

Biodégradation anaérobie de l'acide crotonique par une biomasse bactérienne spécialisée dans la dégradation de l'acide butyrique*

Anaerobic biodegradation of crotonic acid by a bacterial population specialized in the degradation of butyric acid

P. MARTEL-NAQUIN, C. COMEL, R. GOURDON, J. VERON¹

Reçu le 15 janvier 1990, accepté pour publication le 15 octobre 1991**.

SUMMARY

Volatile Fatty Acids (VFAs) are intermediate metabolites formed in the anaerobic biodegradation of organic matter. They are commonly found in sewage, municipal sanitary landfill leachate and effluents from agricultural and food-processing industries. A good knowledge of the microorganisms involved in VFA biodegradation is necessary to operate satisfactory biotreatment of those effluents.

The objective of the present study is to better understand the metabolism of the anaerobic bacteria responsible for the degradation of butyric acid and one of its metabolites (crotonic acid), which is still poorly known.

Syntrophomonas wolfei is one of the few butyrate-degrading acetogenic bacteria that has been documented. First studies have shown that this microorganism is not capable of degrading crotonic acid (MCINERNEY *et al.*, 1979, 1981). This is surprising since crotonyl-Coenzyme A, in its activated form, is an intermediate metabolite of n-butyrate β -oxidation, which is the most common mechanism of butyrate biodegradation. In addition, β -oxidation of crotonate is thermodynamically possible, even under standard conditions.

These observations are at the origin of the present study, which investigates the anaerobic biodegradation of crotonate. Other investigators have followed a similar approach and isolated *S. wolfei* in pure culture on crotonate.

The degradation of crotonate was studied in a bench-scale up-flow anaerobic filter of twenty liters, operated in the dark, at 35 °C.

A first set of experiments was carried out with a biomass exclusively adapted to the biodegradation of butyrate. Heat-expanded vermiculite was used as a packing medium. Various experimental protocols were successively followed.

1. Laboratoire de Chimie Physique Appliquée et Environnement, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 20, avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex.

* Communication présentée à la journée « Jeunes chercheurs » du GRUTTE, le 28 septembre 1990 à Poitiers.

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 décembre 1992.

First, pulses of crotonate were injected into the reactor under conditions of continuous feeding with butyrate, and then, the reactor was continuously fed with crotonate. The objective was to determine whether a bacterial population exclusively adapted to butyrate biodegradation would be capable of degrading crotonate.

It was found that crotonate was actually biodegraded in the reactor. With the first protocol, when pulses of crotonate were injected into the reactor, crotonate was totally removed in 55 hours (fig. 3). Butyrate and acetate concentrations increased as crotonate was degraded, but no significant increase in biogas production was observed. On the other hand, under the same conditions, it was found that iso-butyrate was not degraded, which is consistent with other published data (MCINERNEY *et al.*, 1979, 1981 ; STIEB and SCHINK, 1985, 1989).

With the second protocol (continuous feeding with crotonate at 5.2 g/l), crotonate was totally biodegraded in 48 hours after a 24 hours lag period. This biodegradation resulted in the accumulation of acetate and, in a lower extent, butyrate (fig. 4).

Following this stage, the reactor was fed with a higher crotonate concentration (12 g/l), and it was observed that crotonate was totally degraded in 20 hours, without any lag period (fig. 5).

These results showed that butyrate-degrading bacteria were capable of degrading crotonate effectively after a short period of adaptation.

Further experiments were conducted with a biomass previously adapted to the degradation of a mixture of VFAs (acetate, propionate, iso-butyrate, butyrate and caproate). Berl saddles were used as a support for bacterial growth. The reactor was operated in a recirculated batch mode and spiked with crotonate. Finally, the reactor was successively fed for four weeks with propionate and for two weeks with butyrate, before being spiked with crotonate.

In all these experiments, crotonate biodegradation was observed, but, in contrast to the results obtained with the "vermiculite reactor", no butyrate accumulation occurred (fig.6).

These results show that a bacterial population adapted to the degradation of a mixture of VFAs or to the degradation of individual VFAs such as propionate and n-butyrate, is capable of degrading crotonate.

