

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE



Unité de biochimie de la nutrition (UCL)

Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires (FUSAGx)

**TRAITEMENT FONGIQUE DE DIGESTATS ANAEROBIES
LIGNOCELLULOSIQUES**

Co-promoteurs : Pr P.GERIN et
Ir F. BINDELS
Unité de Génie Biologique, UCL

Mémoire présenté par
Daniel-Bienvenu BANGALA MADA
en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes
Approfondies en Sciences et Technologie
des Aliments

Année académique 2006-2007

Résumé

En dépit de l'utilisation des résidus générés par l'agriculture et par l'agro-industrie comme fertilisants, aliments pour bétails et combustibles, il subsiste toujours le problème de leur quantité à traiter. Ceci a conduit au développement des méthodes de conversion énergétique de ces résidus à travers le processus de la digestion anaérobie ou biométhanisation réalisée par les bactéries anaérobies. Cependant, ces dernières ne sont pas capables de digérer les fibres lignocellulosiques enveloppant les cellules végétales avec comme conséquence un rendement énergétique limité de la digestion anaérobie et un important reste de résidus solides à la fin de l'opération. Or ces fibres représentent environ 50% de toute la biomasse terrestre avec une production annuelle estimée à 50 milliards de tonnes.

Les fibres lignocellulosiques sont constituées de la cellulose, de l'hémicellulose, et de la lignine qui sont fortement entremêlés et sont chimiquement attachées par des liaisons de divers types, covalentes et non covalentes. Il n'y a que quelques organismes qui sont capables de dégrader tous les constituants des fibres lignocellulosique, c'est-à-dire la cellulose, l'hémicellulose et la lignine, simultanément. Ces organismes sont principalement les white-rot fungi ou champignons de pourriture blanche.

Dans ce travail de recherche, la digestion anaérobie des résidus lignocellulosiques est couplée à une digestion fongique afin d'accroître la récupération de l'énergie contenue dans ces substrats et de supprimer la production de résidus solides. L'hypothèse du travail est que les digestats anaérobies lignocellulosiques renferment encore une bonne portion des substances fermentescibles sous forme de fibres lignocellulosiques. Celles-ci sont cependant inaccessibles aux bactéries anaérobies responsables de la biométhanisation. C'est ainsi que le traitement de ces digestats par les white-rot fungi dotés d'enzymes lignolytiques devrait fragmenter la lignine, désagréger les fibres et rendre les polysaccharides pariétaux plus facilement disponibles aux bactéries de la digestion anaérobie.

En pratique, les échantillons de digestats de maïs provenant d'une biométhanisation préalable ont été inoculés avec le white-rot fungi *Pycnoporus sanguineus* (Ps7) afin d'obtenir une hydrolyse des fibres lignocellulosiques. Le dispositif expérimental utilisé pour la digestion fongique des digestats était constitué des flacons de 308 ml fermés par des bouchons de coton et incubés pendant un mois. La digestion anaérobie a été effectuée pendant une période de 7 à 10 jours dans des réacteurs batch anaérobies recouverts de tête manométrique mesurant la pression des gaz carbonique et méthane produits. Des paramètres expérimentaux ont été testés au cours de la digestion fongique des digestats dans le but d'identifier les conditions qui permettraient une croissance maximale du Ps7. Ces paramètres ont été : différentes valeurs de 1) pH et 2) d'humidité de digestats, et 3) leur appauvrissement en éléments nutritifs résiduels facilement assimilables par une opération de « lavage ».

Les traitements appliqués permettent le développement du white-rot fungus Ps7 dans les digestats de maïs mais uniquement lorsque le digestat est préalablement autoclavé, l'inoculation et l'incubation se faisant en conditions stériles. En conditions non stériles, le white-rot fungus subit une importante compétition d'autres organismes présents dans le digestat. Le développement de Ps7 entraîne une amélioration de la biodigestibilité anaérobie des digestats jusqu'à des proportions allant de 36% en 6 jours à 82% en 10 jours d'incubation par rapport aux témoins n'ayant pas subi la digestion fongique.

Les perspectives en cours sont orientées vers la suppression de l'autoclavage de sorte que le développement du white-rot fungus dans les digestats de maïs soit possible en conditions non stériles. Pour cela, la piste d'un appauvrissement plus poussé est proposée.

Dédicace

Au Seigneur Jésus-Christ, je dédie ce travail car :

Le Seigneur est mon berger, je ne manquerai de rien.
Il me met au repos dans des prés d'herbe fraîche,
il me conduit au calme près de l'eau. Il ranime mes forces,
il me guide sur la bonne voie, parce qu'il est le berger
d'Israël. Même si je passe par la vallée obscure, je ne
redoute aucun mal, Seigneur, car tu m'accompagnes. Tu
me conduis, tu me défends, voilà ce qui me rassure. Face à
ceux qui me veulent du mal, tu prépares un banquet pour
moi. Tu m'accueilles en versant sur ma tête un peu d'huile
parfumée. Tu remplis ma coupe jusqu'au bord. Oui, tous
les jours de ma vie, ta bonté, ta générosité me suivront pas
à pas. Seigneur, je reviendrai dans ta maison aussi
longtemps que je vivrai.

Psaumes 23.

Remerciements

Je voudrais remercier, par ces quelques lignes, tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce mémoire ;

Je remercie tout d'abord le Professeur Patrick Gerin pour m'avoir reçu dans son laboratoire, ses conseils, ses corrections et le temps passé à m'aider malgré son emploi du temps chargé.

Je remercie ensuite Françoise Bindels pour son encadrement, ses conseils, sa patience et sa sympathie tout au long de ce travail de recherche.

Je remercie toute l'Unité de GEBI pour son accueil chaleureux au sein de leur équipe et pour tous ces moments agréables passés ensemble.

Je remercie le Professeur Yvan Larondelle et François Bera, mes responsables académiques, pour l'énorme travail scientifique qu'ils ont accompli dans ma formation.

Je remercie tous les Professeurs de la Faculté d'Ingénierie Biologique, Agronomique et Environnementale de l'Université Catholique de Louvain ainsi que ceux de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux qui ont apporté leur pierre dans ma formation.

Je remercie la Commission Universitaire pour le Développement de m'avoir octroyé cette bourse de 13 mois qui m'a permis d'enrichir le bagage de mes connaissances.

Je remercie, enfin, tous les collègues avec qui j'ai partagé cette formation pour tous les meilleurs et les pires moments passés ensemble.

Abréviations

DCO : Demande chimique en oxygène

MS : Matière sèche

MF : Matière fraîche

WRF : White-rot fungi

Ps7 : *Pycnoporus sanguineus* souche 7

Table de matière

Résumé	2
Dédicace.....	3
Remerciements	4
Table de matière	6
Introduction	7
PARTIE I. ETAT DE L'ART	10
Chap. I Contexte général	11
Chap. II Paroi lignocellulosique des plantes	12
II. 1 Introduction	12
II.2 Structure et composition de la lignine	13
II.3 Biodégradation de la paroi lignocellulosique	14
<i>II.3.1 Biodégradation de la cellulose</i>	14
<i>II.3.2 Biodégradation de l' hémicellulose</i>	15
<i>II.3.3 Biodégradation de la lignine par les fungi</i>	16
II.4 Système lignolytique des white-rot fungi	17
Chap. III Le white-rot fungus Pycnoporus sanguineus	19
III.1 Introduction	19
III.2 Classification phylogénique de Pycnoporus sanguineus	19
III.3 Caractères généraux des Pycnoporus sanguineus	19
III. 4 Reproduction	21
III.5 Distribution écologique et hôtes	21
III.6 Système lignolytique de Ps7, son importance économique et écologique	22
Chap. IV Utilisation des White Rot Fungi (WRF) dans la dégradation des parois lignocellulosiques	23
IV.1 Introduction	23
IV.2 Mise en œuvre de la culture des white-rot fungi sur un substrat lignocellulosique	23
IV.3 Schéma général de traitement d'un matériel lignocellulosique par du white-rot fungi	24
Chap. V Aperçu sur la digestion anaérobie	26
V. 1 Définitions	26
V. 2 Sources potentielles de méthane	28
V.3 Principaux facteurs dont dépend la digestion anaérobie	29
V.4 Méthodes de détermination de la biodigestibilité anaérobie	29
V.5 Dispositif expérimental de mesure de biodigestibilité	30
Chap. VI Objectif du mémoire et démarche expérimentale	32
Chap. VII Matériel et méthodes	34
VII.1 Matériel biologique	34
VII.1.1 White-rot fungi	34
VII.1.2 Digestats de maïs	34
VII.1.3 Boues d'épuration (substrat pour l'inoculum anaérobie)	35
VII.2 Méthodes analytiques	35
VII.2.1 Demande chimique en oxygène	35
VII.2.2 Matière sèche	36
VII.3. Traitement de digestats de maïs	36
VII.3.1 Prétraitements physicochimiques de digestats de maïs	36
VII.3.2 Traitement de digestats de maïs avec le white-rot fungus Ps7	39
VII.4 Test de biodigestibilité anaérobie	41

VII.4.1 <i>Protocole d'analyse de biodigestibilité</i>	42
VII.4.2 <i>Traitement des données</i>	43
Chap. VIII Résultats et interprétation des résultats	48
VIII.1 Inoculation du white-rot fungus Ps7 sur digestats non stériles	49
VIII.1.1 <i>Mise au point du protocole de l'incubation de digestats de maïs avec le White-rot fungus Ps7</i>	49
VIII.1.2 <i>Mise au point du protocole du test de biodigestibilité anaérobie de digestats inoculés avec du white-rot fungi Ps7 en conditions non stériles</i>	51
VIII.2 Inoculation du white-rot fungus Ps7 sur digestats stérilisés	54
VIII.2.1 <i>Conditions expérimentales de la deuxième expérience</i>	54
VIII.2.2 <i>Résultats des observations visuelles du substrat stérilisé par simple autoclavage</i>	55
VIII.3 Inoculation de digestats lavés et stérilisés avec du white-rot fungus Ps7	58
VIII.3.1 <i>Conditions expérimentales de la troisième expérience</i>	58
VIII.3.2 <i>Résultats du lavage</i>	59
VIII.3.3 <i>Résultats des observations visuelles</i>	60
VIII.3.4 <i>Résultats du test de biodigestibilité du substrat traité</i>	63
VIII.3.5 <i>Discussion des résultats des observations visuelles et du test de biodigestibilité</i>	65
VIII.4 Inoculation de digestats stérilisés, lavés et acidifiés avec du white-rot fungus Ps7	69
VIII.4.1 <i>Conditions expérimentales</i>	69
VIII.4.2 <i>Résultats des observations visuelles</i>	70
VIII.4.3 <i>Résultats du bilan de matière de la digestion fongique</i>	74
VIII.4.4 <i>Résultats du test de biodigestibilité</i>	75
VIII.4.5 <i>Discussion des résultats</i>	79
Conclusions et suggestions	81
Références bibliographiques	82
Références sur Internet	85

Dans l'Union Européenne et dans plusieurs parties du monde, les résidus générés par l'activité agricole de production primaire et de transformation sont considérables et constituent, depuis un certain nombre d'année, un sérieux problème environnemental. Les pailles de céréales par exemple, représentaient dans l'Union Européenne, il y a quelques années, un surplus annuel de 24 millions de tonnes en matière sèche (Zadrazil et Reigneir 1988). En Malaisie, dans une seule plantation d'huile de palme, environ 11 tonnes de tourteaux sont produites par hectare chaque année, l'abattage ou la chute de vieux palmiers produit environ 115,4 kg de résidu sec par pied (Vikineswary et al., 2006).

En dépit de l'utilisation de ces résidus générés par l'agriculture et par l'agro-industrie comme fertilisants, aliments pour bétails et combustibles, il subsiste toujours le problème de leur quantité à traiter. Ceci a conduit au développement des méthodes de conversion énergétique de ces résidus à travers, notamment, le processus de biométhanisation ou digestion anaérobie réalisée par les bactéries anaérobies. C'est ainsi les déchets ménagers, agricoles, industriels, municipaux et presque 100 sortes de déchets solides de fruits et de légumes, de feuilles, d'herbes, en bois, de mauvaises herbes, marines et des eaux douces ont été explorés pour leur potentiel anaérobie de digestion en méthane (Gunaseelan, 1997).

Dans la nature, les fibres lignocellulosiques représentent la majeure partie de la biomasse avec une production mondiale annuelle estimée à 50 milliards de tonnes (Smith et al., 1988). La biométhanisation, bien que permettant l'hydrolyse des principales macromolécules organiques ou des macropolluants présents dans les matrices environnementales et dans les déchets organiques, ne parvient que très faiblement à réaliser l'hydrolyse des fibres lignocellulosiques enveloppant les cellules végétales. Ceci a pour conséquence un rendement énergétique faible du processus et la persistance du problème de résidus solides à éliminer à l'issue du processus. Dans ces conditions, toute utilisation, en digestion anaérobie, de résidus agricoles ayant une teneur élevée en lignine nécessiterait un prétraitement préalable capable de les en débarrasser.

Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré que deux types de micro-organismes interviennent activement, dans la nature, dans la dégradation des fibres ligno-cellulosiques. Il s'agit des bactéries filamenteuses ou Actinomycètes, notamment au cours du compostage, et

des champignons dit de pourriture blanche, appartenant au groupe des white-rot fungi (Agrios, 2005).

L'étude présente a pour objectif d'augmenter la biodigestibilité anaérobie de résidus agricoles en mettant à profit l'activité lignolytique des white-rot fungi. Il s'agit de développer un procédé couplant la digestion anaérobie et la digestion fongique. En pratique, les digestats de maïs, c'est-à-dire les résidus de maïs ayant subi une digestion anaérobie préalable, sont inoculés par du white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* (Ps7).

L'hypothèse du travail est que les digestats anaérobies lignocellulosiques renferment encore une bonne portion des substances fermentescibles sous forme de fibres lignocellulosiques. Celles-ci sont cependant inaccessibles aux bactéries anaérobies responsables de la bio méthanisation. C'est ainsi que le traitement de ces digestats par les white-rot fungi dotés d'enzymes lignolytiques devrait fragmenter la lignine, désagréger les fibres et rendre les polysaccharides pariétaux plus facilement disponibles aux bactéries de la digestion anaérobie.

La méthodologie du travail consiste en deux principales étapes:

- Traitement de digestats de maïs par digestion fongique : étude des conditions permettant le développement du white-rot fungi dans les digestats de maïs
- Mesure de l'amélioration de biodigestibilité anaérobie de digestats traités.

PARTIE I. ETAT DE L'ART

Chap. I Contexte général

La lignocellulose constituant les enveloppes des cellules végétales est le matériel le plus abondant qui existe sur la terre, elle comprend 50% de toute la biomasse terrestre avec une production annuelle estimée à 50 milliards de tonnes (Smith et al., 1988). Environ la moitié de résidus issus de la production agricole primaire et des agro-industries dans le monde est estimée inutilisée (Smith et al., 1988) Dans ces conditions, la mise en œuvre des méthodes de valorisation de ces résidus lignocelulosiques est donc indispensable pour le cycle du carbone et pour la bonne gestion de l'environnement.

Ce mémoire est une contribution à la résolution du problème posé par la gestion des résidus agricoles lignocelulosiques à l'échelle de la ferme. Subdivisé en deux parties, l'état de l'art et l'expérimentation, cette première partie s'articule autour des 4 chapitres suivants :

- Chap.2 Paroi lignocelulosique des plantes. Ce chapitre explique la structure de cette paroi qui est à l'origine des difficultés rencontrées au cours de sa biodégradation. Ensuite, il explique les mécanismes mis en jeu et les organismes qui interviennent au cours de sa biodégradation.
- Chap.3 Le white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. Dans ce chapitre est présenté le *Pycnoporus sanguineus* qui sera utilisé dans ce travail de recherche. C'est un champignon appartenant à la classe des basidiomycètes qui est efficacement utilisé dans la gestion des résidus riches en lignocellulose.
- Chap. 4 Utilisation des white-rot fungi dans la dégradation des parois lignocelulosiques. Ce chapitre donne quelques principes sur la technique d'utilisation des white-rot-fungi dans le traitement de résidus riches en lignocellulose.
- Chap. 5 Aperçu sur la digestion anaérobie. Le présent travail de recherche va coupler la digestion fongique des résidus lignocelulosiques à leur digestion anaérobie. Ce chapitre a pour objectif de donner quelques informations utiles à la compréhension du processus de la digestion anaérobie.

Chap. II Paroi lignocellulosique des plantes

II. 1 Introduction

La paroi lignocellulosique constitue la première ligne de défense des plantes contre les pathogènes. Tant que celle-ci n'est pas encore franchie les pathogènes n'ont aucune chance de causer un quelconque dommage à la plante. C'est une structure de défense dont la plante dispose déjà, au cours de son développement avant même d'être attaquée par les agents pathogène (Agrios, 1997).

La paroi se compose de trois types de polymères : la cellulose, l'hémicellulose, et la lignine qui sont fortement entremêlées et sont chimiquement attachées par des forces non covalentes et par des liaisons covalentes. La variabilité et le pourcentage de ces composants sont fonction des espèces de plantes, de leur âge, de l'étape de la croissance, et d'autres conditions (Bidlack et al., 1992).

La cellulose est un polymère linéaire constitué des sous unités de molécules de cellobioses, c'est-à-dire par des D-glucose liés entre eux par des liaisons osidiques β -1,4. Le nombre de sous unités de cellobiose constituant la cellulose varie de 4000 à 5000 en moyenne. La molécule de cellulose est linéaire (Perez et al., 2002).

L'hémicellulose est un polymère complexe d'hydrates de carbone. Polysaccharide avec un poids moléculaire plus bas que celui de la cellulose, il est constitué de D-Xylose, D-mannose, D-lactose, D-glucose, L-arabinose, des acides 4-O-methyl-glucuroniques, D-galacturoniques et D-glucuroniques. Les oses sont liés entre eux par des liaisons osidiques β -1,4 et occasionnellement β -1,3 (Perez et al., 2002).

La principale différence avec la cellulose est que l'hémicellulose comporte des ramifications avec de courtes chaînes latérales constituées de différents oses. Contrairement à la cellulose, ces polymères sont facilement hydrolysables. Ils ne forment pas d'agrégats, même co-cristallisés avec des chaînes de cellulose.

II.2 Structure et composition de la lignine

La lignine (avec la cellulose) est le polymère le plus abondant dans la nature. Elle est présente dans les parois cellulaires des plantes, constituant un support structural, conférant l'imperméabilité, la résistance contre les attaques microbiennes et le stress oxydatif. Du point de vue structural, la lignine est un hétéropolymère amorphe, insoluble dans l'eau et sans activité optique. Elle est constituée par des unités de phenylpropane jointes entre elles par différents types de liens aussi bien par des liaisons éther que carbone-carbone. Elle comprend 3 principaux constituants de base : l'alcool p-coumarique (p-hydroxyphenyl propanol), l'alcool coniferylque (guaiacyl propanol), et l'alcool synaptylique (syringyl propanol) (Jeffries, 1994).

Dans les bois tendres, l'alcool coniferylque est le principal constituant ; la lignine de bois dur est constituée des unités d'alcools guaiacyl et syringyl tandis que la lignine des herbes est plutôt constituée des unités de guaiacyl, de syringyl et de p-hydroxyphenyl.

La structure de la lignine est donnée par la figure 2.1

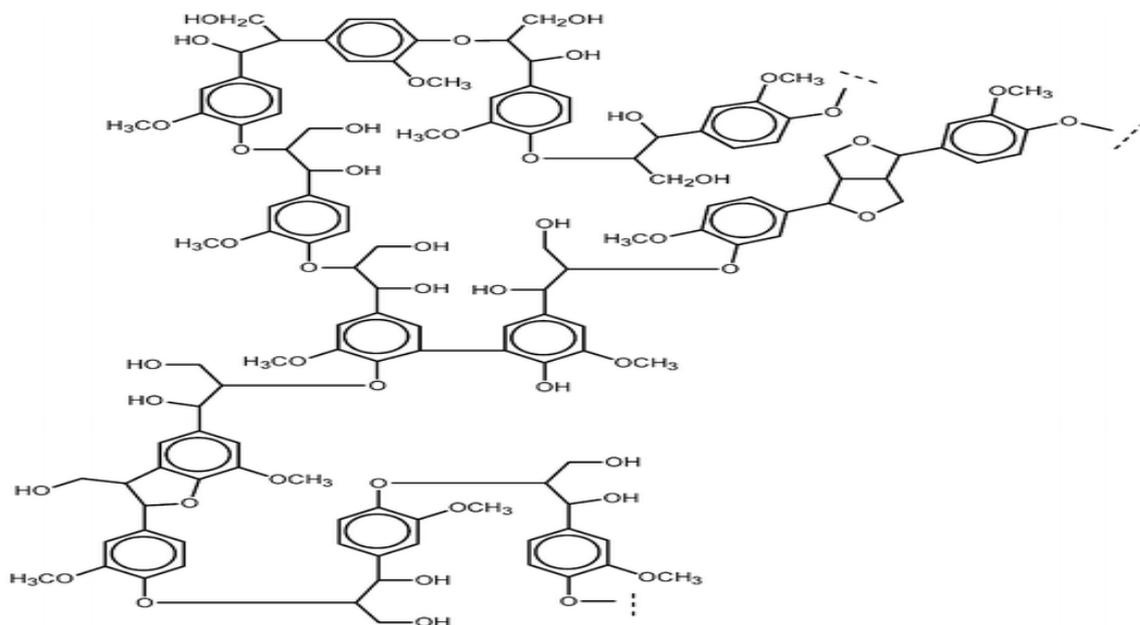


Fig. 2.1 Structure de la lignine des gymnospermes montrant les différents liens entre les unités de phenylpropane. La lignine des angiospermes est très similaire sauf que les unités de phenylpropane contiennent deux groupes methoxyls en position ortho par rapport à l'oxygène (Perez et al., 2004)

II.3 Biodégradation de la paroi lignocellulosique

Sur le plan biologique, la cellulose peut être dégradée sans beaucoup de difficultés par les eubactéries, les fungi et les protozoaires, de même que l'hémicellulose par les bactéries et les fungi. La dégradation biologique de la lignine, à cause des types de liaisons de ses constituants, n'est faisable qu'en présence de certains enzymes oxydatives trouvées chez les bactéries appelées actinomycètes, notamment au cours du compostage, et surtout chez les champignons appelés white-rot fungi ou champignons de pourriture blanche dont il sera question dans les 2 chapitres suivants (Tuomela et al., 2000; Agrios, 2005; Waldner, 1987).

