.

Various hydraulic retention times (HRT) were applied from 72 h to 2 h. The following parameters were determined: pH, chemical oxygen demand (COD), gas production and composition, and the sludge volumetric index (svi) according to the manual of Standard Methods (APHA, 1980). The gas was analyzed by gas chromatography. The real HRT was determined by a tracers technique (Levenspiel, 1972) using bromocresol green and spectrophotometry (617 nm) (Jimenez *et al.*, 1988).

RESULTS.

The start-up of the four reactors was initiated at high HRT, which was decreased after reaching each time the steady state. The steady state was considered established when the parameters kept constant over at least 5 TRH.

The reactors UASB 1 and F.F. 1, inoculated with fresh cow manure, did not present methanogenic activity during the first three months of continuous feeding. For that reason a very small amount of sucrose (500 mg/l) was added to the synthetic waste water, in order to allow facultative anaerobes to use the dissolved oxygen, and then to reduce the redox potential in the reactor. This modification resulted in a rapid increased in the methane production, reaching a stable level in one month for UASB 1 and two months for F.F.1 (Fig. 2). UASB 2 and

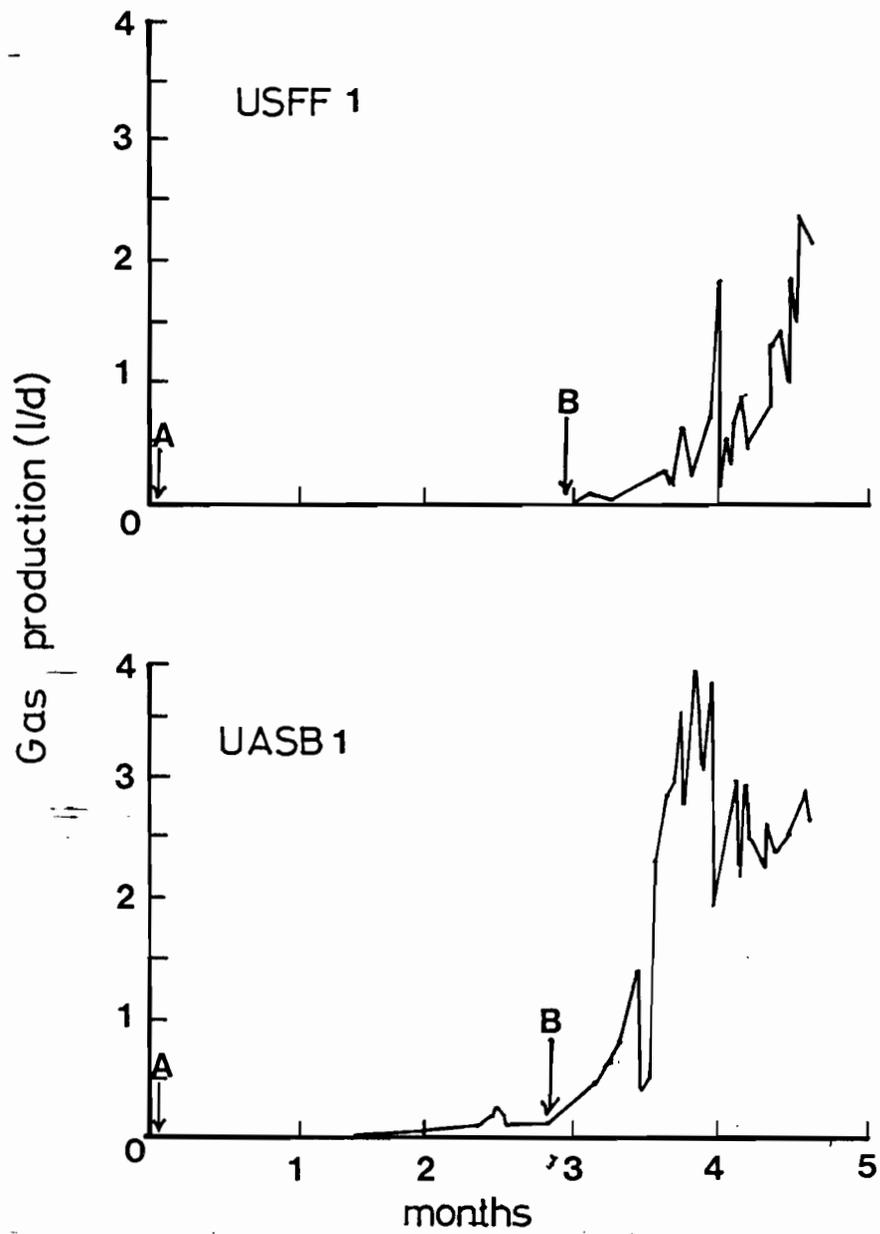


Fig. 2. Daily gas production during the first five months of experimentation. A: start up, B: Sucrose addition.

F.F.2 were inoculated with adapted activated sludge, and fed since the beginning of the start-up with the mixture of VFA and sucrose. Biogas production started immediately.

Fig. 3 shows the relationship between HRT and the efficiency of COD removal for the 4 reactors. The curves present the typical profile for this type of work, with a good clumping of the experimental data. The efficiency of COD removal keeps constant (94%) over a range of COD values, but at HRT below 12 hours, the efficiency rapidly decreased to get a value of 52% at a HRT of 2 hours. Furthermore, in terms of loading rates, the efficiency of COD removal decreases markedly for organic loading rates superior to 15 kg COD/m³.d, at 60 kg COD/m³.d the efficiency decreases to 52% (Fig. 4).

The pH at the Inlet of the reactors was 6.5, and at the outlet was of 8.2 for high HRT and 7.8 for HRT below 12 hours. This relatively low pH of the feed did not affect the efficiency of the process.

The maximum gas production per volume of reactor was 18.3 l/l.d (at standard conditions) and was reached for the reactor F.F. 1 at a organic space loading rate of 60 kg COD/m³.d. The average methane content was 52%.

The amount of sludge and the volumetric Index (svI), were determined for UASB 2. The reactor contained 9.73 g of TSS with a VSS content of 46% , the volumetric Index was 37 ml/g. With a volume of 360 ml the sludge represented 8% of the reactor total volume.

At the end of this study, the real HRT were determined in both fixed film reactors (F.F. 1, F.F. 2) by using tracers. The reactors were operated at a theoretical HRT (space time) of 8.7 h. The results were adjusted to a hydraulic model: J reactors in series with dead-space and J reactors in series with dead-space and hydraulic short-circuit. From the experimental and the adjusted curves (Fig.5), it is shown that the real HRT were markedly lower than the theoretical values, which means there is a high percentage of dead spaces. From the hydraulic model which fits better the experimental data for F.F. 2, a great part of the reactor can be considered as affected by a short-circuit. At the end of the experimental work, in order to determine the displaced volume by the accumulated biofilm, the fixed film reactors were emptied. The final liquid volumes obtained in F.F. 1 and F.F. 2 were 3.35 l and 2.5 l respectively. At the beginning of the experiment, the useful volume was 4.75 l for each reactor. For both reactors, the biofilm can be considered as a dead space. For F.F. 2, the decrease of nearly 50% of the useful volume can explain the important short-circuit.

DISCUSSION.

START-UP.

The methanogenic bacteria did not show any activity during the first 3 months, probably because the redox potential was not appropriate: no reducing agent was used in the feed. The addition of

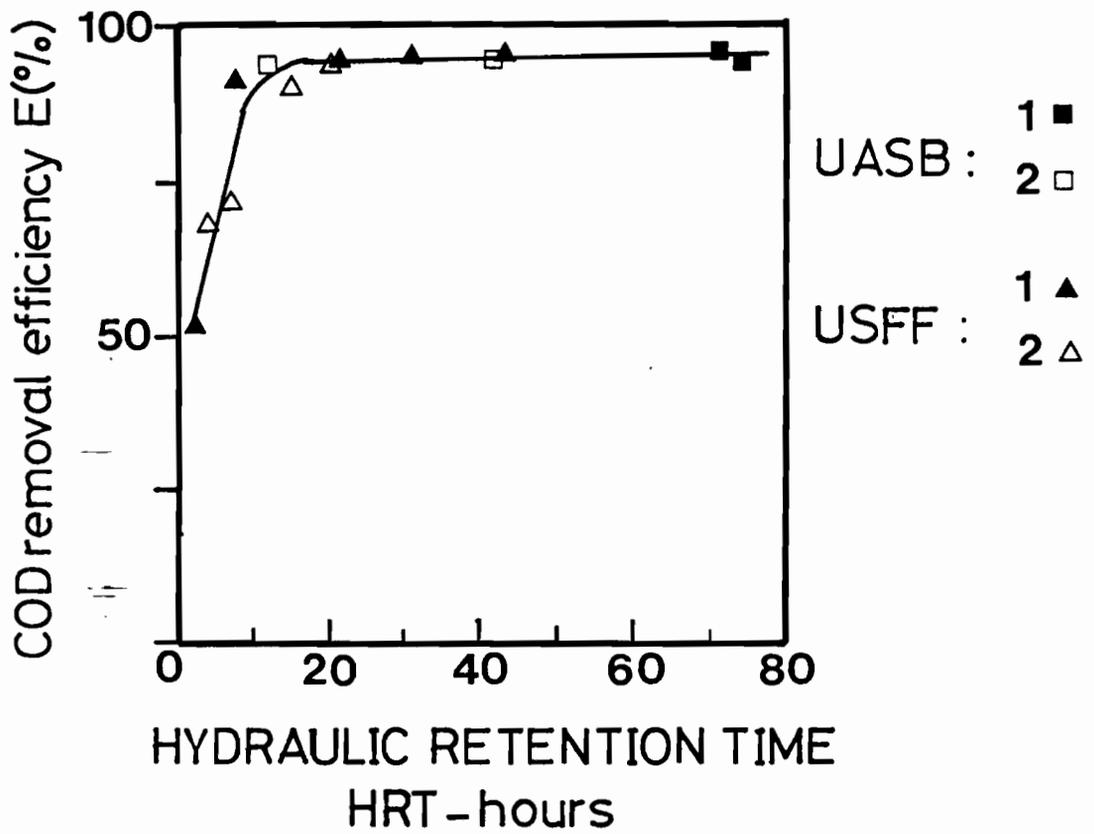


Fig. 3. Effect of the variation of the HRT on the efficiency of COD removal.

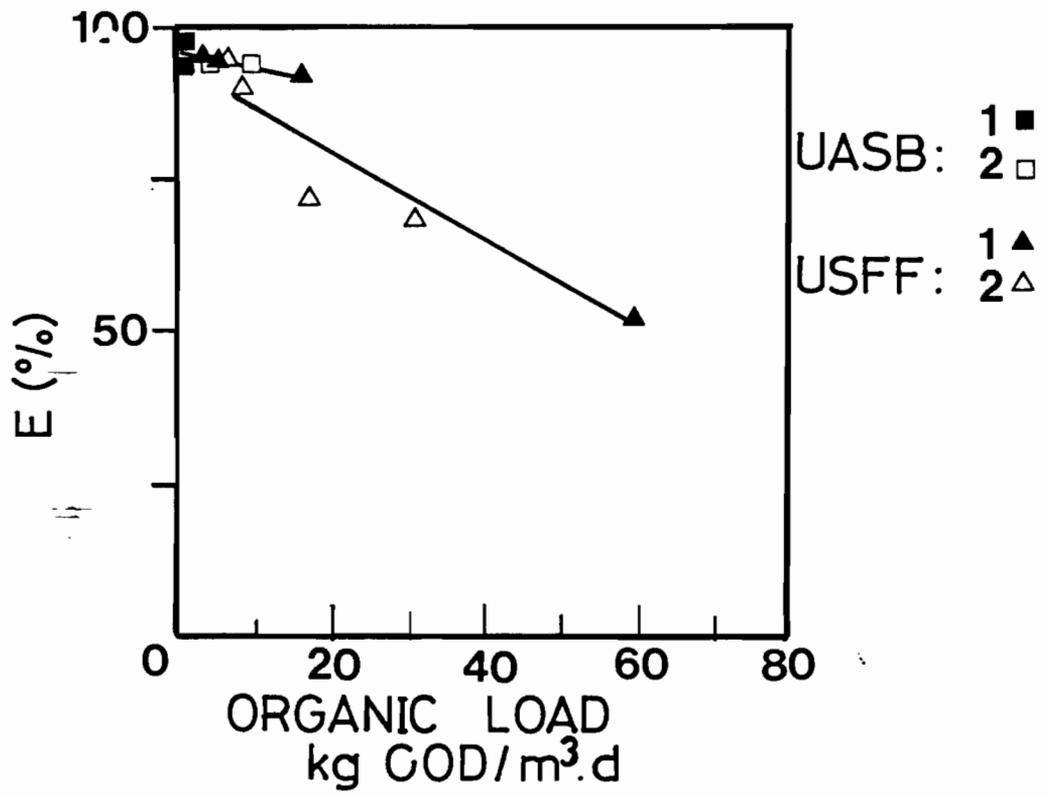


Fig. 4. Effect of the variation of the organic load on the efficiency of COD removal.

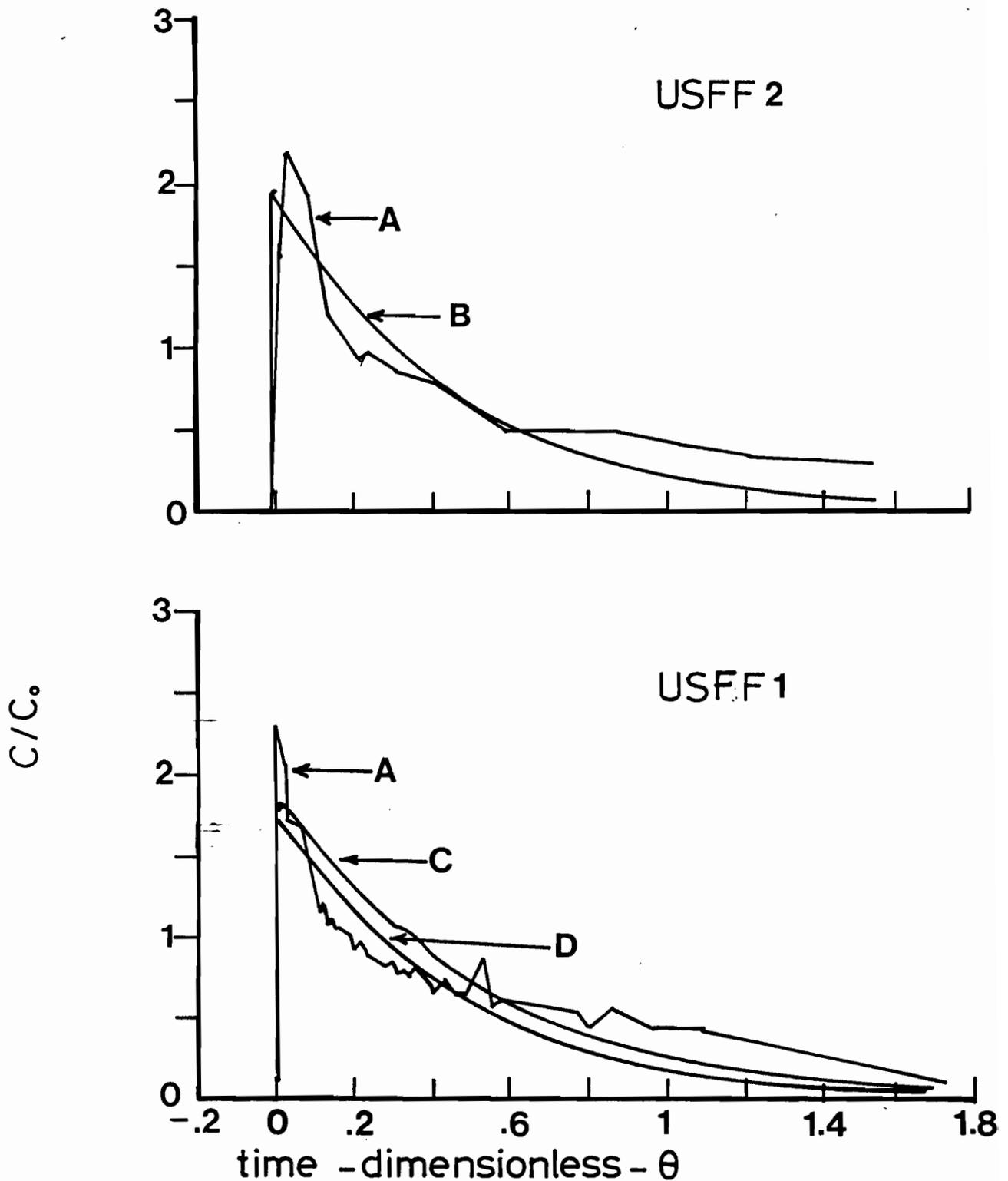


Fig. 5. Residence time distribution evaluation for the FF reactors: experimental and simulated response curves for a pulse tracer input. A: experimental curve from tracing study, B: adjusted curve (a completely mixed reactor with 10 % dead zone and 60 % short circuit), C: adjusted curve (a completely mixed reactor with 47 % dead zone), D: adjusted curve (a completely mixed reactor with 20 % dead zone and 65 % short circuit).

sucrose allows facultative anaerobes to use the dissolved oxygen. Since some sucrose was added from the beginning to the reactors inoculated with adapted activated sludge (UASB and F.F. 2), it is not possible to state which inoculum is better to start-up the reactors. Nevertheless, Welmin *et al.* (1987) found that the activated sludge contained a great number of methanogenic bacteria (10 /g SS); furthermore, it is known that methane production by the rumen is not based on the acetoclastic reaction, contrarily to industrial anaerobic digester (Hobson, 1982), and that rumen bacteria have very specific nutritional requirements, which makes difficult their cultivation without growth factors. In another hand, the texture of both inocula was different. The fresh cow manure (ochre color), contained a great amount of small fibers of very low density which were not retained by the 0.96 mm mesh and which flow out of the reactor during the start-up period, increasing the amount of VSS and the COD in the effluent; in return, the activated sludge from the secondary settler (black color) already presented evidences of small granules (0.5 mm of diameter). The particulate structure of this sludge might provide good resistance to environmental changes, such as oxygen concentration and redox potential. Upon these considerations, it might appear more advisable to use activated sludge as an inoculum for anaerobic reactors.