Based on the present study and on literature data, the following mechanism can be proposed for the biodegradation of crotonate (fig.7). The first stage is the activation of crotonate into crotonyl-Coenzyme A by an acetyl-CoA/crotonyl-CoA transferase, as recently isolated from *S. wolfei* (BEATY and MCINERNEY, 1987). When present at low concentrations, crotonate is probably directly degraded into acetate, as shown by the results obtained with the "selles de Berl reactor", in which no intermediate metabolite has been detected. At higher concentrations, enzymatic sites may be saturated and an equilibrium be established with butyrate, which is then released into the medium. This has been shown by the accumulation of butyrate under conditions of continuous feeding with crotonate. In addition, another intermediate metabolite has been formed, which has not been identified in the present study. This product is most probably poly- β -hydroxy-butyrate, which has been found in *S. wolfei* (MCINERNEY *et al.*, 1979) although it is not very common in chemotrophic bacteria.

Key-words : biodegradation, anaerobic, volatile fatty acid, butyric acid, crotonic acid, bacterial filter.

RÉSUMÉ

La connaissance, actuellement très limitée, du métabolisme des bactéries acétogènes intervenant dans la biodégradation anaérobie de l'acide butyrique et d'un de ses sous-produits, l'acide crotonique, est à l'origine de cette étude.

Après avoir mis au point un réacteur anaérobie à biomasse fixée, cette dernière a, dans un premier temps, été adaptée à la biodégradation exclusive du butyrate. La dégradation du crotonate a ensuite été étudiée, selon différents protocoles expérimentaux (pulses de crotonate en alimentation continue avec du butyrate puis alimentation continue avec du crotonate). Des injections de crotonate ont également été effectuées en circuit fermé, avec une biomasse adaptée dans un premier temps à la dégradation d'un mélange d'AGV, le réacteur étant ensuite alimenté avec du propionate puis du butyrate seuls.

Contrairement à ce que laissait penser la bibliographie, il a été constaté que les bactéries adaptées à la dégradation exclusive du butyrate sont très rapidement à même de dégrader le crotonate.

Les résultats obtenus permettent d'approcher les spécificités bactériennes, la voie catabolique suivie par le crotonate, son mode de régulation enzymatique et les équilibres qui la gouvernent. C'est ainsi qu'il est possible de proposer un modèle explicatif relativement simple du mécanisme de biodégradation du crotonate.

Mots clés : *biodégradation, anaérobie, acide gras volatil, acide butyrique, acide crotonique, filtre bactérien.*

INTRODUCTION

Les acides gras volatils (AGV) apparaissent au cours de nombreuses réactions métaboliques, et en particulier au cours de la biodégradation de la matière organique, en aérobie comme en anaérobiose. Pour cette raison, ils sont très souvent présents dans certains types d'effluents riches en matière organique (eaux usées urbaines, effluents des industries agro-alimentaires, lixiviats de décharges d'ordures ménagères ...).

Leur accumulation dans le milieu peut être responsable, notamment par abaissement du pH et du fait de leur propre effet inhibiteur, du mauvais rendement d'un processus d'épuration biologique, voire de sa totale inhibition. Par ailleurs, leur présence en concentration parfois importante montre que leur biodégradation (qui conditionne généralement le dimensionnement des installations de traitement biologique des eaux) est de fait le facteur limitant de la minéralisation ultime de la matière organique.

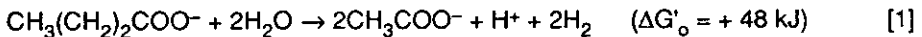
Si l'on veut parfaitement maîtriser la biodégradation des AGV, il est donc indispensable d'améliorer les connaissances relatives au métabolisme des micro-organismes qui interviennent. Nous nous sommes pour cela intéressés à celui encore mal connu des bactéries responsables de la biodégradation anaérobie de l'acide butyrique et de l'un de ses intermédiaires cataboliques, l'acide crotonique, au cours de la méthanisation.

