

# Écologie microbienne de la digestion anaérobie

## Techniques de numération et d'isolement (1)

Jean-Louis GARCIA, Jean-Pierre GUYOT  
Bernard OLLIVIER, Monia TRAD, Claude PAYCHENG\*

---

### Résumé

*L'étude de la méthanisation de résidus cellulosiques solides d'industrie agro-alimentaire (cossettes de betterave sucrière épuisées), a nécessité la mise au point ou l'élaboration de techniques appropriées pour la numération des principaux groupes bactériens impliqués dans le processus de digestion anaérobie. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des milieux contenant 50 % de jus de digesteur.*

*Divers inoculum ont été analysés. Pour le plus performant d'entre eux provenant d'une digestion de résidus de tannerie, la population totale, estimée au microscope en épifluorescence, est de l'ordre de  $10^{10}$  bactéries/ml. La microflore dominante est acidifiante et anaérobie stricte et les souches isolées ont été essentiellement reconnues appartenir aux genres Bacillus et Clostridium.*

**Mots-clés :** Digestion anaérobie — Numérations — Isolements — Bactéries acidifiantes.

---

### Abstract

**MICROBIAL ECOLOGY OF ANAEROBIC DIGESTION. TECHNIQUES OF NUMERATION AND ISOLATION.** *During the study of methane production from cellulosic solid by-products of agroalimentary industry such as leached sugar-beet cossettes, various technics and culture media have been adapted or performed for numeration of main bacterial groups implicated in the anaerobic digestion process. Enumeration media were significantly improved by addition (1/1, v/v) of the supernatant liquid from the digesters. Various inocula were analysed. The more efficient with respect to methane production was from a plant with tannery by-products; this inoculum contained about  $10^{10}$  bacteria/ml counted by fluorescence microscopy. The dominant microflora was acidogenic and strictly anaerobic; characterization of acidogenic strains was performed. In the digesters inoculated with the tannery by-products, species of the Bacillus and Clostridium genus were principally identified.*

**Key words :** Anaerobic digestion — Numerations — Isolations — Acidogenic bacteria.

### Introduction

Les données sur l'écologie microbienne des digesteurs anaérobies sont encore peu nombreuses en ce qui concerne la numération des microflores spécifiques et la nature, l'évolution et les interrelations des populations microbiennes impliquées (MAH et SUSSMAN, 1967; SIEBERT *et coll.*, 1968; HOBSON et SHAW, 1973; SPOELSTRA, 1978; IANNOTTI *et coll.*, 1978; TOUZEL *et coll.*, 1981).

Il est certain qu'une meilleure connaissance de ces microflores et des phénomènes intimes de la

digestion anaérobie permettrait de contrôler la fermentation. Dans les années à venir, on peut raisonnablement espérer pouvoir utiliser dans les digesteurs des associations mixtes de bactéries performantes qui serviront d'inoculum pour un substrat déterminé.

Pour étudier le processus de méthanisation des cossettes de betterave épuisées, nous avons effectué la numération des différents groupes bactériens dans des inoculum de diverses origines et dans les cultures obtenues lors de la digestion anaérobie des cossettes.

---

(1) Cette étude a été réalisée sur contrat COMES n° 80.75.303.

\* Laboratoire de Microbiologie O.R.S.T.O.M., Centre de Recherches IRCHA, B.P. n° 1, 91710 Vert-le-Petit, France.

Des souches bactériennes dominantes ont été isolées et sommairement caractérisées en vue de l'expérimentation de cultures mixtes.

## Matériel et méthodes

### 1. TECHNIQUES DE NUMÉRATION

L'échantillon à analyser est prélevé sous  $N_2$ , puis introduit dans une boîte à gants anaérobie comportant un sas d'entrée (La Calhène, Bezons). Il est ensuite homogénéisé dans un Potter et des suspensions-dilutions sont préparées à l'aide de seringues stériles de 1 ml dans des tubes de Hungate contenant de l'eau réduite (solution de  $K_2HPO_4$  à 6 g/l : 50 ml; solution minérale de BALCH *et coll.* (1979) : 50 ml;  $NaHCO_3$  : 5 g; solution de résazurine à 0,2 % : 0,2 ml; eau distillée : 900 ml) puis on ensemence différents milieux de numération. En fin d'opération, l'échantillon homogénéisé ainsi que les tubes de suspensions-dilutions sont sortis de la boîte à gants pour la réalisation d'autres numérations (fig. 1).

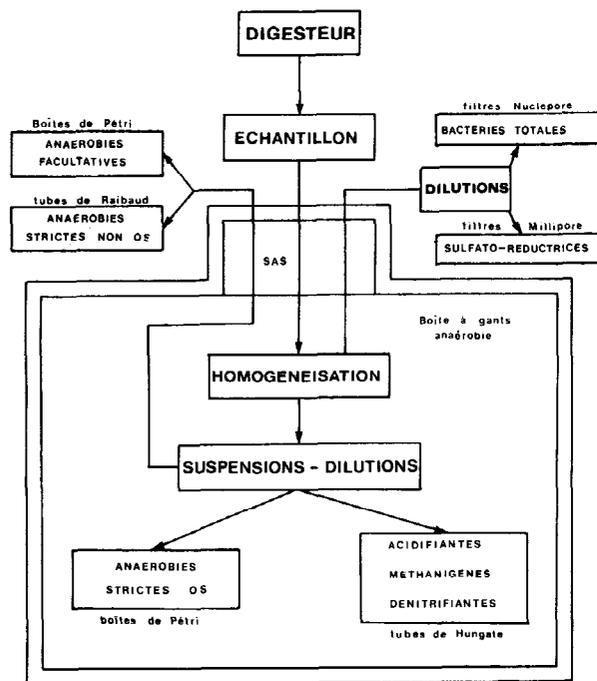


Fig. 1. — Schéma de réalisation des diverses numérations bactériennes.

La population totale est estimée directement au microscope en épifluorescence.

