

UNIVERSITE PARIS VII

DOCTORAT DE 3^e CYCLE

CHIMIE DE LA POLLUTION

DOCUMENT

n° 10

INTERACTIONS
entre la FERMENTATION METHANIQUE
et la SULFATO-REDUCTION

1. Influence des sulfates sur la digestion anaérobie à faible charge
2. Activation de la méthanogénèse
Inhibition de la sulfato-réduction

par

Jean SEGURA

Thèse soutenue devant la Commission d'Examen le 15 mars 1984

Membres du Jury

Président	Gérard MOUVIER
Directeur	Jacques VIGNERON
Rapporteur	Guy ALBAGNAC
	Ivan ELSKENS
	Jean-Marie ROVEL
Examineurs	Gérard FAUP
	Jean-Luc TRANCANT

S O M M A I R E

INTERACTIONS ENTRE LA FERMENTATION METHANIQUE ET LA SULFATO-REDUCTION :

1) INFLUENCE DES SULFATES SUR LA DIGESTION ANAEROBIE A FAIBLE CHARGE,
 2) ACTIVATION DE LA METHANOGENESE ET INHIBITION DE LA SULFATO-REDUCTION.

RESUME 1

ABSTRACT (in english) 4

CHAPITRE I : PRESENTATION 7

1/ INTRODUCTION 7

2/ SOCIETES ET ORGANISMES INTERESSES 8

3/ SITUATION DE L'ETUDE 8

4/ OBJET DE L'ETUDE 9

CHAPITRE II : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 11

INTRODUCTION 11

1/ DIGESTION ANAEROBIE DE LA MATIERE ORGANIQUE 13

1.1/ DEFINITION 13

1.2/ SITES 13

1.3/ BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE 15

1.3.1/ Hydrolyse et acidogénèse 15

1.3.2/ Acétogénèse 19

1.3.3/ Homoacétogénèse 19

1.3.4/ Méthanogénèse 21

1.3.4.1/ Généralités et microbiologie 21

1.3.4.2/ Biochimie 23

...

1.4/ CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES OPTIMALES	24
1.4.1/ Potentiel d'oxydo-réduction	24
1.4.2/ Température	24
1.4.3/ pH	24
1.4.4/ Les éléments minéraux	25
2/ <u>LA REDUCTION DES SULFATES (OU SULFATO-REDUCTION)</u>	27
2.1/ DEFINITION	27
2.2/ SITES	27
2.3/ BIOCHIMIE	27
A/ Dégradation du lactate	27
2.3.1/ Déshydrogénation du lactate	27
2.3.2/ Réaction phosphoroclastique	29
2.3.3/ Phosphorylation et déphosphorylation	29
B/ La réduction dissimilative du sulfate	29
2.3.4/ Activation de l'ion sulfate	29
2.3.5/ Réduction de l'APS en sulfite	29
2.3.6/ Réductions successives du sulfite	31
C/ Le transfert électronique	31
2.3.7/ Activité hydrogénase	31
2.3.8/ Transporteurs	31
2.4/ MICROBIOLOGIE	31
3/ <u>INTERACTIONS DE LA DIGESTION ANAEROBIE ET DE LA SULFATO-REDUCTION</u>	32
3.1/ BUT DES RECHERCHES ET METHODES EMPLOYEES	32
3.2/ CO-EXISTENCE DES DEUX PHENOMENES	33
3.3/ REPARTITION ECOLOGIQUE - INFLUENCE DU POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION	33
3.4/ LA NUTRITION CARBONEE	35
3.4.1/ Substrats en amont de la phase acidogène	35
3.4.2/ Métabolisme du lactate : dégradation complète	36
3.4.3/ Métabolisme propre de l'acétate - formation du méthane	37
3.4.4/ Métabolisme général	39
3.4.5/ Taux de croissance des bactéries et taux de dilution du substrat	39
3.4.6/ Energie de maintenance des bactéries	41
3.4.7/ Interaction du sulfate et de l'acétate en présence des bactéries sulfato-réductrices	42

