

Etude de deux fermentations

- A) Fermentation de papier filtre ;
- B) Fermentation de fougères.

NOTE DE

L. COPPENS,

Docteur en Sciences Chimiques.
Attaché à l'Institut National des Mines.

Il nous a paru intéressant de reprendre, au point de vue de la composition des gaz, cette question des fermentations des matières cellulosiques, domaine dans lequel les travaux d'Oméliansky peuvent servir de base.

Voici comment se trouvent résumés ces travaux dans « La microbiologie appliquée à la fertilisation du sol » de Ed. Kayser.

« Décomposition de la cellulose par voie anaérobie.

C'est Omélianski qui a cherché à isoler le microbe spécifique, en partant de l'idée que le véritable ferment de la cellulose devait être anaérobie et qu'il ne devait pas avoir besoin de beaucoup de matières organiques solubles.

Dans un ballon à long col. il met la solution nutritive suivante, contenant par litre :

Phosphate de potasse	1	gramme.
Sulfate de magnésie	0,5	gramme.
Sulfate d'ammoniaque	1,0	gramme.
Chlorure de sodium		Traces.

Ce mélange est additionné d'un peu de craie et de papier suédois; le sulfate d'ammoniaque peut être remplacé par un demi-gramme de peptone ou d'asparagine.

Le ballon est presque complètement rempli, et l'ensemencement se fait assez largement avec de l'eau de purin ou du limon de fleuves; un tube abducteur permet d'extraire les gaz à la trompe et de les recueillir sous le mercure; la température est maintenue à 34°-35°.

Le dégagement gazeux ne commence quelquefois qu'après plusieurs semaines.

On aperçoit d'abord un léger trouble; le papier semble se couvrir d'un voile, de taches; bientôt on y voit des trous plus ou moins grands selon l'espèce microbienne; le papier est pointillé avec des intermédiaires intacts; il tombe en miettes, devient jaunâtre, très fragile, en même temps qu'il se dégage une odeur de fromage.

Voici les gaz trouvés pour 100 dans une expérience :

CH ⁴	H ²	CO ² + H ² S	O	N ²
71,44	4,75	6,32	0,30	17,17

Oméliansky a constaté, en outre, ceci : c'est que, en portant la semence chauffée au préalable à la température de 75° pendant quinze à vingt minutes, on obtient plus d'hydrogène et moins de CH⁴. En répétant ce chauffage de la même manière pendant plusieurs générations successives, il est arrivé à trouver de l'hydrogène sans trace de CH⁴. La conclusion à tirer, c'est qu'il avait affaire à deux ferments différents : l'un, beaucoup plus résistant à l'action de la chaleur, donnant de l'hydrogène; l'autre, d'incubation moins longue et prenant facilement le dessus, lorsqu'il ne portait pas à 75°. La chaleur était donc un moyen tout indiqué pour arriver à leur séparation. Voici les résultats de deux fermentations ensemencées, l'une avec semence chauffée (ballon A) et l'autre avec semence non chauffée (ballon B) :

	Ballon A.		Ballon B.	
	CO ²	H ²	CO ²	CH ⁴
Après 15 jours .	68,9	30,9	40,8	59,5
Après 30 jours .	63,0	37,4	67,4	32,9

Ces fermentations celluloses sont de durée très longue, et souvent après trois ans, elles ne sont pas encore terminées.

A. — Fermentation avec production d'hydrogène

(Ballon A, semence chauffée)

Elle se fait sous l'influence d'un bâtonnet fin et droit, de 0,5 μ de large sur 4 à 8 μ de long, avec une spore à l'extrémité. Il s'allonge avec l'âge et peut atteindre jusqu'à 10 à 15 μ , sans former de chaînes; quelquefois il est coudé, sporulé. La spore ronde dans les vieilles cultures a 1,5 μ de diamètre; dès qu'elle devient libre, elle tombe au fond, résiste à un chauffage à 90° pendant vingt-cinq minutes et meurt à 100°.