OPERATION AND EFFICIENCY.

Both types of reactors present similar efficiency, then economic considerations will make the difference in treating concentrated waste waters. As a matter of fact, the UASB reactor would be more economic, since it does not require any packing. This will not be valid to treat diluted waste waters, such as municipal waste waters, at temperatures below 20 °C, in this case differences might appear between the two processes (Noyola *et al.*, 1988). However, it must be noted that others selection criterions should be taken into account, such as special characteristics of the effluent to be treated. In this respect, Parkin and Speece (1983) reported a greater resistance to toxic compounds for anaerobic filter than for stirred anaerobic reactors.

BIOMASS CONTENT.

Sludge content in the UASB 2 was determined when it was operated at a organic load of 9.9 Kg COD/m³.d with an efficiency of 94%. The rate of COD removal per kg VSS.d (rx) was calculated: $rx = 9.3 \text{ Kg COD/Kg VSS.d}$. Which is closed to the maximum rate reported by Henze and Harremoes (1983) (13 Kg COD/Kg VSS.d). This rate is valid if only the totality of the VSS fraction is composed of 100% active methanogenic bacteria. If there are others groups of bacteria, like it occurs when the feed and inoculum are complex, the VSS will include all the different types of bacteria, this will reduce the value of rx max to approximately 1 Kg COD/Kg VSS.d, this value is often reported in the literature (Lettinga *et al.*, 1980; Henze and Harremoes, 1983; Kennedy and Droste, 1986; Wu *et al.*, 1987). Furthermore, Lin *et al.* (1986), reported a rx max of 17,6 Kg COD/Kg VSS.d with a stirred anaerobic reactor feeded with a mixture of acetate, propionate, butyrate (2:1:1). These authors concluded that the methanogenic consortium had a rx max higher, when it is fed with a mixture of volatile fatty acids instead of the individual components of the mixture. In our work, the carbon

source of the feed allowed the acetogenic microflora (with propionate) and methanogenic microflora (with acetate and hydrogen) to grow. The close syntrophic relationship between these 2 groups of bacteria makes the acetogenic microflora unable to grow without the hydrogenophilic methanogens (McInerney and Bryant, 1981). Then, this strict interdependency of the microbial groups of the sludge reactor, makes possible to admit that both groups of microorganisms behave as a methanogenic whole. The rate of substrate consumption found, allows us to think that the VSS content was nearly saturated. The specific rate of methane production was 3.46 l/g VSS.d (standard conditions), which permits to calculate a value of 0.37 l CH₄/g COD removed. This is similar to the one proposed by McCarty (1964) (0.35 l/g COD). This specific rate is higher than those proposed in the literature for the acetoclastic methanogenic bacteria: 1 l CH₄/g VSS.d (Valcke and Verstraete, 1983), 3.02 l CH₄ / g VSS.d (Lawrence and McCarty, 1969). But in our study, we must consider that methane was produced from both acetate and propionate (through acetate and hydrogen). A stoichiometric calculation based on UASB 2, give the contribution of each substrate to the methane production: 71% from the added acetate, 17% from the acetate produced from propionate and 12% from the hydrogen, (then 29% from the propionate). From what it can be calculated that the acetoclastic methanogenic bacteria account for 3.04 l of CH₄ of the total specific rate of methane production, this value is similar to that reported by Lawrence and McCarty (1969).

From the previous considerations, it can be stated that the biomass of UASB 2 presented a high methanogenic activity, and that nearly 100% of the VSS was an active methanogenic biomass. This is in agreement with one of the characteristics of the UASB reactor, which is the selection of a highly active granular biomass (Lettinga *et al.*, 1980).

With respect to the fixed film reactors, the immobilized biomass can be estimated indirectly by determining the liquid volume in the reactors, before the inoculation and at the end of the experiment. The calculated biofilm thickness for FF1 and FF2 were 1.33 mm and 2.14 mm respectively. If we used the superficial density given by Kennedy and Droste (1986) (0.116 kg VSS/m³) for a biofilm thickness of 2.6 mm, applying a correction factor which considers the thickness as directly proportional to the density, it is found a total content of VSS of 62,3 g for FF1 and 100.3 g for FF2. The speculative character of this kind of calculations prevents to make definitive conclusions, but can be used as a base for comparisons with the UASB reactors.

Using the last set of data of operation for each fixed film reactor (fig. 3 and 4):(I) FF1: 60 kg COD/m³.d, HRT: 2 h, efficiency: 52.5% ; (II) FF2: 31.52 kg COD/m³.d, HRT: 4 h, efficiency:68.5% , it was possible to calculate the following rx (Kg COD/g VSS.d): 2.37 (FF1), 1.02 (FF2) and the rates of methane production (l CH₄/g VSS.d): 0.73 (FF1), 0.27 (FF2). According to these values, the fixed film reactors had accumulated a biomass of low activity. However, tracers experiments (Fig. 5) shown the existence of numerous dead-spaces and short-circuits in these reactors. As a consequence, the real HRTs and amount of irrigated biomass must be inferior to the values previously calculated. On this basis, the specific rates of COD consumption and

methane production might be greater, taking into account only the VSS fraction of the active part of the fixed film reactors.

Therefore, not only the effluent distribution must be made properly at the bottom of the UASB reactor (Lettinga *et al.*, 1980, 1982), but the same care must be taken for the upflow fixed film reactors: the canals which are formed in the packing material generate dead-spaces and short-circuits, furthermore the gas bubbles produced an effect of upward pumping, which increases the possibilities of short-circuit.

CONCLUSION.

Both type of reactors present similar and satisfactory efficiencies with respect to COD consumption at organic loads up to 15 kg DCO/m³.d.

An highly active biomass was obtained with the UASB reactor. However, efficiencies of the fixed film reactors should be increased if a good process design is used, such as an efficient liquid distribution at the reactor bottom. The reactor packing favours the formation of dead-spaces and short-circuits. Economical calculations and substrate specificity (e.g. toxicity) will command the choice of the process which will be used for a determined application.

ACKNOWLEDGEMENT.

This work was granted by O.E.A. (program: "fuels by fermentation") and CONACYT and was a part of a collaborative research program between UAM-I and ORSTOM (Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Developpement en Cooperation). We thank the valuable technical assistance of Juana Hernandez.

REFERENCES.

Arias A. and Noyla A. 1988 Tratamiento de un agua residual urbana mediante el reactor anaerobio de lecho de lodos (UASB). San Luis Potosi, Mexico. In "Avances en ingenieria quimica 1987" p. 477-483. Leyva R., Medellin F. and Navarro J. (ed.).

APHA (1980) Standard methods for the examination of water and waste water, 15th edition.

Bachmann A., Beard V.L. and McCarty P.L. 1985 Performance characteristics of the anaerobic baffled reactor. Water Research 19, 99-106.

Henze M. and Harremoës P. 1983 Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - A literature review. Water Science and Technology 15, 1-101.

Hobson P.N. 1982 The microbiology of the rumen and anaerobic digesters. Memorias del Simposio Avances en Digestion Anaerobia: Combustibles por Fermentacion. UAM-I/ICAITI, Mexico.

Hulshoff Pol L. and Lettinga G. 1986 New technologies for anaerobic waste water treatment, In Anaerobic Treatment in Tropical countries, Post-Conference International Seminar, IAWPRC Sao Paulo, 30-46.

Jimenez B. Noyola A. and Capdeville B. 1988 Selected dyes for residence time distribution evaluation in bioreactors. Biotechnology Techniques 2, 77-82.

Khan A.W., Trottler T.M., Patel G.B. and Martin S.M. 1979 Nutrient requirement for the degradation of cellulose to methane by a mixed population of anaerobes. Journal of General Microbiology 112, 365-372.

Kennedy K.J. and Droste R.L. 1986 Anaerobic fixed-film reactor treating carbohydrate wastewater. Water Research. 20, 685-695.

Lettinga G., Van Velsen A.F.M., Hobman S.W., de Zeeuw W. and Klapwijk A. 1980 Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechnology Bioengineering. 22, 699-734.

Lettinga G., de Zeeuw W.J., Hulshoff Pol L.A., Hobma S.W., Grin P.C., Wiegant W.N., Van Velsen A.F.M. and Koster I.W. 1982 Anaerobic wastewater treatment using the UASB treatment process. Memorias del Simposio Avances en Digestion Anaerobia: Combustibles por Fermentacion, UAM-I/ICAITI, Mexico.

Levenspiel O. 1972 Chemical reaction engineering. 2nd edition, John Wiley and Sons, New-York, 578 pp.

Lawrence A.L. and McCarty P.L. 1969 Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment. Journal of Water Pollution Control Federation. 41, R1-R7.

Lin C.Y., Sato K., Nolke T. and Matsumoto J. 1986 Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acids. Water Research. 20, 385-394.

Mejia G.M. and Magana A.H. 1986 Digestion anaerobica de aguas residuales de granjas porcinas, en "los limites del deterioro ambiental". Memorias del V Congreso Nacional de Ingenieria Sanitaria y Ambiental, SMISAAC. 136-140.

McCarty P.L. 1964 Anaerobic wastewater treatment fundamentals. Public Works. vol.95: No 9, 107-112; No 10, 123-126; No 11, 91-94; No 12, 95-99.

McInerney M.J. and Bryant M.P. 1981 Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis, In "Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels". Sofer S.S. and Zaborsky O.R. (ed.). Plenum Publishing Corporation, 277-296.

Noyola A. 1986 La digestion anaerobica aplicada al tratamiento de aguas residuales a nivel individual y semicolectivo, en "los limites del deterioro ambiental". Memorias del V Congreso Nacional de Ingenieria Sanitaria Y Ambiental, SMISAAC. 131-135.

Noyola A., Capdeville B. and Roques H. 1988 Anaerobic treatment of domestic sewage with a rotating stationary fixed film reactor. Water Research (In press).

Parkin G.F. and Speece R.E. 1983 Attached versus suspended growth anaerobic reactors: Response to toxic substances. Water Science and Technology. 15, 261-289.

Parkin G.F., Speece R.E., Yang C.H.J. and Kocher W.M. 1983 Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. Journal of Water Pollution Control Federation. 55, 44-55.

Poggi H. and Medina G. (1986) Estabilizacion de lodos en un proceso de alta tasa, en "los limites del deterioro ambiental". Memorias del V Congreso Nacional de Ingenieria Sanitaria y Ambiental, SMISAAC. 71-74.

Sanchez Riera F., Cordoba P. and Sineritz F. 1985 Use of the UASB reactor for the anaerobic treatment of stillage from sugar cane molasses. Biotechnology and Bioengineering. 27, 1710-1716.

Segura J. 1983 La fermentation methanique et l'epuration. Biofutur, fevrier, 47-52.

Speece R.E. (1983) Biotechnology for anaerobic waste treatment. Environmental Science and Technology. 17, 416A-427A.

Switzenbaum M.S. and Jewell W.J. 1980 Anaerobic attached-film expanded bed-bed reactor treatment. Journal of Water Pollution Control Federation. 52, 1953-1965.

Switzenbaum M.S., Sheenan K.S. and Hickey R.F. 1984 Anaerobic treatment of primary effluent. Environmental Technology Letters. 5, 189-200.

Tait S.J. and Friedman A.A. 1980 Anaerobic rotating biological contactor for carbonaceous wastewaters. Journal of Water Pollution Control Federation. 52, 2257-2269.

Valcke D. and Verstraete W. 1983 A practical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic sludges. Journal of Water Pollution Control Federation. 55, 1191-1195.

Van Den Berg L. and Lentz C.P. 1979 Comparison between up- and down-flow anaerobic fixed film reactors of varying surface to volume ratio for the treatment of bean blanching waste, In "Proceeding of the 34th Purdue Industrial Waste Conferences", 319-325.

Van Den Berg L., Lentz C.P. and Armstrong D.W. 1980 Anaerobic waste treatment efficiency comparisons between fixed film reactors, contact digesters and fully mixed, continuously fed digesters, In "Proceeding of the 35th Purdue Industrial Waste Conferences", 788-793.

Vieira S.M. and Souza M.E. 1986 Developpement of technology for the use of the UASB reactor in domestic sewage treatment, In "Anaerobic treatment in tropical countries" post-conference international seminar, IAWPRC Sao Paulo, 106-119.

Wu W., Hu J., Zhao Y., Khang H. and Gu G. 1987 Cultivation of anaerobic granular sludge in UASB reactors with aerobic activated sludge as seed. Water Research. 21, 789-799.

Young M., Betancourt N., Diego M.E. and Mercado G. 1987 Evaluacion de un filtro anaerobio para el tratamiento de las aguas residuales de los beneficios de cafe, en "Memorias del Congreso Nacional", AMCCAA, B.2.6.

Young J.C. and McCarty P.L. 1969 The anaerobic filter for waste treatment. Journal of Water Pollution Control Federation. 41, 160-173.

2.6. Inhibition par le formate de la dégradation anaérobie de l'acétate par des boues granulaires.

INTRODUCTION.

L'inhibition par le formate, de la réaction acétoclastique réalisée par les méthanogènes, a été démontrée avec des cultures pures de bactéries. Pour que cette étude ait un sens pratique, il fallait démontrer sa validité au niveau d'un consortium complexe et naturel de bactéries: nous avons utilisé les boues granulaires d'un réacteur UASB décrit précédemment. En effet, étant donné la présence de différents systèmes microbiens pouvant potentiellement empêcher l'accumulation de formate, auxquels nous avons fait allusion lors de l'article sur le transfert interspèce d'hydrogène à partir du formate, et l'insensibilité présumée des bactéries du genre Methanosaeta à ce type d'inhibition, il n'est pas à priori certain que les boues de digesteurs anaérobies puissent être affectées par cette inhibition.

Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus démontrent au niveau des boues granulaires, que l'acétoclastie est inhibée par le formate.