C'est grâce à ce processus naturel que la matière organique, par l'intermédiaire de nombreuses espèces bactériennes, peut être totalement dégradée en méthane et CO_2 , même en l'absence de lumière ou d'accepteurs d'électrons comme l'oxygène moléculaire, les ions sulfates ou nitrates.

La méthanisation se déroule en quatre étapes : *hydrolyse* des macromolécules, *acidogénèse* (au cours de laquelle sont formés divers acides et alcools, dont l'acide butyrique), *acétogénèse*, étape qui permet à ces produits de se transformer en acétate, formiate, H_2 et CO_2 , précurseurs de la *méthanogénèse*, ultime étape du processus de méthanisation, donnant naissance à un mélange de méthane et de CO_2 .

Les réactions d'acétogénèse à partir des AGV, réalisées par les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène, présentent la particularité d'être thermodynamiquement impossibles dans les conditions standard et doivent donc, pour pouvoir se dérouler, être couplées à d'autres réactions : c'est à ce stade qu'interviennent alors les bactéries méthanogènes.

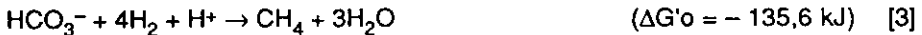
Par exemple, la réaction d'acétogénèse du butyrate :



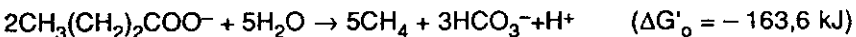
est possible lorsque les bactéries méthanogènes consomment l'acétate et l'hydrogène au fur et à mesure de leur formation, selon les réactions :



et



Le couplage de ces trois réactions ($2 \times (1) + 4 \times (2) + (3)$) conduit à un $\Delta G'_o$ négatif pour la réaction globale de biodégradation du butyrate :



Les premières recherches sur *Syntrophomonas wolfei*, une des rares bactéries acétogènes dégradant le butyrate qui ait été identifiée, ont montré qu'elle ne dégradait pas l'acide crotonique (MCINERNEY *et al.*, 1979, 1981). Fait surprenant, dans la mesure où l'acide crotonique, sous sa forme activée de crotonyl-coenzyme A, est un produit intermédiaire apparaissant au cours de la β -oxydation du butyrate, mécanisme de biodégradation le plus communément admis pour ce produit. Et cela d'autant plus que la β -oxydation directe à partir du crotonate est thermodynamiquement possible même dans les conditions standard.

Partant de ce raisonnement, et parallèlement à une autre équipe de chercheurs (BEATY et MCINERNEY, 1987) qui ont réussi à obtenir *S. wolfei* en culture pure sur crotonate, nous avons été amenés à nous intéresser à la biodégradation anaérobie de ce dernier.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Le réacteur

Classiquement, les recherches relatives au mode de biodégradation des AGV sont menées en travaillant selon les techniques microbiologiques usuelles, souvent avec des cocultures bactériennes.

En ce qui nous concerne, il a été décidé de travailler avec un réacteur cylindrique à biomasse fixée, d'un volume total d'environ vingt litres. Réalisé en plexiglass, il était placé à l'obscurité et muni d'un dispositif de régulation de température (rubans chauffants) le maintenant à 35° Celsius, température optimale de croissance de nombreuses bactéries anaérobies.

Le garnissage employé dans un premier temps était de la vermiculite expansée : ce matériau présente l'avantage d'avoir une surface spécifique (donc potentiellement colonisable par des bactéries) très importante, mais l'inconvénient de s'effriter et de provoquer de fréquents colmatages. Il a pour cela été remplacé par la suite par des selles de Berl (petits éléments en PVC), de surface spécifique plus faible que celle de la vermiculite expansée mais de résistance mécanique par contre excellente.

La figure 1 montre le schéma de fonctionnement de l'installation avec le réacteur « selles de Berl ». La principale différence avec le réacteur « vermiculite » est que le sédimenteur est ici placé en sortie haute, alors qu'il s'agissait auparavant d'un cône situé à la base du réacteur.