Ce microbe est facilement colorable par le violet de gentiane, la fuchsine, mais ne se colore pas en bleu par l'iode, ce qui prouve qu'il n'a rien de commun avec l'**Amylobacter**.

L'examen microscopique montre qu'il est collé aux fibres du papier tantôt en longueur, tantôt en forme spiralee. Au point de vue bactériologique, on doit dire qu'il se cultive difficilement sur les milieux solides; il pousse toutefois sur des tranches de carottes, de pommes de terre, de choux, sous la forme de petites colonies jaunâtres, hyalines, déjà visibles à la loupe; il présente une grande tendance à dégénérer en donnant lieu aux formes d'involution.

Il préfère la cellulose aux autres hydrates de carbone comme les sucres, composés avec lesquels sa culture est plutôt délicate; lorsqu'on renouvelle de temps à autre le liquide nutritif pour éliminer les produits formés, on peut pousser la décomposition jusqu'à 96 p. c. L'analyse des gaz montre, au début surtout, de l'hydrogène et, à la fin, de l'acide carbonique. Ceci est dû sans doute aux coefficients de solubilité différents des deux gaz, car CO² est beaucoup plus soluble dans les liquides que l'hydrogène.

Les deux acides formés, acide acétique et acide butyrique, varient dans des limites assez étendues :

AA	1	3
— de — à —		
AB	4	1

Pour nous faire une idée d'une fermentation pareille, nous donnons ci-dessous le bilan complet, tel qu'il ressort d'une expérience d'Oméliansky :

Cellulose à l'origine	3 gr. 4723
Cellulose non décomposée	0 gr. 1272
	<hr/>
Cellulose disparue	3 gr. 3451
Produits formés :	
Acides gras (A. acét. et A. butyr.)	2 gr. 2402
CO ²	0 gr. 9722
H ²	0 gr. 0138
	<hr/>
	3 gr. 2262

Bilan : 3,3451 — 3,2262 = 0,1209.

Ce manquant de 0,1209 doit être mis au compte des produits odorants volatils comme l'alcool, l'acide valérianique, etc.

B. — Fermentation avec production de CH⁴

(Ballon B, semence non chauffée)

Le mode opératoire pour obtenir ce ferment est le même, avec cette différence que, dans les générations successives, la semence ne subit jamais l'action du chauffage.

L'incubation du microbe est relativement courte et la fermentation part vite; c'est un bâtonnet assez fin, rarement en chaînes, souvent coudé et présentant des formes en baguettes de tambour de 5 μ de long, sur 0 μ 3 de large; la spore à 1 μ de diamètre.

Il se colore de la même manière que le précédent et se comporte dans les milieux liquides et solides exactement comme lui, avec cette différence qu'il donne du CO² et du méthane; la quantité de méthane produite au début est plus forte que celle de l'acide carbonique; mais bientôt on se rapproche des proportions centésimales suivantes :

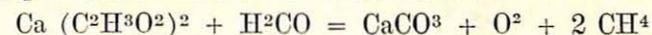
CH ⁴	30 p. c.
CO ²	70 p. c.

C'est-à-dire qu'il n'y a pas des volumes égaux de ces deux gaz, comme l'avait conclu Hoppe-Seyler.

Nous donnons également le bilan complet de cette fermentation, comme pour la précédente :

Cellulose à l'origine	2 gr. 0815
Cellulose non décomposée	0 gr. 0750
	<hr/>
Cellulose disparue	2 gr. 0065
Produits formés :	
Acides volatiles	1 gr. 0223
CH ⁴	0 gr. 1372
CO ²	0 gr. 8678
	<hr/>
	2 gr. 0279

Nous voyons que les gaz constituent à peu près les 50 p. c. de la cellulose disparue et les acides volatils les 50 autres; ces derniers sont de l'acide acétique et de l'acide butyrique; ils disparaissent eux-mêmes en donnant :



Ces recherches d'Oméliansky nous apprennent donc qu'ils existe au moins deux espèces de ferments anaérobies attaquant la cellulose. »

Ces faits peuvent être en relation étroite avec la composition des grisous. On serait porté à conclure que les grisous originels contenaient de l'hydrogène. Celui-ci, par suite de sa faible tendance à l'adsorption et de sa grande vitesse de diffusion, aurait migré partiellement hors des couches pendant les périodes géologiques. Il serait donc naturel que l'on ne trouve plus que de petites quantités de ce gaz. Ce qui est moins naturel, c'est que dans la plupart des grisous on ne retrouve plus la moindre trace d'hydrogène (1).