La dégradation biologique de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine a attiré l'attention des microbiologistes et des biotechnologues depuis un certain nombre d'année et la diversité des substrats cellulosiques et hémicellulosiques a été à la base des difficultés rencontrées dans les études enzymatiques. Les fungi sont les organismes les mieux connus capables de dégrader ces 3 polymères. Etant donné que le substrat est insoluble, la dégradation fongique aussi bien que bactérienne doit intervenir en dehors de la cellule (extracellulaire) en contact avec la paroi lignocellulosique de la plante.

Les microorganismes possèdent deux types de système enzymatique extracellulaire : Le système hydrolytique qui produit les hydrolases et est responsable de la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose ; et un système lignolytique oxydatif et extracellulaire, ce dernier dépolymérise la lignine (Perez et al., 2002).

II.3.1 Biodégradation de la cellulose

La plupart des organismes cellulolytiques appartiennent au groupe des Eubactérie et des Fungi. Cependant il y a aussi quelques protozoaires anaérobies et les moules de boue (*Physarum leucophaeum*) qui soient capables de dégrader la cellulose. Dans les déchets riches en cellulose, les organismes cellulolytiques sont capables de créer des interactions avec les organismes non cellulolytiques. Ces interactions aboutissent à une dégradation complète de la cellulose avec une libération de gaz carbonique et de l'eau en présence de l'air ou la libération de gaz méthane, carbonique et de l'eau en anaérobiose (Béguin et Aubert 1994).

Les microorganismes capables de dégrader la cellulose produisent plusieurs types d'enzyme, avec diverses spécificités, agissant ensembles. Les cellulases hydrolysent les liaisons glucosidiques β -1,4 de la cellulose. Traditionnellement, ces enzymes sont divisés en deux classes : Les endoglucanases et les cellobiohydrolases. Les endoglucanases (endo-1,4- β -glucanases, EGs) peuvent hydrolyser les liaisons intramoléculaires (dans les régions amorphes de la cellulose préférentiellement) ce qui aboutit à de nouvelles terminaisons de la molécule. Les cellobiohydrolases (exo-1,4- β -glucanases, CBHs) exercent leur activité sur les terminaisons d'une chaîne de cellulose existant ou sur les nouvelles chaînes formées par les EGs. Toutes ces enzymes sont capables de dégrader la cellulose sous la forme amorphe, sauf certaines exceptions. Seules les CBHs sont des enzymes capables d'hydrolyser la cellulose sous la forme cristalline. Les CBHs et EGs libèrent les molécules de cellobiose. C'est ainsi qu'une hydrolyse effective de la cellulose requiert aussi la présence des β -glucosidases qui hydrolysent la cellobiose en 2 molécules de glucose. Les produits de la cellulolyse sont les sources d'énergie et de carbone pour les organismes cellulolytiques et autres organismes microscopiques vivant dans le milieu où elle se produit. Ainsi la libération des sucres assimilables partant de la cellulose est le principal moteur d'interaction existant entre micro et autres organismes vivant dans ces environnements. Les endoglucanases, exoglucanases et les β -glucosidases doivent être stables dans l'environnement extracellulaire pour fonctionner correctement, elles peuvent former un complexe ternaire avec le substrat (Perez et al., 2002).

II.3.2 Biodégradation de l'hémicellulose

L'hémicellulose est dégradée en sucres monomères et en acide acétique. Les hémicellulases sont généralement classifiées en fonction de types de substrats sur lesquels elles agissent, de types de liaisons qu'elles hydrolysent et de types de produits formés. Le xylane (polymère de β -Xylose) est le principal hydrate de carbone trouvé dans l'hémicellulose. Sa dégradation complète requiert l'action concertée d'une variété d'enzymes hydrolytiques. Une importante distinction doit être faite entre l'endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) et la 1,4- β -xylosidase (EC 3.2.1.37). La première génère des oligosaccharides à partir du clivage de xylane tandis que la seconde produit du xylose à partir des polysaccharides du xylane. La dégradation de l'hémicellulose requiert aussi des enzymes accessoires telles que la xylane estérase, les estérases feruliques et le p -coumariques, l' α -1-arabinofuranosidases, et l' α -4-O-méthyl glucuronosidases agissant pour l'hydrolyse des xylanes et des mannanes (polymère de mannose de haut poids moléculaire) du bois (Jeffries, 1994).

II.3.3 Biodégradation de la lignine par les fungi

La capacité de cataboliser la cellulose et l'hémicellulose fait partie du métabolisme primaire des fungi. Elle se déroule sous une variété de conditions environnementales avec comme conséquence que ce catabolisme n'est pas considéré comme un facteur limitant dans le cycle du carbone. La lignine, cependant, est extrêmement récalcitrante, résistante à la dégradation. Elle est minéralisée dans un processus oxydatif aérobie strict (Pointing, 2001).

La dégradation naturelle de la lignocellulose est probablement une résultante des activités métaboliques de divers fungi et bactéries. Les fungi dégradant la lignine sont divisés en 3 groupes selon le type de dégradation qu'ils causent. La dégradation connue sous le nom de « pourriture douce » du matériel lignocellulosique est généralement l'œuvre du métabolisme des Ascomycètes. Les agents responsables sont appelés les soft-rot fungi. Dans ce type de dégradation, la cellulose et l'hémicellulose sont complètement dégradées, mais la dégradation de la lignine est lente et incomplète. La pourriture brune, causée par les Basidiomycètes connue sous le nom de brown-rot fungi, entraîne une dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose tandis que la lignine est faiblement modifiée. Le principal effet de ces organismes sur la lignine est une déméthylation des groupes méthoxyl aromatiques. Ces fungi sont surtout humifères (Waldner, 1987).

La dégradation de la lignine, dans la nature, est appréciablement effectuée par les white-rot fungi, ce sont des Basidiomycètes. Il semble que les white-rot fungi secretent une ou plusieurs enzymes (ligninases) qui leur permettent de dégrader la lignine (Agrios, 2005).

La résistance de la lignine à la biodégradation est considérée comme un facteur limitant le recyclage du carbone. Parmi les microorganismes, il y a relativement peu d'espèce de fungi et de bactéries qui sont dotées d'enzymes lignolytiques. L'oxydation de la lignine ne rapporte aucun gain d'énergie nette. Ceci veut dire que la lignine n'est pas un substrat du métabolisme primaire, la lignine est plutôt dégradée durant le métabolisme secondaire de ces organismes. Ces derniers accomplissent cette dégradation dans le but d'accéder aux polysaccharides du bois emprisonnés dans les complexes lignine-hydrate de carbone. Ceci constitue une source énergétique pour les organismes ne pouvant y accéder (Pointing, 2001).

Les white-rot fungi constituent beaucoup plus un groupe physiologique que taxonomique. Ce groupe comprend ces fungi qui sont capables de dégrader intensivement la lignine d'un substrat lignocellulosique. Le nom de white-rot fungi provient de l'aspect que le bois acquiert lorsqu'il est attaqué par ces champignons. L'élimination de la lignine donne une apparence blanchie à ces bois (Pointing, 2001; Blanchette et al., 1988).

II.4 Système lignolytique des white-rot fungi

Les principales réactions catalysées par les enzymes lignolytiques peuvent être résumées en termes de dépolymérisation, démethoxylation, décarboxylation, hydroxylation et ouverture des cycles aromatiques.

Les white-rot fungi sécrètent différemment un ou plusieurs types des 3 enzymes extracellulaires qui sont essentielles pour la dégradation de la lignine, et qui se combinent avec d'autres mécanismes pour déminéraliser la lignine. Ils sont souvent appelés Enzymes Modifiant la Lignine ou LME (Lignin Modifying Enzymes). Les 3 enzymes sont : Deux peroxydases glycosilés contenant des hèmes, la lignine peroxydase (LiP, E.C. 1.11.1.14), la manganèse dépendante peroxydase (MnP, E.C. 1.11.1.13) et une phénol oxydase contenant du cuivre, la laccase (Lac, E.C. 1.10.3.2). En présence d'H₂O₂, générée de manière endogène, la LiP catalyse l'oxydation de l'alcool veratrylique, un médiateur redox de faible masse moléculaire généré de manière endogène. Cet alcool effectue alternativement une oxydation d'un électron des noyaux aromatiques non phénoliques dans la lignine pour produire des radicaux cationiques aryliques. Ces derniers se dégradent alors non enzymatiquement en composés aromatiques et aliphatiques qui sont minéralisés dans la cellule. Les radicaux générés peuvent alors accomplir toute une variété de réactions telles que : l'oxydation de l'alcool benzylique, la rupture des ponts entre carbones, l'hydroxylation, la dimérisation ou polymérisation des phénols, et la déméthylation. Le MnP catalyse une oxydation dépendant de l'H₂O₂ du Mn²⁺ au Mn³⁺ (comme oxalate de Mn³⁺ ou d'autres dicarboxylates) et ceci oxyde les composants phénoliques de la lignine. La Lac génère aussi des radicaux à partir des médiateurs redox de faible masse moléculaire et des radicaux libres d'oxygène. Le médiateur redox serait le 3-hydroxyanthranilate dans la laccase produite par le white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, bien que plusieurs médiateurs artificiels tels que le 1-hydroxybenzotriazole (HBT) et le 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6 acide sulfonique) (ABTS) sont aussi capables d'agir comme les médiateurs de la Lac (Pointing, 2001).

La production des LME intervient durant le métabolisme secondaire et est induit par le faible niveau des nutriments et plus particulièrement de l'azote, du carbone et du soufre. Cependant, il y a certaines espèces qui sont capables de produire la LiP, la MnP et la Lac sous une richesse relative en azote (Pointing, 2001).

Le système lignolytique des white-rot fungi n'est pas spécifique, il peut dégrader une large gamme de substrat. Parmi les activités accomplies figurent la transformation et la minéralisation in vitro de plusieurs types de polluants organiques ayant des structures similaires à la lignine et qui résistent à la dégradation. A ce propos, plusieurs travaux de bioremediation utilisant le système lignolytique des white-rot fungi *Pycnoporus sanguineus* et autres ont été entrepris (Trovaslet et al., 2007).

Chap. III Le white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*

III.1 Introduction

Le *Pycnoporus sanguineus* fait partie du groupe des champignons appelé white-rot fungi, c'est-à-dire, les fungi qui sont capables de s'attaquer au bois et provoquer sa pourriture complète. Jadis identifié comme un agent puissant s'attaquant aux bois des plantes mortes et vivantes (Luna et al., 2004), aujourd'hui il fait l'objet de plusieurs études notamment de valorisation des résidus agricoles riches en lignocelluloses et d'autres encore (Vikineswary et al., 2006; Trovaslet et al., 2007).

III.2 Classification phylogénique de *Pycnoporus sanguineus*

- Règne : Fungi
- Embranchement : Basidiomycota
- Sous-embranchement : Basidiomycotina
- Classe : Basidiomycètes
- Ordre : Aphyllophorales ou Polyporales
- Famille : Polyporaceae
- Genre : *Pycnoporus*
- Espèce : *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill 1904
- Souche : 7

Le genre *Pycnoporus* comprend 3 espèces : Le *Pycnoporus cinnabarinus*, *sanguineus* et *coccineus* (Nobles et al., 1962). Quelques synonymes du *P. sanguineus* : *Boletus sanguineus*, *Coriolus sanguineus*, *Fabiosporus sanguineus*, *Microsporus sanguineus*, *Trametes sanguinea*, *Polystictus sanguineus* (The species 2000 et Itis organisation, 2007).

III.3 Caractères généraux des *Pycnoporus sanguineus*

L'espèce *Pycnoporus sanguineus*, comme les 2 autres espèces du genre *Pycnoporus*, comprend des carcophores colorés de l'orange vif au rouge vif. L'hyménium est formé des pores à l'intérieur desquels on trouve les basides.

Macroscopique

Les 3 espèces du genre *Pycnoporus* présentent une coloration très vive caractéristique. Les couleurs vont de l'orange à des différentes tonalités de rouge, toujours intense. Les carpophores sont annuelles, parfois revivent. Ils croissent sur le bois, ils ont des organes sur une face, unis au substrat par une zone plus ou moins large, ils n'ont pas de stipe. Ils présentent une structure dense, glabre et brillant, épais ou fin selon les conditions. Ils portent des granules oranges qui persistent lorsqu'elles entrent en contact avec l'acide lactique mais disparaissent rapidement en contact de l'hydroxyde de potassium (Nobles et al., 1962).

Les cultures de *Pycnoporus sanguineus* montrent des secteurs blancs opaques sur lesquels se développent de granules orange vif ou encore il se produit des aires où du mycélium rose vif se développe. Les basidiospores semblent courtes et larges ou ovoïdes (Nobles al., 1962).

La figure 3.1 donne une représentation du *P sanguineus*



Fig. 3.1 *Le Pycnoporus sanguineus* (*The long term ecological research, 2001*)

Microscopique

Chez toutes les espèces du genre, il existe des basidiospores elliptiques à cylindracées, lisse et hyalines. Les dimensions varient de 4-5,2 x 2-2,6 microns. Le genre *Pycnoporus* a une structure tritémique, c'est-à-dire qu'il présente trois types d'hyphes :

- les hyphes génératrices, de 1,5-3 microns de diamètre, septées et présentant des anses d'anastomose. Elles constituent le corps du champignon et sont responsables de la croissance. Par différenciation, elles sont à l'origine des autres hyphes.
- Les hyphes squelettiques, de 2,5-6 microns de diamètre, présentent une paroi épaisse et des incrustations d'une substance rougeâtre (acide cinnabarinique et d'autres pigments dérivés). Elles donnent la rigidité aux champignons.

- Les hyphes conjonctives, ramifiés, à paroi épaisse et ayant un diamètre de 1-2 microns. Avec leur structure ramifiée, ils tiennent ensemble les hyphes génératifs (Nobles et al., 1962).

III. 4 Reproduction

Les champignons du genre *Pycnoporus* présentent une sexualité complexe avec quatre signes sexuels et trois types de compatibilité. Le processus sexuel régulé par deux gènes A et B qui contrôlent les différentes étapes de la reproduction.

- Le gène A régule l'union de noyaux et la division parallèle de ceux-ci
- Le gène B régule la migration des noyaux et la formation des anses d'anastomose.

Les gènes A et B présentent deux formes alléliques (A1 et A2, B1 et B2) ce qui représente quatre combinaisons possibles : A1B1, A1B2, A2B1 et A2B2. Pour que la fonction régulée par un gène ne soit pas bloquée lors de l'union sexuelle, les individus doivent présenter des allèles différents pour chacun de deux gènes.

III.5 Distribution écologique et hôtes

Tandis que le *Pycnoporus cinnabarinus* est un champignon des régions tempérées nord et le *Pycnoporus coccineus* des régions tempérés sud, le *Pycnoporus sanguineus* est largement distribué à travers les régions tropicales et subtropicales de l'hémisphère nord et sud. Trouvé en Guinée Conakry et équatoriale, Kenya, Argentine, Brésil, les Iles Vierges, Tanzanie, Afrique du sud, Inde, Nouvelle Guinée, Malaisie, Australie. Fréquemment champignon saprophyte, c'est-à-dire exploitant la matière organique morte ou en décomposition, se nourrit du bois mort de feuillus mais occasionnellement collecté sur les conifères. C'est un agent de la pourriture blanche, il dégrade la matière organique du bois mort en laissant seulement la composante cellulosique, qui est blanche, des arbres à feuilles caduques. Banerjee (1957) a obtenu une infection des branches saines de *shorea robusta* par des inoculations au champ et a suggéré que les champignons pouvaient attaquer les arbres vivants. C'est un champignon des régions tropicales et subtropicales d'Asie, d'Amérique, d'Afrique et de l'Océanie.

III.6 Système lignolytique de *Ps7*, son importance économique et écologique

Le *Pycnoporus sanguineus* est un champignon de pourriture blanche comme les autres champignons du genre *Pycnoporus*. En ce qui concerne son système lignolytique, le *Pycnoporus sanguineus* sécrète uniquement les laccases comme enzymes dégradant la lignine. Les laccases peuvent dépolymériser la lignine des parois lignocellulosiques des résidus agricoles et en faciliter l'hydrolyse des polysaccharides des parois cellulaires. Elles peuvent être utilisées pour délignifier les pulpes en bois, par conséquent, les laccases sont potentiellement applicables pour le blanchissement de pulpe notamment en papeterie. Elles ont aussi la capacité de détoxiquer des polluants phénoliques et sont donc utilisables dans la bioremediation des sites pollués (Trovaslet et al., 2007).

Chap. IV Utilisation des White Rot Fungi (WRF) dans la dégradation des parois lignocellulosiques

IV.1 Introduction

Les sous-produits de l'agriculture sont des résidus riches en hydrates de carbone. Ils constituent donc une source potentielle de nourriture énergétique pour les herbivores, une matière première pour la production des biocarburants et ils peuvent être utilisés comme fertilisants organiques. Cependant leur valeur nutritive, leur potentiel énergétique et fertilisant sont limités par la dégradation lente et difficile de leurs polysaccharides. Toute forme de dégradation de ces sous-produits est fortement limitée par la présence de la lignine, un constituant important de leurs enveloppes. La lignine empêche les enzymes hydrolytiques d'accéder à la cellulose et à l'hémicellulose afin de les dégrader. Il a été démontré que la digestibilité de la paroi cellulosique est inversement corrélée à la teneur en lignine (Agosin et al., 1988).

Vu l'importance quantitative de ces sous-produits agricoles, beaucoup de travaux de recherches ont été entrepris pour les rendre plus facilement biodégradable. Parmi les traitements proposés pour augmenter la biodégradabilité des déchets lignocellulosiques, la digestion fongique de ces derniers est une voie qui offre des perspectives très intéressantes. Plusieurs recherches ont confirmé la capacité des champignons dits de pourriture blanche ou white-rot fungi d'hydrolyser la lignine des pailles de céréales et, ainsi, de rendre leur cellulose et hémicellulose plus susceptibles à une saccharification enzymatique (Hattaka, 1983). D'autres recherches ont été relatives à la conversion du bois en aliments pour herbivores. Les pailles de céréales ont été utilisées avec succès pour la culture des champignons comestibles (Zadrazil, 1988).

IV.2 Mise en œuvre de la culture des white-rot fungi sur un substrat lignocellulosique

La culture des white rot fungi sur un substrat lignocellulosique, en vue d'augmenter sa biodigestibilité ou de faciliter son hydrolyse enzymatique, peut se faire en milieu solide, c'est ce qui est appelé Solid State Fermentation (SSF) ou en conditions immergées (LSF). Le SSF possède quelques avantages sur le LSF, à savoir : la faible exigence du process au point de vue du volume du réacteur de la fermentation, la faiblesse du coût de l'opération et la

possibilité de traitement en conditions non stériles. Les inconvénients sont les difficultés de contrôler l'opération, la faiblesse de la conversion et les techniques de manutention encombrantes (Weiland, 1988).

Le bon déroulement de SSF requiert un certain nombre d'éléments dont un éventuel prétraitement du substrat lignocellulosique, le choix et le criblage des espèces de white rot fungi plus appropriés pour la délignification désirée. Il est aussi important de comprendre le processus enzymatique responsable de la dégradation de la lignine (Weiland, 1988; Eder, 1988).

Le SSF est une méthode attractive pour le traitement biologique des déchets lignocellulosiques, pour améliorer leur digestibilité ou faciliter leur hydrolyse enzymatique. Les principaux facteurs limitants cette méthode sont l'approvisionnement du milieu en oxygène, l'élimination du gaz carbonique formé, les difficultés de contrôle de l'humidité et de la température. Il existe des white-rot fungi mésophiles avec un optimum de température entre 20 et 30°C. Le pH du substrat peut aussi être un facteur limitant. La littérature rapporte que les white-rot fungi se développent dans une large gamme de pH mais les pH les plus optimaux sont acides, entre 5 et 6. Toutefois, un pH un peu plus élevé n'empêche pas la croissance des white-rot fungus. (Weiland, 1988; Tuomela et al., 2000; Zadrazil, 1988).

IV.3 Schéma général de traitement d'un matériel lignocellulosique par du white-rot fungi

La mise en œuvre d'une opération d'inoculation d'un substrat lignocellulosique par les white-rot fungi à l'état solide requiert un minimum de condition pour réussir. Au point IV.2, la plupart de conditions de travail et de l'environnement auxquels ce travail est sensible ont été évoqués. Pour résumer cette opération, Weiland (1988) donne un schéma synthétique du traitement d'un matériel lignocellulosique par du white-rot fungus (figure 4.1).

En premier lieu, le substrat solide doit être haché ou découpé dans le but d'augmenter le ratio surface sur volume. Cela permettra de manipuler plus facilement le substrat et d'avoir les meilleures conditions d'une attaque microbienne. Cependant, il faudra éviter d'avoir des particules de substrats dont la taille est inférieure à 1 mm car les petites particules réduisent la porosité du substrat. Avant la stérilisation du substrat, l'eau doit lui être ajoutée jusqu'à

l'obtention de l'humidité désirée, celle-ci est essentielle pour la croissance du white-rot fungi après son inoculation. D'habitude la stérilisation se fait à 100° C pendant 3h00 ou à 120° C pendant 30 minutes. Après la stérilisation, le substrat solide doit être inoculé soit avec des spores soit avec le mycélium du white-rot fungus. Après le début de la croissance fongique, le contrôle des facteurs environnementaux (teneur en humidité du substrat, la température et le pH) est nécessaire et constitue l'un de plus difficiles tâches à accomplir au cours du Solid State Fermentation. Très souvent, l'opération de culture des white-rot fungi sur un substrat solide se réalise dans des batches. Ceci est dû à la carence de bons détecteurs et à la difficulté liée à la manipulation de grandes quantités de substrats et d'inoculum.