La détermination des volumes de liquide mis en jeu (*tableau 1*) et des caractéristiques hydrodynamiques des deux réacteurs, « vermiculite » et « selles de Berl », nous a conduits à travailler, avec le premier, à un débit de recirculation de 90 l/h, et de 125 l/h avec le second, assurant ainsi l'homogénéisation du milieu en moins de vingt minutes. La concentration des produits injectés étant égale, après trente minutes, à leur dilution normale dans le milieu, l'activité biologique pendant ce laps de temps a été supposée négligeable : ce délai a donc été systématiquement attendu avant d'effectuer les premiers prélèvements.

Tableau 1 Volumes mis en jeu dans les réacteurs.

Table 1 Liquid volumes in the reactors.

	Garnissage	
Volume l	Vermiculite	Selles de Berl
Volume du lit	15,05	14,75
Volume utile	14,40	12,30
Volume total de liquide	16,00	15,90

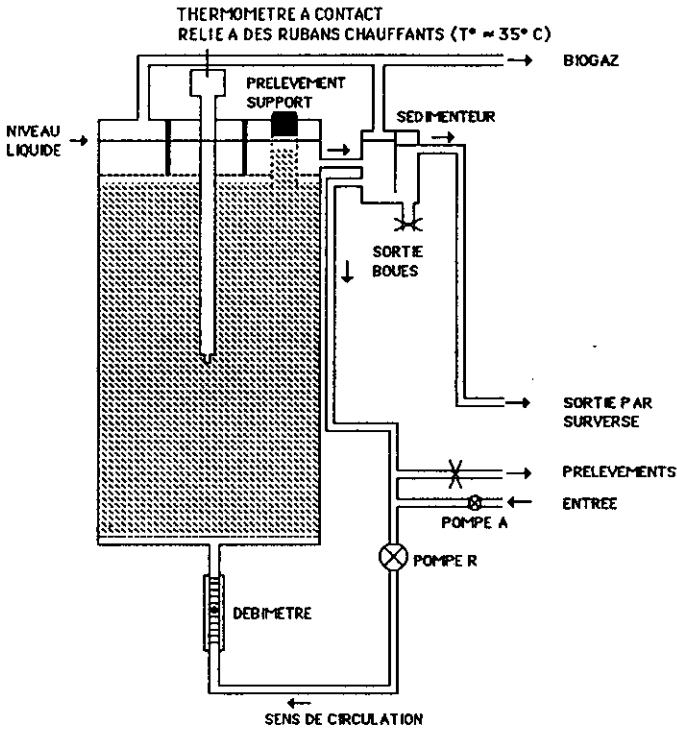


Figure 1 Schéma de fonctionnement du réacteur « selles de Berl ».
Diagram of the « selles de Berl » reactor.

2 - Techniques analytiques

Les concentrations en AGV et en acide crotonique ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe Girdel 30, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue enrobée (phase stationnaire : FFAP acidifiée) et d'un détecteur à ionisation de flamme.

L'appareil utilisé pour la mesure du carbone organique est un analyseur de carbone Beckman (modèle Tocamaster).

La composition du biogaz est analysée par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe Girdel 30 à détection par catharomètre, muni d'une colonne en acier inoxydable (support : Porapak Q 100-120 mesh).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après avoir ensemencé le réacteur « vermiculite » avec une population bactérienne hétérogène (boue de digesteur de station d'épuration), une biomasse adaptée à la dégradation exclusive du butyrate et de ses sous-produits a été développée (MARTEL-NAQUIN, 1990). Le réacteur a ensuite été alimenté en continu, au débit de 10 l/j, avec un milieu contenant les divers éléments indispensables au développement bactérien et 12 g de butyrate/l (tableau 2), le débit de recirculation, assurant l'agitation, étant établi à 90 l/h. Un régime quasi stationnaire a été atteint après environ 25 jours (fig. 2).

Tableau 2 Composition des milieux d'alimentation initiaux (réacteur vermiculite et réacteur selles de Berl).

Table 2 Composition on the initial alimentation media ("vermiculite" and "selles de Berl" reactors).