Ceci nous a amené à étudier (très sommairement d'ailleurs) :

- 1° Une fermentation de cellulose;
- 2° Une fermentation de feuilles de fougères mortes.

Ces deux fermentations ont été ensemencées avec de l'eau de purin.

(1) Or, les méthodes d'analyse employées pour les grisous permettent de déceler 0,001 p. c. d'hydrogène.

I. — Fermentation de cellulose.

Le dispositif employé est représenté par la figure 1.

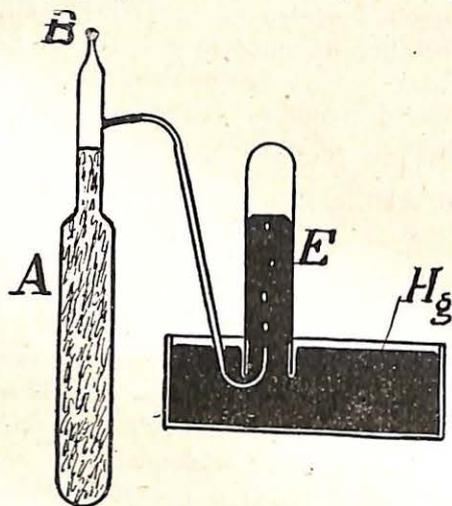


Fig. 1.

Dans l'ampoule A on a mis :

1° 5 grammes de papier filtre;

2° Une solution nutritive (1) contenant :

Phosphate de sodium	0,8 gr.
Chlorure de potassium	Traces
Sulfate d'ammonium	1,0 gr.
Sulfate de magnésium	5,0 gr.

3° Un peu de craie pour neutraliser les acides libérés pendant la fermentation.

Après avoirensemencé, on a scellé en B et le tube abducteur des gaz a été recouvert de son éprouvette à mercure E (22-4-1931).

La fermentation a été maintenue à 30° environ jusqu'au 12 mai 1931, date à laquelle le premier dégagement de gaz se produit. Ensuite on a abandonné la fermentation à la température ambiante. Les variations de celle-ci influent assez

(1) Solution légèrement différente de celle employée par Oméliansky.

sensiblement sur la vitesse de fermentation. Ainsi à 10° le dégagement gazeux cesse complètement pour reprendre aussitôt que la température s'élève. Cette fermentation continue encore actuellement (mars 1932) avec une vitesse dépendant de la température de la place.

L'analyse des gaz recueillis a été faite par distillation fractionnée à basse température et utilisation du gel de silice pour l'isolement de l'hydrogène (1).

Nos observations et les résultats de l'analyse des gaz sont résumés dans le tableau que l'on trouvera plus loin.

II. — Fermentation de feuilles de fougères mortes.

Le dispositif employé est représenté par la figure 2.

