

ÉTUDE
DE L'INFLUENCE INHIBITRICE DE L'ACÉTYLÈNE
SUR LA FORMATION BIOLOGIQUE DU MÉTHANE
DANS UN SOL DE RIZIÈRE

par M. Raimbault.

ORSTOM, Laboratoire de Microbiologie du Sol,
B. P. 1386, Dakar (Sénégal)

SUMMARY

STUDY OF THE INHIBITORY EFFECT OF ACETYLENE
ON THE BIOLOGICAL METHANE FORMATION IN A PADDY SOIL

A 0.05 atm partial pressure of acetylene stopped all the CH₄ evolution during anaerobic paddy soil incubations when different carbon substances were added. It was shown proof that acetylene did not disturb the volatil fatty acids yielding but prohibited the methane forming bacteria from doing future use of those. Acetylene does inhibit methane forming bacteria. Besides, the growth of a *Methanosarcina* strain was stopped by a 0.01 atm partial pressure of acetylene, and resting cells lost 98 per cent of their activity when the acetylene concentration was 0.5×10^{-3} M in the liquid. This acetylene inhibition can be used for studying the metabolism of methane forming bacteria.

KEY-WORDS: Methane, Acetylene, Soil, Anaerobiosis, Carbon, *Methanosarcina*; Metabolism, Inhibition, Rice-field.

INTRODUCTION

On a encore peu de renseignements sur la formation biologique du méthane qui représente pourtant une part importante de l'évolution de la matière organique dans les sols submergés. Koyama [7] et Takai [11] ont montré que, lors de l'incubation d'un sol en anaérobiose, il y a accumu-

Manuscrit reçu le 10 février 1975, accepté le 18 février 1975.

10 DEC. 1976

O. R. S. I. J. M.

M Collection de Référence

62 n° 8435 Bio.Sols

lation puis disparition d'acides organiques dont la majeure partie est constituée par de l'acide acétique. La phase de disparition des acides coïncide avec la formation du méthane. A l'aide de carbonate et d'acétate spécifiquement marqués par ^{14}C , ils ont montré que 60 % du méthane produit dans le sol proviennent du radical méthyle de l'acétate et que 20 à 30 % proviennent de la réduction du CO_2 .

Lors de nos investigations sur l'évolution du méthane dans les sols de rizières, nous nous sommes aperçu que de faibles quantités d'acétylène empêchent totalement la formation de CH_4 . Elleway et coll. [4] mesurant la formation de méthane par des filtrats de liquide de rumen, ont noté un effet semblable de l'acétylène mais ne se sont pas interrogés sur les raisons de ce blocage ni sur son mode d'action.

L'acétylène est surtout connu comme inhibiteur de la nitrogénase, ce qui a permis à Hardy et coll. [5] de mettre au point une méthode sensible pour la mesure de l'activité de cette enzyme. Cependant Brouzes et Knowles [2] ont montré que l'acétylène, à des concentrations supérieures à 0,025 atm, inhibe la croissance de *Clostridium pasteurianum* cultivé en présence d'ammonium. Il semble donc que l'acétylène puisse agir sur les germes anaérobies à un autre niveau que celui de la nitrogénase.

Nous nous sommes demandé si la suppression de la fermentation méthanique dans le sol était due à une inhibition spécifique des microorganismes méthano-formateurs par l'acétylène, ou si ce produit perturbait la formation de substances nécessaires à leur fonctionnement. Pour cela, nous avons suivi l'évolution du méthane et des acides gras volatils, lors d'incubations anaérobies d'échantillons de sols additionnés de différentes substances carbonées, en présence ou non d'acétylène. Par ailleurs, nous avons étudié l'influence de l'acétylène sur des cellules entières d'une souche de bactérie méthano-formatrice isolée du sol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sol utilisé.

Les caractéristiques physico-chimiques du sol employé sont données dans le tableau I. Il s'agit d'un sol de la station rizicole de l'IRAT à Djibelor, en Casamance, dans le sud du Sénégal. Le sol, prélevé juste après la récolte de riz, a été séché à l'air et tamisé à 2 mm.

Incubation du sol.

