

LES RECHERCHES A L'IRD SUR LA DEPOLLUTION ET LA VALORISATION DE DECHETS AGRICOLES ET AGRO-INDUSTRIELS

P. Roger, D. Alazard, I. Gaime-Perraud, J-L Garcia, M. Labat et S. Roussos
Laboratoire de Microbiologie de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
Université de Provence, CESB/ESIL, Case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288, Marseille Cedex 9
Communication à la Conférence-Débat: "L'environnement: une priorité pour l'agriculture; traiter et recycler les déchets". Salon International de l'Agriculture 1-6 Mars 1999. Multigr. 13 pp.

Résumé

L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) a pour objectif la conduite de recherches avec des partenaires scientifiques des pays du Sud sur des thèmes importants pour le développement de ces pays. Depuis une quinzaine d'années, la dépollution et la valorisation des déchets agricoles et agro-industriels constituent l'un des trois principaux thèmes de recherche des microbiologistes regroupant leurs activités au sein d'un Programme de l'IRD intitulé « Utilisation de la biodiversité microbienne pour la valorisation des ressources tropicales ».

Ces recherches sont orientées d'une part vers les activités microbiennes anaérobies et la méthanisation, et d'autre part vers les processus microbiens dits de « fermentation en milieu solide » (FMS) impliquant principalement des champignons et des groupes bactériens tels que les bactéries lactiques. Ces deux orientations conditionnent le classement en trois grands groupes des résidus agricoles et agro-industriels pouvant constituer une source de pollution importante dans les pays du Sud et du Nord (Tableau 1).

Tableau 1. Dépollution et/ou valorisation de résidus agricoles et agro-industriels

Type de résidus	Exemples	Dépollution	Valorisation
Résidus ligno-cellulosiques détruits par brûlis -> CO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Pailles de céréales • Bagasse de canne à sucre 		<ul style="list-style-type: none"> • Substrat et support pour la fermentation en milieu solide (FMS)
Résidus biodégradables non toxiques responsables de l'eutrophisation des milieux	<ul style="list-style-type: none"> • Résidus d'abattoirs • Eaux chargées en amidon 	Dépollution anaérobie en digesteurs	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation du biogaz et du compost produits par le traitement anaérobie
	<ul style="list-style-type: none"> • Pulpe de betterave • Cossette de manioc • Tourteau de coprah • Tourteaux de fruits tropicaux (ananas ...) 		Utilisation en FMS pour: <ul style="list-style-type: none"> • enrichissement protéique et production d'aliment du bétail • la production de métabolites: enzymes, arômes...
Résidus ayant des propriétés toxiques et difficiles à dégrader (riches en aromatiques et/ou en tannins)	<ul style="list-style-type: none"> • Margines et grignons d'olives • Résidus de préparation du beurre de karité 	Dépollution anaérobie en combinaison avec des étapes de dépollution aérobie	<ul style="list-style-type: none"> • Extraction directe ou traitement biotechnologique pour la production de précurseurs de molécules à haute valeur ajoutée
	<ul style="list-style-type: none"> • Pulpe de café 		<ul style="list-style-type: none"> • Substrat pour la production de Pleurotes • Stabilisation par ensilage, détoxification fongique et utilisation comme aliment du bétail • Utilisation en FMS pour la production de molécules à haute valeur ajoutée (enzymes...)

Différents exemples de projets de recherche achevés ou en cours sont résumés en indiquant pour chacun d'eux (1) la nature du problème, (2) l'approche microbiologique du problème et (3) l'état de la valorisation pratique de ces résultats (Tableau 2).



Tableau 2. Opérations de recherche sur la dépollution et la valorisation de résidus agricoles et agro-industriels

Type de résidus	Problème à résoudre	Approche du programme de recherche	Valorisation
Résidus de panses de bovin	Résidu très chargé en matières en suspension	Modélisation et dimensionnement en fermenteur de laboratoire	Abattoirs de Thiès (Sénégal)
Effluents vinicoles	Effluent liquide riche en substrats favorisant l'accumulation d'acides gras volatils bloquant la méthanisation	Préparation d'un inoculum anaérobie adapté	Procédé commercialisé par une PME française
Eaux chargées en amidon des unités d'extraction d'amidon de manioc	Biodégradabilité en présence de cyanure. Conservation de l'inoculum dans un dispositif rustique recevant un effluent liquide en continu	Adaptation de la microflore anaérobie au cyanure. Mise au point d'un filtre anaérobie en bambous (CIRAD)	En cours de vulgarisation
Margines d'huile d'olive	Résidu liquide chargé en composés aromatiques toxiques	Dépollution par un procédé aérobie/anaérobie/aérobie Production de molécules aromatiques à forte valeur ajoutée	Dépollution au stade pilote Valorisation au stade recherche
Résidus d'extraction du beurre de karité	Résidu chargé en tannins toxiques	Isolement de souches anaérobies adaptées	Au stade recherche
Pulpe de café	Résidu fermentescible riche en substances anti-physiologiques (caféine, tannins)	Conservation par ensilage et détoxification par FMS Substrat pour la production de champignons comestibles	Utilisation en alimentation du bétail au stade pilote Au stade de l'exploitation
Bagasse de canne à sucre	Résidu ligno-cellulosique mal valorisé	Utilisation comme support ou substrat en FMS	Quelques applications valorisées au stade industriel
Tourteaux de coprah	Résidu relativement riche en éléments nutritifs et mal valorisé	Enrichissement en protéines par FMS Utilisation comme substrat FMS pour la production de molécules à forte valeur ajoutée	Financièrement non compétitif comparé au tourteau de soja Au stade recherche

Les recherches à l'IRD sur la méthanisation de sous-produits agricoles et agro-industriels tropicaux ont initialement été orientées vers la biodépollution. Les premiers travaux ont utilisé des consortiums microbiens non définis provenant de différents écosystèmes et adaptés aux produits à dépolluer. Ce n'est que récemment qu'un inoculum caractérisé a été utilisé avec succès. Ces travaux ont débouché soit sur la valorisation en milieu industriel, soit sur des essais en cours à l'échelle pilote. Les études récentes s'orientent vers la valorisation et l'on essaye d'extraire à partir des polluants aromatiques, soit directement, soit après traitement microbiologique, des produits à forte valeur ajoutée et des précurseurs de ces produits qui comprennent des arômes et des antioxydants utilisables en alimentation humaine ou animale ou des polymères utilisables en cosmétologie et en chimie fine.

Les recherches à l'IRD ont mis en évidence de nombreuses souches fongiques et microbiennes offrant de nombreuses applications potentielles en fermentation en milieu solide pour la valorisation de sous-produits agricoles et agro-industriels tropicaux. Les produits obtenus couvrent un éventail très vaste incluant la biomasse fongique (inoculum, carpophores, biopesticides), des enzymes fongiques et des métabolites d'intérêt industriel, pharmaceutique et alimentaire. La valorisation de certains de ces résultats se heurte aux problèmes de changement d'échelle et de mise au point de procédés économiquement viables, mais un certain nombre de résultats ont déjà donné lieu à des applications commerciales.

Les résultats fondamentaux et appliqués obtenus sur des produits tropicaux ainsi que les stratégies de recherche utilisées pourraient être le plus fréquemment généralisés à des sous-produits des régions tempérées.

1. Introduction

L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) a pour objectif la conduite de recherches avec des partenaires scientifiques des pays du Sud sur des thèmes importants pour le développement de ces pays. Depuis une quinzaine d'années, la dépollution et la valorisation des déchets agricoles, agro-industriels et industriels constitue l'un des trois thèmes de recherche principaux des microbiologistes du Programme de l'IRD « Utilisation de la biodiversité microbienne pour la valorisation des ressources tropicales ».

