

UNIVERSITE DE PROVENCE

AIX-MARSEILLE I

THESE

présentée par

Bernard OLLIVIER

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR - MENTION SCIENCES

(Biologie Cellulaire - Microbiologie)

**FERMENTATION METHANIQUE
PAR DES CULTURES MIXTES DEFINIES
DE BACTERIES THERMOPHILES**

Soutenue le 12 Novembre 1987 devant la Commission d'examen

**MM. J. BARATTI
J.P. BELAICH (Rapporteur)
J.L. GARCIA
H. PETITDEMANGE (Rapporteur)
A.J.B. ZEHNDER (Rapporteur)**

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie ORSTOM de Marseille sous la direction scientifique de **J.L. Garcia**. Qu'il me soit permis de le remercier pour le soutien qu'il n'a cessé de me prodiguer.

J'adresse ma profonde reconnaissance au Professeur **R.A. Mah** de l'Université de Californie Los Angeles qui m'a initié aux techniques de l'anaérobiose.

Je tiens à remercier MM. les professeurs **J.P. Belaich, J. Baratti, H. Petitdemange** et **J.B. Zehnder** d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens enfin à exprimer toute ma gratitude à mes collègues du laboratoire **ORSTOM** et spécialement à **N. Smiti** pour l'aide qu'ils m'ont apportée au cours de ce travail.

A mon épouse,

A mes parents,

A ma fille

SOMMAIRE

	Page
I - INTRODUCTION	1
II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
A - Les bactéries de la méthanogénèse	4
1 - Microbiologie de l'acidogénèse	4
2 - Microbiologie de l'homoacétogénèse	5
3 - Les bactéries méthanogènes	6
3 - 1 - Habitat	10
3 - 2 - Ultrastructure	10
3 - 3 - Physiologie	13
3 - 4 - Biochimie de la méthanogénèse	15
B - Les cultures mixtes	18
III - MATERIEL ET METHODES	
A - Isolement de bactéries anaérobies thermophiles	24
1 - Inocula utilisés	24
2 - Préparation des milieux de culture	24
2 - 1 - Les techniques de l'anaérobiose	24
2 - 2 - Les milieux de culture	24
2 - 3 - Techniques d'isolement des souches bactériennes	26
2 - 3 - 1 - Les bactéries non méthanogènes	26
2 - 3 - 2 - Les bactéries méthanogènes	26
3 - Les techniques d'analyse	
3 - 1 - Analyse des gaz	27
3 - 1 - 1 - Analyse du méthane	27
3 - 1 - 2 - Analyse de l'hydrogène et du gaz carbonique	27
3 - 2 - Analyse de la phase liquide	28
3 - 2 - 1 - Analyse des acides gras volatils (AGV)	28

3 - 2 - 2 - Analyse des acides organiques	28
3 - 2 - 3 - Analyse des alcools	29
3 - 3 - Analyse des paramètres physicochimiques	29
3 - 4 - Préparation d'une solution d'ADN	30
3 - 4 - 1 - Méthode de purification de l'ADN	30
3 - 5 - Microscopie	32
B - Les cultures mixtes	32
1 - Les microorganismes utilisés	32
1 - 1 - Les bactéries acidifiantes	32
1 - 2 - Les bactéries méthanogènes	32
2 - Les milieux de culture	33
2 - 1 - Milieu de culture pour l'expérience sur gélatine	33
2 - 2 - Milieu de culture pour l'expérience sur cellulose, pectine et pulpes de betterave sucrière	33
3 - Les techniques d'analyse	34
3 - 1 - Dosage des protéines	34
3 - 2 - Dosage des sucres totaux	36

IV - RESULTATS

A - Isolement de bactéries thermophiles intervenant dans la méthanogénèse	37
1 - Isolement et caractérisation d'une bactérie thermophile anaérobie dégradant les protéines (souche BT)	37
1 - 1 - Isolement	37
1 - 2 - Morphologie	38
1 - 3 - Conditions optimales de croissance	38
1 - 4 - Substrats utilisés	38
1 - 5 - Activité métabolique	38
1 - 6 - Discussion	38
2 - Isolement et caractérisation de bactéries méthanogènes thermophiles hydrogénophiles	47
2 - 1 - Isolement d'une bactérie appartenant au genre <i>Methanobacterium</i>	47
2 - 1 - 1 - Isolement	47
2 - 1 - 2 - Morphologie	48
2 - 1 - 3 - Conditions optimales de croissance	48
2 - 1 - 4 - Substrats utilisés	48

2 - 1 - 5 - Discussion	48
2 - 2 - Isolement d'une bactérie appartenant au genre <i>Methanogenium</i> (souche Mg)	54
2 - 2 - 1 - Isolement	54
2 - 2 - 2 - Morphologie	54
2 - 2 - 3 - Conditions optimales de croissance	54
2 - 2 - 4 - Substrats utilisés	57
2 - 2 - 5 - Exigences nutritionnelles	57
2 - 2 - 6 - Discussion	57
3 - Isolement et caractérisation d'une bactérie méthanogène thermophile acétoclaste (souche MP)	63
3 - 1 - Isolement	63
3 - 2 - Morphologie	63
3 - 3 - Conditions optimales de croissance	63
3 - 4 - Substrats utilisés	68
3 - 5 - Exigences nutritionnelles	68
3 - 6 - Discussion	68
B - Les cultures mixtes définies	73
1 - Les expériences sur gélatine	73
1 - 1 - Etude de l'association : <i>Thermobacteroides</i> <i>proteolyticus</i> + <i>Methanobacterium</i> sp (TM)	73
1 - 1 - 1 - Production des gaz	73
1 - 1 - 2 - Analyse de la phase liquide	76
1 - 2 - Etude de l'association : <i>T. proteolyticus</i> + <i>Methanosarcina</i> MP (TS)	76
1 - 3 - Etude de l'association : <i>T. proteolyticus</i> + <i>Methanobacterium</i> sp + <i>Methanosarcina</i> MP (TMS)	76
1 - 3 - 1 - Production des gaz	76
1 - 3 - 2 - Analyse de la phase liquide	82
2 - Les expériences sur cellulose	82
2 - 1 - Etude de l'association : <i>Clostridium</i> <i>thermocellum</i> + <i>Methanobacterium</i> sp (CM)	85
2 - 1 - 1 - Production des gaz	85
2 - 1 - 2 - Analyse de la phase liquide	85
2 - 2 - Etude de l'association : <i>C. thermocellum</i> + <i>Methanosarcina</i> MP (CS)	90
2 - 3 - Etude de l'association : <i>C. thermocellum</i> + <i>Methanobacterium</i> sp + <i>Methanosarcina</i> MP (CMS)	90
2 - 3 - 1 - Production des gaz	90
2 - 3 - 2 - Analyse de la phase liquide	90
2 - 4 - Etude de l'association : <i>C. thermocellum</i> +	

<i>Methanobacterium</i> sp + <i>Methanosarcina</i> MP (CMS) + 5 mM de méthanol	93
3 - Les expériences sur pectine	93
3 - 1 - Produits du métabolisme de <i>C. thermocellum</i>	93
3 - 2 - Etude de différentes associations bactériennes sur pectine	97
4 - Les expériences sur pulpes de betterave sucrière	97
4 - 1 - Etude des associations : C, T, CT, CM, TM	97
4 - 1 - 1 - Dégradation des pulpes de betterave sucrière	97
4 - 1 - 2 - Production des gaz	100
4 - 1 - 3 - Analyse de la phase liquide	100
4 - 2 - Etude des associations : CTM, CMS, TMS	104
4 - 2 - 1 - Dégradation des pulpes de betterave	104
4 - 2 - 2 - Production des gaz	111
4 - 2 - 3 - Analyse de la phase liquide	111
4 - 3 - Etude de l'association CTMS	112
5 - Discussion	117
5 - 1 - Les expériences sur gélatine	117
5 - 2 - Les expériences sur cellulose	118
5 - 3 - Les expériences sur pectine	120
5 - 4 - Les expériences sur pulpes de betterave sucrière	120
V- CONCLUSION	122
VI- BIBLIOGRAPHIE	124
ANNEXE	134

I - INTRODUCTION

La récente crise énergétique a accru l'intérêt que l'on porte de nos jours aux bactéries produisant du méthane. Le prix des hydrocarbures fossiles a atteint dans les Pays en Développement (PED) un tel seuil qu'il devient souhaitable pour l'avenir d'envisager une production du méthane à l'échelle industrielle.

La méthanogénèse est déjà une réalité dans plusieurs pays, notamment pour le traitement des fumiers et lisiers. La production de méthane à partir de ces substrats permet à des petites unités (fermes ou villages) de mieux équilibrer leurs dépenses énergétiques.

Dans le monde, les quantités de déchets urbains ou agricoles non utilisés sont phénoménales. Ils sont le plus souvent représentés sous forme de cellulose, de sucres, d'amidon etc. Les potentialités énergétiques de ces déchets sont énormes. Bien que dans le cas des déjections animales, la méthanogénèse se réalise naturellement grâce à l'intervention d'une flore bactérienne adaptée, il n'en est pas de même pour certains résidus (agricoles ou autres) pour lesquels la flore méthanogène est absente. A ce niveau les microbiologistes ont un rôle prépondérant à jouer, car ils doivent réaliser un inoculum pour la digestion anaérobie de ces résidus, avec comme étape finale le méthane. Cependant, afin d'optimiser le rendement en biogaz, il est avant tout nécessaire d'étudier tous les microorganismes qui interviennent au cours de la méthanogénèse et de déterminer ceux qui y jouent un rôle essentiel. L'ensemble de ces données devrait permettre d'établir une population bactérienne idéale pour un résidu donné.

La fermentation méthanique est un processus anaérobie strict de conversion d'un substrat carboné en acides gras volatils, acides organiques, alcools, gaz carbonique et hydrogène puis finalement en méthane. Dans la nature, la digestion anaérobie s'opère principalement dans les marais, les rizières, les sédiments lacustres et marins, les sources thermales sulfureuses, le tractus digestif de l'homme et des animaux (surtout des ruminants). On estime à plus de 1 000 milliards de m³ la production annuelle de méthane dans l'atmosphère, production primaire qui serait plus élevée sans la constante oxydation biologique du méthane sur les lieux mêmes de sa production.

Il est actuellement admis que la digestion anaérobie des polymères biologiques (cellulose, protéines, etc...) s'effectue selon les étapes suivantes :

- 1 - Hydrolyse des complexes organiques en molécules simples
(ex : cellulose —> cellobiose —> glucose).

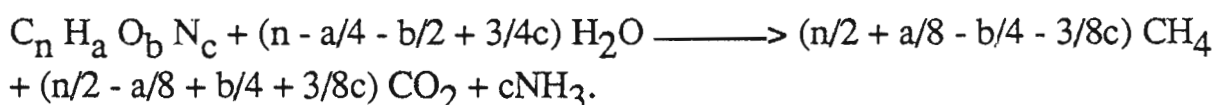
2 - Fermentation des oligomères en acides gras volatils (formiate, acétate, propionate, butyrate), alcool (éthanol), acides organiques (lactate, succinate), et $H_2 + CO_2$. (Fig1).

3 - Acétogénèse et Homoacétogénèse conduisant à la formation d'acétate.

4 - Méthanogénèse *sensus stricto* à partir de l'acétate, du formiate, de $H_2 + CO_2$ (SMITH et MAH, 1966).

70% à 75% du méthane produit dans les digesteurs proviennent de l'acétate tandis que 25% à 30% sont produits à partir de $H_2 + CO_2$.

Selon Buswell et Müller (1952), la dégradation d'un substrat organique en méthane et CO_2 peut globalement être appréhendée par l'équation suivante permettant d'estimer la quantité maximale de méthane pouvant être formée à partir d'un substrat de composition déterminée :



Au cours de ce travail, nous avons entrepris l'étude de la biométhanisation d'un résidu solide d'industrie agroalimentaire (les pulpes de betterave sucrière) par une culture mixte définie de bactéries thermophiles. Ces pulpes sont composées en grande partie, de cellulose, de protéines et de pectine.

La première phase de notre travail a consisté à isoler des bactéries acidifiantes et méthanogènes thermophiles dont certaines ont été associées dans des cultures mixtes définies. Avant de réaliser la biométhanisation des pulpes de betterave nous avons abordé successivement les expériences suivantes :

- la biométhanisation d'un substrat protidique, la gélatine par une culture mixte définie de trois bactéries thermophiles : une bactérie acidifiante (*Thermobacteroides proteolyticus*) et deux bactéries méthanogènes, une hydrogénophile (*Methanobacterium* sp.) et une acétoclaste (*Methanosarcina* MP).

- la biométhanisation de la cellulose par une culture mixte définie de trois bactéries thermophiles: une bactérie cellulolytique (*Clostridium thermocellum*) et les deux bactéries méthanogènes précédentes.

- la biométhanisation de la pectine par la culture mixte utilisée pour la cellulose.

- la biométhanisation des pulpes de betterave par une culture mixte définie composée de l'ensemble des bactéries thermophiles déjà citées.

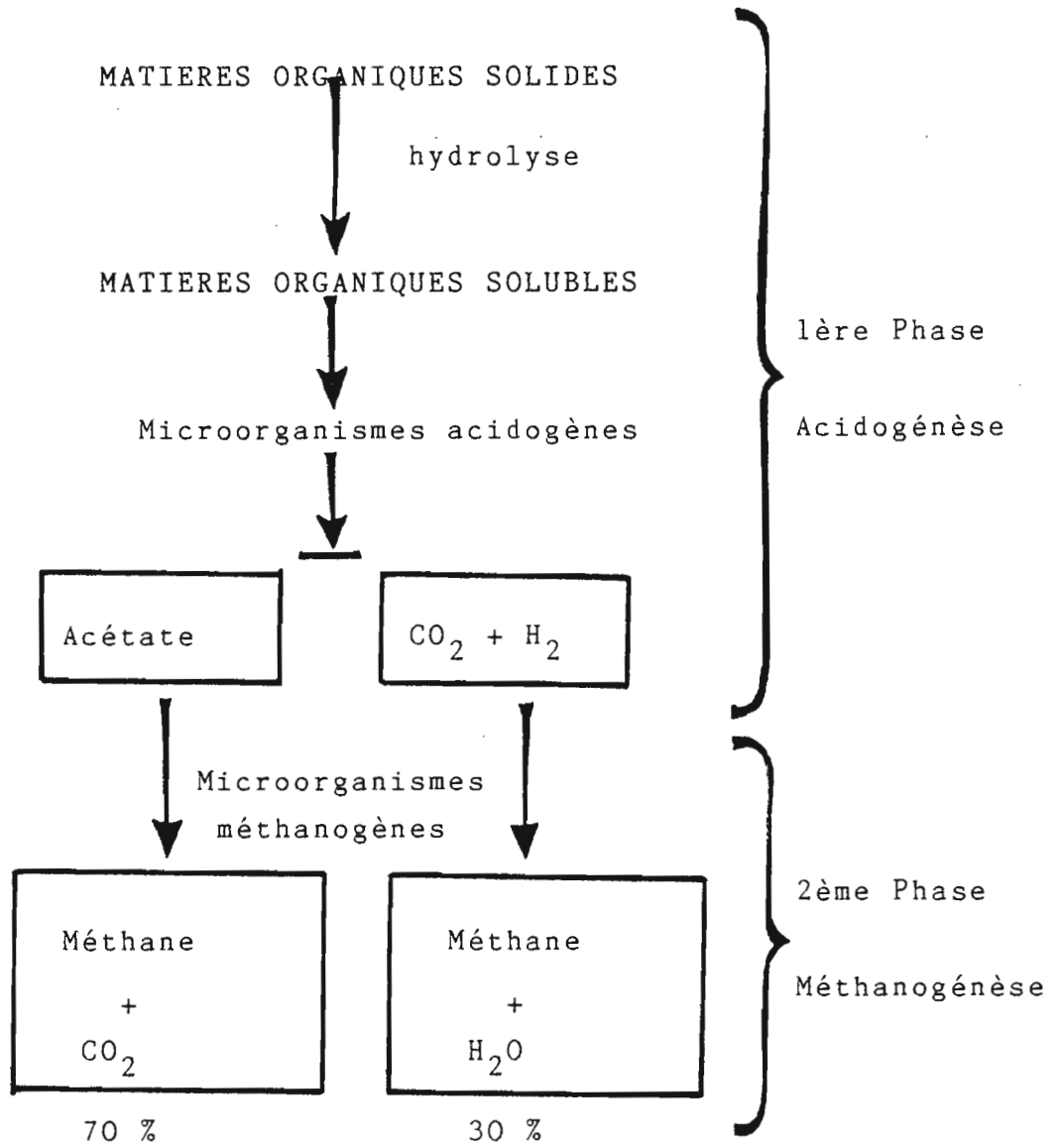


Fig. 1 : Schéma réactionnel de la fermentation méthanique.

II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - LES BACTERIES DE LA METHANOGENESE

La méthanogénèse est un phénomène naturel qui assure la dégradation des composés organiques jusqu'au stade le plus réduit, le méthane.

Il est possible de distinguer trois grandes étapes dans ce phénomène : une étape hydrolytique, une étape d'acétogénèse et une étape de méthanogénèse, chaque étape étant réalisée par différentes catégories de microorganismes qui ont été réparties selon quatre groupes trophiques :

- groupe I : la première étape est réalisée par des bactéries hydrolytiques qui hydrolysent les lipides, les protéines et les glucides (la cellulose principalement) et les transforment en molécules simples (sucres, acides aminés). La seconde étape est réalisée par les groupes II et III de bactéries.

- groupe II : Le groupe II comprend les bactéries fermentaires acidogènes produisant de l'hydrogène et de l'acétate à partir des molécules simples ou de certains acides gras.

- groupe III : Il intervient aussi dans la phase d'acétogénèse mais les bactéries de ce groupe sont dites homoacétogènes et catabolisent les composés monocarbonés (H_2/CO_2 , $HCOOH$) ou hydrolysent des composés multicarbonés en acide acétique uniquement.

- groupe IV : Il comprend les bactéries méthanogènes. Elles réalisent la dernière étape en métabolisant des composés monocarbonés (formiate, H_2/CO_2) ou de l'acétate, en méthane.

Il est important de remarquer qu'à côté de ces quatre groupes se trouve une autre catégorie de bactéries dont l'influence sur la méthanogénèse peut ne pas être négligeable : les bactéries sulfato-réductrices.

1 - Microbiologie de l'acidogénèse

L'acidogénèse est réalisée par les bactéries fermentaires qui interviennent dans la transformation des carbohydrates et des acides gras à longue chaîne en acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate, valérate, etc), acides organiques (lactate, succinate), alcools (éthanol) et $H_2 + CO_2$.

Parmi les facteurs qui influencent l'acidogénèse, on note en particulier la température et le pH. L'acidogénèse peut être réalisée en mésophilie ou en thermophilie. PFEFFER (1974) estime que l'optimum de température en mésophilie est de $42^\circ C$. ; pour ZEIKUS *et al.*, (1975) cet optimum serait de $30^\circ C$. En thermophilie, ces auteurs s'accordent pour estimer que la température maximale est de $60^\circ C$.

La réalisation du processus d'acidogénèse en thermophilie (50° - 60°C) présente quelques avantages : en effet, la solubilisation des matières organiques solides est accentuée et la période de séjour dans les fermenteurs est diminuée.

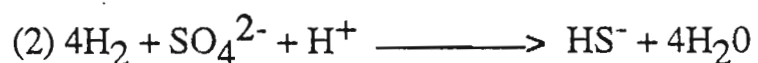
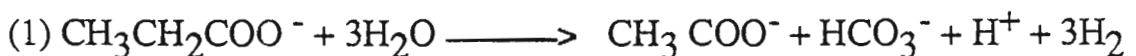
Pour le pH, les résultats de nombreux travaux montrent que la zone optimale de pH se situe entre 6,8 et 7,2 (GHOSH *et al.* , 1975). La plupart des bactéries ont un spectre de pH assez étroit de 6,4 à 7,5 dans lequel leurs fonctions métaboliques sont optimales. La température et le pH ont une action très importante sur la production d'acides lors de la fermentation anaérobie. La vitesse et la production des acides organiques augmentent avec l'élévation de la température et la régulation du pH LOZANO (1979) .

La phase acidogène de la fermentation anaérobie fait intervenir des microorganismes appartenant à des groupes physiologiques variés. Ces bactéries appartiennent à des familles très différentes selon les niches écologiques où elles ont été isolées. Ainsi, les bactéries de la famille des Enterobactéries sont dominantes dans les lisiers de porc (HOBSON et SHAW, 1974). D'autres bactéries appartenant aux genres *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* et *Clostridium* sont couramment isolées dans les digesteurs. On trouve aussi mais en moins grand nombre, des bactéries cellulolytiques du genre *Bacteroides* ou *Ruminococcus* (SCHARER et MOO - YOUNG, 1979) . Au cours de cette phase peuvent intervenir les sulfatoréducteurs, capables de transformer certains acides comme le pyruvate ou le lactate en acétate.

2 - Microbiologie de l'homoacétogénèse

L'homoacétogénèse conduit à la production d'acétate à partir des produits provenant de l'acidogénèse et de sucres libérés lors de l'hydrolyse des polymères biologiques. Différentes bactéries sont impliquées dans cette étape :

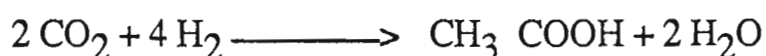
- Les sulfatoréducteurs du groupe II (PFENNIG et WIDDEL, 1981) sont capables de transformer les acides gras (C₃ à C₁₈) en acétate en présence de sulfate (accepteur final d'électrons). Par exemple la dégradation du propionate se réalise suivant la réaction :



Ces bactéries mises en jeu dans la décomposition des AGV appartiennent à de

nouveaux genres récemment décrits par PFENNIG *et al.* (1981). Ce sont en particulier les genres *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*.. En présence d'un tout autre accepteur d'électrons tels que les bactéries méthanogènes utilisant l'H₂, les bactéries sulfatoréductrices du groupe I sont capables de transformer le lactate ou éthanol en acétate (Mc INERNEY et BRYANT, 1981).

- d'autres bactéries sont capables d'oxyder l'hydrogène et de réduire le CO₂ en acétate selon la réaction :



Ces microorganismes sont *Clostridium aceticum* (BRAUN *et al.*, 1981), *C. formiaceticum* (ANDRESEN *et al.*, 1970), *C. thermoautotrophicum* (WIEGEL *et al.*, 1981), *Acetobacterium woodii* (BALCH *et al.*, 1977), *Acetogenium kivui* (LEIGH *et al.*, 1981), *Acetobacterium wieringae* (BRAUN et GOTTSCHALK, 1982), *Acetoanaerobium noterae* (SLEAT *et al.*, 1985), *Sporomusa sphaeroides*, *S. ovata* (MOLLER *et al.*, 1984) et *S. acidovorans* (OLLIVIER *et al.*, 1985). Certaines de ces bactéries telles que *Acetobacterium woodii*, *Sporomusa ovata* ou *S. acidovorans* sont capables de transformer le fructose en acétate. Le rôle de ces bactéries dans la digestion anaérobie n'est pas encore bien élucidé. Elles pourraient intervenir soit comme compétitrices des bactéries méthanogènes utilisant H₂ + CO₂, soit pour favoriser la croissance des bactéries méthanogènes utilisant l'acétate.

Enfin il existe des microorganismes syntrophiques qui peuvent dégrader le propionate (*Syntrophobacter wolinii*, BOONE et BRYANT, 1980) ou le butyrate (*Syntrophomonas wolfei*, Mc INERNEY *et al.*, 1981) en acétate. Ces bactéries ne peuvent se développer sur un tel type de substrat qu'en coculture avec un organisme susceptible d'utiliser H₂ libéré par l'activité de ces bactéries syntrophiques. Si la concentration en H₂ devient trop importante dans le milieu, la croissance de ces bactéries est inhibée. Elles se développent donc le plus souvent en association avec des bactéries sulfatoréductrices (BOONE et BRYANT, 1980) ou méthanogènes (Mc INERNEY *et al.*, 1981). Ces résultats ont mis en évidence l'importance du transfert interspécifique d'hydrogène dans la digestion anaérobie.

3 - Les bactéries méthanogènes

Les bactéries méthanogènes viennent récemment d'être classées dans le nouveau groupe des Archaeobactéries. Cette classification est fonction de particularités au niveau de la séquence en oligonucléotides du 16S - t RNA (BALCH *et al.*, 1979 ; FOX *et al.*, 1977). Ces différences en font un groupe phylogénétique et physiologique distinct chez les Procaryotes. On classe les bactéries méthanogènes en quatorze genres (Tableau 1).

TABEAU 1 : TAXONOMIE DES BACTERIES METHANOGENES

ORDRE	FAMILLE	GENRE	ESPECE	H ₂ + CO ₂	HCOOH	CH ₃ OH	CH ₃ NH ₂	CH ₃ COOH	mésophile	thermophile	HABITAT		
Methano- bacterales	Methano- bacteriaceae	Methano- bacterium	<i>bryantii</i>	+					+		Sédiments		
			<i>formicum</i>	+	+				+		Rumen, séd.		
			<i>thermo- autotrophicum</i>	+							+	Source chaude	
			<i>thermo- alcaliphilum</i>	+							+	Digesteurs	
			<i>thermo- aggregans</i>	+							+	"	
			<i>uliginosum</i>	+						+		"	
	<i>wolfei</i>	+							+	"			
Methano- thermaceae	Methano- planaceae	Methano- thermus	<i>arboriphilus</i>	+					+		Arbres, sol		
			Methano- brevibacter	<i>ruminantium</i>	+	+				+		Rumen	
				<i>smithii</i>	+	+				+		Lisier, séd.	
Methano- sphaera	<i>stadmaniae</i>	+		+				+		Intestin			
Methano- thermus	<i>fervidus</i>	+							+	Source chaude			
Methano- planaceae	<i>Methanoplanus</i>	<i>limicola</i>	+	+					+		Sédiments		
Methanococcales	Methano- coccaceae	Methanococcus	<i>deltae</i>	+	+				+		Sédiments		
			<i>frisius</i>	+	+				+		"		
			<i>halophilus</i>	+	+					+		"	
			<i>jannaschii</i>	+							+	"	
			<i>maripaludis</i>	+	+					+		"	
			<i>thermo- lithotrophicus</i>	+	+						+	"	
			<i>vanniellii</i>	+	+							+	"
			<i>voltae</i>	+	+					+	+	"	

TABLEAU 1 : TAXONOMIE DES BACTERIES METHANOGENES - 8 -

(suite)

ORDRE	FAMILLE	GENRE	ESPECE	H ₂ + CO ₂	HCOOH	CH ₃ OH	CH ₃ NH ₂	CH ₃ COOH	mésophile	thermophile	HABITAT	
Methano- microbiales	Methano- microblaceae	<i>Methano- microblum</i>	<i>mobile</i>	+	+				+		Rumen, sol	
			<i>paynteri</i>	+					+		Sédiments	
		<i>Methanogenium</i>	<i>aggregans</i>	+	+					+		Digesteurs
			<i>bourgense</i>	+	+					+		"
			<i>cariaci</i>	+	+					+		Sédiments
			<i>frittonii</i>	+	+						+	"
			<i>marisnigri</i>	+	+					+		"
			<i>olentangyl tatii</i>	+	+					+		"
		<i>thermo- philicum</i>	+	+						+	"	
		<i>Methanolobus</i>	<i>sicilliae</i>					+	+		+	
<i>tindarius</i>						+	+		+		"	
<i>vulcani</i>						+	+		+		"	
<i>Methano- coccoides</i>		<i>methylutens</i>			+	+		+		Sédiments		
<i>Methano- spirillum</i>		<i>hungatei</i>		+	+				+		Digesteurs	

TABLEAU 1 : TAXONOMIE DES BACTERIES METHANOGENES - 9 -

(suite et fin)

ORDRE	FAMILLE	GENRE	ESPECE	H ₂ + CO ₂	HCOOH	CH ₃ OH	CH ₃ NH ₂	CH ₃ COOH	mésophile	thermophile	HABITAT
Methano- microbiales	Methano- sarcineae	Methano- sarcina	<i>acellvorans</i>			+	+	+	+		Sédiment
			<i>barkeri</i>	+							
<i>mazel</i>	+									"	
<i>thermophila</i>									+	"	
CHTI 55 MP										+	"
		Methanothrix	<i>concllil</i>					+	+		Boues
	<i>soehngenil</i>							+	+		Digesteurs
	<i>thermo- acetophila</i>							+		+	"
		Methano- plasma	<i>ellsabethil</i>	+	+				+		Digesteurs

Les bactéries impliquées dans la production de méthane peuvent se présenter sous forme de batonnets, de spirilles (*Methanospirillum*), de cocci (*Methanococcus*) être assemblés en longs filaments (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) ou en agrégats (*Methanosarcina*) (Tableau 2).

3.1 - Habitat

Les microorganismes produisant du méthane sont représentés dans diverses niches écologiques. Dans un environnement aquatique, le dégagement de bulles de gaz indique le plus souvent la présence d'une activité méthanogène. Les bactéries méthanogènes sont présentes dans des zones anoxiques où la décomposition de la matière organique se réalise en anaérobiose. C'est ainsi qu'en plus des sédiments aquatiques, on trouve ces bactéries dans le tractus intestinal de l'homme ou des animaux, dans les digesteurs et dans les sols. Ces microorganismes sont aussi présents dans les arbres (ZEIKUS et WARD, 1974), ainsi que dans les algues en décomposition.

Les bactéries méthanogènes sont le site final du transfert des électrons libérés lors de la dégradation anaérobie de la matière organique.

3.2 - Ultrastructure

Les bactéries méthanogènes appartiennent à un groupe phylogénétique distinct au sein des Procaryotes. Certes, il y a de fortes similitudes avec les organismes de ce règne (noyau non individualisé, pas d'appareil de Golgi ou d'Ergastoplasme, etc...) mais il y a aussi de profondes différences notamment en ce qui concerne la structure de la paroi. Ainsi les peptidoglycans sont absents de la paroi des bactéries méthanogènes (KANDLER et KONIG, 1978), tous les acides aminés étant présents sous la forme L. La paroi de ces bactéries n'est pas constituée de muréine ; l'acide N - acetylmuramique qui compose ce polymère est remplacé par les résidus d'acide N - acetylalosaminuronique (HAMMES *et al.*, 1979). Cette structure particulière de la paroi a permis de tester l'effet des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la muréine. Un grand nombre d'antibiotiques n'ont aucun effet sur la croissance des microorganismes méthanogènes (HAMMES *et al.*, 1979), ce sont : la nikkomycine, la penicilline-G, la céphalosporine-C. En jouant sur la sensibilité des microorganismes vis à vis des antibiotiques, certains auteurs ont ainsi pu isoler plus facilement les bactéries méthanogènes (GODSY, 1980 ; ZINDER et MAH, 1979).

La membrane des bactéries méthanogènes présente des différences au niveau des lipides. Alors que les lipides des Eurobactéries sont des esters de glycérol et d'acides gras à longue chaîne, ceux des microorganismes produisant du méthane sont des diethers dans lesquels une unité de glycérol est reliée par une liaison éther à deux molécules de phytanol (WOESE, 1981).

De plus le t-RNA des méthanogènes diffère de celui des Procaryotes typiques

TABEAU 2 : MORPHOLOGIE DES BACTERIES METHANOGENES

GENRE	GRAM	MORPHOLOGIE
<i>Methanobacterium</i>	+	Longs bâtonnets
<i>Methanobrevibacter</i>	+	Bâtonnets courts
<i>Methanosphaera</i>	+	Cellules rondes
<i>Methanothermus</i>	+	Longs bâtonnets
<i>Methanococcus</i>	-	Cocci réguliers
<i>Methanomicrobium</i>	-	Bâtonnets courts incurvés
<i>Methanogenium</i>	-	Cocci très irréguliers
<i>Methanospirillum</i>	-	Longs bâtonnets incurvés
<i>Methanolobus</i>	-	Cocci irréguliers
<i>Methanococcoides</i>	-	Cocci irréguliers
<i>Methanoplanus</i>	-	Formes plates anguleuses
<i>Methanosarcina</i>	+	Sarcines
<i>Methanotherix</i>	-	Bâtonnets-longs filaments
<i>Methanoplasma</i>	-	Mycoplasmes

par le fait qu'il ne contient pas la séquence commune GT CG. Ce t-RNA est dépourvu de l'unité thymine (WOLFE, 1979). BALCH *et al.* (1977) ont comparé les séquences de nucléotides de l'ARN ribosomique 16S afin d'étudier les différences entre les bactéries méthanogènes et les Eubactéries. Pour cela, ils ont fait agir au niveau de l'ARN une ribonucléase qui fragmente cette molécule en petits morceaux contenant un à plusieurs nucléotides. Chaque fragment est considéré comme un mot dont on détermine très précisément la séquence des bases. Ensuite, les mots de six lettres ou plus sont rassemblés dans un dictionnaire. La comparaison des dictionnaires de deux organismes s'établit par le calcul du coefficient d'association S_{AB} . Ce coefficient est le rapport entre le double du nombre de lettres dans les mots de six lettres minimum communs aux organismes A et B et le nombre total de lettres dans tous les mots A et B. S_{AB} révèle le degré de proximité phylogénétique de deux organismes. Plus le rapport S_{AB} est grand, plus la relation est étroite. Il a été ainsi montré avec ces valeurs que les bactéries méthanogènes étaient très distinctes des Procaryotes typiques et des Eucaryotes (BALCH *et al.*, 1977). Elles forment une famille très particulière que l'on appelle les Archaeobactéries (WOESE, 1981). A cette famille appartiennent également les bactéries thermoacidophiles (*Sulfolobus*, *Termoplasma*) et les bactéries halophiles, dont certaines se développent facilement dans les saumures. Ces bactéries se rapprochent des bactéries méthanogènes, non seulement par la valeur du coefficient S_{AB} , mais aussi par les caractéristiques morphologiques propres aux méthanogènes (paroi et membrane). Les Archaeobactéries sont aussi différentes des Procaryotes que des Eucaryotes. Elles constituent un nouveau règne avec ses originalités. Il y aurait donc trois lignées : les archaeobactéries, les vraies bactéries ou les Eubactéries et les Eucaryotes. Les archaeobactéries étaient vraisemblablement dominantes à l'époque où sur la terre l'environnement était anoxique. Aujourd'hui, on ne les trouve que dans des endroits très spécifiques où s'établit l'anaérobiose. Un certain nombre de caractères sont propres aux bactéries méthanogènes.

Il a été montré que ces bactéries possédaient un cofacteur, le coenzyme M (CoM), qui intervient comme transporteur du groupe méthyl dans la méthanogénèse (TAYLOR et WOLFE, 1974). Ce coenzyme est constitué de trois sous unités : la sous-unité A est un complexe hydrogénasique, la sous-unité B est un coenzyme stable à la chaleur et la sous-unité C, une protéine non sensible à l'oxygène. En présence d'ATP, de Mg et sous une atmosphère d'hydrogène, le groupe méthylé, fixé par le CoM ($\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CoM}$), est réduit stoechiométriquement en méthane (GUNSALUS et WOLFE, 1978). Ce coenzyme M est absent chez *Methanobrevibacter ruminantium*, mais la culture de ce microorganisme nécessite ce facteur présent dans le jus de rumen (TAYLOR *et al.*, 1974).

Les bactéries méthanogènes possèdent également un composé fluorescent, le facteur F_{420} qui intervient dans les réactions d'oxydoréduction (réduction du NADP) au cours de la méthanogénèse. Ce facteur est associé à un enzyme qui est dénaturé en présence d'oxygène et devient donc non fonctionnel (CHEESEMAN *et*

al . ,1972).

Outre ces particularités, les méthanogènes possèdent également le facteur F₃₄₂, le composé B, le facteur F₄₃₀ et le facteur CDR qui sont indispensables pour la réduction du CO₂ ou de l'acétate en méthane.

3 . 3 - Physiologie

La croissance des bactéries méthanogènes se réalise en anaérobiose et ne s'établit que sous certaines conditions. Il est important de préciser que les exigences nutritionnelles des microorganismes produisant du méthane varient d'une souche à l'autre. En effet, on rencontre des bactéries qui nécessitent des facteurs de croissance présents dans le jus de rumen (*Methanobacterium ruminantium*), d'autres croissent en autotrophie (*M. thermoautotrophicum*). Cependant il apparaît que l'addition de composés complexes tels que l'extrait de levure ou la biotrypcase, stimule la croissance des méthanogènes (MAH *et al.* , 1978). Il a été récemment montré que des bactéries méthanogènes étaient aussi capables de réduire le soufre (STETTER et GAAG, 1983) ou de fixer N₂ (MURRAY et ZINDER, 1984 ; BOMAR *et al.* , 1985). Certains paramètres physicochimiques influent sur la croissance des bactéries méthanogènes dans leur ensemble, ce sont :

- le Eh

En général, on rencontre les bactéries méthanogènes dans des biotopes où les valeurs du Eh sont égales ou inférieures à -200 mV (MAH *et al.* , 1977), ce qui n'est pas étonnant étant donné la faible tolérance de ces microorganismes vis à vis de potentiels d'oxydo-réduction élevés. Pour obtenir une culture de bactéries méthanogènes, il faut donc nécessairement utiliser des réducteurs puissants du type cystéine ou Na₂S afin d'atteindre des Eh assez faibles qui permettent la croissance de ces bactéries.

- le pH

La valeur du pH est prépondérante pour les bactéries productrices de méthane. La plupart se développent à un pH proche de la neutralité (6,5 - 7,5), la croissance ne s'établissant pas à des pH au voisinage de 6 et supérieurs ou égaux à 8. Il existe cependant quelques exceptions telles que *Methanococcus vannielii* qui présente un pH optimum entre 8,0 et 8,5 (JONES et STADTMAN, 1977), ainsi que *Methanobrevibacter arboriphilus* dont la croissance est maximale entre 7,5 et 8,0 (ZEIKUS et HENNING, 1975).

- la température

C'est en mésophilie que l'on trouve la plupart des bactéries méthanogènes. Les températures favorables à la croissance de ces bactéries se situent entre 30°C et 40°C, le maximum de production de CH₄ étant atteint aux alentours de 40°C. Il existe toutefois plusieurs espèces thermophiles qui cultivent entre 65°C et 70°C, dont *Methanothermus fervidus* (STETTER *et al.*, 1981) (Tableau 1). Trois autres souches modérément thermophiles appartenant au genre *Methanosarcina* ont été récemment décrites par ZINDER et MAH (1979), OLLIVIER *et al.* (1984) et TOUZEL *et al.* (1985).

- Effet des sulfates

En présence de fortes concentrations en sulfates, la méthanogénèse est stoppée (WINFREY et ZEIKUS, 1977). Toutefois il semblerait que ces sulfates soient bénéfiques, en faible quantité, pour la croissance des bactéries méthanogènes. Ils le sont d'autant plus lorsqu'on ajoute du fer dans le milieu (VAN DER BERG *et al.*, 1980).

Le sulfate joue le rôle d'accepteur final d'électrons chez les bactéries sulfatoréductrices. Lorsqu'on le trouve en quantités importantes dans le milieu, il favorise la multiplication des sulfatoréducteurs et stimule donc l'utilisation de certains substrats tels que le pyruvate, le lactate, l'hydrogène et surtout l'acétate (substrat clé lors de la méthanogénèse).

Dans de telles conditions la production de méthane est arrêtée. Cependant, si l'on ajoute un excès d'H₂ et d'acétate, on s'aperçoit que la méthanogénèse reprend, ce qui suggère que ces deux substrats sont utilisés en compétition par les bactéries méthanogènes et sulfatoréductrices (WINFREY et ZEIKUS, 1977). Les sulfates ne sont donc pas toxiques pour les méthanogènes ; ils favorisent plutôt la croissance des bactéries sulfatoréductrices sur des substrats tels que l'acétate ou l'H₂, susceptibles d'être utilisés par les méthanogènes.

- Le nitrate et dérivés

Le nitrate et le nitrite inhibent la méthanogénèse lorsque ces deux produits sont présents dans le milieu. Les oxydes nitrique et nitreux ont les mêmes conséquences sur cette étape de la digestion anaérobie (BALDERSTONE et PAYNE, 1976). Toutefois la reprise de la méthanogénèse pourra s'établir lorsque ces formes azotées seront consommées, notamment par la flore dénitrifiante. L'effet inhibiteur de ces composés serait dû à des changements au niveau du potentiel d'oxydation, ou bien à des problèmes de compétitions de substrats (BELL, 1969 ; BOLLAG et CZLONKOWSKI, 1973). Dans le cadre des inhibitions vis à vis de la flore méthanogène, on notera enfin que RAIMBAULT a montré en 1975 l'influence inhibitrice de l'acétylène sur la formation biologique du méthane.

3.4 - Biochimie de la méthanogénèse

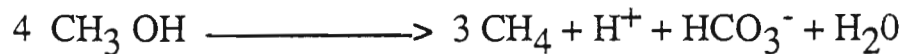
Comme nous l'avons vu précédemment, la plupart des bactéries méthanogènes utilisent H_2+CO_2 pour produire du méthane selon la réaction :



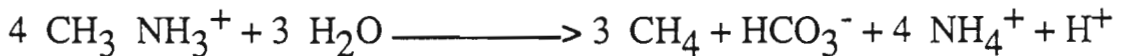
Les espèces des genres *Methanobolus* (KÖNIG et STETTER, 1982), *Methanococoides* (SOWERS et FERRY, 1984), *Methanothrix* et *Methanosphaera* (MILLER et WOLIN, 1985) sont incapables de réaliser cette réaction de même que les espèces thermophiles du genre *Methanosarcina* (ZINDER et MAH, 1979). Le formiate est aussi un substrat pour la flore méthanogène :



Enfin seuls les microorganismes appartenant au genre *Methanosarcina* sont capables de transformer l'acétate, le méthanol, et les méthylamines en méthane. Ces substrats, excepté l'acétate, sont utilisés par *Methanobolus tindarius* où les espèces du genre *Methanococoides*. Les espèces du genre *Methanothrix* n'utilisent que l'acétate :



méthanol

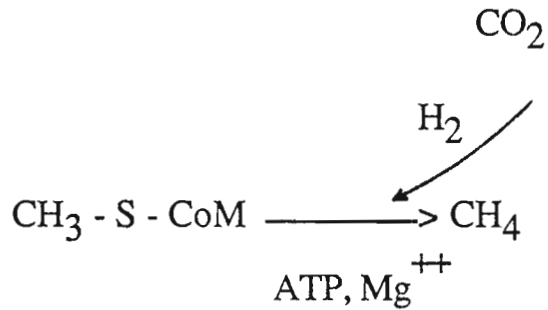


méthylamine

Bien que la plupart des mécanismes intervenant dans la réduction du CO_2 en méthane ne soient pas totalement élucidés, on connaît l'importance et le rôle de certains facteurs au cours de cette étape :

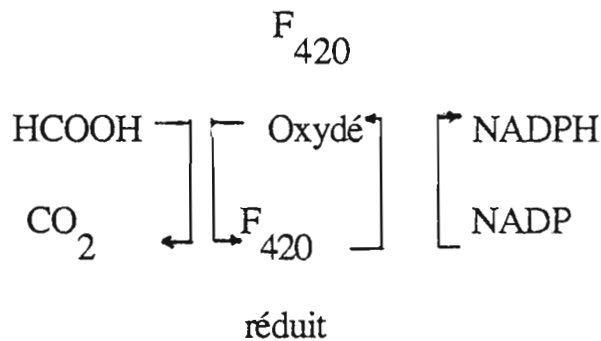
Le coenzyme M (Mc BRIDE et WOLFE, 1971) indispensable à la croissance de *M.rumimantium* est un facteur transporteur du groupement méthyl, en présence d'ATP, de Mg^{++} et d' H_2 . Le système méthyl CoM-réductase permet de catalyser la réaction qui transforme $CH_3 - S - CoM$ en CH_4 .