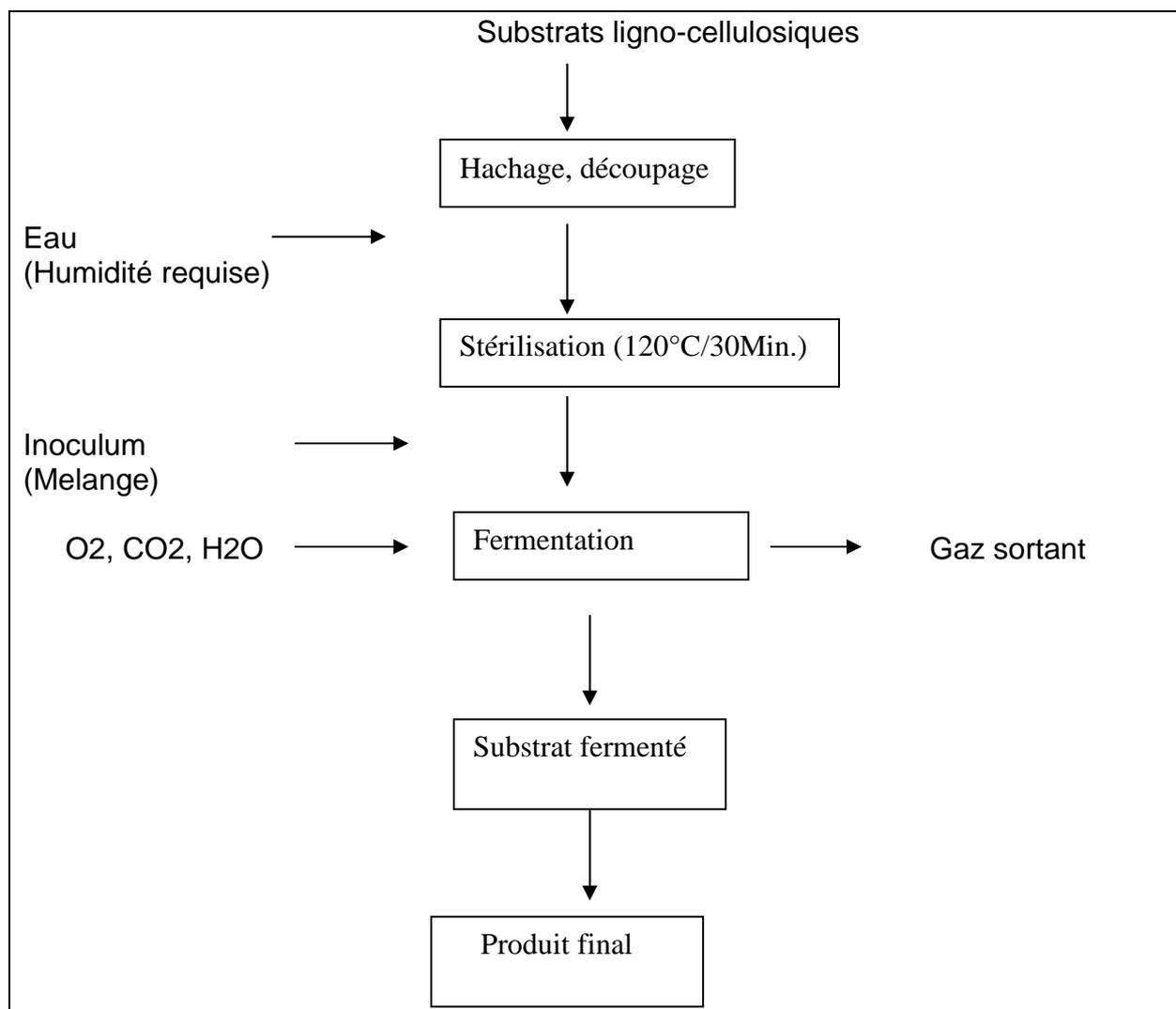


Fig 4.1 Schéma général de traitement d'un matériel lignocellulosique par du WRF (Weiland, 1988)

Chap. V Aperçu sur la digestion anaérobie

V. 1 Définitions

La digestion anaérobie peut être définie comme un processus de conversion biologique sans un accepteur d'électron extérieur comme l'oxygène dans un processus aérobie ou le nitrate ou sulfate dans un processus anoxique. Dans un processus anaérobie, le carbone organique est converti par oxydations et réductions successives vers son état le plus oxydé c'est-à-dire le gaz carbonique et vers son état le plus réduit c'est-à-dire le méthane (Angelidaki et Sanders, 2004).

Le terme biogaz désigne le mélange gazeux final d'un processus de digestion anaérobie (biométhanisation). Le biogaz est constitué de principaux gaz produits au cours du processus, ces gaz sont le gaz carbonique et le méthane. Le biogaz comprend aussi tous les autres gaz secondaires produits (moins de 1% du volume de gaz produit) et constitués de l'azote, les oxydes d'azotes, l'hydrogène, l'ammoniaque, le sulfure d'hydrogène et autres composés volatiles. Une substance est dite biodégradable si elle peut être décomposée par l'action des microorganismes. Les microorganismes utilisent cette substance comme source d'énergie et de carbone. En digestion anaérobie, la substance peut être minéralisé, c'est-à-dire convertie, en plus d'une nouvelle biomasse, en produits carbonés finaux qui sont le gaz carbonique et le méthane (Angelidaki et Sanders, 2004).

La production de méthane (CH_4) est le résultat d'une activité microbienne complexe qui se divise en quatre étapes principales : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Figure 5.1).

L'hydrolyse est cette première étape qui permet la conversion des macromolécules, constituant la matière organique, en plus petites molécules solubles. Cette étape est généralement considérée comme l'étape limitant la vitesse de la digestion anaérobie de substrats solides et macromoléculaires. C'est dans le but d'augmenter cette vitesse que la plupart des prétraitements sont utilisés, afin d'hydrolyser et de solubiliser partiellement, voire complètement, les substrats.

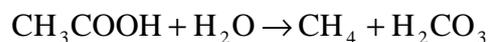
L'acidogénèse permet de fermenter ces acides aminés, ces sucres, ces acides gras, etc. en acides de faibles poids moléculaires (acide lactique, acides gras volatils tels que acétate,

propionate, butyrate...) ainsi qu'en alcools tel l'éthanol. Du bicarbonate (HCO_3^-) et de l'hydrogène sont également générés. Pour obtenir ces produits, les substrats organiques servent aussi bien de donneurs que d'accepteurs d'électrons.

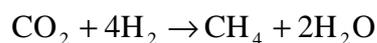
L'acétogénèse va fermenter certains produits issus de l'étape précédente, comme les acides gras volatils et les alcools, en H_2 , CO_2 et acétate. Ce sont en effet ces trois produits qui sont les précurseurs de la formation du méthane. C'est dans cette étape qu'interviennent des bactéries réductrices acétogènes et des bactéries sulfato-réductrices. En présence de soufre (présent dans certains acides aminés), de l'hydrogène sulfuré (H_2S) est aussi généré. Il faut toutefois remarquer que la transformation du propionate et du butyrate en acétate et hydrogène ne peut être réalisée que si la concentration en hydrogène dans le système reste faible ($P_{\text{H}_2} < 10^{-4}$ atm).

La méthanogénèse est la dernière phase au cours de laquelle l'acétate (CH_3COO^-), l'hydrogène et le bicarbonate sont convertis en méthane par des microorganismes méthanogènes. Les réactions sont les suivantes :

Décarboxylation de l'acide acétique :



Réduction du CO_2 :



Deux groupes de microorganismes (archéobactéries) sont impliqués dans ces réactions de production de méthane. Le premier groupe, appelé "méthanogènes acétoclastes", est responsable de la décarboxylation de l'acide acétique. Il est responsable d'environ 72% de la production de méthane. Le second groupe, appelé "méthanogènes hydrogénotrophes" utilise l'hydrogène comme donneur d'électrons et le dioxyde de carbone comme accepteur d'électrons afin de produire du méthane. Il faut que ce second groupe utilise assez rapidement l'hydrogène mis à disposition par les bactéries acétogènes afin de ne pas inhiber la dégradation des acides gras volatils.

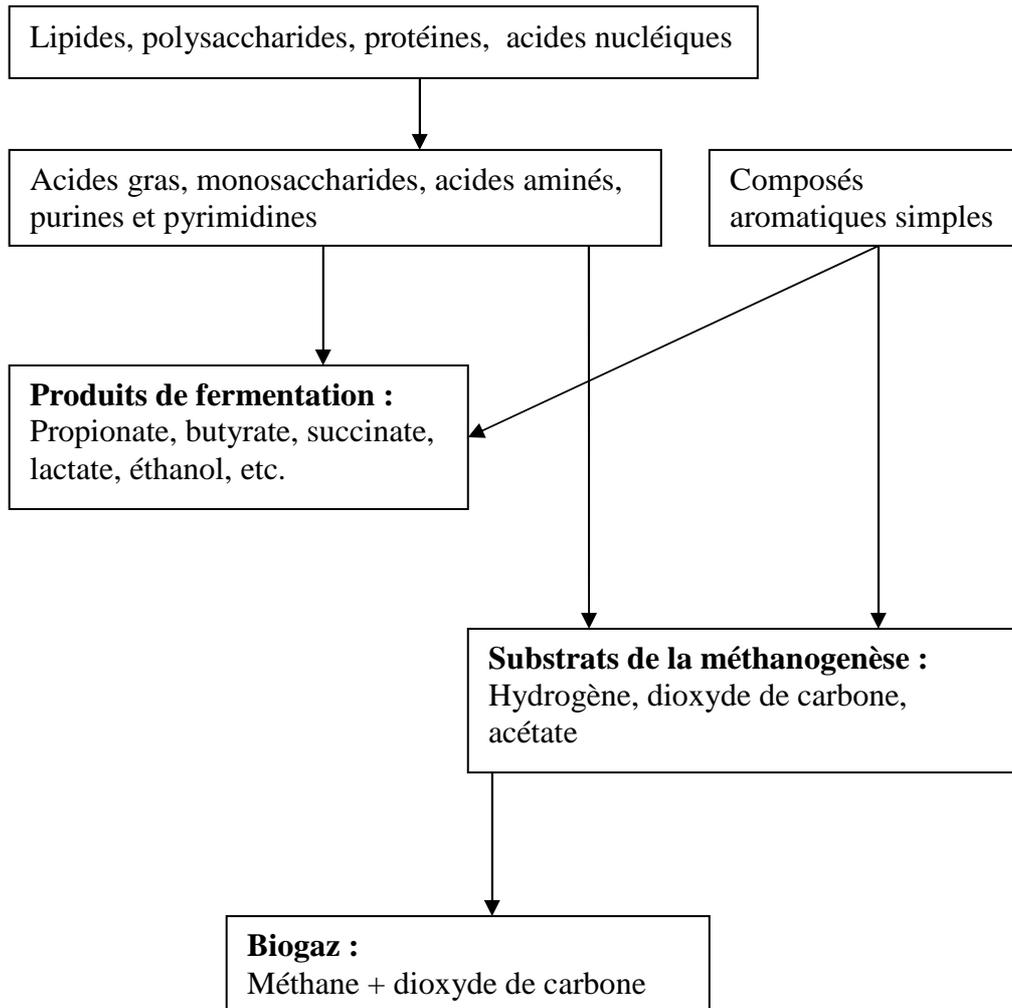


Figure 5.1 : Schéma de la digestion anaérobie (source : Tchobanoglous , 2003)

V. 2 Sources potentielles de méthane

Une large masse de biomasse est utilisable en digestion anaérobie comme source de méthane (Gunaseelan, 1997):

- La fraction organique des déchets municipaux solides,
- les boues d'épuration et effluents industriels,
- les déchets solides des fruits et légumes et leurs feuilles,
- les herbes (graminées),
- la biomasse aquatique.

V.3 Principaux facteurs dont dépend la digestion anaérobie

Il existe plusieurs facteurs physiques, chimiques, physiologiques de l'environnement qui influent sur la biodégradation des composés organiques. Ces facteurs sont la disponibilité des composés, la disponibilité des donneurs et accepteurs d'électrons, la concentration d'oxygène, la température, le pH, l'humidité, la salinité, etc. Parmi ces différents facteurs, la température est la plus importante pour le contrôle du taux de métabolisme microbien dans les environnements anaérobies. La digestion anaérobie peut être effectuée sous 3 gammes différentes de températures (Angelidaki et Sanders, 2004) :

- Digestion psychrophile : basse température (de 15 à 25°C),
- digestion mésophile : température moyenne (de 30 à 45°C),
- digestion thermophile : température élevée (de 50 à 60°C).

Aux températures élevées, la décomposition et la production de gaz sont plus rapides, mais le processus est également plus sensible aux perturbations comme la variabilité des substrats et de la température. La digestion thermophile permet une destruction plus complète des organismes pathogènes que la digestion à basse et moyenne température.

V.4 Méthodes de détermination de la biodigestibilité anaérobie

Les essais sur la biodégradabilité anaérobie sont basés sur la mesure soit de la formation d'un ou de plusieurs produits issus du métabolisme sous investigation soit sur la mesure de l'épuisement du substrat. Les méthodes basées sur la formation des produits analysent le produit final (biogaz) ou les intermédiaires tels que les acides gras volatils. La plupart de méthodes sont basées sur l'analyse de la production du biogaz. Celle-ci est mesurée soit sur le principe de l'augmentation du volume sous une pression constante (méthode volumétrique), soit sous celui de l'augmentation de la pression sous un volume constant (méthode manométrique), soit par la détermination de la formation du méthane par chromatographie gazeuse.

Dans les méthodes basées sur l'épuisement du substrat, l'épuisement du substrat peut être déterminé soit par un paramètre guide (solides volatils, demande chimique en oxygène, carbone organique dissous, etc.) soit par une analyse directe du composé utilisé comme substrat.

V.5 Dispositif expérimental de mesure de biodigestibilité

Il existe deux méthodes de mesure de biodigestibilité anaérobie des substrats communément décrites par la littérature, il s'agit de la mesure en batch (Veekens et Hamelers, 1999) et de la mesure en continu (Miron et al, 2000). Le principe de la méthode en batch est le suivant : le substrat dont la biodégradabilité va être mesurée est incubé dans des fioles ou flacons fermés à une certaine température avec une certaine quantité d'un inoculum méthanogène. Après l'incubation, le degré de dégradation du substrat est évalué à des intervalles de temps réguliers programmés à l'avance afin de déterminer le taux de la biodégradation ou de l'hydrolyse. Des contrôles dans lesquels sont incubés uniquement l'inoculum méthanogène sont ajoutés dans le test afin de déterminer la quantité de biogaz produite par la matière organique contenue dans l'inoculum.

Le principe de la méthode continue est le suivant : le substrat dont la biodégradabilité va être mesurée est incubé dans des réacteurs en tank remués en permanence. Ces réacteurs travaillent à une température spécifique et à des temps de rétention hydrauliques variés. Les analyses sont faites sur l'effluent dès le moment où les conditions stables sont établies.

La méthode d'évaluation de la biodégradabilité de substrat qui sera appliquée dans le cadre de ce mémoire est celle en batch. La méthode en continu est plus laborieuse à mettre en œuvre que les expériences en batch.

PARTIE II. EXPERIMENTATION

Chap. VI Objectif du mémoire et démarche expérimentale

L'objectif de cette étude a été d'augmenter la biodigestibilité anaérobie de résidus agricoles en mettant à profit l'activité lignolytique des white-rot fungi.

En pratique, les échantillons de digestats de maïs provenant d'une biométhanisation préalable ont été inoculés avec le white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* (*Ps7*) afin d'obtenir une hydrolyse des fibres lignocellulosiques. Une schématisation globale du procédé à étudier est donnée par la figure 6.1: le couplage d'un réacteur anaérobie avec un réacteur fongique.

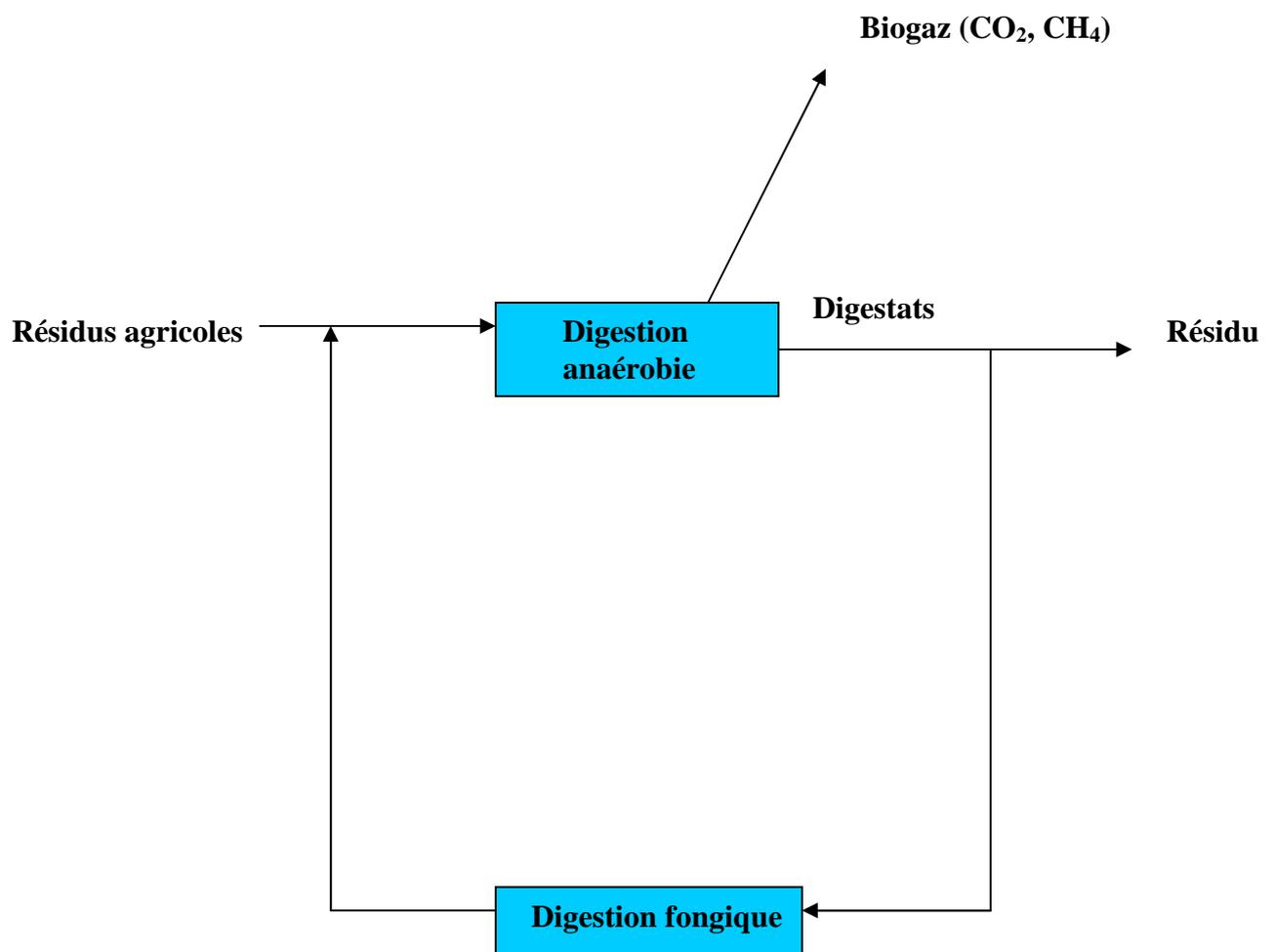


Figure 6.1 Couplage d'un réacteur anaérobie avec un réacteur fongique

Après le traitement de digestats par le Ps7, la vérification de l'amélioration de la biodigestibilité a été faite dans un réacteur batch anaérobie. Dans ce dernier, la production de biogaz a été déterminée par la mesure de la pression développée. Le principe du test de biodigestibilité est développé au point chapitre VI, point 6.4.

La première étape de l'expérimentation a donc consisté en une inoculation de digestats de maïs, contenus dans des réacteurs de digestion fongique, avec du Ps7. L'inoculation a été suivie d'une période d'incubation d'un mois. Au terme de l'incubation, les digestats traités par le Ps7 ont été soumis à un test de biodigestibilité anaérobie, dans les réacteurs batch anaérobies. Le procédé expérimental est schématisé d'une manière pratique par la figure 6.2.

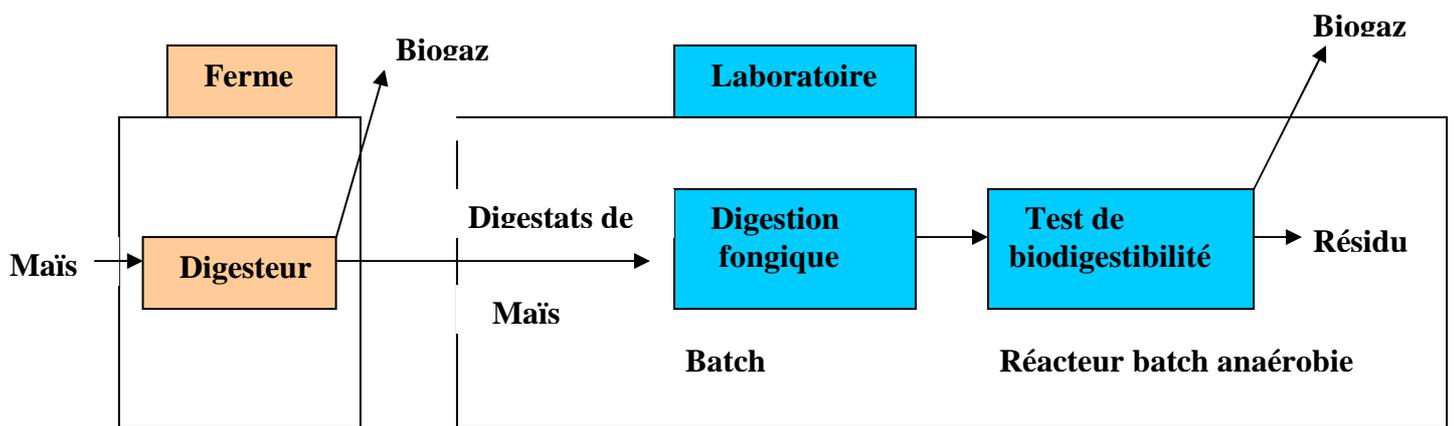


Figure 6.2 Schématisation du processus expérimental

Chap. VII Matériel et méthodes

VII.1 Matériel biologique

VII.1.1 White-rot fungi

Le white-rot fungi utilisé dans ce travail de recherche était le *Pycnoporus sanguineus* (Ps7). C'est une biomasse fongique produite par la firme Whetlands Engineering. Elle se présente sous forme de globules brunâtres, contenus dans de flacons de 60 ml en polyéthylène. Les flacons ont été d'abord surgelés à -80°C et, ensuite conservés à -20°C dans un congélateur au laboratoire. 24h avant l'utilisation du white-rot fungus, les flacons ont été retirés du congélateur et conservés dans un réfrigérateur à 4°C.