Ces recherches répondent à l'attente de partenaires effectifs ou potentiels des PED et de la Métropole. Les producteurs d'huile d'olive du pourtour méditerranéen par exemple, attendent un procédé de dépollution des résidus de fabrication qu'ils ne peuvent plus rejeter rivière ou en mer. Le Burkina-Faso est confronté à un problème de pollution de ses cours d'eau par les résidus d'extraction du beurre de karité. Plusieurs industriels mexicains (levurerie, pétrochimie, peintures...) désirent améliorer la dépollution de leurs effluents. Les coopératives agricoles colombiennes veulent épurer les effluents issus du traitement du manioc. L'activité du Laboratoire de Microbiologie IRD de Marseille intéresse également des PME françaises pour résoudre des problèmes de dépollution spécifiques.

Depuis une dizaine d'années, les recherches en microbiologie de l'IRD susceptibles de contribuer à la dépollution et la valorisation des résidus agricoles et agro-industriels, se sont orientées d'une part vers les activités microbiennes anaérobies et la méthanisation, et d'autre part vers les processus microbiens dits de « fermentation en milieu solide » (FMS) impliquant principalement des champignons mais également des groupes bactériens tels que les bactéries lactiques. Ces deux orientations conditionnent le classement en trois grands groupes des résidus agricoles et agro-industriels pouvant constituer une source de pollution importante dans les pays du Nord et du Sud (Tableau 1):

- Les résidus ligno-cellulosiques détruits par brûlis en plein air, polluants par la production de CO₂ et de fumées. Entrent dans cette catégorie les pailles de céréales brûlées au champ et certains résidus agro-industriels produits en trop grande quantité pour être entièrement consommés comme source d'énergie dans les usines de traitement, tels que la bagasse de canne à sucre. Ces types de déchets peuvent être méthanisés mais sont particulièrement adaptés à la valorisation comme supports de FMS.
- Les résidus et effluents agro-industriels biodégradables non toxiques, nuisibles par l'accumulation de matière organique en décomposition causant des nuisances olfactives et/ou la pollution des cours d'eau. Entrent dans cette catégorie les pulpes de betterave ou les eaux résiduaires des unités d'extraction d'amidon. Ces produits peuvent être dépollués par méthanisation ou, dans certains cas, valorisés par enrichissement en protéines et utilisation comme aliment du bétail.
- Les résidus agro-industriels ayant des propriétés toxiques ou biocides et difficiles à dégrader. Ce sont généralement des résidus riches en structures aromatiques et/ou en tannins. Ces résidus sont soit stockés sur site, soit évacués en décharges contrôlées et leur dégradation ultérieure est très souvent problématique. Les margines d'huile d'olive riches en polyphénols et les résidus d'extraction du beurre de karité sont des exemples de ce type de produits. Ces produits peuvent être dépollués par des processus mixtes faisant appel à une phase de méthanisation. Dans certains cas, on peut également envisager leur valorisation par production de substances à haute valeur ajoutée ou, après détoxification, comme aliment du bétail. C'est en particulier le cas de la pulpe de café.

2. Méthanisation et traitement anaérobie

2.1. Généralités sur la méthanisation

Les techniques de dépollution aérobie en station d'épuration ne sont pas adaptées à tous les types de polluants et ne sont pas toujours financièrement acceptables car elles sont coûteuses en énergie et en surface au sol utilisée. De plus, elles produisent de grandes quantités de boues qui, à leur tour, posent un problème de pollution.

La digestion anaérobie, processus biologique au cours duquel les polluants organiques sont transformés en CH₄ et CO₂ constitue une alternative intéressante. Elle permet la dépollution d'effluents plus ou moins riches en matière organique, ainsi que la production d'énergie sous forme de biogaz et de compost utilisable pour l'agriculture. Elle utilise des réacteurs clos qui occupent nettement moins d'espace au sol que les stations d'épuration classiques et qui ne produisent que de très faibles quantités de boues. Par contre ces dispositifs nécessitent souvent une épuration aérobie complémentaire (Tableau 3).

L'éventail des résidus susceptibles d'être dépollués par fermentation méthanique est très vaste. Les chercheurs de l'IRD ont ainsi, depuis plus de quinze ans, abordé successivement la digestion anaérobie d'algues marines, de résidus d'abattoirs, d'euphorbe (Sow et coll. 1989), de pelures de manioc (Cuzin et coll. 1992a), de pulpe de betterave (Labat et coll. 1984, Ollivier et coll. 1985, Labat et Garcia 1986), d'eaux usées de traitement du maïs (Miambi et Labat 1991), de fientes de volailles, d'eaux usées urbaines (Guyot et al 1990a, b, c), d'effluents d'industries diverses: huileries (Hamdi et al 1992), levurerie, caves vinicoles, pétrochimie et peinture (Noyola et coll. 1990, Macarie et coll. 1992).

Les études récentes ont plus particulièrement porté sur les déchets fortement polluants riches en composés aromatiques, corps gras ou protéines. Trois modèles, permettant d'accéder à trois familles de composés aromatiques, ont été testés :

- Les margines, effluent liquide riche en composés polyphénoliques
- Le tourteau de karité, résidu solide riche en tannins
- Le tractus digestif des termites, insecte capable de dégrader les structures aromatiques issues de la dégradation plus ou moins poussée d'un matériel végétal ligno-cellulosique.

Les études sur la méthanisation ont généralement été menées suivant les étapes suivantes:

- * Etude de faisabilité (charge volumique, neutralisation, temps de séjour)
- * Préparation d'inoculum adaptés
- * Isolement, caractérisation et études physiologiques de bactéries originales
- * Optimisation des procédés
- * Suivi d'opérations pilotes
- * Transfert de technologies

Les études récentes s'orientent vers la valorisation et l'on essaye d'extraire à partir des polluants aromatiques, soit directement soit après traitement microbiologique, des produits à forte valeur ajoutée et des précurseurs de ces produits qui comprennent des arômes et des antioxydants utilisables en alimentation humaine ou animale ou des polymères utilisables en cosmétologie et en chimie fine.

Tableau 3. Comparaison biodépollution aérobie - biodépollution anaérobie

	Biodépollution aérobie	Biodépollution anaérobie
Taille et coût des installations	Grande occupation au sol, coût élevé	Faible occupation au sol et coût plus modéré,
Agitation mécanique	Impérative et coûteuse	Nulle ou faible
Aération	Activité limitée par l'oxygène dissous. Fort niveau d'aération requis	Prohibée
Contrôle de la chaleur	Refroidissement parfois nécessaire	Réchauffement parfois nécessaire. Peut être assuré par le biogaz
Consommation d'énergie	Elevée	Faible
Bactéries pathogènes	Conservées	Éliminées
Boues	Produites en grande quantité	Peu de boues
Produits d'intérêt	Néant	Biogaz + compost
Temps de séjour	En heures	< 1 jour seulement pour les dispositifs les plus performants
DCO traitées	Faibles < 10 g/l	Fortes > 20g/l
Effluent	Fortement dépollué (95% DBO5). Peut souvent être relargué dans l'environnement	Dépollution complémentaire parfois nécessaire

2.2. Méthanisation des panses de bovins d'abattoirs

2.2.1. Le problème

Dans les pays du Sud, l'abattage contrôlé est caractérisé par le rejet de déchets « solides » composés principalement de contenus de panses et d'effluents à forte teneur en matières organiques polluantes rarement valorisés (à noter que cette matière organique peut être importante pour le maintien de la fertilité des sols dans ces régions). Les entreprises d'abattage ont souvent une situation financière fragile et ne peuvent supporter d'importants investissements pour le traitement ou la valorisation de leurs déchets dans des stations d'épuration conventionnelles coûteuses et complexes à exploiter.