Concentrations (g/l)	Réacteur vermiculite	Réacteur selles de Berl
Acétate	0	1,4
propionate	0	1,7
iso-butyrate	0	2,1
butyrate	4,4	2,1
caproate	0	2,7
NH ₄ Cl		0,44
KH ₂ PO ₄		0,08
MgSO ₄ , 7H ₂ O		0,05
CaCl ₂ , 2H ₂ O		0,05
FeSO ₄ , 7H ₂ O		0,01
extrait de levure		0,01
extrait de viande		0,1
NaOH 10 N	qsq pH = 7,0 ± 0,2	

En restant toujours en mode continu d'alimentation avec du butyrate, nous avons effectué un pulse d'acide crotonique, afin de voir si les bactéries adaptées au seul butyrate pouvaient spontanément le dégrader.

Le réacteur étant ouvert, on doit nécessairement observer après injection une diminution de la concentration du produit injecté, celui-ci étant entraîné par le flux de sortie.

L'équation permettant de représenter la variation de la concentration due au simple entraînement du substrat est de la forme :

$$C = C_0 \cdot e^{-t/\tau}, \text{ avec } \begin{array}{l} t = \text{temps de réaction considéré} \\ \tau = \text{temps de passage dans le réacteur (rapport du} \\ \text{volume total de liquide dans le réacteur sur le débit).} \end{array}$$

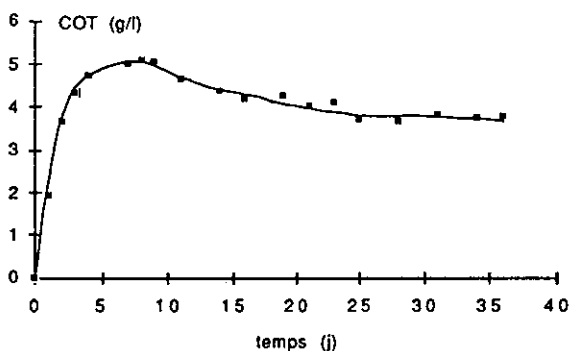


Figure 2 Variation de la concentration en carbone organique total (COT) en alimentation continue avec du butyrate à 12 g/l (réacteur « vermiculite »).
Variation of the total organic carbon (COT) concentration during continuous feeding with butyrate at 12 g/l ("vermiculite" reactor).

Après 24 heures, les valeurs mesurées sont nettement inférieures aux valeurs de simple entraînement par le flux, la concentration en crotonate s'annulant après 55 heures (*fig. 3a*). Nous avons noté en parallèle une augmentation des concentrations en butyrate et en acétate, mais pas d'augmentation sensible de la production de biogaz. Les bactéries dégradant le butyrate sont donc à même, très rapidement, de dégrader le crotonate.

Par comparaison, lors d'un pulse d'iso-butyrate effectué dans les mêmes conditions, nous avons constaté que les valeurs expérimentales se juxtaposent parfaitement à la courbe d'entraînement par le flux (*fig. 3b*), indiquant que l'iso-butyrate n'est pas dégradé par les bactéries dégradant le butyrate, ce qui est conforme aux données bibliographiques (MCINERNEY *et al.*, 1979, 1981 ; STIEB et SCHINK, 1985, 1989).

Nous avons ensuite alimenté le réacteur, non plus avec du butyrate, mais avec du crotonate à la concentration de 5,2 g/l, après l'avoir rapidement vidangé et remplacé son contenu par ce même milieu (expliquant la forte concentration initiale en crotonate).

Après un temps de latence d'environ vingt-quatre heures, pendant lequel la concentration en crotonate varie peu alors que de l'acétate et du butyrate encore présents dans le réacteur sont progressivement dégradés (*fig. 4*), la concentration en crotonate chute rapidement et s'annule au bout de 48 heures. Par contre, comme nous l'avions déjà constaté lors du pulse, la concentration en acétate augmente ainsi que, dans une moindre mesure, celle du butyrate.

Pour se placer dans des conditions comparables à celles suivies lors de l'atteinte du régime quasi stationnaire avec le butyrate, le réacteur a été une nouvelle fois vidangé, rempli avec 10 litres d'un milieu contenant 12 g/l de crotonate puis alimenté en continu, toujours au débit de 10 l/j, avec ce même milieu à 12 g/l.