Le Ps7 a été conservé par Whetlands dans un milieu nourricier, c'est dans ce milieu qu'il a été fourni pour les analyses. La concentration de mycélium était de 1,02g/mL. Avant l'utilisation, le mycélium a été retiré du réfrigérateur et homogénéisé par une agitation manuelle vigoureuse. La teneur en matière sèche de mycélium après homogénéisation a été de 6,45%.

VII.1.2 Digestats de maïs

Les digestats de maïs utilisés dans ce travail de recherche ont été récoltés dans le post-digesteur de la ferme de l'Hosté à Wavre. Ils étaient sous la forme d'un mélange hétérogène constitué d'une fraction solide et d'une fraction liquide. Ils ont été récoltés dans un fût en polyéthylène de 30 litres. Afin de séparer la fraction solide de la fraction liquide des digestats, ils ont été égouttés sur un tamis dont les mailles carrées ont 1 centimètre de coté pendant 24h. Les digestats égouttés ont été conservés dans un seau en polyéthylène de 5 litres à 4°C dans un réfrigérateur.

VII.1.3 Boues d'épuration (substrat pour l'inoculum anaérobie)

Boue aérobie

Les détails sur l'origine et le rôle de cette boue sont donnés au point VII.4.1.1.

Boue anaérobie

Les détails sur cette boue sont donnés au point VII.4.1.1.

VII.2 Méthodes analytiques

VII.2.1 Demande chimique en oxygène

La demande chimique en oxygène (DCO) représente la quantité d'oxydant, exprimée en équivalent oxygène, nécessaire pour oxyder par voie chimique les matières réductrices présentes dans un échantillon. Cette grandeur est utilisée pour déterminer la quantité de matière organique d'un échantillon. Elle est exprimée en milligrammes d'oxygène.

Les mesures ont été réalisées grâce à un kit Merck Spectroquant n°14555 (gamme 500 – 10.000 mg O₂/L).

Le principe de la méthode est l'oxydation de l'échantillon avec une solution chaude (148°C) de dichromate de potassium, d'acide sulfurique et de sulfate d'argent. Le dosage s'effectue par une mesure photométrique de la concentration en ions Cr³⁺ de couleur verte résultant de la réaction d'oxydation.

1 mL d'échantillon a été introduit dans un tube contenant les réactifs. Les échantillons analysés dans le cadre de ces expériences ayant une DCO supérieure à 10.000 mg O₂/L, des dilutions ont été réalisées. Après une agitation vigoureuse, les tubes ont été chauffés à 148°C durant 2 heures dans un thermoréacteur de type TR3000 Merck, puis refroidis jusqu'à température ambiante. Une lecture était alors réalisée à 593 nm dans un photomètre de type SQ200 Merck.

VII.2.2 Matière sèche

La détermination de la masse sèche des échantillons de digestats et du white-rot fungi *Ps7* permet d'exprimer les résultats par rapport à un échantillon exempt d'humidité résiduelle (Buess-Hermann et al., 1997).

Les échantillons de 3g ont été pesés. Ils ont ensuite été étuvés à 105°C pendant 24h jusqu'à poids constant. Le refroidissement des échantillons a été effectué dans le dessiccateur à la sortie de l'étuve. Les échantillons secs refroidis ont été pesés.

La teneur en matière sèche de chaque échantillon est obtenue par la relation :

$$\% M .S. = \frac{P2}{P1} \times 100$$

Avec - P1 la masse de l'échantillon avant égouttage
- P2 la masse de l'échantillon sec

VII.3. Traitement de digestats de maïs

VII.3.1 Prétraitements physicochimiques de digestats de maïs

Pour favoriser la croissance et l'exercice de l'activité lignolytique du white-rot fungus *Ps7*, les digestats de maïs utilisés dans l'expérimentation ont subi quelques traitements physicochimiques en vue d'en connaître les caractéristiques et dans la mesure du possible de les modifier afin d'approcher les conditions qui seraient favorables au *Ps7*.

VII.3.1.1 Autoclavage de digestats

L'autoclavage de digestats permet l'inoculation en conditions stériles. L'avantage est que le white-rot fungi inoculé n'est pas soumis à une compétition microbienne pouvant entraver son métabolisme lignolytique. L'opération consiste en deux autoclavages séparés par une période de repos.

Les portions de 30g d'échantillon de digestats égouttés, de masse sèche connue, ont été pesées dans des ballons tarés. Les ballons (digesteurs aérobies) ont été fermés avec des bouchons en coton, ces derniers ont été protégés avec du papier aluminium (pour éviter les entrées et sorties d'eau). Les échantillons de digestats ont été autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. A la fin de l'opération, l'autoclave a été maintenu fermé jusqu'à son refroidissement à la température ambiante. Les digestats ayant refroidi à température ambiante dans l'autoclave ont été gardés en repos pendant 8h. Les digestats ont été autoclavés une seconde fois à 120°C pendant 20 minutes. Les digestats ont été gardés dans l'autoclave jusqu'à leur refroidissement à température ambiante. La masse sèche de digestats autoclavés a été déterminée.

VII.3.1.2 Lavage de digestats

La délignification relevant d'un métabolisme secondaire des WRF (Pointing, 2001), elle intervient lorsque le milieu dans lequel se développe ces organismes lignolytiques est relativement pauvre en nutriments essentiels et plus particulièrement en azote. Cette opération, consistant à diluer successivement, 3 fois ou plus, les digestats dans un poids d'eau déminéralisée triple ou plus par rapport à leur poids, entraîne un lessivage de principaux éléments nutritifs diffusibles à travers les parois cellulaires des débris de digestats de maïs.

200g de digestat ont été pesés dans un erlenmeyer de 1000 mL. Ensuite, 600 mL d'eau déminéralisée ont été ajoutées dans le digestat pesé. Le mélange a été homogénéisé et maintenu au repos pendant 15 minutes. La fraction liquide a été éliminée par drainage pendant 5 minutes sur tamis de mailles de 1 millimètre. L'opération de lavage a été reprise 2 fois de plus.

VII.3.1.3 Réglage de l'humidité de digestats lavés

Des digestats ont été ajustés à différents taux d'humidité en vue de l'observation ultérieure de la croissance et du développement du white-rot fungus dans différentes conditions d'humidité.

Les digestats lavés ont été égouttés jusqu'à 9,43% de masse sèche par drainage sur le tamis utilisé au cours du lavage pendant 1h00. Une partie de ces digestats a été séchée à l'air jusqu'à atteindre 19,45% de masse sèche par exposition, étalés à l'air dans un récipient, à 35°C dans

une chambre chaude pendant 12h. Le contrôle de l'évolution de la masse sèche a été réalisé par étuvage et pesage. Un échantillon de digestats non lavé a été séché tel que décrit précédemment pour servir de référence.

VII.3.1.4 Détermination du pH de digestats

Chaque organisme vivant possède une valeur minimale, optimale et maximale de pH de croissance qu'il importe de connaître en vue de le faire croître. La détermination du pH du substrat est importante pour déterminer si celui-ci correspond à l'intervalle de croissance de l'organisme désiré. Le pH de digestats destinés à l'inoculation du white-rot fungus Ps7 a été déterminé à l'aide d'une électrode.

5g de digestats ont été dispersés dans 100 millilitres d'eau déminéralisée. Le mélange a été agité pendant 15 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. Il a ensuite été laissé au repos pendant 20 minutes. Le pH de digestats a été mesuré en plongeant l'électrode dans le liquide surnageant.

VII.3.1.5 Acidification de digestats

Les white-rot fungi dont le Ps7 croissent dans une large gamme de pH. La plage de pH se situerait entre 4 et 7,5; avec la valeur optimale du métabolisme lignolytique autour de pH 5,5 (Weiland, 1988; Tuomela et al., 2000; Zadrazil, 1988). Dans le but de vérifier l'effet du pH du digestat sur la croissance et l'activité lignolytique de Ps7 afin de retenir le pH optimal, quelques échantillons de digestat ont subi une acidification à 3 différents pH (4, 5, 6) par l'acide phosphorique 0,2 M. selon la procédure décrite ci-dessous. Aux échantillons acidifiés ont été joints les échantillons non acidifiés (pH $7 \pm 0,5$) pour servir de référence.

Un échantillon de digestat a été pesé dans un Bécher. Il a ensuite été trempé dans un volume d'eau déminéralisée ayant le triple de son poids. La suspension de digestat dans l'eau déminéralisé contenu dans le Bêcher a été titrée par l'acide phosphorique 0,2 molaire contenu dans une burette jusqu'au pH désiré.

VII.3.1.6 Acidification de digestats lavés

Les digestats ont été lavés selon la méthode décrite au point VII.3.1.2. Ils ont ensuite été acidifiés selon la méthode décrite au point VII.3.1.5.

VII.3.1.7 Acidification digestats non lavés

Les digestats, sans être lavés, ont été directement acidifiés selon la méthode décrite au point VII.3.1.5.

VII.3.2 Traitement de digestats de maïs avec le white-rot fungus Ps7

Le principe de ce traitement a été d'incuber les digestats de maïs inoculés avec white-rot fungi *Ps7* dans un réacteur de digestion fongique, une bouteille SCHOTT Duran à col large de 250mL fermé avec un bouchon de coton, pendant un mois à 25°C. L'inoculation de digestats de maïs avec le *Ps7* a été effectuée d'abord, dans une première expérience, en conditions non stériles et ensuite, en conditions stériles. Pendant l'incubation, des observations visuelles quotidiennes des substrats incubés ont été effectuées, les modifications des caractéristiques macroscopiques de substrats ont été notées. A la fin de l'incubation, les substrats ont été pesés, leurs masses sèches ont été déterminées. Ensuite, les substrats ont été soumis à un test de biodigestibilité anaérobie.

VII.3.2.1 Inoculation de digestats de maïs avec le white-rot fungus Ps7 en conditions non stériles.

30g de digestats ont été introduits dans le réacteur de digestion fongique. Le white-rot fungus *Ps7* a été introduit par pipetage d'une suspension de ce white-rot fungus. Le volume pipeté visait à apporter, en masse sèche, 10% de mycelium par rapport à la masse sèche de digestat. La détermination de la quantité exacte de *Ps7* a été effectuée par la mesure des masses sèches respectives et par la détermination de la masse volumique du white-rot fungus. L'introduction de la quantité requise de white-rot fungus a été faite par une pipette.

Deux contrôles ont été joints au traitement décrit ci dessus. Le premier contrôle était un réacteur contenant les digestats dans lesquels il n'y a pas eu de white-rot fungus. Dans le

second contrôle, du white-rot fungus autoclavé à deux reprises à 120°C pendant 20 minutes a été introduit dans les mêmes quantités.

VII.3.2.2 Inoculation de digestats de maïs avec le white-rot fungus *Ps7* en conditions stériles.

Les digestats lavés et/ou acidifiés et autoclavés ont été inoculés avec du *Ps7* sous hotte stérile. L'inoculation s'est effectuée de la même manière qu'en conditions non stériles, c'est-à-dire par pipetage de la suspension de white-rot fungus de manière à apporter une quantité de mycélium correspondant à 10% en masse sèche du digestat.

La figure 7.1 donne une illustration du dispositif expérimental mis en place pour inoculer les digestats de maïs par du *Ps7*.

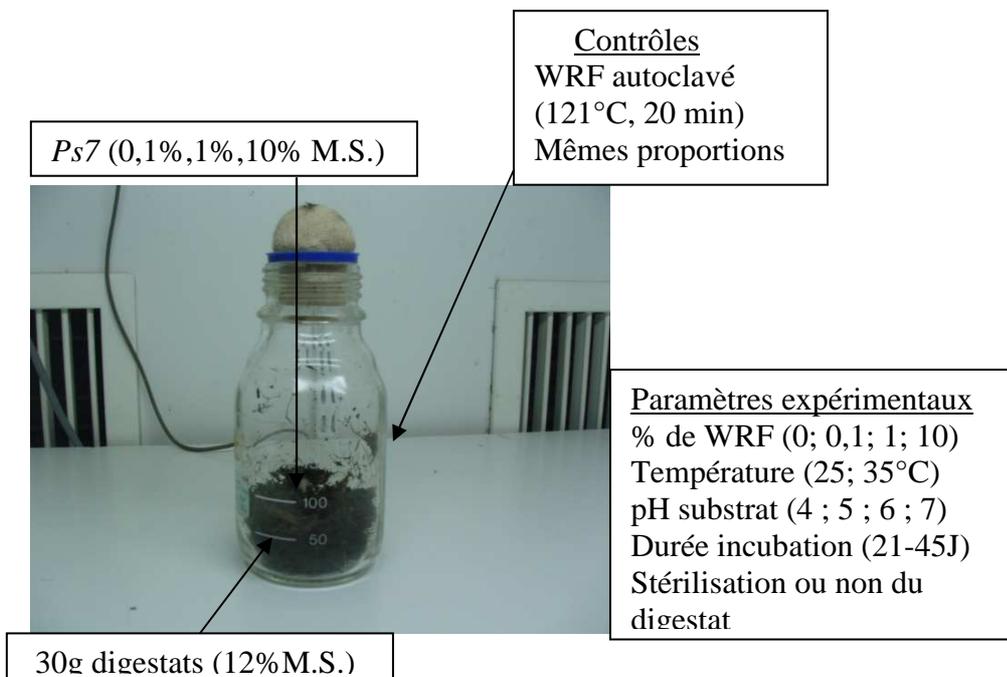


Figure 7.1 Illustration du dispositif expérimental de digestats inoculés par le *Ps7* en milieu solide

VII.4 Test de biodigestibilité anaérobie

La méthode de mesure d'amélioration de la biodigestibilité de digestats a été basée sur la comparaison des évolutions de vitesse de production du biogaz due à la digestion anaérobie de digestats traités avec celle relative à des digestats non traités. Les digestats de maïs traités ou non (substrat) ont été incubés dans un réacteur batch à 35°C sous agitation orbitale avec un inoculum méthanogène. La vitesse de dégradation du substrat a été évaluée par la vitesse de production de biogaz dans le réacteur pendant la période d'incubation. L'incubation a été poursuivie jusqu'à ce que toutes les matières rendues facilement digestibles par les traitements aient été entièrement digérées dans le réacteur batch.

Le protocole de mesure est décrit par le premier point de ce titre : tout d'abord, la préparation de l'inoculum méthanogène ; ensuite, la préparation du substrat, et enfin, l'incubation du substrat avec l'inoculum dans le réacteur batch avec mesure du biogaz produit. Le traitement des données est exposé par le second point. Une illustration du dispositif expérimental mis en place pour le test de biodigestibilité est donnée par la figure 7.2

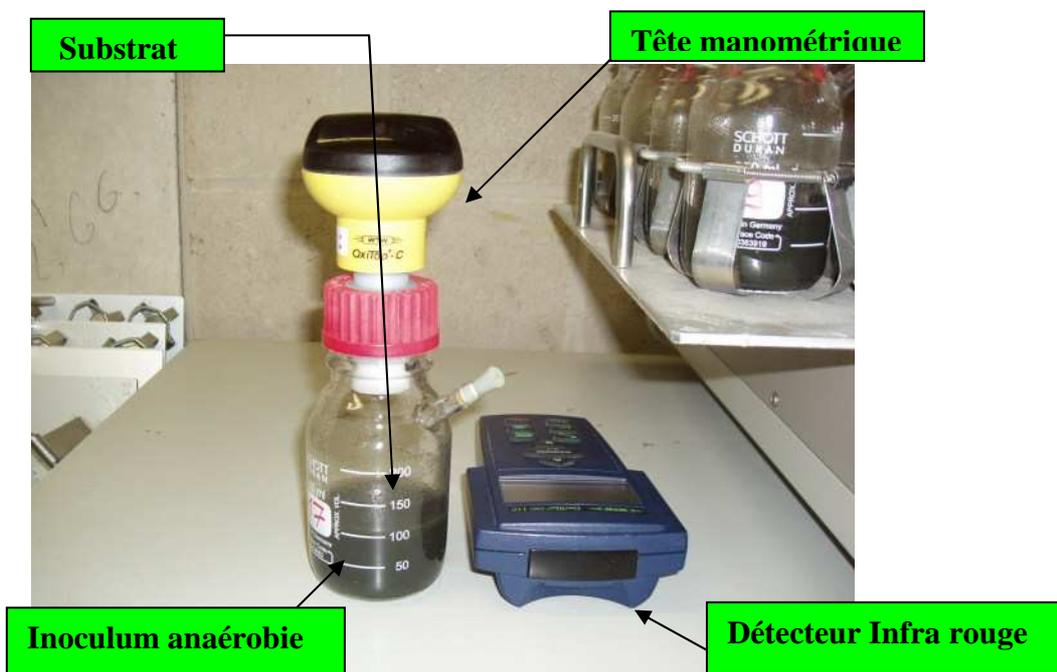


Figure 7.2 Dispositif expérimental du test de biodigestibilité

VII.4.1 Protocole d'analyse de biodigestibilité

VII.4.1.1 Préparation de l'inoculum méthanogène

L'inoculum méthanogène a été obtenu par l'incubation d'une boue activée avec un inoculum anaérobie primaire pendant 7 jours à 35°C sous agitation orbitale (120 rpm). L'incubation a été réalisée directement dans le réacteur batch dans lequel a été effectué le test de mesure de biodigestibilité, c'est-à-dire dans une bouteille SCHOTT Duran à col large de 250mL fermé par une tête manométrique du type « OxiTop Control » (firme WTW) et équipée d'une sortie latérale fermée par un bouchon en caoutchouc.

La boue aérobie fraîche a été récoltée à la station d'épuration de Basse Wavre, à la vis de recirculation après le second clarificateur. Elle a été concentrée par décantation durant une journée à 4°C à l'obscurité et élimination du surnageant. La boue a été utilisée dans les trois jours.

L'inoculum primaire anaérobie a été produit au laboratoire dans un réacteur semi-continu maintenu à 35°C et alimenté tous les 7 jours par l'ajout de 10% en volume de boue aérobie concentrée tel que décrit ci-dessus. Le volume extrait a été stocké à l'obscurité à 4°C et a été utilisé dans les 7 jours comme inoculum primaire pour les expériences.

La boue activée a été mélangée à l'inoculum primaire anaérobie dans un rapport de $1g_{DCO\text{ boue activée}}/1g_{DCO\text{ inoculum anaérobie primaire}}$. La valeur totale de la DCO de la liqueur mixte obtenue au début de l'incubation a été fixée à 12 g/L et son volume a été de 100mL. Le rapport des quantités de boue activée et inoculum anaérobie primaire a été optimisé sur base d'une minimisation de la DCO facilement digestible encore présente après 7 jours d'incubation, tout en maximisant l'activité de l'inoculum et sa capacité à métaboliser rapidement (sans phase de latence) des nouveaux substrats après 7 jours d'incubation.

Les 7 jours d'incubation dans le réacteur batch ont servi à amplifier l'inoculum primaire et à épuiser les substrats facilement digestibles présents dans la boue. Durant cette période d'incubation, des mesures de pressions ont été prises régulièrement afin de vérifier qu'il y avait bien production de gaz et que les conditions anaérobies ont été atteintes.

La pression dans les réacteurs a été relâchée avant l'introduction du substrat dans celui-ci afin de permettre le dégazage en CO₂. Ce dégazage a été réalisé pendant une heure et demie.

VII.4.1.2 Préparation du substrat

Le substrat était constitué par les digestats de maïs digérés par le white-rot fungi *Pycnoporus sanguineus* souche 7 (*Ps7*) pendant 3 semaines à 1 mois.

VII.4.1.3 Incubation du substrat et mesure de la production du biogaz

Le substrat à tester a été introduit dans le réacteur batch contenant l'inoculum méthanogène préparé selon le protocole décrit ci-dessus. Le test de biodigestibilité a alors démarré. Les mesures de pression ont été prises à intervalles réguliers jusqu'à ce que toutes les matières facilement assimilables aient été digérées, c'est-à-dire jusqu'à ce que la vitesse de production de biogaz du substrat traité ait été égale à celle du témoin, le digestat non traité.

Le volume total de la liqueur mixte contenue dans le réacteur (dont le volume utile est de 308mL) a été fixée à 180mL pour permettre une production journalière de gaz inférieure à la saturation du manomètre (350 hPa). La quantité de substrat ajoutée a été de $\frac{3}{4}$ du contenu en inoculum dans le digesteur, soit de 80 mL. Ce volume a été atteint en introduisant la quantité de substrat à tester (environ 35 mL) et en complétant avec de l'eau déminéralisée (environ 45 mL). La pression a été relâchée chaque fois que nécessaire afin de ne pas saturer le manomètre.

Afin de soustraire la production de gaz directement liée à l'inoculum méthanogène, un test de biodigestibilité de l'inoculum méthanogène a été réalisé dans les mêmes conditions avec de l'eau déminéralisée (80 mL) à la place du substrat testé.

VII.4.2 Traitement des données

VII.4.2.1 Transformation des pressions en mesures de biodigestibilité

A la fin des sept ou vingt jours de mesure selon les cas, les données de pression ont été récupérées grâce au contrôleur infrarouge et transférées sur un PC avec le programme "Achat

OC" fourni avec le système OxiTop. Les mesures de pression ont tout d'abord été traitées afin de corriger les dépressurisations causées par l'ouverture des réacteurs, ce qui a permis d'obtenir une continuité dans les courbes. Ensuite, elles ont été transformées mathématiquement en volume de gaz produit en condition normale (pression atmosphérique et Température de 20°C) par masse sèche de digestat, grâce à leur traitement sous "MS Excel".

VII.4.2.2 Correction des dépressurisations

Les digesteurs étant dépressurisés quelques fois sur toute la période de prise de mesure, il a été nécessaire de traiter les données brutes fournies par les têtes de mesures manométriques, afin d'obtenir une continuité dans l'évolution des pressions.

On est parti de l'hypothèse simplificatrice que la vitesse d'augmentation de la pression juste après la dépressurisation a été égale à celle mesurée avant cette dépressurisation. A partir de cette hypothèse, l'estimation de la valeur des deux mesures suivant la dépressurisation a été obtenue à partir de la moyenne des variations de pressions mesurées avant la dépressurisation.