Nous avons utilisé des « flacons sérum » type flacon à perfusion, dont les volumes, voisins de 125 ml, ont été déterminés avec précision. Les flacons contenant 10 g de sol et 12 ml d'eau, remplis d'un gaz inerte pour assurer l'anaérobiose, ont été préincubés à 37° C pendant 72 heures pour que le sol puisse rétablir ses conditions réductrices. On a ajouté les substances carbonées puis complété à 22 ml, avec de l'eau, le volume total de liquide ; enfin, l'atmosphère a été remplacée par de l'azote. Dans le cas de l'utilisation du CO_2 , les flacons ont été remplis d'un mélange de 20 % de CO_2 et 80 % d'hydrogène à la pression atmosphérique. Là où il a été utilisé,

TABLEAU I. — Caractéristiques physico-chimiques du sol de Djibelor.

Argile %	C/N	Matière organique ‰	Cl ⁻ (meq/l)	pH	Conductivité mmho/cm
31,50	12,7	68,00	0	4,3	0,119

Les mesures ont été faites au laboratoire à partir d'échantillons de sol séché à l'air et tamisé à 2 mm.

l'acétylène a été ajouté à l'aide d'une seringue hypodermique par injection à travers le bouchon. Les flacons ont été mis en incubation à 37° (temps zéro).

Mesure des gaz.

Le méthane a été mesuré grâce à un chromatographe à ionisation de flamme (Varian Aerograph 1200) muni d'une colonne « Porapak R ». Pour la mesure du CO₂ et de l'hydrogène, on a utilisé un chromatographe à conductibilité thermique (Varian Aerograph 90 P4) muni d'une colonne « Porapak Q » et d'un tamis moléculaire. Les injections dans les chromatographes ont été faites par l'intermédiaire d'une boucle de mesure de 1 ml reliée d'un côté à la fiole de mesure et de l'autre à une pompe à vide. Ce système permet de calculer la quantité totale de gaz dans le flacon sans que l'on connaisse la pression, le volume de gaz injecté étant toujours la même fraction du volume gazeux total.

Acides volatils.

Pour le dosage de l'acidité volatile totale, le contenu d'un flacon a été centrifugé puis lavé une fois avec 50 ml d'eau ; le surnageant a été alcalinisé et son volume réduit à 10 ml par évaporation sous vide. Cette solution a été placée dans un appareil d'entraînement à la vapeur et acidifiée par de l'acide tartrique. On a recueilli un volume de 150 ml dont on a titré l'acidité par de la soude N/50. Les résultats sont exprimés en μ équivalents d'acide.

L'identification et le dosage des acides volatils ont été effectués sur des échantillons de sol incubés 10 jours en présence d'acétylène. Les acides ont été extraits par la technique de Yamane et Sato [17], puis séparés et dosés par la méthode de Bullen et coll. [3] sur colonne de gel de silice. Nous avons utilisé un gradient linéaire d'éluant allant de 0 % à 20 % de n-butanol dans le chloroforme. Le volume des fractions recueillies était de 4 ml et le volume total d'éluat était de 300 ml.

Microorganisme utilisé.

Il s'agit d'une bactérie méthano-formatrice isolée du sol de Djibelor, pouvant utiliser le méthanol comme seul substrat carboné. C'est une sarcine dont les caractères sont semblables à ceux décrits par Stadtman pour *Methanosarcina barkeri* [9].

Milieu de culture.

Le milieu utilisé pour l'enrichissement, l'isolement et la culture de ce germe était composé de (en g/l) : (NH₄)₂HPO₄, 0,6 ; (NH₄)H₂PO₄, 1,0 ; citrate de fer ammoniacal, 0,05 ; NH₄Cl, 0,5 ; Na₂CO₃, 0,025 ; CaCl₂.2H₂O, 0,01 ; MgCl₂.6H₂O, 0,01 ; MnSO₄.4H₂O, 0,001 ; NaMoO₄, 0,001 ; solution d'oligoéléments selon Wolin et coll. [15] 10 ml. Le pH du milieu a été ajusté à 7. Nous avons utilisé la solution

décrite par Toerien et Siebert [13], contenant un mélange de cystéine et de sulfure de sodium, pour abaisser le potentiel d'oxydo-réduction de ce milieu. L'azote a été utilisé comme atmosphère gazeuse.