Par ailleurs, ces entreprises ont des besoins énergétiques (chaleur, froid, force motrice) qui pèsent lourdement sur les charges d'exploitation lorsqu'ils sont couverts par les combustibles pétroliers et l'électricité du réseau (voir les conclusions de l'atelier "Valorisation agro-énergétique des déchets d'abattoirs en zone tropicale" tenu à Thiès au Sénégal en Novembre 1991).

Dans ce contexte, la méthanisation des déchets solides avec récupération du biogaz et couplée à un système d'épuration aérobie des eaux permettant leur rejet dans le milieu naturel, offrait des potentialités intéressantes.

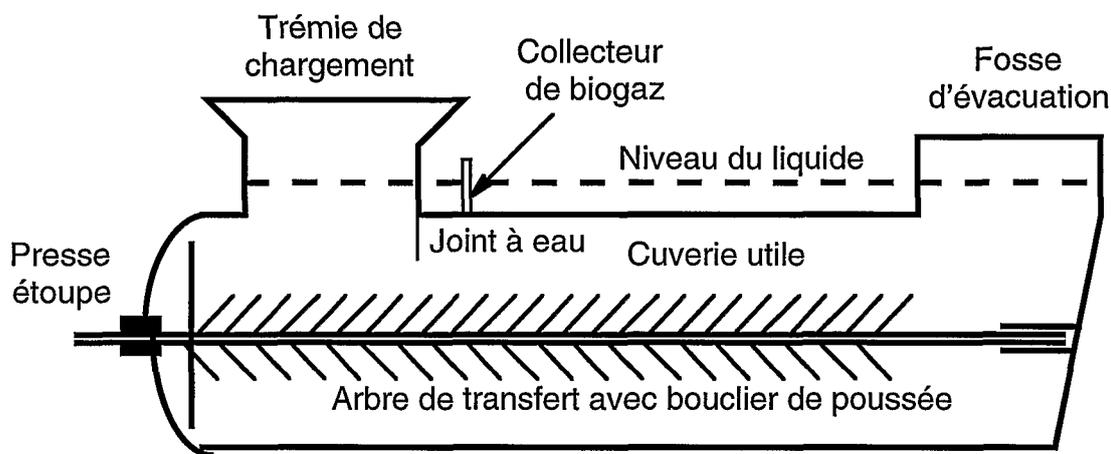
2.2.2. L'approche

La faisabilité de cette biodépollution a été étudiée dans des fermenteurs de un litre au laboratoire. Ces travaux ont permis de préparer un inoculum adapté et de déterminer les paramètres optimaux de la

méthanisation (charge et temps de séjour). Des essais en pilote de 1m³ utilisant le procédé Transpaille (cf. encart), en collaboration avec le CIRAD, ont permis de calculer le dimensionnement du digesteur à installer sur site.

LE PROCÉDE SEMI-CONTINU TRANSPAILLE

Le procédé semi-continu TRANSPAILLE (Forest *et al*, 1984) consiste en une cuve cylindrique métallique équipée d'une trémie de chargement et d'une fosse d'évacuation aux extrémités. A l'intérieur de la cuve, un dispositif de transfert actionné par un vérin et une pompe hydraulique manuelle permet la compression et le transit du substrat en immersion. On effectue généralement une charge par jour, ce qui entraîne l'évacuation d'un volume équivalent de substrat fermenté à l'autre extrémité de la cuve, le jus de fermentation restant dans la cuve. La consommation d'eau est légèrement supérieure au procédé discontinu du fait de l'évaporation à la trémie et à la fosse d'évacuation. Le fermenteur peut être couplé à un gazomètre de stockage en PVC souple.



2.2.3. L'application et le transfert

En 1989, un projet pilote de méthanisation par voie solide des déchets des abattoirs de Thiès (Sénégal) a été financé par plusieurs bailleurs de fonds français et exécuté par la société Agriforce (Farinet *et al*, 1991). Les abattoirs de la ville de Thiès, gérés par la SERAS, société privée sénégalaise, ont une capacité de 2000 tonnes de carcasses par an. L'essentiel des déchets organiques des abattoirs est collecté à la source: les excréments sur les parcs d'attente, les matières stercoraires dans la triperie et une partie du sang sur les aires d'abattage. Ces déchets constituaient initialement 84% de la charge organique des eaux résiduaires. Ils sont méthanisés par le procédé continu Transpaille dans un réacteur de 40 m³ de capacité utile. Les résidus fermentés solides sont récupérés et utilisés comme compost après maturation. Les effluents liquides sont épurés par un système de lagunage naturel et un bassin à macrophytes (*Pistia*). Le biogaz alimente un groupe électrogène de 16 kW équipé d'un moteur à gaz qui fournit les abattoirs en électricité.

Les résultats moyens d'exploitation (1990/91) sont résumés ci-après:

- débit traité: 1,5 tonne/j à 15% MS soit 220 kg MS/j; - effluent: 700 kg/j
- temps de séjour: 20 jours - production de biogaz: 35.5 m³/j - abattement: 84% sur MO
- coût tout équipé hors groupe électrogène: 436.000 F (valeur 1991)

2.3. Traitement d'effluents vinicoles

2.3.1. Le problème

Le procédé de fermentation méthanique avec séparation des phases d'acidification et de méthanogénèse offre d'intéressantes perspectives pour le traitement des effluents vinicoles. Un filtre anaérobie est généralement utilisé pour la deuxième phase; la fixation des bactéries sur un support assure leur rétention dans le digesteur. Les rendements épuratoires s'en trouvent améliorés. Les charges volumiques appliquées peuvent être plus importantes et les temps de séjour de l'effluent à traiter plus courts. Par ailleurs, la fixation des bactéries leur permet de mieux tolérer les variations de charge et de débit, de faciliter le redémarrage des digesteurs et d'avoir des installations plus compactes (Andréoni *et coll.* 1994). Des filtres minéraux ou plastiques et les rafles de raisin peuvent être utilisés comme support.

2.3.2. L'approche

La faisabilité du traitement anaérobie d'effluents vinicoles a été étudiée au laboratoire, dans un fermenteur infiniment mélangé avec une alimentation séquentielle. En régime stabilisé, avec une charge volumique appliquée de 31 kg/m³/j, un rendement épuratoire de 91% de la demande chimique en oxygène (DCO) et une productivité en biogaz de 0,4 l/g DCO éliminée ont été obtenus pour un temps de séjour hydraulique de 1 jour. Pour surmonter les effets de la variation de la composition des effluents et de l'augmentation de la charge volumique, les prélèvements effectués lors de l'alimentation séquentielle en effluent, ont été centrifugés et les bactéries réintroduites dans le fermenteur.

Les études microbiologiques ont montré qu'avec ce type d'effluent riche en composés facilement fermentescibles favorisant l'accumulation d'acides gras volatils (AGV), il était souhaitable de favoriser le développement des populations de bactéries syntrophes connues pour dégrader les AGV. Ce résultat a été obtenu en renforçant les populations de bactéries méthanogènes hydrogénotrophes indispensables au développement des bactéries syntrophes (transfert inter-espèce d'hydrogène). L'inoculation en masse du fermenteur avec les bactéries méthanogènes hydrogénotrophes initialement isolées de ce même fermenteur (*Methanobacterium* spp.) a augmenté les rendements épuratoires, après une phase de latence due au faible temps de génération des bactéries syntrophes. Cette microflore améliorée, constituée de bactéries fermentaires, de syntrophes et de bactéries méthanogènes dégrade rapidement aussi bien un effluent vinicole provenant des premiers soutirages dans lequel seuls l'éthanol, le glucose et l'acétate sont présents, qu'un effluent stocké depuis plusieurs mois, et dans lequel l'étape d'acidification a produit l'accumulation d'AGV.