Si les 3 mesures de pression réalisées avant la dépressurisation au temps t_d ont été $X_{t_{d-3}}$, $X_{t_{d-2}}$ et $X_{t_{d-1}}$, la variation moyenne de pression (ΔP) entre le temps t_{d-1} et le temps t_d (Δt) a été estimée comme suit:

$$\frac{(X_{t_{d-2}} - X_{t_{d-3}}) + (X_{t_{d-1}} - X_{t_{d-2}})}{2 \Delta t} = \frac{(X_{t_{d-1}} - X_{t_{d-3}})}{2 \Delta t} = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

Les deux premières valeurs suivant la dépressurisation ont été corrigées à partir des variations de pression observées avant la dépressurisation. Elles ont été corrigées comme suit :

$$X_{t_{d \text{ corr}}} = X_{t_{d-1}} + \frac{\Delta P}{\Delta t} \times \Delta t$$

$$X_{t_{d+1 \text{ corr}}} = X_{t_{d-1}} + \frac{\Delta P}{\Delta t} \times 2\Delta t$$

Pour corriger la valeur des mesures prises ensuite, on a procédé comme suit :

$$X_{t_{d+1 \text{ corr}}} = \underbrace{[(X_{td} - 1 + 2\Delta P) - X_{t_{d+1}}]}_{\text{Cst}} + X_{t_{d+1}} \quad \text{avec Cst} = \text{constante}$$

$$= \text{Cst} + X_{t_{d+1}}$$

La valeur de "Cst" est une constante qui a été ajoutée à toutes les mesures prises après la dépressurisation, à partir de la seconde mesure. On a obtenu donc :

$$X_{t_{d+2 \text{ corr}}} = \text{Cst} + X_{t_{d+2}}$$

$$X_{t_{d+3 \text{ corr}}} = \text{Cst} + X_{t_{d+3}}$$

⋮

$$X_{t_{d+i \text{ corr}}} = \text{Cst} + X_{t_{d+i}}$$

L'addition de la même constante a été poursuivie jusqu'à la prochaine dépressurisation, où une nouvelle constante de dépressurisation a été calculée.

VII.4.2.3 Transformation des mesures de pressions en volume de gaz produit

La continuité des mesures de pressions rétablie, il a été possible de transformer les valeurs de pression en valeurs représentatives de la biodigestibilité du substrat, c'est-à-dire en volume de gaz émis par quantité de matière sèche (mL de gaz en conditions standard/g_{MS}) pendant une période déterminée. La quantité de matière sèche considérée a été la masse sèche du digestat de maïs additionnée de Ps7 qui lui a été inoculé. L'hypothèse était que le gaz émis par le réacteur était un gaz parfait.

Ce qui a été cherché était donc :

$$\frac{V_s}{M} \quad (\text{mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MSsubstrat traité}})$$

Où :

V_s = Volume de gaz produit à pression atmosphérique et à 20°C (mL)

M = Masse sèche totale initiale du substrat obtenu par addition de la masse sèche de digestat et du Ps7 qui lui a été inoculé.

La valeur de V_S a été trouvée grâce à la loi des gaz parfaits :

$$V_S = \frac{nRT_S}{P_S} \quad (\text{m}^3)$$

où :

n = nombre de moles de gaz produites (mol)

R = constante des gaz parfaits

$$= 8,3145 \frac{\text{J}}{\text{mol.K}}$$

T = Température du gaz à 20°C

$$= 293,15 \text{ K}$$

P = Pression du gaz à l'état standard

$$= 101325 \text{ Pa}$$

La valeur de n a été calculée à partir de la loi des gaz parfaits :

$$n = \frac{P_e V_e}{RT_e} \quad (\text{mol})$$

où :

P_e = Pression mesurée par la tête de mesure dans les conditions expérimentales (Pa),
préalablement corrigée

V_e = Volume de gaz présent dans le réacteur

$$= 308 \text{ mL (volume réacteur)} - 180 \text{ ml (volume liquide)} = 128 \text{ ml}$$

$$= 117 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$$

R = constante des gaz parfaits

$$= 8,3145 \frac{\text{J}}{\text{mol.K}}$$

T = Température du gaz dans les conditions expérimentales

$$= 308,15 \text{ K (35°C)}$$

L'équation qui a permis de trouver V_S a été donc la suivante :

$$V_S = \frac{P_e V_e}{RT_e} \times \frac{RT_S}{P_S} \times 10^6 \quad (\text{ml})$$

La valeur de M se trouve comme ceci :

$$M = (\%MS_1 \times M_1) + (\%MS_2 \times M_2) \quad (\text{g}_{MS})$$

où :

$\%MS_1, M_1$ = La teneur en matière sèche et la masse humide de l'échantillon de digestats

$\%MS_2, M_2$ = La teneur en matière sèche et la masse humide du Ps7 inoculé dans les digestats.

On a obtenu donc comme équation générale :

$$\frac{V_s}{M} = \frac{\frac{P_e V_e T_s}{T_e P_s} \times 10^6}{(\%MS_1 \times M_1) + (\%MS_2 \times M_2)} \quad (\text{mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{MS\text{substrat traité}})$$

Chap. VIII Résultats et interprétation des résultats

Cette étude avait pour objectif d'augmenter la biodigestibilité anaérobie de résidus agricoles riches en lignine en mettant à profit l'activité lignolytique des white-rot fungi. Pour cela, les échantillons de digestat de maïs provenant d'une biométhanisation préalable ont été inoculés avec le white-rot fungi *Pycnoporus sanguineus* (*Ps7*) afin d'obtenir une hydrolyse des fibres lignocellulosiques. Dans ce chapitre, les résultats des 4 essais sont présentés. Les 4 essais avaient pour objectif d'étudier les conditions expérimentales et les traitements à appliquer favorisant le développement du white-rot fungus *Ps7* sur les digestats de maïs. D'expérience en expérience, ces conditions avaient pu être affinées.

Les conditions testées dans les expériences étaient les paramètres susceptibles d'influer sur la croissance du *Ps7* dans les digestats. Le premier essai avait pour principal objectif de mettre au point un protocole d'incubation de digestats de maïs avec le white-rot fungi *Ps7*. La masse minimale de digestat à utiliser comme unité expérimentale, 3 proportions d'inoculation du white-rot fungus *Ps7* et la température d'incubation du substrat ont été testées. Dans la deuxième expérience, un premier autoclavage de digestats avant son inoculation par le *Ps7* a été expérimenté. C'est pendant la troisième expérience que les digestats de maïs ont subi un lavage et un double autoclavage avant leur inoculation et enfin, c'est dans la quatrième expérience qu'en plus de toutes les conditions déjà testées dans les 3 premières expériences, est intervenu le test de l'acidification de digestats.

En ce qui concerne l'application du test de biodigestibilité, il a fait l'objet d'une mise au point à partir de la première expérience. Par la suite, dans l'expérience 3 et 4, il a été appliqué comme tel.

VIII.1 Inoculation du white-rot fungus Ps7 sur digestats non stériles

VIII.1.1 Mise au point du protocole de l'incubation de digestats de maïs avec le White-rot fungus Ps7

Pour mettre au point un protocole d'incubation de digestats de maïs avec le white-rot fungus Ps7, la première expérience a été réalisée en conditions non stériles. Les quantités de white-rot fungus à inoculer dans une quantité de digestat considérée comme unité expérimentale et la température d'incubation ont été testées.

VIII.1.1.1 Conditions expérimentales de la première expérience d'incubation de digestats avec le Ps7

Dans un premier temps, une masse minimale de 30g de digestats de maïs a été testée. Les digestats n'ont subi aucun traitement particulier. 3 proportions différentes en masse sèche de Ps7 ont été testées : 0,1%, 1% et 10% par rapport à la masse sèche de digestat. En plus des échantillons inoculés avec du Ps7 vivant, pour chaque proportion, un échantillon contrôle a reçu une inoculation du Ps7 autoclavé. Il y avait aussi un échantillon contrôle n'ayant reçu aucune inoculation de Ps7. La teneur en matière sèche de digestats était de 13,19%, celle de Ps7 était de 6,45%. Tous les batch ont été fermés avec de bouchons en coton pour limiter le dessèchement du substrat par évaporation. La température d'incubation était de 25°C et la durée d'incubation de 28 jours.

Le Tableau 8.1 donne le plan expérimental de l'inoculation du Ps7 dans les digestats de maïs stérilisés.

Tableau 8.1 Inoculation du Ps7 dans les digestats non stériles

Contenu du réacteur (digestat+WRF)	Proportion de WRF (%)					
	10		1		0,1	
	Test	Contrôle	Test	Contrôle	Test	Contrôle
Digestat solide (g _{MF})	30	30	30	30	30	30
White-rot fungus vivant (g _{MF})	6,13	0	0,63	0	0,06	0
White-rot fungus autoclave (g _{MF})	0	6,13	0	0,63	0	0,06

VIII.1.1.2 Résultats des observations visuelles du substrat non stérile et discussion

Les échantillons de digestat inoculés avec du *Ps7* en conditions non stériles et incubés en milieu solide pendant 28 jours ont été suivis visuellement durant toute la période de l'incubation, en vue d'apprécier les caractéristiques macroscopiques des mycéliums formés.

L'observation visuelle a été suivie, à la fin de l'incubation, par une mise au point du test de biodigestibilité anaérobie.

Résultats

Les observations visuelles effectuées, de manière quotidienne pendant 28 jours, sur les substrats incubés à 25°C ont révélé, à partir du 2^o jour, le développement des filaments blanchâtres dont une illustration est donnée par la figure 8.1. Ce développement est apparu dans tous les échantillons de digestats incubés dans les réacteurs de digestion fongique, c'est-à-dire, ceux inoculés avec le *Ps7* à 0,1%, à 1% et à 10% ; dans leurs contrôles respectifs inoculés avec le *Ps7* autoclavés et dans le contrôle sans *Ps7*. La figure 8.1 illustre ces filaments observés dans le réacteur contenant les digestats inoculés avec 1% de *Ps7*.



Figure 8.1 Développement de moisissure blanchâtre dans les digestats de maïs inoculés de 1% de *Ps7*.

Discussion

Les filaments observés ne correspondent pas à la description que la littérature donne du white-rot fungus *Ps7* (voir au chapitre II, la figure 2.1). En effet selon la littérature le *Ps7* est formé des carcophores colorés de l'orange vif au rouge vif. Aucun batch incubé de cette expérience n'a donné un développement similaire à la description du *Ps7* telle que cela est faite au chapitre II. L'organisme observé forme des développements filamenteux très peu denses et de coloration blanchâtre. Ceci laisse supposer qu'il s'agit d'une moisissure de "contamination". Cette supposition est appuyée par le fait que ce développement se retrouve aussi dans les 2 échantillons contrôles, c'est-à-dire, les digestats qui ont été inoculés de *Ps7* autoclavé et ceux qui ont été incubés sans être inoculés de *Ps7*.

Lors de la mise en œuvre de l'expérience, les digestats n'ont pas été stérilisés avant d'être inoculés avec le *Ps7*. La source de cette "contamination" peut être soit le milieu ambiant où l'inoculation a eu lieu, c'est-à-dire l'atmosphère du laboratoire, soit l'organisme était déjà présent dans les digestats avant l'inoculation. Cet organisme serait donc endogène aux digestats utilisés. Le développement de cet organisme semble inhiber la croissance du white-rot fungi inoculé dans les digestats.

Dans la perspective de poursuivre l'expérimentation, l'autoclavage de digestats avant leur inoculation avec le *Ps7* a été jugé nécessaire pour éliminer la contamination observée. Il faut toutefois noter que par rapport à l'objectif de ce travail, l'autoclavage des substrats lignocellulosiques n'est pas praticable aussi bien à l'échelle de la ferme qu'à l'échelle industrielle. Cependant, il permettrait de se familiariser avec le white-rot fungus en étude et, par la suite, cela permettrait d'affiner les conditions permettant son développement sans autoclavage.

VIII.1.2 Mise au point du protocole du test de biodigestibilité anaérobie de digestats inoculés avec du white-rot fungi *Ps7* en conditions non stériles.

Le test de biodigestibilité anaérobie de digestats de maïs inoculés avec le white-rot fungus *Ps7* a pour objectif de mesurer l'amélioration de la biodigestibilité de ces digestats provoquée par le métabolisme lignolytique du white-rot fungus qui s'y est développé. Ce test intervient juste à la fin de la période d'incubation.

Comme cela a été développé au point VI.4, le test de biodigestibilité requiert, en plus du substrat dont la biodigestibilité va être mesurée, un inoculum méthanogène appelé inoculum secondaire. La mise au point de l'inoculum méthanogène a fait partie d'une expérience antérieure à cette recherche. Le test de biodigestibilité appliqué à cette première expérience avait pour objectif de vérifier si la sensibilité de mesure du test était bonne. Il faut que le test soit capable de mesurer le gain de biodigestibilité acquis par les digestats dans lesquels le white-rot fungus se serait développé par rapport aux contrôles où le développement ne se serait pas effectué.

Les observations sur la biodigestibilité des substrats ont été faites sur les productions de biogaz desquelles a été soustraite la production liée à l'inoculum. La sensibilité de mesure du test de biodigestibilité est bonne lorsque la production du biogaz liée directement à l'inoculum est moins importante que la production due aux substrats. Cela doit être vérifié à partir des courbes de production de biogaz par l'inoculum et par les substrats. Si l'inoculum seul produit une quantité de biogaz aussi importante que celle qui est produite par les substrats, il faut alors adapter le protocole et diminuer la quantité de l'inoculum méthanogène.

VIII.1.2.1 Conditions expérimentales du test de biodigestibilité de digestats inoculés de Ps7 en conditions non stériles

100 ml d'inoculum méthanogène obtenu par l'incubation d'une boue activée avec un inoculum anaérobie primaire pendant 7 jours à 35°C sous agitation orbitale (120 rpm) ont été préparés dans le réacteur batch dans lequel devrait être effectué le test de mesure de biodigestibilité. Les substrats, c'est à dire les digestats inoculés avec le white-rot fungus Ps7 dans les digesteurs fongiques et incubés pendant 28 jours, ont été mélangés avec de l'eau déminéralisée jusqu'à un volume de 80 ml. Chaque mélange a été transvasé dans le réacteur batch anaérobie dans lequel se trouvait l'inoculum méthanogène. Le réacteur batch anaérobie a été fermé par une tête manométrique du type « OxiTop Control » (firme WTW) et était équipée d'une sortie latérale fermée par un bouchon en caoutchouc. Le test de biodigestibilité a alors été démarré. Les mesures de pression ont été prises à intervalles réguliers de 28 minutes jusqu'à ce que toutes les matières facilement assimilables aient été digérées, c'est-à-dire jusqu'à ce que la vitesse de production de biogaz du substrat traité soit égale à celle du témoin, les digestats non traités.

VIII.1.2.2 Résultats du test de biodigestibilité et discussion

Les valeurs de pressions obtenues au cours du test de biodigestibilité anaérobie du substrat issu de la croissance du *Ps7* en substrat non stérile ont été transformées en volume de biogaz produit. Cette transformation a permis d'obtenir la courbe de production de gaz par la liqueur mixte (fig. 8.2). En abscisse se trouve le temps de production (en jours) et en ordonnées le volume de biogaz produit par les digestats biodégradables et les organismes qui s'y sont développés (en mL de biogaz).

La quantité de biogaz produite par le réacteur batch anaérobie contenant l'inoculum méthanogène (contrôle eau) est 16 mL_{biogaz} en 4,5 jours, c'est la plus faible production. La plus grande quantité est produite par les digestats inoculés avec 10% de *Ps7* vivant (60 mL_{biogaz} après 2,5 jours). La production de biogaz par le contrôle 10% WRF a rencontré un problème de mise au point et n'a pu être enregistrée.

L'examen de la courbe révèle que la quantité de biogaz due à l'inoculum méthanogène seul est plus faible que celle produite par l'inoculum méthanogène qui a été mélangé avec le substrat. Étant donné qu'il n'a pas eu croissance manifeste de *Ps7* dans les digestats, la différence de production entre substrats peut être attribuée à la contribution de la matière sèche de l'inoculum et de la moisissure contaminatrice. Pour la suite de l'expérimentation, c'est ce protocole du test de biodigestibilité anaérobie qui a été appliqué pour la mesure de la biodigestibilité anaérobie de digestats inoculés avec du *Ps7*.

Vu le développement d'une moisissure dans les digestats, une proposition de travail pour l'expérience suivante est de réaliser une stérilisation de digestats par autoclavage avant leur inoculation avec le white-rot fungi *Ps7*.

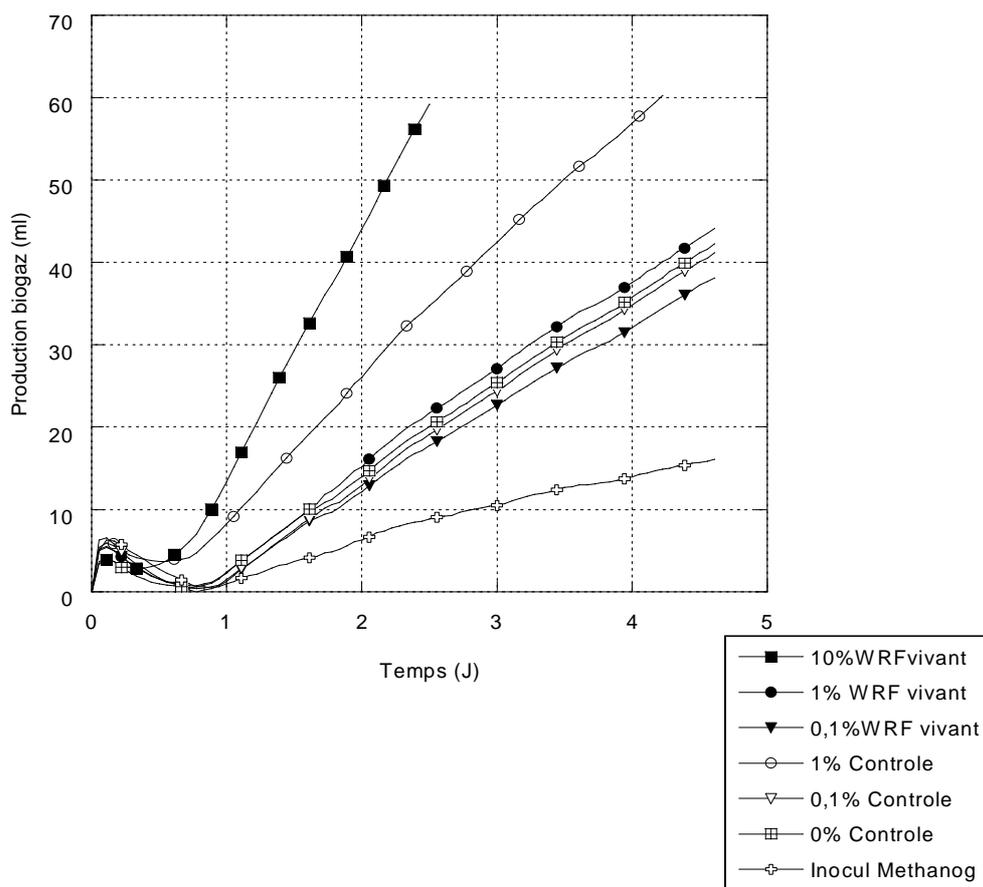


Figure 8.2 Production de biogaz par la liqueur mixte de substrats inoculés en conditions non stériles

VIII.2 Inoculation du white-rot fungus *Ps7* sur digestats stérilisés

VIII.2.1 Conditions expérimentales de la deuxième expérience

Les digestats de maïs ont été autoclavés suite à la grande concurrence que le *Ps7* a rencontrée du fait de développement de la moisissure au cours de la première expérience. Le protocole expérimental était identique à celui de la première expérience sauf que l'autoclavage de digestat de maïs devait mettre le WRF dans des conditions où il ne subirait pas une importante compétition d'autres moisissures et d'autres micro-organismes habituellement présents dans ce genre d'environnement. Des échantillons non autoclavés ont été ajoutés à l'expérience comme contrôles.

En résumé les conditions expérimentales étaient les suivantes.

30g_{MF} de digestats ont été pesés dans les réacteurs de digestion fongique prévus pour l'incubation et ont été autoclavés. Le nombre total d'échantillon était de 10 dont 7 ont été autoclavés. Il n'y a eu aucune répétition. Dans les digestats autoclavés, 3 proportions différentes en masse sèche de *Ps7* ont été testées : 0,1%, 1% et 10% par rapport à la masse sèche de digestat. En plus des échantillons inoculés avec le *Ps7* vivant, pour chaque proportion, un échantillon contrôle autoclavé a reçu une inoculation avec du *Ps7* autoclavé. Il y avait aussi un échantillon contrôle autoclavé n'ayant reçu aucune inoculation avec du *Ps7*. Un échantillon de digestats non autoclavés a été inoculé avec 10 % de *Ps7* et un autre a reçu 10% de *Ps7* autoclavé. Le dernier échantillon de digestats non autoclavé n'a pas été inoculé de white-rot fungus. La température d'incubation était de 25°C et sa durée de 28 jours. Le Tableau 8.2 donne le plan expérimental de l'inoculation du *Ps7* dans les digestats de maïs stérilisés par simple autoclavage.

Tableau 8.2 Inoculation du *Ps7* dans les digestats stérilisés par simple autoclavage

Contenu du réacteur (digestat+WRF)	Proportion de WRF (%)							
	10				1		0,1	
	Test	Contrôle	Test	Contrôle	Test	Contrôle	Test	Contrôle
Digestat solide autoclavé (g _{MF})	30	30			30	30	30	30
Digestat solide non autoclavé (g _{MF})			30	30				
White-rot fungus vivant (g _{MF})	6,13		6,13		0,63		0,06	
White-rot fungus autoclave (g _{MF})		6,13		6,13		0,63		0,06

VIII.2.2 Résultats des observations visuelles du substrat stérilisé par simple autoclavage

Les échantillons de digestats de maïs stérilisés et non stérilisés, inoculés avec le white-rot fungus *Ps7*, ont été soumis à une observation visuelle quotidienne afin de déceler les modifications macroscopiques éventuelles qui seraient dues à la croissance du champignon sur les digestats. Les résultats observés ont été résumés de manière hebdomadaire.

Résultats

Dès la première semaine de l'incubation, il s'est développé dans une partie des échantillons la contamination blanchâtre similaire à celle qui était observée dans la première expérience. A la quatrième semaine, la contamination a été présente dans tous les échantillons autoclavés et non autoclavés, inoculés et non inoculés. Certains échantillons autoclavés ont subi un dessèchement important, il s'agit de digestats autoclavés et inoculés avec 10% de *Ps7*, avec 0,1% de *Ps7* et du contrôle autoclavé et inoculé avec 1% de *Ps7* autoclavé. Jusqu'à la 3^e semaine, il n'y avait aucun signe visuel de développement dans ces derniers. Le développement de la moisissure similaire à celui des autres échantillons n'a été observé qu'après que ces digestats aient été humidifiés par ajout de 5 ml d'eau distillée.