Deux types de numérations sont réalisés :

— une estimation des populations de bactéries anaérobies par mise en évidence de métabolites produits et calcul du nombre le plus probable (MPN). C'est le cas des dénitrifiantes, des méthanigènes et des acidifiantes pour lesquels les métabolites produits sont recherchés par chromatographie en phase gazeuse ( $N_2O$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$  et acides gras volatils). Les bactéries sulfato-réductrices sont estimées par la méthode des filtres Millipore (MOURARET 1970, 1971),

— un dénombrement des bactéries en fonction de leur sensibilité à l'oxygène :

— bactéries anaérobies facultatives et aérobies ensemencées sur boîtes de Pétri gélosées et incubées en présence d'air ;

— bactéries anaérobies non oxygène-sensibles ensemencées en présence d'air en tubes-vanille gélosés (tubes de Raibaud) ;

— bactéries anaérobies strictes ensemencées en l'absence d'air sur boîte de Pétri gélosées puis incubées dans des containers anaérobies.

Les incubations ont lieu à 35 °C ou à 55 °C selon que l'on recherche les bactéries mésophiles ou thermophiles.

#### 1.1. Numération de la totalité des bactéries par comptage direct en épifluorescence

Cette numération s'effectue en dehors de l'enceinte anaérobie. Une dilution, généralement à  $10^{-4}$ , est effectuée pour obtenir au maximum 200 bactéries par champ. La technique utilisée est une coloration à l'acridine orange (10 mg dans 100 ml de tampon phosphate 6,6 mM, pH 6,7) après filtration de 5 ml de la dilution choisie sur un filtre Nucléopore en Polycarbonate (taille des pores : 0,2  $\mu m$  - diamètre : 25 mm) préalablement coloré au noir Soudan B (10 mg dans 75 ml d'alcool absolu et 75 ml d'eau distillée) (HOBBIE *et coll.*, 1977). Ces filtres présentent l'avantage d'avoir une surface plane et des pores de taille régulière. On les rince avec de l'eau distillée stérilisée par filtration puis on les sèche avant de monter un fragment entre lame et lamelle.

Le comptage se fait au microscope à épifluorescence, à l'aide d'un micromètre-oculaire G 100 à réseau de 100 carrés de 100  $\mu m$  de côté. Dix champs sont comptés; on en effectue la moyenne et on ramène le résultat à 1 ml d'échantillon non dilué en multipliant par  $4,18 \cdot 10^7$  (pour une dilution  $10^{-4}$  et un volume filtré de 5 ml).

#### 1.2. Numération des bactéries méthanigènes

On utilise le milieu de BALCH *et coll.* (1979) préparé et réparti suivant la technique classique de Hungate avec notamment l'addition de 0,5 g/l de

L-cystéine-HCl, H<sub>2</sub>O et de Na<sub>2</sub>S, 9H<sub>2</sub>O. Les tubes ensemencés dans la boîte à gants (5 tubes par dilution, 5 ml de milieu par tube) sont amenés sur une rampe de gazage à 8 postes où l'on effectue le vide puis un gazage avec un mélange renfermant 80 % d'H<sub>2</sub> et 20 % de CO<sub>2</sub>. La pression dans les tubes est ajustée à 2 bars puis on met en incubation pendant 3 semaines.

L'atmosphère des tubes présentant une croissance est alors analysée par chromatographie en phase gazeuse pour déceler la présence de CH<sub>4</sub>. On utilise un chromatographe à détection en ionisation de flamme (FID) dans les conditions suivantes :

*Colonne* : acier inox 1,5 m × 1/8" remplie de 10 % carbowax 20 M sur chromosorb Q 80-100 mesh.

*Températures* : colonne : température ambiante ; injecteur : 115° ; détecteur : 250°.

*Débils gaz* : N<sub>2</sub> (vecteur) : 25 ml/mn ; H<sub>2</sub> : 30 ml/mn ; air : 300 ml/mn.

Dans ces conditions, le temps d'éluion de CH<sub>4</sub> est de 16 s.

### 1.3. Numération des bactéries acidifiantes

Le milieu utilisé est celui de ZEIKUS *et coll.* (1980) auquel est ajouté 1‰ d'une solution de sélénite de sodium à 17,3 mg/l. Sa préparation est identique à celle du milieu pour méthanigènes mais on utilise un mélange renfermant 80 % d'N<sub>2</sub>, et 20 % de CO<sub>2</sub> pour gazer les tubes. La pression dans les tubes est ajustée à 0,5 bar.

Après une incubation de 15 jours, l'atmosphère des tubes présentant une croissance est analysée par chromatographie en phase gazeuse pour déceler la présence de H<sub>2</sub>. On utilise un chromatographe à détection par conductibilité thermique (TCD) dans les conditions suivantes :

*Colonnes* : 2 colonnes acier inox 1,80 m × 1/8" remplies de carbosphère 60/80 mesh.

*Températures* : colonne : 85° isotherme ; injecteur : 105° ; détecteur : 150°.

*Courant filaments* : 100 mA.

*Débit gaz N<sub>2</sub> (vecteur)* : 45 ml/mn.

Dans ces conditions, le temps d'éluion de H<sub>2</sub> est de 13 s.

### 1.4. Numération des bactéries dénitrifiantes

La composition du milieu est la suivante : NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g ; Nutrient Broth (Difco), 8 g ; Eau distillée, 1 000 ml. Sa préparation est identique à celle du milieu pour méthanigènes. On utilise de l'azote pour gazer les tubes de Hungate. La pression

est ajustée à 0,5 bar environ. On introduit 1 ml d'acétylène dans chaque tube avant l'incubation.

L'atmosphère des tubes présentant une croissance est analysée par chromatographie en phase gazeuse pour déceler la production de N<sub>2</sub>O dont la réduction ultérieure se trouve bloquée par l'acétylène (YOSHINARI *et* KNOWLES, 1976). On utilise un chromatographe à détection par conductibilité thermique (TCD) dans les conditions identiques aux précédentes mais avec l'hélium comme gaz vecteur et un courant aux filaments de 250 mA. Le temps d'éluion de N<sub>2</sub>O est de 7 mn (fig. 2A).