ATP, de Mg^{++} et d' H_2 . Le système méthyl CoM-réductase permet de catalyser la réaction qui transforme $CH_3 - S - CoM$ en CH_4 .



Cette réaction est activée en présence de CO_2 (WOLFE, 1979). Avant de parvenir à cette forme méthylée du CoM, le CO_2 est pris en charge par un transporteur XH ($XCOOH$) (Fig 2a). Ce composé est ensuite réduit ($XCHO$) (Fig 2b) en présence d'un facteur CDR (facteur indispensable pour la réduction du CO_2 en méthane). C'est à ce moment là qu'intervient le CoM qui fixe le groupement formyl et libère ainsi le transporteur X. Après réduction, le CoM passe sous la forme hydroxyméthylée ($HOH - CH_2 - S - CoM$) (Fig 2c) qui de nouveau réduite donne le méthyl CoM (Fig 2d). Il y a alors production de méthane (Fig 2e) (WOLFE, 1979).

Un autre coenzyme, le facteur F_{420} est couplé à la réduction du NADP (TZENG *et al.*, 1975) de la façon suivante :



Les électrons provenant du NADPH sont utilisés pour permettre au système méthyl - CoM réducteur, précédemment décrit, de fonctionner (ELLEFSON et

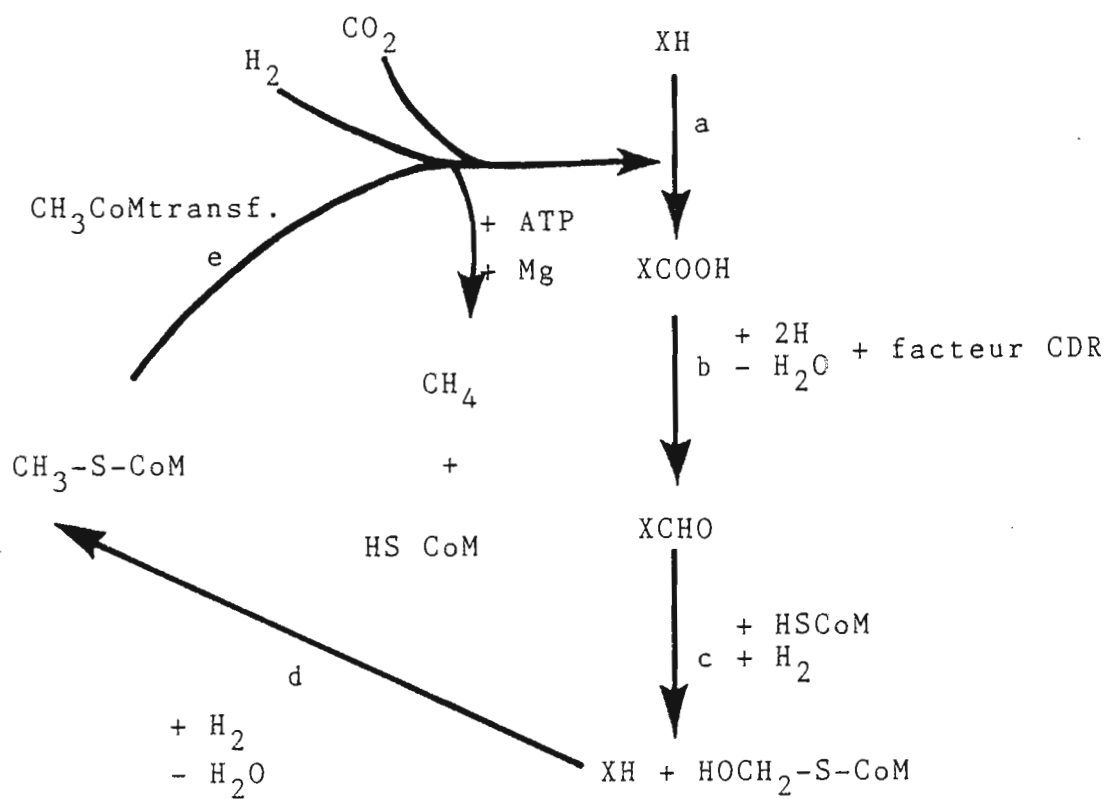


Fig. 2 : Réduction du CO_2 en méthane

WOLFE, 1980). En ce qui concerne l'acétate, c'est le carbone du groupement méthyl qui va former la molécule de méthane (ZEIKUS *et al.*, 1975 ; SMITH et MAH, 1980). La CO-déshydrogénase oxyde la moitié carbonyle de l'acétate et fournit les électrons nécessaires à la réduction du groupement méthyl en méthane (Fig 3) (KRZYCKI et ZEIKUS, 1984 ; KÖHLER et ZEHNDER, 1984).

L'utilisation du méthanol nécessite un transfert du groupement méthyl sur un composé cobamide dérivé d'une forme méthyl-vitamine B₁₂, suivi d'un clivage avec production de CH₄ (BLAYLOCK et STADTMAN, 1964).

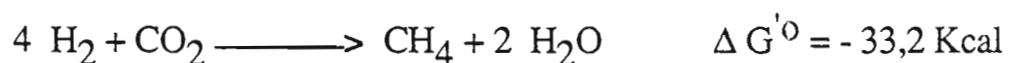
L'acétate est incorporé dans le carbone cellulaire. On le retrouve notamment dans un certain nombre d'acides aminés tels que le glutamate, l'aspartate et l'alanine selon un processus qui met en jeu l'acétyl - CoA (Fig 4) (WEIMER et ZEIKUS, 1979). Cette incorporation de l'acétate au niveau cellulaire a également été démontrée chez *M. thermoautotrophicum* (FUCHS *et al.*, 1978). Dans ce cas toutefois, la voie de synthèse des acides aminés est différente de celle des sarcines. Par exemple le glutamate est synthétisé via la réaction : malate → fumarate → succinate → cétoglutarate → glutamate.

B - LES CULTURES MIXTES

En 1967 BRYANT *et al.* montraient que l'espèce *Methanobacillus omelianskii* correspondait en fait à l'association de deux organismes capables de transformer l'éthanol en acétate + CH₄. *Methanobacillus omelianskii* est composé d'une part d'un organisme S (REDDY *et al.*, 1972) qui transforme l'éthanol en acétate selon la réaction :



Le bilan thermodynamique de cette équation est défavorable. Pour que la décomposition de l'éthanol se réalise, il faut nécessairement déplacer l'équilibre de la réaction en éliminant l' H₂ produit. C'est à ce niveau qu'intervient le deuxième élément de la coculture qui utilise H₂ et le gaz carbonique pour produire du méthane (souche MoH) :



La combinaison de ces deux microorganismes permet ainsi la dégradation de l'éthanol :



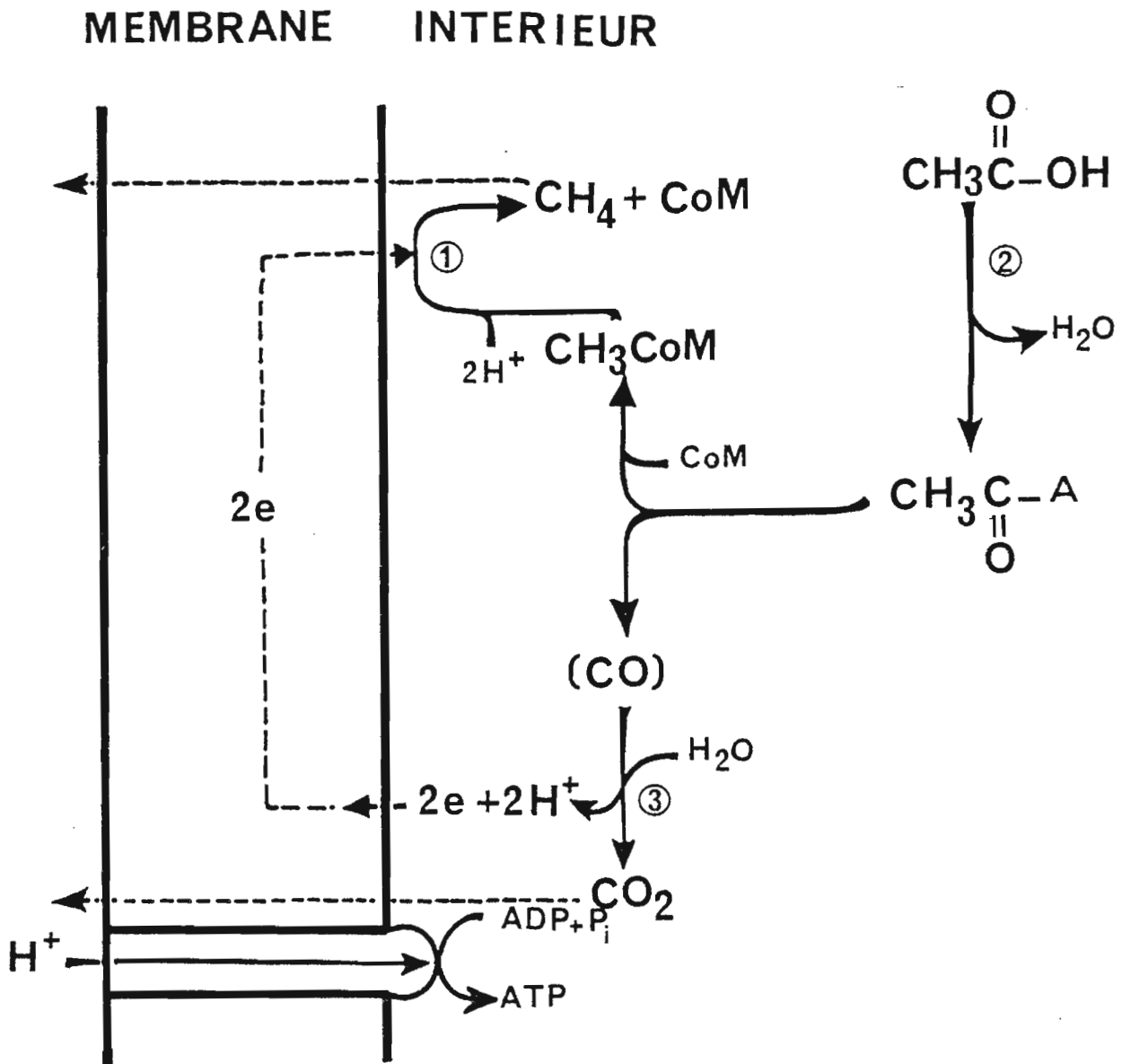


Fig. 3 : Modèle du flux d'électrons et de carbone chez les bactéries méthanogènes poussant sur acétate, selon ZEIKUS *et al.* (1985).

1 : méthylreductase ; 2 : acétate thiokinase ; 3 : CO deshydrogénase.

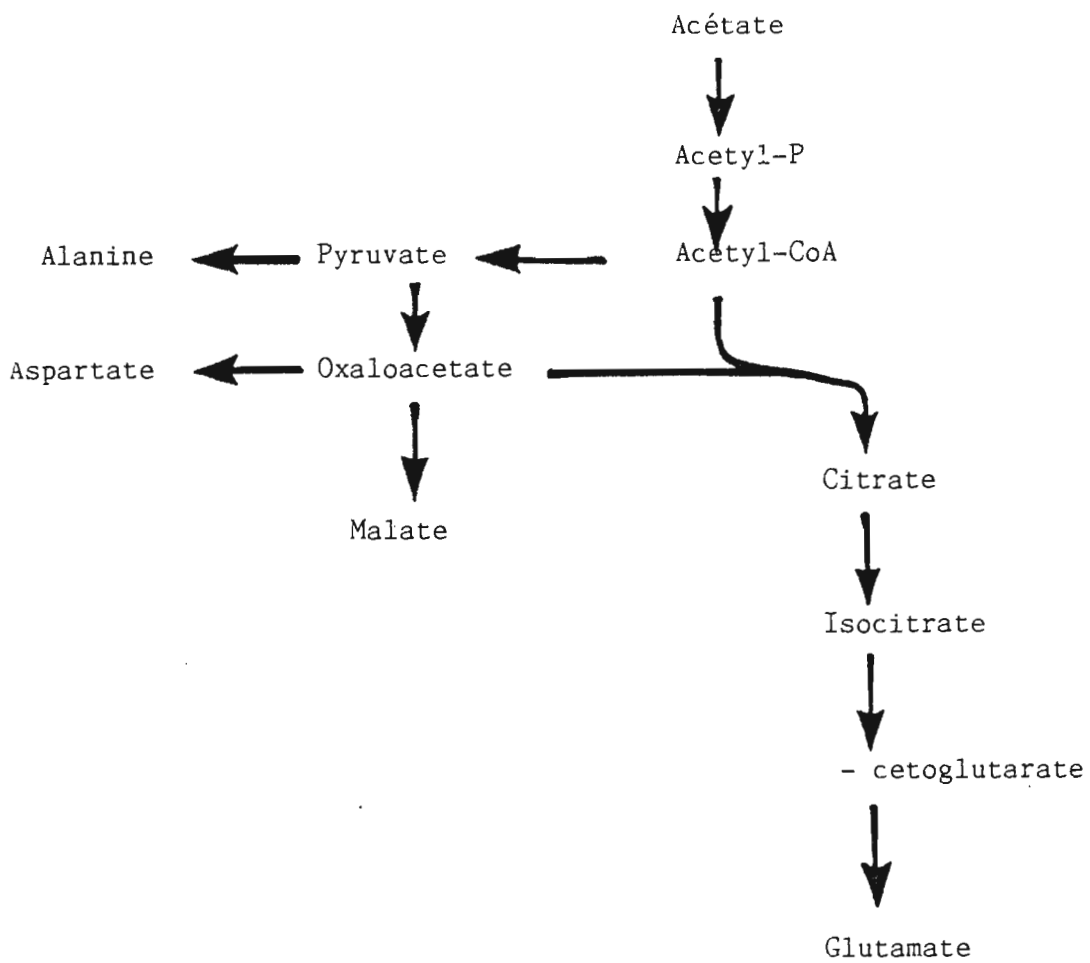


Fig. 4 : Biosynthèse des acides aminés à partir de l'acétate chez *Methanosarcina barkeri*.

Ces résultats mettent en évidence les problèmes liés au concept du transfert interspécifique d'hydrogène. Certaines bactéries ne peuvent croître qu'en présence d'un autre microorganisme capable de consommer l' H_2 qu'elles produisent; elles sont dites syntrophiques : sur propionate par exemple, il faut que *Syntrophobacter wolinii* soit associé à un sulfatoréducteur en présence de sulfate ou à une méthanogène utilisatrice d' H_2 , pour pouvoir utiliser cet acide gras (BOONE et BRYANT, 1980). Cet acide peut être toutefois oxydé par une bactérie sulfatoréductrice en acétate + CO_2 en présence de sulfates : elle appartient au genre *Desulfobulbus* (PFENNIG *et al.*, 1981). Un autre type de transfert interspécifique d'hydrogène a été utilisé par Mc INERNEY *et al.*, (1979). Ces auteurs ont isolé une coculture, capable d'oxyder le butyrate en acétate + H_2 , composée de *Syntrophomonas wolfei* et d'une bactérie sulfatoréductrice utilisatrice d'hydrogène : *Desulfovibrio* G11. La présence de *Desulfovibrio* rend thermodynamiquement plus favorable l'oxydation du butyrate puisque l' H_2 est éliminé par la voie sulfatoréductrice. Ces mêmes auteurs ont également associé *S. wolfei* à une bactérie méthanogène : *M. hungatei*. Il y a alors utilisation de l'isoheptanoate et transformation en acétate, isovalérate et méthane, avec consommation du butyrate et du formiate. Indépendamment de ces bactéries syntrophiques, en absence de sulfates, certaines bactéries sulfatoréductrices associées à des bactéries hydrogénophiles méthanogènes sont capables de dégrader le lactate ou l'éthanol. La coculture *Desulfovibrio desulfuricans* et *Methanobacterium bryantii* transforme l'éthanol en acétate + CH_4 (BRYANT *et al.*, 1977).

Cette sulfatoréductrice associée à *Methanosarcina barkeri* métabolise le lactate en acétate + CO_2 + CH_4 dans un premier temps, puisque *Methanosarcina* utilise tout d'abord H_2 + CO_2 pour produire du méthane. Dans un second temps, l'acétate est transformé en CH_4 lorsque H_2 a été entièrement consommé (Mc INERNEY et BRYANT, 1981 ; TRAORE, 1981).

La recherche de bactéries ou cocultures qui peuvent métaboliser de tels substrats est de première importance en ce qui concerne la digestion anaérobie. Ces produits peuvent s'accumuler dans les digesteurs, il est donc utile de connaître des microorganismes susceptibles de les consommer pour les transformer en méthane.

De nombreux chercheurs se sont intéressés à la réalisation de cultures mixtes capables de transformer certains polymères (la cellulose) ou sucres (glucose) en CH_4 . Ces études ont pour but le plus souvent de travailler avec un minimum de souches pour arriver dans les meilleures conditions au résultat souhaité : la production de méthane. De plus, ces expériences nous permettent de mieux comprendre les interactions pouvant exister entre les différents microorganismes. On pourrait aussi concevoir d'utiliser ces cultures mixtes pour inoculer les déchets

En 1974, SCHEIFFINGER *et al.* étudient le transfert interspécifique d'hydrogène entre des souches différentes de *Selenomonas ruminantium* et *Methanobrevibacter smithii*. *S. ruminantium* est une bactérie qui fermente les carbohydrates en lactate, propionate, acétate et CO₂. Sur cinq souches étudiées, seules HD₄ et PC 18 produisent de l'hydrogène à partir du glucose. Quand ces souches sont cultivées avec *Methanobacterium smithii* ou avec *M.bryantii* (souche MOH) la production d'hydrogène s'accroît de 100 fois ; cette production est calculée à partir du méthane produit assumant la stoechiométrie suivante :



En 1977, CHEN et WOLIN réalisent une expérience avec *S. ruminantium* en coculture avec *M.smithii* ; ils observent une augmentation de la production de propionate et d'acétate.

En 1977, LATHAM et WOLIN étudient la fermentation de la cellulose par *Ruminococcus flavefaciens* en présence et en l'absence de *M. smithii*. *R.flavefaciens* qui est une bactérie anaérobie cellulolytique du rumen, produit principalement de l'acide succinique, acétique et formique, de l' H₂ et du CO₂ à partir de la cellulose. En coculture, l'hydrogène ne s'accumule pas, le formiate n'est pas détecté, le succinate l'est en petite quantité et l'acétate devient le produit majeur de la fermentation avec le méthane.

En 1977, WEIMER et ZEIKUS montrent que *Clostridium thermocellum* associé à *Methanobacterium thermoautotrophicum* produit moins d'éthanol et plus d'acétate. L'hydrogène n'est pas détecté mais la quantité de méthane produit traduit une nette augmentation de la production d'hydrogène ; le butyrate et le lactate ne sont pas affectés. Avec le cellobiose comme substrat, les produits de la fermentation sont identiques mais en coculture, la teneur en éthanol diminue tandis que celle de l'acétate ne varie pratiquement pas. De plus, la production de méthane est faible ; elle s'arrête rapidement et l'hydrogène s'accumule.

En 1981, LAUBE et MARTIN étudient la triculture suivante sur cellulose : *Acetivibrio cellulolyticus* associé à *Desulfovibrio gigas* et à *M.barkeri*. Après 16 jours de fermentation, moins d'hydrogène et d'éthanol sont produits dans la coculture, *A. cellulolyticus* - *D.gigas* que dans la culture pure de *A.cellulolyticus*.. Dans la coculture *A. cellulolyticus* - *M.barkeri* moins d'éthanol et plus d'acétate sont produits, l'hydrogène n'apparaît que transitoirement à un niveau très faible. En triculture, aucun des trois produits précédemment cités ne se sont accumulés.

TRAORE (1981) et TRAORE *et al.* (1983 a,b) réalisent une coculture de *Desulfovibrio vulgaris* et *M.barkeri* sur lactate. Il est mis en évidence un transfert interspécifique d'hydrogène entre les deux bactéries. Récemment, un champignon anaérobie cellulolytique du rumen a été associé à *Methanobrevibacter* souche RA1

et *M. barkeri* souche 227 (MOUNTFORT *et al.* , 1982). La triculture produit 1,3 moles de CH₄ par mole d'hexose consommée.

Enfin en 1984, JONES *et al.* réalisent une culture mixte définie de bactéries, composée d'*Escherichia coli*, *Acetobacterium woodii*, *Desulfovibrio sp.*, *Methanobacterium formicicum* et *Methanosarcina barkeri* afin d'assurer la bioconversion du saccharose en méthane et CO₂ via l'acétogénèse. Avec 0,2% de saccharose, l'association convertit 77% du carbone en CH₄ et CO₂, avec une teneur en méthane d'environ 53%. Avec des charges élevées en saccharose (supérieures à 0,2%), le système a un rendement pauvre en méthane et la dégradation du saccharose est inhibée. En cours d'expérience il y a établissement d'un transfert d'hydrogène entre *E.coli* et les bactéries méthanogènes, entraînant une formation de plus grandes quantités d'acétate au détriment de l'éthanol.

III - MATERIEL ET METHODES

A - ISOLEMENT DE BACTERIES ANAEROBIES THERMOPHILES

1 - Inocula utilisés

La recherche de bactéries strictement anaérobies a été entreprise à partir de l'enrichissement de boues de station d'épuration (boues de Bourg en Bresse) ou de fumiers de bovins sur des résidus de tannerie (expérimentation IRCHA, Vert-le-Petit) dans les proportions suivantes : boues d'épuration (65%), carnasses (25%), déchets divers non tannés (10%). L'enrichissement a été conduit en thermophilie. Au cours de l'expérimentation, il y a eu une forte production de méthane, de l'ordre de 70% du gaz produit. Les résidus de tannerie sont constitués essentiellement de protéines (50%), lipides (16%) et de matières minérales (35%). Une composition plus fine de ces résidus a été établie par le Centre Technique du cuir (Tableau 3). D'autres enrichissements ont été réalisés à partir d'un digesteur alimenté en jacinthes d'eau et inoculé avec un broyat de termites du Congo à 55°C.

2 - Préparation des milieux de culture

2 . 1 - Les techniques de l'anaérobiose

Au cours de notre travail, nous avons utilisé les techniques développées par HUNGATE (1969). Pour la préparation des milieux de culture et de solutions anaérobies de réactifs, nous avons employé une boîte à gants anaérobie (La Cahlène, Bezons, France). Les milieux de culture ont été répartis dans des flacons sérums de 60 ml (ou des tubes à haute pression) selon la technique de BALCH *et al.* (1979).

2. 2 - Les milieux de culture

L'eau qui entre dans la constitution de nos milieux est une eau déionisée Milli - Q (résistivité = 17 M Ω). L'ensemble des milieux utilisés sont rapportés en ANNEXE. Après incorporation de tous les éléments, le milieu est mélangé, ajusté à pH = 7 avec une solution de KOH 10 M. Il est ensuite porté à ébullition pendant 5 minutes sous une atmosphère d'azote exempte d'oxygène. Après réduction de la résazurine, il est refroidi sous azote à température ambiante pendant environ 10 minutes. Le flacon est ensuite bouché et transféré dans la boîte à gants anaérobie. 20 ml de milieu sont répartis dans des flacons sérum de 60 ml, (ou 10 ml de milieu dans des tubes haute pression). Les récipients sont fermés à l'aide de bouchons en

TABLEAU 3 : ANALYSE DES RESIDUS DE TANNERIE

pH	9,3
Résidu sec (RS) g/Kg	230
Matières minérales (% RS)	37
Matières organiques (% RS)	63
Azote N (% RS)	12,0
Carbone C (% RS)	34,0
Chlorure Cl g/Kg	3,0
Phosphates PO_4^{3-} g/Kg	1,0
Calcium Ca^{2+} g/Kg	47,5
Chrome Cr^{3+} g/Kg	7,3
Matières grasses g/Kg	30,0

butyl (Bellco Glass, Inc, Vineland, N.J.). On les sort de la boîte à gants. Ils sont ensuite sertis, puis on introduit l'atmosphère désirée (N_2 ou N_2/CO_2). Après stérilisation à l'autoclave (20 minutes, $120^\circ C$) et avant inoculation, 0,4 ml d'une solution de Na_2S (1%) sont apportés pour 20 ml de milieu. Dans le cas de bactéries méthanogènes, 0,3 ml de $Na_2 CO_3$ (10%) sont ajoutés à 20 ml de milieu, alors que l'on ajoute seulement 0,1 ml de $Na H CO_3$ (10%) pour 20 ml de milieu destiné aux bactéries non méthanogènes. Le pH final de ces milieux est de l'ordre de 7,0. La préparation des milieux pour les roll-tubes se réalise dans les mêmes conditions. 4,5 ml de milieu sont répartis dans chaque tube de culture pyrex (Bellco) fermé avec un bouchon en butyl n°00 (ARTHUR H.THOMAS Co., Philadelphia, Pa.). En ce qui concerne les boîtes de Pétri, le milieu n'est réparti qu'après stérilisation dans l'enceinte anaérobie. Les boîtes sont ensuite incubées dans des containers spéciaux pouvant supporter de fortes pressions (BALCH *et al.*, 1979) et exempts d' O_2 .

2 . 3 -Techniques d'isolement des souches bactériennes

Après enrichissement sur des milieux propres à chaque bactérie, l'isolement de certaines d'entre elles est réalisé à partir de colonies obtenues sur des boîtes de Pétri ou en roll-tubes.

2 . 3 . 1 - Les bactéries non méthanogènes

On les isole à partir des boîtes de Pétri incubées en anaérobiose dans les containers cités précédemment et à partir de roll-tubes.

Les colonies obtenues sur boîtes de Pétri sont étalées sur de nouvelles boîtes. L'opération est répétée plusieurs fois pour assurer la purification des souches qui sont ensuite conservées sur gélose nutritive ou en milieu liquide à $4^\circ C$.

En ce qui concerne les roll-tubes, les colonies sont repiquées en milieu liquide, puis en roll-tubes après croissance de la souche bactérienne jusqu'à l'obtention d'un seul type de colonie. Les souches sont conservées de la même manière que précédemment.

2 . 3 . 2 - Les bactéries méthanogènes

Nous effectuons tout d'abord un enrichissement par repiquages successifs de 1 ml dans 20 ml de milieu neuf. L'apparition de CH_4 est suivie par chromatographie en phase gazeuse. Les colonies peuvent être obtenues après dilution et étalement de la suspension, soit en boîtes de Pétri avec incubation en container anaérobie, soit en roll-tubes préparés avec 1,5% d'agar etensemencés dans la masse au bain marie à $45^\circ C$. Les colonies sont repiquées plusieurs fois dans les mêmes conditions. La purification ultime des souches peut être obtenue par l'emploi d'antibiotiques spécifiques comme la pénicilline (HAMMES *et al.*, 1979). Afin de confirmer si une

souche est pure, il est aussi nécessaire d'ensemencer une suspension de milieu liquide en roll-tubes et de constater la présence d'un seul type de colonie. Il est nécessaire d'inoculer la souche dans un milieu riche contenant extrait de levure, Biotrypcase et Glucose.

3 - Les techniques d'analyse

En ce qui concerne les bactéries non méthanogènes nous avons analysé plus précisément la production d'acides gras volatils, d'acides organiques et d'alcools. Pour l'ensemble des bactéries isolées, nous avons étudié un certain nombre de paramètres pour nous permettre de les identifier : le pH, la température, la tolérance en NaCl, la sensibilité à l'oxygène, le G/C %. Dans certains cas nous avons procédé au suivi de la production des gaz (H_2 , CO_2 ou CH_4).

3 . 1 - Analyse des gaz

3 . 1 . 1 - Analyse du méthane

L'analyse du CH_4 est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse (Varian Aerograph série 2700), muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en acier inox (2m x 1/8") remplie de Porapack Q,80 - 100 mesh. Le gaz vecteur est de l'azote. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Température : - colonne.....190°C
 - injecteur..... 180°C
 - détecteur..... 250°C

Débits gaz : - gaz vecteur, N_2 17 ml/mn
 - air.....300 ml/mn
 - H_230 ml/mn

Echantillon : 0,1 ml de gaz prélevé et injecté à l'aide d'une seringue Hamilton "Pressure Lock".

3 . 1 . 2 - Analyse de l'hydrogène et du gaz carbonique

L'analyse de l'hydrogène est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse (Girdel série 30), muni d'un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) et de deux colonnes en acier inox (1,80 m x 1/8") contenant du carbosphère 60 - 80 mesh. Les conditions opératoires sont les suivantes:

Température : - injecteur..... 105°C
 - colonne.....85°C
 - détecteur..... 150°C
 - débit gaz vecteur N_2 45 ml/mn

- courant filaments..... 90 mA

0,1 ml de gaz est injecté à l'aide d'une seringue Hamilton. Dans ces conditions, le temps d'élution de l'hydrogène est de 13 secondes.

3 . 2 - Analyse de la phase liquide

Les échantillons de 1 ml prélevés lors des expériences sont centrifugés 10 mn à l'aide d'une microcentrifugeuse (MLW TH 12, BIOBLOCK SCIENTIFIC). Le surnageant est recueilli et stocké au congélateur jusqu'au moment de l'analyse.

3 . 2 .1 - Analyse des acides gras volatils (AGV)

L'analyse des AGV est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse (Varian Aerograph série 2700), muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en acier inox de 2,7 m x 1/8" remplie de chromosorb WAW 80 - 100 mesh, imprégnée de 25 % de NPGA (Neopentylglycol adipate) et 2 % d' $H_3 PO_4$. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Température : - colonne.....190°C
 - injecteur..... 240°C
 - détecteur..... 250°C

Débit gaz : - gaz vecteur, N_217 ml/mn
 saturé en acide formique
 - air..... 300 ml/mn
 - H_230 ml/mn

Le surnageant de centrifugation est traité avant analyse en acidifiant 0,5 ml avec 10 μ l de $H_3 PO_4$ à 50 % (V/V).

On injecte 2 μ l avec une microseringue Hamilton. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon contenant 1 g/l de chacun des AGV. Cette solution est acidifiée dans $H_3 PO_4$ à 50 % (V/V).

3 . 2 . 2 - Analyse des acides organiques

Pour le dosage des acides organiques nous avons utilisé les mêmes conditions opératoires que pour les AGV. Cependant, avant d'analyser les acides organiques, on doit les méthyler en utilisant la technique suivante :

- 1 ml de la solution à analyser

- 2 ml de méthanol
- 0,4 ml de H₂ SO₄ (50 %)

Boucher, agiter et mettre dans un bain-marie à 60°C pendant 30 minutes, puis refroidir et ajouter :

- 1 ml d'eau distillée
- 0,5 ml chloroforme

Effectuer 20 retournements, laisser décanter et injecter 2 µl de la phase chloroformique dans la colonne utilisée pour les AGV. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon contenant 1 % V/V de chacun des acides organiques.

Cette solution est méthylée de la même manière que celle utilisée pour l'échantillon à doser.

L'analyse quantitative est réalisée en comparant les surfaces des pics avec celles des standards.

3 . 2 . 3 - Analyse des alcools

Ces composés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse en utilisant le même appareil et les mêmes conditions opératoires que pour le méthane. On injecte 2 µl du surnageant avec une microsiringue Hamilton . Les hauteurs des pics sont comparées avec celles obtenues avec un mélange standard à 1 % (V/V) d'alcools.

3 . 3 - Analyse des paramètres physicochimiques (pH, température, tolérance aux sels.)

La température optimale de croissance, ainsi que la tolérance aux sels (NaCl) sont déterminées pour chacune des souches isolées. Pour les souches thermophiles ,la température est étudiée entre 35 et 75°C. Pour les souches méthanogènes, nous devons déterminer si elles sont tolérantes aux sels ou halophiles, car ce critère est important pour l'identification de ces bactéries. Les quantités de sel testées sont apportées dans les flacons sérum à l'intérieur de la boîte à gants anaérobie avant répartition du milieu de culture. Les flacons sont ensuite stérilisés.

En ce qui concerne le pH, nous l'ajustons après stérilisation des milieux de culture qui sont initialement à pH = 7. La gamme de pH étudiée se situe entre 5 et 9. Les pH acides et les pH alcalins sont obtenus respectivement avec des solutions anaérobies stériles d'HCl 2N et de Na₂ CO₃ (10 %).

3 . 4 - Préparation d'une solution d'ADN

L'ADN a été extrait et purifié selon la technique de PRICE *et al.* , (1978). La détermination du G/C % a été réalisée par ultracentrifugation dans un gradient de chlorure de césium (PRICE *et al.* , 1978).

3 . 4 . 1 - Méthode de purification de l'ADN

Toute la verrerie et le matériel doivent être stérilisés.

Après avoir constaté la pureté de la culture bactérienne et l'état des cellules (paroi intacte), ajouter 2 ml de diethyl pyrocarbonate par litre de culture et centrifuger 20 mn à 12000 g.

Reprendre le culot de bactéries avec un tampon saccharose. Centrifuger 20 mn à 12000 g et suspendre les cellules dans un tampon sarcosyl (1 %). Laisser au congélateur toute une journée.

Décongeler la solution dans de l'eau froide et incorporer des volumes

équivalents de solution et de billes de verre (Glasperlen, 0,10 - 0,11 mm , Kat. Nr 54140 (2883) B. BRAUN) destinées à casser les cellules dans un petit flacon. Placer ce flacon sur un agitateur (cell homogeniser MSK B. BRAUN) sous CO₂ à froid (4°C) pendant environ deux minutes. Recommencer l'opération jusqu'à ce que plus de 50 % des cellules soient rompues, (vérifier au microscope). Récupérer le surnageant et laver les billes de verre avec un volume connu de tampon sarcosyl (30 %).

Reprendre le surnageant.

Noter le volume total de la suspension cellulaire et la verser dans un bécher. Ajouter une solution de perchlorate de sodium équivalente au volume total.

4

Mélanger et ajouter un autre volume de tampon sarcosyl (30 %) égal à :

Nouveau volume total - Volume du tampon sarcosyl utilisé précédemment

30

Ajouter une solution de CIA (4 % alcool isoamylique dans du chloroforme) équivalente au nouveau volume.

Mélanger 3 heures la solution obtenue à 4°C.

Centrifuger 20 mn à 11000 g, récupérer le surnageant et ajouter 3 fois le même

volume d'éthanol absolu.

Mélanger tout doucement et laisser toute la nuit à 4°C.

Centrifuger la solution d'ADN 10 mn à 5000 g.

Récupérer le culot avec 20 à 40 ml de solution de citrate de sodium dans un bécher.

Apporter 100 µg/ml d'amylase et de ribonucléase et laisser six heures sous agitation à température ambiante. Ajouter 100 µg/ml de pronase et agiter quatre heures à température ambiante.

Apporter un volume équivalent de solution de CIA et agiter doucement 30 r

Centrifuger 20 mn à 12000 g, récupérer le surnageant et ajouter trois fois son volume en alcool absolu froid. Placer à 4°C toute la nuit.

Centrifuger la solution d'ADN 10 mn à 5000 g. Reprendre le culot avec 5 à 10 ml de tampon phosphate 10^{-3} M et ajouter deux gouttes de chloroforme. La solution finale d'ADN doit présenter les caractéristiques suivantes au niveau de la densité optique :

$$\frac{DO\ 260\ nm}{DO\ 280\ nm} = 1,7 \qquad \frac{DO\ 230\ nm}{DO\ 260\ nm} = 0,4\ à\ 0,9$$

La détermination du G/C % a été réalisée par l'Université de Californie de Davis.

- solutions employées

- solution de citrate de sodium (SCS)

Na Cl.....	17,5 g
Citrate de sodium.....	8,8 g
Eau distillée.....	2000 ml

- Préparation des solutions enzymatiques.

Dissoudre 2 mg de chacun des enzymes par ml de SCS. La pronase, exempte de nucléase, B-grade, Calbiochem. 537088. Ribonucléase pancréatique de boeuf, A grade, Calbiochem, 55674 (chauffer 10 mn à 80°C). Amylase, type IV A, fongique, Sigma A 6630.

- solution de perchlorate de sodium 5 M.

- tampon saccharose :

Tris.....	4,84 g
EDTA.....	7,44 g
Saccharose.....	300 g
Eau distillée.....	2000 ml
Ajuster à pH 7,8	

- Phosphate de sodium 1 M.

Phosphate de sodium monobasique.....	137,99 g
Phosphate de sodium dibasique.....	141,96 g
Eau distillée.....	2000 ml

3 . 5 - Microscopie

Les photomicrographies ont été prises à l'aide d'un "NIKON FX 35" monté sur un microscope NIKON (ILFORD HPS Film, ASA 400). L'analyse au microscope électronique des souches a été réalisée après fixation à la glutaraldehyde et à l'osmium par Ralph Robinson (Université de Floride).

B - LES CULTURES MIXTES

1 - Les microorganismes utilisés

1 . 1 - Les bactéries acidifiantes

- *Clostridium thermocellum* NCIB 10682 : Bactérie cellulolytique thermophile.

- *Thermobacteroides proteolyticus* ATCC 35242 : Bactérie protéolytique thermophile isolée au Laboratoire.

1 . 2 - Les bactéries méthanogènes

- *Methanobacterium sp* : Bactérie thermophile hydrogénéophile isolée au Laboratoire.

- *Methanosarcina MP* : Bactérie thermophile acétoclaste isolée au Laboratoire.

2 - Les milieux de culture

2.1 - Milieu de culture pour l'expérience sur gélatine

L'étude de la culture mixte définie composée de *Thermobacteroides proteolyticus*, *Methanobacterium* sp et *Methanosarcina* MP a été réalisée à 55°C sur le milieu suivant :

Solution minérale.....	50 ml
Solution d'oligo-éléments.....	10 ml
NH ₄ Cl.....	1 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,2 g
L. cystéine.....	0,5 g
résazurine.....	1 ml
Extrait de levure.....	1 g
Eau distillée.....	1000 ml

La phase gazeuse était N₂.

Après stérilisation et avant inoculation, on ajoute 0,2 ml d'une solution de Na₂S (2 %) et 1,2 ml d'une solution de gélatine (20 %).

2.2 - Milieu de culture pour l'expérience sur cellulose, sur pectine et sur pulpes de betterave sucrière

L'étude de la culture mixte définie composée de : *Clostridium thermocellum*, *Methanobacterium* sp et *Methanosarcina* MP a été réalisée à 55°C sur le milieu suivant :

Extrait de levure.....	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O.....	1,1 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O.....	0,16 g
L. cystéine.....	0,50 g
Résazurine.....	1 ml
FeSO ₄ (5 %).....	0,03 ml
Eau distillée.....	1000 ml

La phase gazeuse était N_2/CO_2 . (80/20)

La cellulose (CMN300) a été apportée à raison de 6 g/l. Les pulpes de betterave sucrière (voir composition Tableau 4) ont été apportées à raison de 10 g/l. Elles ont été broyées préalablement à l'aide d'un mortier.

Après stérilisation et avant inoculation, on ajoute 0,2 ml d'une solution de Na_2S (2 %) et 0,9 ml d'une solution de $NaHCO_3$ (10 %) par flacon sérum de 20 ml.

3 - Les techniques d'analyse

L'analyse des acides gras volatils, des acides organiques, des alcools et des gaz a été réalisée selon les méthodes décrites précédemment.

3 . 1 - Dosage des protéines (gélatine)

Pour doser les protéines, on prépare une solution étalon de gélatine contenant de 0 à 400 mg/l et on effectue le dosage suivant la méthode de LOWRY *et al.* , (1951). Le protocole opératoire est le suivant :

Dans des tubes à essai de 16 x 160 mm, apporter successivement :

- 1 ml de la solution à doser convenablement diluée ;
- 1 ml de soude N (ne pas agiter les tubes) ;
- porter à 100°C pendant 5 minutes. Refroidir brutalement ;
- ajouter 5 ml d'une solution A + B + C (50 : 1 : 1, V/V) ;
- laisser 30 minutes à l'obscurité à la température du laboratoire
- ajouter 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué de moitié dans l'eau ; bien agiter ;
- laisser 30 minutes à l'obscurité, à la température du laboratoire.

Pour la composition de la solution (ABC) voir annexe.

La lecture est faite à 750 nm avec un spectrophotomètre (Spectronic 21 BAUSCH et LOMB).

TABLEAU 4 : ANALYSE ORGANIQUE DES PULPES
DE BETTERAVE SUCRIERE

Constituants	% rapporté à la M.S.	% rapporté au poids frais
Cellulose	21	4,2
Hémicelluloses	23	4,6
Sucres solubles	4	0,8
Pectine	11	2,2
Protéines	10 (N 6,25)	2
Lipides	2	0,4
Lignine	2,6	0,5
Cendres	5	1
Fraction indéterminée	21	4,2

3.2 - Dosage des sucres totaux

Par chauffage en milieu acide, les sucres donnent des dérivés du furfural qui réagissent avec l'antranol en équilibre avec l'anthrone pour donner un composé bleu-vert. La lecture se fait à 625 nm.

Le protocole opératoire est le suivant : dans les tubes de 16 x 160 mm placés dans de la glace on apporte successivement :

- 2,5 ml de la solution à doser, convenablement diluée
- 5 ml de la solution d'anthrone réfrigérée

Quand la série des tubes est prête, on mélange rapidement au vortex et on place les tubes au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans l'eau glacée pendant 5 minutes. On prépare une solution étalon de cellulose contenant de 0 à 50 mg/l (voir annexe).

Pour les pulpes de betterave sucrière, on a mesuré les sucres totaux dans les deux phases liquide et solide.

Pour la phase liquide, on a suivi le même protocole mais on a broyé la phase solide dans un Potter pour la solubiliser.

IV - RESULTATS

A - ISOLEMENT DE BACTERIES THERMOPHILES INTERVENANT DANS LA METHANOGENESE

1 - Isolement et caractérisation d'une bactérie thermophile anaérobie dégradant les protéines (souche BT)

L'étude de la digestion anaérobie nous a conduit à nous intéresser non seulement aux bactéries productrices de méthane mais aussi à celles qui peuvent jouer un rôle important au cours de la méthanogénèse.

Récemment, de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'isolement des bactéries anaérobies thermophiles. Plusieurs espèces de bactéries strictement anaérobies ont été découvertes tant parmi les bactéries méthanogènes (FERGUSON et MAH, 1983 ; HUBER *et al.* , 1982) que parmi les bactéries non productrices de méthane (BEN-BASSAT et ZEIKUS, 1981 ; ZEIKUS *et al.* , 1979). Certains de ces microorganismes tels que *Thermoanaerobacter ethanolicus* (WIEGEL et LJUNGSDHAL, 1981) ou *Thermobacteroides acetoethylicus* (BEN-BASSAT et ZEIKUS, 1981) sont classés dans le manuel de Bergey, parmi les genres d'affiliation incertaine.

D'autres espèces thermophiles appartiennent à des genres bien définis tels que *Clostridium* (HOLLAUS et SLEYTR, 1972) ou *Desulfovibrio* (ROZANOVA et KHUDYAKOVA, 1974). Au cours d'un enrichissement de fumier de bovin avec des résidus de tannerie en condition thermophile, nous avons isolé une nouvelle espèce bactérienne dont les caractéristiques sont les suivantes :

1 . 1 - Isolement

L'enrichissement a été réalisé sur le milieu préconisé par BALCH *et al.* , (1979) pour les bactéries méthanogènes. La production de méthane a été constatée dès les premiers jours. Après plusieurs repiquages sur milieu neuf, des colonies isolées ont été obtenues en utilisant les cylindres haute pression sous N_2/CO_2 . Il n'a pas été possible cependant sous cette atmosphère d'isoler la bactérie méthanogène thermophile. Les résultats relatifs à ce microorganisme seront présentés ultérieurement au cours de ce mémoire. Toutefois une colonie dominante est apparue au cours des ultimes dilutions et a été obtenue en culture pure dans le milieu de culture décrit en ANNEXE.