Discussion

Le développement blanchâtre observé ne présente pas les caractéristiques macroscopiques du white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. Ces caractéristiques sont décrites au chapitre IV. Vu ce développement malgré l'autoclavage, une première hypothèse serait que l'autoclavage n'a pas suffi pour supprimer les possibilités de développement endogène. Par exemple l'autoclavage ne parviendrait qu'à détruire les formes végétatives de l'organisme contaminant tandis que les formes sporulées (résistantes à la stérilisation) seraient restées inaltérées. La germination de ces spores se serait alors produite après l'inoculation avec du *Ps7*. Une seconde hypothèse serait que la contamination viendrait de l'air ambiant étant donné que l'inoculation de digestats avec le white-rot fungus n'a pas été effectuée sous hotte stérile. Ces hypothèses ont conduit à commencer une nouvelle expérience dans laquelle les digestats de maïs subiraient un double autoclavage avant d'être inoculés avec le white-rot fungus *Ps7*. Les deux autoclavages de digestats devant être séparés d'un temps de repos d'au moins 5 heures afin de permettre aux éventuelles spores du contaminant de germer et de pouvoir ensuite être supprimées par le deuxième autoclavage. L'inoculation avec le *Ps7* devrait aussi être faite sous une hotte stérile avec du matériel stérile.

Le dessèchement d'un certain nombre d'échantillon, phénomène non observé au cours de la première expérience, serait probablement dû à la sortie rapide des échantillons de digestats hors de l'autoclave, avant leur refroidissement. Ce phénomène aurait probablement pour origine le déséquilibre de pression de vapeur entre l'air ambiant et le réacteur venant de

l'autoclave suite à leur mise en contact direct avant le refroidissement du réacteur. Ceci a suggéré qu'au cours de l'expérience suivante d'inoculation de digestats de maïs avec le *Ps7*, les digestats devraient rester dans l'autoclave hermétiquement fermé jusqu'à leur refroidissement complet. Ceci devrait éviter leur dessèchement par évaporation de l'humidité.

Après deux essais d'inoculation de digestats de maïs avec le white-rot fungi *Ps7*, il n'y a pas eu de développement d'organisme comparable au *Pycnoporus sanguineus* tel que la littérature l'a décrit. Ce résultat, sous la lumière de la littérature scientifique, a conduit à analyser les exigences culturales du white rot-fungi *Pycnoporus sanguineus* et, sur base de ces exigences, appliquer certains traitements physicochimiques aux digestats de maïs dans le but de les rendre plus propices au développement de *Ps7*.

En ce qui concerne la température d'incubation, le *Pycnoporus sanguineus* est une espèce de champignon tropicale (Nobles al., 1962). Les températures moyennes des régions tropicales oscillent entre 20 et 30°C. Dans la plupart de travaux de recherche où le substrat a été inoculé avec le *Pycnoporus sanguineus*, c'est dans cet intervalle de température que l'incubation de ces substrats a été réalisé (Vanhulle et al., 2007; Trovaslet et al., 2007). Pour cette raison, la température d'incubation a été maintenue à 25°C.

Du point de vue de l'humidité du digestat dans lesquels le white-rot fungus a été inoculé par la suite, Weiland (1988) stipule que l'humidité du substrat lignocellulosique dans lequel sera inoculé le white-rot fungus doit être située à un minimum de 12% et la valeur optimale, d'une manière générale, est de 60 à 80% d'humidité. Pour la suite des expériences, un test d'inoculation a été réalisé sur les digestats ayant un taux d'humidité d'environ 88% et un autre test sur de digestats d'environ 80% d'humidité.

Au cours de 2 premières expériences, en observant les échantillons de digestats inoculés avec le *Ps7* et incubés, le constat suivant est fait : la moisissure non désirée s'est développée aussi bien dans les échantillons de digestats inoculés avec le *Ps7* vivant que dans les contrôles ayant reçu le *Ps7* autoclavé et dans les contrôles n'ayant reçu aucune inoculation. Ceci semble indiquer qu'une bonne proportion de substances directement assimilables est encore contenue dans les digestats de maïs utilisés pour l'expérimentation. Ces substances assimilables peuvent permettre le développement de bactéries, de moisissures, de protozoaires, etc. Or la dégradation de la lignine relève d'un métabolisme secondaire des white-rot fungi, ces derniers

croissent dans un milieu relativement pauvre en éléments nutritifs (Pointing, 2001; Waldner, 1987), c'est la raison pour laquelle, dans la suite de l'expérience, une partie du digestat a été lavé, c'est-à-dire lessivé dans l'eau déminéralisée dans un rapport de 1/27° soit par 3 dilutions successives dans un volume d'eau représentant chacun 3 fois sa masse.

VIII.3 Inoculation de digestats lavés et stérilisés avec du white-rot fungus *Ps7*

L'expérience suivante a d'abord servi à tester les différents paramètres physicochimiques susceptibles de favoriser le développement du white-rot fungi *Ps7* qui ont été débattu dans la discussion. Au cours de cette expérience, la proportion de white-rot fungi à inoculer dans les digestats de maïs a été fixée à 10%. Ceci a été un choix et non le résultat des observations, la quantité optimale du white-rot fungi à inoculer dans les digestats pourra être testée au cours d'une expérience ultérieure.

VIII.3.1 Conditions expérimentales de la troisième expérience

Dans cette troisième expérience, les digestats de maïs ont subi quelques traitements physicochimiques avant d'être inoculés avec le white-rot fungus *Ps7*:

1. Les digestats ont été lavés, égouttés pendant 1h30 et séchés d'un taux de matière sèche de 9,33% à un taux de matière sèche de 12,03 par exposition dans une chambre chaude de 35°C pendant 5h;
2. Les digestats ont été lavés, égouttés et séchés par exposition pendant 10h30 dans la chambre chaude jusqu'à un taux de matière sèche de 19,01% ;
3. Les digestats solides non lavés ont été séchés par exposition dans la chambre chaude pendant 10h30 jusqu'à un taux de matière sèche de 20,45%.
4. Un dernier échantillon de digestats solide n'a subi aucun de traitements décrits ci-dessus. Son taux de matière sèche était de 13,19%.

L'objectif visé par le lavage de digestats a été d'éliminer tous les éléments nutritifs disponibles présents dans les digestats. Cette élimination des éléments nutritifs devrait permettre de limiter la croissance des micro-organismes indésirables. Elle devrait aussi favoriser le déclenchement du métabolisme secondaire du white-rot fungus *Ps7* à cause de la pauvreté relative du milieu en éléments nutritifs.

30g de digestats de chaque type ont été pesés dans les réacteurs de digestion prévus pour l'incubation et ont été autoclavés. Tous les échantillons ont été autoclavés à deux reprises, les 2 autoclavages ont été séparés par une période de repos de 8h. Le nombre total d'échantillon a été de 12. Les échantillons de digestats autoclavés de chaque type ont été inoculés avec le white-rot fungus *Ps7* sous une hotte stérile. La proportion de *Ps7* (en masse sèche) a été de 10% par rapport à la masse sèche de digestat dans lesquels il a été inoculé. Pour chaque traitement, un contrôle a été prévu. Le contrôle n'a reçu aucune inoculation avec le white-rot fungus. Une répétition a été prévue pour chaque traitement et pour chaque contrôle. Le tableau 8.3 donne le plan expérimental de l'expérience.

Tableau 8.3 Conditions opératoires de l'inoculation du white-rot fungus *Ps7* sur digestats de maïs stérilisés lavés et non lavés.

Contenu du réacteur (digestat+WRF)	Proportion de WRF (%)				
	10				0
Digestats lavés 12% ms (g _{MF})	30				
Contrôle de digestats lavés 12% ms (g _{MF})					30
Digestats non lavés 13% ms (g _{MF})		30			
Contrôle de digestats non lavés 13% ms (g _{MF})					30
Digestats lavés 19% ms (g _{MF})			30		
Contrôle de digestats lavés 19% ms (g _{MF})					30
Digestats non lavés 20% ms (g _{MF})				30	
Contrôle de digestats non lavés 20% ms (g _{MF})					30
White-rot fungus <i>Ps7</i> vivant (g _{MF})	5,58	6,13	8,84	9,51	0

VIII.3.2 Résultats du lavage

Le résultat du lavage est donné par le bilan matière du lavage. C'est la relation :

$$BM = \frac{\text{Matière _ sèche _ après _ lavage}}{\text{Matière _ sèche _ avant _ lavage}} \times 100$$

La matière sèche avant lavage était de 13,19%, celle d'après lavage et égouttage de 1h30 était de 9,33%. Le bilan matière est donc de :

$$BM = 70,74\%$$

70,74% des matières ont été récupérées après le lavage de digestats. Autrement dit, le lavage a entraîné une perte de 29,26% de substances (facilement assimilables) de digestats.

VIII.3.3 Résultats des observations visuelles

Les échantillons de digestats de maïs lavés et non lavés et inoculés avec le white-rot fungus *Ps7*, en conditions stériles, ont été observés quotidiennement afin de déceler les modifications macroscopiques éventuelles qui seraient due à la croissance du champignon sur les digestats. Les résultats observés ont été résumés de manière hebdomadaire.

Aucun des contrôles n'a présenté de signe visuel de développement durant toute la période de l'incubation (1 mois). Le tableau 8.4, à la page suivante, donne l'évolution du développement du *Ps7* dans le substrat semaine par semaine pendant un mois.

A la première semaine de l'incubation, aucun signe visuel de développement n'a été observé dans les échantillons incubés.

A la deuxième semaine d'incubation, un tapis blanchâtres s'est développé dans tous les échantillons inoculés de *Ps7*. Ce développement s'est réalisé de manière similaire dans tous ces échantillons. Un échantillon de digestat lavé à 88% d'humidité (12% de matière sèche) a présenté, en plus, un faible développement des granules oranges.

A la 3^e semaine, le tapis blanchâtre présent dans tous les échantillons inoculés avec du *Ps7* a subit une croissance presque similaire. Les granules oranges se sont développées dans les échantillons lavés de 12% de matière sèche, non lavés de 13% matière sèche et non lavés de 20% matière sèche. Dans ces trois échantillons, l'intensité de cette présence a été presque similaire. A part les granules oranges, il s'est développé aussi un tapis orange dans les échantillons lavés de 12% matière sèche et non lavé de 20% matière sèche ; ce développement a été plus important dans l'échantillon lavé de 12% matière sèche.

Tableau 8.4 Observation visuelle du substrat

Teneur en matière sèche (%)	Code du Substrat	Appréciation visuelle du substrat par semaine			
		18/02 – 22/04	23/04 – 29/04	30/04 – 06/05	07/05 – 13/05
12 %	Digestat lavé autoclavé + 10% Ps7	Aucun	Tapis blanchâtre +	Tapis blanchâtre + Mycélium orange +++ Granules oranges + Décoloration du digestat (en brun clair) ++++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange ++++ Décoloration du digestat (en brun clair) ++++
	Contrôle Digestat lavé autoclavé	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun
13 %	Digestat non lavé autoclavé + 10% Ps7	Aucun	Tapis blanchâtre +	Tapis blanchâtre ++ Granules oranges + Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair ++++
	Contrôle Digestat non lavé autoclavé	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun
19 %	Digestat lavé autoclavé + 10% Ps7	Aucun	Tapis blanchâtre +	Tapis blanchâtre + Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange ++ Décoloration +++
	Contrôle Digestat lavé autoclavé	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun
20 %	Digestat non lavé autoclavé + 10% Ps7	Aucun	Tapis blanchâtre +	Tapis blanchâtre ++ Mycélium orange + Granules oranges + Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre + Mycélium orange ++ Décoloration en brun clair ++
	Contrôle Digestat non lavé autoclavé	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun

Légende : ±= Développement relativement faible

+ = Développement relativement moyen

++ = Développement relativement important

+++ = Développement relativement très important

++++ = Développement relativement très très important

Un dernier phénomène observé pendant cette 3^e semaine a été la décoloration du digestat qui accompagne le développement du white-rot fungus. Cette décoloration a été plus importante dans les digestats lavés de 12% matière sèche ; elle a été la moins importante dans les digestats non lavés de 20% matière sèche. Les échantillons témoins non inoculés ne se sont pas décolorés.

A la 4^e semaine, le développement du tapis blanchâtre et du tapis orange se sont étendus sur toutes les surfaces des substrats inoculés. La plus importante proportion a été observée sur les digestats lavés de 12% matière sèche et la plus petite proportion sur les digestats non lavés de 20% matière sèche. La décoloration du digestat s'est aussi étendue : tous les échantillons inoculés se sont décolorés et sont passés de brun foncé au brun clair. Les figures 8.3 et 8.4, donnent une illustration du tapis blanchâtre, du tapis orange et de la décoloration de digestats lavés, séchés à 12% d'humidité et inoculés avec du *Ps7* en conditions stériles. Les photos ont été prises à la 4^e semaine d'incubation



Figure 8.3 Développement du white-rot fungus *Ps7* dans les digestats de maïs lavés, séchés à 12% de matière sèche et stérilisés (à gauche) et non lavés et à 13% de matière sèche (à droite)



Figure 8.4 Développement du white-rot fungus *Ps7* dans les digestats de maïs lavés, séchés à 19% de matière sèche et stérilisés (à gauche) et non lavés à 20% de matière sèche (à droite)

VIII.3.4 Résultats du test de biodigestibilité du substrat traité

VIII.3.4.1 Conditions expérimentales

Les substrats, c'est à dire les digestats de maïs lavés et non lavés, autoclavés et inoculés avec le white-rot fungus *Ps7* dans le réacteur de digestion fongique ont été incubés pendant 28 jours. A la fin de l'incubation, chaque échantillon a été mélangé avec de l'eau déminéralisée jusqu'à un volume de 80 mL. Ce dernier mélange a été transvasé dans le réacteur batch anaérobie dans lequel se trouvait 100 mL d'un inoculum méthanogène. Le réacteur batch anaérobie a été fermé par une tête manométrique du type « OxiTop Control » (firme WTW). Il était équipé d'une sortie latérale fermée par un bouchon en caoutchouc. Le test de biodigestibilité a alors été démarré.

VIII.3.4.2 Résultats

La liqueur mixte était constituée de l'inoculum secondaire et du substrat issu soit du développement de *Ps7* dans les digestats de maïs lavés ou non lavés et stérilisés, soit du contrôle autoclavé de chaque type. La conversion en volume de biogaz produit par le test de biodigestibilité anaérobie de la liqueur mixte a donné les figures 8.5. Les résultats, pour les échantillons qui ont été inoculés, ont été exprimés en volume de biogaz produit divisé par la masse sèche mesurée avant la digestion fongique, c'est-à-dire la masse sèche de digestats additionnée de celle du white rot fungi avec lequel il a été inoculé. Pour les contrôles, c'est-à-dire les échantillons non inoculés, le volume de biogaz produit a été divisé par la masse sèche de digestat placés dans le réacteur de digestion fongique avant l'incubation.

La plus grande quantité de biogaz a été produite par la liqueur mixte de digestats lavés autoclavés de 12% matière sèche ($72 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ en 6 jours). Le contrôle correspondant, c'est-à-dire, ayant subi le même traitement mais non inoculé, a produit un peu moins ($56 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ en 6 jours). La liqueur mixte de digestats non lavés de 13% matière sèche produit aussi un peu plus que son témoin correspondant (respectivement 59 et $46 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ en 6 jours) mais moins que les échantillons lavés. Les liqueurs mixtes des digestats lavés de 12% et non lavés de 14% matière sèche ont produit plus de biogaz que celles de 19% et de 20% matière sèche de même type (41 et $42 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ contre 27 et $29 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ en 6 jours).

La plus faible production de biogaz est obtenue à partir de la liqueur mixte du témoin de digestats lavés à 19% matière sèche ($27 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ en 6 jours).

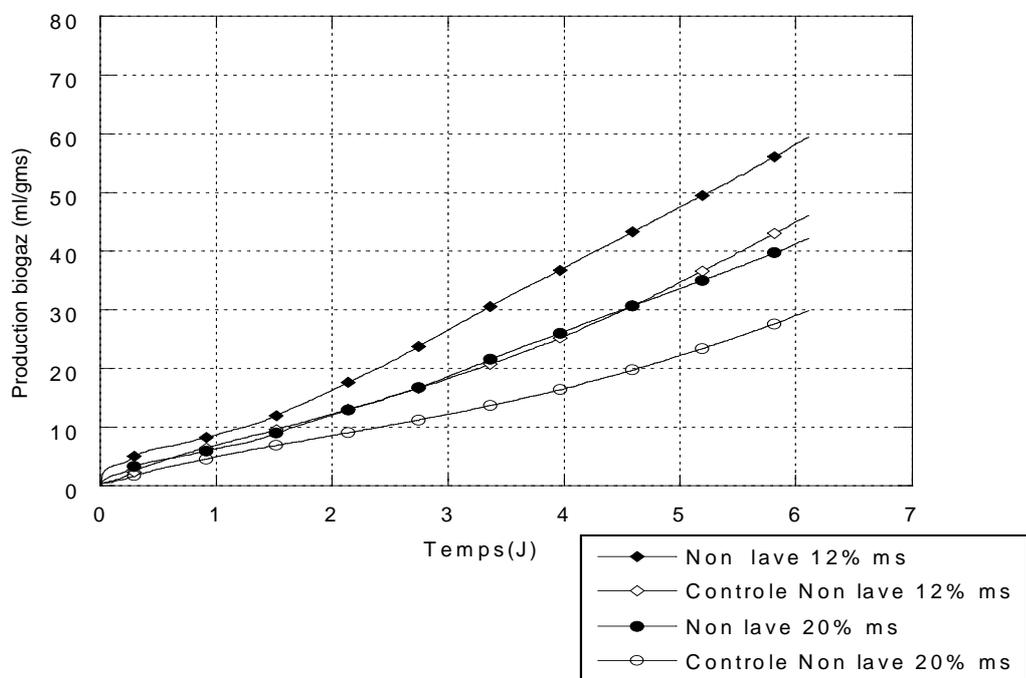
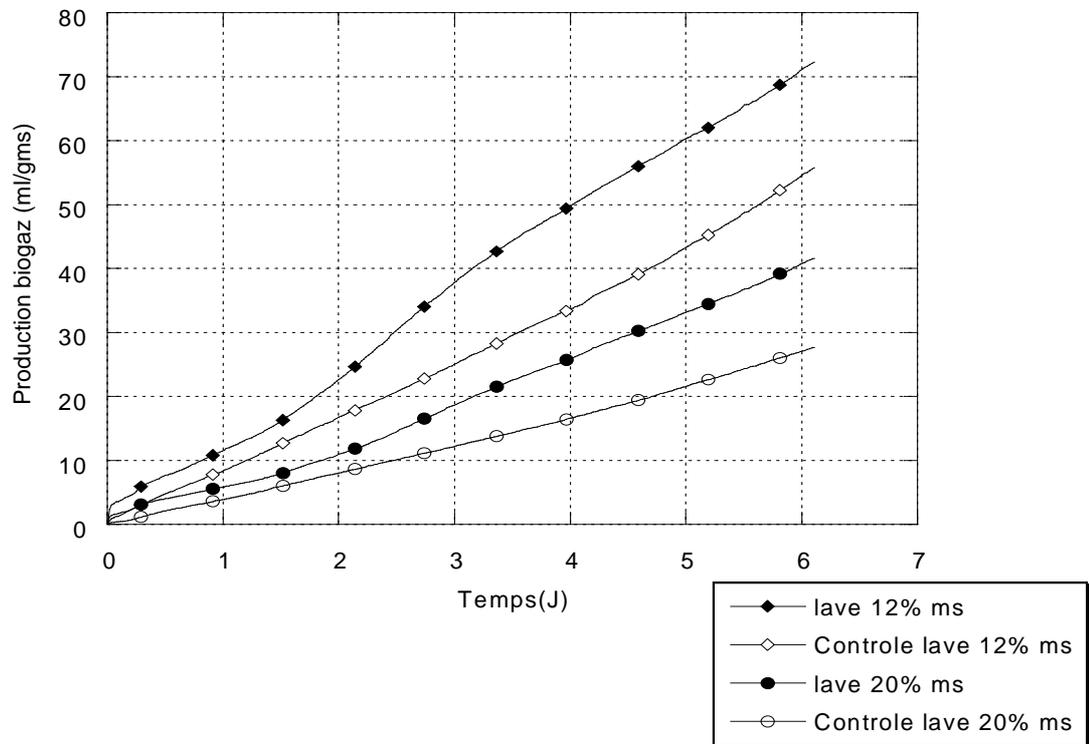


Figure 8.5 Production de biogaz par les liqueurs mixtes des substrats lavés et stérilisés (au dessus) et des substrats non lavés et stérilisés (au dessous)

VIII.3.5 Discussion des résultats des observations visuelles et du test de biodigestibilité

Les deux autoclavages de digestats séparés par une période de repos de 8 heures, en association avec l'inoculation en conditions stériles, ont permis le développement du Ps7 et donc ont supprimé le problème de la concurrence que le développement de la moisissure a posé à celui de *Ps7*. Le problème de la moisissure dans les contrôles a aussi été résolu.

Au cours de cette expérience, une période d'incubation de 7 jours a été nécessaire pour que les signes macroscopiques de la croissance et du développement de *Ps7* apparaissent. Durant toute la période de l'incubation des substrats, 4 principales caractéristiques macroscopiques ont accompagné le développement des *Ps7* : Le développement d'un tapis blanc, d'un tapis orange (figure 8.3 et 8.4), des granules oranges et la décoloration des digestats. Ces observations peuvent constituer le signe d'un développement de *Ps7* parce que la littérature stipule d'une part que le développement des white-rot fungi, dont fait partie le *Ps7*, sur un substrat lignocellulosique entraîne la décoloration de ce dernier suite à l'élimination de la lignine (Pointing, 2001; Blanchette et al., 1988) et d'autre part que le champignon *Pycnoporus sanguineus* présente une coloration orange (Nobles al., 1962).

La plus importante croissance fongique a été observée dans les digestats autoclavés à 12% de matière sèche tandis que la plus faible dans les digestats autoclavés à 20% de matière sèche. Ces résultats pourraient signifier que la teneur en humidité plus élevée du premier type de digestats a favorisé le développement du *Ps7*, ce qui correspondrait à la littérature qui stipule que la teneur en humidité du substrat lignocellulosique est un des facteurs essentiels à la croissance des white-rot fungi (Weiland, 1988).