Les essais pilotes ont montré que l'inoculation avec des souches méthanogènes adaptées permettait (1) une augmentation du rendement épuratoire d'environ 10%, (2) une augmentation de la charge volumique du pilote de 1,9 à 9 kg DCO/m³/j et (3) une réduction du temps de séjour de 225 à 50 h. L'effet de l'inoculation s'est maintenu pendant les deux mois de suivi. Les rendements d'épuration de la DCO dans les conditions de l'essai ont été de 80%. L'effluent acqueux avait des caractéristiques très favorables pour une dégradation complémentaire par voie biologique aérobie (DBO₅/DCO=0,56). La production de biogaz a été de 0,3 l/g de DCO éliminée avec une teneur en méthane de 80%.

2.3.3. L'application et le transfert

ARM Biotechnology a installé à la cave coopérative de Goult-Lumière (Vaucluse), un digesteur pilote de 5 m³ à séparation de phases: une phase acidogène en réacteur infiniment mélangé et une phase méthanogène en filtre anaérobie avec support en verre poreux. Ce dispositif a été complété par l'adjonction d'un biofiltre aérobie constitué d'un lit bactérien immergé et aéré par diffuseur microbulles, et d'un clarificateur pour récupérer les boues. Ce pilote a été testé lors de la campagne 1995, sous le contrôle de la Fédération des Caves Coopératives du Vaucluse et de l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse. Une double inoculation de la cuve de méthanogénèse a été réalisée avec les bactéries méthanogènes hydrogénotrophes et l'inoculum mixte préparés au laboratoire.

Le rendement épuratoire à la sortie du filtre anaérobie a été de 80% de la DCO pour une charge moyenne d'entrée de 20g/l de DCO et de moins de 200 mg/l de matières en suspension totales (MEST). Le rendement épuratoire à la sortie du dispositif complet a été de 96,8% de la DCO et 82,5% des MEST.

La Société ARM Biotechnology a ensuite livré pour la campagne 1996, une station complète de dépollution (digesteur anaérobie + biofiltre aérobie + décanteur) à la cave vinicole de Goult-Lumière. Cette installation a confirmé les résultats obtenus sur le pilote, produisant un rendement épuratoire de 96,8% de la DCO. D'autres installations de ce type sont actuellement en cours de développement dans d'autres caves de la région.

2.4. Traitement d'effluents de la petite industrie d'extraction d'amidon de manioc

2.4.1. Le problème

En Amérique Latine, et plus particulièrement dans les pays andins, l'extraction de l'amidon de manioc destiné à l'alimentation humaine sous la forme d'amidon aigre est réalisée selon des procédés artisanaux dans des entreprises familiales. Ces unités d'extraction d'amidon, appelées « rallanderias », captent l'eau des sources andines nécessaire au procédé d'extraction et rejettent leurs effluents liquides dans l'environnement sans aucun traitement (Rojas et al. 1996). Leur capacité de traitement est de 1 à 5 tonnes de racines par jour, ce qui correspond à une capacité de production de 250 à 1250 kg d'amidon aigre par jour. On compte environ 250 unités d'extraction d'amidon dans le seul département du Cauca (sud de la Colombie) qui produisent chacune un volume de rejets de 10 à 15 m³ d'eau par tonne de manioc traité. Ces effluents sont faiblement chargés en matière organique, leur DCO n'excède pas 6000 mg/l, mais contiennent de 2 à 4 mg/l de cyanure provenant du cyanure naturellement contenu dans les tubercules de manioc (Cuzin et Labat 1992b). Les déchets solides représentés essentiellement par l'écorce et les fibres du manioc, ne constituent pas une source de pollution car ils sont commercialisés comme aliment pour le bétail après séchage au soleil.

2.4.2. L'approche

Dans le cadre d'un projet financé par l'union européenne, l'IRD en collaboration avec le CIRAD et l'université del Valle de Cali en Colombie, s'est intéressé au problème du traitement de ces effluents qui polluent en amont les cours d'eau servant à l'approvisionnement en eau des populations habitant dans les vallées.

Les travaux de laboratoire combinant à la fois des études de conduite de réacteurs et des études microbiologiques des phénomènes complexes se déroulant dans ces réacteurs, ont montré que la fermentation méthanique était une technique particulièrement adaptée pour l'épuration des effluents d'amidonneries de manioc. Tous les procédés de traitement anaérobie (UASB, séparation de phase, Transfiltre) testés au niveau du laboratoire ont permis d'éliminer 90 % de la pollution contenue dans les eaux résiduaires (Alazard 1996). En tenant compte des conditions socio-économiques de cette activité artisanale, ces recherches ont abouti à la conception et à la mise au point par le CIRAD d'un réacteur rustique fondé sur le principe du filtre anaérobie. Ce réacteur est constitué d'une fosse parallélépipédique garnie de bambous découpés dans le sens de la longueur et orientés dans le sens du flux de l'effluent et disposés avec une légère pente de manière à permettre l'évacuation du biogaz. La ségrégation totale du flux d'effluent est favorisée et permet de limiter les risques d'acidification du réacteur. La fonction de fixation des bactéries sur le support est par ailleurs conservée et évite leur lessivage.

2.4.3. L'application et le transfert

L'efficacité des prototypes de laboratoire a permis la réalisation d'une opération de démonstration dans une « rallanderia » pilote mise en place par une des entités régionales chargées de l'Environnement (TERMOCAUCA). Ce type de traitement à faible coût, puisqu'il utilise un matériel disponible localement et correspond mieux au contexte socio-économique de ce secteur d'activité, pourrait être généralisé à l'ensemble des « rallanderias » de la région.

2.5. Dépollution et valorisation des margines d'huile d'olive

2.5.1. Le problème

Aliment ancestral du bassin méditerranéen, l'huile d'olive voit sa production augmenter régulièrement, en raison de la reconnaissance de sa haute valeur diététique. Après broyage de l'olive fruit et écart des parties solides (grignons ou tourteaux d'olive) par pressage, la phase huileuse et la phase aqueuse sont séparées et le résidu organique liquide, appelé margines, est écarté. Ce sous-produit pose des problèmes importants de pollution.

La difficulté de traitement des margines est due à leur forte concentration en charge polluante, à leur grande toxicité pour la microflore et à leur mauvaise biodégradabilité. La charge polluante en sortie d'industrie oléicole est exceptionnelle: elle dépasse généralement 120 g de DCO/l et peut atteindre 200 g DCO/l. La toxicité de cet effluent est essentiellement due à sa haute teneur en composés phénoliques, qui vont des monoaromatiques jusqu'aux polyphénols de hauts poids moléculaires. Chaque année, entre 20 et 35 millions de m³ de margines sont produites autour du Bassin Méditerranéen. La majeure partie de ces rejets liquides est traitée par collecte dans des bassins d'évaporation aménagés à ciel ouvert. Dans ces bassins, le processus de dégradation n'est que partiel, ce qui entraîne l'accumulation et la concentration de la majeure partie de la matière organique présente.