1 . 2 - Morphologie

Les colonies apparaissent après 4 jours à 55°C. Elles sont circulaires, convexes et blanches. Les dimensions varient de 0,5 à 1 mm. Le microorganisme est un bâtonnet isolé ou en paire en phase exponentielle de croissance (Fig 5). En fin de culture on aperçoit quelques formes filamenteuses. Les cellules varient de 1 à 6 µm en longueur, la largeur étant d'environ 0,8 µm. Aucune lyse n'a été observée au cours de la phase stationnaire. La bactérie isolée est Gram négatif, non sporulée et immobile. L'observation au microscope électronique (Fig 6) a montré que les cellules possédaient une fine couche de peptidoglycans et une paroi extérieure très dense. Aucun flagelle n'a pu être révélé.

1 . 3 - Conditions optimales de croissance

Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que cette espèce est strictement anaérobie. Les analyses du pH et de la température ont été réalisées sur un milieu contenant 0,2 % d'extrait de levure. La croissance a été observée entre pH 5,0 et 8,5 avec un optimum à pH 7,5 (Fig 8). Le microorganisme croît entre 35°C et 70°C. 63°C est la température optimale de croissance (Fig 7). A cette température, la bactérie présente un temps de génération de 13 heures.

1 . 4 - Substrats utilisés

Les résultats rapportés sur le tableau 6 indiquent que la souche BT utilise les protéines (gélatine) et les peptides. Par contre, la croissance sur sucres est faible en présence uniquement d'extrait de levure. Toutefois l'addition de jus de rumen ou de Biotrypcase stimule fortement la croissance de la souche BT sur de tels substrats (Tableau 6). L'addition de casaminoacides n'a aucune influence sur l'utilisation des sucres (Tableau 7).

1 . 5 - Activité métabolique

L'analyse des acides gras volatils a été réalisée sur un milieu contenant de l'extrait de levure et de la gélatine ou du glucose. L'acide acétique est le principal produit détecté. Les acides propionique, isobutyrique, isovalérique et valérique sont aussi produits (Tableau 8) ; l'H₂ et le CO₂ sont détectés en faible quantité. Le lactate, le succinate et les alcools ne sont pas produits. L'hémolyse n'a jamais été observée sur une gélose à base de sang de mouton. La bactérie résiste enfin à la kanamycine (100 µg/ml). La valeur du G/C % est 45 .

1 . 6 - Discussion

L'absence de spore et de mobilité, la coloration de Gram indiquent que la souche BT pourrait appartenir au genre *Bacteroides* . La bactérie utilise la gélatine, les peptones, la biotrypcase et l'extrait de levure sans toutefois utiliser les acides an

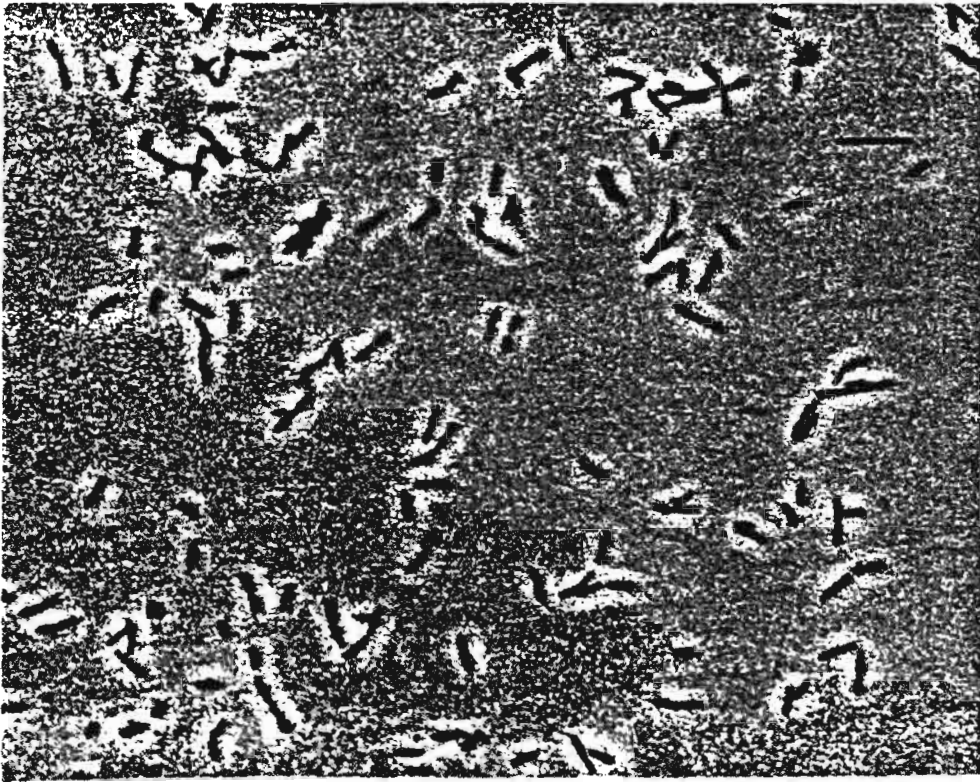


FIG. 5 : Photomicrographies en contraste de phase de la souche BT
(Trait = 10 μm)

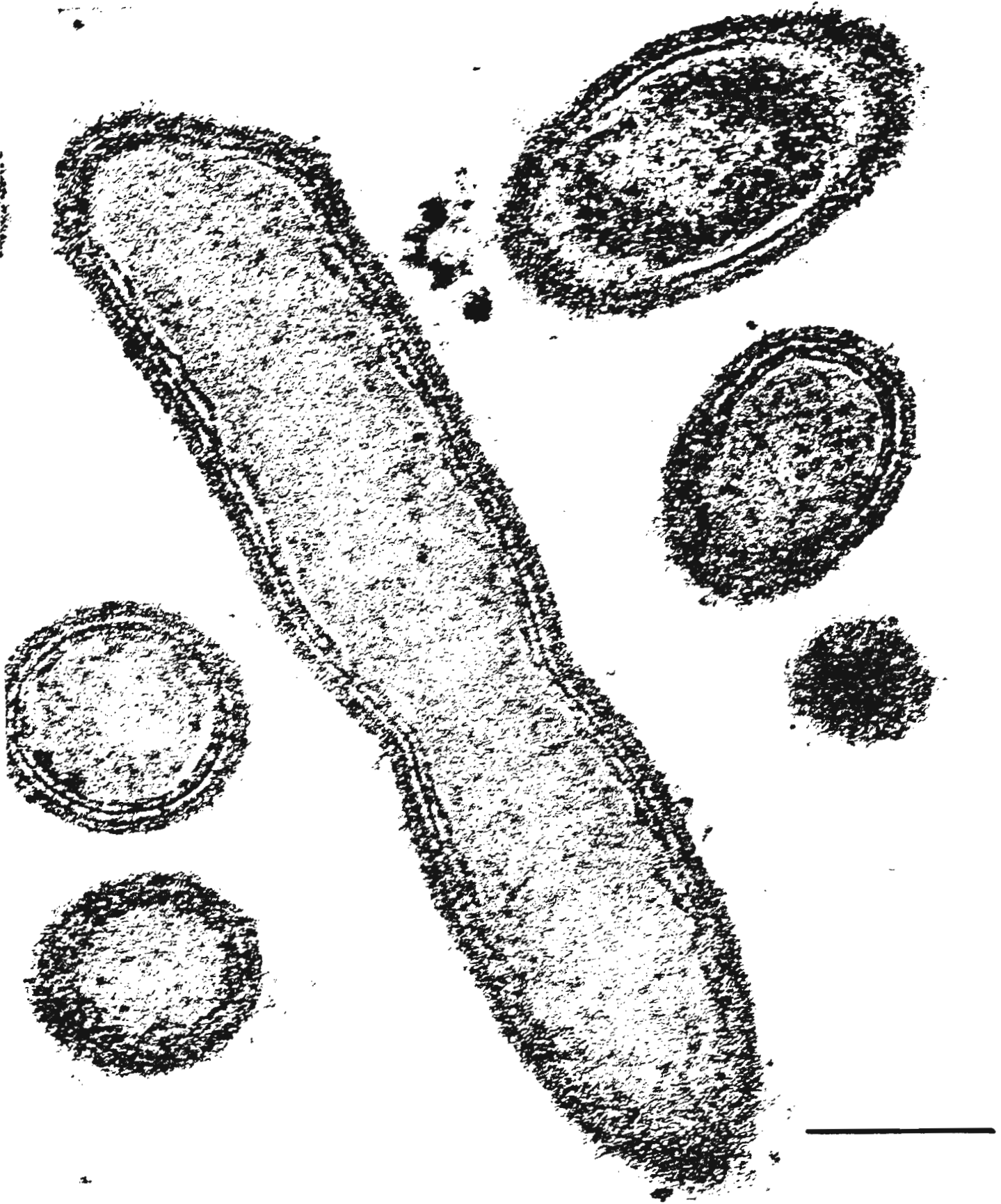


FIG. 6 : Photographie en microscopie électronique de coupes minces de la bactérie thermophile utilisant la gélatine (Trait = 0,5 μm).

TABLEAU 5 : SENSIBILITE DE LA BACTERIE
THERMOPHILE (BT) A L' OXYGENE

μ moles O ₂	D.O. maximale (580 nm)
0,89	0,42
1,78	0,41
4,45	0,43
9,90	0,44
19,80	0,44
29,70	0,00
0	0,41

- Lecture faite après 48 h d'incubation à 65°C.
- Le volume d'O₂ est exprimé pour 10 ml de milieu
- Le milieu contient 0,1 % d'extrait de levure et 0,3 % de gélatine

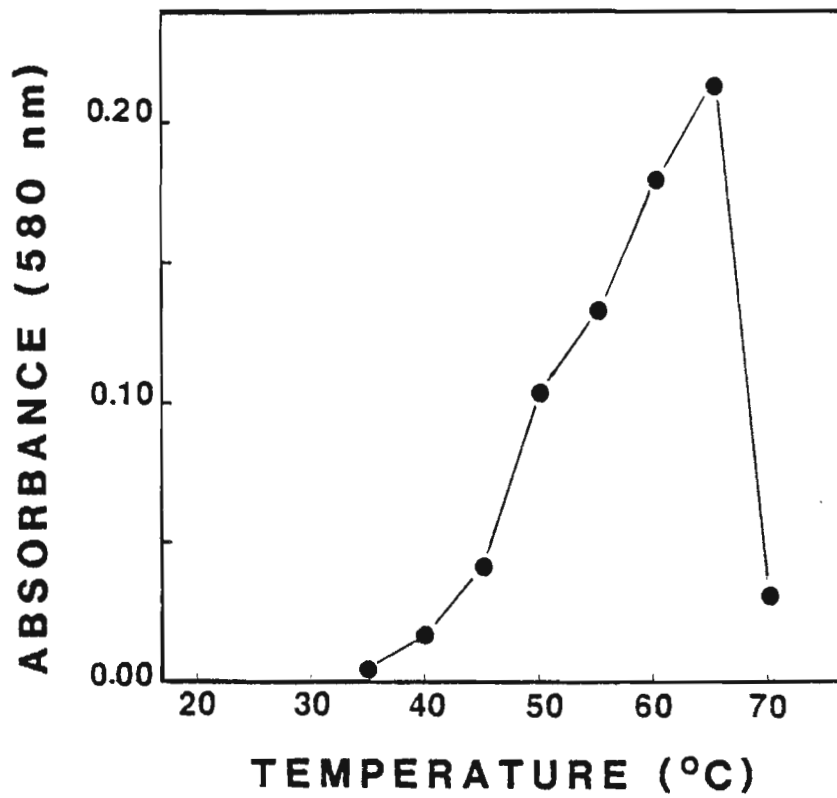


FIG. 7 : Effet de la température sur la croissance de la bactérie BT.Lecture après 40 h de croissance

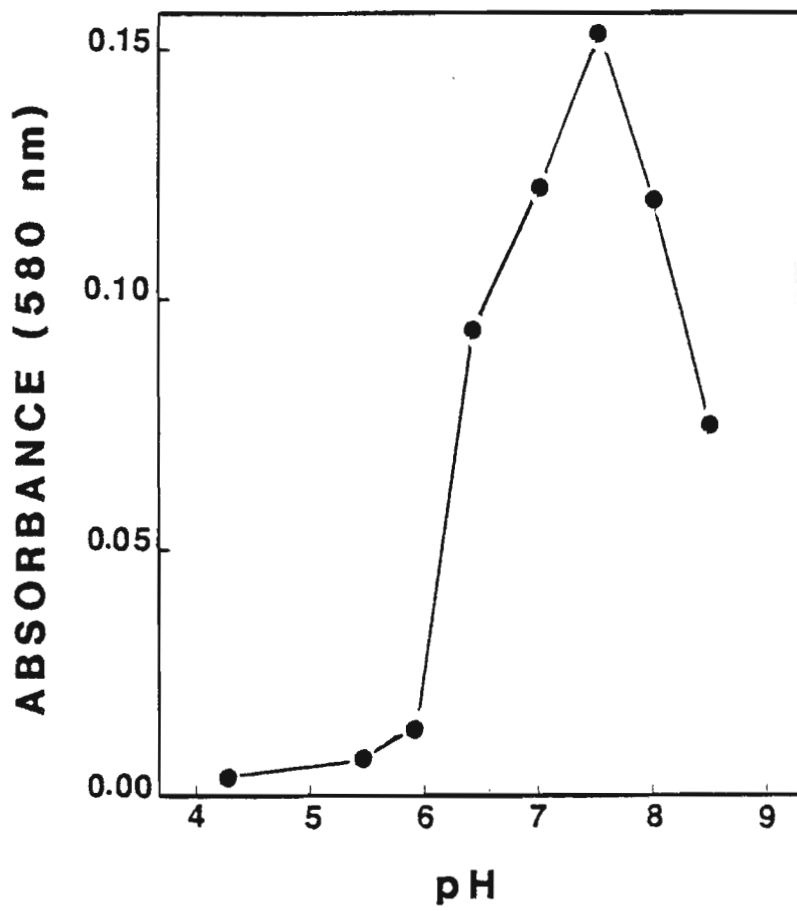


FIG. 8 : Effet du pH sur la croissance de la bactérie BT. Lecture après 24 h de croissance.

TABLEAU 6 : EFFET DE L' ADDITION D' EXTRAIT DE LEVURE ET DE JUS DE RUMEN SUR LA PRODUCTION D'H₂ ET LA CROISSANCE DE LA SOUCHE BT SUR DIFFERENTS SUBSTRATS

SUBSTRATS	EXTRAIT DE LEVURE		EXTRAIT DE LEVURE + JUS DE RUMEN	
	DO	H ₂ (μmoles/10 ml milieu)	DO	H ₂ (μmoles/10 ml milieu)
Temoin	0,08	14,2	0,10	16,7
Glucose	0,11	56,3	0,27	125,1
Fructose	0,09	45,1	0,25	104,9
Maltose	0,10	43,6	0,23	45,3
Saccharose	0,09	51,5	0,26	95,6
Mannose	0,11	52,4	0,20	57,6
Biotrypcase	0,17	29,2	0,19	27,6
Ext.levure	0,27	40,6	0,29	43,2
Peptone	0,38	24,0	0,48	26,4
Gelatine	0,32	24,7	0,36	22,6
Caseine	0,21	23,2	0,21	24,3

- Les sucres ont été apportés à 10 mM. Les autres composés ont été apportés à 3 g/l. Les composés suivants ne sont pas utilisés : arabinose, rahmnose, xylose, galactose, cellobiose, lactose, trehalose, glycerol, mannitol, Casamino acides

- L'extrait de levure et le jus de rumen ont été apportés respectivement à 0,1 et 2 %

- La croissance a été déterminée par la mesure de la densité optique à 580 nm après 40 heures de culture à 65°C.

TABLEAU 7 : EFFET DE L'ADDITION DE COMPOSES ORGANIQUES SUR L'UTILISATION DU GLUCOSE.

COMPOSE ORGANIQUE AJOUTE	% DU GLUCOSE UTILISE	DO	DO DU TEMOIN SANS GLUCOSE
Temoin	20	0,14	0,08
Trypticase peptone (1 g/l)	32	0,38	0,11
Casaminoacides (1 g/l)	17	0,09	0,09
jus de Rumen (2 %)	36	0,29	0,09
Methylbutyrate (0,02 %)	17	0,15	0,08

- Les bactéries ont été cultivées sur un milieu de base contenant 1 g/l d'extrait de levure et 10 mM de glucose.
- La croissance a été déterminée par la mesure de la densité optique à 580 nm après 40 h de culture à 65°C.

TABLEAU 8 : PRODUCTION D'ACIDES GRAS VOLATILS SUR MILIEU
CONTENANT DE LA GELATINE OU DU GLUCOSE.

ACIDES GRAS VOLATILS	GELATINE	GLUCOSE
ACIDE ACETIQUE	7,5	3,10
ACIDE PROPIONIQUE	0,03	0
ACIDE ISOBUTYRIQUE	0,15	Traces ^a
ACIDE BUTYRIQUE	0	0
ACIDE ISOVALERIQUE	0,37	Traces
ACIDE VALERIQUE	0	0
ACIDE ISOCAPROIQUE	0,01	0
ACIDE CAPROIQUE	0	0

- Les bactéries ont été cultivées sur un milieu contenant 3 g/l de gélatine ou 10 mM de glucose. Dans les 2 cas 1 g/l d'extrait de levure a été apporté.
- Les produits ont été examinés après 40 heures d'incubation à 65°C.

- a < 0,01 mM

Ces caractéristiques ont été remarquées chez l'espèce *Bacteroides assacharolyticus* (WAHREN et GIBBONS, 1970). Les auteurs ont montré que cette souche se développant sur Trypticase, était capable de dégrader les peptides alors que les acides aminés n'étaient pas fermentés. De plus l'espèce *B. assacharolyticus* est décrite par WILLIAMS *et al.* (1975) comme étant stimulée par la présence de sucres mais n'utilisant que faiblement ces derniers. L'addition de jus de rumen ou de Trypticase stimule la croissance de la souche BT sur sucres. Une telle stimulation a été observée chez *Bacteroides ruminicola* (RUSSELL, 1983). Chez cette bactérie, la synthèse du matériel cellulaire n'est pas toujours proportionnelle aux quantités de sources de carbone et d'énergie utilisées. La même observation a été faite chez la souche BT quand elle se développait sur mannose ou maltose. Cependant la température optimale de croissance de la souche BT (63°C) ne nous permet pas de la classer dans le genre *Bacteroides* qui ne comprend pas d'espèces thermophiles.

Recemment, un bacille Gram négatif thermophile asporulé a été décrit (BEN-BASSAT et ZEIKUS, 1981). Cet organisme a été placé dans le nouveau genre *Thermobacteroides*, l'espèce type étant *T. acetoethylicus*. *T. acetoethylicus* aurait été placé dans le genre *Bacteroides*, si ce n'était sa nature thermophile. Nous pouvons donc classer la souche BT dans le genre *Thermobacteroides*. L'espèce *T. proteolyticus* est proposé (OLLIVIER *et al.*, 1985). Elle diffère de *T. acetoethylicus* par le fait qu'elle utilise les peptones, qu'elle est immobile et qu'elle ne produit pas d'alcools à partir des sucres. La souche BT ne peut appartenir au genre *Thermoanaerobium* (ZEIKUS *et al.*, 1979) ou au genre *Thermoanaerobacter* (WIEGEL et LJUNGDAHL, 1981). Elle diffère de ces bactéries par la coloration de Gram et par les substrats qu'elle utilise.

2 - Isolement et caractérisation de bactéries méthanogènes thermophiles hydrogénophiles

2 . 1 - Isolement d'une bactérie appartenant au genre *Methanobacterium*

2 . 1 . 1 - Isolement

L'isolement a été réalisé à partir d'un digesteur alimenté avec des résidus de tannerie et inoculé avec du fumier de bovin.

Nous avons procédé tout d'abord à un enrichissement sur milieu riche contenant du jus de rumen sous $H_2 + CO_2$, cinq fois consécutivement à raison d'un repiquage par semaine. L'analyse au microscope montrait à ce stade une population mixte de bactéries où dominait un bacille très long, atteignant parfois 10 μm . Nous avons inoculé cette culture cinq fois sur milieu sans jus de rumen, sans pour autant éliminer la flore méthanogène. Après addition de pénicilline et de D. cyclosérine, seul le long bacille précédemment décrit et un petit coccobacille très mobile étaient

présents. Pour séparer ces deux bactéries, nous avons réalisé des étalements sur des boîtes de Pétri que nous avons inoculées sous $H_2 + CO_2$ dans des cylindres haute pression. Après apparition des colonies bactériennes, nous avons repiqué ces colonies sur milieu sans extrait de levure et Biotrypcase. Après 4 à 5 jours de culture, seule la bactérie méthanogène thermophile était présente dans le milieu. La pureté de la souche a été testée en présence de glucose, d'extrait de levure et de Biotrypcase. Dans ces conditions, aucune croissance bactérienne contaminante ne se produisait.

2 . 1 . 2 - Morphologie

Les colonies apparaissent après une semaine sur un milieu gélosé à 60°C. Elles sont rondes, blanches et convexes et peuvent atteindre 2 à 3 mm. La bactérie thermophile est un bâtonnet, le plus souvent isolé ou en paire (Fig 9), rarement en filament. Les dimensions de la cellule varient de 5 à 10 μm . Le microorganisme est immobile et Gram +. Aucune lyse n'a été observée après la phase exponentielle de croissance.

2 . 1 . 3 - Conditions optimales de croissance

La croissance s'établit entre 40°C et 70°C avec un optimum vers 65°C (Fig 10). La bactérie méthanogène peut se développer entre pH 6 et 8,5. Une meilleure utilisation des substrats a été observée à pH 7 (Fig 11).

2 . 1 . 4 - Substrats utilisés

H_2/CO_2 est la seule source de carbone et d'énergie utilisée. Les autres substrats de la méthanogénèse (formiate ou autres) ont été testés en présence ou en absence de jus de rumen, sans qu'aucune croissance ne soit observée. La bactérie méthanogène thermophile peut croître en autotrophie (Fig 12), c'est-à-dire en l'absence d'extrait de levure, de Biotrypcase et de vitamines. La croissance sur H_2/CO_2 est alors réalisée en six jours à 60°C. L'apport de jus de rumen (Fig 13) stimule nettement la production de méthane puisqu'à 100 h, tout l' H_2 est pratiquement consommé. Sans jus de rumen, on constate qu'à 100 h l' H_2 n'a été utilisé qu'à moitié (Fig 12).

2 . 1 . 5 - Discussion

Une bactérie thermophile méthanogène a pu être isolée d'un enrichissement de fumier de bovin sur des résidus de tannerie. Ce microorganisme n'utilise qu' H_2/CO_2 comme source de carbone et d'énergie. Il peut croître parfaitement en autotrophie, mais l'addition de jus de rumen stimule la production de méthane. Cette stimulation de la méthanogénèse est certainement liée à la présence dans le jus de rumen de facteurs de croissance ou du coenzyme M. L'ensemble des propriétés

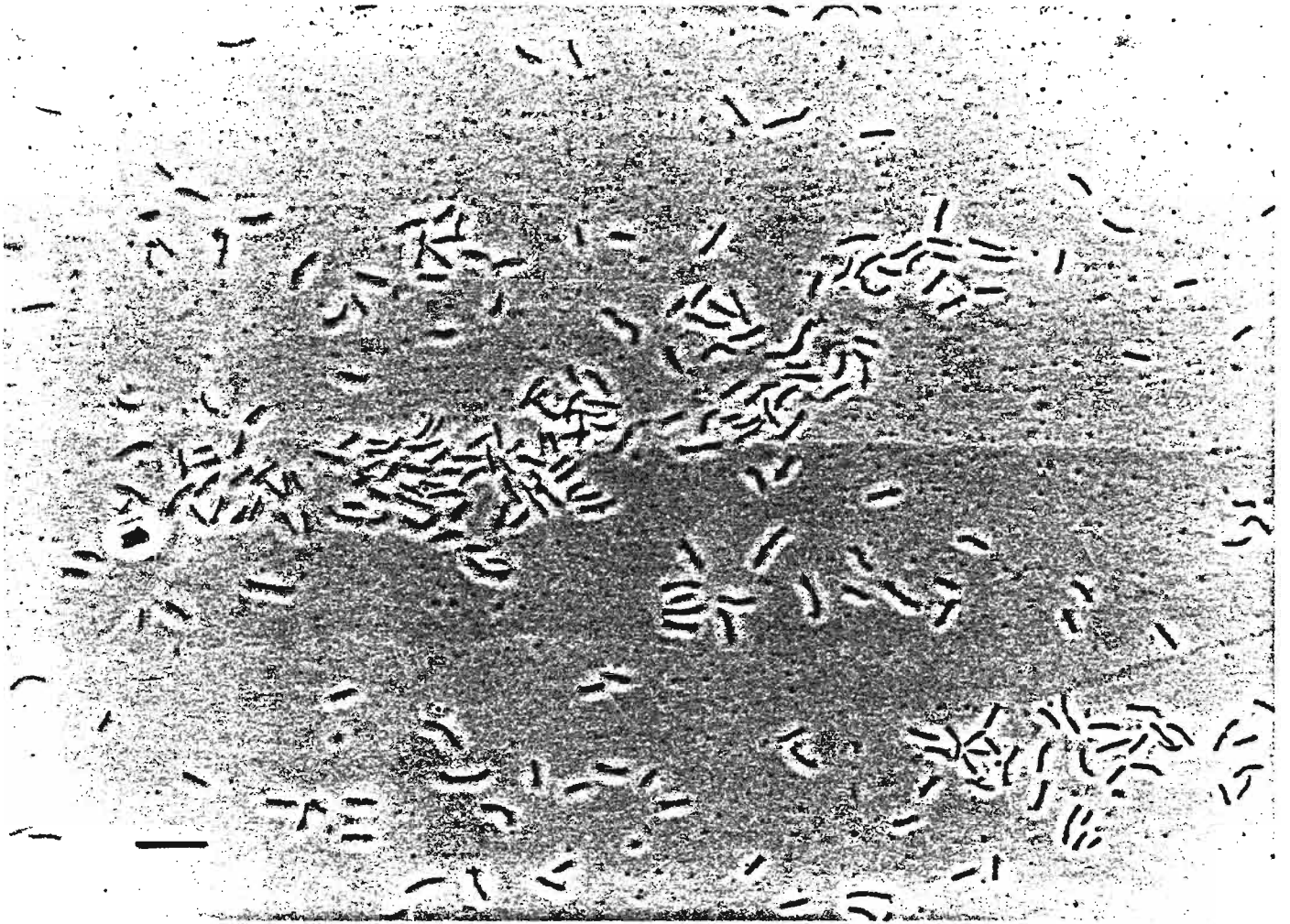


FIG. 9 : Bactérie méthanogène thermophile (Trait = 10 μm).

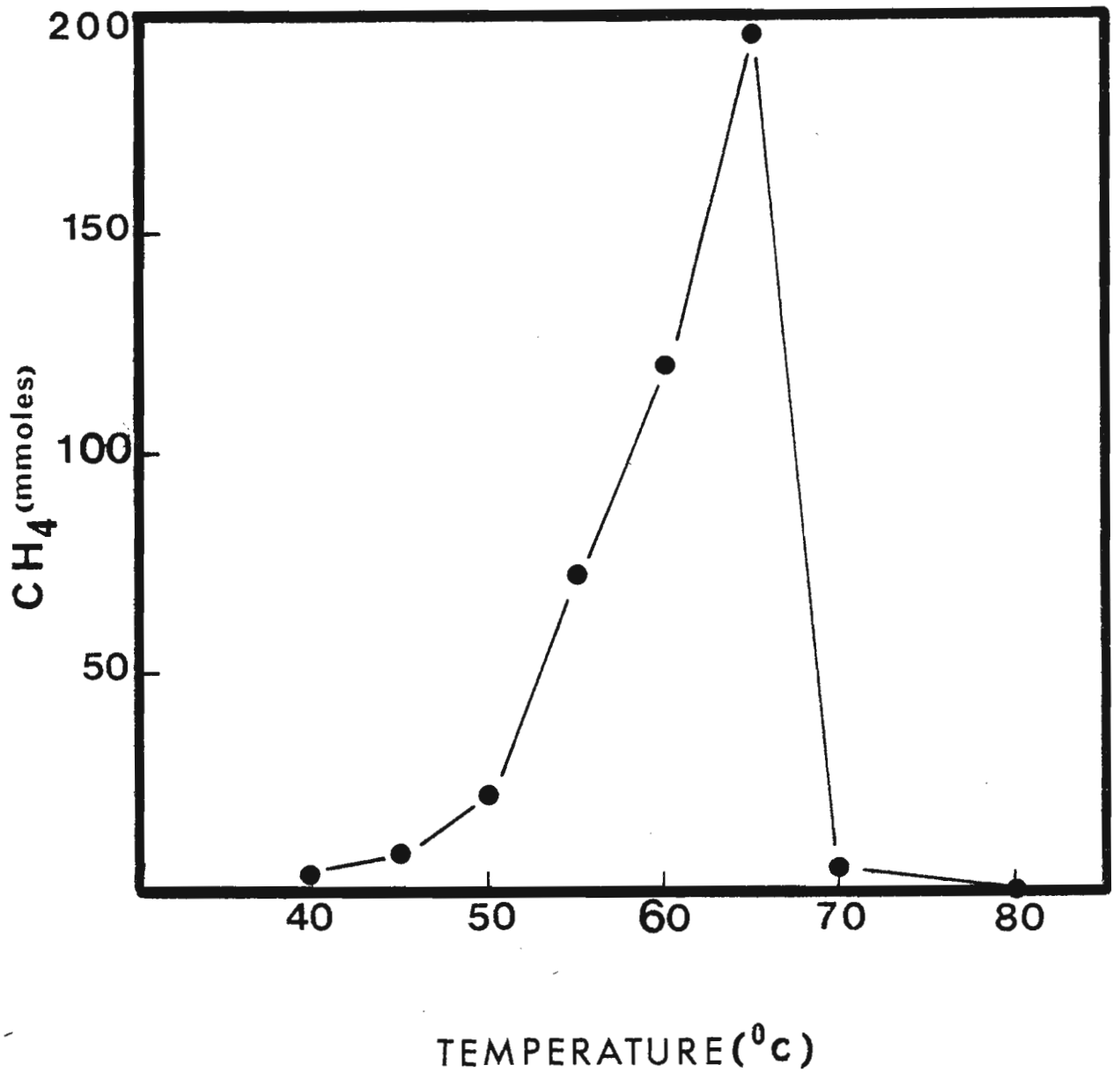


Fig.10 : Effet de la température sur la croissance de la bactérie méthanogène thermophile.
Lecture faite après deux jours de culture sous H₂/CO₂. Les quantités de méthane sont exprimées par litre de milieu.

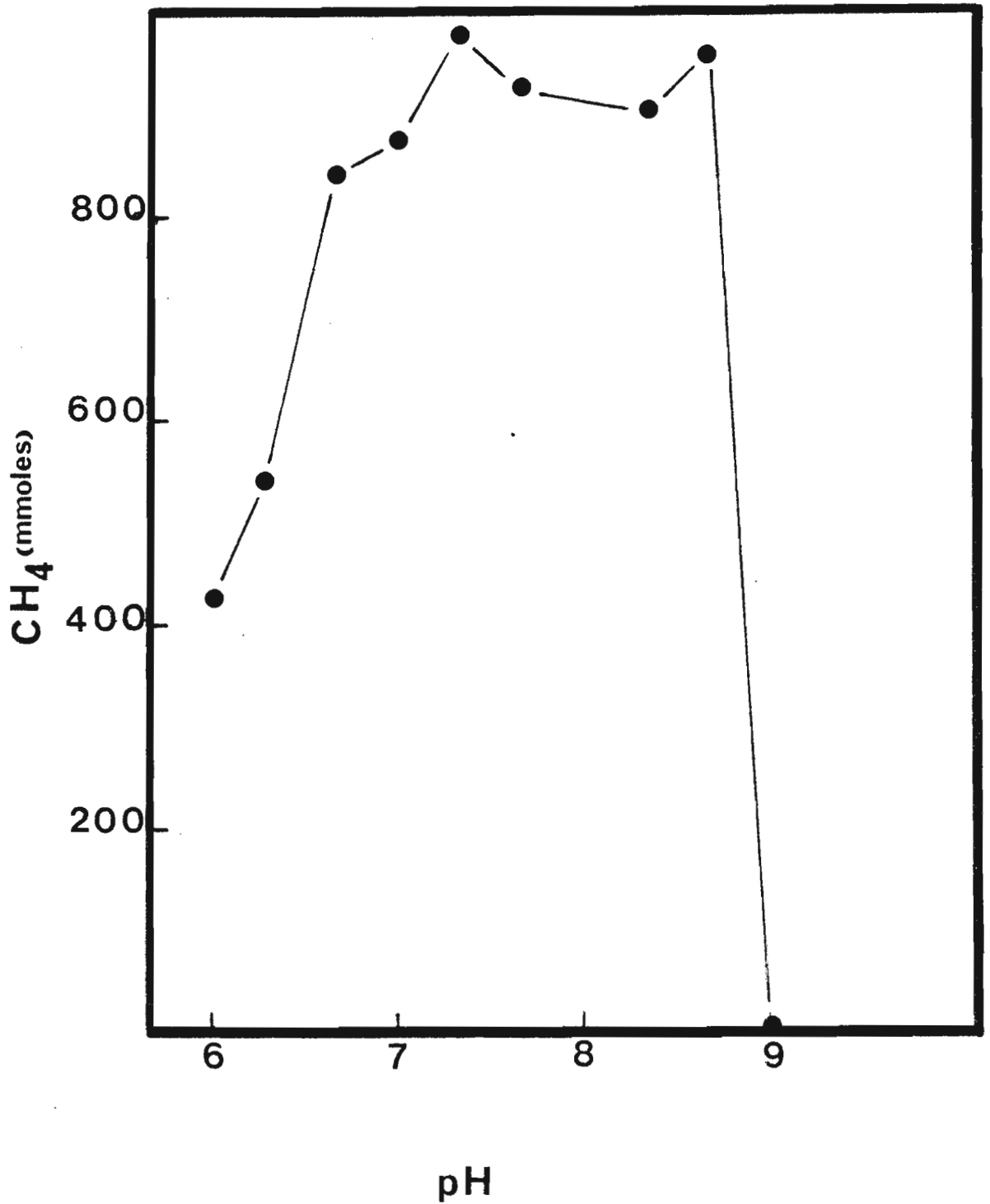


FIG. 11 : Effet du pH sur la croissance de la bactérie méthanogène thermophile.
Lecture faite après 5 jours de culture sous H₂/CO₂. Les quantités de méthane sont exprimées par litre de milieu.

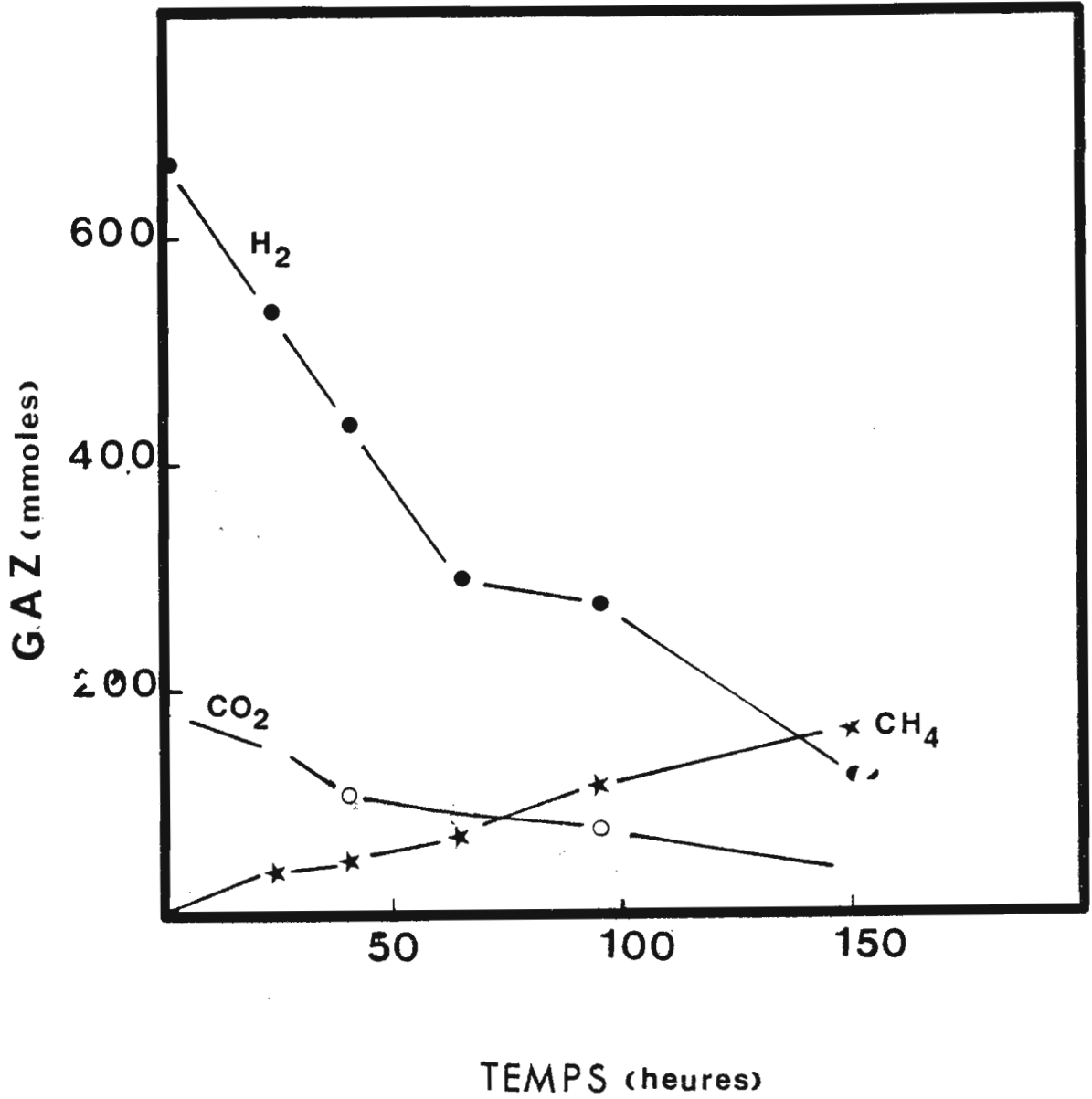


FIG. 12 : Utilisation d'H₂ + CO₂ par la bactérie méthanogène thermophile en autotrophie. Les quantités de gaz sont exprimées par litre de milieu.

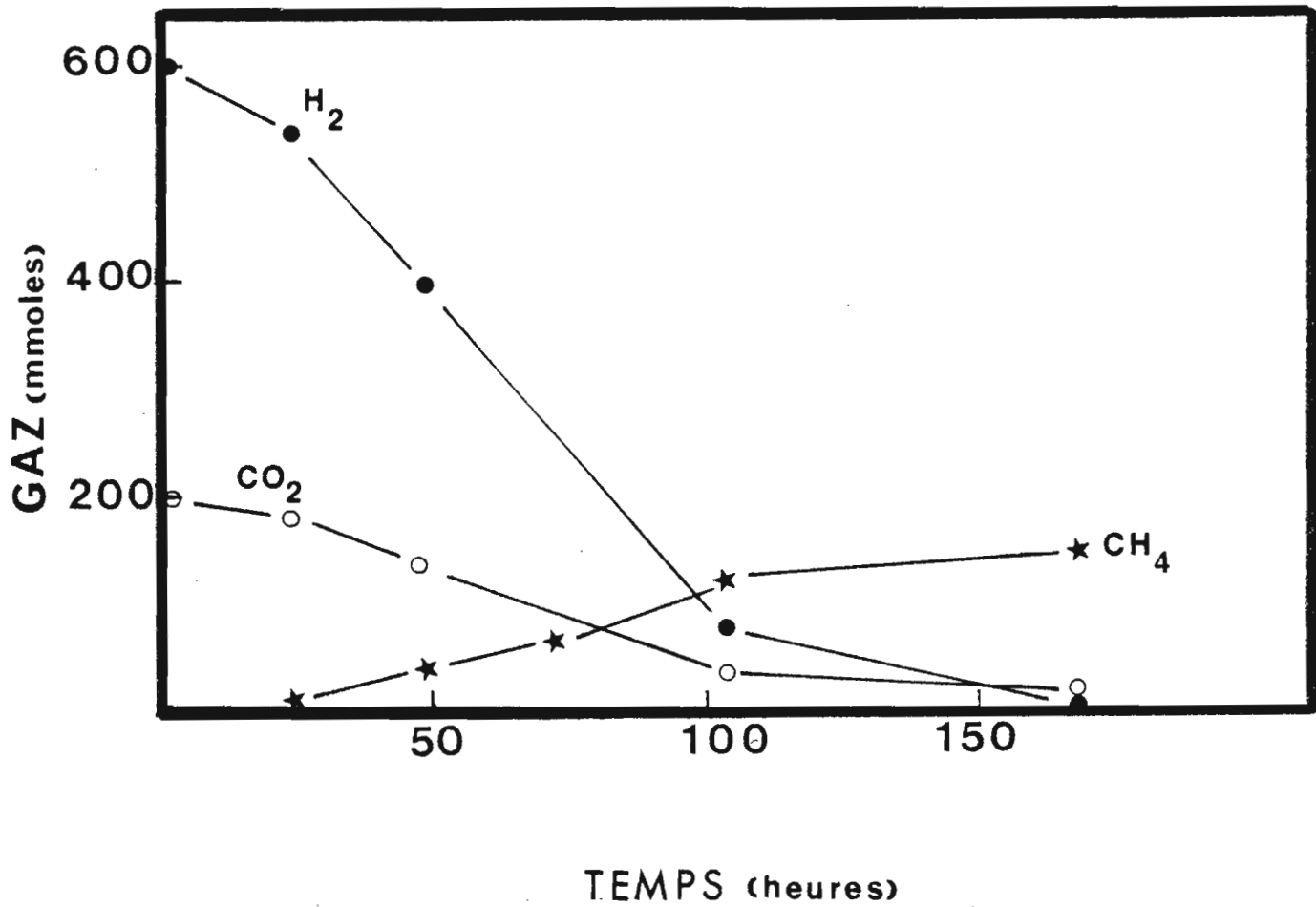


FIG. 13 : Utilisation d'H₂ + CO₂ par la bactérie méthanogène thermophile en présence de jus de rumen. Les quantités de gaz sont exprimées par litre de milieu.

morphologiques et physiologiques du microorganisme isolé sont comparables à celles obtenues par ZEIKUS et WOLFE (1972) chez *Methanobacterium thermoautotrophicum*. C'est vraisemblablement une souche de cette espèce que nous avons isolée.

2 . 2 - Isolement d'une bactérie appartenant au genre *Methanogenium* (souche Mg)

2 . 2 . 1 - Isolement

L'isolement a été réalisé à partir d'un digesteur alimenté en jacinthes d'eau et inoculé avec un broyat de termites du Congo. Nous avons procédé à un enrichissement sur le milieu de culture utilisé pour cette souche (Voir ANNEXE). Après environ 7 jours de culture, nous avons dilué 0,5 ml de l'enrichissement en utilisant plusieurs roll-tubes.

Après une semaine à 55°C, nous avons obtenu des colonies isolées et nous avons alors repiqué chacune des colonies dans un roll-tube. Nous avons réalisé des dilutions et sur les nouvelles colonies, nous avons répété la série de dilutions jusqu'à l'obtention d'une souche pure. Nous avons vérifié la pureté de la souche en inoculant d'autres roll-tubes (un seul type de colonie est apparu) ou des milieux riches contenant du glucose, de l'extrait de levure et du Biotrypcase (aucune croissance n'a été observée).