Par ailleurs, le calcul du K_m apparent de ces boues vis-à-vis du formate, comparé à celui de Methanobacterium formicicum, montre une affinité très faible des boues pour le formate. Ce qui dans le cas de l'effluent utilisé (mélange d'acétate et de propionate), ne concorde pas avec l'hypothèse du transfert interspèce de formate présentée lors de l'étude bibliographique, étant donné que l'oxydation anaérobie du propionate aurait sélectionné une population de bactéries méthanogènes ayant une certaine affinité pour le formate, si l'on postule la validité de cette théorie.

Biotechnology Letters Vol 11 No 5 365-368 (1989)
Received as revised April 4

INHIBITION OF THE ANAEROBIC ACETATE DEGRADATION BY FORMATE.

Guyot J.P. and F. Ramirez.

Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Iztapalapa,
Departamento de Biotecnologia, Av. Michoacan y Purisima,
Apartado Postal 55-535, Col. Vicentina, 09340 Mexico D.F.,
MEXICO.

SUMMARY: Granular sludge from an UASB reactor fed with VFA showed a very low affinity for formate which provide little support to the theory of interspecies formate transfer. It is shown that formate can inhibit acetate degradation by anaerobic sludge.

INTRODUCTION:

Formate has an important role in the anaerobic degradation of organic matter, as one of the major products of fermentative reactions (Guyot and Brauman, 1986), and as one of the main substrates for methanogenic bacteria (Balch *et al.*, 1979). The majority of the hydrogenophilic methanogens which cannot use acetate as energy source, can use formate as the other substrate for methane production (Guyot and Brauman, 1986). Hydrogen is known to inhibit methanogenesis from acetate by some acetoclastic methanogens of the Methanosarcina type (Ferguson and Mah, 1983) but not with the Methanotrix type bacteria (Zehnder *et al.*, 1980). Furthermore Guyot (1986) shown that formate can inhibit methanogenesis from acetate in pure cultures of Methanosarcina barkeri 227 and Methanosarcina thermophila. However the possible inhibitory effect of formate on the acetoclastic reaction by sludge from anaerobic reactors remained to be investigated.

NUMERISE

F 31.522

MATERIALS AND METHOD:

UASB reactor: a 4.5 litre UASB reactor was continuously fed during one year with a mixture of acetic (3.5 g/l) and propionic (1 g/l) acids as carbon and energy sources, in the following salt medium (mg/l):

NH_4HCO_3 (1000), NaHCO_3 (800), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (250), K_2HPO_4 (130), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (200), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (14), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10), $\text{MnCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05).

Experimental techniques: anaerobic techniques as described by Hungate (1969) and Balch et al (1978) were used throughout.

Experiments: kinetic experiments were run in 80 ml serum bottles which contained each 10 ml of granular sludge and 10 ml of the same mineral solution used for the reactor. The granular sludge (1 mm to 2 mm) was sampled 24 hours before the beginning of the experiments, and allowed to stay under vacuum in the pre-chamber of an anaerobic hood (Mc Coy), to allow the consumption of residual substrates from the reactor and accelerate the gas removal. Effectively, 24 hours later, controls run without substrate indicated no detectable acetate or propionate. At the beginning of the experiment (time 0), concentrated stock solutions of acetate and (or) formate were injected into the serum bottles. For the inhibition experiments, for a constant acetate concentration, different formate concentrations were added at the same time. For the determination of the apparent saturation constant ($K'm$) of formate, different formate concentrations were tested as substrate. From the time-course of formate methanogenesis at different concentrations, a double reciprocal plot was used to calculate $K'm$. Experiments were run in triplicate.

Analytical techniques: acetate was analyzed by gas chromatography using a flame ionization detector and a stainless steel column packed with Porapak Q (80-100 mesh). Volatile Suspended Solids (VSS) were analyzed according to the standard methods (1980).

RESULTS AND DISCUSSION.

Determination of the kinetic parameters for formate methanogenesis by the granular sludge, gave the specific rate of formate degradation (Asp) as 3 mmol/g VSS.h and a $K'm$ of 11 mM. These values compared to those found by Schauer et al (1982) for Methanobacterium formicicum (Asp: 37 mmol/g VSS.h, $K'm$: 0.58 mM) show that the UASB reactor had selected a very poor formate using microbial population, probably because the reactor was exclusively fed with acetate and propionate. Thus the sludge might be enriched with hydrogenophilic methanogens, acetoclastic methanogens, and obligate hydrogen producing acetogens. We must conclude, in view of the kinetic data, that the selected hydrogenophilic methanogens present little affinity for formate and are mainly unable to use formate. This observation and others published elsewhere (Guyot and Brauman, 1986) do not support the theory of interspecies formate transfer described by Thiele and Zeikus (1988), since in that

case our reactor would also have selected a microbial population able to use formate efficiently.

The effect of different formate concentrations on the acetoclastic reaction was determined and the maximal rate of acetate consumption for each curve (Table 1) was calculated by double reciprocal plot from each point of the curves $1/V = f(1/S)$:

formate mM	Vm mmol acetate/l.h	standard deviation
0	3.02	0.25
5	2.50	0.10
50	2.31	0.07
100	2.05	0.13

Table 1. Effect of different formate concentrations on the rate of acetate degradation, for the same initial acetate concentration (8.5 mM) (triplicate experiments).

Clearly table 1 demonstrates the inhibitory effect of various formate concentrations on acetate degradation; at 100 mM the maximal rate (Vm) is decreased by one third. This confirms—with anaerobic sludge the experiment performed with pure cultures of Methanosarcina (Guyot, 1986) and adds new perspectives in the field of the inhibition of anaerobic digestion. Since formate, like hydrogen, is a major product of the first step of anaerobic degradation of organic matter, and nevertheless the sludge capacity to use formate is low, as we described; we suspect that formate accumulation in such a digester may cause either a decrease of reactor performances or a digester failure. Another interesting observation made by Belay et al (1986), is the inhibition between pH 5.8 to 6.2 of both growth and methanogenesis of Methanococcus thermolithotrophicus grown on H_2-CO_2 in presence of formate; it would be valuable to define the extent of such an inhibition with other hydrogenophilic methanogens. We note that formate might not be inhibitor of the Methanothrix type of bacteria, since they have a formate dehydrogenase and the hydrogen evolved by formate breakdown does not inhibit them (Zehnder et al, 1980). Thus the effect of formate or hydrogen on the acetoclastic reaction in anaerobic reactors might greatly depend on the relative proportion of Methanosarcina and Methanothrix. Therefore, there is a double interest to look for the enrichment of a digester sludge with Methanothrix, because of its high affinity for low acetate concentrations and its potential resistance to inhibition by either hydrogen or formate. In the future the definition of an index which would characterize the ratio Methanosarcina/Methanothrix for a sludge, might help to forecast the ability of an anaerobic reactor inoculum to be inhibited by either formate or hydrogen at the level of the acetoclastic reaction.

ACKNOWLEDGEMENTS: this work is part of a collaborative research program between ORSTOM (Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Developpement en Cooperation) and UAM-I (Universidad Autonoma Metropolitana unidad Iztapalapa). We thank O.E.A. and E.E.C. for their financial support.

REFERENCES.

APHA (1980). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th edition.

Balch, W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R., and Wolfe R.S. (1979). Microbiol. Rev. 43, 260-296.

Balch, W.E.; and Wolfe, R.S. (1976). Appl. Environ. Microbiol. 32, 781-791.

Belay, N., Sparling, R., and Daniels, L. (1986). Appl. Environ. Microbiol. 52, 1080-1085.

Fergusson, T.J. and Mah, R.A. (1983). Appl. Environ. Microbiol. 48, 348-355.

Guyot, J.P. (1986) FEMS Microbiol. Lett. 34, 149-153.

Guyot, J.P., and Brauman, A. (1986). Appl. Environ. Microbiol. 52, 1436-1437.

Hungate, R.E. (1969). A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds. vol.3B, pp. 117-132, Academic Press Inc. New-York.

Schauer, N.L., Brown, D.P., and Ferry, J.G. (1982). Appl. Environ. Microbiol. 44, 549-554.

Thiele, J.H., Chartrain, M., and Zeikus, J.G. (1988). Appl. Environ. Microbiol. 54, 20-29.

Zehnder, A.J.B., Huser, B. A., Brock, T.D., and Wuhrmann, K. (1980). Arch. Microbiol. 124, 1-11.

**2.7. Evolution des activités et populations microbiennes
de boues granulaires provenant d'un réacteur UASB.**

INTRODUCTION.

L'étude de cultures mixtes définies nous a permis d'étudier l'utilisation d'acides gras volatils dans des conditions bien précises. Après avoir étudié cet aspect, il nous a paru comme étant complémentaire et nécessaire de s'interroger sur la nature des activités microbiennes au sein d'une population naturelle, comme celle composant les boues granulaires d'un réacteur UASB.

Ceci amène à envisager le problème à différents niveaux:

- qu'elles sont les limitations liées aux problèmes de transfert de masse, sur les cinétiques d'utilisation de substrats tels l'acétate ou le propionate par les boues granulaires?
- est-il possible d'apprécier l'évolution de ces activités au cours du temps et d'en tirer des conclusions ?
- qu'elle est la proportion relative des différents groupes microbiens composants ces boues, et de quelle manière exprimer les résultats des numérations, quand on se rend compte de l'hétérogénéité qui existe dans la littérature.

L'article présenté aborde chacun de ces aspects, et met en évidence la difficulté pratique d'effectuer l'analyse cinétique d'utilisation de substrats par des boues granulaires, en raison principalement des problèmes de diffusion et d'adsorption du substrat.

EVOLUTION OF MICROBIAL ACTIVITIES AND POPULATIONS IN GRANULAR SLUDGE FROM AN UASB REACTOR

J.P. Guyot*, A. Noyola and O. Monroy

Universidad Autonoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa (UAM-I), ORSTOM, Departamento de Biotecnología, Apartado Postal 55-535, Mexico DF 09340, MEXICO.

SUMMARY.

With granular sludges grown in an UASB reactor fed with a mixture of acetate and propionate, it is shown that (i) growth of propionate-utilizing bacteria is responsible for the increase of the VSS content of the granular sludge, acetoclastic microflora did not grow or little, (ii) there is not a stoichiometric relationship between substrate removal and observed methane production, and (iii) contrary to the common practice the best way to present data on bacterial concentrations in sludges is: bacteria/g VSS, which will provide a reliable basis for comparisons between different works from various authors.

INTRODUCTION.

The Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor is a well established process for the anaerobic treatment of various kind of waste waters (Lettinga *et al.*, 1980). Its good performances depends on the formation of a bed of well settling and highly active granular sludge, with a low sludge volumetric index (SVI) and a high methanogenic activity (Lettinga *et al.*, 1980). This kind of anaerobic reactor might be an economic way for treating waste waters in developing countries (Noyola *et al.*, 1988) if means are available to deal with the inoculum. Unfortunately, in spite of numerous studies, there is still a need for basic information on the characterization of the parameters that control the granulation of the sludge and its microbial composition. Such data are important for the optimization of anaerobic reactors operation and start-up.

In this paper some aspects of anaerobic microbial populations of granular sludge from an UASB reactor are discussed, particularly substrate consumption activities and microbial composition.

MATERIAL AND METHODS.

UASB reactor. A 4.5 liter reactor was inoculated with activated sludge collected from a quiescent anaerobic zone of an aeration tank of a municipal waste water treatment plant, this sludge had a high mineral fraction (73% of TSS) due to small particles and grit. The reactor was operated for a year at 35°C, at an hydraulic retention time of 2 days, performing a 90% COD removal with a synthetic waste water containing acetic acid (3.5 g/l) and propionic acid (1 g/l) as energy and carbon sources, and a salt medium previously described (Noyola *et al.*, 1988).

Experimental conditions. The anaerobic technique of Hungate (1969) and Balch and Wolfe (1976) was used throughout this study to prepare the cultivation media; a gassing manifold (Balch *et al.*, 1979) and an anaerobic chamber were used for the operation of inoculation and addition of the substrates. Sodium sulfide was used as reductant.

Kinetics experiments. The sampled granular sludge (1 mm to 2 mm of diameter) was allowed to stay 24 hours under vacuum, in the air lock of the anaerobic hood, in order to allow the residual substrates to be biologically removed and to allow the gas produced to escape more easily; then, the sample was flushed with nitrogen. Controls containing no substrate only showed a residual methane production. Once, inside the anaerobic chamber, 10 ml of sample were distributed per serum-bottle (60ml) which already contained 10 ml of a mineral solution (Noyola *et al.*, 1988). At time zero of the experiments, the substrates were added in known excess, in order to be in saturating conditions. Each experiment was run in duplicate and incubated at 35°C.

Bacteria counts. The anaerobic bacteria were quantified using the most probable number (MPN) technique with 5 tubes per dilution; sludge granules were dispersed in the anaerobic chamber using a Potter. For the OHPA bacteria (Obligate Hydrogen Producing Acetogenic Bacteria) the same culture media as for methanogenic bacteria were used, except for the sulfate salts which were changed for chloride salts. Sludges for kinetics experiments and bacterial counts were sampled at the reactor bottom.

Analytical techniques. Total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were determined in duplicate using Standards Methods (1976). Acetate was analyzed by gas chromatography, using a FID detector and a stainless steel column packed with Porapack Q (80-100 mesh). Methane was analyzed using the same conditions as acetate but the samplings and injections were made by means of a Hamilton pressure-lock syringe.

RESULTS AND DISCUSSION.

Two series of experiments were performed during an eight month period. The first one was run 3 months after the start-up of the UASB reactor. Time-course of methane production from acetate and propionate were recorded (Fig. 1) and the kinetic parameters were calculated (Table 1, 1st series).

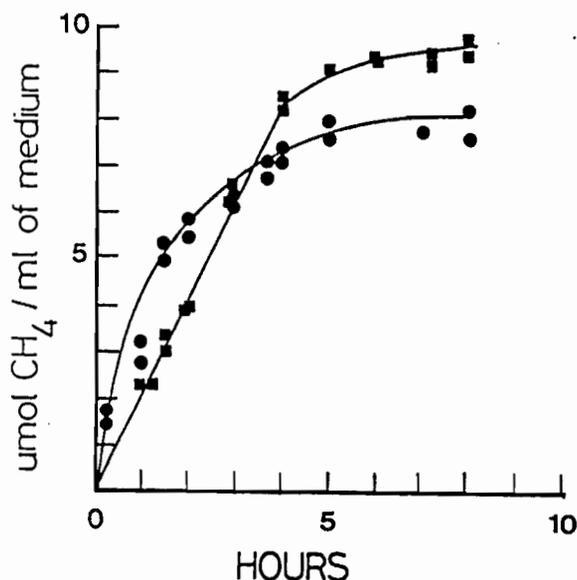


Fig. 1. time course of methane production from acetate (●) and propionate (■) by granular sludges, 3 months after the UASB reactor start-up.

The maximum velocity (V_{max}) and specific activity ($Asp = V_{max}/VSS$) of methanogenesis from acetate is higher than the parameters calculated for propionate (Table 1, 1st series). Lower activities were calculated by Dolfling (1985): 0.3 to 1.14 mmol/g VSS/h for the acetate and 0.36 to 0.42 mmol/g VSS/h for the propionate. This author also observed that the activity of the acetoclastic microflora is higher than that of the propionate users. The granular sludge used by Dolfling (1985) were sampled from an industrial UASB digester (Holland), fed with waste waters from a sugar beet processing plant. We can see that the results obtained from two different geographic areas (temperate and tropical) and two different types of effluent are in the same order of magnitude. Some differences would be expected mainly in relation with the origin of the inoculum.

Table 1. Kinetic parameters for methane production by granular sludge.