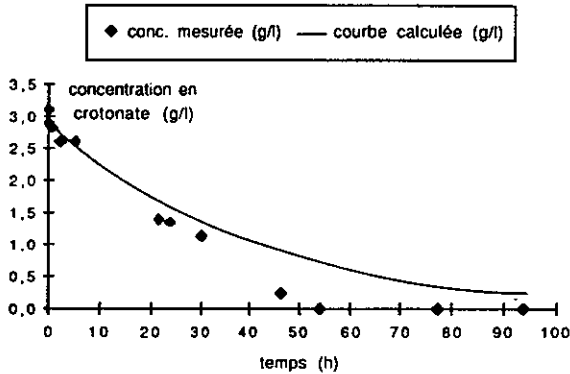
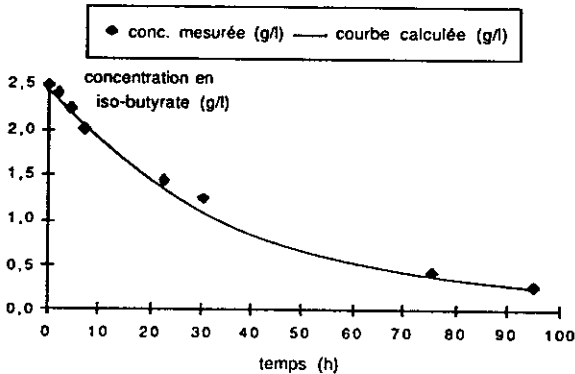
3a : pulse de crotonate (*crotonate pulse*)3b : pulse d'iso-butyrate (*iso-butyrate pulse*)

Figure 3 Comparaison entre la courbe théorique de diminution de la concentration de l'acide injecté par simple entraînement (courbe calculée) et les valeurs expérimentales (concentrations mesurées) (réacteur « vermiculite »).

Comparison between the washout curve ("courbe calculée") and the experimental results ("conc. mesurée") for the spiked acid ("vermiculite" reactor).

Une diminution très rapide (sans temps de latence) de la concentration en crotonate a été cette fois observée, celle-ci s'annulant en une vingtaine d'heures (fig. 5). Ce sont alors sensiblement les mêmes concentrations en acétate et en butyrate, que lors du régime précédemment établi avec du butyrate à la concentration de 12 g/l, qui ont été atteintes.

Avec le réacteur selles de Berli, les bactéries ont été dès le début délibérément adaptées à la biodégradation d'un mélange d'AGV (tableau 2). La capacité de cette biomasse à dégrader, entre autres, le crotonate a alors été testée, en effectuant par deux fois, après rinçage, une injection rapide de ce seul produit et en suivant l'évolution en circuit fermé pendant six heures. Ensuite, le réacteur a été alimenté en continu avec un milieu contenant 5 g de

propionate/l. Après quatre semaines, une injection identique de crotonate a été effectuée. Enfin, après avoir alimenté le réacteur en continu pendant deux semaines avec du butyrate à la concentration de 6 g/l, une nouvelle injection de crotonate a été réalisée. Pour les quatre injections dont il vient d'être question, un début de biodégradation du crotonate a été observé pendant la durée des expériences mais sans formation simultanée de butyrate, contrairement aux résultats obtenus avec le réacteur vermiculite (fig. 6).

Ces résultats montrent que les bactéries adaptées à la biodégradation d'un mélange d'AGV, jamais mises en présence de crotonate, sont néanmoins capables de le dégrader.

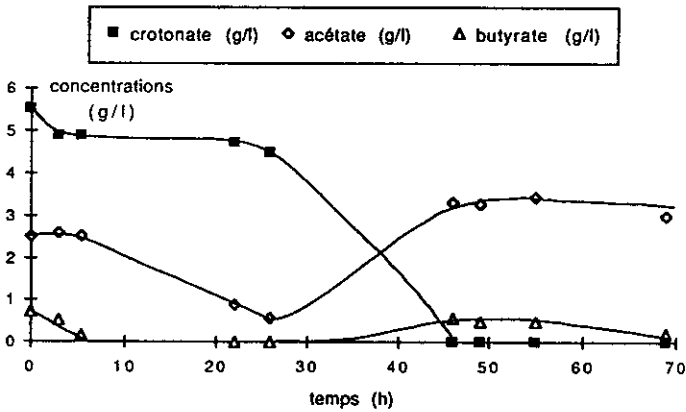


Figure 4 Variation des concentrations en acétate, butyrate et crotonate en alimentation continue avec du crotonate à 5,2 g/l (réacteur vermiculite).