2 . 2 . 2 - Morphologie

Les colonies apparaissent après environ 15 jours sur H₂/CO₂ en roll-tubes. Leur taille n'est que de 1 à 2 mm. Elles sont rondes, convexes et blanches lorsqu'elles sont jeunes, devenant légèrement jaunes en fin de croissance. Les bactéries présentent des formes coccoïdes très irrégulières de 1 à 3 µm (irrégularité en forme et en dimension, Fig 14). Le plus souvent isolés, ces cocci sont observés en paire lors de la phase exponentielle de croissance. La lyse de ces cellules est très rapide en fin de croissance.

La bactérie est Gram négatif, elle est immobile. Les cellules sont sensibles à 0,1 % de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), indiquant que la paroi de ces microorganismes est très fragile.

2 . 2 . 3 - Conditions optimales de croissance

Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant H₂/CO₂ comme source de carbone et d'énergie. La souche méthanogène Mg se développe de façon optimale à 60°C (Fig 15). Aucune croissance n'a pu être observée à 37°C ou 70°C.

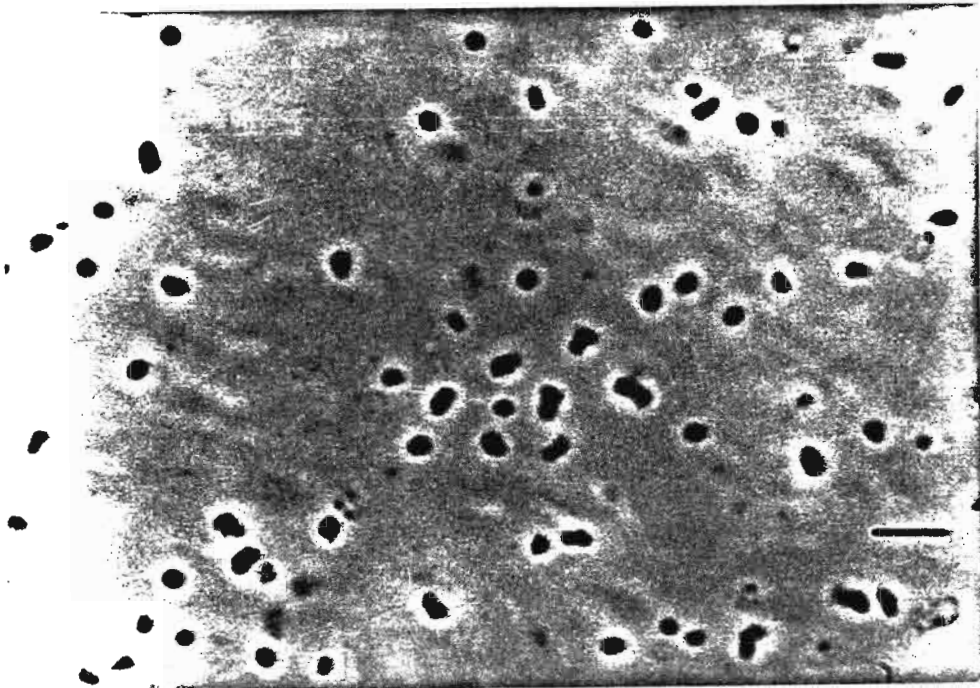


FIG. 14 : Bactérie méthanogène thermophile, souche Mg (Trait = 10 μm).

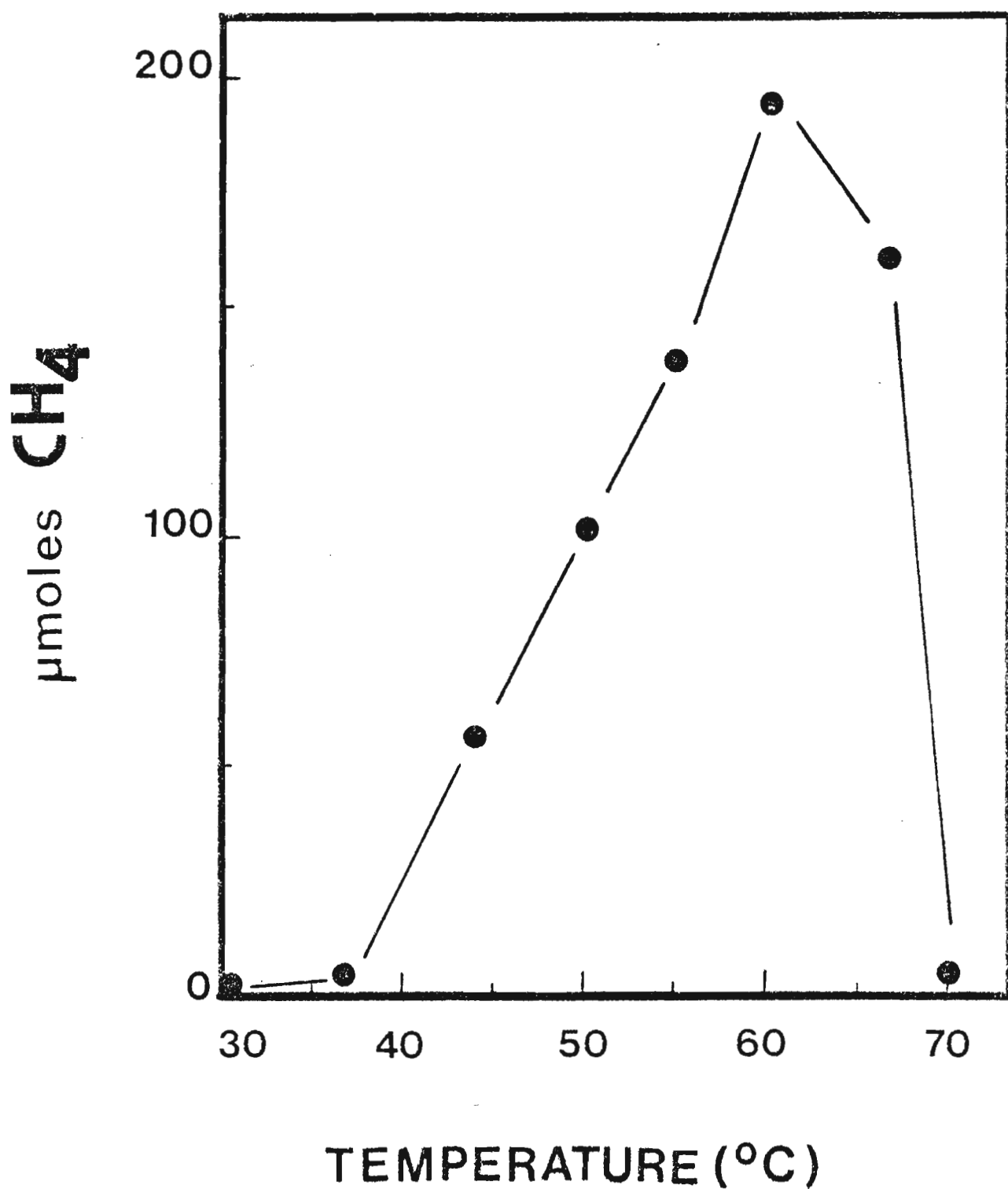


FIG. 15 : Effet de la température sur la production de méthane par la souche Mg. Résultats obtenus après 2 jours de culture sous H₂/CO₂ à 55°C. Les quantités de méthane sont exprimées pour 20 ml de milieu

Le pH optimum se situe entre 7.0 - 7.5. A pH 6.0 ou pH 8,5, la bactérie ne se développe pas (Fig 16). La souche Mg est capable de croître en absence de NaCl (Fig 17). Elle présente cependant une concentration optimale de NaCl de l'ordre de 10 g/l. Lorsque cette concentration atteint 40 g/l, la production de méthane s'arrête.

2 . 2 . 4 - Substrats utilisés

La bactérie ne produit du méthane qu'à partir du formiate ou de $H_2 + CO_2$. Les résultats sur acétate, méthanol ou méthylamines ont montré que ce microorganisme était incapable d'utiliser de tels substrats.

2 . 2 . 5 - Exigences nutritionnelles

La bactérie thermophile peut croître en absence de fortes teneurs en Magnesium (Tableau 9).

La souche Mg ne peut produire du méthane en absence de composés organiques. La production maximale de méthane a été obtenue sur milieu contenant du Biotrypcase ou de l'acétate + extrait de levure. En présence d'extrait de levure seulement ou d'acétate la croissance est limitée (Tableau 10).

2 . 2 . 6 - Discussion

La bactérie méthanogène isolée d'un enrichissement de jacinthes d'eau inoculé avec un broyat de termites du Congo se présente sous forme coccoïde. Bien que nous ne possédions pas les résultats du G/C %, il semble fort probable que la souche Mg appartienne au genre *Methanococcus* ou *Methanogenium*.

En effet, la souche Mg ne peut appartenir aux genres *Methanoplanus*, *Methanosarcina*, *Methanolobus* ou *Methanococcoides* pour les raisons suivantes : Les bactéries appartenant au genre *Methanolobus* ou *Methanococcoides* n'utilisent que le méthanol et les méthylamines (KÖNIG et STETTER, 1982 ; SOWERS et FERRY, 1983). *Methanoplanus limicola* présente des formes planes (WILDGRUBER *et al.*, 1982). Enfin, le genre *Methanosarcina* se compose de microorganismes capables de dégrader l'acétate, se présentant le plus souvent en tétrades.

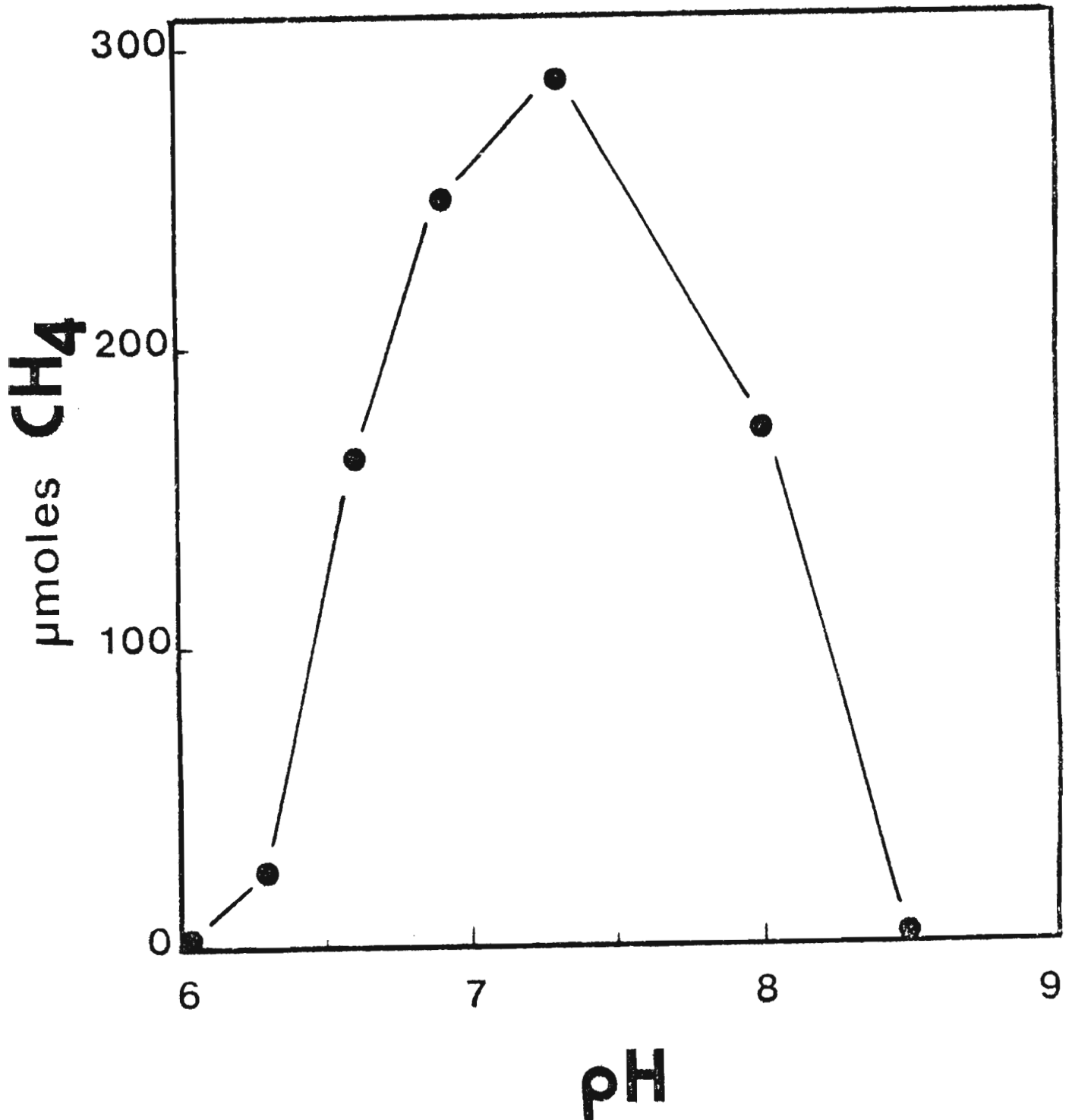


FIG. 16 : Effet du pH sur la production de méthane par la souche Mg. Résultats obtenus après 2 jours de culture sous H₂/CO₂. Les quantités de méthane sont exprimées pour 20 ml de milieu.

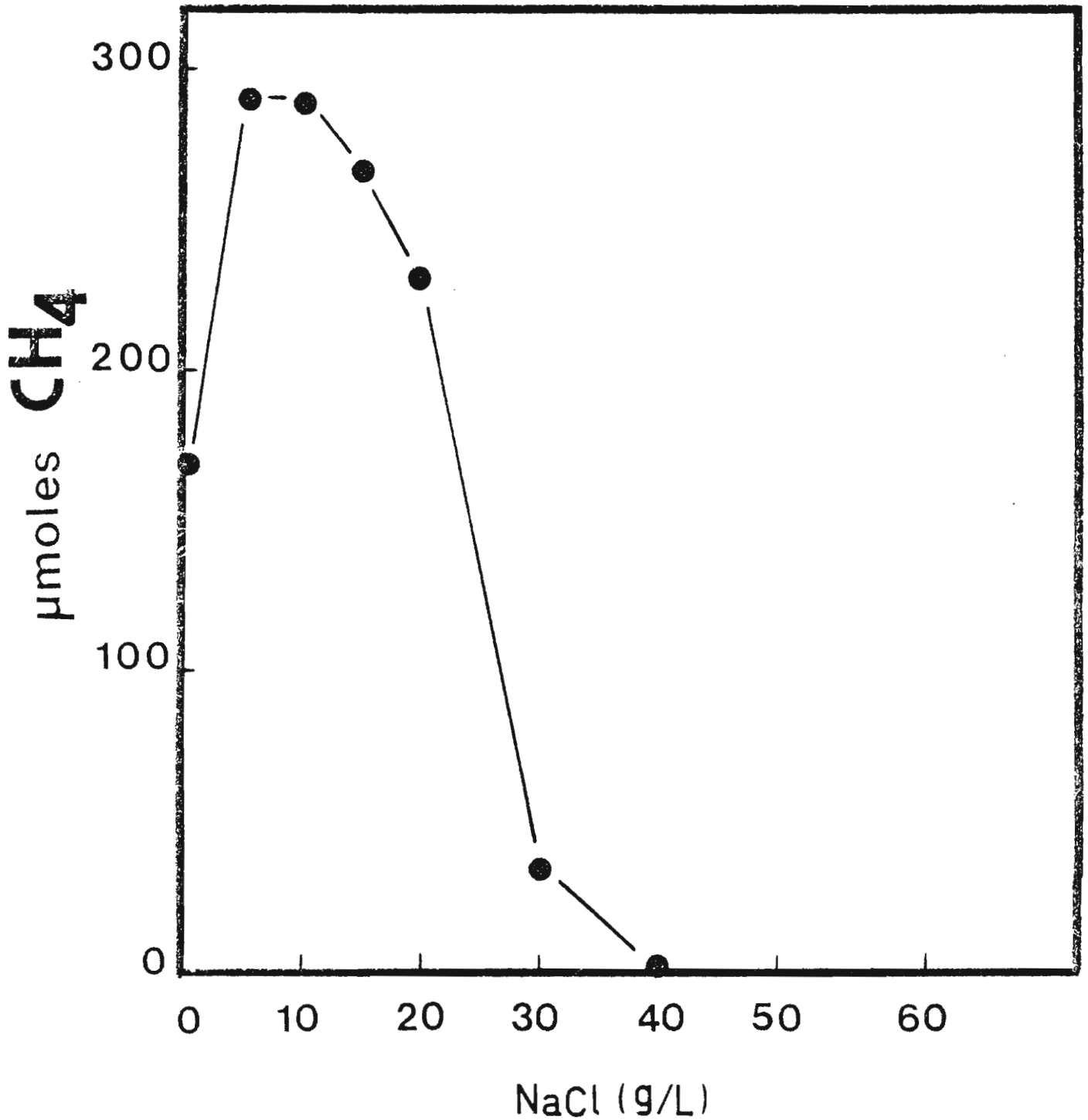


FIG. 17 : Effet de la concentration en NaCl sur la production de méthane par la souche Mg. Résultats obtenus après 2 jours de culture sous H_2/CO_2 à $55^\circ C$. Les quantités de méthane sont exprimées pour 20 ml de milieu.

Parmi les deux genres *Methanococcus* et *Methanogenium*, le genre *Methanococcus* peut être éliminé. Les bactéries de ce genre sont exigeantes en Magnésium, mais elles ne le sont pas vis à vis de l'acétate (JONES et STADTMAN, 1977).

Récemment plusieurs souches d'une même espèce thermophile appartenant au genre *Methanogenium* (*M. thermophilicum*) ont été décrites (FERGUSON et MAH, 1983 b ; RIVARD et SMITH, 1982 ; ZABEL *et al.*, 1985). Les propriétés morphologiques et physiologiques de la souche Mg nous permettent de la classer dans cette même espèce. Aucune différence nette ne subsiste entre la souche Mg et les autres souches de l'espèce *M. thermophilicum*.

TABLEAU 9 : EFFET DE L' ADDITION DE $MgCl_2$ SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE Mg.

$MgCl_2 \cdot 6 H_2 O$ (g/l)	0	0,1	0,4	0,8	2	10
CH_4 (μ moles)	229	229	250	328	257	246

- Les résultats sont exprimés en μ moles pour 20 ml de milieu.

- Résultats après 2 jours de culture à 55°C sous H_2/CO_2 .

TABLEAU 10 : EXIGENCES NUTRITIONNELLES DE LA SOUCHE

METHANOGENE Mg

TRAITEMENTS	JOURS DE CULTURE			
	3	5	7	17
Témoin	0	0	0	0
Vitamines	0	0	0	0
Extrait de levure	109	170	170	175
Biotrypcase	32	359	453	611
Acetate	0	0	0	44
Acetate + Biotryp.	77	368	405	619
Acetate + Extrait de levure	250	565	630	619
Acetate + Vitamines	0	18	18	44

- Les résultats sont exprimés en μmoles de CH_4 pour 20 ml de milieu de culture.
- Les composés organiques sont apportés à 1 g/l. La solution de vitamines a été apportée à 0,05 ml/20 ml.
- Les bactéries ont été cultivées sous H_2 / CO_2 (2 atm) à 55°C.

3 - Isolement et caractérisation d'une bactérie méthanogène thermophile acétoclaste (souche MP)

3 . 1 - Isolement

800 g de jacinthes d'eau ont été dilués avec 800 ml d'eau et inoculés avec 1,25 g de termites broyés du Congo (*Cubitermes sp*). L'expérience a été réalisée par le Laboratoire d'Energétique Electrochimique et Biochimique (Université Paris Val de Marne). La digestion anaérobie s'est déroulée durant 45 jours en condition thermophile (55°C). Le méthane a été détecté après 30 jours d'inoculation. Le pourcentage de méthane dans le biogaz était de 53 %.

Des échantillons ont été inoculés dans le milieu décrit en ANNEXE, contenant 0,1 % d'extrait de levure et 5 % (V/V) de jus de rumen. Des enrichissements ont été réalisés sur H₂/CO₂, acétate, triméthylamine (TMA) et méthanol. Le méthane a été produit après trois jours de culture sous H₂/CO₂. Sur ce substrat nous avons isolé la bactérie hydrogénophile précédemment décrite (*Methanogenium sp*, souche Mg). Sur les autres substrats (acétate, TMA, méthanol), une bactérie se présentant le plus souvent en tétrades, était dominante.

Après plusieurs transferts de cet enrichissement, nous avons dilué 1 ml de milieu en roll-tubes selon la technique de HUNGATE (1969). La purification de la souche n'a pu être réalisée qu'en diminuant la concentration en extrait de levure du milieu de culture (0,01 %). La pureté de la souche a été établie par l'examen microscopique et son inoculation dans un milieu contenant du glucose (5 g/l), de l'extrait de levure et du Biotrypcase (2 g/l).

3 . 2 - Morphologie

Les colonies apparaissent après 4 jours de culture à 55°C. Elles sont tout d'abord blanches, puis deviennent jaunes. Pendant la croissance, le microorganisme forme de larges agrégats (Fig 18, Fig 19). Des cellules isolées ou en tétrades sont quelquefois observées dans les jeunes cultures. Dans les cultures plus âgées, les agrégats peuvent se rompre et libérer d'innombrables cocci (1 à 2 µm) (Fig 20, Fig 21). Toutefois cette rupture n'est pas systématique.

3 . 3 - Conditions optimales de croissance

La température optimale de croissance est de 55°C. La bactérie ne se développe pas à 30 ou 60°C (Fig 22). Le pH optimum se situe entre 6,5 et 7,0. La croissance est nulle pour des valeurs de pH inférieures à 6,0 (Fig 23).

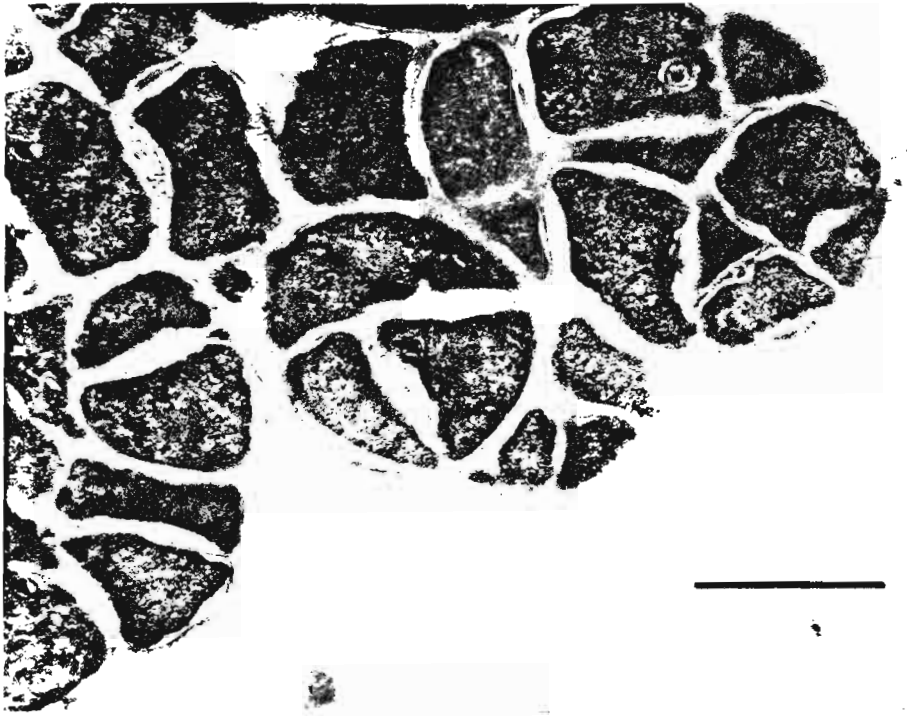


FIG. 18 : Formation d'aggregats chez *Methanosarcina* MP (Trait = 10 μm).

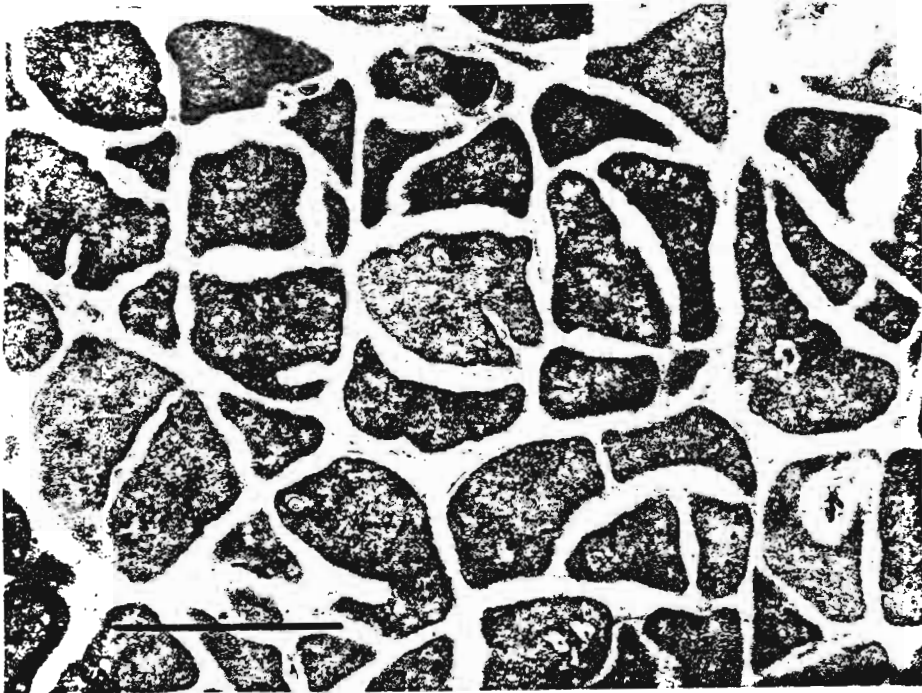


FIG. 19 : Vue de l'intérieur de l'aggregat chez *Methanosarcina* MP (Trait = 10 μm).

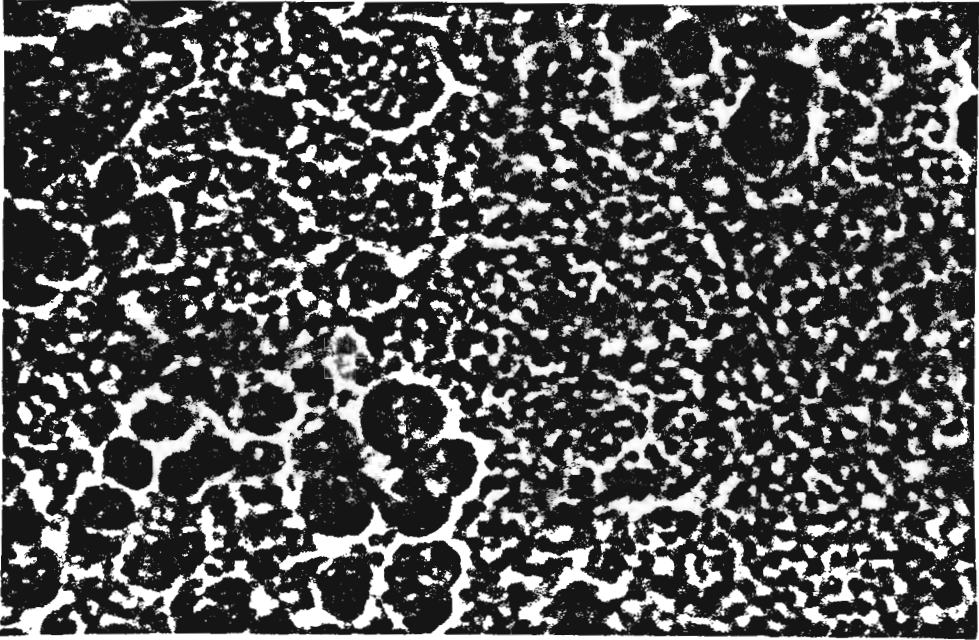


FIG. 20 : Libération de nombreuses cellules coccoides à partir d'aggrégats chez *Methanosarcina* MP (Trait = 10 μ m).

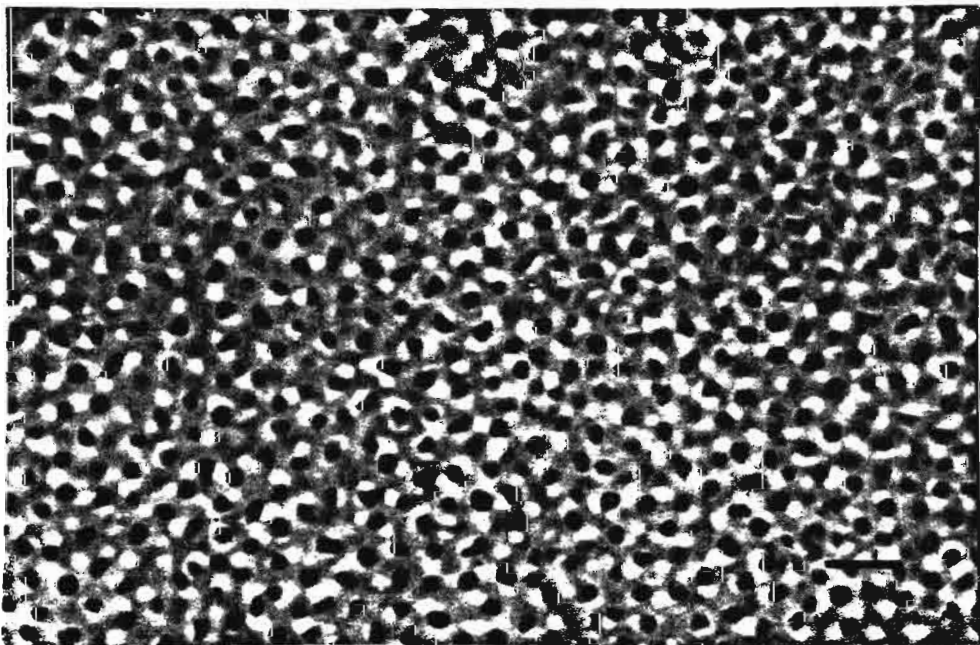


FIG. 21 : Cellules coccoides (trait = 10 μ m).

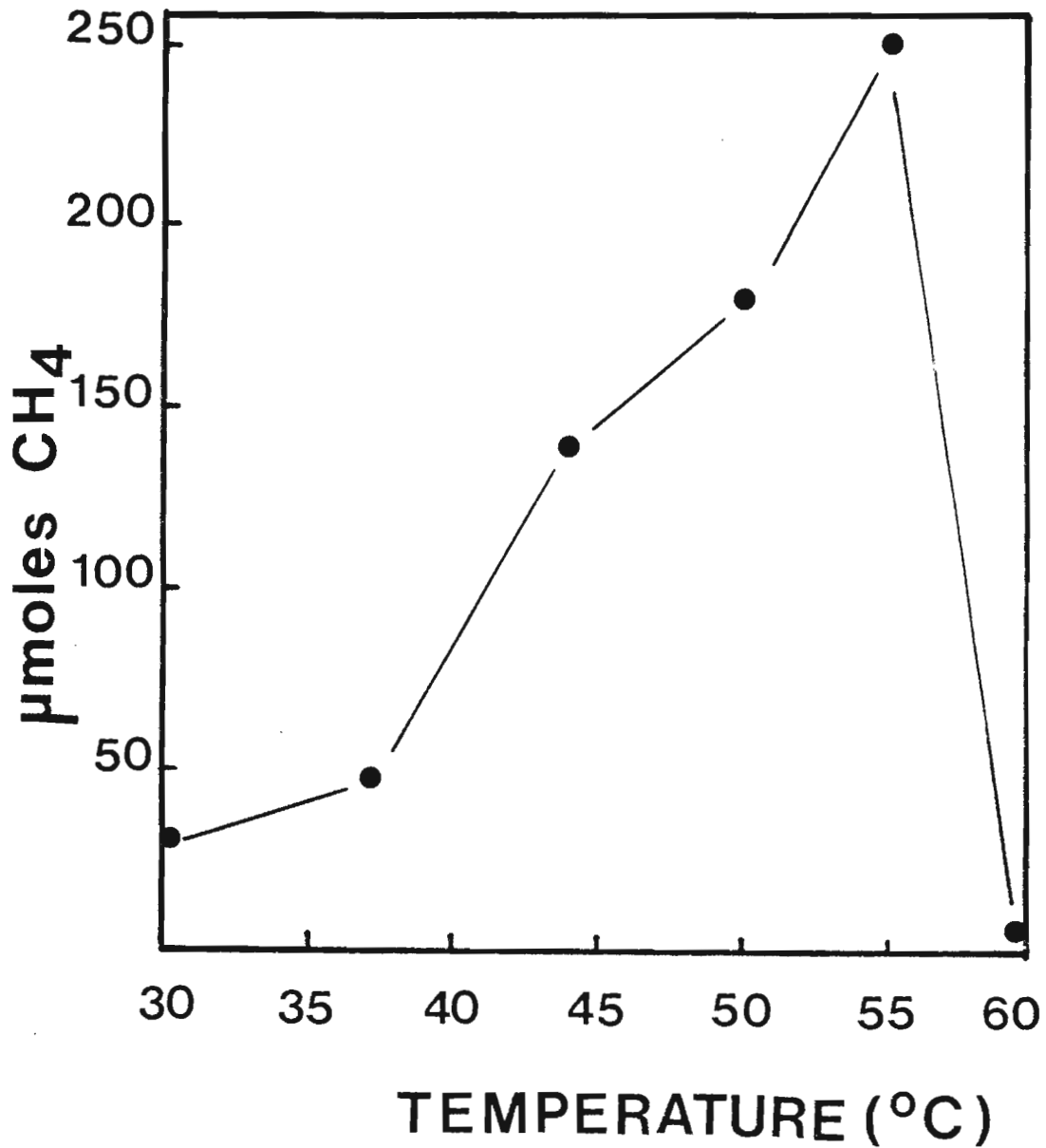


FIG. 22 : Effet de la température sur la production de méthane chez *Methanosarcina* MP. Les résultats ont été obtenus après 6 jours de culture. Les quantités de méthane sont exprimées pour 20 ml de milieu.

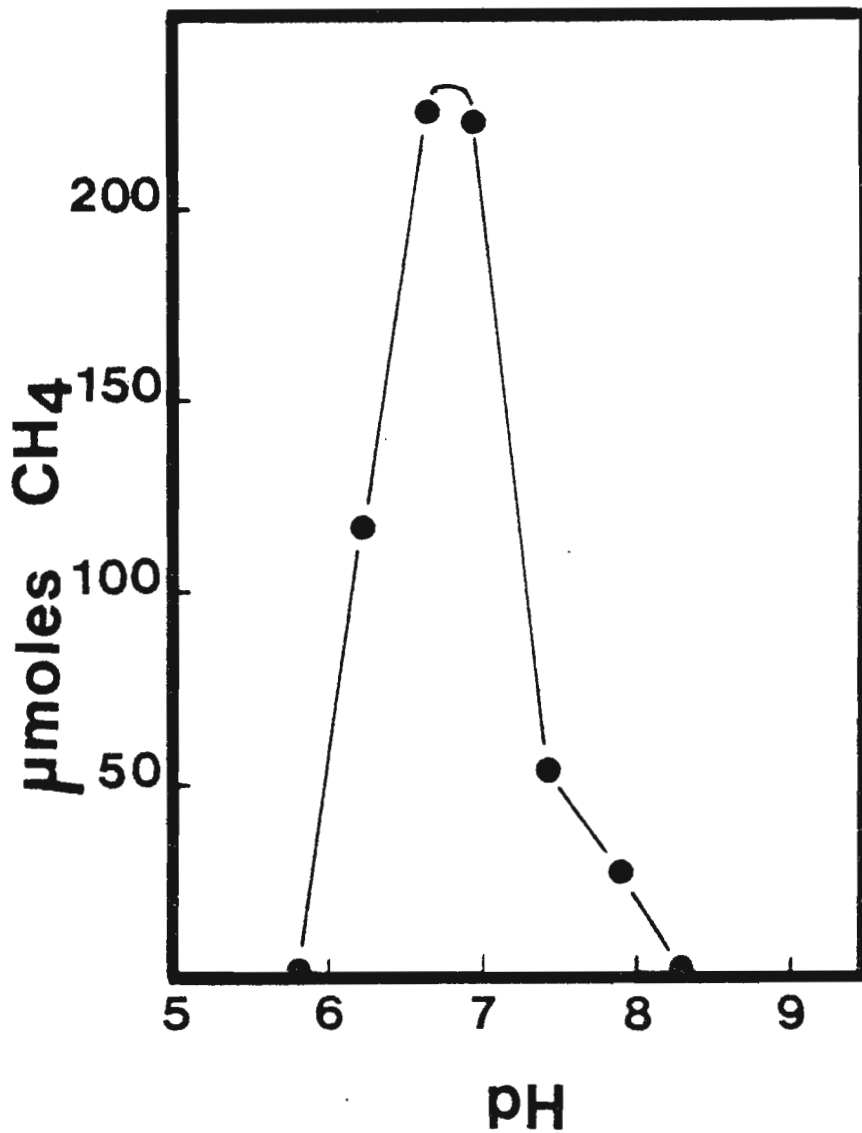


FIG. 23 : Effet du pH sur la production de méthane chez *Methanosarcina* MP. Les résultats ont été obtenus après 6 jours de culture. Les quantités de méthane sont exprimées pour 20 ml de milieu.

3.4 - Substrats utilisés

La souche MP utilise le méthanol, les méthylamines, et l'acétate comme sources de carbone et d'énergie. Aucune croissance n'a été obtenue sur H_2/CO_2 ou formiate après un mois d'incubation à 55°C. H_2/CO_2 inhibe la réaction acétoclastique (Fig 24).

3.5 - Exigences nutritionnelles

La bactérie thermophile peut croître en absence de vitamines ou de composés organiques (Fig 25). Cependant, dans de telles conditions la croissance est très lente. L'apport de vitamines, d'extrait de levure ou de jus de rumen stimule fortement la croissance (Fig 25, Fig 26). Par contre, l'addition de Biotrypcase n'a aucun effet (Fig 25).

3.6 - Discussion

La température optimale de croissance de la souche MP se situe aux environs de 55°C. Aucune croissance n'est observée à 30°C ainsi qu'à 60°C. Ces résultats indiquent que la bactérie isolée fait partie des bactéries modérément thermophiles. Les propriétés physiologiques et morphologiques de la souche MP nous permettent de la classer dans le genre *Methanosarcina*. D'autres genres de bactéries méthanogènes tels que les genres *Methanolobus* (KÖNIG et STETTER, 1982) ou *Methanococoides* (SOWERS et FERRY, 1983) utilisent aussi le méthanol et les méthylamines mais n'utilisent pas l'acétate.

La souche MP ainsi que les autres bactéries thermophiles acétoclastes, sont incapables d'utiliser $H_2 + CO_2$ comme source de carbone et d'énergie (NOZHEVNIKOVA et YAGODINA, 1982 ; TOUZEL *et al.*, 1985 ; ZINDER et MAH, 1979).

Par contre, les autres bactéries mésophiles appartenant au genre *Methanosarcina* sont hydrogénophiles (MAH et SMITH, 1981 ; MAH *et al.*, 1978), excepté l'espèce *M. mazei* qui utilise faiblement H_2/CO_2 (MAH, 1980).

Morphologiquement, la souche MP ressemble à *Methanosarcina thermophila* (ZINDER et MAH, 1979). Elle en diffère cependant par le fait qu'elle peut, contrairement à cette espèce, se développer sur milieu minéral. De plus, la souche MP peut libérer des agrégats, de nombreux cocci, ainsi que l'avait décrit MAH (1980) pour l'espèce mésophile *M. mazei*. La souche MP présente d'autres petites différences par rapport à *M. thermophila* : elle est incapable de se développer à pH 5,5 et pH 8,0 et présente un optimum de température légèrement supérieur (55°C au lieu de 50°C).

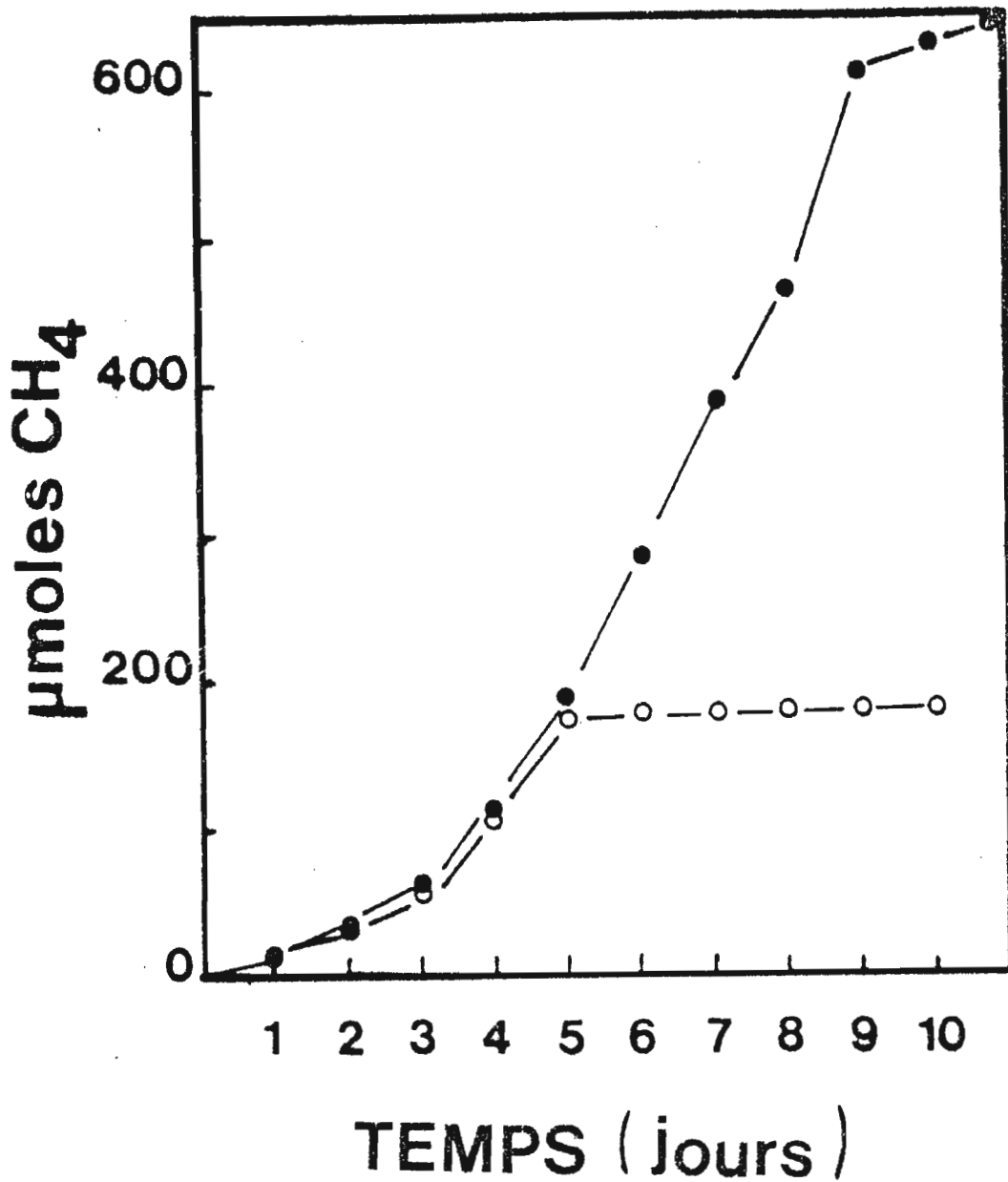


FIG. 24 : Effet de l'addition d'H₂/CO₂ sur la dégradation de l'acétate chez *Methanosarcina* MP. Les quantités de CH₄ sont exprimées pour 20 ml de milieu. L'addition d'H₂/CO₂ (0,5 bar) a été faite après 5 jours de culture.