	So mM	TSS g/l	VSS %	V_{max} mmol/l/h	Asp mmol/g VSS/h	V_{max}/g TSS mmol/g TSS/h
Acetate:						
1st series	7.8	28.4	27	10.8	1.4	0.38
2nd series	11.7	13	53	6.4	0.9	0.49
Propionate:						
1st series	5.4	28.4	27	4.3	0.55	0.15
2nd series	10	13	53	4.5	0.64	0.35

Eleven months after start-up, in order to study the sludge evolution, the same parameters were measured in a second series of experiments. The time-course of experiments is presented in Fig. 2 and the calculated kinetic parameters in Table 1, 2nd series. The methanogenic activity from acetate remained greater than that from propionate. The VSS fraction increased twice from 27 % to 53% (% TSS) and the V_{max} calculated per gram of TSS, increased 1.3 times with acetate and 2.3 times with propionate as substrates. Then, on the basis of proportionality between microbial biomass and V_{max} , the increase in VSS (%TSS) can be related with the increase of the V_{max} (per g TSS) of propionate degradation. The increase of biomass can mainly be explained by the growth of the population of the propionate-using bacteria: the increase of methanogenic specific activity with propionate, together with the decrease of the activity with acetate, are also arguments that support this observation, since those values are calculated per gram of VSS as a whole (acetoclastic plus OHPA biomass). This implies that the acetoclastic microflora did not grow or little. To date, scarcely anything is available about physiology of complex anaerobic microbial populations within anaerobic reactors, even if efforts are made to understand them on the basis of individual properties of defined microbial groups. In the case of the acetoclastic bacteria, the hypothesis is made that they could be present under a physiological state corresponding at an uncoupling between growth and energy metabolism, since acetate consumption is accomplished in our reactor apparently without significant growth. In anaerobic digestion this phenomenon might be very important, because one of the great advantages of this process is the generation of small amounts of sludge which is generally attributed to the slow generation time of anaerobic bacteria. In view of the former results, we emit the hypothesis that uncoupling energy production and growth would also act in favor of a low biomass

generation with active metabolic properties in anaerobic reactors.

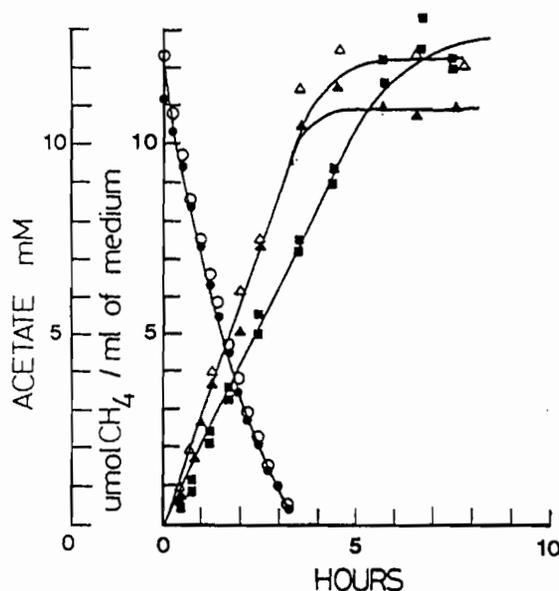


Fig. 2. Kinetics of acetate consumption (\circ , \bullet) and methane production from acetate (\blacktriangle , \triangle) and propionate (\blacksquare) (duplicate experiments) by granular sludges, 11 months after the UASB reactor start-up.

Dolfing (1985) has calculated degradation activities of acetate and propionate from the curves of methane production, in order to characterize the mass transfer limitations of the substrate in the granular sludge. However, in his study the mass transfer limitations of the methane evolved from the biomass within the granules to the atmosphere, was ignored. In case that gas transfer limitation exists, it might not be accurate to calculate substrate degradation in the liquid phase from evolved methane data, since the observed kinetics of both substrates removal and methane production could not be correlated. Taking into account these considerations, the acetate degradation parameters were determined from the curve of acetate consumption (Fig. 2), in order to know if the methane production was stoichiometrically related with the substrate removal. The V_{max} , A_{sp} and apparent constant of affinity (K'_m) were calculated using the following linearized Michaelis-Menten equation: $(\ln S_0/S_t)/t = (-1/K'_m) \times (S_0 - S_t)/t + V_{max}/K'_m$, where S is the initial (o) or time (t) acetate concentration (Robinson and Characklis, 1984). The calculated V_{max} were 9.5 mmol/l/h (Table 2) for the acetate degradation and 6.4 mmol/l/h for the methane production (Table 1, 2nd series), so there is a difference of 48.4% between the two parameters. Furthermore, whereas acetate quite disappeared after 3 hours, a slight methane production is still registered during one hour more (Fig. 2). This could be explained by the presence of tiny gas bubbles that remain stuck to the granules, after substrate disappearance, and by the consumption of remaining acetate adsorbed onto the granules. Without gas transfer limitation the V_{max} calculated in both cases must be equal (according to $1 \text{ mol Acetate} \rightarrow 1 \text{ mol CH}_4$), but as we can note, in the case of granular sludge this phenomenon should be taken into account since the V_{max} are quite different between acetate degradation and methane production. Then, it must be concluded that with granular sludge, it is not correct to perform kinetics studies of substrate consumption only on the basis of methane production.

A K'_m value for acetate of 1.3 mM was found, which is slightly higher than those calculated by Dolfing (1985) with granular sludges

(Table 2). Kaspar and Wuhrmann (1978) with a completely stirred conventional digester found a $K'm$ of 0.32 mM (Table 2). The K_m of pure cultures of acetoclastic bacteria are 0.7 mM for Methanothrix soehngenii (Huser et al., 1982), 1.2 mM for Methanothrix concilii (Patel, 1984) and 0.5 mM for Methanosarcina barkeri (Smith and Mah, 1978). This means that the different values found by the various authors with anaerobic sludges are of the same order of magnitude as those calculated for the pure cultures of methanogenic bacteria.

Table 2. Kinetics parameters of acetate degradation by granular sludge. (*) Data calculated in mmol/g VSS/h, from values in μ mol/g VSS/mn in the cited reference.

	this work UASB 4.5L	conventional reactor Kaspar <u>et al.</u> , 1978	Industrial UASB Dolfing (1985)
$V_{max,Ac}$ mmol/l/h	9.5	0.63	—
$A_{sp,Ac}$ mmol/g VSS/h	1.4	—	0.3 a 1.14(*)
$K'm$ mM	1.3	0.32	0.5 a 1

In order to characterize the different microbial populations of the granular sludge, the anaerobic bacteria were counted (Table 3). It is found that acetoclastic bacteria represents 30 % of the hydrogenophilic bacteria.

Table 3. Quantification of the different microbial groups in the granular sludges. E is for exponent of 10. I : this work, II : Dolfing et al., 1985, III : Dubourguler et al., 1987.

	Number of microorganisms			
	per g VSS	per ml		
	I	I	II	III
Fermentative bacteria	3.E6	2.E7	1.E10	1.E9
Acetoclastic methanogens	3.E5	3.E6	1.E8	2.5.E9
Hydrogenophilic methanogens	1.E6	1.E7	1.E9	2.5.E9
OHPA: propionate users	2.E5	6.E6	1.E7	2.5.E8

In our reactor, the high fraction of hydrogen-using methanogenic bacteria is explained by their role in the syntrophic association with propionate users. Furthermore, it has been demonstrated that methanogenic acetoclastic bacteria evolved molecular hydrogen (15 Pa) when using acetate (Lovley and Ferry, 1985); then, we can expect that this hydrogen may act as another substrate source for hydrogenophilic bacteria in anaerobic reactors, since a very tight relationship exists between these bacteria in a granule.

Dubourguler et al. (1988) and Dolfing et al. (1985) made counts by the MPN method using 3 tubes per dilution which makes difficult any comparison with our counts (5 tubes per dilution); furthermore, their data are reported as bacteria/ml, which is difficult to interpret in the case of solids as granular sludge: the amount of sludge (TSS) that can be taken out from a same reactor between two different samplings can vary markedly, since it is difficult to control the volume of liquid which run out in the same time with the sludge. Moreover, VSS

concentration in the sludge bed may vary widely for different reactors, preventing comparisons between them. In our laboratory, we often observed that two samples taken out from the same reactor at very short time intervals gave different results in term of bacteria/ml but same counts as bacteria/g VSS. Table 3 gives us an idea of such a difference when the counts are calculated as bacteria/ml or bacteria/g VSS. Wu *et al.* (1987) reported data as bacteria/ml and bacteria/g Suspended Solids, which goes in the sense of our assumption. Nevertheless, they did not report counts as bacteria/g VSS. Since the VSS content of a sludge is used as an indicator of biomass and to express most of the operation parameters of anaerobic reactors, it might appear more useful to report bacterial counts as bacteria/g VSS.

ACKNOWLEDGMENTS: This work is part of a project supported by O.E.A. (Organizacion de los Estados Americanos) under the program "fuels by fermentation" and by the E.E.C. (European Economic Community) (grant No. C11.0197.Mexico (H)). J.P. Guyot is a visiting researcher from ORSTOM (Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Developpement en Cooperation).

REFERENCES.

- Balch, W.E., G.E. Fox, L.J. Magrum, C.R. Woese, and R.S. Wolfe. 1979. Microbiol. Rev. 43: 260-296.
- Balch, W.E., and R.S. Wolfe. 1976. Appl. Environ. Microbiol. 32: 781-791.
- Dolfing, J. 1985. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 77-81.
- Dolfing, J., A. Griffioen, A.R.W. van Neerven, and L.P.T.M. Zevenhulzen. 1985. Can. J. Microbiol. 31: 744-750.
- Dubourguler H.C., D.B. Archer, G. Albagnac, and G. Prensler. (1988) Proceedings of the 5th International Symposium on anaerobic digestion, Bologna, Italy. pp. 13-23. In E.R. Hall and P.N. Hobson (ed.). Pergamon Press.
- Dubourguler H.C., Prensler G., and Albagnac G. 1987. Proceeding of the GASMAT-workshop, Lunteren, Netherlands. pp. 18-33.
- Hungate, R.E. 1969. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed.) Methods in Microbiology, vol. 3B. pp. 117-132. Academic Press. Inc. New-York.
- Huser, B.A., K. Wuhrmann, and A.J.B. Zehnder. 1982. Arch. Microbiol. 132: 1-9.
- Kaspar, H.F., and K. Wuhrmann. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36: 1-7.
- Lettinga, G, A.F.M. van Nelsen, S.W. Hobma, W. de Zeeuw, and A. Klapwijk. 1980. Biotechnol. Bioeng. 22: 699-734.
- Lovley D.R., and J.G. Ferry. 1985. Appl. Environ. Microbiol. 49: 247-249.
- Noyola A., J.P. Guyot and O. Monroy. 1988. Proceedings of the 1rst National Symposium on Environmental Engineering, Mexico City, Mexico. pp. 179-197. In Instituto de Ingenieria, UNAM (ed.).
- Patel, G.B. 1984. Can. J. Microbiol. 30: 1383-1396.
- Robinson, J.A., and W.G. Characklis. 1984. Microb. Ecol. 10: 165-178.
- Smith, M.R., and R.A. Mah. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36: 870-879.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1976. 14th Edition, American Public Health Association. Washington, D.C.
- Wu W., Hu J., Gu X., Zhao Y., Zhang H. and Gu G. 1987. Wat. Res. 21: 789-799.

3. Discussion générale.

3.1. Le transfert interspèce d'électrons.

Des cultures mixtes définies capables de produire du méthane à partir du saccharose, du xylane et du propionate ont été élaborées. L'étude de ces cultures mixtes a été prolongée par celle d'associations microbiennes naturelles: les boues granulaires d'un réacteur de type UASB. Nous avons pu ainsi mettre en évidence des phénomènes nouveaux, concernant l'écophysiole de la digestion anaérobie.

Lors de l'étude de la culture mixte définie composée de Escherichia coli, Acetobacterium woodii, Desulfovibrio vulgaris, Methanobacterium formicicum et Methanosarcina barkeri (Jones et al, 1984), la possibilité d'un transfert interspèce d'hydrogène entre E. coli et les méthanogènes hydrogénophiles a été démontrée. Ce transfert interspèce d'hydrogène a pu également être obtenu en utilisant M. barkeri comme bactérie hydrogénophile non-utilisatrice de formate. Ce type de transfert interspèce d'électrons avec une bactérie du genre Methanosarcina a aussi été étudié par Traoré et al (1983), en utilisant comme donneur d'hydrogène Desulfovibrio vulgaris. De plus, la possibilité d'un transfert interspèce d'hydrogène entre une bactérie sulfato-réductrice et une méthanogène hydrogénophile non utilisatrice de formate (Methanobacterium bryantii), démontrée dans cette thèse (Guyot et Brauman, 1986), liée aux mesures des paramètres cinétiques d'utilisation du formate par des boues granulaires (Guyot et Ramirez, 1989), sont autant de faits ajoutés aux précédents qui ne correspondent pas à la théorie du transfert interspèce de formate, émise par Thiele et Zeikus (1988) et reprise par Boone et al (1989). Car dans aucun des cas cités, un transfert interspèce de formate ne peut être envisagé pour expliquer la relation syntrophique qui s'établit entre les bactéries donneuses et acceptrices d'électrons, à moins que la bactérie donneuse d'électrons soit capable de mobiliser deux systèmes de transfert différents qui s'expriment parallèlement ou alternativement selon la bactérie acceptrice d'électrons. Il est en effet troublant que les calculs de Boone et al (1989), basés sur l'hypothèse du transfert interspèce de formate, prévoient une production de méthane dans les digesteurs en meilleure concordance avec les valeurs observées expérimentalement, que les calculs effectués sur la base d'un transfert interspèce d'hydrogène. Par ailleurs, ces auteurs ont déterminé l'existence d'une formate déshydrogénase (FDH) chez Syntrophomonas wolfei dont ils n'ont pas étudié le fonctionnement, et les bactéries du genre Desulfovibrio sont aussi pourvues d'une FDH dont la localisation est périplasmique (Peck Jr., 1984). Néanmoins, malgré la présence de ces enzymes, aucune preuve tangible n'a été apportée sur l'existence d'un transfert interspèce de formate: les expériences de Thiele et Zeikus (1988) ne permettant pas de conclure affirmativement. Alors que Boone et al (1989) déterminent par dosage une concentration d'hydrogène dans la phase liquide de l'ordre de 63 nM, lors d'une expérience mettant en présence une co-culture syntrophique dégradant le butyrate, et qu'ils calculent selon les lois des équilibres chimiques que cette concentration devrait être en équilibre avec 16.3 uM de formate, il apparaît surprenant que les

mêmes auteurs n'aient pas cherché, pour confirmer leur hypothèse, à analyser par dosage le formate qu'ils prétendent être présent dans le milieu. Par ailleurs, aucune contre expérience plaçant la même co-culture dans un milieu contenant du butyrate, avec une concentration initiale de formate élevée pour rendre la réaction de transfert interspèce de formate thermodynamiquement défavorable, n'a été effectuée. Car de la même manière qu'une forte pression partielle en hydrogène inhibe la dégradation des acides gras volatils, une concentration de formate supérieure à 1 mM (selon les calculs thermodynamiques de Boone et al, 1989) devrait inhiber celle du butyrate. Si l'on tenait cette dernière supposition pour valide, la courbe biphasique de méthanogénèse obtenue avec la tri-culture: Cellulomonas, Desulfovibrio vulgaris et Methanobacterium formicicum cultivée avec du xylane comme substrat, en absence de sulfate, (Guyot, 1986) pourrait effectivement s'expliquer par une inhibition de l'oxydation de l'éthanol due à une accumulation de formate lors de la première phase. Le formate, durant cette phase, serait consommé par la méthanogène, et une fois l'inhibition levée, l'oxydation de l'éthanol pourrait avoir lieu par transfert interspèce de formate lors de la seconde phase. Lors de la rédaction de cet article (Guyot, 1986), l'hypothèse du transfert interspèce de formate n'avait pas encore été émise, et deux autres hypothèses pour expliquer ce phénomène biphasique avaient été avancées:

- la première étant l'oxydation du formate par M. formicicum lors de la première phase, empêchant cette bactérie d'établir simultanément un transfert interspèce d'hydrogène avec la sulfato-réductrice pour l'oxydation de l'éthanol qui ne pourrait se produire que lors de la seconde phase, une fois la méthanogène rendue disponible,
- la seconde étant l'utilisation du formate par l'association bactérie sulfato-réductrice/bactérie méthanogène, sur la base d'un transfert interspèce d'hydrogène lors de la première phase, suivie de l'oxydation de l'éthanol lors de la seconde phase. La vérification de cette seconde hypothèse a néanmoins permis de démontrer par la suite, la possibilité d'un transfert interspèce d'hydrogène entre une sulfato-réductrice et une méthanogène à partir du formate (Guyot et Brauman, 1986).