### 1.5. Numération des bactéries sulfato-réductrices

La numération des bactéries sulfato-réductrices est une donnée intéressante, en raison de leur compétition avec les méthanigènes pour le flux d'électrons servant à la réduction des substrats. On filtre 50 ml d'une dilution au centième de l'échantillon sur filtre Millipore HA-0,45 μ, puis le filtre est introduit dans un tube à vis renfermant 50 mg de FeS et entièrement rempli de milieu approprié (Kimax 125 × 16). On visse le bouchon sans laisser de bulle d'air, puis on incube et on note le nombre de jours nécessaires au noircissement complet du filtre. On se réfère ensuite à une courbe donnant en fonction de la durée d'incubation observée, le log du nombre initial de bactéries. Cette courbe a été établie à partir de dilutions connues issues d'une culture pure de *Desulfovibrio vulgaris*. La composition du milieu et sa préparation sont adaptées de celles du milieu de MOURARET (1971, 1972) :

A (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 2 g ; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10H<sub>2</sub>O, 1 g ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 0,1 g ; NH<sub>4</sub>Cl, 1 g ; lactate de sodium à 60 %, 6 ml ; eau distillée, 800 ml) ; B (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g ; eau distillée, 100 ml) ; C (sel de Mohr, 0,5 g ; eau distillée, 100 ml). Les solutions A et B sont stérilisées 20 mn à 120° et la solution C par filtration. On mélange les 3 solutions après refroidissement ; pH 7,1.

### 1.6. Numération des bactéries anaérobies facultatives

Sur des boîtes de Pétri renfermant de l'agar nutritif (Difco) on étale 0,2 ml de chaque dilution. Les colonies sont comptées à l'aide d'une loupe binoculaire après quelques jours d'incubation en aérobiose.

### 1.7. Numération des bactéries anaérobies non oxygène-sensibles (non OS)

La préparation du milieu et sa composition sont identiques à celles du milieu pour bactéries

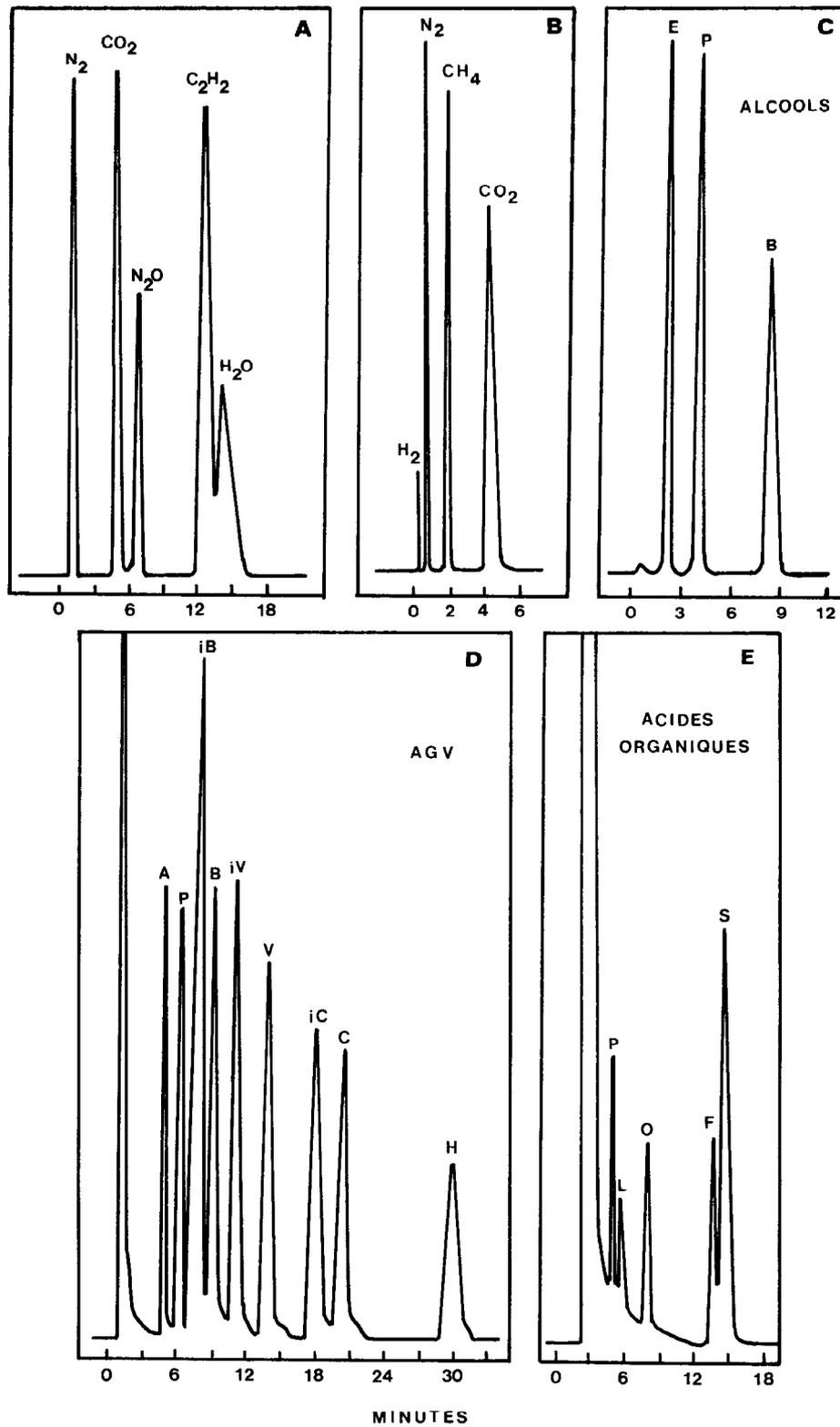


Fig. 2. --- Chromatogrammes des analyses de gaz, alcools et acides.

acidifiantes mais la résazurine est remplacée par 12 ml d'une solution de bleu de bromothymol (1 g dans 25 ml de soude N/10 et 475 ml d'eau). De l'agar (5 g/l) est incorporé au milieu, puis celui-ci est réparti en tubes de 16 (14 ml/tube) qui sont plongés dans l'eau bouillante puis maintenus dans un bain-marie à 45°. Le milieu est alors ensemencé puis coulé dans des tubes vanille de Raibaud en présence d'air. Les bactéries ont donc été en contact avec O<sub>2</sub> mais elles sont incubées en conditions anaérobies strictes. Seules pourront croître celles qui ne sont pas sensibles à l'oxygène. Les tubes positifs virent du vert au jaune. On peut également compter les colonies dans les tubes contenant les dilutions extrêmes.