Symboles : contrôle, ● , addition d'H₂/CO₂, ○

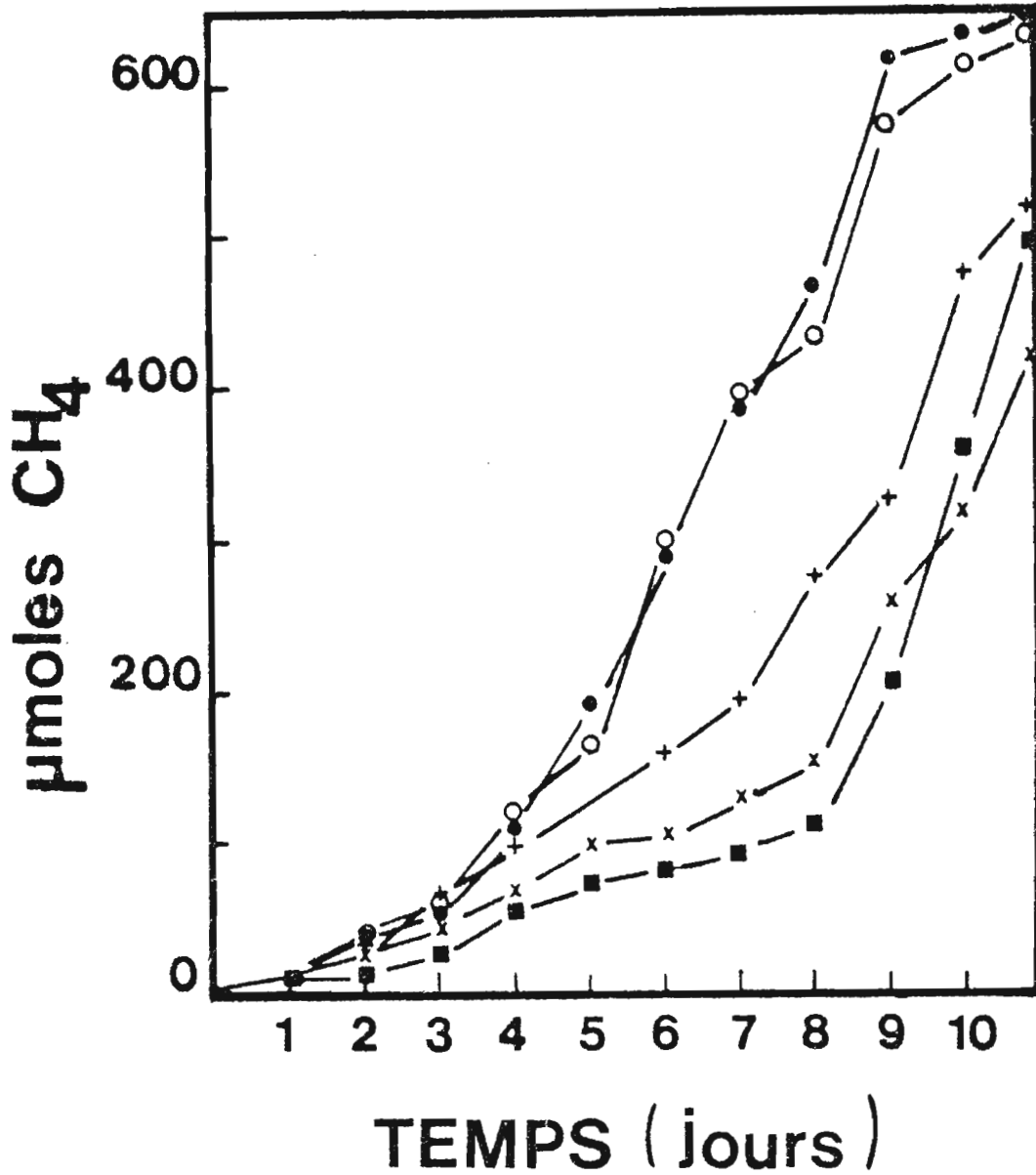


FIG. 25 : Exigences nutritionnelles chez *Methanosarcina* MP. Les quantités de CH_4 sont exprimées pour 20 ml de milieu. L'inoculum était une culture de la souche MP ayant poussé sur milieu minéral
 Symboles : controle, ■ ; vitamines, + ; biotrypcase (1g/l), x ; extrait de levure (1g/l), ○ ; extrait de levure (1g/l) + Biotrypcase (1g/l), ●

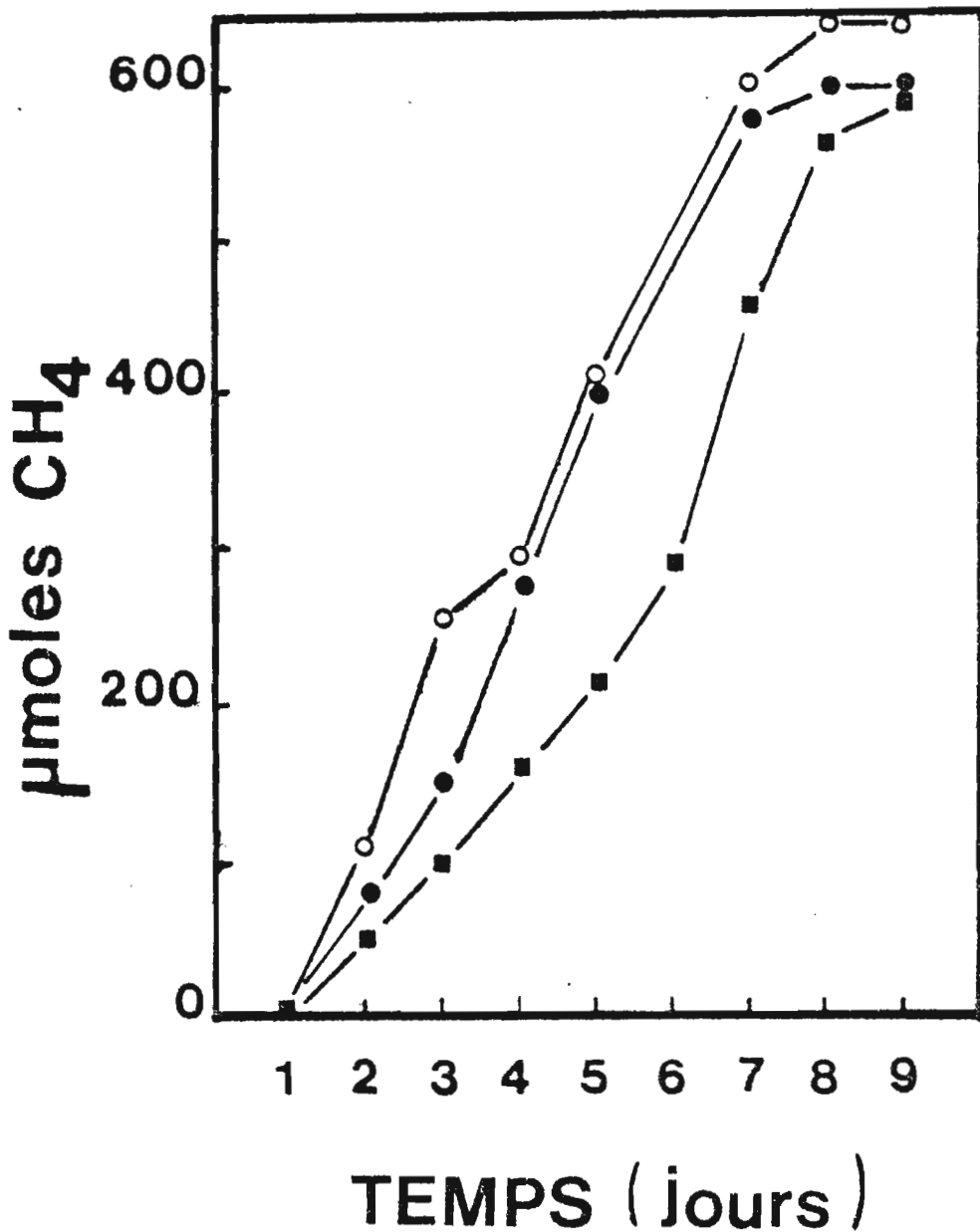


FIG. 26 : Effet de l'addition de jus de rumen sur la production de méthane chez *Methanosarcina* MP. Les quantités de CH_4 sont exprimées pour 20 ml de milieu. Le milieu de base contient 0,1 % d'extrait de levure. symboles : Témoin, ■ ; jus de rumen 1 % (V/V), ● ; jus de rumen 5 %, ○

L'isolement d'une nouvelle sarcine thermophile à partir d'un digesteur alimenté en jacinthes d'eau et inoculé avec des broyats de termites confirme que ces bactéries jouent un rôle important dans la digestion anaérobie thermophile, ainsi que l'avaient suggéré ZINDER et MAH (1979). Nos résultats ne nous permettent pas de conclure, cependant, que la bactérie isolée provient vraiment du tube digestif des termites.

B - LES CULTURES MIXTES DEFINIES

Dans le cadre de ces expériences, nous avons utilisé des souches que nous avons isolées, souche protéolytique (*Thermobacteroides proteolyticus*), souche méthanogène hydrogénophile (*Methanobacterium* sp), souche méthanogène acétoclaste (*Methanosarcina* MP) et une souche de collection : *Clostridium thermocellum* NCIB 10682.

1 - Les expériences sur gélatine

Les inoculum utilisés ont été les suivants :

- *T. proteolyticus* (T.) : 1 ml d'une culture âgée de 5 jours à 60°C
- *Methanobacterium* sp (M) : 1 ml d'une culture âgée de 3 jours à 60°C
- *Methanosarcina* MP (S) : 2 ml d'une culture âgée de 7 jours à 55°C

Nous avons réalisé les associations suivantes sur gélatine :

- (T) - *T. proteolyticus*
- (TM) - *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp
- (TMS) - *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP
- (TS) - *T. proteolyticus* + *Methanosarcina* MP

Des flacons ne contenant pas de gélatine ont été inoculés de la façon suivante :

- (T) - *T. proteolyticus*
- (S) - *Methanosarcina* MP
- (M) - *Methanobacterium* sp
- (TM) - *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp
- (TMS) - *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP

Les expériences ont été réalisées à 55°C, 3 répétitions ont été analysées par traitement. Les résultats sont exprimés en µmoles par flacon de 20 ml.

1.1 - Etude de l'association : *Thermobacteroides proteolyticus* + *Methanobacterium* sp (TM)

1.1.1 - Production des gaz

En culture pure, *T. proteolyticus* produit environ 100 µmoles d'H₂ pour 20 ml de milieu (Fig 27). Lorsque cette bactérie est associée à *Methanobacterium* sp, la production d'H₂ est nettement plus importante (Fig 27).

En coculture (TM), environ 200 µmoles de méthane sont produites à partir de l'H₂ libéré lors de la dégradation de la gélatine par la source acidifiante (Fig 28).

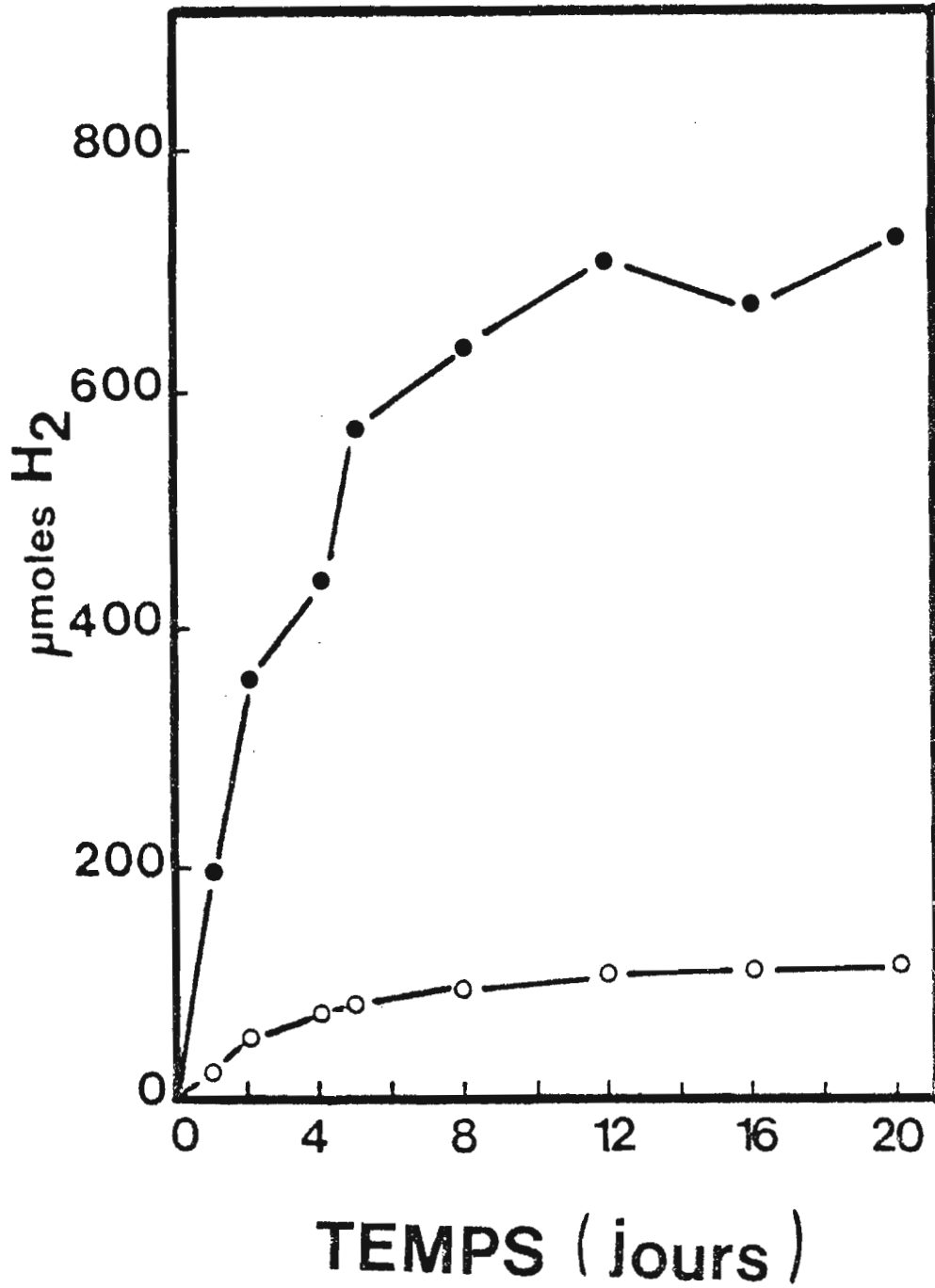


FIG. 27 : Production d'H₂ lors de la dégradation de la gélatine.
T. proteolyticus ○, *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp. ●

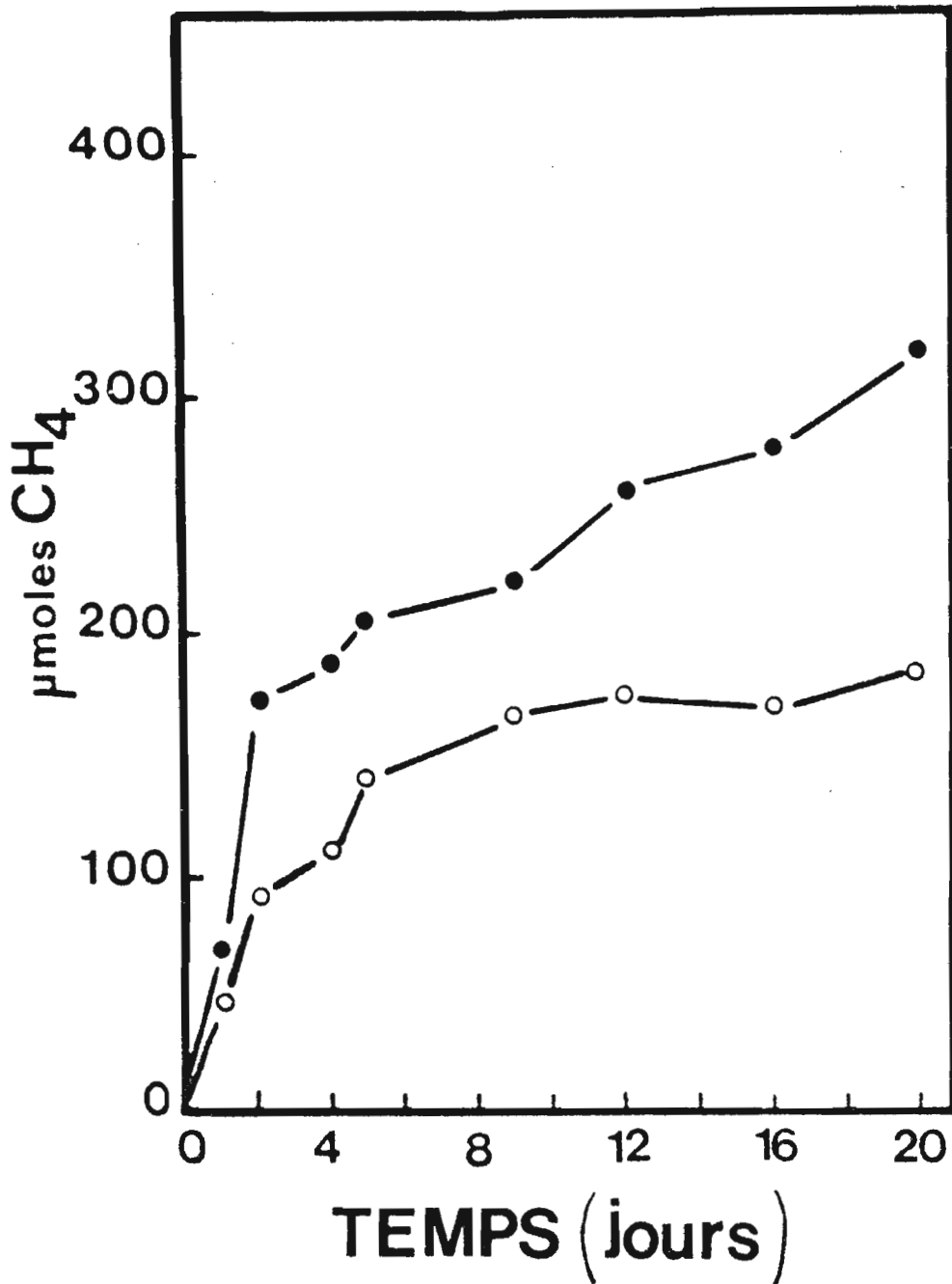


FIG. 28 : Production de méthane lors de la dégradation de la gélatine. *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp, ○; *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP, ●

1 . 1 . 2 - Analyse de la phase liquide

- dosage des protéines :

Les résultats obtenus montrent que lorsque la souche acidifiante est associée à une souche méthanogène utilisant H_2/CO_2 , le substrat est très vite dégradé.

En effet, dès le 3ème jour la presque totalité de la gélatine a été dégradée en coculture (TM). Au contraire, il a fallu plus de 10 jours de culture pour que *T. proteolyticus* puisse métaboliser la même proportion de substrat dans les conditions de l'expérience (Fig 29).

On remarque tout de même qu'au 24ème jour, l'utilisation de la gélatine est moindre dans le cas d'une culture pure de la souche acidifiante (Fig 29).

- analyse des AGV :

Les résultats obtenus montrent que la souche acidifiante produit en culture pure de l'acétate et de l'isovalérate (Fig 30).

A la fin de l'expérience, des traces de propionate et d'isobutyrate sont détectées

Par contre, dans le cas de la coculture (TM), on trouve également de l'acétate et de l'isovalérate, mais les quantités de propionate et d'isobutyrate sont plus importantes (Fig 31).

L'acétate est le principal AGV détecté lorsque *T. proteolyticus* est cultivé sur gélatine. Associée à *Methanobacterium* sp, cette souche produit d'avantage d'acétate (Fig 31).

1 . 2 - Etude de l'association : *T. proteolyticus* + *Methanosarcina* MP (TS)

Nous avons constaté que le métabolisme de *T. proteolyticus* n'a pas été modifié lorsque cette bactérie a été associée à *Methanosarcina* MP. La bactérie méthanogène n'a utilisé ni H_2/CO_2 , ni l'acétate comme sources de carbone et d'énergie (Fig 32).

1 . 3 - Etude de l'association : *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP (TMS)

1 . 3 . 1 - Production des gaz

Les résultats obtenus au cours de l'expérience réalisée avec 6 g/l de gélatine lors de l'association des 3 bactéries indiquent que la production de méthane est biphasique : la 1ère phase correspond à la production de méthane par la souche hydrogénéophile pendant les 5 premiers jours de l'expérience et la 2ème phase

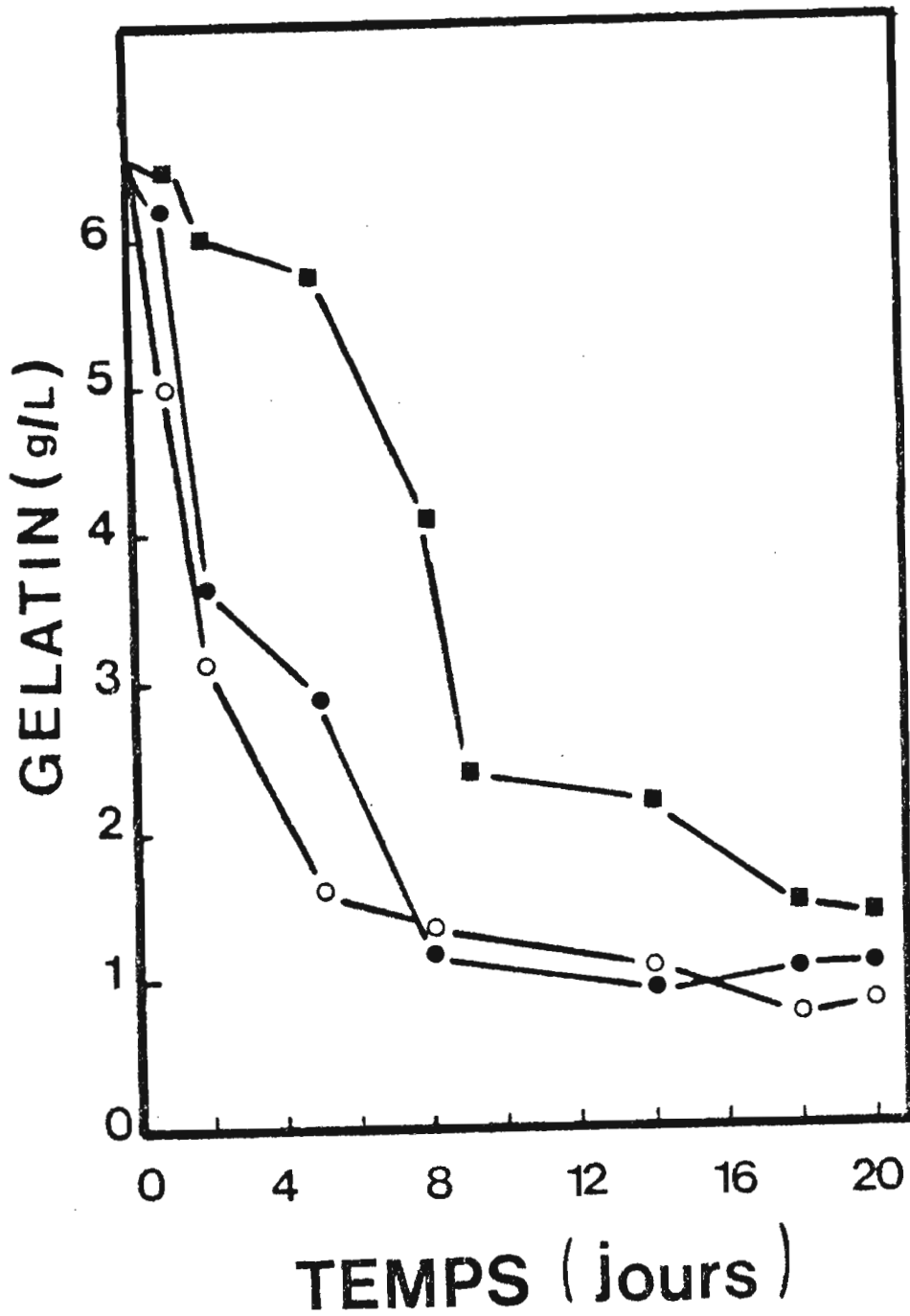


FIG. 29 : Dégradation de la gélatine par différentes associations de bactéries. *T. proteolyticus* , ■ ; *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp, ○ ; *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP, ●.

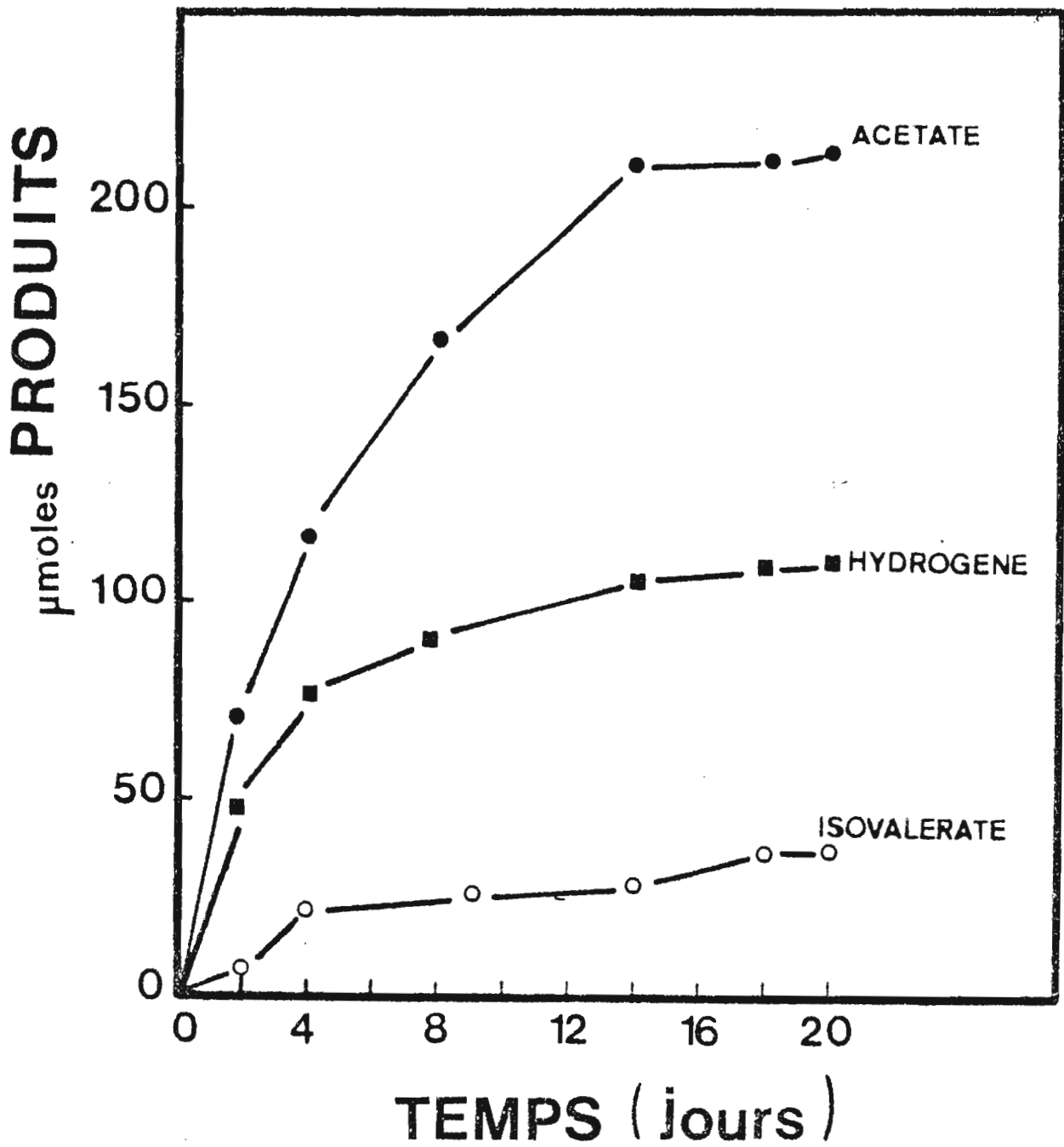


FIG. 30 : Produits de la dégradation de la gélatine par *T. proteolyticus*.

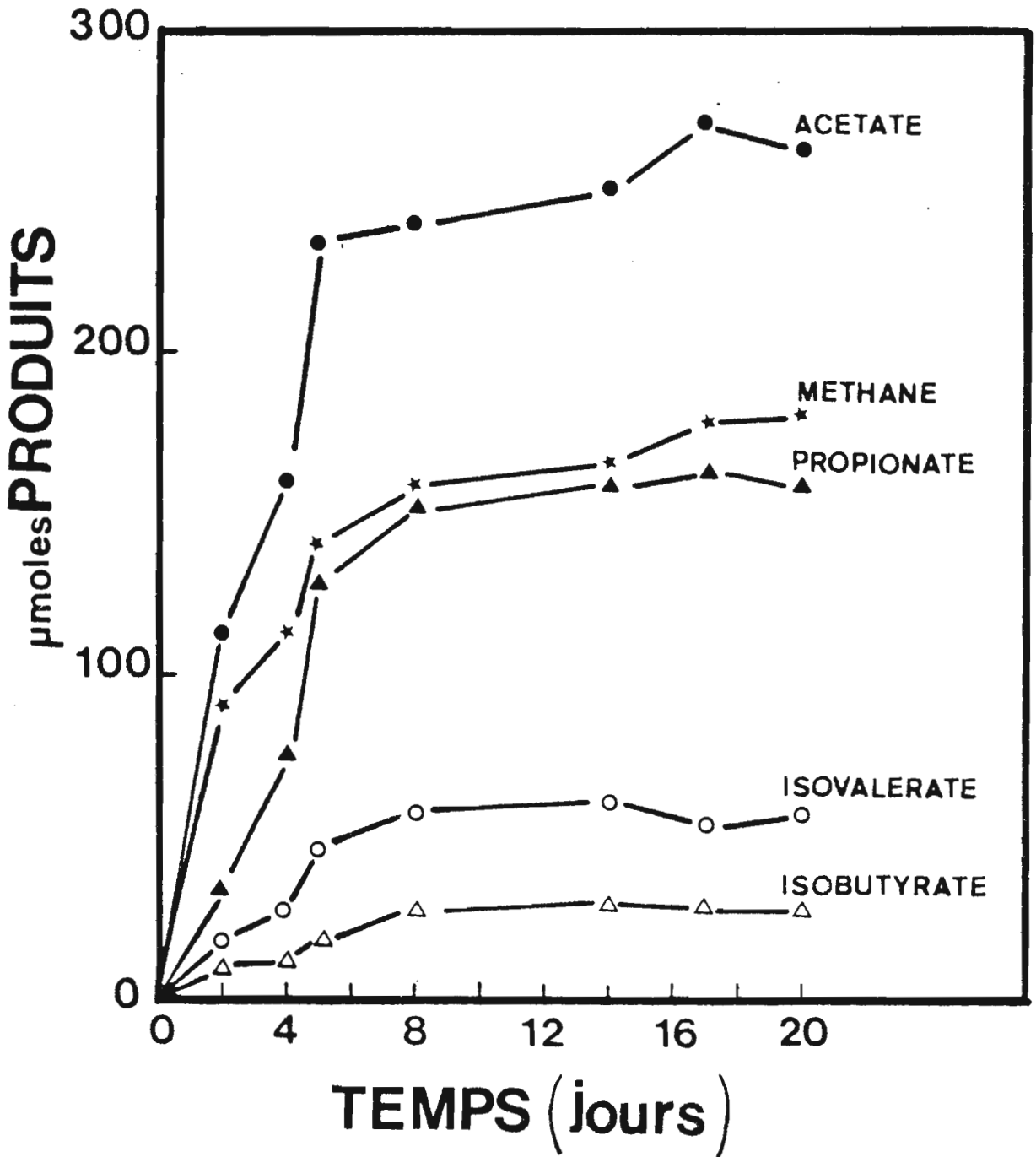


FIG. 31 : Produits de la dégradation de la gélatine par l'association *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp.

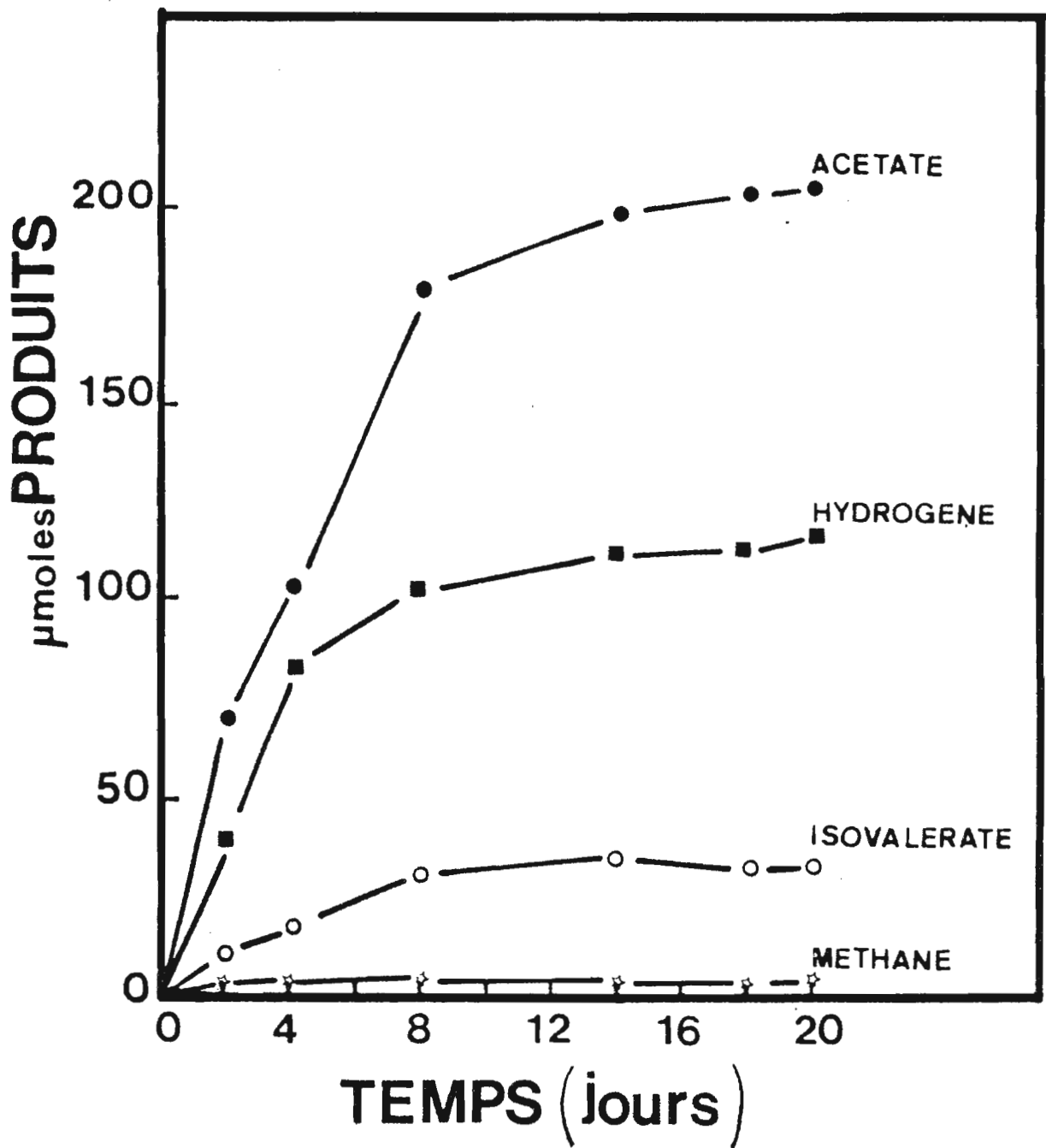


FIG. 32 : Produits de la dégradation de la gélatine par l'association *T.proteolyticus* + *Methanosarcina* MP.

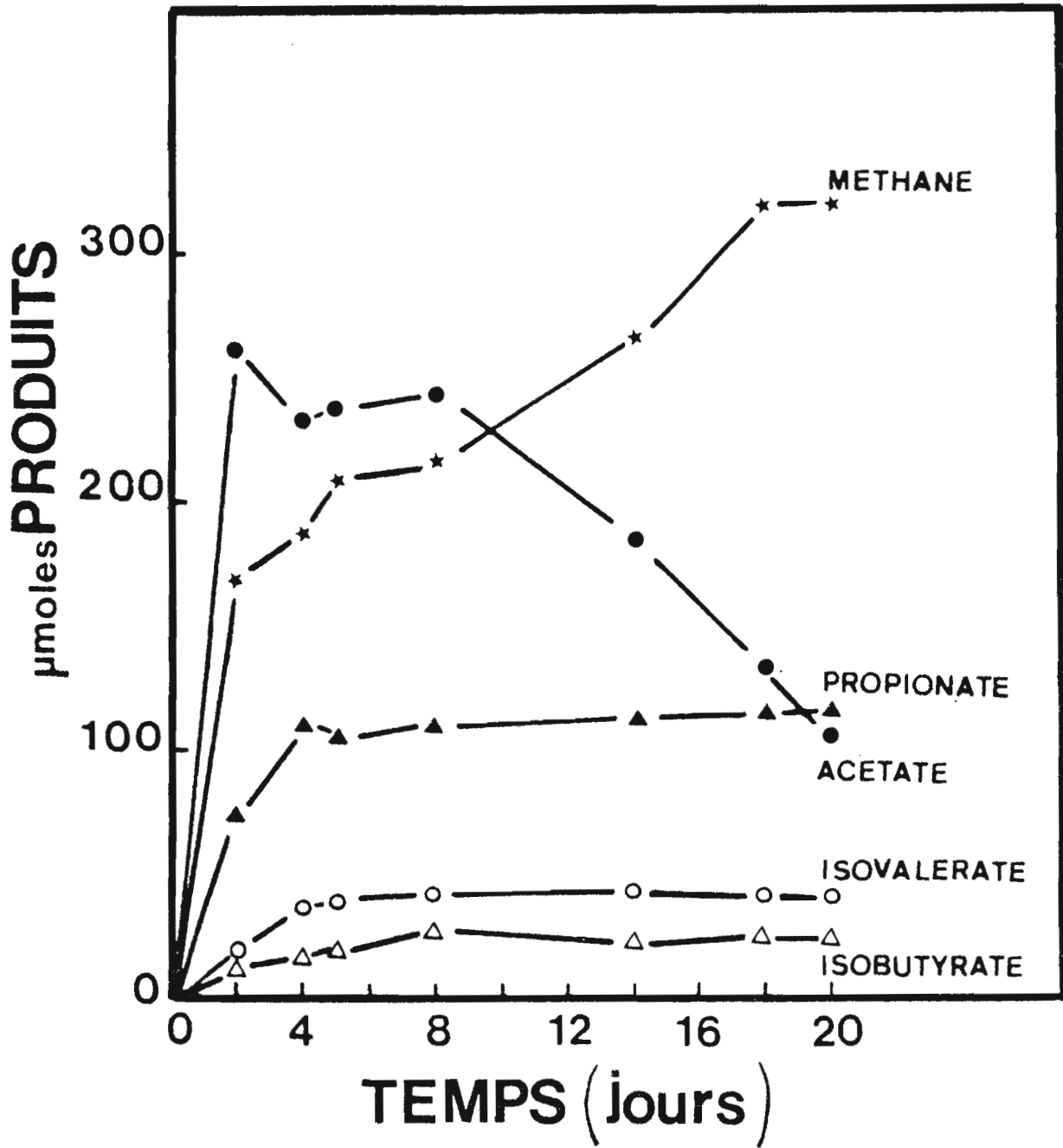


FIG. 33 : Produits de la dégradation de la gélatine par l'association *T.proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP.

correspond à la production de méthane par la bactérie acétoclaste (Fig 28). Après 20 jours d'incubation, la production de méthane atteint 300 μ moles par flacon (Fig 33).

1.3.2 - Analyse de la phase liquide

Les résultats obtenus après 20 jours d'incubation montrent que l'inoculation de la sarcine thermophile n'a absolument pas modifié la production d'acides gras volatils dans la culture mixte (TMS) par rapport à la coculture (TM) (Fig 31, Fig 33).

En effet, nous pouvons remarquer qu'il y a également production d'acétate, isobutyrate, isovalérate et propionate en proportions identiques dans les deux associations (Fig 33).

Cependant, après 2 jours d'incubation, la concentration d'acétate diminue dans la triculture et on assiste à une production de méthane par la voie de l'acétoclastie. Après 20 jours, la totalité de l'acétate produit n'est pas utilisée ; sur les 300 μ moles d'acétate présentes seules 200 μ moles ont été dégradées par la bactérie acétoclaste *Methanosarcina* MP (Fig 33).

La fermentation de la gélatine n'est pas accompagnée d'une forte diminution du pH. Durant l'expérience, le pH passe de 7,2 à 6,8 (Tableau 11).

2 - Les expériences sur cellulose

Nous avons réalisé les associations suivantes sur cellulose :

- *Clostridium thermocellum* (C)
- *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp (CM)
- *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP (CMS)

Des flacons sans cellulose ont été inoculés de la manière suivante

- *C. thermocellum* (C)
- *Methanosarcina* MP (S)
- CM, CMS

Les inoculum utilisés ont été les suivants :

- *C. thermocellum* : 1 ml d'une culture âgée de 6 jours à 60°C
- *Methanobacterium* sp : 1 ml d'une culture âgée de 3 jours à 60°C
- *Methanosarcina* MP : 2 ml d'une culture âgée de 7 jours à 55°C

Les expériences ont été réalisées à 55°C, 3 répétitions ont été analysées par traitement. Les résultats sont exprimés en μ moles par flacon de 20 ml de milieu pour 6 g/l de cellulose CMN 300.

TABLEAU 11 : MESURE DU pH APRES 24 HEURES D'INCUBATION
POUR LES DIFFERENTES ASSOCIATIONS BACTERIENNES
ETUDIEES.