Nous avons adopté la technique de Hungate [6] pour la préparation et le transfert du milieu en conditions d'anaérobiose ainsi que pour les repiquages.

Expériences sur les cellules entières.

Pour la récolte et la mise en suspension des cellules obtenues sur 2 litres de milieu, nous avons utilisé la méthode décrite par Wolin [14]. Les mesures d'inhibition par l'acétylène ont été faites dans des tubes de 20 ml contenant : 1 ml de tampon phosphate 0,2 M, 10 μ l de méthanol, 1 ml de suspension cellulaire (100 mg de cellules, poids humide) et 4 ml d'eau sous atmosphère d'azote. Les mesures du CH_4 ont été obtenus par injection dans le chromatographe de 0,5 ml de gaz prélevé dans les tubes grâce à une seringue hypodermique de 1 ml ; l'acétylène ayant été injecté à la seringue pour atteindre des pressions partielles allant de 0 à 0,05 atm et les tubes mis au bain-marie à 37°.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. — INHIBITION DE LA FORMATION DE CH_4 PAR L'ACÉTYLÈNE

Lorsqu'un échantillon de sol de rizière est incubé en anaérobiose à 37°, il produit du méthane avec une vitesse qui est fortement influencée par l'addition de différentes substances carbonées. Si, dans le flacon, on ajoute de surcroît, 2 ml d'acétylène pour 100 ml de volume gazeux, la production de méthane cesse complètement. La figure 1 nous montre que, dans le cas où l'on a fourni du méthanol, la formation de méthane est totalement bloquée par des quantités d'acétylène supérieures à 0,05 atm et elle est encore très fortement freinée par une pression partielle de 0,001 atm. Il s'agit donc d'un blocage très énergique. Des essais parallèles ont montré que 20 p. 100 d'oxyde de carbone n'empêchent pas la formation de méthane en présence de méthanol. Par ailleurs, nous n'avons pas observé la formation de quantités appréciables d'éthylène à partir d'acétylène, sauf en présence de glucose, lequel est favorable au développement des organismes fixateurs d'azote. Ces différentes considérations tendent à montrer qu'il s'agit là d'un mécanisme d'inhibition différent de celui exercé sur la nitrification.

L'acétylène peut empêcher la formation de méthane dans le sol en agissant directement sur les germes méthano-formateurs ou indirectement sur d'autres organismes anaérobies qui produisent du CO_2 , de l'hydrogène et des acides volatils comme l'acide acétique, toutes substances nécessaires au fonctionnement des bactéries produisant du méthane. Pour résoudre ce problème, nous avons suivi la production du méthane et l'accumulation d'acides volatils dans des échantillons de sols auxquels ont été ajoutées différentes substances carbonées, en présence ou non d'acétylène.

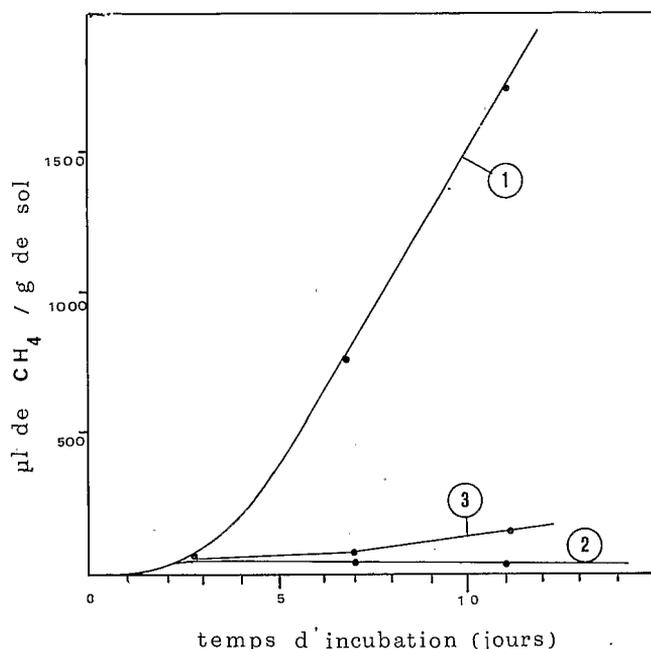


FIG. 1. — Inhibition de la formation de méthane par l'acétylène dans des échantillons de sol contenant du méthanol. Les fioles contiennent : sol, 10 g ; méthanol, 75 mg ; eau, 22 ml ; atmosphère, N₂.