### 1.8. Numération des bactéries anaérobies oxygène-sensibles (OS)

Le milieu est identique au précédent mais les boîtes de Pétri sont préparées et ensemencées en boîte à gants anaérobie puis placées dans un container muni d'un manomètre, d'un septum pour les prélèvements de gaz et d'un robinet de gazage (BALCH *et coll.*, 1979) pour être incubées à l'abri de l'oxygène dans un mélange N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20 %). Le dénombrement des colonies permet de calculer le nombre total de bactéries anaérobies. Le nombre de bactéries anaérobies OS est obtenu par différence avec celui des bactéries anaérobies non OS.

## 2. TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES SOUCHES BACTÉRIENNES

Des isollements de bactéries ont été réalisés au cours des numérations effectuées sur divers inoculums et pendant la digestion anaérobie des cossettes de betterave en mésophilie et en thermophilie. Pour cela on est parti de colonies obtenues sur boîtes de Pétri ou en tubes de Raibaud et de cultures provenant des dilutions ultimes positives pour l'activité recherchée. Dans la plupart des cas, il s'agit donc de bactéries dominantes. Ces souches sont étudiées sommairement puis les plus intéressantes sont conservées en vue d'études ultérieures en cultures mixtes pour la mise au point d'inoculums appropriés.

### 2.1. Bactéries anaérobies facultatives

Ce sont les plus faciles à isoler, du fait de l'absence de précaution vis-à-vis de l'oxygène. Les colonies obtenues sur boîtes de Pétri sont étalées sur de nouvelles boîtes.

L'opération doit être répétée plusieurs fois pour assurer la purification des souches qui sont

ensuite conservées sur gélose nutritive inclinée en pilulier à vis à 4 °C.

L'identification sommaire consiste à effectuer la coloration de Gram et celle des flagelles selon la technique de Rhodes (1958), la recherche de l'oxydase et de la catalase et l'analyse des produits de la fermentation du glucose par chromatographie en phase gazeuse. Les alcools, les acides gras volatils (AGV) et les acides organiques sont détectés en ionisation de flamme (FID) dans les conditions suivantes :

#### AGV (COUPLET *et coll.*, 1979)

*Colonne*: acier inox de 2,70 m × 1/8" remplie de chromosorb WAW 80-100 mesh, imprégnée de 25 % NPGA (Neopentylglycol adipate) et 2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

*Températures*: colonne : 190° isotherme ; injecteur : 200° ; détecteur : 245°.

*Débits gaz*: N<sub>2</sub> (vecteur) : 17 ml/mn ; H<sub>2</sub> : 30 ml/mn ; Air : 120 ml/mn.

*Injection*: 2 µl de l'échantillon dilué de moitié avec de l'acide formique à 40 %.

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon contenant 1 ml de chacun des AGV pour 100 ml d'eau. Cette solution est diluée de moitié dans l'acide formique à 40 %. La succession des pics est représentée sur la fig. 2 D.

#### Alcools

*Colonne*: acier inox de 2 m × 1/8" remplie de Porapak Q 80-100 mesh.

Les conditions opératoires sont identiques à celles qui sont utilisées pour les AGV. L'étalonnage est réalisé à l'aide de solutions étalon d'alcools diluées au 1/100<sup>e</sup> (éthanol, propanol et butanol). La succession des pics est représentée sur la fig. 2 C.

#### Acides organiques

La colonne et les conditions opératoires sont identiques à celles qui sont utilisées pour les AGV. On procède à la méthylation préalable des acides organiques non volatils par le méthanol en milieu sulfurique. Le dérivé méthylé est extrait par le chloroforme. Des essais sont actuellement en cours pour améliorer la méthylation et la détection. La succession des pics est représentée sur la fig. 2 E.

Si la souche étudiée produit du gaz lors de la fermentation du glucose, on la teste sur une galerie API 20 E (API SYSTEM, La Balme-les-Grottes) qui permet d'identifier les entérobactéries.

### 2.2. Bactéries anaérobies strictes

On les isole à partir des boîtes de Pétri incubées en containers anaérobies, à partir des tubes de Raibaud employés pour la numération des bactéries

ries non OS et à partir des tubes de numération des bactéries acidifiantes.

Pour les colonies en boîtes de Pétri, on opère comme pour les bactéries anaérobies facultatives mais en effectuant les manipulations dans l'enceinte anaérobie. Les souches pures sont conservées sur gélose inclinée en tube de Hungate sous atmosphère de  $N_2-CO_2$  (80-20 %).

Pour les colonies en tube de Raibaud, il suffit de couper le tube légèrement au-dessus de la colonie et de transférer celle-ci à l'aide d'une pipette pasteur équipée d'une « propipette », dans un milieu faiblement gélosé en tube de Veillon dont le contenu est ensuite dilué dans plusieurs tubes successifs (RAIBAUD *et coll.*, 1966). Après incubation, on prélève les colonies comme il vient d'être indiqué et on les étale sur gélose nutritive en boîte de Pétri. L'incubation est effectuée en container anaérobie.

Pour l'identification sommaire de ces souches, on opère comme pour les bactéries anaérobies facultatives. Une identification plus poussée peut être obtenue avec une galerie API 20 A.

### 2.3. Bactéries méthanigènes

L'isolement de ces bactéries est une opération très longue et fastidieuse car leur croissance est lente et elles sont souvent mêlées à d'autres bactéries qu'il est difficile d'éliminer.

Il faut d'abord effectuer plusieurs enrichissements successifs sur le milieu de numération en tubes haute pression (BALCH *et coll.*, 1979), par repiquages de 0,1 ml dans 5 ml de milieu neuf. L'apparition de  $CH_4$  est suivie par chromatographie après 3 semaines d'incubation sous atmosphère de  $H_2-CO_2$  (80-20 %) à la pression de 3 atm.