ASSOCIATIONS	T	TM	TMS
pH final	6,75	6,7	6,75

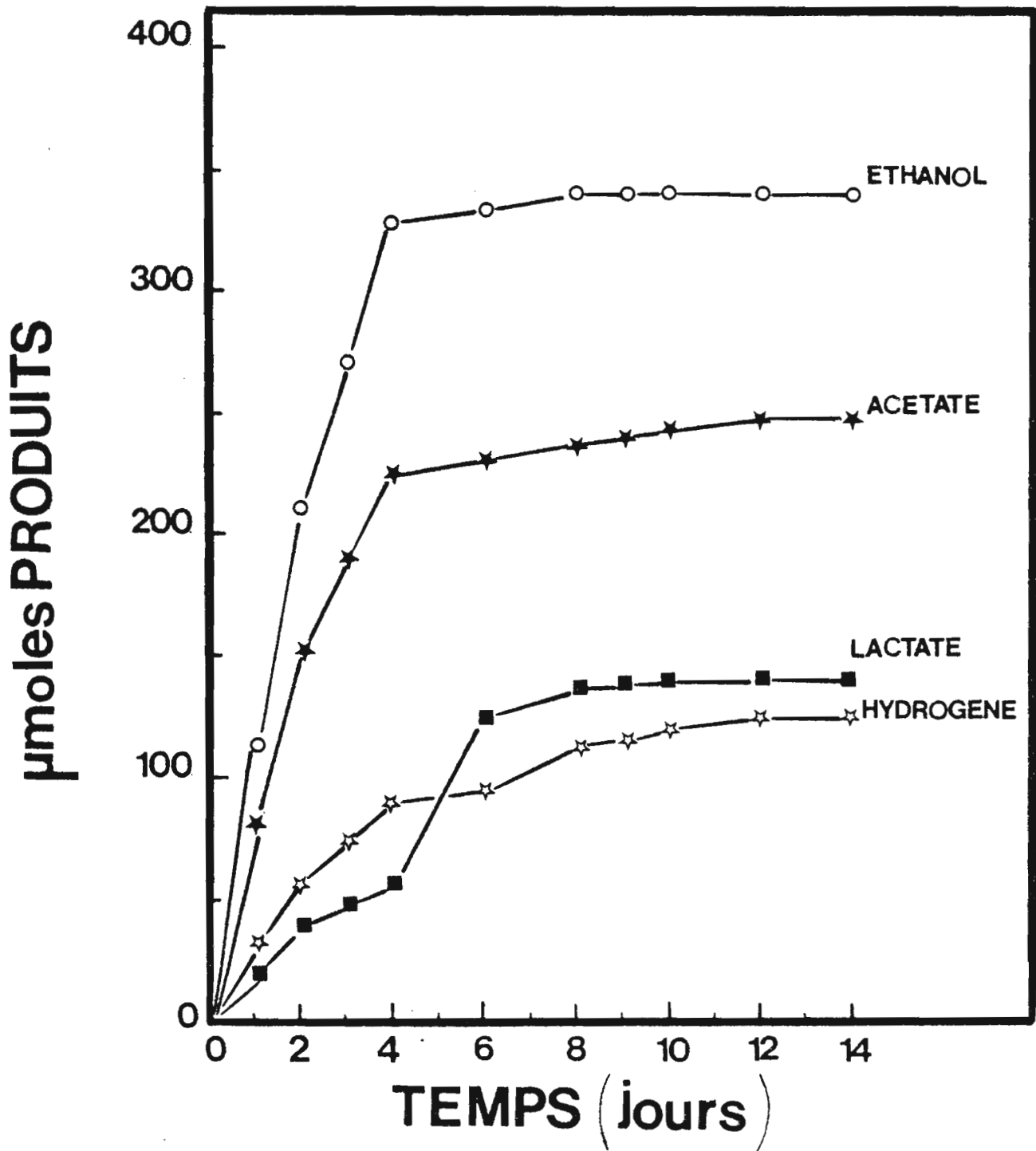


FIG. 34 : Produits de la dégradation de la cellulose par *C.thermocellum*.

2.1 - Etude de l'association : *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp (CM)

2.1.1 - Production des gaz

Les résultats obtenus montrent qu'en culture pure, *C. thermocellum* produit environ 100 μ moles d'hydrogène (Fig 34). Quand cette bactérie est couplée avec une bactérie méthanogène hydrogénophile, la production d' H_2 est multipliée par 14, elle atteint 1400 μ moles (Fig 35) ; cette quantité a été déterminée d'une manière théorique à partir de la production de méthane ($4 H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4$). En coculture (CM), 400 μ moles de méthane sont produites à partir de l'hydrogène libéré lors de la fermentation de la cellulose (Fig 36).

2.1.2 - Analyse de la phase liquide

- fermentation de la cellulose :

La figure 37 montre la dégradation de la cellulose par les différentes associations de *C. thermocellum* avec les deux bactéries méthanogènes (hydrogénophile et acétoclaste).

La dégradation de la cellulose n'est pas modifiée lorsque *C. thermocellum* est associé à une bactérie méthanogène hydrogénophile. Par contre, l'inoculation de *Methanosarcina* MP provoque un net ralentissement de cette dégradation (Fig 37).

La fermentation de la cellulose a été accompagnée d'une forte chute du pH relative à une accumulation d'acides gras dans le milieu de culture (Fig 38).

Le pH initial de 7,2 passe à 5,8 après 6 jours d'incubation notamment lorsque *C. thermocellum* est associé à une bactérie méthanogène hydrogénophile : *Methanobacterium* sp (Fig 38).

- analyse des acides gras volatils (AGV) :

Les résultats de notre expérience montrent que la souche acidifiante produit en culture pure de l'acétate (Fig 34). Dans le cas de la coculture (CM), on retrouve également de l'acétate (Fig 36), mais cet AGV est produit en plus grande quantité. En effet, 700 μ moles d'acétate sont produites en coculture ; cette production n'est que de 200 μ moles lorsque *C. thermocellum* est cultivé en culture pure (Fig 34).

- analyse des alcools :

Le seul alcool détecté au cours de la fermentation de la cellulose est l'éthanol.

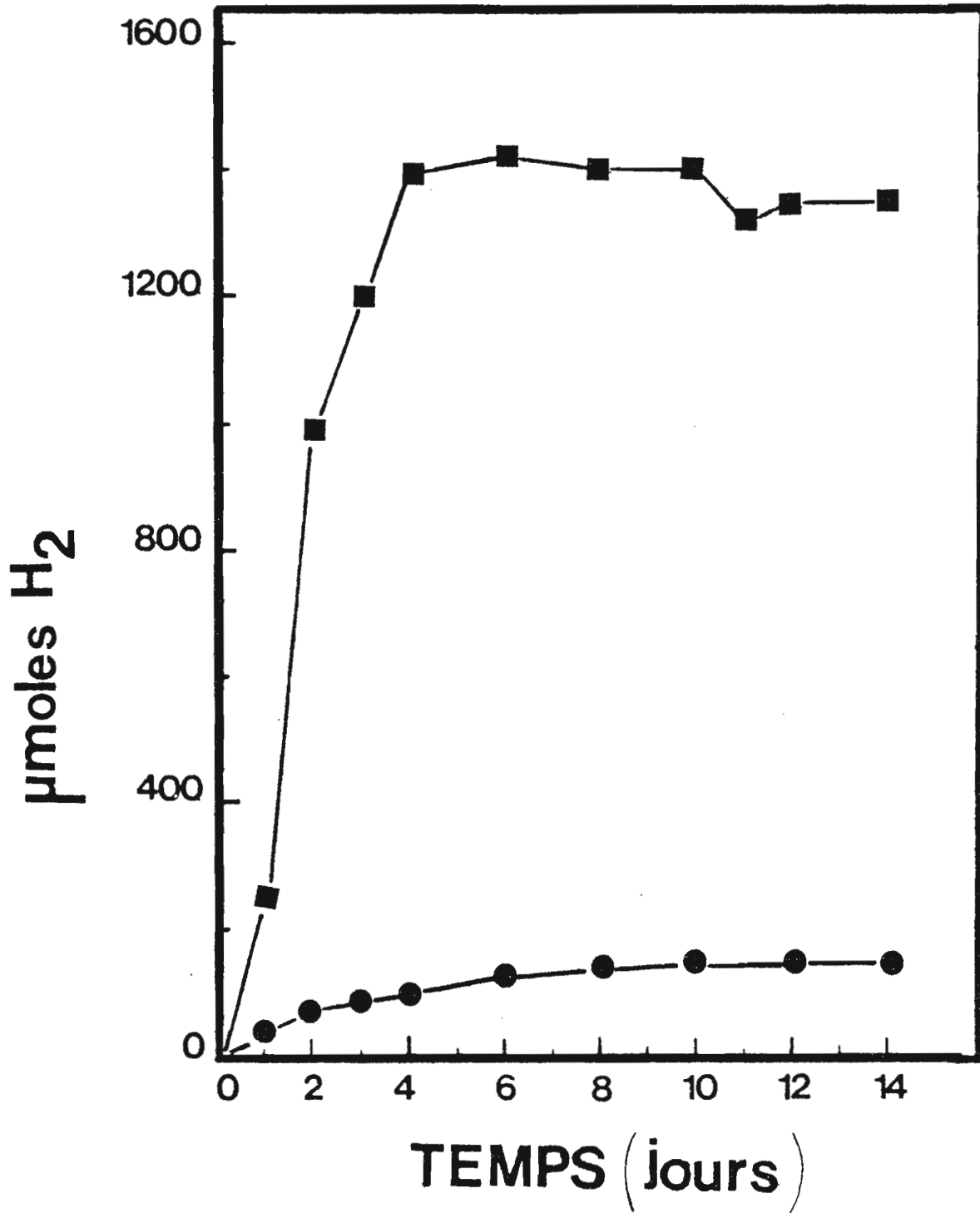


FIG. 35 : Production d' H_2 au cours de la dégradation de la cellulose. *C. thermocellum* , ● ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp, ■

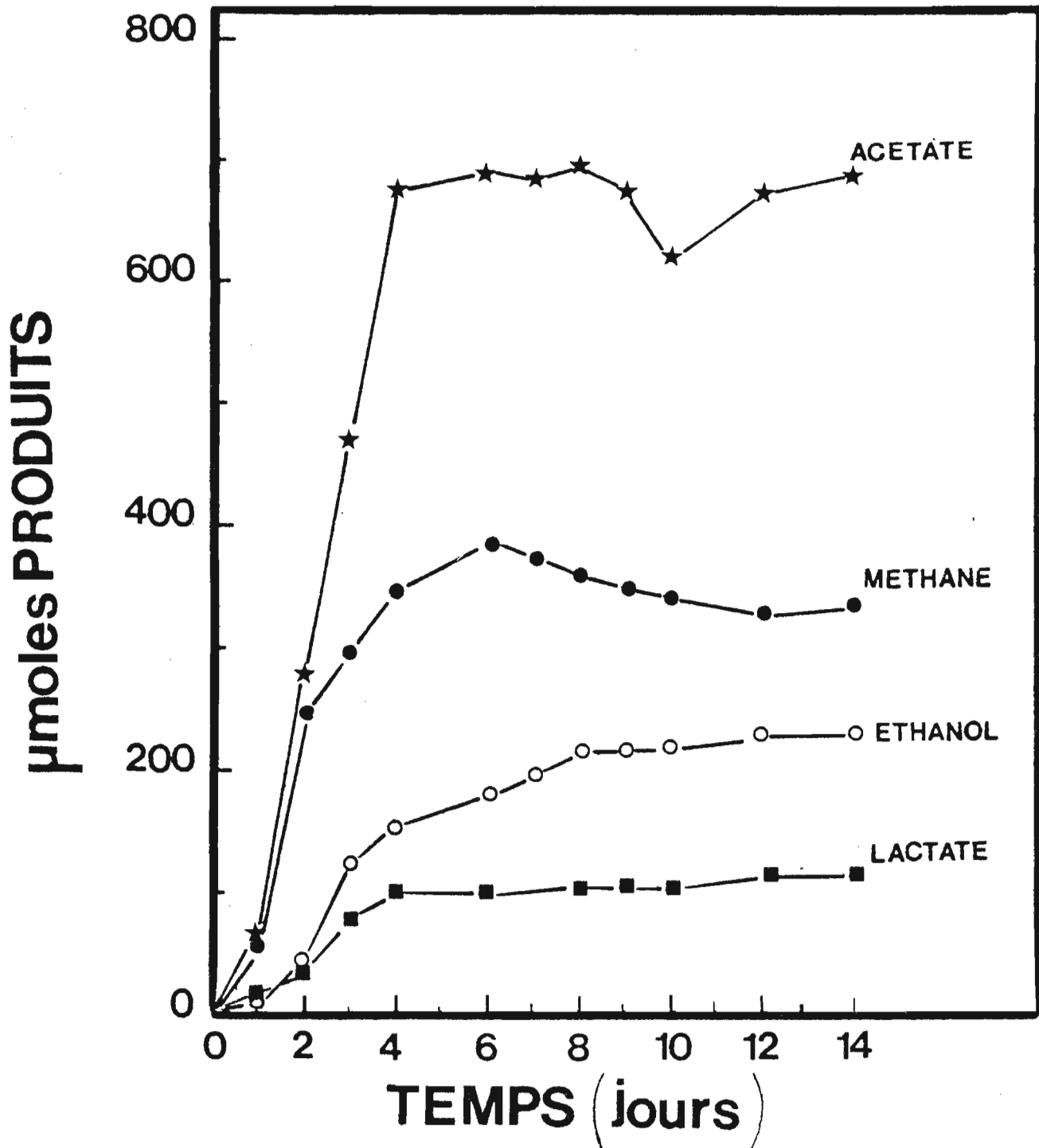


FIG. 36 : Produits de la dégradation de la cellulose par *C.thermocellum* + *Methanobacterium* sp.

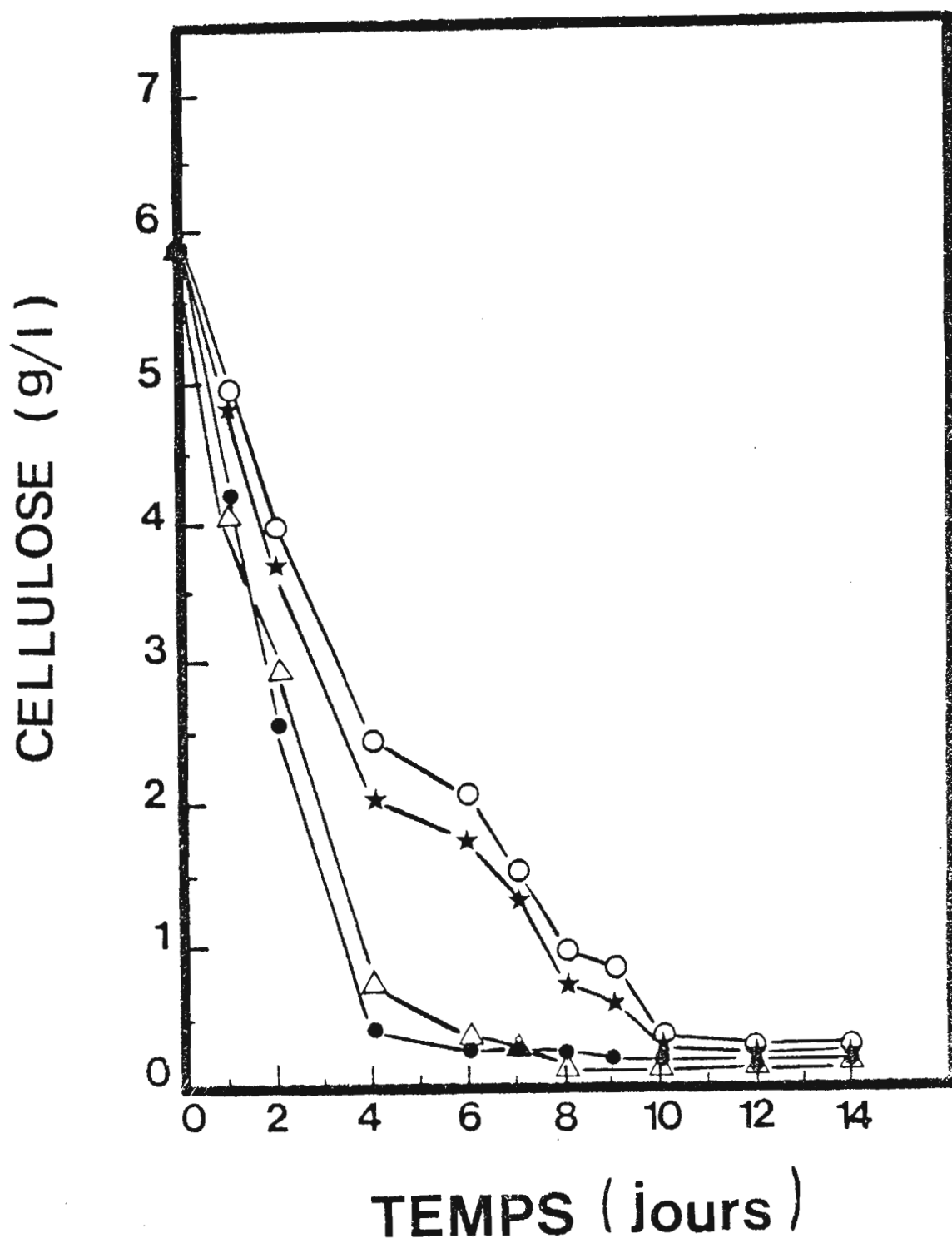


FIG. 37 : Dégradation de la cellulose par diverses associations de bactéries : *C. thermocellum*, ● ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp., △ ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp. + *Methanosarcina* MP, ○ ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP + 5 mM méthanol , ★

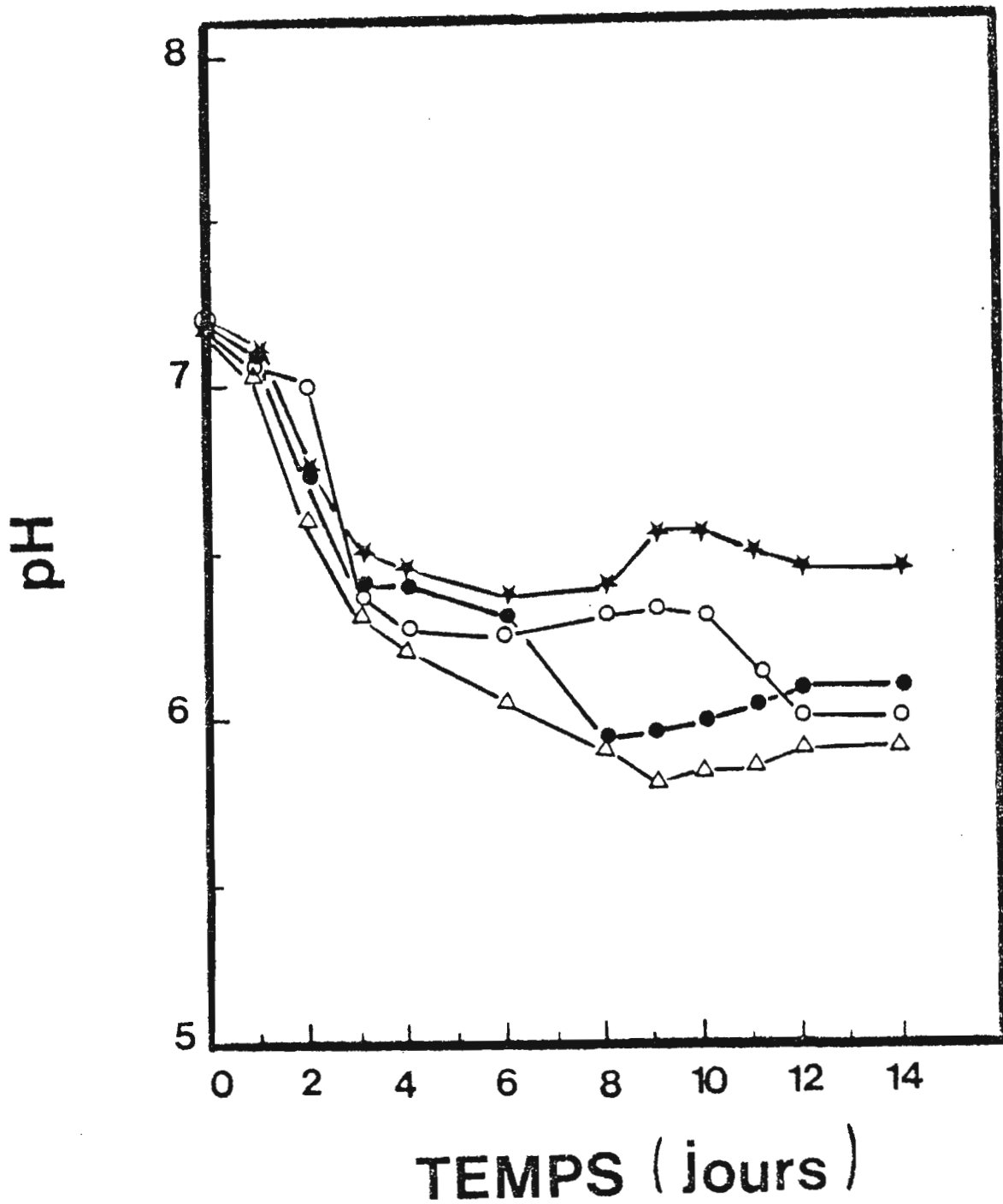


FIG. 38 : Evolution du pH au cours de la dégradation de la cellulose. *C. thermocellum*, ● ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp., △ ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp. + *Methanosarcina* MP, ○ ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP + 5 mM méthanol ★

En culture pure *C. thermocellum* produit environ 350 μ moles d'éthanol (Fig 34). Par contre, dans le cas de la coculture, (CM), la quantité produite est moins importante (200 μ moles) (Fig 36).

- analyse des acides organiques :

La fermentation de la cellulose par *C. thermocellum* conduit à la production de lactate. Quantitativement, il n'y a pas de différence entre *C. thermocellum* en culture pure (Fig 34) et *C. thermocellum* associé à la bactérie hydrogénéophile (Fig 36); environ 100 μ moles de lactate sont produites.

2.2 - Etude de l'association : *C. thermocellum* + *Methanosarcina* MP (CS)

L'inoculation de *Methanosarcina* MP n'a pas modifié le métabolisme de *C. thermocellum* sur cellulose. De plus, la bactérie méthanogène n'a utilisé ni l' H_2 libéré, ni l'acétate produit.

2.3 - Etude de l'association : *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP (CMS)

Les résultats de l'association (CM) ont montré que l'acétate s'accumulait dans le milieu lors de la dégradation de la cellulose. Il était donc intéressant de tester dans cette coculture une souche méthanogène thermophile utilisant l'acétate.

2.3.1 - Production des gaz

Les mesures de production de méthane ont été réalisées jusqu'au 14^{ème} jour d'incubation.

Pendant cette période, 700 μ moles de CH_4 sont produites (Fig 39).

2.3.2 - Analyse de la phase liquide

- fermentation de la cellulose :

L'inoculation de *Methanosarcina* MP à la coculture *C. thermocellum* - *Methanobacterium* sp, a provoqué un ralentissement de la dégradation de la cellulose (Fig 37). En effet, dès le 4^{ème} jour, 95 % de la cellulose a été dégradée en coculture (CM). Au contraire, il a fallu plus de 10 jours de culture pour que *C. thermocellum* puisse métaboliser la même proportion de substrat en triculture (Fig 37).

- analyse des alcools :

La fermentation de la cellulose en triculture montre que la production d'éthanol est la même qu'en coculture (Fig 39).

- analyse des acides organiques :

Le lactate a été détecté en quantité équivalente dans la culture mixte (CMS) et dans la coculture (CM) (Fig 39, Fig 36).

- analyse des acides gras volatils :

L'acétate produit au cours de l'acidogénèse commence à être dégradé à partir du 5ème jour via la méthanogénèse (Fig 39).

Après 14 jours d'incubation, la sarcine thermophile n'a pas consommé la totalité de l'acétate produit ; environ 400 μ moles s'accumulent dans le milieu (Fig 39).

En triculture, le pH tombe à 6,2 au 4ème jour. Lors de la dégradation de l'acétate, le pH se stabilise jusqu'au 10ème jour, puis il chute faiblement et rejoint la même valeur qu'en coculture (Fig 38).

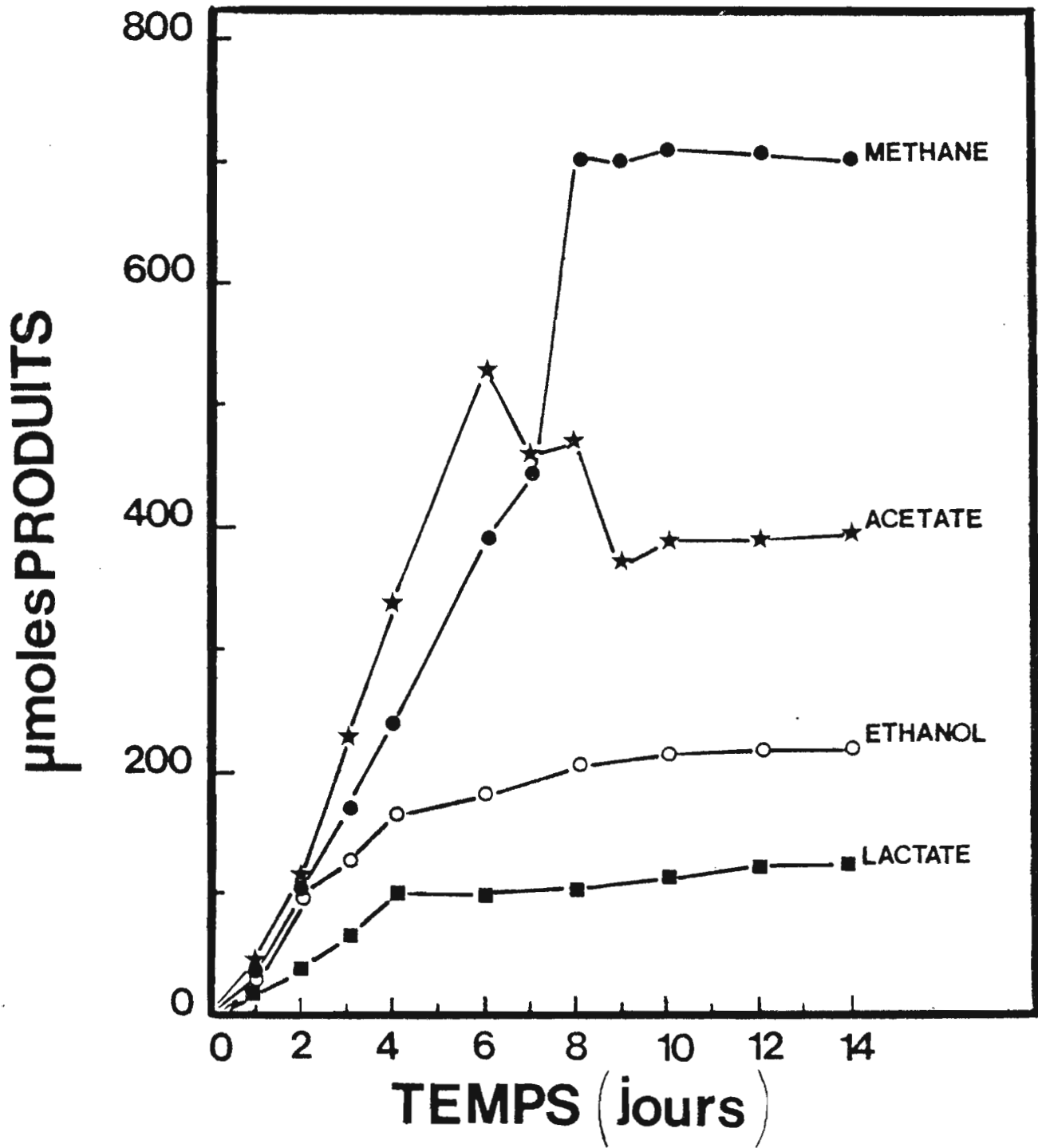


FIG. 39 : Produits de la dégradation de la cellulose par *C.thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP.

2.4 - Etude de l'association : *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP + 5 mM de Méthanol

Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que les précédentes mais nous avons ajouté dans le milieu de culture 5 mM de méthanol pour analyser l'effet de cette addition sur l'utilisation de l'acétate par *Methanosarcina* MP. Le méthanol est en effet un substrat plus facilement assimilable pour la méthanogénèse. Les résultats obtenus montrent une très forte production de méthane (1100 µmoles) (Fig 40, Fig 41).

La dégradation de la cellulose conduit à la production de lactate, d'éthanol, d'isobutyrate et d'acétate (Fig 40). Après 4 jours d'incubation, une dégradation de l'acétate a été observée. Cette dégradation s'arrête au 10ème jour d'incubation.

L'addition de 5 mM. de méthanol dans la triculture a induit une dégradation plus rapide de l'acétate après 2 jours d'incubation. La presque totalité de ce substrat a été transformée en méthane à la fin de l'expérience (Fig 40).

3 - Les expériences sur pectine

Nous avons réalisé le même type d'associations que lors des expériences sur cellulose.

Les expériences ont été réalisées à 55°C, 3 répétitions ont été analysées par traitement. Les résultats sont exprimés en µmoles par flacon de 20 ml de milieu contenant 5 g/l de pectine.

3.1 - Produits du métabolisme de *C. thermocellum*

L'hydrolyse de la pectine par *C. thermocellum* conduit à la production de méthanol, d'isopropanol et d'hydrogène (Tableau 12). Aucun acide organique n'a été détecté. De plus *C. thermocellum* ne produit pas de gaz carbonique à partir de la pectine. On notera que le méthanol est le produit majeur du métabolisme de *C. thermocellum*.

De faibles quantités d'hydrogène ont été libérées (Tableau 12). Il apparaît d'après nos résultats, que les fortes concentrations en pectine défavorisent la production d'hydrogène (Tableau 12).

La dégradation de la pectine s'accompagne d'une chute importante du pH (Tableau 12).

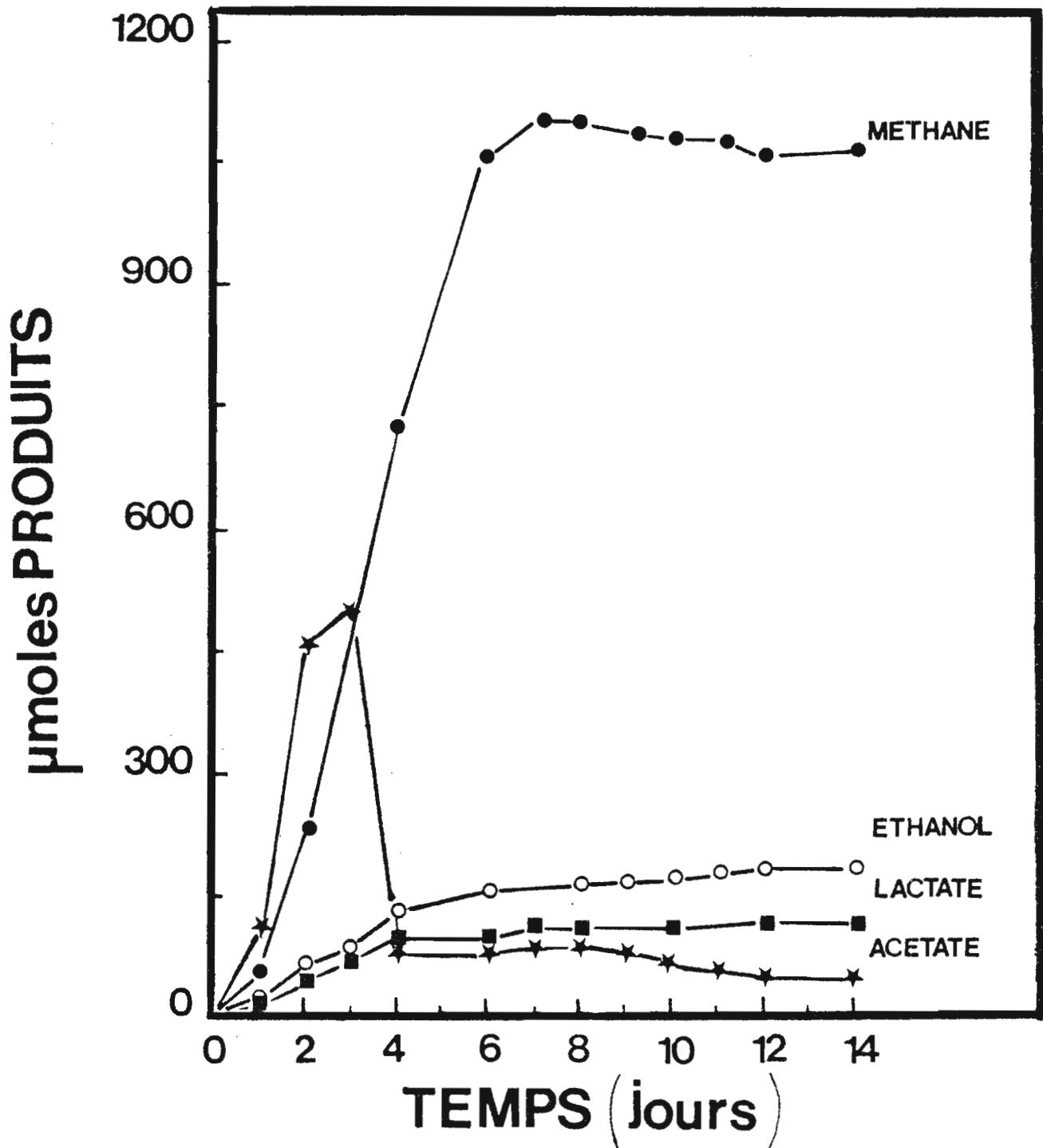


FIG. 40 : Produits de la dégradation de la cellulose par *C.thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP + 5 mmol méthanol.

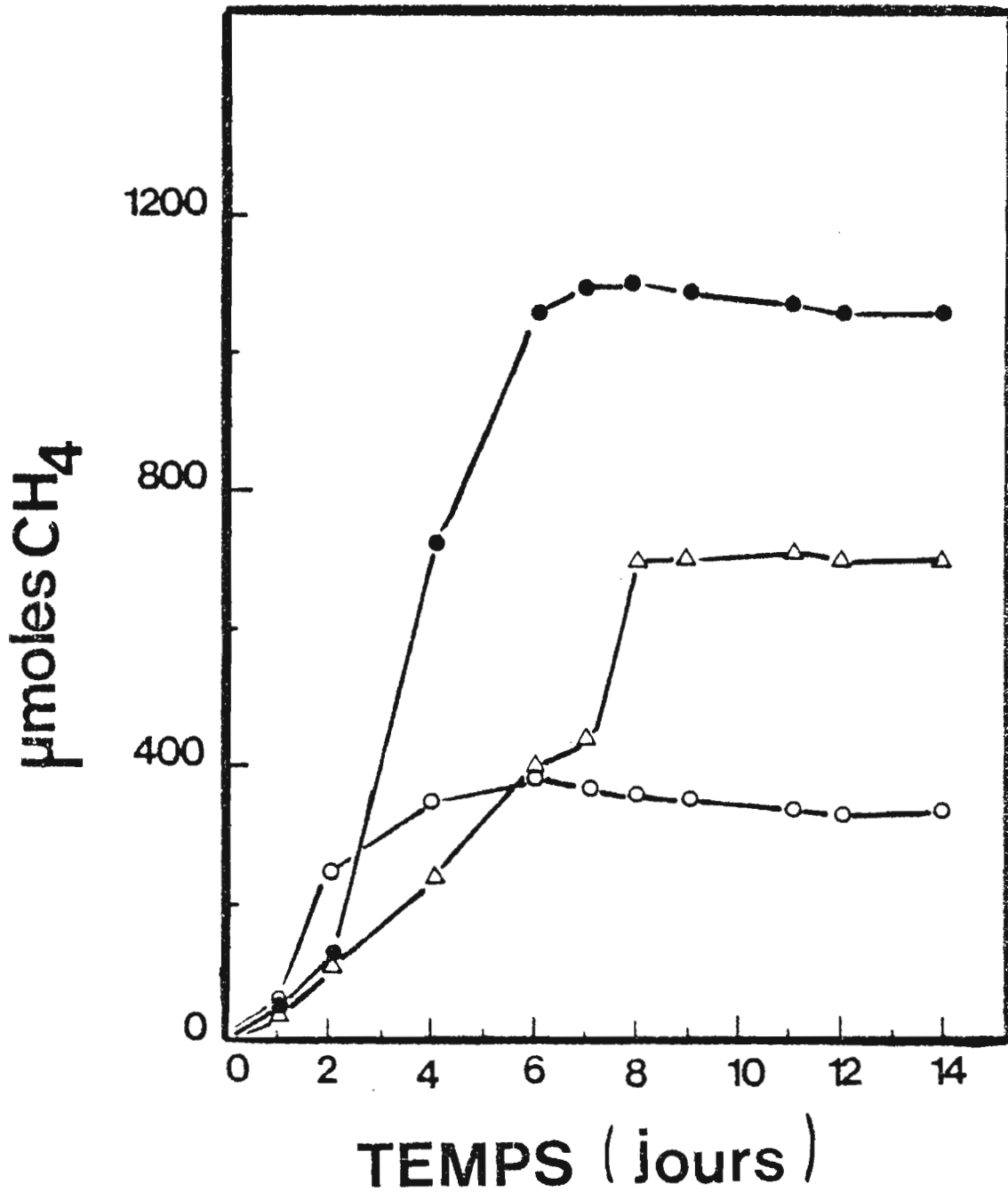


FIG. 41 : Comparaison de la production de méthane par trois associations bactériennes cultivées sur cellulose. *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp, ○ ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP, △ ; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp. + *Methanosarcina* MP + 5 mM méthanol, ●

TABLEAU 12 : PRODUITS DE LA DEGRADATION DE LA PECTINE PAR

Clostridium thermoCELLUM

PECTINE g/l	METHANOL	ISOPROPANOL	HYDROGENE	pH FINAL
0	31,5	0	29,5	7,25
2	129,0	13,9	48,9	7,0
4	226,5	26,6	56,3	6,80
5	281,3	34,7	ND	6,70
6	334,1	41,3	61,2	6,65
8	425,6	53,7	65,8	6,55
10	512,9	65,3	80,7	6,40
15	731,3	97,6	56,7	6,0
20	881,6	135,8	23,8	5,55

- Les résultats sont exprimés en μ moles pour 20 ml de milieu
- ND : non déterminé
- Les valeurs ont été déterminées après 12 jours de culture à 55°C

3 . 2 - Etude de différentes associations bactériennes sur pectine

L'inoculation d'une bactérie méthanogène hydrogénophile ne modifie pas le métabolisme de *C. thermocellum* sur pectine (Tableau 13). Contrairement aux expériences précédentes, la production d'hydrogène n'est pas améliorée. De même, la bactérie méthylotrophe *Methanosarcina* MP utilise le méthanol, sans aucun effet sur l'hydrolyse de la pectine. On remarquera que cette souche a été capable d'utiliser une partie de l'hydrogène libéré et que le méthanol n'a pas été totalement consommé.

4 - Les expériences sur pulpes de betterave sucrière

L'analyse chimique de pulpes de betterave sucrière indique qu'elles contiennent environ 45 % de cellulose et d'hémicelluloses, 10 % de protéines et 11 % de pectine. Nous avons donc associé les organismes cellulolytique et pectinolytique *C. thermocellum* et protéolytique *T. proteolyticus* aux deux bactéries méthanogènes précédemment citées.

Nous avons réalisé les associations suivantes sur pulpes de betterave sucrière :

culture pure : *C. thermocellum* (C)
T. proteolyticus (T)

coculture : *C. thermocellum* + *T. proteolyticus* (CT)
C. thermocellum + *Methanobacterium* sp (CM)
T. proteolyticus + *Methanobacterium* sp (TM)

triculture: *C. thermocellum* + *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp (CTM)
C. thermocellum + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP
(CMS)
T. proteolyticus + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP(TMS)

culture mixte de 4 bactéries : *C. thermocellum* + *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP (CTMS)

Les expériences ont été réalisées avec 10 g/l de pulpe de betterave à 55°C ; trois répétitions ont été analysées par traitement. Les résultats sont exprimés en µmoles par flacon de 20 ml de milieu.

4 .1 - Etude des associations C, T, CT, CM, TM

4 .1 .1 - Dégradation des pulpes de betterave sucrière

Pour suivre la fermentation des pulpes, les sucres totaux et les protéines ont été mesurés en début et en fin d'expérience.

TABLEAU 13 : PRODUITS DE LA DEGRADATION DE LA PECTINE PAR DIFFERENTES ASSOCIATIONS DE BACTERIES.

TRAITEMENTS	METHANOL	ISOPROPANOL	HYDROGENE	METHANE
<i>C. thermocellum</i>	348,5	36,7	39,8	0
<i>C. thermocellum</i> + <i>Methanosarcina MP</i>	43,6	36,7	5	236
<i>C. thermocellum</i> + <i>Methanobacterium sp</i>	328,5	33,2	0	13
<i>C. thermocellum</i> + <i>Methanobacterium sp</i> + <i>Methanosarcina MP</i>	45,4	30,1	0	256

- Les résultats sont exprimés en μ moles pour 20 ml de milieu.
- Les valeurs ont été déterminées après 12 jours de culture à 55°C.
- La pectine a été apportée à raison de 5 g/l.

TABLEAU 14 : DOSAGE DES SUCRES TOTAUX APRES 20 JOURS D' INCUBATION POUR
 LES DIFFERENTES ASSOCIATIONS BACTERIENNES ETUDIEES SUR
 PULPES DE BETTERAVE .

ASSOCIATIONS	T	C	CT	TM	CTM	CM	CMS	TMS	CTMS
SUCRES TOTAUX g/l	5,2	1,9	1,9	5,0	1,0	1,0	1,3	4,8	1,1

- Sucres totaux initiaux : 5,3 g/l.

- dosage des sucres totaux :

Après 20 jours d'incubation, la bactérie cellulolytique associée à une bactérie méthanogène hydrogénophile a mieux dégradé les sucres totaux.

En effet, la concentration de ces sucres passe de 5,3 g/l à 1 g/l à la fin de l'expérience pour l'association (CM) (Tableau 14). La présence d'une bactérie protéolytique n'a pas modifié la quantité de substrat dégradée par la bactérie cellulolytique *C. thermocellum* (Tableau 14).

- dosage des protéines :

La concentration initiale est de 2 g/l. Après 20 jours d'incubation, les résultats montrent que le couplage de la bactérie acidifiante protéolytique *T. proteolyticus* avec une bactérie méthanogène hydrogénophile conduit à une dégradation incomplète des protéines (Tableau 15).

En coculture (TM), la concentration en protéines dans le milieu passe de 2 g/l à 1 g/l ; par contre en culture pure, la concentration passe de 2 g/l à 1,6 g/l (Tableau 15).

4 . 1 . 2 - Production des gaz

Les expériences réalisées sur les pulpes de betterave ont montré que la production d'hydrogène est 10 fois plus importante lorsque les deux bactéries acidifiantes sont couplées avec une bactérie méthanogène (CTM) (Fig 42).

En effet, la production d'hydrogène passe de 150 μ moles pour l'association CT à 1500 μ moles pour CTM (Fig 42). La bactérie cellulolytique produit beaucoup plus d'hydrogène que la bactérie protéolytique (Fig 42).

En coculture, avec une méthanogène hydrogénophile, la totalité de l'hydrogène produit par les deux bactéries acidifiantes a été transformée en méthane (Fig 46,47).

4 . 1 . 3 - Analyse de la phase liquide

- analyse des alcools :

La fermentation des pulpes de betterave par la bactérie acidifiante *C. thermocellum* conduit à la production de méthanol. La quantité produite est la même pour toutes les associations : elle est de 75 μ moles environ (Fig 43, 46).

Outre le méthanol, la fermentation des pulpes de betterave conduit à la production d'éthanol (Fig 43).

TABLEAU 15 : DOSAGE DES PROTEINES APRES 20 JOURS D'INCUBATION POUR
 LES DIFFERENTES ASSOCIATIONS BACTERIENNES ETUDIEES
 SUR PULPES DE BETTERAVE SUCRIERE.

ASSOCIATIONS	T	C	CT	TM	CTM	CM	CMS	TMS	CTMS
PROTEINES FINALES g/l	1,64	1,98	1,34	1,06	1,30	1,96	2,06	1,66	1,73

- Protéines initiales : 2,05 g/l.