Une autre conséquence du transfert interspèce de formate serait celle au niveau de la théorie du recyclage de l'hydrogène (hydrogen cycling) de Odom et Peck (1984), chez les bactéries sulfato-réductrices. Cette théorie consiste en un transfert d'hydrogène entre une fermentation cytoplasmique du substrat et une chaîne respiratoire membranaire, se traduisant par une production d'hydrogène diffusant au travers de la membrane et sa réoxydation par une hydrogénase membranaire couplée au cytochrome C3, ce qui créerait un gradient de proton permettant de faire fonctionner une pompe à proton et de produire de l'ATP pour la cellule selon un mécanisme chimioosmotique. La possibilité du transfert interspèce d'hydrogène chez les bactéries sulfato-réductrices s'expliquerait aisément grâce à cette théorie. Or si l'on reprend l'hypothèse de Thiele et Zeikus (1988) et de Boone et al (1989), il faudrait que l'hydrogène produit par les sulfato-réductrices soit réoxydé sous forme de formate. Ce

qui est probable étant donné la présence d'une formate déshydrogénase périplasmique chez Desulfovibrio (Peck, 1984), mais conduirait aussi à s'interroger sur le fonctionnement de cette enzyme qui supposerait, dans ces conditions et en l'absence de transfert interspèce de formate et présence de sulfates, l'existence d'un cycle futile de production et d'hydrolyse du formate au niveau du périplasma afin de permettre le recyclage de l'hydrogène !?

L'hypothèse du transfert interspèce de formate reste donc à démontrer dans son existence et à vérifier dans ces conséquences.

3.2. Transfert interspèce d'hydrogène et bactéries sulfato-réductrices.

Tout au long de cette thèse, des cultures mixtes définies ont été élaborées sur la base d'un transfert interspèce d'hydrogène entre une bactérie méthanogène et une BSR: nous admettons dans le cadre de ce travail, en absence de démonstration claire de l'hypothèse du transfert interspèce de formate, la validité du transfert interspèce d'hydrogène dans ce type de relation syntrophique.

Les cultures mixtes élaborées sur un tel principe n'ont posé aucun problème, et nous avons pu mettre en évidence une nouvelle possibilité de transfert interspèce d'hydrogène à partir du formate, entre une BSR du genre Desulfovibrio et une bactérie méthanogène (Guyot et Brauman, 1986). Cette relation syntrophique vient appuyer la théorie de l'"hydrogen-cycling" de Odom et Peck (1984), car elle est un indice supplémentaire de la production intermédiaire d'hydrogène par un Desulfovibrio à partir d'un substrat (le formate), pouvant donner lieu selon les circonstances à une respiration sulfate ou à un transfert interspèce d'hydrogène. Néanmoins, avec Desulfobulbus sp., bactérie sulfato-réductrice du groupe II, il n'a pas été possible d'établir lors de cocultures sur propionate, de transfert interspèce d'hydrogène avec une méthanogène, malgré le fait que Desulfobulbus soit capable de croître en présence d'hydrogène (Guyot et Traoré, 1985). D'autres expériences que nous avons réalisées et non publiées dans le cadre de cette thèse, nous ont indiqué qu'une BSR du groupe II isolée au laboratoire de microbiologie ORSTOM de l'Université de Provence, capable d'oxyder incomplètement le butyrate en acétate, ne pouvait pas établir de relations syntrophiques avec des méthanogènes sur la base d'un transfert d'hydrogène. Il est d'ailleurs remarquable que dans la littérature, à notre connaissance, l'on ne reporte pas de couplages entre des BSR du groupe II et des méthanogènes. Ce qui fort probablement indique que dans le cas des BSR de ce groupe, la théorie du recyclage de l'hydrogène ne s'applique pas, et que par conséquent il n'y a pas production intermédiaire d'hydrogène moléculaire lors de l'oxydation du propionate ou du butyrate. La conversion du propionate en acétate chez Desulfobulbus propionicus et chez Syntrophobacter wolini suivrait la même voie: celle de la formation intermédiaire de méthylmalonyl-coA (Mucha et al., 1988; Stams et al., 1984). Dans les deux cas il y aurait donc la formation de NADH, H⁺, mais dans celui

de S. wolinii la régénération du transporteur d'électrons en NAD^+ se ferait par l'intermédiaire d'un transfert interspèce obligatoire, alors que dans le cas de D. propionicus, malgré la présence d'une très forte activité NADH déshydrogénase (Stams et al., 1984), le pouvoir réducteur du NADH, H^+ ne serait pas transmis via la formation d'hydrogène moléculaire: Stams et al. (1984) signalent que chez D. propionicus, le système $\text{NADH, H}^+/\text{NAD}^+$ déshydrogénase est capable de transmettre ses électrons à des cytochromes de type b.

Alors que dans les digesteurs anaérobies les composés tels le lactate, l'éthanol et le formate peuvent être oxydés en absence de sulfate, soit par des bactéries OHPA, soit par des BSR couplées à des méthanogènes, les acides gras volatils comme le butyrate ou le propionate ne peuvent l'être que par les bactéries OHPA. Il n'existe apparemment pas de groupe microbologique pouvant offrir une alternative à l'oxydation anaérobie des acides gras par les bactéries OHPA en absence de sulfate. Par contre, en présence de sulfate, il existe probablement une compétition entre les BSR et les bactéries OHPA pour l'utilisation de ces acides. Ce type de compétition n'a pas encore été étudiée, et il serait intéressant de connaître les affinités de chacun des deux groupes microbiens pour ces substrats, de la même manière que nous connaissons celle des BSR du groupe I et des méthanogènes vis-à-vis de l'hydrogène et de l'acétate (Kristjansson et al., 1982; Schonheit et al., 1982).

3.3. Sulfates, sulfures et digestion anaérobie.

Lors de la culture mixte associant Desulfobulbus sp. avec M. barkeri 227 (Guyot et al., 1985) en présence de propionate (6,24 mM) et d'un excès de sulfate de sodium, 5 mM de sulfures dissouts sont formés et la réaction acétoclastique se trouve inhibée. M. barkeri DM nécessite pour une croissance optimale sur méthanol une concentration en sulfure ajoutés de 1,25 mM (Mountfort et Asher, 1979), ceci correspond selon ces auteurs à une concentration en sulfure dissouts de l'ordre de 0,87 mM (pH 7). Néanmoins Scherer et Sahm (1981), pour d'autres variétés de M. barkeri (DSM 800, 804, 805, et 1232) cultivées sur méthanol, déterminent un optimum de concentration situé entre 2,5 et 4 mM de sulfures ajoutés, soit selon eux 0,04 à 0,06 mM (pH 6,35) de sulfures dissouts. Les mêmes auteurs reportent qu'à une concentration de 12 mM de sulfure ajoutés, il y a une inhibition presque totale de la méthanogénèse. Dans les digesteurs anaérobies, quand les sulfures s'accumulent dans le milieu, on peut avoir des phénomènes d'inhibition partielle ou totale de la méthanogénèse. La littérature reporte une extrême variabilité entre les seuils inhibiteurs en sulfures, pouvant varier de 50 mg/l à 1000 mg/l (Isa et al., 1986; Khan et Trottier, 1978; Mulder, 1984; Oleszkiewicz et al., 1989; Rinzema et Lettinga, 1988). Cette variabilité s'explique probablement par la diversité des procédés testés et d'opération des réacteurs: un réacteur UASB n'aura probablement pas la même sensibilité qu'un filtre anaérobie ou qu'un réacteur infiniment mélangé.

Il n'est par conséquent pas surprenant qu'une accumulation de sulfures jusqu'à 5 mM inhibe la méthanogénèse à partir de l'acétate, lors de l'expérience couplant Desulfobulbus sp. à M. barkeri (Guyot et al., 1985). L'addition de fer ferreux lors de cette expérience permet de précipiter les sulfures produits par la BSR et de lever cette inhibition. Ce qui permet d'envisager une application pratique de l'addition de fer ferreux aux effluents riches en sulfate (effluents de distilleries, de l'industrie de la levure, de papeteries, etc...) afin de prévenir l'inhibition qui pourrait se produire par l'accumulation de sulfures. Ceci reçoit actuellement une application dans notre laboratoire mexicain du département de Biotechnologie de la UAM-I, où des sulfates ferreux sont volontairement ajoutés à des réacteurs UASB de laboratoire, alimentés avec des effluents synthétiques non réduits: les sulfates ajoutés permettent par sulfato-réduction de baisser notablement le potentiel redox interne du réacteur, mais les sulfures produits en permanence à cause de l'alimentation en continue du réacteur sont précipités sous forme de sulfure ferreux, et s'accumulent donc sous une forme non toxique.

3.4. Inhibition de la méthanogénèse à partir de l'acétate par le formate.

L'étude de la culture mixte mettant en présence une bactérie fermentaire (Cellulomonas) et une méthanogène acétoclaste (M. barkeri) (Guyot, 1986) a permis de mettre en évidence un phénomène d'inhibition nouveau: l'inhibition de l'utilisation de l'acétate par M. barkeri par le formate. Cette inhibition est à rapprocher de celle provoquée par l'hydrogène vis-à-vis du même genre bactérien cultivé sur acétate (Baresi et al., 1978; Fergusson et Mah, 1983; Zinder et mah, 1979). Nous pouvons supposer que l'inhibition de l'acétoclastie par le formate est largement répandue chez les bactéries du genre Methanosarcina, car nous avons pu la démontrer chez deux espèces du genre très différentes: M. barkeri 227, M. thermophila TM-1. Néanmoins, les méthanogènes acétoclastes du genre Methanosaeta ne sont pas sensibles à l'hydrogène et sont dotées d'une formate-déshydrogénase (Zehnder et al., 1980), il est donc fort probable que le formate n'ait aucune action inhibitrice sur ces bactéries. L'inhibition de l'acétoclastie par l'hydrogène et le formate chez les Methanosarcina, conduit à nous interroger sur la signification de l'extrême spécialisation trophique des bactéries méthanogènes. En effet, la plupart des méthanogènes hydrogénophiles non acétoclastes peuvent utiliser le formate, alors qu'aucune des méthanogènes acétoclastes ne peuvent utiliser ce substrat. Le rôle protecteur des méthanogènes hydrogénophiles contre une éventuelle accumulation d'hydrogène est bien connu: moins de 1% des capacités d'utilisation de l'hydrogène sont mises à profit par les boues de digesteurs anaérobies (Kaspar et Wuhrmann, 1978), et les numérations effectuées sur des boues granulaires (Dolfing et al., 1985; Guyot et al.; 1990) montrent qu'en général la concentration en bactéries méthanogènes hydrogénophiles est largement supérieure à celle des acétoclastes. Ce qui prouve une certaine capacité des boues de digesteurs anaérobies

à amortir une augmentation de la teneur en hydrogène. Nous pouvons penser que ces caractéristiques jouent également en faveur d'une protection des acétoclastes vis-à-vis d'une augmentation de la concentration en formate. Nous pourrions néanmoins douter de la validité de cette inhibition par le formate au niveau des boues de digesteurs, étant donné la présence aux côtés des Methanosarcina de bactéries du genre Methanosaeta à priori non sensible à l'action du formate. L'étude que nous avons réalisée (Guyot et Ramirez, 1989) démontre que l'acétoclastie par des boues granulaires est effectivement inhibée par le formate. Il est fort probable que la portée de cette inhibition soit limitée par la proportion relative des Methanosarcina et des Methanosaeta dans les boues de digesteurs, d'où l'intérêt de chercher l'enrichissement de ces boues en Methanosaeta: un inoculum riche en Methanosaeta serait moins sensible aux effets inhibiteurs de l'hydrogène et du formate sur l'acétoclastie, et serait par conséquent plus stable.

Par ailleurs, la mesure de l'hydrogène dans les digesteurs permet de réaliser un contrôle fin de la digestion anaérobie (Harper et Pohland, 1985; Whitmore et al., 1987); étant donné la possibilité théorique d'un transfert interspèce de formate (Thiele et Zeikus, 1988) (sous réserve de sa démonstration) et la production de formate très répandue chez les bactéries fermentaires, nous pouvons imaginer qu'un dérèglement du fonctionnement d'un digesteur pourrait conduire à une augmentation rapide de la concentration en formate dans le milieu, de même que l'hydrogène le formate pourrait-être alors un paramètre supplémentaire de contrôle de la digestion anaérobie.

Ainsi les conséquences spéculatives de l'inhibition de l'acétoclastie par le formate méritent d'être probablement étudiées plus en détail dans le futur.

3.5. Activités des boues granulaires.

Les cultures mixtes définies permettent, comme nous l'avons déjà évoqué, de simplifier les phénomènes microbiens se produisant dans les systèmes anaérobies. Ces modèles ont bien entendu leurs limitations, et il convient de compléter ces études par celles des inocula mixtes naturels que sont les boues des digesteurs anaérobies. L'actualité présentée par l'étude des boues granulaires des réacteurs UASB nous a conduit à étudier leurs activités vis-à-vis de la dégradation de deux acides gras volatils: l'acétate et le propionate, et à nous interroger sur l'évolution de ces activités dans le cadre de conditions bien contrôlées: celles d'un réacteur UASB alimenté avec un mélange d'acétate et de propionate (Noyola et al., 1988; Guyot et al., 1990).

Dans un pays en développement comme le Mexique, le démarrage d'un réacteur UASB n'est pas un problème facile à résoudre, principalement de par le manque de réacteurs industriels en opération pouvant fournir en grande quantité des inocula déjà adaptés pour ensemercer les nouveaux réacteurs. Devant une telle circonstance, il

convient donc d'élaborer ses propres protocoles afin de produire les boues nécessaires, et d'avoir des données sur leur performances qui soient comparables à celles obtenues dans les pays industrialisés. L'utilisation de boues activées adaptées anaérobiquement a permis l'obtention d'un inoculum efficace (dépôt de brevet en cours) et un démarrage satisfaisant des réacteurs que nous avons expérimentés (Noyola *et al.*, 1988; Guyot *et al.*, 1990); l'étude des activités des boues granulaires obtenues, situe cet inoculum au même rang que ceux étudiés en régions tempérées. Cette étude nous a aussi fait ressortir l'extrême importance des phénomènes de diffusion du substrat à son site réactionnel (le granule de boue), et la difficulté à réaliser des mesures d'activités de dégradation d'un substrat sur la simple détermination du méthane produit, car à la diffusion du substrat s'ajoute le problème du transfert du gaz produit de la phase liquide vers la phase gazeuse. De surcroît, il faut aussi tenir compte des phénomènes d'adsorption du substrat à la surface des granules. Il est regrettable que sur ce point particulier, la littérature n'offre pas d'informations suffisantes.