3.5/ LA PRESSION D'HYDROGENE	44
3.5.1/ Phénomènes "in situ"	44
3.5.2/ Effet positif sur la méthanogénèse (voie H ₂ /CO ₂) Effet de synergie avec le gaz carbonique	44
3.5.3/ Effet négatif sur la méthanogénèse (voie acétate)	46
3.5.4/ Effet positif sur la sulfato-réduction. Compétition avec la méthanogénèse	47
3.5.5/ Effet négatif sur la dégradation de la matière organique - Rôle de l'accepteur d'électrons - Complémentarité trophique des bactéries	50
3.6/ LA SALINITE EN SULFATES	53
3.6.1/ Dans les milieux naturels	53
3.6.2/ Effet neutre ou positif sur la méthanogénèse - Effet de synergie avec le fer	53
3.6.2.1/ Le sulfate seul	53
3.6.2.2/ Le sulfate avec le fer	54
3.6.3/ Effet inhibiteur sur la méthanogénèse - Effet stimulateur sur la sulfato-réduction	57
3.6.4/ Commentaire sur l'effet du sulfate	60
3.7/ LA TENEUR EN SULFURES ET EN HYDROGENE SULFURE	61
3.7.1/ Origine, devenir et comportement en solution	61
3.7.2/ Nutrition soufrée de la flore méthanogène. Effet positif sur la production de méthane	63
3.7.3/ Effet inhibiteur sur la méthanogénèse	64
3.7.4/ Cause de l'inhibition Découplage entre la croissance des bactéries méthanogènes et la production de méthane	68
3.8/ INHIBITION DE LA SULFATO-REDUCTION	68
3.8.1/ Usage des inhibiteurs	68
3.8.1.1/ Inhibiteurs métaboliques	69
3.8.1.2/ Inhibiteurs de dissimilation	73
3.8.2/ Effet positif sur la méthanogénèse	74
4/ <u>COMMENTAIRE GENERAL ET CONCLUSIONS</u>	76

CHAPITRE III : PROJETS D'ETUDES

77

1/ <u>LES OBJECTIFS</u>	77
2/ <u>ASPECT TECHNOLOGIQUE ET CHAMP EXPERIMENTAL</u>	78
2.1/ LES PILOTES	78
2.1.1/ Fermentation "batch" à alimentation unique	78
2.1.1.1/ Principe	78
2.1.1.2/ Avantages	78
2.1.1.3/ Inconvénients	78
2.1.2/ Fermentation avec alimentation continue	79
2.1.2.1/ Principe	79
2.1.2.2/ Avantages	79
2.1.2.3/ Inconvénients	79
2.2/ LES PARAMETRES DE CONTROLE ET LE CALCUL DES DONNEES	80
2.2.1/ Mesures et analyses	80
2.2.2/ Les objectifs du contrôle analytique : illustration	81

CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES

83

1/ <u>NATURE ET PROVENANCE DES ENSEMENCEMENTS</u>	83
2/ <u>MILIEU D'ALIMENTATION</u>	83
3/ <u>PROTOCOLES EXPERIMENTAUX, MATERIEL ET MONTAGE DES PILOTES</u>	83
3.1/ ETUDE DE L'INFLUENCE DES SULFATES SUR UN DIGESTEUR ALIMENTE A FAIBLE CHARGE VOLUMIQUE	83
3.1.1/ Principe	83
3.1.2/ Matériel	85
3.1.2.1/ Fermenteur	85
3.1.2.2/ Décanteur	85
3.1.2.3/ Pompes	85
3.1.2.4/ Conditionnement thermique	86
3.1.2.5/ Comptage et stockage du gaz	86
3.1.2.6/ Piège à hydrogène sulfuré	86
3.1.2.7/ Surveillance de la température	86
3.1.2.8/ Système d'horlogerie	86
3.1.2.9/ Petit matériel	87
3.1.3/ Montage du pilote	87

3.2/ ACTIVATION DE LA METABOGENESE. INHIBITION DE LA SULFATO-REDUCTION ETUDE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES COMPOSES ORGANIQUES ET MINERAUX SUR LES ACTIVITES METHANIGENE ET SULFATO-REDUCTRICE ETUDE DE L'INFLUENCE DU TAUX DE BIOMASSE.	87
3.2.1/ Principe	87
3.2.1.1/ Enrichissement des boues	87
3.2.1.2/ Tests des substances en fermentation "batch". Influence du taux de biomasse	89
3.2.2/ Matériel	89
3.2.2.1/ Digesteur contact (modifications)	89
3.2.2.1.1/ Alimentation et fermentation	89
3.2.2.1.2/ Décantation et recyclage des boues	90
3.2.2.1.3/ Sortie et comptage du gaz	90
3.2.2.1.4/ Matériel additif ou de remplacement	90
3.2.2.2/ Fermenteurs "batch"	91
3.2.2.2.1/ Description	91
3.2.2.2.2/ Chargement	91
3.2.3/ Montage des pilotes	93
4/ <u>METHODES ANALYTIQUES</u>	94
4.1/ LA DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE (DCO)	94
4.2/ LES MATIERES EN SUSPENSION (M.e.S).	94
4.3/ LES MATIERES SECHES (M.S)	94
4.4/ LES MATIERES VOLATILES EN SUSPENSION (MVS ou MV)	94
4.5/ LE TITRE ALCALIMETRIQUE (TAC)	95
4.6/ L'ACIDITE VOLATILE (AV)	95
4.7/ PRELEVEMENT ET ANALYSE DE GAZ	95
4.7.1/ Prélèvement	95
4.7.2 / Stockage	95
4.7.3/ Analyse en chromatographie phase gazeuse	97
4.7.4/ Analyse de l'hydrogène sulfuré	98
4.8/ PRESENTATION DES RESULTATS	99
<u>PHOTOS</u>	100