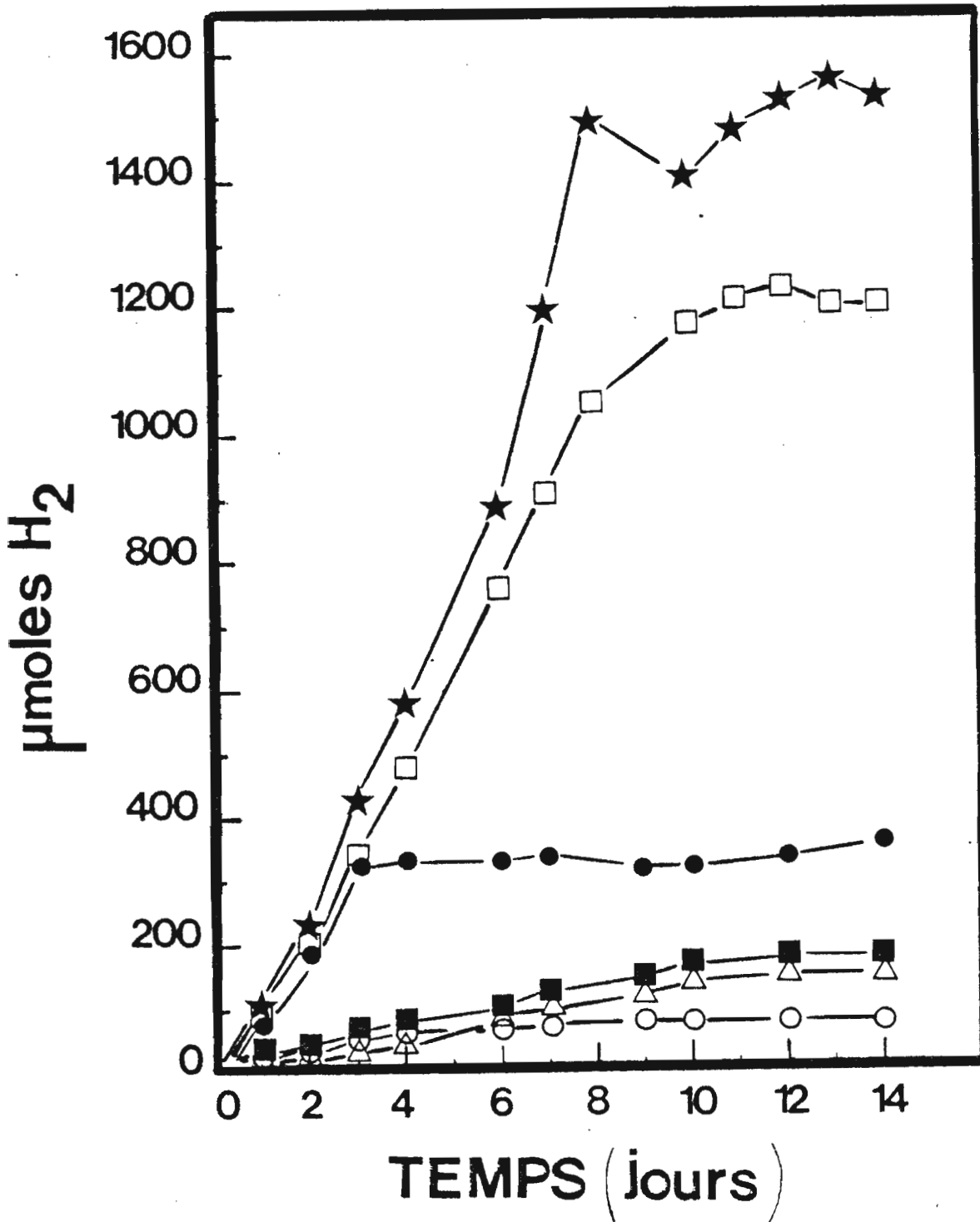


FIG. 42 : Comparaison de la production d'hydrogène par les bactéries acidifiantes dans les différentes associations. *T. proteolyticus*, ○; *C. thermocellum*, △; *C. thermocellum* + *T. proteolyticus*, ■; *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp, ●; *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp, □; *C. thermocellum* + *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp, ★

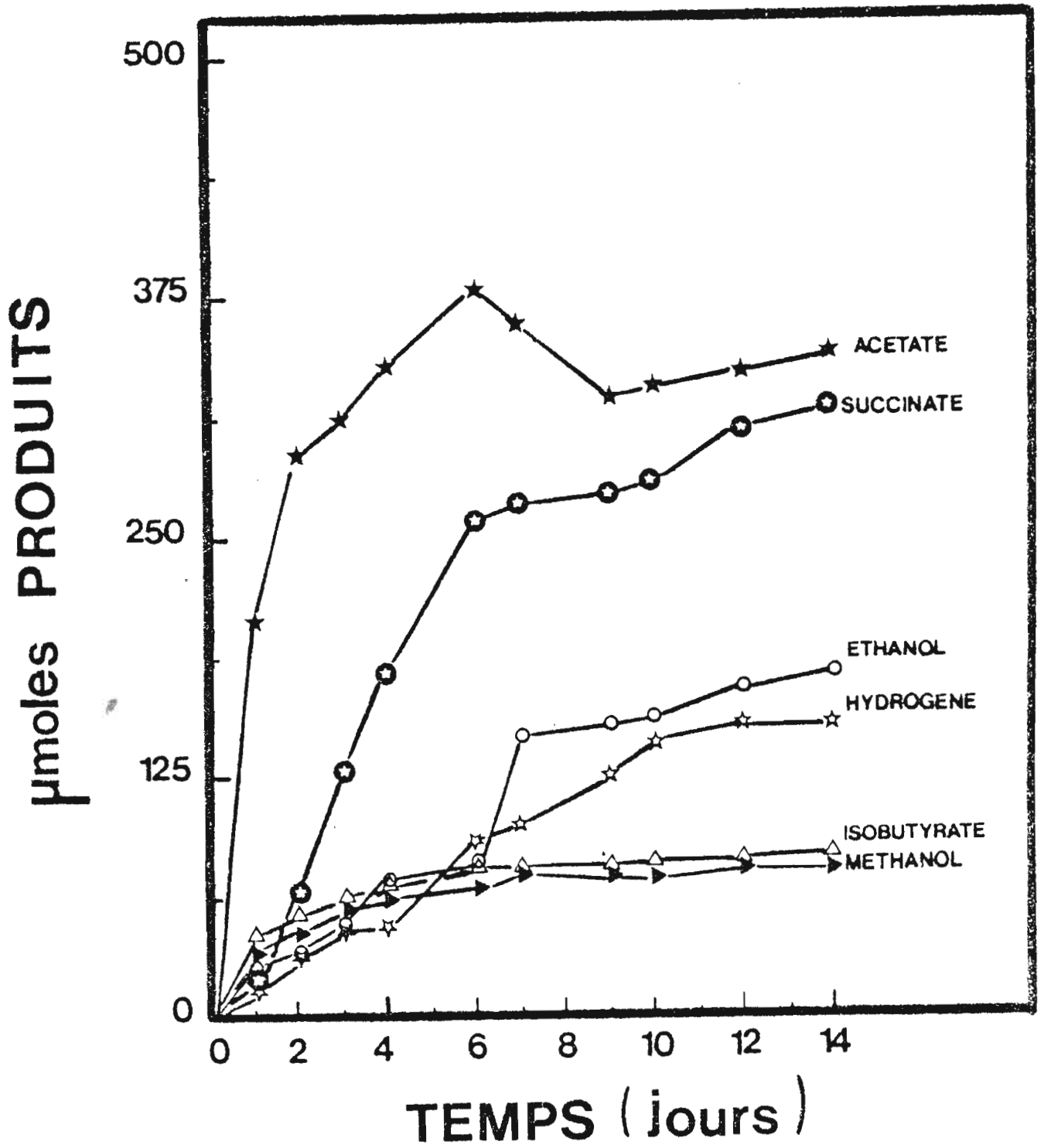


FIG. 43 : Produits de la dégradation des pulpes par *C. thermocellum*.

En culture pure *C. thermocellum* produit plus d'éthanol qu'en coculture (Fig 43, 46). La production passe de 150 à 30 μ moles lorsqu'elle est couplée avec une méthanogène hydrogénéophile.

- analyse des acides organiques :

Le dosage des acides organiques a montré que le succinate est un produit de la fermentation des pulpes de betterave (Fig 43).

En culture pure, *C. thermocellum* produit beaucoup plus de succinate qu'en coculture avec une bactérie méthanogène hydrogénéophile. En effet, dans la coculture (CM), de faibles quantités de succinate sont détectées (Fig 46), alors qu'en culture pure, la bactérie cellulolytique produit environ 300 μ moles (Fig 43).

- analyse des acides gras volatils :

L'acétate, l'isobutyrate, le propionate et des traces d'isovalérate sont produits lors de la dégradation des pulpes par *C. thermocellum*.

Le couplage de *C. thermocellum* avec une bactérie méthanogène hydrogénéophile améliore nettement la production d'acétate. Elle passe de 350 à 900 μ moles (Fig 43, 46).

Il en est de même pour la bactérie protéolytique ; en coculture avec une méthanogène hydrogénéophile (TM), cette bactérie produit plus d'acétate qu'en culture pure (Fig 44, 47).

Lorsque nous avons couplé les deux bactéries acidifiantes, nous avons remarqué une amélioration de la production d'acétate. La quantité produite est presque équivalente à la production cumulée d'acétate, obtenu séparément pour chacune des souches (Fig 45).

Le pH, lors des expériences réalisées avec *T. proteolyticus*, est resté pratiquement stable, par contre pour les autres expériences, nous avons noté une variation du pH proportionnelle à la quantité d'acétate accumulée (Tableau 16).

4.2 - Etude des associations CTM, CMS, TMS

4.2.1 - Dégradation des pulpes de betterave

Les sucres totaux et les protéines ont été mesurés en début et en fin d'expérience.

- dosage des sucres totaux :

L'association d'une bactérie acétoclaste *Methanosarcina* MP à la coculture *C.*

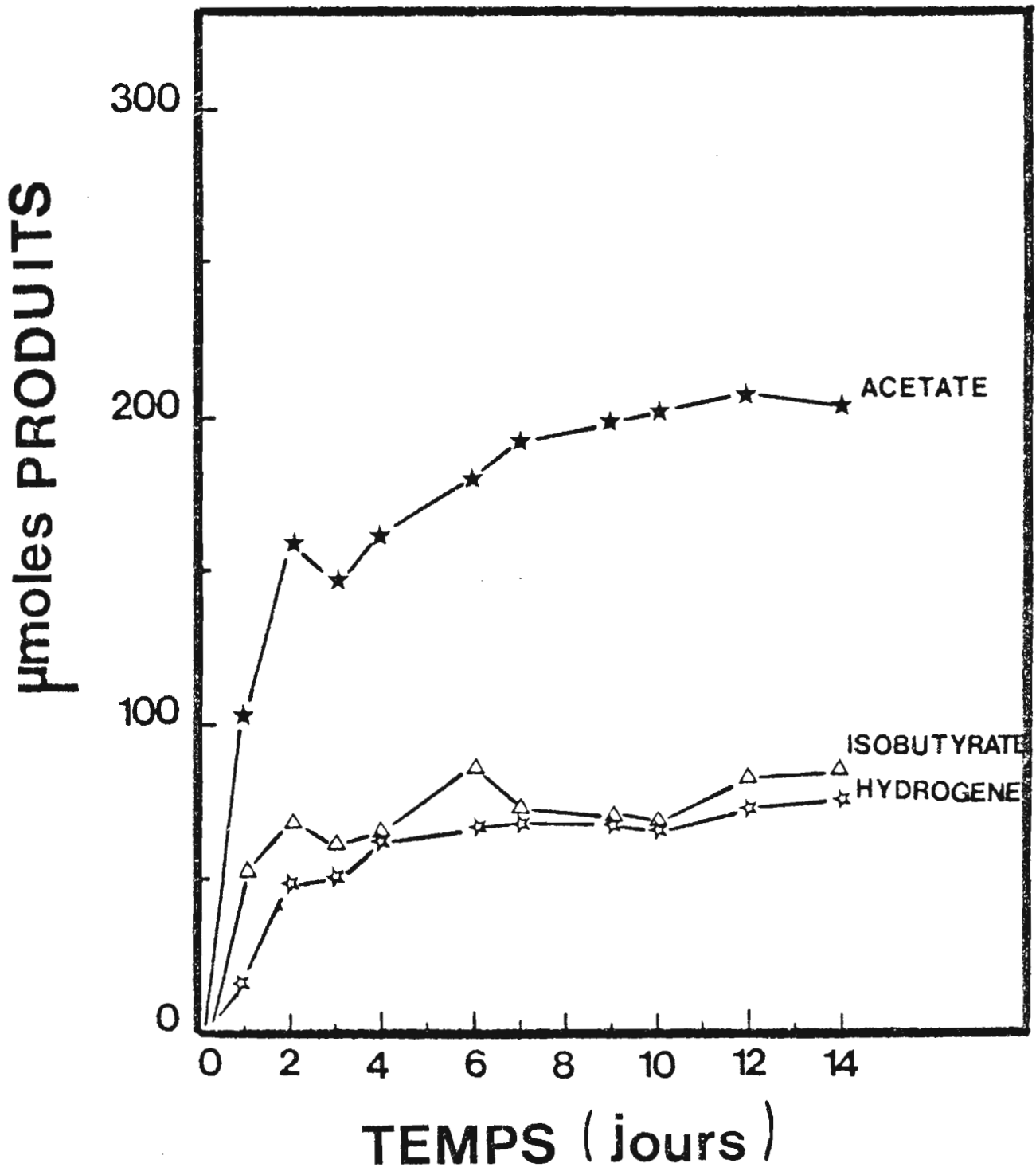


FIG. 44 : Produits de la dégradation des pulpes par *T. proteolyticus*.

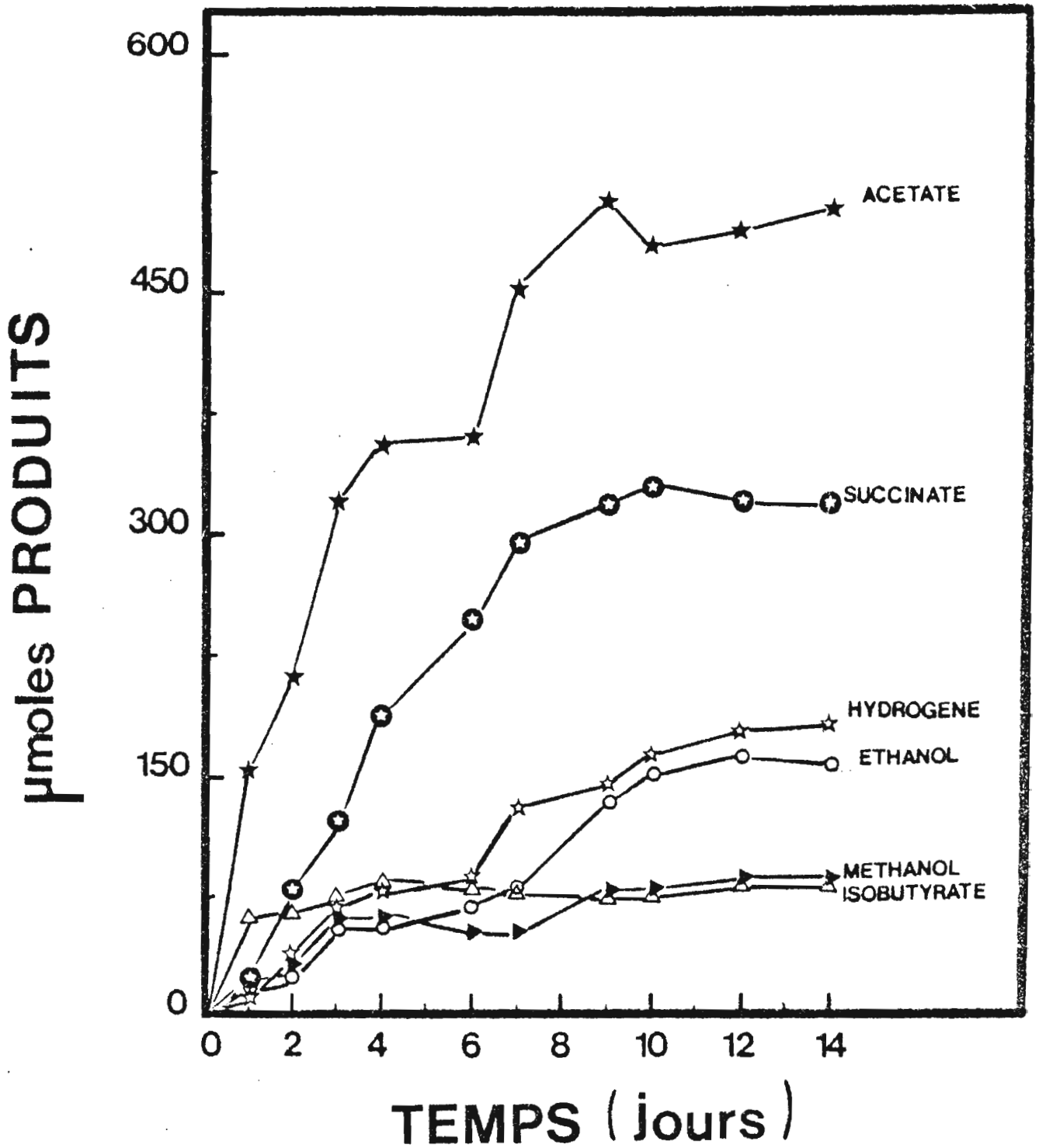


FIG. 45 : Produits de la dégradation des pulpes par *C. thermocellum* + *T. proteolyticus*.

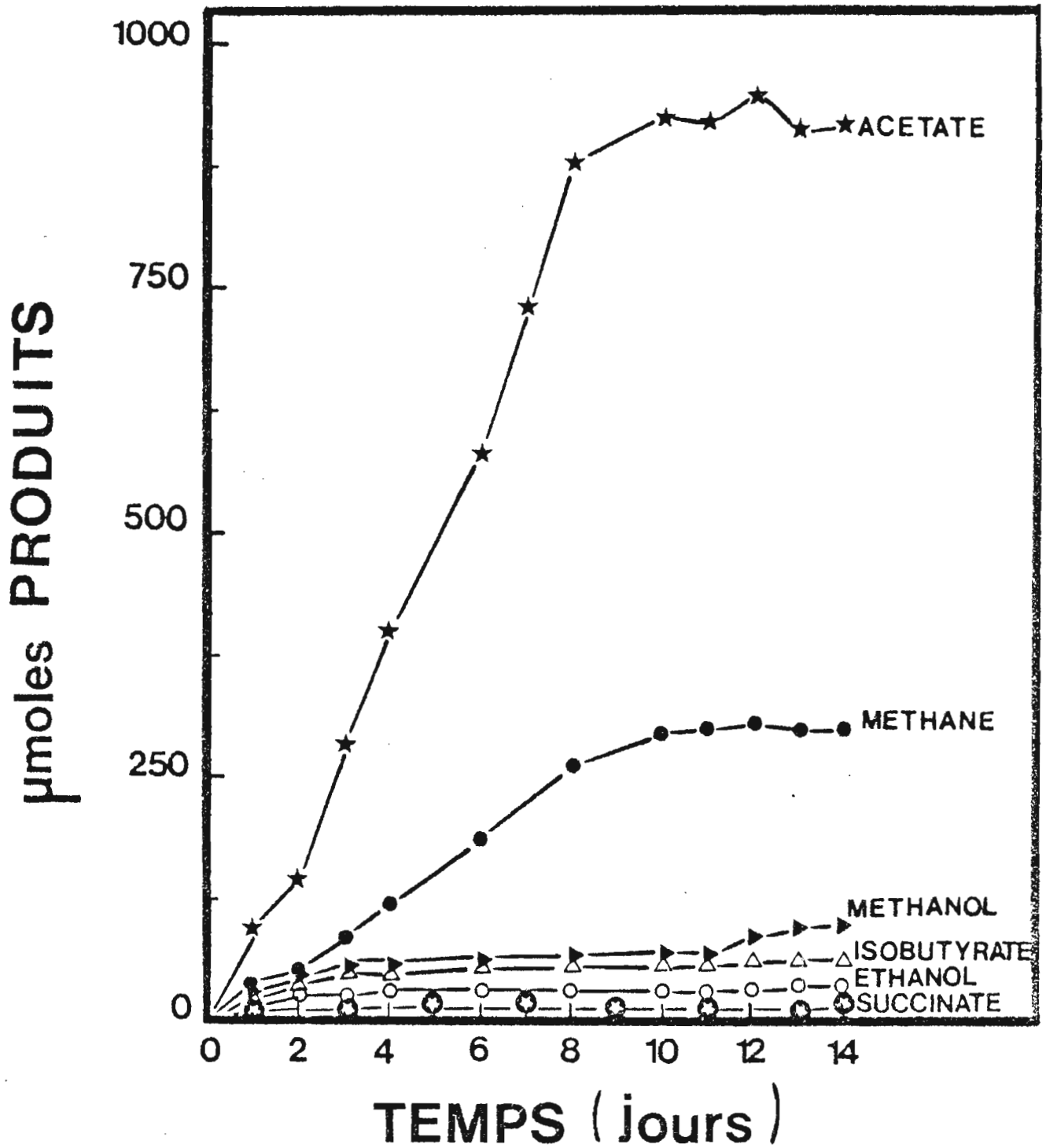


FIG. 46 : Produits de la dégradation des pulpes par *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp.

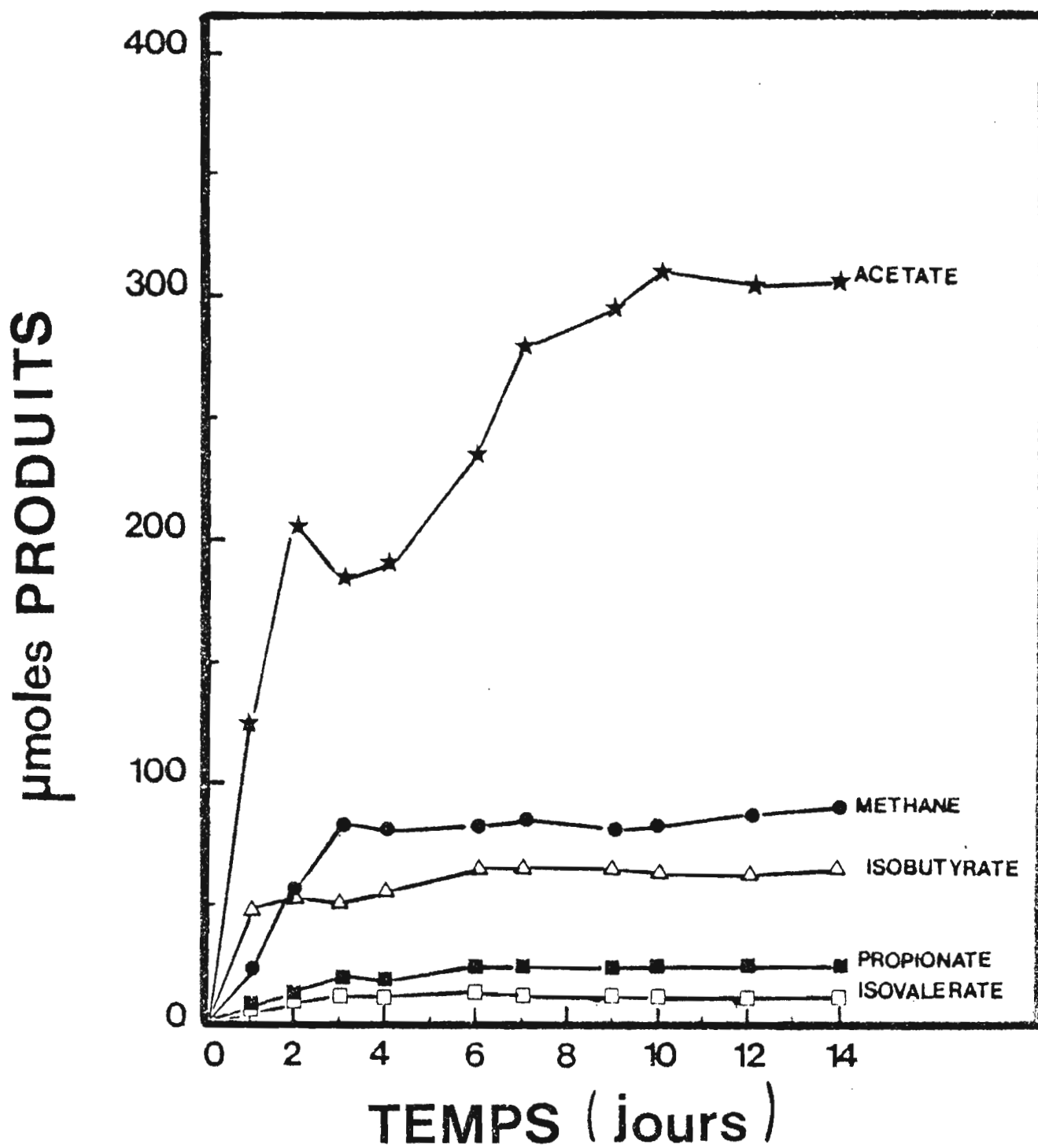


FIG. 47 : Produits de la dégradation des pulpes par *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp.

TABLEAU 16 : EVOLUTION DU PH EN FONCTION DU TEMPS (JOURS D' INCUBATION) POUR LES DIFFERENTES ASSOCIATIONS BACTERIENNES ETUDIEES SUR PULPES DE BETTERAVE.

Thermobacteroides proteolyticus (T)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14
PH	7,2	7,1	7,05	7,0	6,9	7,0	6,95	7,0

Clostridium thermocellum (C)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14
PH	7,2	6,8	6,5	6,0	5,9	5,85	5,70	5,95

Clostridium thermocellum + *Thermobacteroides proteolyticus* (CT)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14
PH	7,2	6,6	6,4	6,2	5,9	5,8	5,7	5,8

T. proteolyticus + *Methanobacterium sp* (TM)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14
PH	7,2	7,15	7,15	7,1	7,1	7,05	7,1	7,15

Clostridium thermocellum + *Methanobacterium sp* (CM)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14
PH	7,2	6,7	6,6	5,95	5,75	5,65	5,65	5,60

TABLEAU 16 (SUITE).

C. thermocellum + *T. proteolyticus* + *Methanobacterium sp* (CTM)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14
PH	7,2	6,4	6,5	6,3	6,3	6,2	6,15	6,2

C. thermocellum + *Methanobacterium sp* + *Methanosarcina MP* (CMS)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
PH	7,2	7	6,9	6,85	6,9	6,8	6,6	6,6	6,4	6,4	6,5

T. proteolyticus + *Methanobacterium sp* + *Methanosarcina MP* (TMS)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
PH	7,2	7,15	7,15	7,1	7,15	7,05	7,05	7,0	7,0	6,95	6,95

C. thermocellum + *T. proteolyticus* + *Methanobacterium sp*
+ *Methanosarcina MP*. (CTMS)

JOURS	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
PH	7,2	7,05	6,9	6,95	6,8	7	6,8	6,85	6,65	6,6	6,6

thermocellum - *Methanobacterium* sp n'a en rien modifié l'utilisation des sucres par *C. thermocellum*. La concentration en sucres totaux reste presque identique pour les deux types d'associations (CM, CMS) (Tableau 14).

- dosage des protéines :

Le dosage des protéines montre que l'utilisation de l'acétate par la sarcine thermophile ne favorise pas une meilleure fermentation des pulpes. La quantité dégradée est toujours la même dans les deux cas (TM, TMS) (Tableau 15).

4 . 2 . 2 - Production des gaz

L'inoculation de la bactérie méthanogène acétoclaste a été accompagnée d'une forte production de méthane.

Une comparaison entre la coculture CM et la triculture CMS montre que la quantité de méthane produite passe de 250 μ moles (Fig 46) à 1100 μ moles (Fig 49).

Environ 800 μ moles de méthane proviennent de la dégradation de l'acétate.

De même pour la dégradation des protéines, la quantité de méthane produite en culture mixte avec *Methanosarcina* est nettement supérieure à celle produite en coculture (Fig 50).

4 . 2 . 3 - Analyse de la phase liquide

-analyse des alcools :

Le méthanol est produit au cours de la fermentation des pulpes par *C. thermocellum*.. Lorsque cette bactérie est associée à la sarcine thermophile, le méthanol est converti en méthane (Fig 49).

Comme dans le cas des cultures pures et des cocultures, la fermentation des pulpes en culture mixte (CMS, CTM) conduit à la production d'éthanol mais en faible concentration (Fig 48, 49).

- analyse des acides organiques :

Des traces de succinate ont été détectées au cours de l'expérience.

- analyse des acides gras volatils :

Au cours des couplages réalisés entre les bactéries acidifiantes et la bactérie méthanogène hydrogénéophile, nous avons constaté une forte production d'acétate (1200 μ moles) pour l'association CTM (Fig 48). Avec l'inoculation de la bactérie

méthanogène acétoclaste, la presque totalité de l'acétate produit par la voie de l'acidogénèse se transforme en méthane; cela est vrai pour l'association CMS (Fig 49) et pour l'association TMS (Fig.50). L'utilisation de l'acétate permet au pH de se stabiliser aux environs de 6,5 dans le cas de CMS (Tableau 16).

4.3 - Etude de l'association CTMS

Cette expérience a été réalisée afin d'obtenir une quantité maximale de méthane en associant les deux bactéries acidifiantes avec les deux bactéries méthanogènes. D'après nos résultats obtenus avec les associations CMS et TMS, nous avons estimé que la quantité de méthane produite serait d'environ 1500 μ moles pour CTMS. Cependant, après 20 jours d'incubation, nous avons remarqué que la production de méthane est presque identique pour les deux types de couplage CMS et CTMS (Fig 49, 51).

La concentration de l'acétate dans le milieu commence à diminuer dès le 2ème jour (Fig 51). La transformation de l'acétate en méthane continue jusqu'au 12ème jour de l'expérience (Fig 51). Puis, l'acétate s'accumule dans le milieu avec une concentration de 300 μ moles (Fig 51).

Les valeurs du pH confirment les résultats déjà obtenus au cours de la dégradation de l'acétate. En effet, pour l'association CTMS, le pH se stabilise tout au long des 12 premiers jours d'incubation, puis il baisse pour atteindre 6,6 après 20 jours (Tableau 16).

Tous ces résultats montrent que la majeure partie du méthane produit provient de la fermentation de la cellulose et des hémicelluloses par la bactérie acidifiante *C. thermocellum*. . La triculture CMS a produit 5 mmoles de CH_4 /g de pulpes de betterave dégradées.

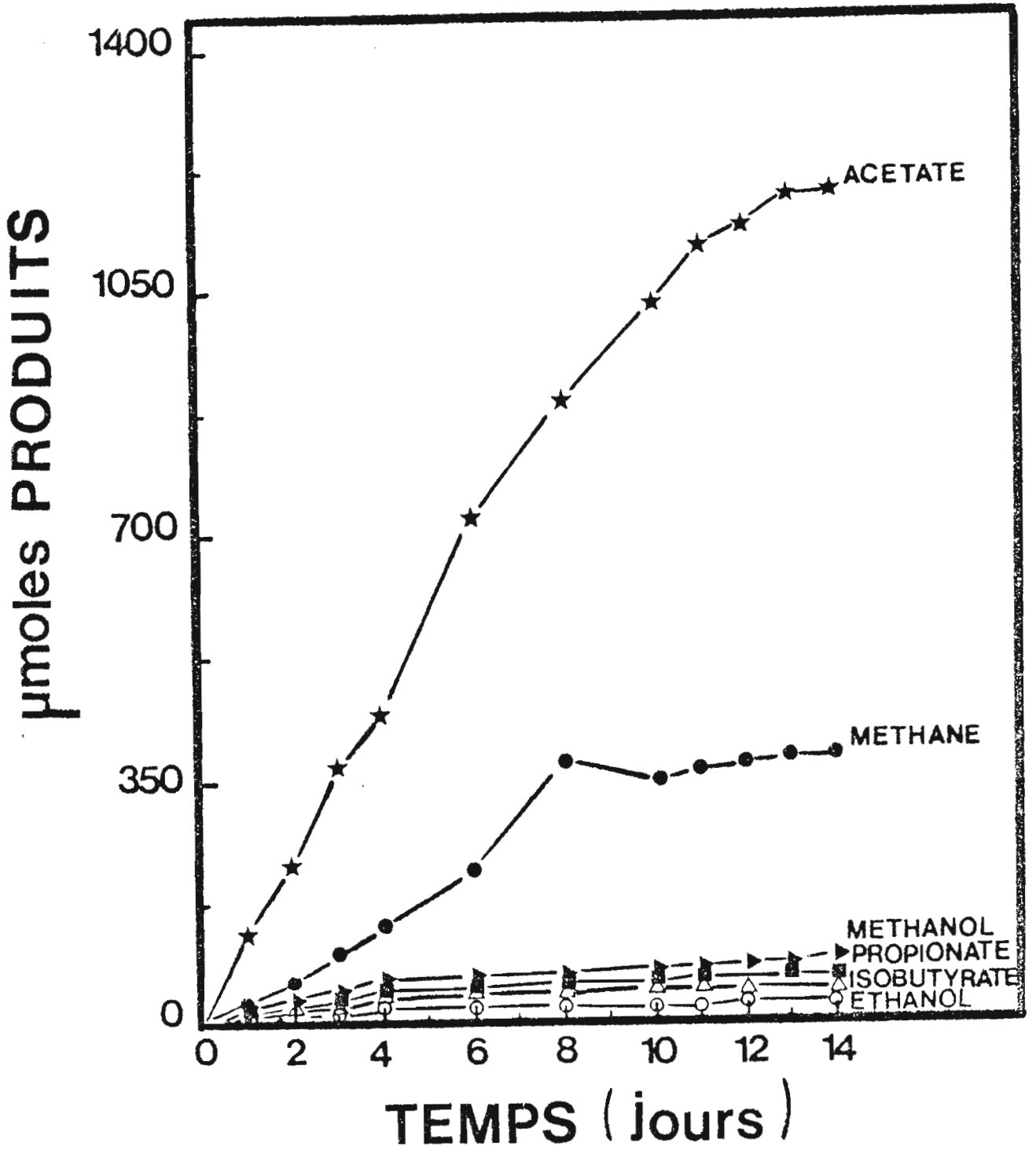


FIG. 48 : Produits de la dégradation des pulpes par *C.thermocellum* + *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp.

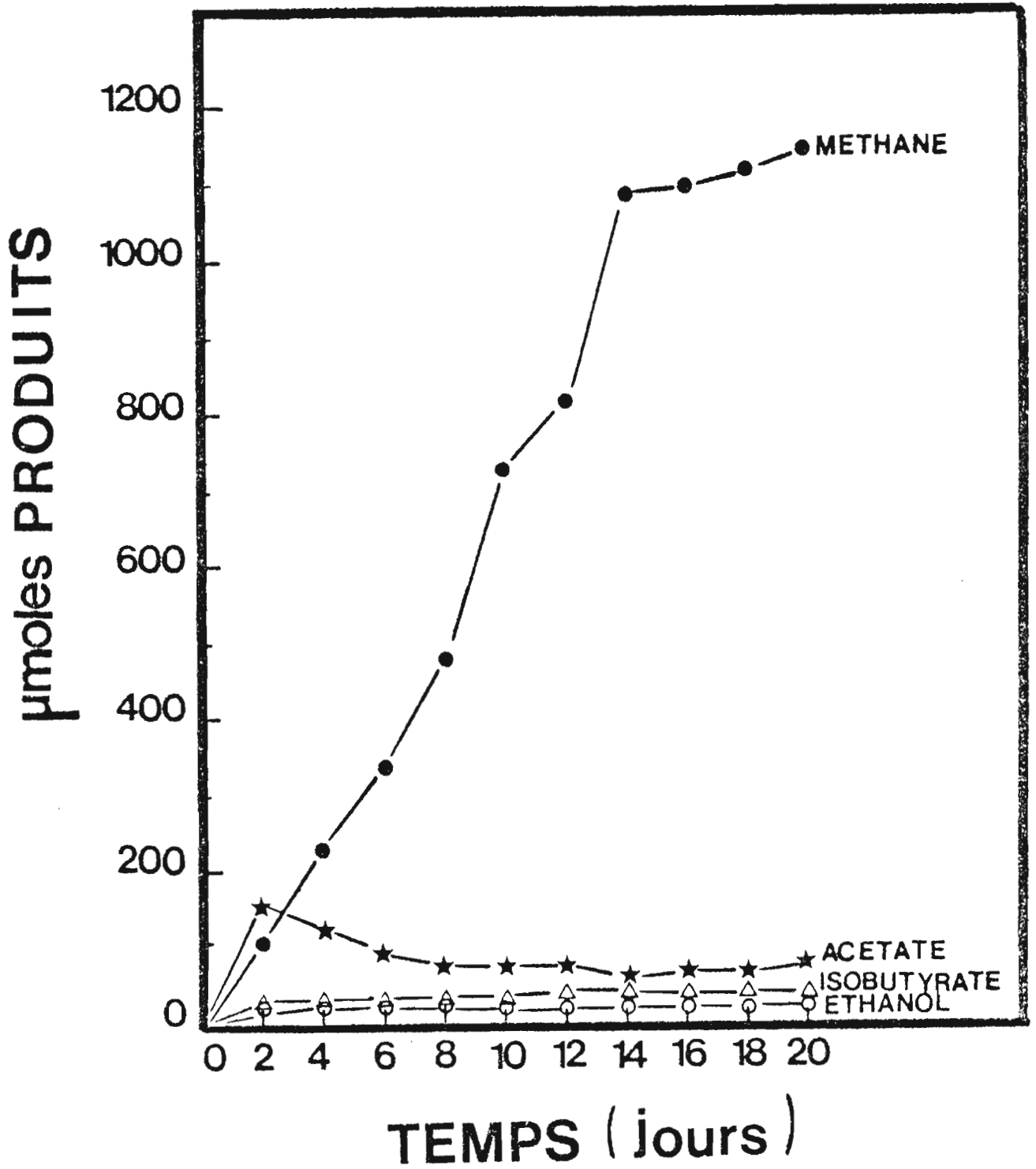


FIG. 49 : Produits de la dégradation des pulpes par *C. thermocellum* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP.

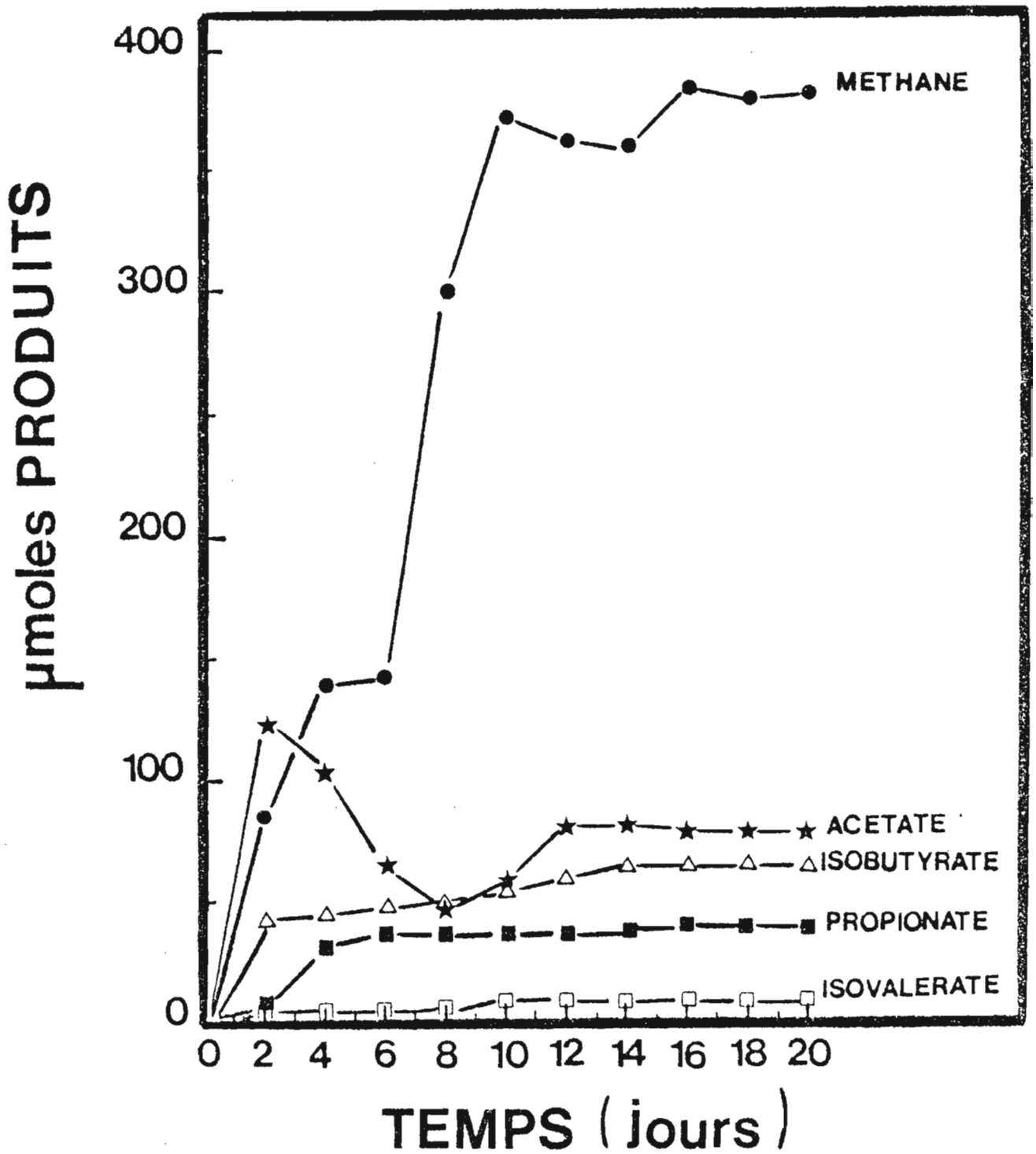


FIG. 50 : Produits de la dégradation des pulpes par : *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP.

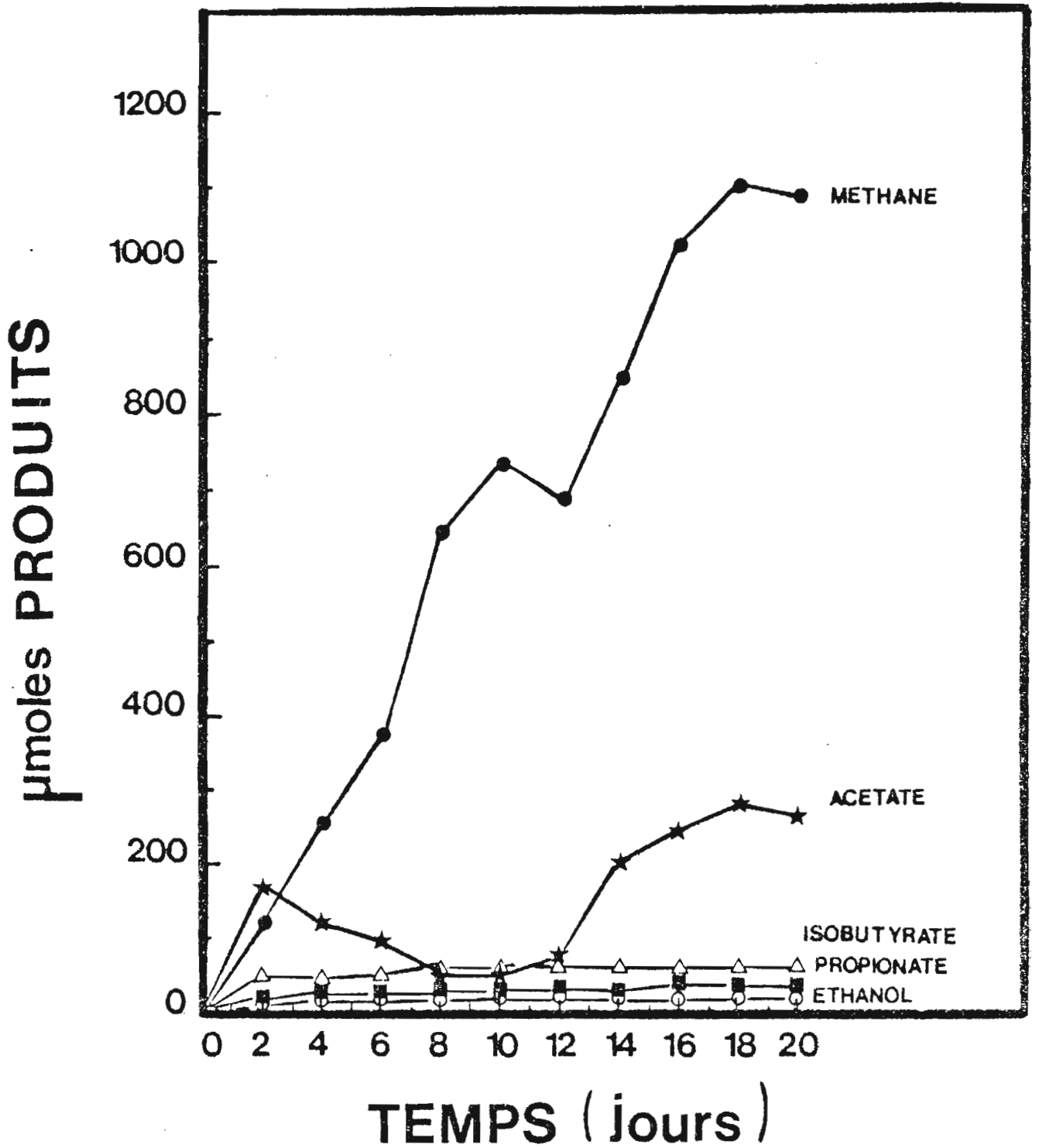


FIG. 51 : Produits de la dégradation des pulpes par *C. thermocellum* + *T. proteolyticus* + *Methanobacterium* sp + *Methanosarcina* MP.