Divers procédés ont été testés pour le traitement des margines. Les traitements physiques ou chimiques sont fondés sur la séparation des constituants solubles et insolubles des margines et ne permettent de traiter ultérieurement que la partie soluble.

Les traitements biologiques ou mixtes font appel à des micro-organismes aérobies et anaérobies. Certains micro-organismes aérobies (bactéries ou champignons) dégradent en totalité les composés polyaromatiques complexes et de hauts poids moléculaires, comme les lignines, tannins et polyphénols des margines. Toutefois, l'utilisation de dispositifs aérobies de dépollution des margines se heurte au coût élevé de la construction et de l'exploitation des installations, qui rend ces procédés non rentables financièrement.

La rupture de cycles aromatiques par voie anaérobie est limitée aux composés de faibles poids moléculaires et la cinétique de dégradation est souvent lente. Toutefois la dégradation anaérobie de composés aromatiques complexes est effective pour des oligolignols ainsi que pour des tannins.

2.5.2. L'approche dépollution

Le problème majeur de la dépollution anaérobie des margines étant leur toxicité due aux propriétés antibactériennes des composés phénoliques et tanniques qu'elles contiennent en fortes quantités, l'objectif des recherches entreprises dans ce projet a été la mise au point d'un procédé biologique de traitement comprenant une première étape aérobie destinée à améliorer la biodégradabilité des composés polyaromatiques, suivie d'une étape de biodégradation anaérobie (Hamdi et Garcia 1993).

Considérant l'analogie de structure entre les polyphénols des margines et la lignine (polyphénols de haut poids moléculaire), nous avons testé la biodégradabilité des margines par des champignons ligninolytiques (Hamdi et coll. 1991). *Phanerochaete chrysosporium* qui décolore les margines en

décomposant les polyphénols (Sayadi et coll. 1995) s'est révélé l'espèce la plus efficace pour un prétraitement aérobic. Cette première étape permet également un abaissement significatif de la DCO initiale.

L'étape aérobic est suivie d'une fermentation méthanique. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le procédé du filtre anaérobic et ont permis de produire un biogaz de très bonne qualité (>70 % de méthane), avec une bonne productivité et un abaissement de la DCO de l'ordre de 50 à 75% (Labat et coll. 1994).

Ces deux étapes, appliquées en continu, ont permis un abaissement global de la DCO initiale de l'ordre de 80 à 90%. Un traitement tertiaire est donc malgré tout nécessaire, mais l'effluent sortant, en raison de sa faible DCO, peut être dépollué classiquement en station d'épuration (Labat et coll. 1996).

2.5.3. L'application et le transfert

Ce projet a bénéficié d'un financement de l'Union Européenne et a été réalisé en collaboration entre l'IRD et le Centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie). Il a permis l'installation et le suivi d'un pilote comprenant un dispositif en deux étapes: 1 réacteur aéré de 1m³ inoculé avec *Phanerochaete chrysosporium* et un digesteur de 1 m³ de type filtre anaérobic. Ce pilote a été installé dans une huilerie de la région de Sfax.

2.5.4. L'approche valorisation

Les margines, par leur forte concentration en composés polyaromatiques, constituent une source potentielle de molécules ou de précurseurs de molécules à haute valeur ajoutée. Une alternative à la dépollution complète est donc de réaliser une dégradation partielle des margines par voie microbienne (bactéries ou champignons), en respectant les structures aromatiques présentes, ceci afin de biotransformer les structures polluantes en composés d'intérêt industriel.

Les travaux en cours portent plus particulièrement sur l'identification des structures aromatiques présentes pour envisager leur transformation par des micro-organismes possédant des voies métaboliques permettant la production de composés utilisables, entre autres, comme antioxydants, arômes odorants, polyphénols réticulés, conservateurs, etc. ...

2.6. Résidus de production de beurre de karité

Le karité est un arbre soudano-sahélien. Le beurre de karité, utilisé notamment en cosmétologie, est obtenu après broyage et pressage des amandes de karité, suivi d'un tamisage et d'une filtration. La phase liquide ou huile brute est conditionnée alors que la phase solide, ou tourteau, est écartée. Ce sous-produit est riche en acides gras insaturés et en tannins. Les tannins, de structure chimique très stable, possèdent des propriétés antimicrobiennes, soit directes soit indirectes.

Les recherches en cours portent sur l'isolement de bactéries capables de dégrader ces tannins et sur l'étude de leur métabolisme pour développer des procédés de dépollution et de valorisation de ce type de sous-produit riche en tannins.

3. Fermentation en milieu solide

3.1. Généralités sur la Fermentation en Milieu Solide

On qualifie de fermentation en milieu solide (FMS) une croissance microbienne qui se développe en surface et à l'intérieur d'une matrice solide et en absence d'écoulement liquide. Les FMS ont été utilisées depuis très longtemps en alimentation humaine aussi bien dans les pays tempérés que tropicaux. Elles concernent le plus souvent la transformation de produits laitiers, de produits amylicés (manioc, maïs, riz...) ou de protéines végétales (soja) par des champignons ou des bactéries lactiques.

Les FMS peuvent également être utilisées pour valoriser des sous-produits agricoles ou agro-industriels. Un exemple classique est la production de champignons de Paris (*Agaricus bisporus*) ou de Pleurotes (*Pleurotus ostreatus*) sur des pailles de céréales plus ou moins compostées (Roussos et coll. 1997a). La grande diversité des produits valorisables, des micro-organismes utilisables et des produits obtenus apparaît dans un ouvrage récent sur les FMS (Roussos et coll. 1997b). En fonction de la nature du support, on peut distinguer deux types de FMS:

1- *Culture solide sur une phase substrat-support*. La phase solide est constituée à partir d'un produit assurant à la fois la fonction de support et de source de nutriments, généralement des produits ou sous-produits agricoles relativement riches en substrats métabolisables (exemples: pulpe de café, son de blé, pulpes de betteraves, écarts de triage de bananes, résidus de produits amylicés, tourteaux de coprah ...)

2- *Culture solide avec une phase support imprégnée d'un milieu liquide*. Dans ce type de fermentation, la phase solide est utilisée comme un support inerte, qui ne constitue pas une source de nutriments pour les micro-organismes, mais sert de réservoir d'une solution nutritive, celle-ci étant absorbée sur la matrice solide. Dans ce type de FMS, la capacité d'absorption du support est un facteur important. Les matériaux utilisés sont divers et la plupart ont une forte capacité de rétention d'eau (exemples : bagasse de canne à sucre, paille, vermiculite, éponge, polyuréthane,...).

Différents dispositifs de FMS ont été mis au point. Il existe des dispositifs statiques, dans lesquels le substrat est généralement disposé dans des plateaux perforés placés dans des chambres à humidité

contrôlée sous aération constante. Il existe une grande variété de dispositifs dynamiques. Dans les systèmes à plateaux rotatifs et les tours de fermentation à plateaux, le milieu est homogénéisé par transfert vertical du milieu d'un plateau à l'autre. Pour les micro-organismes les plus demandeurs en O₂, de l'air humidifié est insufflé à la base des tours. Il existe également des fermenteurs de type pétrin où l'homogénéisation du milieu est assurée soit par la rotation de la cuve sous un bras fixe (Raimbault 1980), soit par un brassage par une vis sans fin portée par un chariot se déplaçant latéralement sur le bord d'une cuve fixe (Durand et coll., 1988). Plus récemment un bioréacteur à vis sans fin a été adapté pour la production en continu d'enzymes et de métabolites fongiques sur bagasse de canne à sucre en FMS (Roussos et Pyle, 1998). Les dispositifs de type pétrin sont encore à l'échelle pilote..