1 = témoin ; 2 = CH ≡ CH (0,02 et 0,005 atm) ; 3 = CH ≡ CH (0,001 atm).

II. — PRODUCTION DE MÉTHANE

Dans le tableau II, nous avons rapporté le temps d'incubation nécessaire pour obtenir une forte accumulation de CH₄, la vitesse maximale de formation de méthane, ainsi que le pourcentage de carbone ajouté transformé en carbone méthanique.

En présence de glucose, on observe un temps de latence élevé (12 jours). Cela a été constaté également par Bell [1] et Yamane et Sato [16] qui l'interprètent comme un effet dépressif du glucose sur les bactéries méthanofomatrices. Des études complémentaires en cultures pures seraient nécessaires pour élucider cette question.

On observe une réduction pratiquement complète du CO₂ en CH₄ par l'hydrogène dans le cas où l'échantillon de sol est incubé dans une atmosphère de 20 p. 100 de CO₂ et 80 p. 100 d'H₂. On peut donc penser que la réutilisation de l'hydrogène produit par des sols incubés en anaérobie avec du glucose [16] est due presque exclusivement à l'activité des ferments méthaniques. D'ailleurs, dans ce cas, si on bloque leur activité par l'acétylène, on constate que l'hydrogène accumulé ne disparaît plus.

Parmi les substances carbonées étudiées, c'est l'acétate qui permet la plus grande vitesse de production de méthane dans le sol. Si l'on considère

TABLEAU II. — Production de méthane à partir de différentes substances carbonées.

Substances utilisées	Temps de latence (jours)	Vitesse maximale $\mu\text{l, CH}_4/\text{g de sol/jour}$	Rdt % (*)
Peptone	2	250	19
Cellulose	3	700	16
Glucose	12	400	26
Acétate	4	1 200	41
Méthanol	3	650	30
$\text{CO}_2 + \text{H}_2$	5	225	90
Témoin	1	50	—

Chaque fiole contenait 10 g de sol, 22 ml d'eau, et suivant le cas, peptone, 50 mg ; cellulose, 100 mg ; glucose, 75 mg ; acétate, 75 mg ; méthanol, 75 mg ; atmosphère N_2 sauf pour $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ (20,80 v/v).
 (*) Dans cette colonne, figure le rendement carboné de la transformation en méthane.

que la formation de CH_4 à partir de l'acétate procède de la réaction $\text{CH}_3 - \text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$, le rendement carboné théorique de la transformation est 50 p. 100. Le rendement de 41 p. 100 observé laisse penser que la dégradation anaérobie de l'acétate dans le sol est due principalement aux bactéries produisant du méthane. Cela est en accord avec les observations de certains auteurs [7, 8] qui affirment que 70 p. 100 du méthane produit dans le sol provient de la dégradation de l'acétate.

III. — ACIDES VOLATILS

Étant donné l'importance des acides gras volatils (en particulier l'acétate), lors de la production de CH_4 dans le sol, nous avons mesuré le méthane produit et nous avons dosé parallèlement l'acidité volatile totale. Pour savoir à quel niveau se situait l'action de l'acétylène, nous avons fait les mesures en présence ou non de ce produit.

La figure 2 nous présente les résultats obtenus en fonction de la substance carbonée incorporée au sol. Les résultats sont exprimés en μmole d'acide ou de CH_4 par gramme de sol. Si on considère l'acide acétique, 1 μmole fournit théoriquement 1 μmole de CH_4 . Il apparaît ainsi sur cette figure que, comme nous l'avons dit plus haut, quelle que soit la substance carbonée ajoutée, le méthane vient en très grande partie des acides volatils.