Les colonies sont obtenues sur boîte de Pétri après dilution et étalement de la suspension sur milieux gélosés incubés en container sous atmosphère d' $H_2-CO_2$  (80-20 %) à la pression de 3 bars, ou bien en roll-tubes après ensemencement dans la masse de milieux gélosés à 2 % maintenus au bain-marie à 45°, ou encore en tubes de Raibaud contenant un milieu à 0,5 % d'agar pour les bactéries utilisatrices d'acétate.

Les colonies sont repiquées plusieurs fois dans les mêmes conditions. La purification ultime des souches peut nécessiter l'emploi d'antibiotiques spécifiques comme la céphalotine et la clindamycine (GODSY, 1980) ou la pénicilline G et la D-cyclosérine (ZINDER *et MAH*, 1979).

### 2.4. Bactéries sulfato-réductrices

A partir des tubes inoculés avec le filtre Millipore et présentant un net noircissement, on prélève 0,2 ml de culture que l'on introduit dans 50 ml

de milieu au lactate de sodium en flacon sérum de 125 ml, dont l'atmosphère est constituée par un mélange de  $N_2$  et de  $CO_2$  (80-20 %). Les flacons sont placés à l'étuve à 35° pendant 1 à 2 semaines. Cinq repiquages successifs sont effectués avant d'étaler la culture sur boîtes de Pétri gélosées qui sont ensuite incubées dans un container « Gaspak Anaerobic System » (Biomérieux, Lyon). Les colonies de bactéries sulfato-réductrices sont révélées par l'apparition de taches noires. La purification nécessite plusieurs repiquages dans les mêmes conditions. Les souches pures sont conservées à 4°C sur gélose inclinée en tubes de Hungate sous atmosphère de  $N_2-CO_2$ .

Des bactéries utilisant l'acétate ou le propionate peuvent également être recherchées dans les mêmes conditions (WIDDEL *et PFENNIG*, 1981). Elles pourront se révéler utiles pour les expériences de cultures mixtes.

### 2.5. Bactéries dénitrifiantes

Leur importance est secondaire pour le processus de digestion anaérobie. Mais la recherche de souches dénitrifiantes anaérobies strictes est intéressante car on ne connaît actuellement aucune espèce de ce type capable de réduire le nitrate en gaz.

On réalise les isollements à partir des tubes de numération fortement positifs, par des enrichissements successifs sur le même milieu puis étalement en boîte à gant anaérobie sur boîtes de Pétri gélosées qui sont incubées en anaérobiose en container anaérobie.

Pour leur identification on procède comme pour les bactéries anaérobies.

### 2.6. Bactéries utilisant le propionate

Ces bactéries qui sont encore assez mal connues peuvent être indispensables pour lutter contre l'empoisonnement d'un digesteur consécutif à une accumulation trop importante de propionate. Leur isolement est tenté à partir de cultures d'enrichissement en tubes de Hungate sous atmosphère  $N_2-CO_2$  (80-20 %) et sur milieu pour anaérobies strictes dans lequel le propionate remplace le glucose comme source de carbone et où les concentrations de biotrypcase et d'extrait de levure sont ramenées à 0,2 g/l.

## Résultats et discussion

### 1. NUMÉRATION DES POPULATIONS BACTÉRIENNES

#### 1.1. Mise au point des milieux

La mise au point des milieux de numération a été effectuée sur des échantillons prélevés dans un

digesteur de l'I.R.C.H.A. fonctionnant en alimentation semi-continue avec des cossettes prétraitées par la soude. L'inoculum initial provenait d'un digesteur fonctionnant avec des boues de station d'épuration de résidus de tannerie.

Les 4 premières numérations (tabl. I) ont été effectuées avec des milieux de culture classique (BALCH *et coll.*, 1979); les résultats sont très éloignés de la population totale qui est de l'ordre de  $10^{10}$  bactéries/ml. Pour affiner la technique, différentes conditions de milieux ont été comparées : (1) milieu classique, (2) remplacement de l'eau distillée ajoutée au milieu par une solution saline 0,15 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pour rétablir les conditions de salinité du digesteur et (3) remplacement de 50 % de l'eau distillée par le jus

du digesteur préalablement centrifugé et stérilisé 45 mn à  $110^\circ$ .

L'adjonction de jus de digesteur améliore considérablement les résultats (tabl. I). D'autre part, les numérations d'acidifiants producteurs d'AGV et d'acidifiants producteurs d' $\text{H}_2$  sont identiques et correspondent probablement à une même population. Dans les numérations ultérieures, le jus du digesteur sera donc systématiquement utilisé et les acidifiants comptés par l'analyse de l'hydrogène produit. Pour les bactéries thermophiles qui sont essentiellement représentées par des espèces du genre *Bacillus* non productrices de gaz, les tubes positifs seront ceux qui présenteront une croissance ou la présence d'AGV.

TABLEAU I

Numérations bactériennes effectuées sur un digesteur pilote de l'I.R.C.H.A. alimenté en semi-continu avec des cossettes de betterave traitées à la soude, et mis en route depuis le 16.1.81

DATE	8/4	30/4	12/5	5/6	11/6	19/6	3/7
A. G. V. mg/l							
Acétate	484		34	408	146	237	2823
Propionate	352		0	0	0	0	1426
Butyrate	0		0	0	0	0	584
Valérate	0		0	0	0	0	0
Flore totale bactéries/ml	$10^{10}$		$10^{10}$	$2.10^{10}$	$0,7.10^{10}$	$< 10^{10}$	$1,15.10^9$
Sulfatoréducteurs	$2.10^7$	$2.10^7$	$2.10^7$	$2.10^7$		$2.10^7$	
Méthanigènes							
Milieu 1	$1,25.10^6$	$2,25.10^6$	$2,25.10^6$	$4.10^7$	$8.5.10^7$	$< 10^7$	
Milieu 2					$1,25.10^8$	$< 10^7$	
Milieu 3					$6,25.10^8$	$< 10^7$	$7.10^7$
Acidifiants (AGV)							
Milieu 1'	$2.10^6$	$5,5.10^6$	$1,25.10^8$	$2.10^8$	$2.10^8$	$3,5.10^8$	
Milieu 2'					$8,5.10^9$	$1,25.10^8$	
Milieu 3'					$2.10^{10}$	$2.10^9$	$10^9$
Acidifiants ( $\text{H}_2$ )							
Milieu 1'	$2.10^6$	$5,5.10^6$	$1,25.10^8$	$2.10^8$	$2.10^8$	$3,5.10^8$	
Milieu 2'					$8,5.10^9$	$1,25.10^8$	
Milieu 3'					$2.10^{10}$	$2.10^9$	$10^9$