L'étude de l'évolution des activités microbiennes, entre deux périodes de fonctionnement du réacteur UASB mentionné, suffisantes pour permettre à la biomasse d'évoluer (3 mois et 11 mois après le démarrage), nous a permis de mettre en évidence que l'activité acétoclastique n'avait pratiquement pas augmenté, alors que la biomasse totale avait doublé ainsi que l'activité de dégradation du propionate. Ce phénomène est d'autant plus curieux, que les bactéries OHPA responsables de la dégradation du propionate présentent au laboratoire des temps de génération largement supérieurs à ceux des acétoclastes. Les faibles taux de croissance des anaérobies strictes, en particulier des méthanogènes, sont généralement invoqués pour expliquer les faibles vitesses de production de boues par les digesteurs anaérobies, comparées à celles des traitements aérobies. A la vue des résultats obtenus, une autre hypothèse vient à l'esprit: celle d'un découplage énergétique entre la croissance et la production d'énergie par les acétoclastes. Une telle possibilité limiterait la production de cellules des bactéries acétoclastiques, tout en conservant les activités de dégradation de l'acétate. Fardeau et Belaich (1986) ont montrés, dans le cas d'une bactérie méthanogène hydrogénophile et thermophile, Methanococcus thermolithotrophicus, qu'un excès de source de carbone et d'énergie pouvait induire un découplage énergétique. Etant donné les temps de génération élevés des méthanogènes acétoclastes, les temps de rétention hydraulique (TRH) que nous avons appliqués (deux jours) au réacteur (très inférieurs à ces temps de génération), et les concentrations en acétate de l'effluent très supérieures aux constantes d'affinités de ces bactéries, nous pouvons nous demander si de telles conditions ne conduiraient pas aux mêmes effets que ceux mis en évidence chez M. thermolithotrophicus. Il est donc tout à fait raisonnable de croire que la production de biomasse dans les digesteurs anaérobies, composée d'un ensemble complexe de micro-organismes, n'est pas seulement limitée par les temps de génération des populations microbiennes, mais aussi par des phénomènes de découplage énergétique. Il apparaît nécessaire d'effectuer des études en réacteurs à flux continu avec rétention de biomasse à des TRH très

réduits, dans des conditions proches des réacteurs industriels, en utilisant d'une part des souches pures de bactéries méthanogènes acétoclastes et d'autre part des cultures mixtes définies réunissant des méthanogènes et des bactéries OHPA. L'évolution des techniques immunologiques, les possibilités de doser spécifiquement l'activité des méthanogènes hydrogénophiles par mesure du coenzyme F_{420-2} ou méthanoptérine, et des méthanogènes acétoclastes par mesure de la sarcinaptérine (Gorris *et al.*, 1988), devraient permettre de quantifier avec une meilleure précision l'évolution des différents groupes microbiens, avec l'idée de proposer une analyse expérimentale plus fine de l'évolution des populations microbiennes dans les digesteurs anaérobies.

L'évaluation de la biomasse dans un digesteur anaérobie se fait le plus souvent par la mesure des matières solides volatiles en suspension en suivant une technique standardisée, la concentration des groupes microbiens composant cette biomasse est le plus souvent déterminée par la technique du nombre le plus probable. En général on trouve un nombre de méthanogènes hydrogénophiles (BMH) supérieur aux bactéries OHPA et aux méthanogènes acétoclastes (BMA) (Guyot *et al.*, 1990). Nous avons accentué le rôle des BMH comme étant essentiellement celui d'un tampon biologique, prévenant l'accumulation d'hydrogène et de formate, évitant ainsi aux bactéries OHPA et aux BMA d'être inhibées par l'un de ces produits. L'utilisation de la technique du nombre le plus probable pour quantifier les bactéries dans les boues de digesteurs anaérobies est d'un usage répandu, néanmoins les résultats sont souvent exprimés en nombre de bactéries/ml, ce qui n'a pratiquement aucune valeur et ne permet pas d'établir de comparaison entre digesteurs quand il s'agit de réacteurs avec rétention de biomasse et homogénéisation réduite ou nulle. L'expérience nous prouve que d'un prélèvement à l'autre la concentration de boues dans un échantillon provenant du même réacteur varie, par ailleurs l'absence d'agitation forcée dans ces réacteurs fait qu'un résultat exprimé par ml d'un milieu non homogène n'a aucune signification. La seule exception consisterait à quantifier les variations de population le long d'une hauteur de colonne de réacteur. Cette réserve mise à part, il apparaît plus opportun quand on souhaite obtenir des valeurs comparables entre réacteurs différents, d'établir les numérations en nombre de bactéries/g de matières volatiles en suspension, car les résultats ainsi exprimés ne dépendent plus de la variabilité liée à l'échantillonnage, et caractérisent la composition microbiologique d'une unité de boue. Il faut remarquer que les paramètres les plus importants d'un digesteur anaérobie sont fréquemment donnés par unité de matière volatile solide en suspension, telle la charge massique: kg DCO appliquée/kg MVS.j.

3.6. Cultures mixtes définies méthanogènes: considérations générales.

L'étude de l'écophysiologie microbienne de la digestion anaérobie est facilitée par l'emploi de culture mixtes définies, hormis les conséquences théoriques de l'utilisation de telles cultures, des conséquences pratiques évidentes apparaissent: l'élaboration d'inocula artificiels pour l'ensemencement de digesteurs industriels. Comme il a été fait remarquer dans la partie introductive de cette thèse, la fabrication et l'usage de tels inocula paraissent peu justifiés quand il s'agit de traiter des substrats ou des effluents aisément hydrolysables: il existe déjà des inocula naturels, bon marché, aisément disponibles en grande quantité et aisément adaptables si les précautions nécessaires sont prises. En revanche, pour de nombreuses substances toxiques et (ou) difficilement hydrolysables, d'origine soit naturelle ou qui résultent de l'activité humaine aboutissant au rejet de composés xénobiotiques dans l'environnement, confrontant ainsi l'arsenal biologique classique à des composés de structure inhabituelle, il n'existe pas forcément d'inocula pouvant répondre a priori à une exigence déterminée. Dans de tels cas il faut sélectionner la boue qui fera office d'inoculum, l'adapter parfois longuement et veiller à l'utiliser dans des limites de concentrations des substances à traiter qui ne soient pas toxiques, ce qui implique une étape très longue avant et lors du démarrage du réacteur. Pour de nombreux composés de ce type il est très difficile de trouver l'inoculum approprié, et il faut une réelle expertise en la matière car le démarrage raté d'un réacteur peu coûter cher, non seulement du point de vue économique mais aussi en terme de crédibilité vis-à-vis du procédé employé. Ainsi la production de cultures mixtes définies pouvant méthaniser un ou plusieurs composés "récalcitrants" apparaît comme une alternative séduisante, permettant de disposer d'un inoculum ayant des propriétés bien déterminées. L'idéal étant de disposer d'un inoculum "multitâche" ayant un spectre d'action relativement large. Néanmoins, il n'est probablement pas nécessaire de produire un inoculum de laboratoire capable de mener à bien la méthanisation complète d'un composé, car même si cette opération est techniquement réalisable, comme il a été montré dans cette thèse et dans d'autres, il apparaît économiquement et techniquement plus judicieux de s'orienter vers la production d'un inoculum constitué uniquement de la ou des bactéries hydrolytiques désirées. Car lors de la méthanisation d'un composé difficile, l'étape limitante devient celle de l'hydrolyse. Il suffirait par conséquent de doper des boues naturelles servant d'inoculum de base avec l'inoculum artificiel contenant les germes indispensables à l'hydrolyse. Dans un tel cas, il faut aussi s'interroger sur les aspects relatifs à l'implantation et la propagation de l'inoculum dopant au sein d'une population naturelle, et le cas échéant trouver les astuces nécessaires pour favoriser ces opérations.

La possibilité d'immobiliser avec succès une culture mixte définie a été démontrée dans le cadre de cette thèse (Jones et al., 1984). L'immobilisation d'une culture mixte dans les conditions décrites par Jones et al. (1984), pourrait permettre l'étude des

conséquences d'un rapprochement spatial des bactéries OHPA et méthanogènes sur la cinétique d'utilisation des acides gras volatils, et permettre ainsi d'apprécier expérimentalement et de manière contrôlée les relations existantes au sein des boues granulaires des réacteurs UASB. Les phénomènes de diffusion interespèce d'hydrogène entre les bactéries OHPA et méthanogènes mis en causes par Boone et al. (1989) dans le cas de suspensions microbiennes dispersées, doivent être reconsidérés dans le cas de cultures immobilisées. En effet les calculs de Boone et al. (1989) établis pour une concentration de méthanogènes en suspension dispersée de 10^7 /ml, et une distance intermicrobienne supérieure à $10\ \mu\text{m}$, distance à partir de laquelle selon ces auteurs la concentration d'hydrogène est celle de la phase liquide, s'avèrent inutiles et probablement faux pour des distances intermicrobiennes inférieures à $10\ \mu\text{m}$. Par ailleurs, dans le cadre de suspensions dispersées les données de Schink et Thauer (1988) sont plus réalistes, car ils utilisent comme variables une distance intermicrobienne de $8\ \mu\text{m}$ pour une suspension de 10^9 bactéries/ml, ce qui est plus en relation avec les mesures de concentrations microbiennes généralement reportées. D'emblée il apparaît que les calculs de Boone et al. (1989) doivent-être révisés et réajustés en fonction de conditions mieux choisies, mais quand on examine le cas des agrégats bactériens pour une distance intermicrobienne estimée à $0,08\ \mu\text{m}$ le flux d'hydrogène augmente de 100 fois (Schink et Thauer, 1988), ce qui remet en question les calculs de Boone et al. !

Ces considérations théoriques sont développées non seulement pour mettre en évidence les limites de la théorie de Boone et al. (1989), mais aussi pour insister sur le fait que l'immobilisation de cultures mixtes définies devrait être une option à envisager pour la préparation d'inocula artificiels, quand des échanges interespèce d'hydrogène sont prévus. Etant donné le caractère non proliférant d'un tel inoculum, il faut veiller à ce que les concentrations en cellules immobilisées soient importantes. Par contre quand il n'y a pas de transfert interespèce d'hydrogène mis en jeu, il vaut peut-être mieux songer à un conditionnement de l'inoculum artificiel qui permette la libération des bactéries dans le milieu récepteur, soit par dissolution, soit par hydrolyse de la matrice afin de permettre à ces dernières de se multiplier. Dans ce dernier cas il est peut-être souhaitable d'inclure avec l'inoculum, un substrat d'accompagnement ou un co-métabolite permettant aux bactéries d'initier leur croissance dans les meilleures conditions.

Enfin, il convient de signaler que le choix de la bactérie hydrolytique ne doit pas se faire qu'en fonction de sa seule capacité hydrolytique. Quand pour un même substrat diverses espèces sont disponibles, il est recommandable d'apporter une attention particulière aux produits d'hydrolyse, et d'éviter autant que possible l'emploi de bactéries produisant de grandes quantités de formate. Non pas en raison d'éventuels problèmes d'inhibition, mais surtout à cause du mauvais rendement en méthane auquel on peut s'attendre de la conversion du formate. En effet, pour quatre moles de formate nous n'aurons qu'une mole de méthane formée et trois de gaz carbonique, ce qui est illustré par la culture mixte

Cellulomonas-M. formicicum décrite par Guyot (1986). On améliorera donc la production de méthane en évitant la production intermédiaire de formate.

4. Conclusion générale.

Le choix d'une bactérie fermentaire pour élaborer une culture mixte définie efficace, ne devra pas se faire que sur la base de ses potentialités hydrolytiques, il faudra tenir compte de la nature des produits formés en calculant le pourcentage de conversion possible du carbone en méthane.

En ce qui concerne le choix d'une bactérie acétogène, les bactéries sulfato-réductrices du groupe I sont de bonnes candidates quand il s'agit de transformer du lactate ou de l'éthanol. Mais pour les acides gras volatils il faudra se contenter d'une bactérie OHPA, malgré leurs très faibles taux de génération. L'utilisation d'une BSR du groupe II obligerait à utiliser du sulfate. La production et l'accumulation de sulfures induiraient une inhibition de la méthanogénèse, d'où la nécessité de précipiter les sulfures sous forme de sulfures ferreux. Ce qui peut représenter un avantage, car la production de sulfures à partir des sulfates permet d'éviter l'addition préalable au milieu de culture, d'un réducteur comme le sulfure de sodium.

La possibilité d'immobiliser les cultures mixtes définies offre de plus amples perspectives d'utilisation. Mais étant donné les coûts prévisibles d'un tel inoculum, cette application ne pourrait être envisageable que dans un cas extrême, par exemple la biodégradation d'un polluant de structure aromatique résistant aux procédés et souches classiques. De surcroît, l'immobilisation de cultures mixtes définies peut offrir un moyen d'investigation des relations inter-microbiennes se produisant au sein des boues granulaires ou de biofilms, —car l'étude au laboratoire, en milieu dilué avec des suspensions microbiennes libres, ne permet pas d'aborder les phénomènes relatifs aux problèmes de limitation de transfert de masse, et de confinement des souches bactériennes. De ce point de vue, l'étude réalisée avec des boues granulaires est particulièrement éloquente, car elle met bien en évidence les problèmes de diffusion liés à ce genre d'inoculum.

L'utilisation de cultures mixtes définies a permis, lors de cette étude, de mettre en évidence la possibilité d'établir un transfert interspèce d'hydrogène entre E. coli et des bactéries méthanogènes, avec pour incidence une meilleure production intermédiaire d'acétate. Il a aussi été démontré que les BSR pouvaient utiliser le formate sur la base d'un transfert interspèce d'hydrogène, ce qui vient s'ajouter aux exemples cités dans la partie bibliographique de cette thèse. Par ailleurs, cette relation syntrophique est un argument supplémentaire en faveur de la théorie de Odom et Peck (1984) du recyclage de l'hydrogène, mais ne va pas dans le sens de la théorie de Thiele et Zeikus (1988) au sujet du transfert interspèce de formate.

La découverte de l'inhibition de l'acétoclastie par le formate ajoute un élément nouveau à la compréhension de la régulation de la digestion anaérobie. Le rôle du formate peut être rapproché de celui de l'hydrogène: les deux composés ont une action négative sur les bactéries du genre Methanosarcina, mais n'ont pas d'effet sur celles du genre Methanosaeta (qui possèdent une formate-déshydrogénase). La

définition future d'un index caractérisant le rapport Methanosarcina/Methanosaeta, permettrait d'inclure un élément supplémentaire dans la modélisation de la digestion anaérobie. La découverte de l'inhibition de l'acétoclastie par le formate, accentue le rôle joué par les bactéries méthanogènes hydrogénophiles utilisatrices de formate. Il est en effet frappant de constater que la plupart des méthanogènes hydrogénophiles non-acétoclastes sont utilisatrices de formate, et qu'aucune bactérie acétoclaste ne l'est. Les méthanogènes hydrogénophiles utilisatrices de formate permettraient non seulement de maintenir une faible pression partielle en hydrogène, mais aussi d'éviter une accumulation de formate, et joueraient ainsi le rôle de protectrices de la réaction acétoclastique contre une éventuelle destabilisation par l'hydrogène et le formate.

Finalement, l'évolution des boues dans les réacteurs anaérobies est un sujet qui, de manière très surprenante, n'a pas fait l'objet d'un intérêt soutenu de la part des scientifiques. Il serait intéressant pour le futur, d'étudier plus en détail les aspects relatifs à la physiologie des méthanogènes, et en particulier ceux concernant les possibilités de découplage énergétique, car la faible production de boues dans les réacteurs anaérobies peut s'expliquer, non seulement par le faible taux de croissance des bactéries anaérobies, mais aussi par l'existence d'un découplage entre la croissance et le métabolisme énergétique de ces bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

Ahring B.K. and Westermann P. (1987) Kinetics of butyrate, acetate, and hydrogen metabolism in a thermophilic, anaerobic, butyrate-degrading triculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 434-439.

Andreesen JR, Gottschalk G., and Schlegel H.G. (1970) Clostridium formicoaceticum nov. spec. Isolation, description and distinction from C. aceticum and C. thermoaceticum. *Arch. Microbiol.* 72: 154-174.

APHA (1980). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th edition.

Arias A. and Noyola A. (1988) Tratamiento de un agua residual urbana mediante el reactor anaerobio de lecho de lodos (UASB). San Luis Potosí, México. In "Avances en ingeniería química 1987" p. 477-483. Leyva R., Medellín F. and Navarro J. (ed.).

Attal, Ehlinger F., Audie J.M., and Faup G.M. pH inhibition mechanisms of acetogenic, acetoclastic and hydrogenophilic populations. *Anaerobic Digestion 1988. Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, Bologna, Italy.* pp.71-78. E. R. Hall and P. N. Hobson (ed.). Pergamon Press.

Bachmann A., Beard V.L., and McCarty P.L. (1985) Performance characteristics of the anaerobic baffled reactor. *Water Res.* 19, 99-106.

Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R., and Wolfe R.S. (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43: 260-296.

Balch W.E., Schoberth S., Tanner R.S., and Wolfe R.S. (1977) Acetobacterium, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 355-361.

Balch W.E. and Wolfe R.S. (1976) New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-COM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 781- 791.