La croissance et le développement de *Ps7* les plus importants ont été observés dans les digestats lavés par rapport aux digestats non lavés. Ceci peut s'expliquer par le fait que le lavage de digestats a provoqué un lessivage, proportionnel au degré de dilution de digestats, de principales substances nutritives diffusibles (protéines, minéraux, etc.) encore présentes dans la masse de digestats.

Dans tous les échantillons lavés et non lavés inoculés, la croissance fongique s'est manifestée par une décoloration de digestats. Ces derniers sont complètement passés de brun foncé au brun clair à la quatrième semaine. Cette décoloration peut être attribuée au métabolisme

oxydatif de *Ps7*, notamment à l'oxydation de la lignine et des matières humiques de digestats de maïs.

La production de biogaz par le test de biodigestibilité de la liqueur mixte issue de digestats lavés à 12% de matière sèche et inoculés avec du *Ps7* a été la plus importante des liqueurs mixtes de tous les substrats de cette expérience. Cette grande production peut être attribuée à l'augmentation de la biodigestibilité des digestats de maïs du fait de leur délignification par le white-rot fungus *Ps7*. En effet, la délignification a pour effet de rendre disponible les molécules de cellulose, hémicellulose et autres emprisonnées dans la matrice lignocellulosique (Perez et al., 2002). Il est à noter que la production de biogaz est favorisée par l'autoclavage du substrat destiné à subir une digestion anaérobie (Kim et al., 2003), elle serait aussi favorisée par le lavage du substrat.

La production de biogaz observée chez les substrats lavés à 12%MS et non lavés à 13%MS a été plus grande que celle des substrats de même type à 19% et 20% de matière sèche. Ceci pourrait être dû au fait que la croissance du white-rot fungus *Ps7* a été plus importante dans les digestats à taux plus faible de matière sèche, c'est-à-dire avec une humidité plus élevée. Cependant, le fait que la digestion des contrôles ait été aussi influencée, dans le même sens, peut signifier que cette différence de biodigestibilité anaérobie serait liée aussi à d'autres facteurs tels que la quantité de substrat la subissant. De ce point de vue, la quantité de substrat à 19% et 20%MS plus élevée entraverait l'activité de bactéries anaérobies responsables de la biométhanisation.

La teneur en éléments nutritifs plus faible de digestats lavés peut aussi être un facteur de réduction de la concurrence subie par le *Ps7* de la part de la contamination et d'autres organismes présent dans les digestats. En effet, plus le substrat lignocellulosique est riche en substances facilement assimilables, plus le spectre d'organismes capables de l'infecter est large. Par contre, plus il est pauvre, plus ce spectre se réduit et plus la croissance des white-rot fungi et l'exercice de leur métabolisme lignolytiques sont privilégiés (Pointing, 2001).

A la fin du test de biodigestibilité des substrats, après 6 jours d'incubation, les réacteurs batch anaérobies dans lesquels le test de biodigestibilité s'est déroulé ont été laissés au repos (arrêt de l'agitation). L'observation des ces réacteurs batch après environ 24h de repos a révélé une différence de présentation dans la liqueur mixte entre les substrats dans lesquels le *Ps7* s'est

développé et les contrôles non inoculés. Les substrats dans lesquels le *Ps7* s'est développé ont sédimenté dans la liqueur mixte tandis que les substrats contrôles ont flotté sur la liqueur mixte figure 8.6). Ce phénomène peut être attribué à l'oxydation des fibres hydrophobes de digestats dont la lignine fait partie. Il a été démontré que le laccase, enzyme produite par le *Ps7*, par un mécanisme oxydatif, peut cliver la liaison aryl-carbone α et associer un groupement hydrophile tel que le OH^- à ce noyau aryl (Palmer et Evans 1983). La conséquence de cette combinaison serait la transformation des fibres hydrophobes en composés hydrophiles.



Figure 8.6 Différence de présentation entre digestats digérés par le *Ps7* (à droite) et les contrôles non digérés (à gauche) dans la liqueur mixte

Après avoir mis en évidence la pertinence de l'inoculation en conditions stériles, du taux d'humidité et du lavage de digestats sur la croissance du *Ps7* sur les digestats de maïs, la prochaine étape à franchir dans ce travail de recherche a consisté à trouver, sur base de la littérature scientifique, un ou plusieurs paramètres physicochimiques qui permettraient de favoriser le développement du white-rot fungus *Ps7*, relativement aux autres micro-organismes présents. L'objectif de la démarche a été de combiner ce ou ces paramètres avec les traitements déjà réalisés afin d'obtenir les conditions les plus favorables permettant de développer le white-rot fungus dans les digestats sans autoclavage.

La piste choisie a été celle de l'acidification de digestats. A ce sujet, Tuomela et al. (2000) stipulent que la croissance des white-rot fungi au cours du compostage peut se faire dans une large gamme de pH. Par ailleurs, dans plusieurs travaux de recherches entrepris avec les white-rot fungi en général et avec le *Pycnoporus sanguineus* en particulier, l'activité

lignolytique optimale de ces champignons a été obtenue à un pH d'environ 5,5 (Trovaslet et al., 2007 ; Vanhulle et al., 2007)

Le lavage a semblé favoriser la biodigestibilité de digestats à 12% de matière sèche par rapport aux digestats non lavés de taux en matière sèche voisin (13%). Une hypothèse pour expliquer ce fait serait que le lavage favoriserait l'élimination des matières récalcitrantes.

Pour déterminer si le gain de biodigestibilité dû à la croissance du white-rot fungus a été plus élevé dans les digestats lavés ou non lavés, dans ceux à 12% de matière sèche ou à 20%, nous avons calculé le gain de biodigestibilité (GB) avec la formule:

$$GB_1 = \frac{V_{Test} - V_{Controle}}{V_{ControleRéf}} \times 100$$

Avec :

- V_{Test} : la production de biogaz par les digestats traités et incubés avec du white-rot fungus vivant
- $V_{Controle}$: la production de biogaz par les digestats témoins qui ont subi le même traitement et ont été inoculés avec le white-rot fungus autoclavé
- $V_{Controle Réf}$: la production de biogaz par les digestats qui n'ont subi aucun traitement et qui n'ont pas été inoculés avec le white-rot fungi

Dans cette expérience, aucun contrôle n'a été inoculé avec le Ps7 autoclavé. C'est ainsi que pour le calcul du gain de biodigestibilité, la production de biogaz due à ce contrôle va être remplacée par celle du contrôle non inoculé ayant subi le même traitement que les digestats dont le gain de biodigestibilité va être déterminé. En procédant ainsi, le gain de biodigestibilité obtenu sera légèrement plus élevé que celui dû aux digestats seuls par ce qu'il sera majoré de la biodigestibilité due au mycelium du Ps7 qui a été inoculé. Le tableau 8.5 donne les différents gains de biodigestibilité obtenus en appliquant la formule du gain de biodigestibilité et en tenant compte de la remarque s'y référant.

Tableau 8.5 Gain de biodigestibilité de digestats de maïs lavés suite à la croissance du white-rot fungus Ps7

Type de digestats	Gain de biodigestibilité dû au Ps7 (%)
digestats lavés à 12% de matière sèche	36
digestats non lavés à 13% de matière sèche	29
digestats lavés à 19% de matière sèche	30
digestats non lavés à 20% de matière sèche	26

Le gain de biodigestibilité dû à la croissance de Ps7 dans les digestats lavés à 12% de matière sèche a été le plus important et le plus faible a été celui dû à la croissance de Ps7 dans les digestats non lavés à 20% de matière sèche.

Au cours de la prochaine expérience, dans la perspective d'obtenir le développement du white-rot fungus Ps7 dans les digestats de maïs sans autoclavage préalable, sur base des difficultés rencontrées au cours de 2 premières expériences d'inoculation, des résultats obtenus dans l'expérience passée et de la littérature scientifique, l'acidification à différents pH de digestats destinés à être inoculés avec le Ps7 a été ajoutée aux traitements physicochimiques déjà appliqués.

VIII.4 Inoculation de digestats stérilisés, lavés et acidifiés avec du white-rot fungus Ps7

L'objectif de cette expérience a été de tester la croissance du *Ps7* sous différentes conditions de pH dans les digestats non stériles. La contribution du lavage a aussi été testée.

VIII.4.1 Conditions expérimentales

Au cours de cette expérience, les principaux traitements que les digestats ont subis avant d'être inoculés avec le *Ps7* ont été :

1. Les digestats ont été lavés et égouttés, ensuite ils ont été divisés en 4 échantillons. 3 échantillons ont été acidifiés respectivement aux pH 4 ; 5 et 6. Un échantillon n'a pas été acidifié. Tous les échantillons ont été autoclavés à deux reprises séparées par une pause de 8h. La teneur en matière sèche de digestats lavés et égouttés est de 9,33%. Celle de Ps7 est 6,45%

2. Les digestats ont été traités comme au premier traitement mais n'ont pas été autoclavés. La teneur en matière sèche de digestats lavés et égouttés est de 9,33%.

3. Les digestats n'ont pas été lavés, ni autoclavés. Ils ont été divisés en 4 échantillons. 3 échantillons ont été acidifiés respectivement aux pH 4 ; 5 et 6. Un échantillon n'a pas été acidifié. La teneur en matière sèche de digestats non lavés est de 13,19%.

30g de digestat de chaque type ont été préparés dans les réacteurs prévus pour l'incubation. Les digestats préparés selon les 3 types de traitement ont été inoculés avec le white-rot fungus *Ps7*. La proportion de *Ps7* (en masse sèche) a été de 10% par rapport à la masse sèche de digestat dans lesquels il a été inoculé. Seuls les échantillons de digestats autoclavés ont été inoculés sous une hotte stérile. Pour chaque traitement, un contrôle a été prévu. Le contrôle a subi le même traitement que l'échantillon de digestats non acidifié correspondant. Il a été inoculé avec le *Ps7* autoclavé en une proportion de 10% en masse sèche. Une répétition a été prévue pour chaque traitement et pour chaque contrôle. Le nombre total d'échantillon a été de 30.

VIII.4.2 Résultats des observations visuelles

Les observations visuelles de cette expérience ont été faites de manière journalière. Elles ont été faites séparément pour les 3 types de traitement (Tableaux 8.6 et 8.7).

VIII.4.2.1 Digestats lavés, acidifiés et autoclavés

Les résultats observés ont été décrits de manière hebdomadaire dans le tableau 8.6

Il y a eu un faible développement d'un tapis blanchâtre, probablement un mycélium, dès la première semaine dans tous les échantillons quel que soit le pH. Aucun développement n'a été observé dans les échantillons contrôles.

A la deuxième semaine, le tapis blanchâtre, identique à celui observé dans la troisième expérience, a continué sa croissance, de manière presque similaire, dans tous les échantillons de digestats lavés, autoclavés et inoculés. Il s'est développé aussi un mycélium rouge dans tous ces échantillons sauf dans les contrôles.

Tableau 8.6 Digestats lavés, acidifiés et autoclavés

Code du Substrat	Appréciation visuelle du substrat par semaine			
	21-27/05	28/05-03/06	04-09/06	10-16/06
Digestat lavé autoclavé pH7	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ++ Mycélium orange ± Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre ++++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair +++
Digestat lavé autoclavé pH6	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ++ Mycélium orange + Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre ++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair +++
Digestat lavé autoclavé pH5	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange ++ Décoloration en brun clair ++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair +++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair +++
Digestat lavé autoclavé pH4	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ++ Mycélium orange ± Décoloration en brun clair ++	Tapis blanchâtre ++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair ++	Tapis blanchâtre +++ Mycélium orange +++ Décoloration en brun clair +++
Contrôle Digestat lavé autoclavé pH7	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun

Le développement de ce mycélium rouge a été plus important dans les échantillons de digestats ayant été acidifiés à pH 5 et 6. Un début de décoloration des digestats a été observé. Leur coloration est passée du brun foncé au brun clair. A ce niveau, la décoloration la plus importante a été observée au niveau des substrats à pH 7 et 6.

A la troisième semaine, le mycélium blanchâtre s'est étendu dans la quasi-totalité des surfaces de tous les échantillons de digestats lavés, autoclavés et inoculés de *Ps7*. Le mycélium rouge est devenu aussi important ainsi que la décoloration de digestats. La décoloration a été plus importante dans les digestats à pH 7.

A la quatrième semaine, toutes les surfaces de digestats lavés, autoclavés et inoculés de *Ps7*, tous les pH compris, ont été recouvertes d'un mycélium bicolore blanc rouge. A l'exception des contrôles qui sont restés brun foncé, tous les digestats ont présenté une décoloration, ils sont tous devenus brun clair. Le développement du white-rot fungi *Ps7* a été plus important dans les digestats inoculés à pH 7, c'est-à-dire, non acidifiés. Jusqu'à la quatrième semaine aucun signe de développement n'a été observé dans les contrôles inoculés de *Ps7* autoclavés.

VIII.4.2.2 Digestats non lavés, acidifiés et non autoclavés

Dès la première semaine, des filaments blanchâtres se sont développés dans les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés avec du *Ps7* à pH 7 et 5. Ces filaments ont été similaires à la moisissure observée dans les digestats de maïs lors de la première expérience en conditions non stériles. Ce développement était plus important dans les digestats acidifiés à pH 5. Aucun développement ne s'est manifesté dans les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés à pH 6 ni dans le contrôle ayant été inoculé à pH 7 avec du *Ps7* autoclavé.

A la deuxième semaine, il n'y a pas eu de changement notable par rapport à la première semaine, sauf que la moisissure s'est étendue dans le substrat contrôle inoculé avec le *Ps7* autoclavé.

A la troisième semaine, la moisissure s'est développée dans les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés de *Ps7* à pH 6.

A la quatrième semaine, il n'y a pas eu de changement notable par rapport à la troisième semaine.

Aucun signe de croissance et de développement du white-rot fungus *Ps7* tels que décrit dans la littérature (Noble et al., 1962), n'a été observé pendant toute la période d'incubation. La figure 8.7 donne une illustration des différences visuelles entre le développement du white-rot fungus *Ps7* et de la moisissure blanchâtre dans les digestats de maïs.



Figure 8.7 Comparaison entre le développement des moisissures blanchâtres endogènes (gauche) et le Ps7 (droite) dans les digestats de maïs.

VIII.4.2.3 Digestats lavés, acidifiés et non autoclavés

Les résultats observés ont été décrits de manière hebdomadaire dans le tableau 8.7

Tableau 8.7 Digestats lavés, acidifiés et non autoclavés

Code du Substrat	Appréciation visuelle du substrat par semaine			
	21-27/05	28/05-03/06	04-09/06	10-16/06
Digestat lavé non autoclavé pH7	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ±
Digestat lavé non autoclavé pH6	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ±	Tapis blanchâtre ±
Digestat lavé non autoclavé pH5	Tapis blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±
Digestat lavé non autoclavé pH4	Tapis blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±
Digestat lavé non autoclavé pH7	Aucun*	Filament blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±	Filament blanchâtre ±

A la première semaine, des mycéliums blanchâtres se sont développés dans tous les digestats, sauf dans le contrôle. Cependant, ce développement a été très faible. Les mycéliums blanchâtres ont été similaires à ceux qui se sont développés dans les digestats lavés acidifiés autoclavés.

A la deuxième semaine, le mycélium blanchâtre s'est maintenu sans s'étendre d'avantage dans les échantillons lavés, non autoclavés et inoculés à pH 7 et 6. Dans les échantillons à pH 5 et 4, s'est plutôt développé la moisissure blanchâtre identique à celle de la première expérience.

A la troisième et à la quatrième semaine d'incubation, il ne s'est pas manifesté beaucoup de modification par rapport à celles observées à la deuxième semaine.

VIII.4.3 Résultats du bilan de matière de la digestion fongique

Le bilan matière de la digestion fongique a été calculé sur base de la matière fraîche résiduelle et de la matière sèche résiduelle des substrats à la fin de la digestion fongique. Toutefois, les résultats exprimés sur base de la matière fraîche ont été fortement influencés par la perte de l'humidité par les substrats durant toute la période d'incubation.

Dans le tableau 8.8 se trouvent les masses fraîches résiduelles, les masses sèches résiduelles et les teneurs en matière sèches des substrats dans lesquels la croissance fongique s'est effectuée pendant 28 jours, c'est-à-dire ceux qui ont été lavés et autoclavés, et le bilan matière de la digestion fongique est donné dans le tableau 8.9.

Tableau 8.8 Masse fraîche, masse sèche et teneur en matière sèche des substrats après digestion fongique de 28 jours

Condition testée	Masse fraîche résiduelle après digestion fongique (g _{MF})	Teneur en matière sèche résiduelle après digestion fongique (%)	Masse sèche résiduelle après digestion fongique (g _{MS})
Digestat lavé autoclavé pH7	15,39	14,75	2,27
Digestat lavé autoclavé pH7	16,52	11,50	1,90
Digestat lavé autoclavé pH7	17,54	13,00	2,28
Digestat lavé autoclavé pH7	17,21	13,25	2,28
Contrôle Digestat lavé autoclavé pH7	19,72	15,11	2,98

Tableau 8.9 Bilan matière de la digestion fongique de digestats de maïs après 28 jours d'incubation

Condition testée	Matière fraîche résiduelle après digestion fongique (% de la matière fraîche initiale)	Matière sèche résiduelle après digestion fongique (% de la matière sèche initiale)
Digestat lavé autoclavé pH7	44,82	73,73
Digestat lavé autoclavé pH7	48,11	61,61
Digestat lavé autoclavé pH7	51,08	73,98
Digestat lavé autoclavé pH7	50,12	73,98
Contrôle Digestat lavé autoclavé pH7	57,43	96,78

VIII.4.4 Résultats du test de biodigestibilité

Les figures 8.8 à 8.13 donnent les courbes des productions cumulées de biogaz dans les réacteurs batch anaérobies au cours des tests de biodigestibilité des liqueurs mixtes issues de digestats lavés, autoclavés et inoculés aux pH 7 ; 6 ; 5 et 4 ; de digestats non lavés, non autoclavés et inoculés aux pH 7 et 5 ainsi que de digestats non lavés, non autoclavés et inoculés aux pH 7 ; 5 et 4.

Les productions de biogaz ont été exprimées par rapport à la masse sèche des substrats avant la digestion fongique (figure 8.8, 8.9 et 8.10) et après la digestion fongique (figure 8.11, 8.12 et 8.13). Dans le premier cas, les résultats ont été exprimés, pour les échantillons qui ont été inoculés de *Ps7* vivant, en volume de biogaz produit divisé par la masse sèche mesurée avant la digestion fongique. Celle-ci est obtenue par la masse sèche de digestats additionnée de celle du white rot fungi avec lequel il a été inoculé. Pour les contrôles, c'est-à-dire les échantillons inoculés avec le *Ps7* autoclavé, le volume de biogaz produit a été divisé par la masse sèche de digestats et de *Ps7* autoclavé placés dans le réacteur avant l'incubation. Dans le second cas, les substrats ont été pesés à la fin de la digestion fongique, leurs masses sèches ont été déterminées, ensuite la production de biogaz a été divisée par la masse sèche du substrat correspondant.

La première figure (8.8) concerne les productions liées aux substrats lavés, autoclavés et inoculés pour les 4 pH testés. La deuxième figure (8.9) est relative aux productions des substrats non lavés, non autoclavés et inoculés pour les pH 7 et 5 et la troisième figure (8.10) aux productions des substrats lavés, non autoclavés et inoculés pour les pH 7 ; 6 et 5.

Les 4 types de digestats qui ont été lavés, autoclavés et inoculés à différents pH ont produit après 10 jours d'incubation des quantités de biogaz nettement plus élevées que celle du contrôle. Ces quantités de biogaz ont été très proches. Toutefois, la plus grande quantité de biogaz a été produite par la liqueur mixte de l'échantillon inoculé à pH 5 (83 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour). Elle a été suivie par celle de l'échantillon à pH 6 (78 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour), à pH 7 (77 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour). Le contrôle lavé, autoclavé et inoculé de *Ps7* autoclavé à pH 7 a produit la plus petite quantité de biogaz (42 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour).

Les différences de biodigestibilité entre les liqueurs mixtes de digestats non lavés, non autoclavés et inoculés aux pH 7 et 5 et leur contrôle ont été peu importantes. La plus importante quantité de biogaz a été produite par les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés à pH 7 (25 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour), ensuite les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés à pH 5 (24 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour) et enfin le contrôle (13 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour)

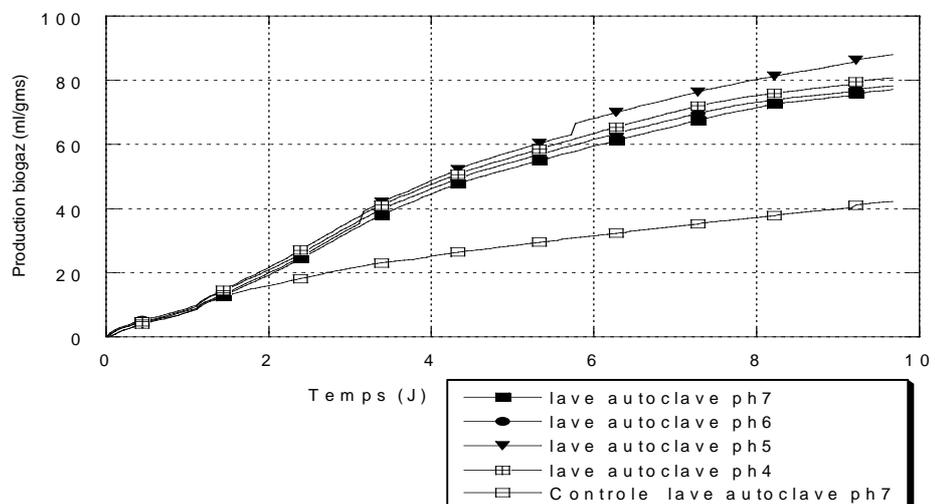
Au niveau de la production de biogaz par les liqueurs mixtes de digestats lavés, non autoclavés et inoculés aux pH 7 ; 6 et 5, la différence de biodigestibilité entre les digestats à pH 7 (25 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour) et leur contrôle (26 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour) n'a pas été établies. Les digestats lavés, non autoclavés et inoculés à pH 6 ont produit la plus importante quantité de biogaz (39 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour). Ensuite le contrôle lavé, non autoclavé et inoculé de *Ps7* autoclavé à pH 5 (30 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour).