La population de bactéries anaérobies facultatives s'élève à  $10^8$  bactéries/ml dans les échantillons (résultat non rapporté au tableau I). La population dominante du digesteur est donc composée d'anaérobies strictes avec une très nette dominance des bactéries acidifiantes. Le 18/6, un incident a entraîné la mise à l'air du digesteur pendant 2 heures. Cette opération s'est répercutée sur l'analyse du lendemain (tabl. I) qui a démontré une chute de toutes les populations bactériennes excepté les sulfato-réducteurs qui sont non oxygène-sensibles (non OS).

Les jus de quatre digesteurs différents ont été comparés quant à leur influence sur la numération des bactéries méthanigènes dans le digesteur précédent. Les résultats sont équivalents :  $4.10^7$  avec le jus de digesteur de cossettes,  $1,75.10^7$  avec le jus de digesteur de fientes de poules inoculé par un lisier de bovin,  $1.10^7$  avec le jus de digesteur de boues de station d'épuration de résidus de tannerie et  $1,25.10^7$  avec le jus de digesteur de fientes de dindes. Le choix de jus de digesteur pour la préparation des milieux de numération ne semble donc pas influencer sur le résultat des numérations. Par la suite, nous avons utilisé le jus du digesteur de cossettes puis un jus de rumen fraîchement prélevé.

## 1.2. Application à divers inoculums

Trois inoculums différents ont été analysés dans les conditions décrites précédemment : un effluent du digesteur pilote de l'I.R.C.H.A. alimenté avec des boues de station d'épuration de résidus de tannerie (RT); le rumen d'un bœuf fraîchement abattu; une boue de la station d'épuration de Colombes. Des numérations ont également été effectuées sur des cultures en fermenteur de 2 litres au cours de la digestion des cossettes ayant subi différents prétraitements.

Les résultats sont rapportés au tableau II. En mésophilie, la population totale est de l'ordre de  $10^9$  à  $10^{10}$  bactéries/ml; dans presque tous les cas, la proportion de bactéries anaérobies facultatives est voisine de 1 %. Les bactéries anaérobies non oxygène-sensibles (non OS) sont relativement nombreuses et voisines de 10 pour 100. Les bactéries acidifiantes représentent la population la plus nombreuse dans les échantillons analysés, excepté pour la boue de station d'épuration qui présente une prédominance de bactéries sulfato-réductrices lesquelles sont habituellement peu nombreuses (1 pour mille). Les bactéries méthanigènes sont de l'ordre de 1 % dans l'ino-

TABLEAU II

Numérations bactériennes effectuées sur divers inoculums

NUMERATIONS	Inoculum RT (boue)	Inoculum RT	Fermenteur 35° + inoculum RT Traitement NaOH Régulation de pH. Fin de phase acidifiante	Fermenteur 55° + inoculum RT Traitement cellulases régulation de pH. 2 j. après inoculation	Fermenteur 35° + inoculum RT Traitement T. harzianum + 2 j. incubation 50°. 3 j. après inoculation	Inoculum Jus de rumen	Inoculum boue de station d'épuration de COLUMBES
Bactéries totales	$1,3.10^9$	$7.10^9$	$10^{10}$	$2,5.10^8$	$9.10^9$	$9.10^8$	$3.10^9$
Anaérobies facultatives	$3.10^7$	$6.10^6$	$8.10^9$	$1,5.10^7$	$1,5.10^7$	$2,8.10^6$	$4.10^7$
Anaérobies non OS	$6.10^6$	$2,2.10^8$	$> 10^8$		$1,25.10^9$		$10^9$
Anaérobies strictes OS	$6,4.10^7$	$3.10^7$	$2.10^9$				$5.10^7$
Acidifiantes	$1,75.10^8$	$8,5.10^9$	$8,5.10^9$	$6,5.10^7$	$4,5.10^{10}$	$2,5.10^8$	$8,5.10^7$
Methanigènes	$4,5.10^6$	$6,5.10^7$	$1,25.10^8$	$0 \text{ à } 10^{-5}$	$2,25.10^8$	$2,25.10^7$	$10^6$
Sulfatoreductrices	$10^8$	$10^6$		$0 \text{ à } 10^{-2}$		$10^7$	$10^8$
Dénitrifiantes	$0 \text{ à } 10^{-5}$	$1,5.10^5$		$0 \text{ à } 10^{-3}$	$2,5.10^3$	$4,5.10^6$	$3,5.10^6$

TABLEAU III  
Analyse sommaire des bactéries anaérobies facultatives (digesteur avec résidus de tannerie-RT)

N° souche	Bacille	cocobacille	Coque	Spore	en chaînes	1 flagelle polaire	> 1 flagelle polaire	péritriche	Gram	Oxydase	Catalase	Croissance anaérobie	Fermentation glucose		Identité présumée
													acide	gaz	
RT 1	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 3	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 4	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 5	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 6	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 7	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	<i>Bacillus</i>
RT 8	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	N.D.
RT 9	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>Bacillus</i>
RT 10	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Bacillus</i>
RT 11	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	<i>Proteus Vulgaris</i>
RT 12	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	<i>Micrococcus</i>
RT 13	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 14	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>
RT 15	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 16	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Bacillus</i>
RT 17	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>Alcaligenes</i>
RT 18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Aeromonas</i>
RT 19	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	<i>Listeria</i>
RT 20	-	+	-	+	-	-	-	-	V	+	+	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 21	+	-	-	+	-	-	-	+	V	-	-	+	+	+	<i>Bacillus</i>
RT 22	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i>
RT 23	-	-	+	-	amas	-	-	-	+	-	-	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
RT 24	-	-	+	-	amas	-	-	-	+	-	-	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
RT 25	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	<i>Listeria</i>

ND : non déterminé.