Baresi W.E., Mah R.A., Ward D.M., and Kaplan I.R. (1978) Methanogenesis from acetate: enrichment studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:186-197.

Battersby N.S. and Wilson V. (1989) Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 433-439.

Bauchop T. and Mountfort D.O. (1981) Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1103-1110.

Beatty P.S. and McInerney (1987) Growth of Syntrophomonas wolfei in pure culture on crotonate. Arch. Microbiol. 147: 389- 393.

Belay N., Sparling R., and Daniels L. (1986) Relationship of formate to growth and methanogenesis by Methanococcus thermolithotrophicus. Appl. Environ. Microbiol. 52, 1080-1085.

Bletcher K., Zellner G., and Winter J. (1989) Growth of methanogens on cyclopentanol/CO₂ and specificity of alcohol dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. 59: 307-312.

Bergmeyer H.U. and Klotzsch H. (1965) Estimation of substrates, p. 99-102. In H.U. Bergmeyer (ed.). Methods of enzymatic analysis. Academic Press, Inc. New-York.

Bharati P.A.L., Baulaigue R., and Matheron R. (1982) Degradation of cellulose by mixed cultures of fermentative bacteria and anaerobic sulfur bacteria. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. C3: 466-474.

Boone D.R. (1982) Terminal reactions in the anaerobic digestion of animal waste. Appl. Environ. Microbiol. 43: 57-64.

Boone D.R. and Bryant M.P. (1980) Propionate-degrading bacterium, Syntrophobacter wolinii sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 40: 626-632.

Boone D.R., Johnson R.L., and Lin Y. (1989) Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ or formate uptake. Appl. Environ. Microbiol.-55: 1735-1741.

Braun M. and Gottschalk G. (1982) Acetobacterium wieringae sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3: 368-376.

Bryant M.P., Campbell L.L., Reddy C.A., and Crabill R. (1977) Growth of Desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1162-1169.

Bryant M.P., Tzeng S.F., Robinson I.M., and Joyner A.E. (1971) Nutrient requirements of methanogenic bacteria. Adv. Chem. Ser. 105: 23-40.

Bryant M.P., Wolin E.A., Wolin M.J., and Wolfe R.S. (1967) Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. Arch. Microbiol. 59: 20-31.

Chen M. and 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.

Chung K.T. (1976) Inhibitory effects of H₂ on growth of Clostridium cellobioparum. Appl. Environ. Microbiol. 31: 342- 348.

Cord-Ruwisch R., Ollivier B., and Garcia J.L. (1986) Fructose degradation by Desulfovibrio sp. in pure culture and in coculture with Methanospirillum hungatei. *Current Microbiol.* 12: 285-289.

Dietrich G., Weiss N., and Winter J. (1988) Acetothermus paucivorans gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic bacterium from sewage sludge, fermenting hexoses to acetate, CO₂, and H₂. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 174-179.

Dolfing, J. (1985) Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrate concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 77-81.

Dolfing, J., Griffioen A., van Neerven A.R.W., and Zevenhuizen L.P.T.M. (1985) Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.* 31: 744-750.

Dubourguier H.C., Archer D.B., Albagnac G., and Prensier G. (1988) Structure and metabolism of methanogenic microbial conglomerates. *Proceedings of the 5th International Symposium on anaerobic digestion*. Bologna, Italy. pp. 13-23. In E.R. Hall and P.N. Hobson (ed.). Pergamon Press.

Dubourguier H.C., Prensier G., and Albagnac G. (1987) Structure and microbial activities of granular anaerobic sludge. Proceeding of the GASMAT-workshop, Lunteren, Netherlands. pp. 18-33.

Du Toit P.J., Olivier S.P., and van Biljon P.L. (1984) Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and aminoacid composition. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1071-1078.

Eichler B. and Schink B. (1984) Oxidation of primary aliphatic alcohols by Acetobacterium carbinolicum sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 140: 147-152.

Fardeau M.L. and Belaich J.P. (1986) Energetics of the growth of "Methanococcus thermolithotrophicus". *Arch. Microbiol.* 144: 381-385.

Fergusson, T.J. and Mah, R.A. (1983) Effect of H₂-CO₂ on methanogenesis from acetate or methanol in Methanosarcina spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 348-355.

Fontaine F.E., Peterson W.H., McCoy E., Johnson M.J., and Ritter G.J. (1942) A new type of glucose fermentation by Clostridium thermoaceticum, n. sp. *J. Bacteriol.* 43: 701-715.

Genthner B.R.S. and Bryant M.P. (1982) Growth of Eubacterium limosum with carbon monoxide as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 70-74.

Genthner B.R.S. and Bryant M.P. (1987) Additional characteristics of one-carbon-compound utilization by Eubacterium limosum and Acetobacterium woodii. Appl. Environ. Microbiol. 53: 471-476.

Gianfreda P., Parascandolo P., and Scardi V. (1980) A new method of whole microbial cell immobilization. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11: 6-7.

Gorris L.G.M., de Kok T.M., Kroon B.M., van der Drift C., and Vogels G.D. (1988) Relationship between methanogenic cofactor content and maximum specific methanogenic activity of anaerobic sludges. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1126-1130.

Gottschalk G. (1979) Bacterial fermentations. p.195 In M.P. Starr (ed.). Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New-York.

Greening R.C. and Leedle J.A.Z. (1989) Enrichment and isolation of Acetitomaculum ruminis, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. Arch. Microbiol. 151: 399-406.

Guiot S.R. and van der Berg L. (1984) Performance and biomass retention of an upflow anaerobic reactor combining a sludge blanket and a filter. Biotechnol. Lett. 6: 161-164.

Guyot J.-P., Macarie H., and Noyola A. (1990) Anaerobic digestion of a petrochemical wastewater using the UASB process. Appl. Biochem. Biotechnol. (sous-presse).

Hadzija O. (1974) A simple method for the quantitative determination of muramic acid. Anal. Biochem. 60: 512-517.

Harper S.R. and Pohland F.G. (1985) Biotechnology report: Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. Biotechnol. Bioeng. 28: 585- 602.

Henze M. and Harremoes P. (1983) Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - A literature review. Water Sci. Technol. 15, 1-101.

Heyes R.H. and Hall R.J. (1983) Kinetics of two sub-groups of propionate-using organisms in anaerobic digestion. Appl. Environ. Microbiol. 46: 710-715.

Hobson P.N. (1982) The microbiology of the rumen and anaerobic digesters. Memorias del Simposio Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación. UAM-I/ICAITI, México.

Horowitz A., Shelton D.R., Cornell C.P., and Tiedje J.M. (1982) Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge. Dev. Ind. Microbiol. 25: 435-444.

Hulshoff Pol L. and Lettinga G. (1986) New technologies for anaerobic waste water treatment, in Anaerobic Treatment in Tropical countries, Post-Conference International Seminar, IAWPRC Sao Paulo, 30-46.

Hungate, R.E. (1969). A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds. vol.3B, pp. 117-132, Academic Press Inc. New-York.

Huser, B.A., Wuhrmann K., and Zehnder A.J.B. (1982) Methanothrix soehngeni gen. nov. sp., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch. Microbiol. 132: 1-9.

Iannotti E.L., Kalkkewitz D., Wolin M.J., and Bryant M.P. (1973) Glucose fermentation products of Ruminococcus albus grown in continuous culture with Vibrio succinogenes: changes caused by interspecies transfer of H₂. J. Bacteriol. 114: 1231-1240.

Isa Z., Grusenmeyer S., and Verstraete W. (1986) Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. Appl. Environ. Microbiol. 51: 572-579.

Jeris J.S and McCarty P.L. (1965) The biochemistry of methane fermentation using 14C-tracers. J. Water Pollut. Control Fed. 37: 178-192.

Jewell W.J., Switzenbaum M.S., and Morris J.W. (1981) Municipal wastewater treatment with the anaerobic attached microbial film expanded bed process. J. Wat. Pollut. Control Fed. 53:482-490.

Jimenez B. Noyola A., and Capdeville B. (1988) Selected dyes for residence time distribution evaluation in bioreactors. Biotechnology Techniques 2: 77-82.

Jones W.J., Guyot J.P., and Wolfe R.S. (1984) Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1-6.

Karube I., Kuriyama S., Matsunaga T., and Suzuki S. (1980) Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria. Biotechnol. Bioeng. 22: 847-857.

Kaspar H.F. and Wuhrmann (1978) Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. Appl. Environ. Microbiol. 36: 1-7.

Kaspar H.F., Holland A.J., and Mountfort D.O. (1987) Simultaneous butyrate oxydation by Syntrophomonas wolfei and catalytic olefin reduction in absence of interspecies hydrogen transfer. Arch. Microbiol. 147: 334-339.

Kennedy K.J. and Droste R.L. (1986) Anaerobic fixed-film reactor treating carbohydrate wastewater. Water Res. 20, 685- 695.

Khan A.W. (1980) Degradation of cellulose to methane by a coculture of Acetovibrio cellulolyticus and Methanosarcina barkeri. FEMS Microbiol. Lett. 9: 233-235.

Khan A.W. and Trottier T.M. (1978) Effect of sulfur- containing compounds on anaerobic degradation of cellulose to methane by mixed cultures obtained from sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol. 35: 1027-1034.

Khan A.W., Trottier T.M., Patel G.B., and Martin S.M. (1979) Nutrient requirement for the degradation of cellulose to methane by a mixed population of anaerobes. J. of Gen. Microbiol. 112, 365-372.

Kierstan M. and Bucke C. (1977) The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. Biotechnol. Bioeng. 19: 387-397.

Kristjansson J.K., Schonheit P., and Thauer R.K. (1982) Different Ks values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. Arch. Microbiol. 131: 278-282.

Krumholz L. R., and Bryant M. P. (1986) Syntrophococcus sucromutans sp. nov. gen. nov. uses carbohydrates as electron acceptor systems. Arch. Microbiol. 143: 313-318.

Lang E. and Lang H. (1972) Spezifische farbreaktion zum direkten nachweis der ameisensaure. Z. Anal. Chem. 260: 8-10.

Lapage S.P., Sneath P.H.A., Lessel E.F., Skerman V.B.D., Seelilger H.P.R., and Clark W.A. (ed.) International code of nomenclature of bacteria. 1975 Revision American Society for Microbiology, Washington D.C.

Latham M.J. and Legakis (1976) Cultural factors influencing the utilization or production of acetate by Butyrivibrio fibrisolvans. J. Gen. Microbiol. 94: 380-388.

Latham M.J. and Wolin M.J. (1977) Fermentation of cellulose by Ruminococcus flavefaciens in the presence and absence of Methanobacterium ruminantium. Appl. Environ. Microbiol. 34: 297- 301.

Laube V.M. and Martin S.M. (1981) Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by triculture of Acetovibrio cellulolyticus, Desulfovibrio sp., and Methanosarcina barkeri. Appl. Environ. Microbiol. 42: 413-420.

Lawrence A.L. and McCarty P.L. (1969) Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment. J. Water Poll. Control Fed. 41, R1-R7.

Leigh J.A., Mayer F., and Wolfe R.S. (1981) Acetogenium kivui, a new thermophilic hydrogen-oxidizing acetogenic bacteria. Arch. Microbiol. 129: 275-280.

Le Ruyet P. (1984) Hydrolyse et fermentation des polysides végétaux par les bactéries anaérobies. Thèse de docteur-ingénieur en biologie et physiologie végétale. Université des sciences et techniques de Lille I.

Lettinga G., de Zeew W.J., Hulshoff Pol L.A., Hobma S.W., Grin P.C., Wiegant W.N., Van Velsen A.F.M., and Koster I.W. (1982) Anaerobic wastewater treatment using the UASB treatment process. Memorias del Simposio Avances en Digestión Anaerobia: Combustibles por Fermentación, UAM-I/ICAITI, México.

Lettinga G., Van Velsen A.F.M., Hobman S.W., de Zeeuw W., and Klapwijk A. (1980) Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechnol. Bioeng. 22, 699-734.

Levenspiel O. (1972) Chemical reaction engineering. 2nd edition, John Wiley and Sons, New-York, 578 pp.

Lin C.Y., Sato K., Noike T., and Matsumoto J. (1986) Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acids. Water Res. 20, 385-394.

Ljungdahl L.G. and Eriksson K.E. (1985) Ecology of microbial cellulose degradation. Advances in microbial ecology, vol.8. pp. 237-299. Marshall K.C. Plenum Publishing Corporation.

Lovley D.R., Dwyer D.F., and Klug M.J. (1982) Kinetics analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1373- 1379.

Lovley D.R. and J.G. Ferry (1985) Production and consumption of H₂ during growth of Methanosarcina spp. on acetate. Appl. Environ. Microbiol. 49: 247-249.

Maddox I.S., Dunnill P., and Lilly M.D. (1981) Use of immobilized cells of Rhizopus nigricans for the 11-hydroxylation of progesterone. Biotechnol. Bioeng. 23: 345-354.

Mah R.A. and Smith M.R. (1981) The methanogenic bacteria. The prokaryotes, vol. 1, pp. 948-977. Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., and Schlegel H.G. (eds.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Mah R.A. (1980) Isolation and characterization of Methanococcus mazei. Curr. Microbiol. 3: 321-326.

McCarty P.L. (1964) Anaerobic wastewater treatment fundamentals. Public Works. vol.95: No 9, 107-112; No 10, 123-126; No 11, 91-94; No 12, 95-99.

McInerney M.J. and Bryant M.P. (1981) Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of Methanosarcina barkeri and Desulfovibrio species and effect of H₂ on acetate degradation. Appl. Environ. Microbiol. 41: 346-354.

McInerney M.J. and Bryant M.P. (1981) Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis, p. 277-296. In S.S. Sofer and O.R. Zabrosky (ed.). Biomass conversion process for energy and fuels. Plenum publishing corporation.

McInerney M.J., Bryant M.P., Hespell R.B., and Costerton J.W. (1981) Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 1029-1039.

McInerney M.J., Roderick I.M., and Bryant M.P. (1981) Syntrophic association of a butyrate-degrading bacterium and Methanosarcina enriched from bovine rumen fluid. Appl. Environ. Microbiol. 41: 826-828.

Mejía G.M. and Magana A.H. (1986) Digestión anaeróbica de aguas residuales de granjas porcícolas, en "los límites del deterioro ambiental". Memorias del V Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, SMISAAC. 136-140.

Min C. and 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.

Mountfort D.O., Brulla W.J., Krumholz L.R., and Bryant M.P. (1984) Syntrophus buswelli gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 216-217.

Mucha H., Lingens F., and Trosch W. (1988) Conversion of propionate to acetate and methane by syntrophic consortia. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 581-586.

Mulder A. (1984) The effects of high sulfate concentrations on the methane fermentation of wastewater. Innovations in Biotechnology. pp. 133-145. Honwink E.H. and van der Meer (ed.). Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

Nagase M. and Matsuo T. (1982) Interactions between amino-acid-degrading bacteria in anaerobic digestion. Biotechnol. Bioeng. 24: 2227-2239.

Noyola A. (1986) La digestión anaerobia aplicada al tratamiento de aguas residuales a nivel individual y semicolectivo, en "los límites del deterioro ambiental". Memorias del V Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria Y Ambiental, SMISAAC. 131-135.

Noyola A., Capdeville B., and Roques H. (1988) Anaerobic treatment of domestic sewage with a rotating stationary fixed film reactor. Water Res. (in press).

Noyola A., J.P. Guyot, and O. Monroy. (1988) Proceedings of the 1st National Symposium on Environmental Engineering, Mexico City, Mexico. pp. 179-197. In Instituto de Ingeniería, UNAM (ed.).

Nozhevnikova A.N. and Chudina V.I. (1985) Morphology of the thermophilic acetatebacterium Methanothrix thermoacetophila sp. nov. Microbiology (Engl. Transl. Mikrobiologiya) 53: 618-624.

Nussbaum R. (1983) Petrole vert, raffineries et biotechnologies. Biofutur 11:33-42.

Odom J.M. and Peck H.P. (1984) Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy couplings in the sulfate-reducing bacteria Desulfovibrio. Ann. Rev. Microbiol. 38: 551-592.