La comparaison des caractéristiques des fermentations en milieu liquide et solide (Tableau 4) montre un certain nombre d'avantages des FMS, toutefois le changement d'échelle est encore un facteur limitant à l'exploitation des nombreuses potentialités biotechnologiques de cette méthode

Tableau 4. Comparaison fermentation en milieu liquide - fermentation en milieu solide

	Fermentation en milieu liquide	Fermentation en milieu solide
Substrats	Préférentiellement solubles. Si solides, problèmes d'homogénéisation	Polymères insolubles (amidon,, cellulose, pectines, lignine...) + substrats solubles
Aseptie	Stérilisation par la chaleur et maintien plus ou moins facile	Conditions non stériles
Consommation d'eau	Elevée, effluent rejeté	Faible. Pas d'effluent
Contrôle de la chaleur	Facile	Plus difficile surtout en FMS statique (faible transfert)
Aération	Activité limitée par l'oxygène dissous. Fort niveau d'aération requis	Aération facile. Grande interface air/substrat. Colmatage en FMS statique.
Contrôle du pH	Facile	Nécessité d'utilisation de milieux tamponnés en FMS statique
Agitation mécanique	Facile	Impossible en FMS statique.
Consommation d'énergie	Elevée	Faible en FMS statique
Changement d'échelle	Maîtrisé, équipements disponibles	Equipements en développement
Volume et coût des installations	Grand volume, coût élevé	Volumes et coût plus faibles,
Récupération des produits d'intérêt	Produits dilués (30-80 g/l)	Produits concentrés (100-300 g/l)
Effluent	Volumes importants d'effluents souvent polluants	Pas d'effluents (produit ou compost)

3.2. Dépollution et valorisation de la pulpe de café

3.2.1. Le problème

Chaque tonne de café vert produit 500 Kg de pulpe de café. La production mondiale de pulpe de café est de l'ordre de 2, 5 millions de tonnes en matière sèche. La pulpe de café pose de graves problèmes de pollution de l'environnement et en particulier des cours d'eaux en Amérique latine.

Cette pulpe riche en sucres simples, en protéines, en amino acides et en minéraux contient en faible quantité des tannins, des polyphénols et de la caféine qui sont des facteurs antiphysiologiques interdisant son utilisation pour la nutrition des monogastriques et des ruminants.

D'autre part la production de pulpe de café intervient à un moment où la main d'oeuvre disponible est entièrement utilisée pour la production de café vert. Le problème de la valorisation de la pulpe de café comme aliment du bétail est donc celui de sa conservation et de sa détoxification.

3.2.2. L'approche

Des programmes de coopération scientifique avec le Mexique, la Colombie et le Brésil, financés partiellement par l'Union Européenne, ont été développés pour étudier d'une part la conservation par ensilage et d'autre part la détoxification fongique de la pulpe de café.

Les études d'ensilage ont montré que la microflore lactique endogène de la pulpe de café séchée au soleil est suffisante pour amorcer un ensilage présentant des caractéristiques physico-chimiques finales acceptables (Perraud-Gaime 1995). Cependant, l'apport de différents ferments biologiques

permet d'améliorer la qualité des ensilages : homogénéité de la population microbienne, augmentation du taux d'acide lactique, pas de production d'AGV indésirables ni d'éthanol. Nous avons testé en particulier un pied de cuve de pulpe de café ensilée naturellement ; un ferment monosouche (*Lactobacillus plantarum* A6) ; un ferment commercial DpH4 (associant deux souches de bactéries lactiques à un complexe enzymatique) qui se sont révélés efficaces.

Nous avons également montré que l'addition de cellulases dans l'ensilage permet d'augmenter le taux de sucres réducteurs (Perraud-Gaime 1995). Le suivi des ensilages a montré une acidification rapide du milieu. Ce procédé est très efficace pour assurer une bonne conservation de la pulpe de café sans perte importante de matière sèche mais ne permet pas de dégrader la caféine (Perraud-Gaime et Roussos 1997).

La détoxification de la pulpe de café a été étudiée en FMS en utilisant des champignons filamenteux qui ont été sélectionnés pour leur activité décaféinase et tannase. Un des problèmes à résoudre, était d'obtenir la dégradation de la caféine avant la phase de sporulation du champignon pour préserver l'appétence du produit.

Des études préalables réalisées en coopération avec l'IRD et l'UAM d'Iztapalapa de Mexico ont permis de sélectionner deux souches de *Penicillium* et six d'*Aspergillus* pour leur haute capacité à dégrader la caféine. Après un criblage en Fermentation en Milieu Solide de ces souches, nous avons sélectionné *Penicillium* sp. V33A25. Ce micro-organisme dégrade la caféine de la pulpe de café à 94% après 30 heures de fermentation aérobie, avant la phase de sporulation. La croissance du champignon et la dégradation de la caféine sont parfaitement corrélées à la respirométrie, technique qui nous permet de suivre en continu le développement des micro-organismes en FMS. D'autre part, un plan d'expérience nous a permis de constater que la stérilisation du substrat n'a pas d'influence sur la dégradation de la caféine.

3.2.3. L'application et le transfert

Dans le cadre du projet européen (Biopulca), des inoculums de bactéries lactiques sélectionnés sont produits en quantités suffisantes pour effectuer des ensilages pilotes et des tests au niveau industriel dans deux sites au Mexique.

A noter également que des souches de champignons comestibles (pleurote, volvaria, chitake) ont été sélectionnées pour leur rendement de fructification sur coques de café (résultant du traitement à sec des cerises de café) et sont testées à l'échelle pilote au Brésil.

3.3. Valorisation de la bagasse de canne à sucre

3.3.1. Le problème

La bagasse de canne à sucre est le résidu solide obtenu après extraction à la presse du jus de canne. Pour chaque tonne de canne à sucre, on obtient 90 Kg de sucre et 250 Kg de bagasse. La production mondiale annuelle de bagasse est estimée à X millions de tonnes. Ce sous-produit agricole tropical ligno-cellulosique est le plus fréquemment utilisé comme source d'énergie ou comme matière première dans l'industrie papetière (Cuba, Argentine).

Généralement, la quantité de bagasse produite par les usines est supérieure à la quantité nécessaire pour la production d'énergie sur site. Environ 60 % sont utilisés comme combustible, le reste est brûlé dans un but d'élimination alors qu'il pourrait servir d'aliment pour les ruminants, de substrat ou de support pour des FMS.

3.3.2. L'approche

La bagasse est composée essentiellement de cellulose (38%), d'hémicellulose (34%) et de lignine (11%). L'hydrolyse chimique ou enzymatique de la cellulose en sucres simples est l'étape limitant l'utilisation de la bagasse comme matière première dans l'alimentation ou dans les procédés biotechnologiques. A l'IRD nos recherches ont été orientées vers la mise au point d'un procédé de FMS, permettant la culture de *Trichoderma harzianum*, un champignon filamenteux cellulolytique producteur de cellulases. L'étude de la croissance et de la sporulation de *T.harzianum* a permis de définir les conditions et les milieux de culture les plus appropriés pour obtenir une culture optimisée. L'utilisation d'un dispositif d'incubation simple autorise le suivi du développement du champignon et l'étude en laboratoire de la production de cellulases sur bagasse en FMS. Après 48 heures de FMS, on obtient 2.000 UAPF (unités activités papier filtre) et 20.000 UACMC (unités activités carboxyméthylcellulases) pour 100 g de bagasse.