On constate par ailleurs qu'en absence d'acétylène, l'apparition du CH_4 coïncide exactement avec la disparition des acides volatils. En présence d'acétylène, le méthane n'est pas formé, mais les acides volatils sont produits

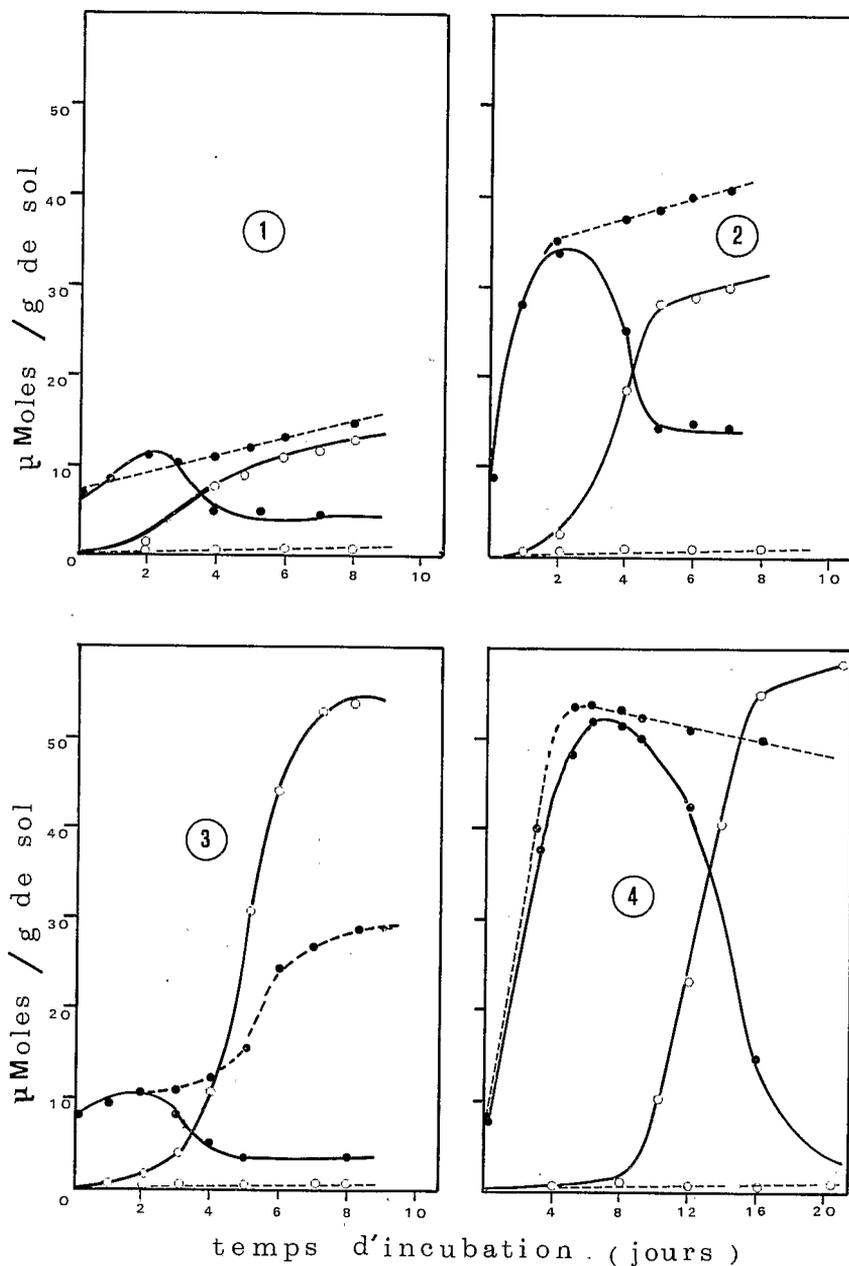


Fig. 2. — Influence de l'acétylène sur la formation de méthane et d'acides volatils dans des échantillons de sol.

1 = témoin ; 2 = peptone, 50 mg ; 3 = cellulose, 100 mg ; 4 = glucose, 75 mg.
 (●) acides volatils totaux ; (○) méthane.
 — sans acétylène ; - - - - - 0,01 atm de CH₂=CH₂.

exactement de la même façon qu'en son absence. La différence réside dans le fait qu'ils ne sont jamais réutilisés.

Dans le cas du glucose et de la peptone, la production d'acides volatils est beaucoup plus rapide que leur transformation. Par contre, dans le cas de la cellulose, les productions d'acides volatils et de CH_4 sont simultanées, ce qui explique qu'on ait trouvé très peu d'acides volatils en absence d'acétylène. On peut penser que les activités des ferments cellulolytiques et méthaniques sont étroitement associées dans le sol.