5 - Discussion

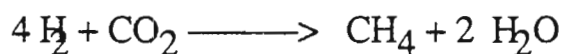
5.1 - Les expériences sur gélatine

La plupart des expériences de méthanisation par des cultures mixtes définies de bactéries ont été réalisées en mésophilie (KHAN, 1980 ; LAUBE et MARTIN, 1981; MOUNTFORT *et al.*, 1982 ; JONES *et al.*, 1984).

L'originalité de notre travail a consisté à travailler en conditions thermophiles.

Les résultats obtenus lors de cette étude démontrent que la gélatine représente un substrat facilement méthanisable. La souche hydrolytique acidifiante associée à une souche méthanogène hydrogénophile dégrade plus rapidement cette protéine qu'en culture pure. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au cours d'autres expériences, notamment celles réalisées par MOUNTFORT *et al.* (1982) qui ont montré que la dégradation de la cellulose par un champignon associé à des bactéries méthanogènes hydrogénophiles, est plus rapide que celle obtenue lors de la croissance en culture pure du champignon.

L'analyse des produits de la dégradation de la gélatine montre que le métabolisme est modifié lorsque *T. proteolyticus* est associé à *Methanobacterium* sp. En culture pure, *T. proteolyticus* dégrade la gélatine en acétate (principal acide gras volatil détecté) et H₂ + CO₂. Dans la coculture *Thermobacteroides* - *Methanobacterium*, des quantités nettement plus importantes de propionate et d'isobutyrate ont été détectées et l'acétate reste le produit majeur de la fermentation avec le méthane. Dans ces conditions, la production d'hydrogène s'accroît de 10 fois ; cette production est calculée à partir du méthane produit selon la réaction :



Les travaux récents de NAGASE et MATSUO (1982), ont montré qu'en présence d'une culture mixte non définie, la dégradation d'acides aminés conduisait à des productions plus ou moins importantes d'acétate, de propionate, d'isobutyrate, d'isovalérate et d'H₂ + CO₂. La protéolyse réalisée par *T. proteolyticus* libère vraisemblablement dans le milieu des acides aminés ou des peptides. Les divers acides gras volatils obtenus seraient donc le résultat de la fermentation des peptides étant donné que *T. proteolyticus* n'utilise pas les acides aminés. L'acétate, le propionate, l'isobutyrate et l'isovalérate sont aussi les principaux acides gras volatils libérés lors de la dégradation de la gélatine.

En coculture (TM) aucune trace d'hydrogène n'est décelée et il y a établissement d'un transfert d'hydrogène entre *T. proteolyticus* et *Methanobacterium* sp., entraînant la formation d'une plus grande quantité d'acétate. Ce transfert d'hydrogène modifie le métabolisme de la bactérie fermentaire.

En 1977, CHEN et WOLIN ont réalisé une expérience avec *Selenomonas ruminantium* qui dégrade le glucose principalement en lactate avec de petites quantités de propionate, acétate, formiate et CO₂. Par contre, en coculture avec *Methanobrevibacter smithii*, ils ont observé une augmentation de la teneur en propionate et acétate.

Quand nous avons couplé *T. proteolyticus* avec *Methanosarcina* MP, aucune modification n'a été observée au cours de l'expérience en comparaison avec *T. proteolyticus* en culture pure. Une forte accumulation d'hydrogène a été notée et l'acétate n'a pas été converti en méthane.

Ces résultats montrent que *Methanosarcina* MP n'est capable ni d'utiliser l'hydrogène ni de transformer l'acétate en méthane en présence d'hydrogène.

En triculture (TMS), la dégradation de l'acétate par *Methanosarcina* MP ne peut avoir lieu que lorsque l'hydrogène a été transformé en méthane par *Methanobacterium* sp. . La méthanogénèse s'est effectuée en deux étapes : utilisation d'H₂/CO₂ par *Methanobacterium* sp et utilisation de l'acétate par *Methanosarcina* MP.

De nombreux travaux ont étudié l'effet de l'hydrogène sur le métabolisme de l'acétate chez les bactéries méthanogènes (SMITH et MAH, 1978 ; Mc INERNEY et BRYANT, 1981).

FERGUSON et MAH (1983 a) ont montré que l'addition d'hydrogène dans le milieu de culture inhibe l'acétoclastie chez *Methanosarcina mazei*. *Methanosarcina* sp souche 227 ne produit pas de quantité significative de méthane à partir d'acétate en présence d'hydrogène. Notre travail montre bien l'intérêt d'associer des bactéries acidifiantes avec des bactéries méthanogènes. En effet, la transformation de l'hydrogène en méthane par la bactérie hydrogénéophile *Methanobacterium* sp induit la dégradation de l'acétate par *Methanosarcina* MP.

La production maximum de méthane a été obtenue en triculture (TMS) (3,3 mmoles CH₄ /g de gélatine dégradée).

5.2 - Les expériences sur cellulose

Les résultats obtenus au cours de ces expériences montrent que la fermentation thermophile de la cellulose par une culture mixte définie de trois bactéries: *C. thermocellum*, *Methanobacterium* sp, *Methanosarcina* MP conduit principalement à la formation de méthane.

En triculture, la fermentation de la cellulose s'opère en deux étapes : (1) acidogénèse et (2) méthanogénèse.

De nombreux travaux ont été réalisés sur la dégradation de la cellulose, mais dans la plupart des cas, ils ont eu lieu en mésophilie (KHAN 1980; LAUBE et MARTIN, 1981 ; MOUNTFORT *et al.*, 1982). La première étude en thermophilie de la fermentation de la cellulose en culture mixte définie a été réalisée par WEIMER et ZEIKUS (1977). Ils ont étudié la coculture *C. thermocellum* et *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Le but de notre travail était d'étudier le rôle de la bactérie acétoclaste *Methanosarcina* MP associée à cette même coculture *C. thermocellum* - *Methanobacterium* sp.

En monoculture, *C. thermocellum* fermente la cellulose en H_2 - CO_2 , acétate, éthanol et produit en quantité plus faible du lactate.

En coculture, il y a moins d'éthanol et plus d'acétate. L'hydrogène n'est pas détecté mais la quantité de méthane produite traduit une nette augmentation de la production d'hydrogène.

LATHAM et WOLIN (1977), étudiant la fermentation de la cellulose par *Ruminococcus flavefaciens* en présence et en absence de *M. smithii*, ont montré que la bactérie anaérobie cellulolytique du rumen produit principalement les acides succinique, acétique et formique, H_2 et CO_2 à partir de la cellulose. En coculture, avec une bactérie hydrogénéophile, l'hydrogène ne s'accumule pas, le formiate n'est pas détecté, le succinate l'est en petite quantité et l'acétate devient le produit majeur de la fermentation avec le méthane.

En ce qui concerne nos résultats sur cellulose, aucune trace d'hydrogène n'est décelée et il y a établissement d'un transfert interspécifique d'hydrogène entre *C. thermocellum* et la bactérie méthanogène hydrogénéophile *Methanobacterium* sp, induisant une formation importante d'acétate au détriment de l'éthanol. Ces résultats sont en accord avec le travail réalisé par JONES *et al.* (1984), lors de la fermentation du saccharose par *E. coli* en absence et en présence de *Methanobacterium formicicum*.

Methanosarcina MP est incapable de transformer $H_2 + CO_2$ en CH_4 (OLLIVIER *et al.*, 1984). De ce fait, nous avons pu mieux déterminer le rôle respectif de chacune des bactéries méthanogènes lors de la dégradation de la cellulose.

Le rendement en méthane est nettement plus élevé avec l'association CMS qu'avec CM. 1200 μ moles de méthane sont produites, 70 % de ce méthane provient de la dégradation de l'acétate et 30 % de la dégradation d' H_2/CO_2 .

Au cours de nos expériences, l'addition d'une faible quantité de méthanol a

induit une forte utilisation de l'acétate dans la culture mixte. A la fin de l'expérience, la totalité de l'acétate a été convertie en méthane. En l'absence de méthanol, la dégradation de l'acétate se fait lentement et s'arrête au 8ème jour. L'acétate s'accumule dans le milieu, le pH baisse et devient défavorable pour la sarcine thermophile. La méthanogénèse est en effet sensible aux variations du pH. Une acidification trop rapide du milieu déstabilise le couplage entre la bactérie fermentaire (acidifiante) et les bactéries méthanogènes. Ces phénomènes ont été observés dans les digesteurs anaérobies, où le système tampon est réalisé par du bicarbonate à faible concentration ; une surcharge du digesteur produit une brusque acidification qui inhibe la méthanogénèse.

La transformation de l'acétate en méthane par *Methanosarcina* MP n'est possible qu'en triculture et surtout en présence d'une bactérie hydrogénophile : *Methanobacterium* sp qui est capable d'utiliser l'hydrogène produit au cours de la fermentation de la cellulose. Ces résultats suggèrent une inhibition de l'acétoclastie par $H_2 - CO_2$ comme lors des expériences sur gélatine.

Le maximum de méthane produit est obtenu avec l'addition du méthanol dans la triculture CMS (9,2 mmoles CH_4 /g de cellulose dégradée).

5 . 3 - Les expériences sur pectine

C. thermocellum produit principalement à partir de la pectine, du méthanol et de l'isopropanol. Ces résultats mettent en valeur la présence de la pectine méthyl esterase chez *C. thermocellum*.. Cette enzyme joue un rôle important dans la solubilisation des pectines en catalysant l'hydrolyse des liaisons méthyl-ester. Cette réaction conduit à la production de méthanol et d'acides pectiques ou pectiniques (SOMOGYI et ROMANI, 1964). Il en résulte, ainsi que nous avons pu le remarquer, une baisse de pH dans le milieu.

Aucun transfert interspécifique d'hydrogène ne s'est réalisé entre *C. thermocellum* et la bactérie méthanogène hydrogénophile *Methanobacterium* sp. Dans la triculture, *Methanosarcina* MP a utilisé le méthanol libéré lors de l'hydrolyse de la pectine.

5 . 4 - Les expériences sur pulpes de betterave sucrière

La fermentation des pulpes de betterave sucrière en culture mixte définie par des bactéries thermophiles confirme les résultats obtenus au cours des expériences réalisées sur gélatine pure et sur cellulose .

Les résultats présentés démontrent que la culture mixte *C. thermocellum* - *Methanobacterium* sp - *Methanosarcina* MP est capable de convertir 75 % des carbohydrates contenus dans les pulpes de betterave sucrière en méthane.

Au cours de la fermentation des pulpes de betterave, une modification du métabolisme a été constatée. *C. thermocellum* produit essentiellement de l'acétate, du succinate, de l'éthanol, du méthanol et $H_2 + CO_2$. Par contre en coculture *C. thermocellum* - *Methanobacterium* sp aucune trace d'hydrogène n'est détectée; il y a établissement d'un transfert interspécifique d'hydrogène entre *C. thermocellum* et la bactérie méthanogène hydrogénophile, induisant une production importante d'acétate et de méthane. Le succinate et l'éthanol sont produits en petite quantité.

Lors de la croissance de *C. thermocellum* sur cellulose pure, le lactate est l'acide organique principal produit ; le succinate s'accumule à l'état de traces. L'inverse se produit lors de la croissance sur pulpes de betterave sucrière. La présence de méthanol lors de la dégradation de ce substrat, confirme que *C. thermocellum* possède une activité pectinolytique. Le méthanol, métabolisé en premier lieu par la bactérie acétoclaste, induit probablement une forte dégradation de l'acétate en méthane, ainsi que nous l'avons montré lors de nos expériences sur cellulose.

Une simple comparaison entre les cultures mixtes CMS et CTMS montre que la production de méthane est presque identique pour les deux types d'associations, et que 300 μ moles d'acétate s'accumulent dans le milieu pour CTMS accompagnées d'une chute de pH qui provoque une inhibition de l'acétoclastie.

Tous ces résultats montrent que la plus forte production de méthane est obtenue lors de la fermentation de la cellulose et des hémicelluloses par la bactérie acidifiant *C. thermocellum* ; la triculture CMS a produit 5 mmoles de CH_4 /g de pulpes de betterave dégradées.

V - CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons isolé plusieurs souches thermophiles impliquées dans la digestion anaérobie des polymères biologiques. Des cultures mixtes définies de bactéries ont été étudiées.

Les expériences réalisées séparément sur gélatine et sur cellulose montrent que la forte production de méthane résulte essentiellement de l'utilisation de l'hydrogène et de l'acétate produits lors de la fermentation des composés organiques par les bactéries acidifiantes respectives.

Au cours de nos expériences, nous avons observé que le métabolisme des bactéries acidifiantes (*C. thermocellum*, *T. proteolyticus*) était modifié lorsqu'elles étaient couplées à une bactérie méthanogène hydrogénophile (*Methanobacterium* sp) excepté lorsque *C. thermocellum* était cultivé sur pectine. La production d'hydrogène était décuplée et la concentration en acétate augmentait nettement. En présence de la bactérie méthanogène hydrogénophile, aucune trace d'hydrogène n'est décelée ; il y a établissement d'un transfert interspécifique d'hydrogène entre les bactéries acidifiantes et la bactérie méthanogène hydrogénophile. Ce processus induit une formation importante d'acétate. Il en résulte par la suite une importante production de méthane.

L'utilisation d'hydrogène dans le milieu modifie d'un point de vue qualitatif et quantitatif les produits du métabolisme de *T. proteolyticus* et *C. thermocellum*.

En ce qui concerne les expériences sur cellulose, nous avons remarqué que dans l'association CMS, la sarcine thermophile n'a pu utiliser la totalité de l'acétate produit et que le pH est descendu à 6,2. Cette baisse de pH est défavorable à la croissance de la bactérie méthanogène *Methanosarcina* MP et provoque une inhibition de l'acétoclastie. L'addition d'une faible quantité de méthanol a, par contre, induit une forte utilisation de l'acétate dans la triculture (CMS). A la fin de l'expérimentation, la totalité de l'acétate a été convertie en méthane.

Cette étude souligne les interactions entre les différents microorganismes thermophiles intervenant lors de la méthanisation de la gélatine, de la cellulose et de la pectine. L'étude préliminaire sur des composés organiques chimiquement définis nous a permis de mieux comprendre le rôle des bactéries thermophiles sélectionnées pour la méthanisation d'un substrat plus complexe : les pulpes de betterave sucrière.

Dans le cas de l'association CMS, 5 mmoles de CH₄ ont été produits par g de pulpes dégradées. L'inoculation de *T. proteolyticus* dans la culture mixte *C. thermocellum* - *Methanobacterium* sp - *Methanosarcina* MP n'a que peu modifié le

rendement en CH₄.

La fermentation méthanique, tout en fournissant de l'énergie, produit également une source fertilisante et l'on sait que l'un des facteurs du développement rural est précisément la fourniture d'énergie et d'engrais.

La fermentation méthanique est aussi un bon procédé pour l'épuration et la valorisation énergétique des rejets des industries agro-alimentaires.

La voie thermophile mérite plus d'attention en raison des temps de génération plus courts des microorganismes thermophiles, un contrôle bactériologique plus efficace et une meilleure solubilisation des matières organiques aux températures élevées.

Notre étude nécessite maintenant un complément d'expérimentation à l'échelle pilote. Cette culture mixte définie pourrait alors être testée pour la biométhanisation de certains déchets agricoles riches en cellulose, en protéines ou en pectine.

VI - BIBLIOGRAPHIE

- ANDREESEN, J.R., GOTTSCHALK, G. et SCHLEGEL, H.G. (1970). *Clostridium formiaceticum* nov. spec., isolation, description and distinction from *C.aceticum* and *C.thermoaceticum*. **Arch.Microbiol.**, **72**: 154 - 174.
- BALCH, W.E., FOX, G.E., MAGRUM, L.J., WOESE, L.R. et WOLFE, R.S. (1979) .Methanogens : reevaluation of a unique biological group. **Microbiol.Rev.**, **43** : 260 - 296.
- BALCH, W.E., MAGRUM, L.J., FOX, G.E. et WOLFE, R.S. (1977). An ancient divergence among the bacteria. **J. Mol. Evol.**, **9** : 305 - 311.
- BALCH, W.E., SCHOBERTH, S., TANNER R.S. et WOLFE, R.S. (1977). *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide reducing, anaerobic bacteria. **Int. J. Syst Bacteriol.**, **27** : 335 - 361.
- BALDERSTONE, W.L. et PAYNE, W.J. (1976). Inhibition of methanogenesis in salt marsh sediments and whole-cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen oxides. **Appl. Environ.Microbiol.**, **32** : 264 - 269.
- BELL, R.G. (1969). Studies on the decomposition of organic matter in flooded soil. **Soil Biol. Biochem.**, **1** : 105 - 116.
- BEN-BASSAT, A. et ZEIKUS, J.G. (1981). *Thermobacteroides acetoethylicus* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium. **Arch. Microbiol.**, **128** : 365 -370.
- BLAYLOCK, B.A. et STADTMAN, T.C. (1964).Enzymatic formation of methylcobalamin in *Methanosarcina barkeri* extracts.**Biochem.Biophys.Res. Commun.**, **17** : 475 - 480.
- BOLLAG, J.M. et CZLONKOWSKI, S.T. (1973). Inhibition of methane formation in soil by various nitrogen - containing compounds. **Soil Biol. Biochem.**, **5** : 673 - 678.
- BOMAR, M., KNOLL, K. et WIDDEL, F. (1985). Fixation of molecular nitrogen by *Methanosarcina barkeri* . **FEMS . Microbiol. Ecol.**,**1**:47-55.

- BOONE, D.R. et BRYANT, M.P. (1980). Propionate degrading bacterium , *Syntrophobacter wolinii*, sp. nov. ,gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40** : 626 - 632.
- BRAUN, M. et 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., C₃* : 368 - 376.
- BRAUN, M., MAYER, F. et GOTTSCHALK, G. (1981). *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch. Microbiol.*, **128** : 288 - 293.
- BRYANT, M.P., CAMPBELL, L.L., REDDY, C.A et CRABILL, M.R. (1977). Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂ - utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33** : 1162 - 1169.
- BRYANT, M.P., WOLIN, E.A, WOLIN, M.J. et WOLFE, R.S. (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.*, **59** : 20 - 31.
- BUSWELL, A.M. et MÜLLER, H.F. (1952). Mechanics of methane fermentation. *Industr. Engin. Chem.* , **44**.
- CHEESEMAN, P., TOMS - WOOD, A. et WOLFE, R.S. (1972). Isolation and properties of a fluorescent compound Factor 420, from *Methanobacterium* strain M.o.H. *J. Bacteriol.*, **112** : 527 - 531.
- CHEN, M. et 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.
- ELLEFSON, W.L. et WOLFE, R.S. (1980). Role of component C in the methyl - reductase system of *Methanobacterium*.. *J. Biol. chem.*, **255** : 8388 - 8389.
- FERGUSON, T.J. et MAH, R.A. (1983 a). Effect of H₂ - CO₂ on methanogenesis from acetate or methanol in *Methanosarcina* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* , **46** : 348 - 355.

- FERGUSON, T.J. et MAH, R.A. (1983b). Isolation and characterization of an H_2 - oxidizing thermophile methanogen. **Appl. Environ. Microbiol.**, **45** : 265 - 274.
- FOX, G.E., MAGRUM, L.J., BALCH, W.E., WOLFE, R.S. et WOESE, C.R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. **Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A.** , **74** : 4537 - 4541.
- FUCHS, G. , STUPPERICH, E. et THAUER, R.K. (1978). Acetate assimilation and synthesis of alanine, aspartate and glutamate in *Methanobacterium thermoautotrophicum*.. **Arch. Microbiol.**, **117** : 61 - 66.
- GHOSH S., CONRAD, J.R. et KLASS, D.L. (1975). Anaerobic acidogenesis of wastewater sludge. **J. Wat. Pollut. Contr. Fed.** , **47** : 30 - 45.
- 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.
- GUNSALUS, R.P. et WOLFE, R.S. (1978). ATP activation and properties of the methylcoenzyme M reductase system in *Methanobacterium thermoautotrophicum*.. **J. Bacteriol.**, **135** : 851 - 857.
- HAMMES, W.P., WINTER, J. et KANDLER, O. (1979). The sensitivity of the pseudomurein containing genus *Methanobacterium* to inhibitors of murein synthesis. **Arch. Microbiol.**, **123** : 275 - 279.
- HOBSON, P.N. et SHAW, B.G. (1974). The bacterial population of piggery waste anaerobic digesters **Wat. Res.**, **8** : 507 - 516.
- HOLLAUS, F. et SLEYTR, V. (1972). On the taxonomy and fine structure of some hyperthermophilic saccharolytic clostridia. **Arch. Microbiol.** , **86** : 129 - 146.
- HÜBER, H., THOMM, M., KÖNIG, H., THIES, G. et STETTER, K.O. (1982). *Methanococcus thermolithotrophicus* , a novel thermophilic lithotrophic methanogen. **Arch. Microbiol.**, **132** : 47 - 50.
- HUNGATE, R.E. (1969). A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes, In : Norris, R. and Ribbons, D.W. (eds) **Methods in Microbiology**, vol 3B, Academic press, Inc, New-York, pp. 117 - 132.

- JONES, W.J., GUYOT, J.P et WOLFE, R.S. (1984). Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47** : 1 -6.
- JONES, J.B. et STADTMAN, T.C. (1977). *Methanococcus vannielii* : culture and effects of selenium and tungsten on growth. *J. Bacteriol.*, **130** : 1404 - 1406.
- KANDLER, O. et KÖNIG, H. (1978). Chemical composition of the peptidoglycan free cell walls of methanogenic bacteria. *Arch. Microbiol.*, **118**:141-152.
- KHAN, A.W. (1980). Degradation of cellulose to methane by a coculture of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Methanosarcina barkeri*. *FEMS. Microbiol. Lett.* , **9** : 233 - 235.
- KÖHLER, H.P.E. et ZEHNDER, A.J.B. (1984). Carbon monoxide dehydrogenase and acetate thiokinase in *Methanotherix Soehngenii*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **21** : 287 - 292.
- KÖNIG, H. et STETTER, K.O. (1982). Isolation and characterization of *Methanlobus tindarius* sp. nov., a coccoid methanogen growing only on methanol and methylamines. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., C₃* : 478 - 490.
- KRZYCKI, J.A. et ZEIKUS, J.G. (1984). Characterisation and purification of carbon monoxide dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* ,**158** : 231 - 237.
- LATHAM, M.J. et 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. et MARTIN, S.M. (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.
- LEIGH, J.A. , MAYER, F. et WOLFE, R.S. (1981). *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen oxidising acetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* , **129** : 275 - 280.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.

- LOZANO, I.T. (1979). Contribution à l'étude cinétique de la phase acidogène de la fermentation méthanogène. **Thèse de Docteur Ingénieur. I.N.S.A. Toulouse.**
- MAH, R.A. (1980). Isolation and Characterization of *Methanococcus mazei*, **Curr. Microbiol.**, **3** : 321 - 326.
- MAH, R.A. et SMITH, M.R. (1981). The methanogenic bacteria. In : Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. (eds), **The Prokaryotes, Vol I**, Springer verlag, Berlin, pp 948 - 977.
- MAH, R.A., SMITH, M.R. et BARESI, L. (1978). Studies on an acetate fermenting strain of *Methanosarcina*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **35** : 1174 - 1184.
- MAH, R.A. , WARD, D.M., BARESI, L. et GLASS, T.L. (1977). Biogenesis of methane. **Ann. Rev. Microbiol.**, **31** : 309 - 341.
- Mc BRIDE, B.C. et WOLFE, R.S. (1971). Biochemistry of methane formation. **Adv. Chem. Ser.**, **105** : 11 - 22.
- Mc INERNEY, M.J. et BRYANT, M.P. (1981). Anaerobic degradation of lactate by syntrophic association of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. **Appl. Environ. Microbiol.** , **41** : 346 - 354.
- Mc INERNEY, M.J. MACKIE, R.I. et BRYANT, M.P. (1981). Syntrophic association of a butyrate - degrading bacterium and *Methanosarcina* enriched from bovine rumen fluid. **Appl. Environ. Microbiol.**, **41** : 826-828.
- MILLER, T.L. et WOLIN, M.J. (1985). *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov. : a species that forms methane by reducing methanol with Hydrogen. **Arch. Microbiol.**, **141** : 116 - 122.
- MÖLLER, B., OBMER, R., HOWARD, B.H., GOTTSCHALK, G. et HIPPE, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of Gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. **Arch. Microbiol.**, **139** : 388 - 396.
- MOUNTFORT, D.O., ASHER, R.A. et BAUCHOP, T. (1982). Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. **Appl. Environ. Microbiol.** , **44** : 128 - 134.

- MURRAY, P.A. et ZINDER, S.H. (1984). Nitrogen fixation by a methanogenic archaeobacterium. *Nature*, **312** (5991) : 284 - 286.
- NAGASE, M. et MATSUO, T. (1982). Interactions between amino-acid degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* , **24** : 2227 - 2240.
- NOZHEVNIKOVA, A.N. et YAGODINA, T.G. (1982). A thermophilic acetate methane-producing bacterium. *Microbiologiya.* , **51**: 534 - 540.
- OLLIVIER, B., CORDRUWISCH, R., LOMBARDO, A. et GARCIA, J.L. (1985). Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.*, **142** : 307 - 310.
- OLLIVIER, B., LOMBARDO A., et GARCIA J.L. (1984). Isolation and characterization of a new thermophilic *Methanosarcina* strain (strain MP). *Ann. Microbiol.* , **B 135** : 187 - 198.
- OLLIVIER, B.M., MAH, R.A., FERGUSON, T.J., BOONE, D.R., GARCIA, J.L. et 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.
- PFEFFER, J.T. (1974). Temperature effects on anaerobic fermentation of domestic refuse. *Biotechnol. Bioeng.* , **16** : 771 - 787.
- PFENNIG, N. et WIDDEL, F. (1981). Ecology and physiology of some anaerobic bacteria from the microbial sulfur cycle. In : Bothe,H. and Trebot, A. (eds), *Biology of inorganic Nitrogen and sulfur*, Springer Verlag, Berlin, pp 169 - 177.
- PFENNIG, N., WIDDEL, F. et TRÜPPER, H.G. (1981). The dissimilatory sulfate reducing bacteria. In : Starr, M.P., Stolp, H., Trüpper, H.G., Balows, A. et Schlegel, H.G. (eds), *The Procaryotes*, vol I, Springer Verlag, Berlin, pp. 926 - 940.
- PRICE, C.W., FUSON, G.B. et PHAFF, H.J. (1978). Genome comparison in yeast systematics : delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaromyces*, and *Picchia*. *Microbiol. Rev.*, **42** : 161-193.

- RAIMBAULT, M. (1975). Etude de l'influence inhibitrice de l'acétylène sur la formation biologique du méthane dans un sol de rizière. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **1264** : 247 - 258.
- REDDY, C.A., BRYANT, M.P. et WOLIN, M.J. (1972). Characteristics of "s"organism isolated from *Methanobacillus omelianskii*. *J. Bacteriol.*, **109** : 539 - 545.
- RIVARD, C.J. et SMITH, P.H. (1982). Isolation and characterization of a thermophilic marine methanogenic bacterium, *Methanogenium thermophilicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bact.*, **32** : 430 - 436.
- ROZANOVA, E.P. et KHUDYAKOVA, A.T. (1974). A new non spore-forming thermophilic sulfate-reducing organism, *Desulfovibrio thermophilus*, nov. sp. *Microbiologiya*, **43** : 1069 - 1075.
- RUSSELL, J.B. (1983). Fermentation of peptides by *Bacteroides ruminicola* B₁₄. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45** : 1566 - 1574.
- SCHARER, J.M. et MOO-YOUNG, M. (1979). Methane generation by anaerobic digestion of cellulose containing wastes. *Adv. Biochem. Engng.*, **11** : 85 - 101.
- SCHEIFINGER, C.C., LINEHAM, B. et WOLIN, M.J. (1975). H₂ production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **29** : 480 - 483.
- SLEAT, R., MAH, R.A. et ROBINSON, R. (1985). *Acetoanaerobium noterae* gen. nov., sp. nov. : an anaerobic bacterium that forms acetate from H₂ and CO₂. *Int. J. Syst. Bact.*, **35** : 10 - 15.
- SMITH, M.H. et MAH, R.A. (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.*, **14** : 368 - 371.
- SMITH, M.R. et MAH, R.A. (1978). Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36** : 870 - 879.
- SMITH, M.R. et MAH, R.A. (1980). Acetate as sole carbon and energy source for growth of *Methanosarcina* strain 227. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** : 993 - 999.
- SOMOGYI, L.P. et ROMANI, R. (1964). A simplified technique for the determination of pectin methylesterase activity. *Anal. Biochem.*, **7** : 498 - 501.

- SOWERS, K.R. et FERRY, J.G. (1983). Isolation and characterization of a methylotrophic marine methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45** : 648 - 690.
- STETTER K.O. et GAAG, G. (1983). Reduction of molecular sulphur by methanogenic bacteria. *Nature.*, **305** (5932) : 306 - 309.
- STETTER, K.O., THOMM, M., WINTER, J., WILDGRUBER, G., HUBBER, H., ZILLIGW., JANECOVIC, D., KÖNIG, H., PALM, P. et WUNDERL, S. (1981). *Methanothermus-fervidus*, sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an icelandic hot spring. *ZBL. Bakt. Mikrobiol. Hyg. C. Allg.*, **2** : 166 - 178.
- TAYLOR, C.D., Mc BRIDE, B.C., WOLFE, R.S. et BRYANT, M.P. (1974). Coenzyme M, essential for growth of a rumen strain of *Methanobacterium ruminantium*. *J. Bacteriol.*, **120** : 974 - 975.
- TAYLOR, C.D. et WOLFE, R.S. (1974). Structure and methylation of coenzyme M. *J. Biol. Chem.*, **249** : 4875 - 4885.
- TOUZEL, J.P., PETROFF, D. et ALBAGNAC, G. (1985). Isolation and characterization of a new thermophilic *Methanosarcina*, the strain CHTI 55. *System. Appl. Microbiol.*, **6** : 66 - 71.
- TRAORE, S.A. (1981). Energétique de la croissance des bactéries sulfato-réductrices lorsque l'accepteur final d'électrons est le sulfate ou une bactérie méthanogène. Transfert interspécifique d'hydrogène. Energie de maintenance. **Thèse de Docteur-es-sciences**, université d'Aix-Marseille I.
- TRAORE, S.A., FARDEAU, M.-L., HATCHIKIAN C.E., LE GALL J. et BELAICH J.-P. (1983a) 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.
- TRAORE, S.A., GAUDIN, C., HATCHIKIAN, C.E., LE GALL, J. et BELAICH, J.-P. (1983b) Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: maintenance energy coefficient of the sulfate-reducing organism in the absence and presence of its partner. *J. Bacteriol.*, **155** : 1260-1264.
- TZENG, S.F., WOLFE, R.S. et BRYANT, M.P. (1975). Factor 420 - dependent pyridine nucleotide-linked hydrogenase system of *Methanobacterium ruminantium*. *J. Bacteriol.*, **121** : 184 - 191.

- VAN DEN BERG, L. , LAMB, K.A., MURRAY, W.D. et ARMSTRONG, D.W. (1980). Effects of sulfate, iron and hydrogen on the microbiological conversion of acetic acid to methane. *J. Appl. Bacteriol.*, **48** : 437 - 447.
- WAHREN, A. et GIBBONS, R.J. (1970). Amino acid fermentation by *bacteroides melaninogenicus*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, **36** : 149 - 159.
- WEIMER, P.J. et ZEIKUS, J.G. (1977). Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33** : 289 - 297.
- WEIMER, P.J. et ZEIKUS, J.G. (1979). Acetate assimilation pathway of *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.*, **137** : 332 - 339.
- WIDDEL, F. (1980). Anaerober abbau von Fettsäuren und benzoessäure durch neu isolierte arten sulfat-reduzierender bakterien, *Dissertation* Göttingen, pp 1 - 443.
- WIEGEL, J., BRAUN, M. et GOTTSCHALK, G. (1981). *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr. Microbiol.*, **5** : 255 - 260.
- WIEGEL, J. et LJUNGDAHL, L.G. (1981). *Thermoanaerobacter ethanolicus*, gen. nov., spec. nov, a new extreme thermophilic anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.*, **128** : 343 - 348.
- WILDGRÜBER, G., THOMM, M., KÖNIG, H., OBER, K., RICCHIUTO, T. et STETTER, K.O. (1982). *Methanoplanus limicola*, a plate-sphaped methanogen representing a novel family, the *Methanoplanaceae*. *Arch. Microbiol.*, **132** : 31 - 36.
- WILLIAMS, R.A.D, BOWDEN, G.H., HARDIE, J.M. et SHAH, H. (1975). Biochemical properties of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies. *Int. J. Syst. Bact.*, **25** : 298 - 300.
- WINFREY, M.R. et ZEIKUS, J.G. (1977). Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33** : 275 - 281.
- WOESE, C. (1981). Les Archaeobactéries. *Pour la science*, **46** : 56 - 69.

- WOLFE, R.S. (1979). Methanogens : a surprising microbial group. **Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.**, **45** : 353 - 364.
- ZABEL, H.P., KÖNIG, H. et WINTER, J. (1985). Emended description of *Methanogenium thermophilicum*, Rivard and Smith, and assignment of new isolates to this species. **System. Appl. Microbiol.**, **6** : 72 - 78.
- ZEHNDER, A.J.B., HUSER, B.A., BROCK, T.D. et WUHRMANN, F. (1980). Characterization of an acetate - decarboxylating , non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. **Arch. Microbiol.**, **124**: 1 - 11.
- ZEIKUS, J.G., HEGGE, P.W. et ANDERSON, M.A. (1979). *Thermoanaerobium brockii* gen. nov. and sp. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactiv, anaerobic bacteria. **Arch. Microbiol.**, **122** : 41 - 48.
- ZEIKUS, J.G. et HENNING, D.L. (1975). *Methanobacterium arbophilicum* sp. nov., an obligate anaerobe isolated from the wetwood of living trees. **Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.**, **41** : 543 - 552.
- ZEIKUS, J.G., KERBY, R. et KRZYCKI, J.A. (1985). Single-carbon chemistry of acetogenic and methanogenic bacteria. **Science.**, **127** : 1167 - 1173.
- ZEIKUS, J.G. et WARD, J.G. (1974). Methane formation in living trees : a microbial origin. **Science**, **184** : 1181 - 1183.
- ZEIKUS, J.G., WEIMER, P.J., NELSON, D.R. et DANIELS, L. (1975). Bacterial methanogenesis : acetate as a methane precursor in pure culture. **Arch. Microbiol.**, **104** : 129 - 134.
- ZEIKUS, J.G. et WOLFE, R.S. (1972). *Methanobacterium thermoautotrophicum* sp. nov. an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. **J. Bacteriol.**, **109** : 707 - 713.
- ZINDER, S.H. et 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.

ANNEXE

**MILIEU DE CULTURE DE LA BACTERIE
THERMOPHILE PROTEOLYTIQUE UTILISANT
LA GELATINE (SOUCHE BT)**

Solution minérale de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	25	ml
Solution d'oligo-éléments de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	5	ml
NH ₄ Cl.....	1,0	g
K ₂ H PO ₄ , 3 H ₂ O.....	0,4	g
Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,1	g
L-Cystéine.....	0,5	g
Extrait de levure (DIFCO).....	1,0	g
Gélatine (DIFCO).....	3,0	g
Résazurine.....	0,001	g
Eau distillée.....	1000	ml

**MILIEU DE CULTURE DE LA BACTERIE
METHANOGENE THERMOPHILE
(*METHANOBACTERIUM sp*)**

K ₂ H PO ₄ (Solution à 6 g/l).....	50	ml
Solution minérale de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	50	ml
Solution d'oligo-éléments de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	10	ml
FeSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,002	g
L. cystéine.....	0,5	g
Acétate de sodium.....	2,5	g
Formiate de sodium.....	2,5	g
Extrait de levure (DIFCO).....	2,0	g
Biotrypcase (Biomérieux).....	2,0	g
Jus de digesteur purifié et stérilisé.....	500	ml
Eau distillée.....	500	ml
Résazurine 0,2 %	1	ml

**MILIEU DE CULTURE DE LA BACTERIE
METHANOGENE THERMOPHILE
(*METHANOGENIUM sp*)**

Solution minérale de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	50	ml
Solution d'oligo-éléments de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	10	ml
NH ₄ Cl.....	1	g
K ₂ HPO ₄ ,3H ₂ O.....	0,4	g
MgCl ₂ ,6H ₂ O.....	0,5	g
Acétate de sodium.....	1	g
Extrait de levure (DIFCO).....	1	g
Biotrypcase (Biomerieux).....	1	g
Resazurine.....	0,001	g
Eau distillée.....	1000	ml

**MILIEU DE CULTURE DE LA BACTERIE
METHANOGENE ACETOCLASTE
THERMOPHILE (*METHANOSARCINA* MP)**

Solution minérale de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	50	ml
Solution d'oligo-éléments de BALCH <i>et al.</i> (1979).....	10	ml
NH ₄ Cl.....	1	g
K ₂ H PO ₄ , 3 H ₂ O.....	0,4	g
Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,2	g
L. cystéine.....	0,5	g
Acétate de sodium, 3 H ₂ O.....	5	g
Extrait de levure (DIFCO).....	1	g
Résazurine.....	0,001	g
Eau distillée.....	1000	ml

**SOLUTION D'OLIGO-ELEMENTS DE
BALCH *et al.* (1979)**

Acide nitriloacétique.....	1,5	g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O.....	3,0	g
Mn SO ₄ , 2 H ₂ O.....	0,5	g
NaCl.....	1,0	g
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O.....	. 0,1	g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,1	g
CaCl ₂ , 2H ₂ O.....	0,1	g
ZnCl ₂	0,1	g
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,01	g
AlK(SO ₄) ₂	0,01	g
H ₃ BO ₃	0,01	g
Na ₂ Mo O ₄ , 2 H ₂ O.....	0,01	g
Eau distillée.....	..1000	ml

Dissoudre l'acide nitrilotriacétique avec KOH jusqu'à pH 6,5.
Ajuster le pH à 7,0 avec KOH.
Conserver au réfrigérateur.

SOLUTION MINERALE DE BALCH *et al.* (1979)

KH ₂ PO ₄	6,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0	g
NaCl.....	12,0	g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O.....	2,6	g
CaCl ₂ , 2H ₂ O.....	0,16	g
Eau distillée	1 000	ml

SOLUTION DE VITAMINES DE BALCH *et al.* (1979)

Biotine.....	20	mg
Acide folique.....	20	mg
Pyridoxine - HCl.....	100	mg
Thiamine- HCl.....	50	mg
Riboflavine.....	50	mg
Acide nicotinique.....	50	mg
DL panthothénate de calcium.....	50	mg
Vitamine B ₁₂	1	mg
Acide p - aminobenzoïque.....	50	mg
Acide lipoïque.....	50	mg
Eau distillée.....	1 000	ml

DOSAGE DES PROTEINES

* Réactif du Biuret (A + B + C : 50 : 1 : 1 V/V) à mélanger au dernier moment.

A : Na_2CO_3 à 2 % dans une solution de soude à 0,4 %

B : Cu SO_4 à 1 % dans de l'eau

C : Tartrate double de sodium et potassium à 2 % dans de l'eau.

* Gélatine : 300 mg dans 1 000 ml d'eau distillée.

* Réactif de Folin-Ciocalteu à diluer dans de l'eau distillée.

DOSAGE DES SUCRES TOTAUX

* Réactif à l'anthrone

Anthrone 200 mg

Acide sulfurique 95 % 1 000 ml

* Cellulose : 50 mg dans 1 000 ml d'eau distillée.

LISTE DES PUBLICATIONS

1. OLLIVIER, B., LOMBARDO, A. et GARCIA, J.-L. (1984) Isolation and characterization of a new thermophilic *Methanosarcina* strain (strain MP). **Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur)**, **135 B** : 187-198 .
2. OLLIVIER, B., SMITI, N. et GARCIA, J.-L. (1985) Thermophilic methanogenesis from sugar beet pulp by a defined mixed bacterial culture. **Biotechnol.Lett.**, **7** : 847-852 .
3. OLLIVIER, B., MAH, R.A., FERGUSON, T.J., BOONE, D.R., GARCIA, J.-L. et 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 .
4. OLLIVIER, B., SMITI, N. , MAH, R.A. et GARCIA, J.-L. (1986) Thermophilic methanogenesis from gelatin by a mixed defined bacterial culture. **Appl.Microbiol.Biotechnol.**, **24** : 79-83 .
5. SMITI, N., OLLIVIER, B. et GARCIA, J.-L. (1986) Thermophilic degradation of cellulose by a triculture of *Clostridium Thermocellum*, *Methanobacterium* sp. and *Methanosarcina* MP. **FEMS Microbiol.Lett.**, **35** : 93-97 .

RESUME

Ce travail décrit l'étude de la biométhanisation d'un résidu solide d'industrie agroalimentaire, les pulpes de betterave sucrière, par une culture mixte de bactéries thermophiles. Ces pulpes sont composées en grande partie de cellulose, de protéines et de pectines.

La première phase a permis l'isolement de bactéries acidifiantes et méthanogènes thermophiles dont certaines ont été associées dans des cultures mixtes définies. Une bactérie protéolytique, *Thermobacteroides proteolyticus*, et trois bactéries méthanogènes appartenant aux genres *Methanobacterium*, *Methanogenium* et *Methanosarcina* ont été identifiées.

Dans une deuxième étape, une expérimentation en cultures mixtes définies a été réalisée pour méthaniser la gélatine en associant *Thermobacteroides proteolyticus* à *Methanobacterium* sp. et *Methanosarcina* MP. Ces mêmes bactéries méthanogènes ont été couplées à *Clostridium thermocellum* pour la fermentation méthanique de la cellulose et des pectines. L'ensemble de ces bactéries ont été associées pour la méthanisation des pulpes de betterave sucrière avec un rendement de 5,5 mmole de méthane par g de matière sèche.

Ces résultats montrent qu'il existe un transfert interspécifique d'hydrogène entre les bactéries fermentaires et les bactéries méthanogènes sur gélatine et cellulose; ce processus entraîne une modification du métabolisme de la bactérie hydrolytique impliquée. Au contraire, l'utilisation des pectines ne conduit à aucun transfert d'H₂ obligé. Cette étude démontre, d'autre part, que l'utilisation de l'acétate par *Methanosarcina* MP dans la culture mixte n'est réalisable qu'en l'absence d'hydrogène.