Les procédés de FMS développés apportent des solutions intéressantes. Ainsi, la bagasse additionnée de mélasse (deux sous-produits de l'industrie sucrière) et ensilée en présence de bactéries lactiques conduit à un produit qui constitue un fourrage de qualité acceptable par le bétail. Elle peut être aussi utilisée pour la production d'alcool combustible, après hydrolyse préalable, ou comme support solide pour la culture et la production de champignons filamenteux.

Différentes études de l'IRD ont montré un large potentiel d'utilisation de la bagasse de canne à sucre qui peut être utilisé comme support ou comme substrat pour la production

- de biomasse fongique (inoculum ou carpophores pour la consommation)
- de biopesticides fongiques utilisables pour le contrôle de certains nématodes et insectes

- d'enzymes fongiques: cellulases, hemi-cellulases, pectinases, amylases, lipases (Cordova et al. 1998)
- de métabolites d'intérêt industriel: acides fumarique, citrique (Gutierrez-Rojas et coll. 1995; Pintado et coll. 1998), lactique ...alcool (Saucedo-Castañeda et coll. 1992)
- de métabolites d'intérêt pharmaceutiques: antibiotiques (Barrios-Gonzalez et coll. 1988) et alcaloïdes (Trejo-Hernandez et coll. 1993)
- de métabolites d'intérêt alimentaire: arômes (Christen et coll. 1994, Kabbaj 1997, Sarhy-Bagnon 1996), conservateurs.

3.3.3. L'application et le transfert

L'utilisation des potentialités des FMS est encore limitée par des problèmes de changement d'échelle. Actuellement les techniques utilisées au niveau industriel concernent la production:

- de blanc de pleurote et des carpophores comestibles (Mexique),
- de biopesticides (Europe et en Amérique Latine).
- d'aliment du bétail (« zacamel » au Mexique)

3.4. Valorisation des tourteaux de coprah

3.4.1. Le problème

Le résidu du traitement des noix de coco pour l'extraction de l'huile, le tourteau constitue une source d'énergie et de protéines économiquement importantes dans les pays producteurs. Toutefois, son utilisation en alimentation animale, en particulier pour les monogastriques, est limitée du fait de sa faible teneur en protéines (< 25% de la MS) et de sa forte teneur en cellulose (> 15% de MS). De plus les protéines de tourteau de coprah contiennent peu d'acides aminés essentiels tels que lysine, méthionine et cystine. Cependant la disponibilité du tourteau de coprah à faible coût dans des pays où l'élevage des monogastriques (volailles et porc) tend à s'intensifier, conduit à rechercher des méthodes pour équilibrer la ration des animaux en protéines en incorporant au tourteau de coprah de la farine de poissons ou les acides aminés déficients. La synthèse des protéines par les micro-organismes constitue une alternative intéressante pour assurer le remplacement des sources protéiques (tourteau de soja, farine de poisson) et améliorer le contenu en acides aminés essentiels du tourteau de coprah.

3.4.2. L'approche

Un programme coopératif entre le CIRAD-CP, l'INRA, l'Université Autonome Métropolitaine de Mexico et l'IRD, financé par le MESR, a étudié l'enrichissement en protéines et probiotiques du tourteau de coprah par FMS. Le criblage de champignons filamenteux a montré que 11 souches sur 51 testées pouvaient être retenues. Elles appartiennent aux espèces *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium* sp., et *Penicillium roquefortii*. Le produit obtenu après un à deux jours de fermentation avait une teneur totale en protéines de l'ordre de 35%, une teneur en acides aminés essentiels satisfaisante, une teneur en cellulose significativement diminuée et il contenait des probiotiques. Toutefois le prix de revient de ce produit restait très significativement supérieur à celui du tourteau de soja pour des teneurs en protéines identiques.

Une orientation du projet vers l'utilisation du tourteau de coprah comme substrat pour la culture de champignons thermophiles en vue de produire des lipases fongiques thermostables a permis l'obtention de concentrations très élevées de ces enzymes par FMS (Cordova et coll. 1998). Des études récentes ont également démontré un très fort potentiel du tourteau de coprah pour la production de la 6-phényl-pyrone (arôme noix de coco) par culture en FMS de *Trichoderma hazianum* sur un mélange de bagasse de canne à sucre et de tourteau de coprah.

3.4.3. L'application et le transfert

Ce programme n'a pas encore atteint la phase de valorisation.

4. Conclusion

Les recherches à l'IRD sur la méthanisation de sous-produits agricoles et agro-industriels tropicaux ont initialement été orientées dans l'optique de la biodépollution. Les premiers travaux ont utilisé des consortiums microbiens non définis provenant de différents écosystèmes et adaptés aux produits à dépolluer. Ce n'est que récemment qu'un inoculum caractérisé a été utilisé avec succès. Ces travaux ont débouché soit sur la valorisation en milieu industriel, soit sur des essais en cours à l'échelle pilote.

L'approche dépollution n'est pas la seule voie d'utilisation des micro-organismes anaérobies. Les études récentes s'orientent vers la valorisation et l'on essaye d'extraire à partir des polluants aromatiques, soit directement, soit après traitement microbiologique, des produits à forte valeur ajoutée et des précurseurs de ces produits qui comprennent des arômes et des antioxydants utilisables en alimentation humaine ou animale ou des polymères utilisables en cosmétologie et en chimie fine.

Depuis la mise au point d'un procédé de FMS permettant l'enrichissement de sous-produits amylicés en protéines pour leur utilisation en alimentation animale par Rimbault (1980), les recherches à l'IRD ont mis en évidence de nombreuses souches fongiques et microbiennes offrant de nombreuses applications potentielles en FMS pour la valorisation de sous-produits agricoles et agro-industriels

tropicaux. Les produits obtenus couvrent un éventail très vaste incluant la biomasse fongique (inoculum, carpophores, biopesticides), des enzymes fongiques et des métabolites d'intérêt industriel, pharmaceutique et alimentaire.

La valorisation de certains de ces résultats se heurte aux problèmes de changement d'échelle (Lonsane et coll. 1992) et de mise au point de procédés économiquement viables, mais un certain nombre de résultats sont déjà donné lieu à des applications commerciales.

Les résultats fondamentaux et appliqués obtenus sur des produits tropicaux ainsi que les stratégies de recherche utilisées pourraient être le plus fréquemment généralisés à des sous-produits des régions tempérées.