Nous avons recherché ensuite quelle était la nature des acides volatils accumulés. Pour cela, nous avons extrait, séparé et dosé les différents acides après 10 jours d'incubation des échantillons de sol en présence d'acétylène. Le tableau III rassemble les résultats obtenus. Nous avons noté sur ce tableau le pourcentage de carbone ajouté transformé en acides volatils. Nous avons également exprimé le pourcentage de chaque acide par rapport à l'acidité totale.

TABLEAU III. — Production d'acides volatils dans le sol à partir de différentes substances carbonées.

Substances utilisées	A. propionique %	A. butyrique %	A. acétique %	Rdt % (*)
Peptone	9	19	72	51
Cellulose	1	28	71	28
Glucose	1,5	36	62,5	59
Témoin	6	21	70	—

Pour les conditions expérimentales, voir le texte et le tableau II.
 (*) Dans cette colonne, figure le rendement carboné de la transformation en acides volatils totaux.

Dans tous les cas, l'acide acétique est le plus abondant (environ 70 %) ; l'acide butyrique représente 20 à 35 p. 100 de l'acidité, et la proportion d'acide propionique est toujours inférieure à 10 p. 100. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux qui ont été obtenus par d'autres auteurs [11, 12].

En conclusion, l'acétylène n'a pas modifié de façon sensible le pourcentage de chacun des acides volatils. Comme l'acétylène n'a pas non plus empêché la formation globale de ces acides, on peut dire qu'il n'a pas exercé une action sensible sur leur production. Son action est donc située au niveau de la réutilisation de ces acides et de leur transformation en CH_4 . L'acétylène semble donc agir directement sur le métabolisme des bactéries méthano-formatrices ; pour le vérifier, nous avons étudié l'action de ce produit sur la formation de CH_4 par des cultures pures.

IV. — INFLUENCE DE L'ACÉTYLÈNE SUR DES CELLULES ENTIÈRES

Nous avons étudié l'action de l'acétylène sur une souche de *Methanosarcina* que nous avons isolée du sol en utilisant un milieu contenant du méthanol comme seule source de carbone et d'énergie.

Nous avons d'abord étudié l'influence de l'acétylène sur des cellules mises en condition de croissance. Pour cela, nous avonsensemencé des tubes contenant 5 ml de milieu de culture avec un inoculum important. La figure 3 montre que, pour une pression partielle d'acétylène supérieure à 0,01 atm, la formation de CH₄ (et corrélativement la croissance) est complètement inhibée. Entre 0 et 0,01 atm, la formation de CH₄ est ralentie.

Nous avons ensuite fait une étude sur des cellules non proliférantes. La figure 4 nous indique que, pour une pression partielle d'acétylène

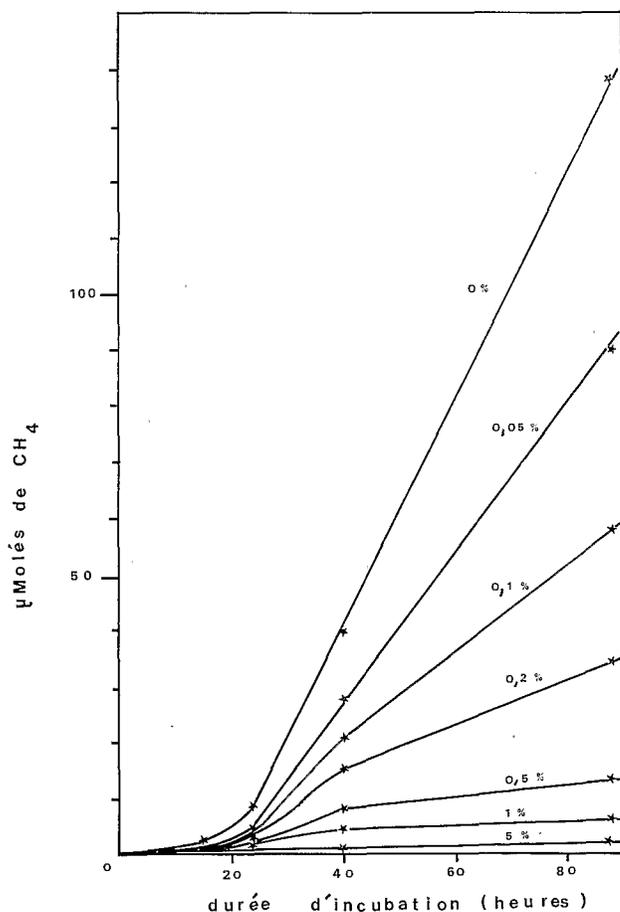


FIG. 3. — Inhibition de la croissance de *Methanosarcina* par différentes concentrations d'acétylène.