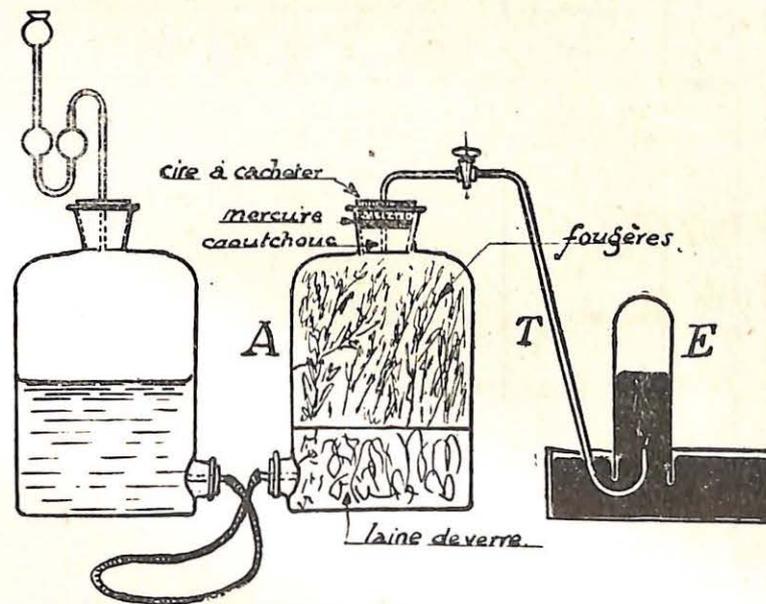


Fig. 2.

(1) Les gaz étaient d'abord débarrassés de l'anhydride carbonique (et H² S) dont le volume important pouvait gêner les opérations du fractionnement.

Les fougères, déjà visiblement altérées par l'oxydation de l'air, ont été finement hachées et mises dans le flacon A. On a ajouté une solution nutritive contenant par litre :

- Sulfate de magnésium 5 gr.
- Sulfate d'ammoniaque 1 gr.
- Chlorure de sodium 30 gr.

Après addition d'un peu de craie on aensemencé. Finalement, par la manœuvre du flacon de niveau, l'air a été chassé par le tube T et celui-ci, débouchant sous la cuve à mercure, a été recouvert de son éprouvette à mercure E (30-4-1931).

Le premier dégagement gazeux s'est manifesté vers le 5 mai 1931. La fermentation, qui jusqu'alors avait été main-

Dénomination de l'échantillon	Durée de dégagement de l'échantillon	Volume total réduit sec à 0° et 760 m/m de Hg	Composition en cm³						
			O ₂	N ₂	H ₂	CO	CH ₄	C _x H _y	CO ₂ et H ₂ S
Fermentation de papier									
F ₁	22-4-1931 au 28-5-1931	22,96 cm ³	—	8,92	—	—	1,35	—	12,62
F ₂	28-5-1931 au 19-6-1931	18,14 cm ³	Analyse non faite						
F ₃	19-6-1931 au 1-7-1931	16,65 cm ³	—	,35	,03	—	1,80	—	14,44
F ₄	1-7-1931 au 20-2-1932	220,15 cm ³	—	,98	,02	—	90,23	—	128,88
Fermentation de fougères									
F' ₁	30-4-1931 au 5-7-1931	411,70 cm ³	,18	53,97	—	,42	330,09	,02	27,00
F' ₂	5-7-1931 au 30-7-1931	243,50 cm ³	—	6,48	—	n.d.(2)	213,29	—	23,76

(1) Résultat douteux : la détermination a été faite sur 63,45 cm³; après absorption du CO par le chlorure cuivreux, il restait 68,38 cm³; différ. = 0,07 cm³. Les erreurs d'observation pourraient à la rigueur atteindre cette différence.

tenue à 30° environ, a été abandonnée à la température ambiante.

La vitesse du dégagement gazeux, assez lente au début (1), s'accroît ensuite (2), pour diminuer de nouveau jusqu'à l'arrêt complet (3).

Nos observations et les résultats de l'analyse des gaz sont résumés dans le tableau ci-dessous.

- (1) Production de 411,7 cm³ du 30-4-1931 au 5-7-1931.
- (2) Production de 243,5 cm³ du 5-7-1931 au 30-7-1931.
- (3) Après le 30-7-1931, la fermentation s'est arrêtée assez rapidement. Les 120 cm³ (environ) de gaz dégagés après cette date n'ont plus été analysés. Les fougères qui émergeaient du liquide étaient recouvertes de petites colonies blanches.