V : Variable

culum ou les fermenteurs inoculés avec l'effluent de résidus de tannerie ainsi que dans le jus de rumen mais moins nombreuses (1‰) dans les boues de Colombes. Les bactéries dénitrifiantes sont peu nombreuses mais atteignent cependant 1‰ dans le jus de rumen et la boue de Colombes.

En thermophilie, l'effluent de résidus de tannerie ne renfermait pratiquement que des bactéries acidifiantes.

## 2. ISOLEMENT DE SOUCHES PURES

Tout au long des numérations précédentes, des isollements de souches dominantes ont été effectués pour les différents groupes bactériens étudiés.

### 2.1. Bactéries anaérobies facultatives

Ce sont les plus faciles à obtenir puisqu'elles croissent très bien à l'air. Elles sont essentiellement représentées par des bactéries acidifiantes dont certaines fermentent le glucose avec production de gaz mais, après analyse détaillée des souches, on trouve également quelques bactéries aérobies strictes.

Les résultats correspondant aux effluents de digesteur fonctionnant avec des résidus de tannerie, au jus de rumen fraîchement prélevé et à une boue de la station d'épuration de Colombes sont rapportés respectivement aux tableaux III et IV. Pour les résidus de tannerie, on trouve plus de 70 % de *Bacillus* et pratiquement une seule entéro-bactérie, *Proteus vulgaris*. Dans le jus de rumen, nous n'avons pas décelé de bactéries gram + mais deux souches d'*Escherichia coli*. Sur les dix souches isolées dans la boue de station d'épuration, cinq sont des cocci et une seule entérobactérie, *Enterobacter agglomerans*.

L'analyse des acides produits par les souches acidifiantes retenues, sur le milieu utilisé pour l'isolement, est rapportée au tableau V. La plus forte production a été obtenue avec deux souches thermotolérantes et surtout avec une souche de *Bacillus* qui a produit 3,6 g/l d'acide lactique. A quelques exceptions près, l'accumulation d'acétate semble prépondérante pour la plupart des souches.

### 2.2. Bactéries anaérobies strictes

La presque totalité des souches isolées est représentée par des espèces sporulées du genre

TABLEAU IV

Analyse sommaire des bactéries anaérobies facultatives isolées du jus de Rumen (JR) et des boues de la station d'épuration de Colombes (BC)

N° souche	Bacille	Cocobacille	Coque	Spore	en chaînes	1 flagelle poleaire	Flagelle poleaire	Péritriche	Gram	Oxydase	Catalase	Croissance anaérobie	Fermentation glucose		Identité présumée
													Acide	Gaz	
JR 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
JR 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
JR 3	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>Flavobacterium</i>
JR 4	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
JR 5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	<i>Aeromonas</i>
BC 1	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	<i>Listeria</i>
BC 2	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>Listeria</i>
BC 3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
BC 4	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
BC 5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Neisseria</i>
BC 6	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	<i>Aerococcus</i>
BC 7	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	<i>Moraxella</i>
BC 8	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	<i>Paracoccus denitrificans</i>
BC 9	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
BC 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Enterobacter agglomerans</i>

TABLEAU V  
Production d'acides (g/l) par les souches acidifiantes anaérobies facultatives retenues

N° Souche		Acétique	Butyrique	Valérique	Lactique	Oxalique	Succinique	Total
isolement	collec- tion							
RT <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	0,20	0,22		ND	ND	ND	0,42
RT <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	0,53			-	-	-	0,53
RT <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>	0,23	0,10		-	-	-	0,33
RT <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>	0,22	0,29		-	-	-	0,51
RT <sub>5</sub>	A <sub>5</sub>	0,25			-	-	-	0,25
RT <sub>6</sub>	A <sub>6</sub>	0,28			-	-	-	0,28
RT <sub>7</sub>	A <sub>7</sub>	0,30			-	-	-	0,30
RT <sub>10</sub>	A <sub>8</sub>	0,34			-	-	-	0,34
RT <sub>11</sub>	A <sub>9</sub>	0,57			-	-	-	0,57
RT <sub>13</sub>	A <sub>10</sub> <sup>T</sup>	1,29	0,65	0,05	-	-	-	1,99
RT <sub>15</sub>	A <sub>11</sub> <sup>T</sup>	0,84	0,67	0,04	-	-	-	1,55
RT <sub>19</sub>	A <sub>12</sub>	0,51			-	-	-	0,51
RT <sub>20</sub>	A <sub>13</sub>	0,56			-	-	-	0,56
JR <sub>2</sub>	A <sub>14</sub>	0,51			-	-	-	0,51
JR <sub>4</sub>	A <sub>15</sub>	0,47			-	-	-	0,47
JR <sub>5</sub>	A <sub>16</sub>	0,22			-	-	-	0,22
BC <sub>1</sub>	A <sub>17</sub>	0,20	0,25		0,01			0,46
BC <sub>4</sub>	A <sub>18</sub>	0,21				0,01	0,08	0,30
BC <sub>10</sub>	A <sub>19</sub>	0,19		0,03	0,45		0,06	0,73
RT <sub>21</sub>	A <sub>20</sub>	0,38	0,61	0,02	0,10		0,01	1,12
RT <sub>23</sub>	A <sub>21</sub>	0,41	0,09		3,63		0,03	4,16
RT <sub>24</sub>	A <sub>22</sub>	0,08			0,21		0,01	0,30
RT <sub>25</sub>	A <sub>23</sub>	0,25	0,28		0,69	0,01	0,01	1,24

RT : résidus de tannerie - JR : jus de rumen - BC : boue de COLOMBES -  
- ND : non déterminé -

*Clostridium* pour la plupart productrices de gaz. L'analyse des acides formés par les souches retenues est rapportée au tableau VI. Sur les 12 souches analysées, 9 produisent de l'acide butyrique.

### 2.3. Autres bactéries

Les enrichissements et isolements de souches méthanigènes, sulfato-réductrices, dénitrifiantes et syntrophiques (acétate ou propionate) feront l'objet d'autres publications.