Variation of the acetate, butyrate and crotonate concentrations during continuous feeding with crotonate at 5.2 g/l ("vermiculite" reactor).

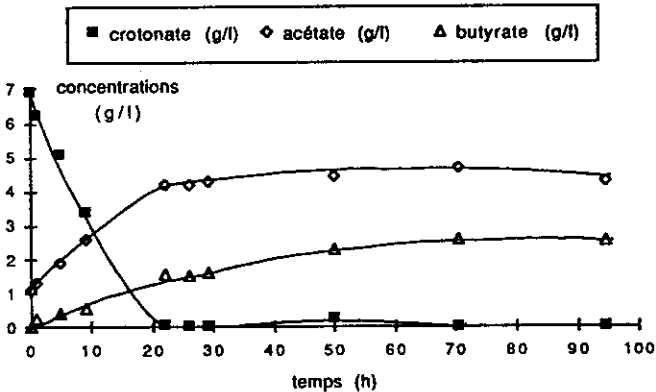


Figure 5 Variation des concentrations en acétate, butyrate et crotonate en alimentation continue avec du crotonate à 12 g/l (réacteur vermiculite).

Variation of the acetate, butyrate and crotonate concentrations during continuous feeding with crotonate at 12 g/l ("vermiculite" reactor).

CR/MEL : injections après alimentation continue avec un mélange d'AGV

CR/P : injection après alimentation continue avec du propionate

CR/B : injection après alimentation continue avec du butyrate

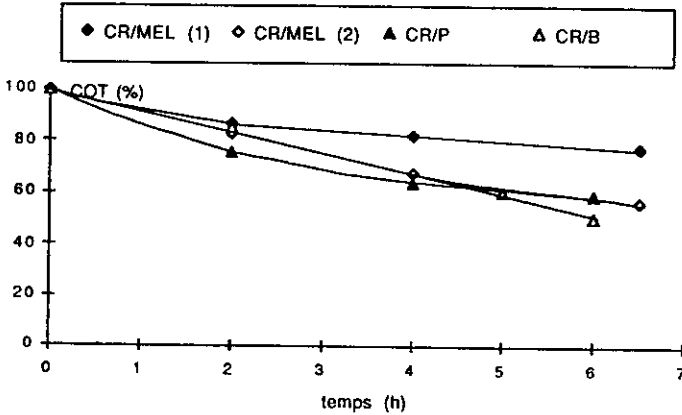


Figure 6 Variation de la concentration en carbone organique total (COT) après injections de crotonate (réacteur « selles de Berl »).

Variation of the total organic carbon (COT) concentration after injections of crotonate ("selles de Berl" reactor).

Comme les résultats obtenus avec le réacteur vermiculite le laissent supposer, ce sont donc vraisemblablement les mêmes bactéries qui dégradent le butyrate et le crotonate, ce qui est somme toute logique.

En se fondant sur les données bibliographiques existantes (BEATY et MCINERNEY, 1987) et sur l'ensemble de nos résultats, il est maintenant semblait-il possible de proposer un modèle explicatif relativement simple du mécanisme de biodégradation du crotonate.

En tout état de cause, le crotonate doit d'abord être activé en crotonyl-coenzyme A par une acétyl-CoA/crotonate-CoA transférase (dont l'existence a d'ailleurs été récemment démontrée chez *S. wolfei* (BEATY et MCINERNEY, 1987)).

Lorsque le crotonate est en faible concentration dans le milieu, il est sans doute directement dégradé en acétate, ce que montrent nos expériences effectuées avec le réacteur selles de Berl, où aucun autre produit intermédiaire n'a été détecté.