Composition %							Composition % CO ₂ et H ₂ S déduits					
O ₂	N ₂	H ₂	CO	C _x H _y	C _x H _y	CO ₂ et H ₂ S	O ₂	N ₂	H ₂	CO	CH ₄	C _x H _y
de papier												
—	38,97	—	—	5,90	—	55,13	—	86,85	—	—	13,15	—
Analyse non faite												
—	2,11	,18	—	10,83	—	86,88	—	16,08	1,37	—	82,55	—
—	,45	,01	—	40,99	—	58,55	—	1,09	,02	—	98,89	—
de fougères												
,04	13,11	—	,10 (1)	80,18	,005	6,56	,04	14,03	—	,11 (1)	85,81	,005
—	2,66	—	n.d. (2)	87,58	—	9,76	—	2,95	—	n.d. (2)	97,05	—

(2) L'absence de CO peut se déduire dans les limites des erreurs d'observation des résultats de la combustion (pris pour la combustion : 77,01 cm³; $\frac{\text{contract.}}{2,007} = 74,80 \text{ cm}^3$;

$\frac{\text{CO}_2}{0,9951} = 74,67$; différ. = 0,13).

On remarquera l'absence (quasi (1) complète) d'hydrocarbures autres que le méthane, tant dans les gaz de la fermentation de fougères que dans ceux de la fermentation de cellulose. A part cela, si l'on déduit l'anhydride carbonique et l'hydrogène sulfuré, la composition de F⁴ et de F² se rapproche de celle des grisous (2).

L'allure des deux fermentations est fort différente au point de vue de la production de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène sulfuré (voir tableau) (3).

L'hydrogène était complètement absent dans la fermentation de fougères. Par contre les échantillons F³ et F⁴ en contenaient des traces (4).

Nous n'avons pas encore étudié l'influence de la température sur la composition des gaz dégagés.

Ceci n'est d'ailleurs qu'une recherche de curiosité par laquelle nous avons voulu voir si des fermentations de matières cellulosiques donnaient aisément des gaz se rapprochant de nos grisous. Il nous a paru intéressant de publier les résultats obtenus sans vouloir d'ailleurs attribuer à cette modeste note une importance disproportionnée aux moyens mis en œuvre.

(1) Pour l'échantillon F¹ seul on a renseigné la présence d'hydrocarbures autres que CH⁴ (.02 cm³ c. à d. .005 p. c.). Comme nous l'avons dit plus haut, l'échantillon (ici 411,7 cm³) était d'abord débarrassé de CO² et H²S. Nous avons pourtant retrouvé .5 cm³ environ de CO² après le fractionnement. L'absorption préalable de CO² avait donc été incomplète. Il est possible que les .02 cm³ de Cx Hy isolés aient été du méthane retenu par dissolution dans les .5 cm³ de CO² solide. Etant donné le petit volume, nous n'avons pu vérifier par combustion la nature de ces .02 cm³.

(2) Il est évident qu'il ne peut être question ici d'hélium qui est un gaz d'infiltration dans le cas des grisous.

(3) La fermentation de fougères seule dégageait des quantités appréciables de H² S (noircissement des éprouvettes à mercure).

(4) Il faut remarquer que les .03 cm³ de H² renseignés pour l'échantillon F³ ont été déterminés par combustion, après isolement par le gel de silice. Il est inutile d'insister sur le fait que la moindre erreur d'observation lors de la combustion modifie dans de larges mesures la teneur en H² après la déduction de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène sulfuré.

SERVICE DES ACCIDENTS MINIERS ET DU GRISOU

LES ACCIDENTS SURVENUS

DANS LES

CHARBONNAGES DE BELGIQUE

pendant l'année 1927

PAR

G. RAVEN

Ingénieur en Chef-Directeur des Mines, à Bruxelles.

Accidents survenus dans les travaux
souterrains.

(Suite) (1).

Les accidents survenus dans les puits intérieurs.

Ces accidents sont au nombre de 11, ce qui représente 5,6 % du nombre total des accidents survenus dans les travaux souterrains.

Ils ont causé la mort de 10 ouvriers et occasionné des blessures graves à un autre.

Pour 10.000 ouvriers de l'intérieur, la proportion de tués a été de 0,81.

Le nombre des ouvriers qui ont trouvé la mort dans les accidents de l'espèce représente 4,8 % du nombre total

(1) Voir *Annales des Mines de Belgique*, tome XXXII (année 1931), 3^e et 4^e livraisons.