### Conclusion

Ces recherches préliminaires effectuées dans le cadre de l'étude de la méthanisation de résidus cellulose solides d'industrie agro-alimentaire tels que les cossettes de betterave sucrière épuisées, ont nécessité l'adaptation ou la mise au point de techniques et milieux de culture pour mieux cerner l'écologie microbienne de la digestion anaérobie.

L'influence bénéfique de l'adjonction de jus

TABLEAU VI  
Production d'acides (g/l) par les souches acidifiantes anaérobies strictes retenues

N° Souche		Acétique	Butyrique	Valérique	Lactique	Oxalique	Succinique	Total
isolement	collec- tion							
RTS <sub>1</sub>	AS <sub>1</sub>	0,11		0,03	0,10		0,01	0,25
RTS <sub>2</sub>	AS <sub>2</sub>	0,14		0,02	0,10			0,26
RTS <sub>3</sub>	AS <sub>3</sub>	0,23	0,50				0,02	0,75
RTS <sub>4</sub>	AS <sub>4</sub>	0,09		0,03	0,20		0,01	0,33
RTS <sub>5</sub>	AS <sub>5</sub>	1,18	1,96		0,34	0,05	0,02	3,55
RTS <sub>12</sub>	AS <sub>6</sub>	0,49	0,60				0,01	1,10
RTS <sub>13</sub>	AS <sub>7</sub>	0,41	0,60				0,02	1,03
RTS <sub>14</sub>	AS <sub>8</sub>	0,36	0,52		0,05		0,01	0,94
RTS <sub>15</sub>	AS <sub>9</sub>	0,35	0,72					1,07
RST <sub>16</sub>	AS <sub>10</sub>	0,34	0,56		0,07	0,01	0,01	0,99
RTS <sub>10</sub>	AS <sub>11</sub>	0,42	0,73		0,01		0,01	1,17
RTS <sub>11</sub>	AS <sub>12</sub>	0,36	0,90					1,26

de digesteur ou de rumen dans les milieux, constatée par plusieurs auteurs, est confirmée par nos propres résultats. Les bactéries acidifiantes représentent la flore dominante des digesteurs, qui est principalement anaérobie stricte. La sensibilité à l'oxygène varie en fonction de l'inoculum.

Ces techniques de numération couplées à l'analyse des acides gras volatils produits au cours

de la digestion, permettent de suivre efficacement l'évolution d'un digesteur. L'isolement de bactéries représentatives des différents groupes impliqués dans le processus devrait conduire à la réalisation d'expériences de cultures mixtes pour la mise au point d'un inoculum adapté au substrat à digérer.

*Manuscrit reçu au Service des Éditions le 28 mai 1982*

## BIBLIOGRAPHIE

- BALCH (W. E.), FOX (G. E.), MAGRUM (L. J.), WOESE (C. R.), WOLFE (R. S.), 1979. — Methanogens : reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, 43 : 260-296.
- COUPLET (P.), ALBAGNAC (G.), MORFAUX (J. N.), 1979. — Digestion anaérobie en deux étapes des effluents de type agro-alimentaire. Étude sur pilote de laboratoire. *Tribune du Cebedeau*, 425 : 111-122.
- GODSY (E. M.), 1980. — Isolation of *Methanobacterium bryantii* from a deep aquifer by using a novel broth-antibiotic disk method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39 : 1074-1075.
- HOBBIE (J. E.), DALEY (R. J.), JASPER (S.), 1977. — Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 : 1225-1228.
- HOBSON (P. N.), SHAW (B. G.), 1973. — The bacterial population of piggery-waste anaerobic digesters. *Wat. Res.*, 8 : 507-516.
- IANNOTTI (E. L.), FISCHER (J. R.), SIEVERS (D. M.), 1978. — Medium for the enumeration and isolation of bacteria from a swine waste digester. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 : 555-566.
- MAH (R. A.), SUSSMAN (C.), 1967. — Microbiology of anaerobic sludge fermentation. I — Enumeration of the non-methanogenic anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.*, 16 : 358-361.
- MOURARET (M.), 1971. — Étude biologique des eaux du barrage d'Ayame I en Côte d'Ivoire — Rapport de convention O.R.S.T.O.M. EECl, O.R.S.T.O.M., Paris.
- MOURARET (M.), 1972. — Étude biologique des eaux dans quelques cours d'eau du Cameroun et du Gabon — Rapport de Convention O.R.S.T.O.M.-SNEC-SEEM., O.R.S.T.O.M., Paris.
- RAIBAUD (P.), DICKINSON (A. B.), SACQUET (E.), CHARLIER (H.), MOCQUOT (G.), 1966. — La microflore du tube digestif du rat. I. Techniques d'étude et milieux de culture proposés. *Ann. Inst. Pasteur*, 110 : 568-590.
- RHODES (M. E.), 1958. — The cytology of *Pseudomonas* sp. as revealed by a silver-plating staining method. *J. Gen. Microbiol.*, 18 : 639-648.
- SIEBERT (M. L.), TOERIEN (D. F.), HATTINGH (W. H. J.), 1968. — Numeration studies on methanogenic bacteria. *Wat. Res.*, 2 : 545-554.
- SPOELSTRA (S. F.), 1978. — Enumeration and isolation of anaerobic microbiota of piggery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35 : 841-846.
- TOUZEL (J. P.), SAMAIN (E.), ALBAGNAC (G.), MORFAUX (J. N.), 1981. — Microbiologie des digesteurs anaérobies de l'épuration des eaux résiduaires. *Ind. Alim. Agric.*, 98 : 833-842.
- WIDDEL (F.), PFENNIG (N.), 1981. — Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfohalobium postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 129 : 395-400.
- YOSHINARI (T.), KNOWLES (R.), 1976. — Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 69 : 705-710.
- ZEIKUS (J. G.), BEN-BASSAT (A.), HEGGE (P. W.), 1980. — Microbiology of methanogenesis in thermal, volcanic environments. *J. Bacteriol.*, 143 : 432-440.
- ZINDER (S. H.), MAH (R. A.), 1979. — Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> for methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38 : 996-1008.