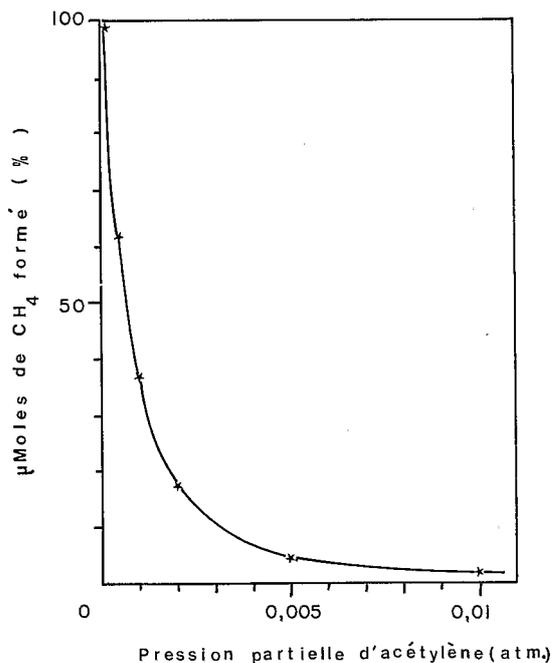


FIG. 4. — Influence de la pression partielle d'acétylène sur l'activité méthano-formatrice de *Methanosarcina*.

de 0,01 atm, l'activité des cellules est réduite à 2 p. 100. La concentration d'acétylène dissous dans la phase liquide est alors de $0,5 \times 10^{-3}$ M environ. Notons que l'addition de méthanol n'augmentait pas sensiblement la vitesse de formation de méthane, car les cellules possédaient un fort métabolisme endogène. C'est donc surtout cette activité endogène que l'acétylène inhibait dans cette expérience.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'étude du blocage de la formation de méthane dans des échantillons de sol incubés sous anaérobiose en présence d'acétylène nous a permis de montrer qu'il s'agit d'une action directe de ce produit sur les ferments méthaniques.

En effet, l'acétylène ne perturbe pas la dégradation de la peptone, de la cellulose et du glucose en acides volatils. Il agit essentiellement au niveau de la réutilisation de ces acides, du CO₂ et de l'hydrogène par les bactéries produisant du méthane. L'étude sur des cellules entières d'une souche de *Methanosarcina* nous a montré que cette inhibition est très forte puisqu'une concentration de $0,5 \times 10^{-3}$ M d'acétylène dissous réduit l'activité méthano-formatrice de 98 p. 100.

Par ailleurs, l'acétylène peut être utilisé comme inhibiteur spécifique de la formation de méthane lors d'études sur le métabolisme de ce produit dans le sol ou dans des cultures. Ainsi, sans avoir eu recours aux produits radioactifs, nous avons montré que dans les sols où existent des conditions d'anaérobiose, la cellulose, la peptone et le glucose sont transformés en acides volatils avec des rendements carbonés de 28, 51 et 59 p. 100 respectivement, et que les rendements en carbone méthanique sont de 16, 19 et 26 p. 100 respectivement.

Le mécanisme de l'inhibition de la formation de méthane par l'acétylène n'est pas connu. On peut penser que ce produit bloque la chaîne de transfert des électrons puisqu'il agit également sur le métabolisme endogène des cellules. Par ailleurs, étant donné que l'acétylène inhibe aussi bien la réduction du CO₂ par l'hydrogène que la réduction du méthanol en méthane, on peut penser que cette action se situe à la fin de cette chaîne. Or Stadtman et Blaylock [10] ont montré que le dernier stade de la réduction (CH₃ - X + 2 H⁺ → CH₄ + X H) implique la vitamine B₁₂. On peut alors émettre l'hypothèse que l'acétylène agit au niveau de la méthylcobalamine en se substituant au groupement - CH₃. Des études seront entreprises dans cette direction.