A de plus fortes concentrations, pouvant conduire à la saturation des sites enzymatiques, un équilibre s'établit avec du butyrate alors formé. Cela explique la présence de butyrate lors des expériences d'alimentation continue avec du crotonate. De plus, la rapidité de dégradation du crotonate alors constatée et la forte teneur en carbone organique de l'effluent (par rapport à la teneur théorique calculée d'après les concentrations en AGV et en crotonate) montrent clairement qu'il y a formation rapide d'un produit que nous n'avons

pas pu identifier à l'aide de notre équipement analytique. Ce produit est vraisemblablement du poly- β -hydroxybutyrate, substance de réserve énergétique peu fréquente chez les bactéries chimiotrophes, mais dont la présence a été mise en évidence chez *S. wolfei* (MCINERNEY *et al.*, 1979).

Finalement, on peut proposer pour l'ensemble des réactions considérées un schéma faisant apparaître en particulier des équilibres en amont du crotonyl-CoA (fig. 7).

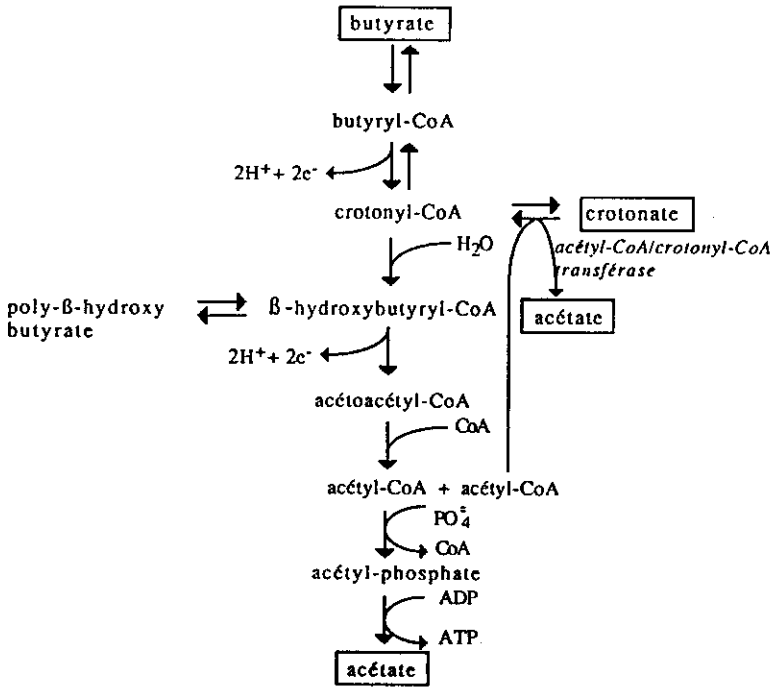


Figure 7 Schéma proposé pour la biodégradation du crotonate.
Proposed scheme for the biodegradation of crotonate.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Ministère de la Recherche et de la Technologie et la société France-Déchets pour avoir permis la réalisation de cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEATY, P.S., McINERNEY, M.J., 1987. Growth of *Syntrophomonas wolfei* in pure culture on crotonate. *Arch. Microbiol.*, **147**, p. 389-393.
- McINERNEY, M.J., BRYANT, M.P., HESPELL, R.B., COSTERTON, S.W., 1981. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **41**, n°4, p. 1029-1039.
- McINERNEY, M.J., BRYANT, M.P., PFENNIG, N., 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch. Microbiol.*, **122**, p. 129-135.
- MARTEL-NAQUIN, P., 1990. Etude de la biodégradation des acides gras volatils et de l'acide crotonique en filtre bactérien anaérobie par différentes biomasses spécialisées. Thèse de Doctorat : Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 183 pages.
- STIEB, M., SCHINK, B., 1985. Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a spore forming obligately syntrophic bacterium. *Archives of Microbiology*, **140**, p. 387-390.
- STIEB, M., SCHINK, B., 1989. Anaerobic degradation of isobutyrate by methanogenic enrichment cultures and by a *Desulfococcus multivorans* strain. *Arch. Microbiol.*, **151**, p. 126-132.