5. Bibliographie

- Alazard D (1996) Traitement des déchets liquides et solides de la petite et moyenne industrie d'extraction d'amidon de manioc. Dans: "Valorisation des produits, sous-produits et déchets de la petite et moyenne industrie de transformation du manioc en Amérique Latine", Op n° 2 Traitement des déchets Rapport final CEE (contrat TS3-CT92-0110), 332 p
- Andréoni V, Colombo G, Origgio M, Zangrossi M, Daffonchio D, Sorlini C (1994) Evolution of microbial activity during anaerobic digestion of winery wastewater under variable loading and operating conditions. Congrès International « Traitement des effluents vinicoles » Narbonne-Epernay 20-24 Juin 1994 pp 209-214
- Barrios-Gonzalez J, Tomasini A, Viniestra-Gonzalez G, Lopez, L (1988) Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 10: 793-798
- Christen P, Villegas E, Revah S (1994) Growth and aroma production by *Ceratocystis fibriata* in various fermentation media. *Biotechnol. Lett.* 16: 1183-1188
- Cordova J, Nemmaoui M, Ismaili-Alaoui M, Morin A, Roussos S, Raimbault M, Benjlali B (1998) Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Catalysis B: Enzym.* 5: 75-78
- Cuzin N, Farinet JL, Segretain C, Labat M (1992a) Methanogenic fermentation of cassava peel using a pilot plug flow digester. *Biores. Technol.* 41:259-264
- Cuzin N, Labat M (1992b) Reduction of cyanide levels during anaerobic digestion of cassava. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 27: 329-336
- Durand A, de la Broise D, Blachère H (1988) Laboratory scale bioreactor for solid state process. *J. Biotechnol.* 8:59-66
- Farinet JL, Hurvois Y, Forest F (1991) Wastes management and processing for energy, fertilizer and pollution control in a tropical slaughterhouse. 6th European Conference « Biomass for Energy, industry, and Environment » Athens, Greece April 22-26
- Forest F, Lidon B, Farinet JL (1984) Installations de production de biogaz à partir de substrats pailleux, choix et conditions de réussite, procédé discontinu et continu. In Maitrise de l'énergie et développement, document de travail biogaz AFME, Ministère de la Coopération GRET Eds
- Gutierrez-Rojas M, Cordova J, Auria R, Revah S, Favela-Torres E (1995) Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.* 17: 219-224
- Guyot JP, Macarie H, Noyola A (1990a) Anaerobic digestion by UASB reactors of a wastewater containing aromatic compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25: 579-589
- Guyot JP, Noyola A, Monroy O (1990b) Evolution of microbial activities and population in granular sludge from an UASB reactor. *Biotechnol. Lett.* 12: 155-160
- Guyot JP, Monroy O, Noyola A (1990c) Le traitement des eaux résiduaires au Mexique. *ORSTOM Actualités* 31: 6-8
- Hamdi M, Garcia JL (1993) Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*. *Process. Biochem.* 28:155-159
- Hamdi M, Garcia JL, Ellouz R (1992) Integrated biological process for olive mill wastewaters treatment. *Bioprocess. Eng.* 8:79-84
- Hamdi M, Khadir A, Garcia JL (1991) The use of *Aspergillus niger* for the bioconversion of olive mill waste-waters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 828-831
- Kabbaj Wafaâ (1997) Physiologie de la croissance et production d'arôme par des cultures mycéliennes de *Pleurotus* et de *Morchella* sur milieu solide. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, ENSBANA, 165 pp
- Labat M, Garcia JL (1986) Study on the development of methanogenic microflora during anaerobic digestion of sugar beet pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 163-168
- Labat M, Garcia JL, Meyer F, Deschamps F (1984) Anaerobic digestion of sugar beet pulps. *Biotechnol. Lett.* 6:379-384
- Labat M, Sayadi S, Gargouri A, Gharsallah N, Zorgani F, Belhedi N, Jaoua M, Aifa MS, Ellouz R (1994) Traitement des margines par voie biologique, une alternative à la voie physico-chimique. In *Chimie de l'environnement dans les pays riverains de la Méditerranée. Soc Chim Tunisie*, 1:48-53
- Labat M, Sayadi S, Gargouri A, Zorgani F, Jaoua M, Zekri S, Ellouz R (1996) Procédé aérobie-anaérobie pour le traitement biologique des résidus liquides de l'industrie oléicole. In : *Journées*

- Industrielles sur la Digestion Anaérobie, JIDA-96, 17-18 Juin 1996, Château de Montplaisir, Narbonne, France
- Lonsane BK, Saucedo-Castaneda G, Raimbault M, Roussos S, Viniegra-Gonzales G, Kildhial NP, Ramakrishna MM, Krishnaiah MM (1992) Scale-up strategies for solid state fermentation system : State of the Art. *Process. Biochemistry*. 27: 259-273
- Macarie H, Noyola A, Guyot JP (1992) Anaerobic treatment of petrochemical wastewater from a terephthalic acid plant. *Wat. Sci. Technol.* 25: 223-235
- Miambi E, Labat M (1991) Termite gut microbiota as inocula for maize (*Zea mais*) residues processing in anaerobic digesters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 158-163
- Noyola A, Macarie H, Guyot JP (1990) Treatment of terephthalic acid plant wastewater with an anaerobic fixed film reactor. *Environ. Technol.* 11: 239-248
- Ollivier B, Smiti N, Garcia JL (1985) Thermophilic methanogenesis from sugar beet pulp by a defined mixed bacterial culture. *Biotechnol. Lett.* 7:847-852
- Perraud-Gaime, I (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, France, 209 p
- Perraud-Gaime I, Roussos S (1997) Preservation of coffee pulp by ensilage: Influence of biological additives. In Roussos, S, Lonsane, BK, Raimbault, M and Viniegraz-Gonzalez, G (Eds), *Advances in solid state fermentation*, Kluwer Acad Publ, Dordrecht, p193-207
- Pintado J, Lonsane BK, Gaime-Perraud I, Roussos S (1998) On-line monitoring of citric acid production in solid state culture by respirometry. *Process. Biochemistry*. *** **
- Raimbault M (1980) croissance de champignons filamenteux en milieu solide. Thèse de Doctorat d'Etat Université Paul Sabatier, Toulouse, ORSTOM, Montpellier
- Rojas, O, Torres, P, Alazard, D, Farinet, J-L, Cardozo, M del C (1996) The process of starch extraction from cassava: a typical case of rural agroindustry with a high pollution potential. In *Cassava flour and starch: Progress in research and development* Dufour, D, O' Brien G et Best R Eds CIAT Publication No 271
- Roussos S, Bresson E, Saucedo-Castañeda G, Martinez P, Guynberteau J, Olivier J-M (1997a) Production of mycelial cell inoculum of *Pleurotus opuntiae* on natural support in solid state fermentation In Roussos, S, Lonsane, BK, Raimbault, M, Viniegraz-Gonzalez, G (eds), *Advances in solid state fermentation*, Kluwer Acad Publ, Dordrecht, p 483-500
- Roussos S, Lonsane BK, Raimbault M and Viniegra-Gonzalez G (eds) (1997b) *Advances in Solid State Fermentation Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation (FMS-95)*, Montpellier France 27-28 February 1995 Kluwer Academic Publishers , Dordrecht 47 chapitres 631 pp
- Roussos S, Pyle DL (1998) Continuous enzymes and fungal metabolite production in solid state fermentation using a counter-current reactor. In Raimbault M, Soccol C, Chuzel G (Eds), *Proc of the International Training course on Solid State Fermentation Curitiba 6-10 october 1997*, ORSTOM, Montpellier, pp 21- 35
- Sahry-Bagnon V, Lozano P, Pioch D, Roussos S (1996) Coconut-like aroma production by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation. In Roussos,S, Lonsane, BK, Raimbault, M and Viniegra-Gonzalez, G (Eds), *Advances in Solid State fermentation* Kluwer Acad Publ, Dordrecht, chapter 31: 379-391
- Saucedo-Castañeda G, Lonsane BK, Navarro JM, Roussos S, Raimbault M (1992) Potential of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36: 47-61
- Sayadi S, Zorgani F, Labat M, Jaoua M, Aifa MS, Gargouri A, Gharsallah N, Zekri S, Ellouz R (1995) Lignin peroxidase is the key enzyme in the decolorization of olive mill wastewaters by *Phanaerochaete chrysosporium*. *J. Cell. Biochem. Keystone Symp on Molec and Cell Biol*, March 16-22, Lake Tahoe, California
- Sow D, Ollivier B, Viaud P, Garcia JL (1989) Mesophilic and thermophilic methane fermentation of *Euphorbia tirucalli*. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5:547-550
- Trejo-Hernandez MR, Lonsane BK, Raimbault M, Roussos S (1993) Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* 1029c in solid state fermentation system: Influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar cane pith bagasse. *Process. Biochem.* 28: 23-27