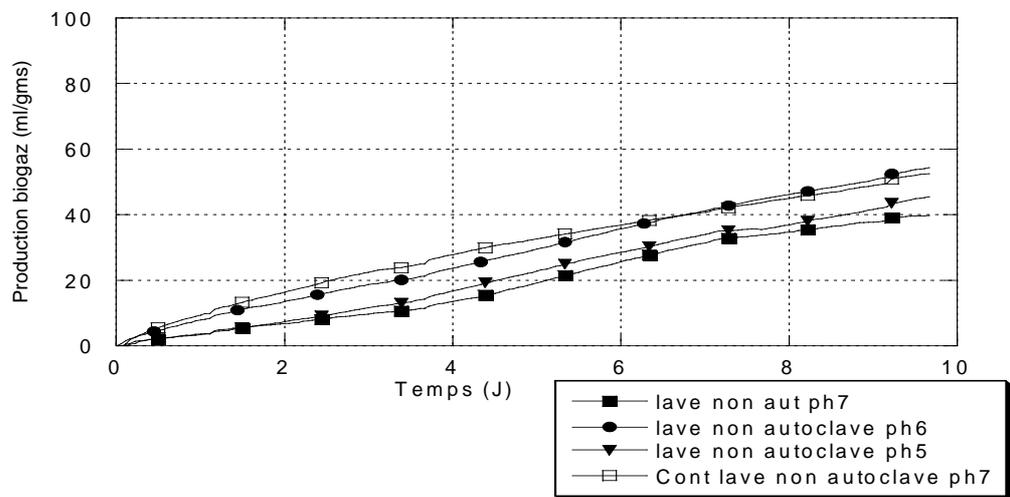
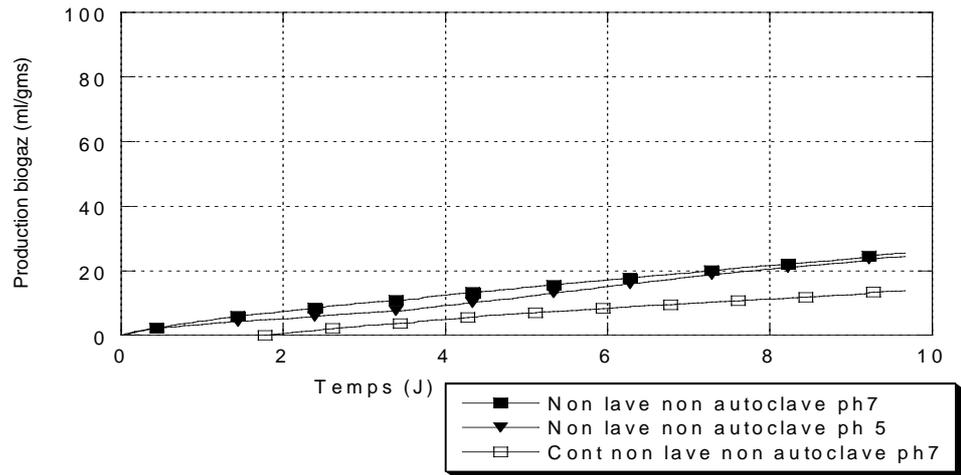
Lorsque les productions de biogaz par les digestats sont exprimées par rapport à la masse sèche des substrats après la digestion fongique, le volume de biogaz produit par unité de masse de substrat est plus élevé en comparaison à celui qui est exprimé par rapport à la masse avant digestion fongique. Ainsi la plus grande quantité de biogaz est produite de la liqueur mixte de l'échantillon inoculé à pH 6 (148 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour). Elle a été suivie par celle de l'échantillon à pH 5 (127 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour), à pH 7 (118 mL_{biogaz}/g_{MS} au 10^o jour). Le contrôle lavé, autoclavé et inoculé de *Ps7* autoclavé à pH 7 a produit la plus petite

quantité de biogaz ($45 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ au 10° jour). Néanmoins les 4 types de digestats qui ont été autoclavés, lavés et inoculés à différents pH ont produit après 10 jours d'incubation des quantités de biogaz nettement plus élevées que celle du contrôle.

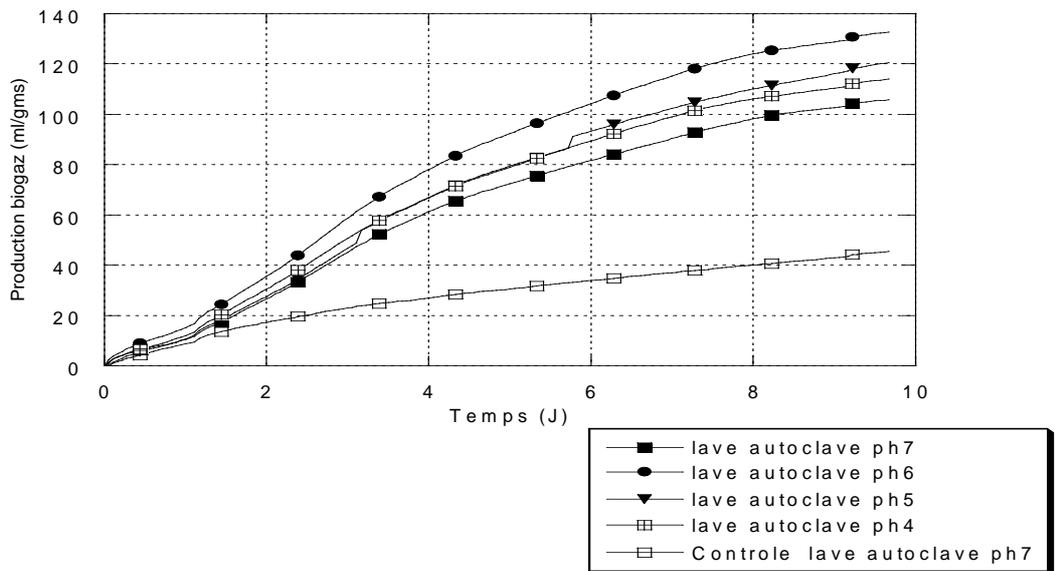
Dans le cas des liqueurs mixtes de digestats non lavés, non autoclavés et inoculés aux pH 7 et 5, la plus importante quantité de biogaz a été produite par les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés à pH 5 ($57 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ au 10° jour), ensuite les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés à pH 7 ($37 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ au 10° jour) et enfin le contrôle ($21 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ au 10° jour).

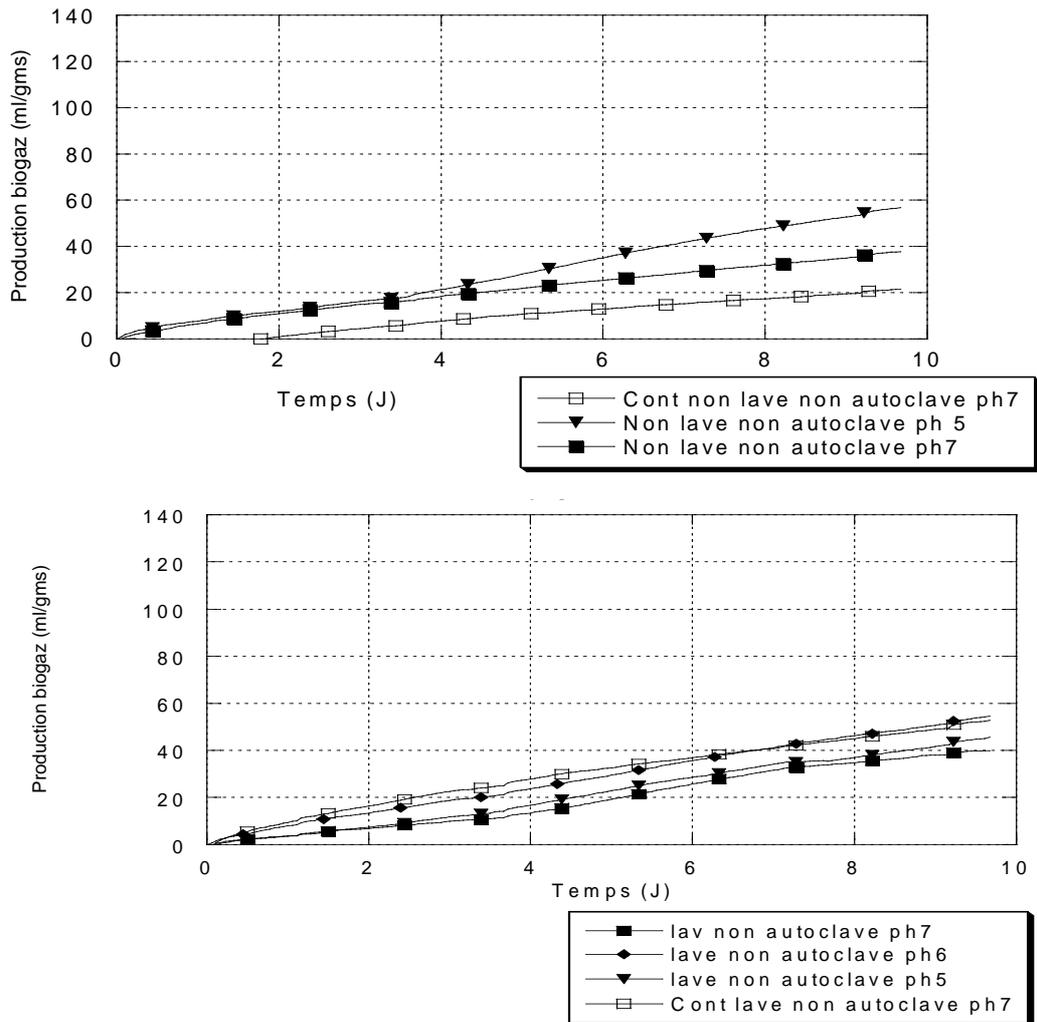
Et, enfin, dans le cas des liqueurs mixtes de digestats lavés, non autoclavés et inoculés aux pH 7 ; 6 et 5; les digestats lavés, non autoclavés et inoculés à pH 6 ont donnés la plus importante production de biogaz ($54 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ au 10° jour). Ensuite le contrôle lavé, non autoclavé et inoculé de Ps7 autoclavé à pH 7 ($52 \text{ mL}_{\text{biogaz}}/\text{g}_{\text{MS}}$ au 10° jour).





De haut en bas : Figure 8.8 ; 8.9 et 8.10 Production de biogaz par masse sèche avant digestion fongique de digestats lavés, autoclavés et inoculés à différents pH; digestats non lavés, non autoclavés et inoculés à différents pH; digestats lavés, non autoclavés et inoculés à différents pH.





De haut en bas : Figure 8.11 ; 8.12 et 8.13 Production de biogaz par masse sèche après digestion fongique digestats lavés, autoclavés et inoculés à différents pH; digestats non lavés, non autoclavés et inoculés à différents pH; digestats lavés, non autoclavés et inoculés à différents pH.

VIII.4.5 Discussion des résultats

Dès la première semaine, le développement du tapis blanchâtre, similaire à celui observé à partir de la deuxième semaine de la troisième expérience d'inoculation a été observé dans tous les échantillons de digestats lavés, acidifiés, autoclavés et inoculés à différents pH, à l'exception des contrôles inoculés de *Ps7* autoclavé. Ce développement est interprété comme une amorce de développement de mycélium de *Ps7*. Ce développement s'est fait dans tous substrats quel que soit le pH, conformément à la littérature qui stipule que les white-rot fungi ont une large gamme de pH pour leur croissance (Tuomela et al., 2000)

Le développement de tapis mycélien orange et la décoloration qui sont intervenus dans tous les digestats autoclavés et inoculés, à l'exception des contrôles, a confirmé le développement

du *Ps7* inoculé. Ce développement est similaire à celui de la troisième expérience. La croissance macroscopique la plus importante a été observée dans l'échantillon non acidifié, c'est-à-dire à pH 7.

L'acidification de digestats n'a pas permis au *Ps7* de se développer en conditions non stériles étant donné que le *Ps7* ne s'est pas développé dans les digestats non lavés, non autoclavés et inoculés aux différents pH. Une hypothèse avancée serait que les digestats contiendraient trop de matière facilement digestible permettant à d'autres microorganismes de se développer et de rentrer en concurrence avec le white-rot fungus.

Dans les digestats qui ont été lavés pour être appauvris de matières facilement digestibles et qui ont été inoculés avec le *Ps7* en conditions non stériles, le développement de *Ps7* n'a pas été observé quelque soit le pH testé. La croissance de *Ps7* n'a pas n'ont plus été observée mais plutôt la moisissure.

Au cours du test de biodigestibilité de différents substrats lavés et non lavés, autoclavés et non et inoculés à différents pH, la plus grande quantité de biogaz a été produite par les digestats lavés, autoclavés et inoculés à différents pH, respectivement à pH 6, pH 5 et pH 7. Ceci peut être expliqué d'abord par le fait que l'autoclavage des substrats améliore leur biodigestibilité (Kim et al., 2003) et ensuite par le fait que des éléments facilement assimilables seraient rendus disponibles du fait de l'activité lignolytique de *Ps7*. Etant donné que le contrôle non lavé, non acidifié, autoclavé et non inoculé de *Ps7* n'a pas été prévu pour l'expérience et qu'il n'y a pas eu des contrôles pour les pH 4 ; 5 et 6, le gain de biodigestibilité dû à la croissance du *Ps7* dans les digestats lavés, non acidifié et autoclavés a été obtenu à partir de la relation :

$$GB_2 = \frac{V_{Test} - V_{Contrôle .auto .Ph 7}}{V_{Contrôle .auto .Ph 7}} \times 100$$

Le gain de biodigestibilité des digestats lavés, non acidifiés et autoclavés dû à la croissance du white-rot fungus *Ps7* a été de 82% plus élevé par rapport à leur contrôle inoculé de *Ps7* autoclavé.

L'observation des courbes des 3 types de digestats testés indique que l'autoclavage a favorisé la biodigestibilité de digestats. Ainsi, le contrôle lavé, non acidifié et autoclavé a produit plus

de biogaz que le contrôle lavé, non acidifié et non autoclavé (42 mL_{biogaz}/g_{MS} contre 26 mL_{biogaz}/g_{MS} en 10 jours). De même, le simple lavage de digestats a provoqué une augmentation de leur biodigestibilité par rapport aux digestats non lavés (26 mL_{biogaz}/g_{MS} pour le contrôle lavé, non acidifié et non autoclavé le contre 13 mL_{biogaz}/g_{MS} en 10 jours pour le contrôle non lavé, non acidifié et non autoclavé).

Pour obtenir l'augmentation de biodigestibilité globale de digestats lavés, non acidifiés et autoclavés, c'est-à-dire, l'augmentation due à la croissance du *Ps7*, au lavage et à l'autoclavage de digestats, la production de biogaz de ces digestats a été comparée à celle du contrôle non lavé, non acidifié et non autoclavé. La relation appliquée a été :

$$GB_3 = \frac{V_{Test} - V_{Controle .auto .Ph 7}}{V_{Controle .non .auto .non .lave .Ph 7}} \times 100$$

Cette relation a permis de trouver que l'augmentation de biodigestibilité de digestats lavés, non acidifiés et autoclavés a été de 251% par rapport aux digestats non lavés, non acidifiés et non autoclavés. Ce surplus de biodigestibilité pourrait être dû au lavage et à l'autoclavage de digestats. Par manque de contrôles, l'augmentation de biodigestibilité due à l'acidification n'a pas été déterminée.

Conclusions et suggestions

Le lavage et surtout l'autoclavage de digestats ont permis le développement du white-rot fungus *Ps7*. Ainsi au cours de l'expérience réalisée sur les digestats autoclavés, lavés et testés à quatre différents taux de matière sèche, le gain de biodigestibilité obtenu après 28 jours d'incubation et 6 jours de digestion anaérobie a été de 36% pour les digestats lavés à 12% de matière sèche, de 29% pour les digestats non lavés à 13% de matière sèche, de 30% pour les digestats lavés à 19% de matière sèche et de 26% pour les digestats non lavés à 20% de matière sèche. Ce gain au cours de l'expérience réalisée sur les digestats lavés, acidifiés et autoclavés a été de 82% après 28 jours de digestion fongique et 10 jours de digestion anaérobie.

L'inoculation du *Ps7* sur les digestats de maïs non stérilisés n'a pas permis le développement du white-rot fungus sur ces digestats et ce, dans aucune des conditions testées : acidification

ou lavage. Le développement observé dans toutes les expériences réalisées en conditions non stériles a été une moisissure blanchâtre. Une hypothèse a été que les digestats contiendraient encore trop de matières facilement digestibles permettant le développement des microorganismes entrant en compétition avec le white-rot fungus.

Les conclusions tirées ont conduit aux suggestions suivantes :

- Poursuivre la digestion anaérobie de digestats de maïs pendant un ou deux mois avant de les inoculer de *Ps7* pour une nouvelle expérience,
- Augmenter le lavage de digestats en élevant le facteur de dilution jusqu'à 1/100 voire 1/1000 avant de les inoculer avec du *Ps7*, sans autoclavage. Ceci permettra de vérifier si les digestats sont suffisamment pauvre pour la survie d'un quelconque organisme et ainsi induire le métabolisme secondaire de *Ps7*,
- Vérifier la faisabilité d'une croissance du champignon dans un tambour soumis à une rotation (homogénéisation de l'aération et de l'humidité)

Références bibliographiques

- Agosin, E., Tollier, M. T., Heckmann, E., Brillouet, J. M., Thivend, P., Monties, B. and Odier, E. (1988). Effect of fungal treatment of lignocellulosics on biodegradability. In Degradation of Lignocellulosics in Ruminants and in Industrial Processes (Van Der Meer, J. M., Rijkens, B. A., Ferranti, M.P.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London, Ch. 4, 35-44.
- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 922.
- Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. San Diego Academic Press, California, pp. 635.
- Angelidaki, I. and Sanders W. (2004). Assessment of anaerobic biodegradability of macropollutants. Environmental Science and Biotechnology, 3, 117-129.
- Banerjee, S. (1957). Parasitism of *Polystictus sanguineus* (L) Mey. On *Shorea robusta* Gaertn. f. Sci. and Culture (Calcutta), 23, 100-101.
- Béguin, P., Aubert, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. Microbiology Review, 13, 25-58.

- Bidlack, J., Mike, M., Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 72, 51-56.
- Blanchette, R.A., Obst, J.R., Hedges, J.I. and Weliky, K. (1988). Resistance of hardwood vessels to degradation by White rot Basidiomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 66:1841-1847.
- Buess-Herman, C., Dauchot-Weymeers, J., Dumont, F. (1997). *Chimie Analytique*. Skoog. West. Holler. De Boeck Université, Paris, Bruxelles, p. 744-748.
- Eder, J. (1988). Practical problems in the pretreatments of straw-based lignocellulosic substrate for Pleutorus production. In *Treatments of Lignocellulosics with White Rot Fungi* (Zadrazil, F., Reigner, P.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London, Ch. 2, 14-20.
- Gunaseelan, V.N. (1997). Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass and Bioenergy*, 13, 83-114.
- Hattaka, A.I. (1983). Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 18, 350-357.
- Jeffries, T. W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In *Biochemistry of Microbial Degradation* (Ratledge, C.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Ch. 8, 233-277.
- Kim, J., Park, C., Kim, T.-H., Lee, M., Kim, S., Kim, S.-W. and Lee, J. (2003). Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95, 271-275.
- Luna, M. L., Murace, M. A., Keil, G. D. and Otano, M. E. (2004). Patterns of decay caused by *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma lucidum* (Aphyllophorales) in poplar wood. *Iawa Journal*, 25, 425-433.
- Mildred, K., Frew, N. and B.P. (1962). Studies in wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 40, 988-1016.
- Miron, Y., Zeeman, G., Van Lier, J.B., Lettinga, G. (2000). The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Resources*, 34, 1705-1713.
- Palmer, J. M. and Evans, C. S. (1983). The enzymatic degradation of lignin by white-rot fungi. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B* 300, 293-303.

- Pérez, J., Munoz-Dorado, J., Rubia, T., Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5, 53-63.
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 20-33.
- Smith, J. F., Fermor, T. R. and Zadrazil, F. (1988). Pretreatment of lignocellulosics for edible fungi. In *Treatments of Lignocellulosics with White Rot Fungi* (Zadrazil, F., Reigner, P.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London, Ch.1, 3-13.
- Tchobanoglous, G. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and reuse*. Burton, F. L., McGraw-Hill Science/Engineering/Math: 629-633.
- Trovaslet, M., Enaud, E., Guiavarch'h, Y., Corbisier, A-M. and Vanhulle, S. (2007). Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 1-35.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itavaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72, 169-183.
- Vanhulle, S., Radman, R., Parra, R., Cui, T., Bols, A-M., Tron, T., Sannia, G and Keshavarz, T (2007). Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (7). pp. 1712-1718.
- Veeken, A. and Hamelers, B. (1999). Effect of temperature on the hydrolysis rate of selected biowaste components, bores. *Technology*, 69, 249-255.
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A., Jones, E.B.G. (2006). Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, 97, 171-177.
- Waldner, R. (1987). *Lignolytic system of white-rot fungi*. Thèse de doctorat, Eidgenössischem Technischem Hochschule, ZurichH, microfiche.
- Weiland, P. (1988). Principle of solid state fermentation. In *Treatments of Lignocellulosics with White Rot Fungi* (Zadrazil, F., Reigner, P.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London, Ch. 9, 64-76.
- Zadrazil, F. (1988). White rot fungi and mushrooms grown on cereal straw: aim of the process, final products, scope for the future. In *Degradation of Lignocellulosics in Ruminants and in Industrial Processes* (Van Der Meer, J. M., Rijkens, B. A., Ferranti, M.P.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London, Ch. 6, 55-62.

- Zadrazil, F., Reigner, P. (1988). Treatments of Lignocellulosics with White Rot Fungi. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London, pp. 120.

Références sur Internet

- Lodge, D. J. (1988). "Pycnoporus sanguineus L. ex Fr.", sur le site de State University of New York College at Cortland. Pages consultées le 15 juillet 2007
<http://www.cortland.edu/nsf/lodpysa.HTML>
- The species 2000 and Itis organisation (2007). "Catalogue of life : 2007 Annual Checklist : Genus Pycnoporus." sur le site de The species 2000 and Itis organisation. Pages consultées le 23 juillet 2007
http://www.catalogueoflife.org/show_species_details.php?record_id=3246446