RÉSUMÉ

Une pression partielle de 0,05 atm d'acétylène empêche toute formation de CH₄ lors d'incubations de sol de rizière en anaérobiose même après addition de différentes substances carbonées. Il a été montré que l'acétylène ne perturbe pas la formation d'acides gras volatils, mais interdit leur réutilisation ultérieure par les germes produisant du CH₄. Il s'agit donc d'une inhibition directe des bactéries méthano-formatrices.

Par ailleurs, la croissance d'une souche de *Methanosarcina* est totalement inhibée par une pression partielle d'acétylène de 0,01 atm. L'activité méthano-formatrice des « resting-cells » de cette bactérie est réduite de 98 p. 100 par une concentration de $0,5 \times 10^{-3}$ M d'acétylène dans la phase liquide. Cette inhibition de la formation de CH₄ par l'acétylène peut être utilisée pour l'étude du métabolisme des bactéries produisant du méthane.

MOTS-CLÉS : Méthane, Acétylène, Sol, Anaérobiose, Carbone, *Methanosarcina*; Rizière, Métabolisme, Inhibition.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BELL, R. G., Studies on the decomposition of organic matter in flooded soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1969, 1, 105-116.
- [2] BROUZES, R. & KNOWLES, R., Inhibition of growth of *Clostridium pasteurianum* by acetylene: implication for nitrogen fixation assay. *Canad. J. Microbiol.*, 1971, 17, 1483-1489.

- [3] BULLEN, W. A., VARNER, J. E. & THOMPSON, R. H. S., Separation of organic acids from plant tissues. *Analyt. Chem.*, 1952, 24, 187-190.
- [4] ELLEWAY, R. F., SABINE, J. R. & NICHOLAS, D. J. D., Acetylene reduction by rumen microflora. *Arch. Mikrobiol.*, 1971, 76, 277-291.
- [5] HARDY, R. W. F., HOLSTEN, R. D., JACKSON, E. K. & BURNS, R. C., The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 1968, 43, 1185-1207.
- [6] HUNGATE, R. E., The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bact. Rev.*, 1950, 14, 1-49.
- [7] KOYAMA, T., Biogeochemical studies on lake sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen. Recent researches in the fields of hydrosphere and nuclear geochemistry. Maruzen Co. Ltd., Tokyo, 1964, 143-177.
- [8] SMITH, P. H. & MAH, R. A., Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.*, 1966, 14, 368-371.
- [9] STADTMAN, T. C. & BARKER, H. A., Studies on the methane fermentation. IX. The origin of methane in the acetate and methanol fermentations by *Methanosarcina*. *J. Bact.*, 1951, 61, 81-86.
- [10] STADTMAN, T. C. & BLAYLOCK, B. A., Role of B₁₂ compounds in methane formation. *Fed. Proc.*, 1966, 25, 1657-1661.
- [11] TAKAI, Y. & KAMURA, T., The mechanism of reduction in waterlogged paddy soil. *Folia Microbiol.*, 1966, 11, 304-313.
- [12] TAKIJIMA, Y., Studies on organic acids in paddy field soils with reference to their inhibitory effects on the growth of rice plants. II. Relations between production of organic acids in waterlogged soils and the root growth inhibition. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1964, 10, 212-219.
- [13] TOERIEN, D. F. & SIEBERT, M. L., A method for the enumeration and cultivation of anaerobic « acid-forming » bacteria present in digesting sludge. *Water Res.*, 1967, 1, 397-404.
- [14] WOLIN, E. A., WOLFE, R. S. & WOLIN, M. J., Viologen dye inhibition of methane formation by *Methanobacillus omelianskii*. *J. Bact.*, 1964, 87, 993-998.
- [15] WOLIN, E. A., WOLIN, M. J. & WOLFE, R. S., Formation of methane by bacterial extracts. *J. biol. Chem.*, 1963, 238, 2882-2886.
- [16] YAMANE, I. & SATO, K., Decomposition of glucose and gas formation in flooded soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1964, 10, 127-133.
- [17] YAMANE, I. & SATO, K., Method of extracting organic acid from flooded soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1967, 13, 113-120.