Oleszkiewicz J.A., Marstaller T., and McCartney D.M. (1989) Effects of pH on sulfide toxicity to anaerobic process. Environ. Technol. Lett. 10: 815-822.

Ollivier B., Cord-Ruwish R., Lombardo A., and Garcia J.L. (1985) Isolation and characterization of Sporomusa acidovorans sp. nov. a methylotrophic homoacetogenic bacterium. Arch. Microbiol. 142: 307-310.

Ollivier B., Cord-Ruwish R., Hatchikian E.C., and Garcia J.L. (1988) Characterization of Desulfovibrio fructovorans sp. nov. Arch. Microbiol. 149: 447-450.

Ollivier B., Lombardo A., and Garcia J.L. (1984) Isolation and characterization of a new thermophilic Methanosarcina strain (strain MP). Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 135 B: 187-198.

Ollivier B., Mah R.A., Ferguson T.J., Boone D.R., Garcia J.L., and Robinson R. (1985) Emendation of the genus Thermobacteroides: Thermobacteroides proteolyticus sp. nov., a proteolytic acetogen from a methanogenic enrichment. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 425-428.

Parkin G.F. and Speece R.E. (1983) Attached versus suspended growth anaerobic reactors: Response to toxic substances. Water Sc. Technol. 15, 261-289.

Parkin G.F., Speece R.E., Yang C.H.J., and Kocher W.M. (1983) Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. J. Water Poll. Control Fed. 55, 44-55.

Patel, G.B. (1984) Characterization and nutritional properties of Methanothrix concilii sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen. Can. J. Microbiol. 30: 1383-1396.

Patel, G.B. and Sprott G.D. (1990) Methanosaeta concilii gen. nov. "Methanothrix concilii" and Methanosaeta thermoacetophila nom. rev., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 79-82.

Peck Jr. H.D. (1984) Physiological diversity of the sulfate-reducing bacteria. Microbial Chemoautotrophy. Strohl W.R.S and Tuovinen O.H. (ed.) The Ohio State University Press, Columbus.

Pfennig N., Widdel F., and Truper H.G. (1981) The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. The Prokaryotes, chap. 74, pp. 926-940. Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., and Schlegel H.G. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Phelps T.J., Conrad R., and Zeikus J.G. (1985) Sulfate-dependent interspecies H₂ transfer between Methanosarcina barkeri and Desulfovibrio vulgaris during coculture metabolism of acetate or methanol. Appl. Environ. Microbiol. 50: 589-594.

Playne M.J. and Wallis A.F.A. (1982) Determination of pentose sugars in fermentation solutions by a simple gas chromatographic procedure. Biotechnol. Lett. 10: 679-684.

Poggi H. and Medina G. (1986) Estabilización de lodos en un proceso de alta tasa, en "los limites del deterioro ambiental". Memorias del V Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, SMISAAC. 71-74.

Rinzeme A. and Lettinga G. (1988) The effect of sulphide on the anaerobic degradation of propionate. Env. Technol. Lett. 9: 83-88.

Robinson J.A. and Characklis W.G. (1984) Simultaneous estimation of V_m , K_m , and the rate of endogenous substrate production (R) from substrate depletion data. Microb. Ecol. 10: 165-178.

Rouvière P.E. and Wolfe R.S. (1988) Novel biochemistry of methanogenesis. J. Biol. Chem. 263: 7913-7916.

Roy F., Samain E., Dubourguier H.C., and Albagnac G. (1986) Syntrophomonas sapovorans sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. Arch. Microbiol. 145: 142-147.

Sanchez Riera F., Cordoba P., and Sineritz F. (1985) Use of the UASB reactor for the anaerobic treatment of stillage from sugar cane molasses. Biotechnol. Bioeng. 27, 1710-1716.

Schauer, N.L., Brown, D.P., and Ferry, J.G. (1982) Kinetics of formate metabolism in Methanobacterium formicicum and Methanospirillum hungatei. Appl. Environ. Microbiol. 44, 549- 554.

Scheifinger C.C., Linhan B. and Wolin M.J. (1975) H₂ production by Selenomonas ruminantium in the absence and presence of methanogenic bacteria. Appl. Microbiol. 29: 480-483.

Scherer P., Kluge M., Klein J. and Sahm H. (1981) Immobilization of the methanogenic bacterium Methanosarcina barkeri. Biotechnol. Bioeng. 23: 1057-1065.

Scherer P. and Sahm (1981) Influence of sulphur containing compounds on the growth of methanosarcina barkeri in a defined medium. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12: 28-35.

Schink B. (1985) fermentation of acetylene by an obligate anaerobe Pelobacter acetylenicus sp. nov. Arch. Microbiol. 142: 295-301.

Schink B. and Thauer R.K. (1988) Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation. In Lettinga G., Zehnder A.J.B., Grotenhuis J.T.C. and Hulshoff Pol L.W. (ed.) Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. Proceedings of the GASMAT-workshop, Netherland 1987. Pudoc Wageningen (Publisher).

Schonheit P., Kristjansson J.K., and Thauer R.K. (1982) Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out- compete methanogens for acetate. Archiv. Microbiol. 132: 285- 288.

Schulze D., Menkhans M., Fiebig R., and Dellweg H. (1988) Anaerobic treatment of protein-containing waste waters: correlation between coenzyme F₄₂₀ and methane production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 506-510.

Ségura J. (1983) La fermentation methanique et l'épuration. Biofutur, février, 47-52.

Shelton D.R. and Tiedje J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Microbiol. 47: 850-857.

Sleat R. and Mah R.A. (1984) Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. Appl. Environ. Microbiol. 47: 884-885.

Sleat R., Mah, R.A. and Robinson R. (1985) Acetobacterium noterae gen. nov., sp. nov.: an anaerobic bacterium that forms acetate from H₂ and CO₂. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:10-15.

Smith P.H. and Hungate R.E. (1958) Isolation and characterization of Methanobacterium ruminantium n. sp. J. Bacteriol. 75: 713-718.

Smith M.R. and Mah R.A. (1966) Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. Appl. Microbiol. 14: 368- 371.

Smith, M.R. and R.A. Mah (1978) Growth and methanogenesis by Methanosarcina strain 227 on acetate and methanol. Appl. Environ. Microbiol. 36: 870-879.

Smith M.R. and Mah R.A. (1980) Acetate as sole carbon and energy source for growth of Methanosarcina strain 227. Appl. Environ. Microbiol. 39: 993-999.

Stams A.J.M, Kremer D.R., Nicolay K., Weenk G.H., and Hansen T.A. (1984) Pathway of propionate formation in Desulfobulbus propionicus. Arch. Microbiol. 139:167-173.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1976. 14th Edition, American Public Health Association. Washington, D.C.

Stieb M. and Schink B. (1984) A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, Ilyobacter polytropus, gen. nov. sp. nov., possessing various fermentation pathways. Arch. Microbiol. 140: 139-146.

Stieb M. and Schink B. (1985) Anaerobic oxidation of fatty acids by Clostridium bryantii sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. Arch. Microbiol. 140: 387-390.

Speece R.E. (1983) Biotechnology for anaerobic waste treatment. Environ. Sci. Technol. 17, 416A-427A.

Switzenbaum M.S. and Jewell W.J. (1980) Anaerobic attached- film expanded-bed reactor treatment. J. Water Poll. Control Fed. 52, 1953-1965.

Switzenbaum M.S., Sheenan K.S., and Hickey R.F. (1984) Anaerobic treatment of primary effluent. Environ. Technol. Lett. 5, 189-200.

Talt S.J. and Friedman A.A. (1980) Anaerobic rotating biological contactor for carbonaceous wastewaters. J. Water Poll. Control Fed. 52, 2257-2269.

Thauer R.K., Jungermann K., and Decker K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41: 100-181.

Thauer R. K., Möller-Zinkhan D., and spormann A.M. (1989) Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. Rev. Microbiol. 43: 43-67.

Thiele J.H. and Zeikus J.G. (1988) Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. Appl. Environ. Microbiol. 54: 20-29.

Thiele J.H., Chartrain M., and Zeikus J.G. (1988) Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 10-19.

Timell T.E. (1967) Recent progress in the chemistry of wood hemicellulose. *Wood Sci. Technol.* 1: 45-70.

Touzel J.P., Prensier G., Roustan J.L., Thomas I., Dubourguier H.C., and Albagnac G. (1988) Description of a new strain of Methanosarcina soehngenii and rejection of Methanothrix concilii as a synonym of Methanothrix soehngenii. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 30-36.

Traore A.S., Fardeau M.L., Hatchikian C.E., Le Gall J., and Belaich J.P. (1983) Energetics of growth of a defined mixed culture of Desulfovibrio vulgaris and Methanosarcina barkeri: interspecies hydrogen transfer in batch and continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1152-1156.

Valcke D. and Verstraete W. (1983) A practical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic sludges. *J. Water Poll. Control Fed.* 55, 1191-1195.

van den Berg L., Lamb K.A., Murray W.D., and Armstrong D. W. (1980) Effects of sulphate, iron and hydrogen on the microbiological conversion of acetic acid to methane. *J. Appl. Bacteriol.* 48:437-447.

van den Berg L. and Lentz C.P. (1979) Comparison between up- and down-flow anaerobic fixed film reactors of varying surface to volume ratio for the treatment of bean blanching waste, in "Proceeding of the 34th Purdue Industrial Waste Conferences", 319-325.

van den Berg L., Lentz C.P., and Armstrong D.W. (1980) Anaerobic waste treatment efficiency comparisons between fixed film reactors, contact digesters and fully mixed, continuously fed digesters, in "Proceeding of the 35th Purdue Industrial Waste Conferences", 788-793.

Vieira S.M. and Souza M.E. (1986) Developpement of technology for the use of the UASB reactor in domestic sewage treatment, in "Anaerobic treatment in tropical countries" post- conference international seminar, IAWPRC Sao Paulo, 106-119.

Wada M., Kato J. and Chibata I. (1981) Continuous production of ethanol in high concentration using immobilized grwing yeast cells. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 67- 71.

Wagener S. and Schink B. (1987) Anaerobic degradation of nonionic and anionic surfactants in enrichment cultures and fixedd-bed reactors. *Wat. Res.* 21: 615-622.

Weimer P.J. and Zeikus J.G. (1977) Fermentation of cellulose and cellobiose by Clostridium thermocellum in the absence and the presence of Methanobacterium thermoautotrophicum. Appl. Environ. Microbiol. 33: 289-297.

Whitmore T.N., Lloyd D., Jones G. and Williams T.N. (1987) Hydrogen-dependent control of the continuous anaerobic digestion process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 383-388.

Widdel F. (1986) Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1056-1062.

Widdel F. (1987) Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder A.J.B. (ed.). Environmental Microbiology of anaerobes, chapter 10. John Wiley, New-York, London.

Wieringa K.T. (1940) The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. Antonie v. Leeuwenhoek 6: 251-262.

Winter J.U. (1980) Glucose fermentation to methane and CO₂ by defined mixed cultures. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. C 1: 293-306.

Winter J.U. and Wolfe R.S. (1979) Complete degradation of carbohydrate to carbon dioxide and methane by syntrophic cultures of Acetobacterium woodii and Methanosarcina barkeri. Arch. Microbiol. 121: 97-102.

Wolfe R.S. and Higgins I.J. (1979) Microbiol. biochemistry of methane-a study in contrasts, p. 268-295. In J.R. Quayle (ed.), Int. Rev. Biochem. vol. 21. University Park Press, Baltimore.

Wolin M.J. (1974) Metabolic interactions among intestinal microorganisms. Am. J. Clin. Nutr. 27: 1320-1328.

Wolin E.A., Wolin M.J., and Wolfe R.S. (1963) Formation of methane by bacterial extracts. J. Biol. Chem. 238: 2882-2886.

Wu W., Hu J., Zhao Y., Khang H. and Gu G. (1987) Cultivation of anaerobic granular sludge in UASB reactors with aerobic activated sludge as seed. Water Res. 21, 789-799.

Young M., Betancourt N., Diego M.E. and Mercado G. (1987) Evaluación de un filtro anaerobio para el tratamiento de las aguas residuales de los beneficios de café, en "Memorias del Congreso Nacional", AMCCAA, B.2.6.

Young J.C. and McCarty P.L. (1969) The anaerobic filter for waste treatment. J. Water Poll. Control Fed. 41, 160-173.

Zehnder A.J.B. (1978) Ecology of methane formation. *Water Poll. Microbiol.* vol. 2, pp. 349-376. Mitchell R. (ed.). John Wiley and son.

Zehnder, A.J.B., Huser, B.A., Brock, T.D., and Wuhrmann, K. (1980) Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.* 124, 1- 11.

Zeikus J.G. (1977) The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41: 514-541.

Zhao H., Yang D., Woese C. R., and Bryant M. P. (1990) Assigment of Clostridium bryantii to Syntrophospora bryantii gen. nov., comb. nov. on the basis of a 16s rRNA sequence analysis of its crotonate-grown pure culture. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 40-44.

Zinder S.H. Arguish T., and Lobo A.L. (1987) Isolation and characterization of a thermophilic acrtotrophic strain of Methanothrix. *Arch. Microbiol.* 146: 315-322.

Zinder S.H. and Koch M. (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate; acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* 138: 263-272.

Zinder S.H. and Mah R.A. (1979) Isolation and characterization of a thermophilic strain of Methanosarcina unable to use H₂-CO₂ for methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 996-1008.

Articles de l'auteur présentés dans le cadre de cette thèse:
(par ordre d'apparition)

Jones W.J., Guyot J.P., and Wolfe R.S. (1986) Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1-6.

Guyot J.P., Traore I. and Garcia J.L. (1985) Methane production from propionate by methanogenic mixed culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 329-332.

Guyot J.P. (1986) Role of formate in methanogenesis from xylan by Cellulomonas sp. associated with methanogens and Desulfovibrio vulgaris: inhibition of the acetoclastic reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 149-153.

Guyot, J.P., and Brauman, A. (1986). Methane production from formate by syntrophic association of Methanobacterium bryantii and Desulfovibrio vulgaris JJ. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1436-1437.

Noyola A., Guyot J.P., and Monroy O. (1988) Experimental comparison of two types of advanced anaerobic reactors. Proceedings of the First National Symposium on Environmental Engineering. Mexico D.F., Mexico. UNAM-I.I. (ed.).

Guyot J.P. and Ramirez F. (1989). Inhibition of the anaerobic acetate degradation by formate. *Biotechnol. Lett.* 11: 365-368.

Guyot J.P., Noyola A., and Monroy O. (1990) Evolution of microbial activities and populations in granular sludge from an UASB reactor. *Biotechnol. Lett.* 12: 155-160.

RESUME

L'emploi de cultures mixtes définies ou naturelles a permis d'étudier quelques interactions microbiennes se déroulant dans les digesteurs anaérobies. Il a été démontré qu'il était possible d'immobiliser avec succès des cultures mixtes définies anaérobies en utilisant un gel d'agar. Grâce à l'emploi de cultures mixtes définies, il a été démontré la possibilité de transfert interspèces d'hydrogène entre E. coli et des méthanogènes et entre Desulfovibrio vulgaris et Methanobacterium bryantii à partir du formiate. Lors de l'étude de la méthanisation du xylane par une culture mixte définie, l'inhibition de la méthanogénèse à partir de l'acétate par le formiate a été démontrée, ces résultats ont été confirmés par l'emploi de boues granulaires provenant d'un réacteur UASB. Avec des boues granulaires issues du même réacteur, des études visant à déterminer quantitativement leur composition microbiologique et les activités de dégradation d'acides gras volatils (acétate et propionate) ont été réalisées. Une discussion globale, basée sur ces résultats permet de mettre en valeur le rôle écologique important des méthanogènes hydrogénophiles utilisatrices de formiate, dans les phénomènes de régulation de la digestion anaérobie, et une analyse critique du concept de transfert interspèce de formiate est exposée.

MOTS-CLES: Digestion anaérobie, Méthanogènes, Réacteurs UASB, Sulfato-réductrices, Transfert-interespèce d'hydrogène, Inhibition, Cultures mixtes, Acides gras volatils.