CHAPITRE V : RESULTATS ET COMMENTAIRES

	105
<u>1/ ETUDE DE L'INFLUENCE DES SULFATES SUR UN DIGESTEUR ALIMENTE A FAIBLE CHARGE</u>	105
1.1/ ALIMENTATION CARBONEE. JUSTIFICATION DE LA FAIBLE CHARGE	105
1.2/ APPORT EN SULFATE	105
1.3/ INFLUENCE SUR LA DIGESTION	105
1.4/ INFLUENCE SUR LA FORMATION D'HYDROGENE SULFURE	106
1.5/ COMMENTAIRE	106
1.6/ CONCLUSION	108
<u>2/ ACTIVATION DE LA METHANOGENESE - INHIBITION DE LA SULFATO-REDUCTION ETUDE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES COMPOSES ORGANIQUES ET MINERAUX INFLUENCE DU TAUX DE BIOMASSE.</u>	108
2.1/ COMPORTEMENT DU FERMENTEUR D'ENRICHISSEMENT (PILOTE "MERE")	108
2.2/ CALENDRIER ET CARACTERISTIQUES DES SERIES D'ESSAIS DE FERMENTATION "BATCH"	109
2.3/ INFLUENCE DU SULFATE SEUL	110
2.3.1/ Production de gaz	110
2.3.2/ Composition du gaz : CH ₄ et CO ₂	111
2.3.3/ Hydrogène sulfuré	111
2.3.4/ Autres paramètres de digestion : DCO, pH, TAC, AV	111
2.3.5/ Commentaire	112
2.4/ EMPLOI DU METHANOBAC	113
2.4.1/ Production de gaz	113
2.4.2/ Composition du gaz : CH ₄ et CO ₂	113
2.4.3/ Hydrogène sulfuré	114
2.4.4/ Autres paramètres de digestion : DCO, pH, TAC, AV	114
2.4.5/ Commentaire	114
2.5/ EMPLOI DU CHROMATE DE SODIUM	114
2.5.1/ Production de gaz	115
2.5.2/ Composition du gaz : CH ₄ et CO ₂	115
2.5.3/ Hydrogène sulfuré	115
2.5.4/ Autres paramètres de digestion : DCO, pH, TAC, AV	115
2.5.5/ Commentaire	116

2.6/ EMPLOI DU MERCAPTO-2-BENZOTHIAZOLE	116
2.6.1/ Production de gaz	116
2.6.2/ Composition du gaz : CH ₄ et CO ₂	117
2.6.3/ Hydrogène sulfuré	117
2.6.4/ Autres paramètres de digestion : DCO, pH, TAC, AV	118
2.6.5/ Commentaire	118
2.7/ EMPLOI DE L'ACETATE DE SODIUM	118
2.7.1/ Production de gaz	119
2.7.2/ Composition du gaz : CH ₄ et CO ₂	119
2.7.3/ Hydrogène sulfuré	120
2.7.4/ Autres paramètres de digestion : DCO, pH, TAC, AV	121
2.7.5/ Commentaire	121
2.8/ EMPLOI DU CHLORURE FERREUX	122
2.8.1/ Production de gaz	123
2.8.1.1/ Cinétiques d'apparition	123
2.8.1.2/ Influence de la teneur en FeCl ₂	123
2.8.2/ Composition du gaz : CH ₄ et CO ₂	124
2.8.2.1/ Cinétiques d'apparition	124
2.8.2.2/ Influence de la teneur en FeCl ₂	124
2.8.3/ Hydrogène sulfuré	125
2.8.4/ Autres paramètres de digestion : DCO, pH, TAC, AV	125
2.8.5/ Commentaire	126
2.9/ INFLUENCE DU TAUX DE BIOMASSE	129
2.9.1/ Production de Biogaz	130
2.9.2/ Composition du biogaz : CH ₄ et CO ₂	131
2.9.3/ Hydrogène sulfuré	131
2.9.4/ Autres paramètres de digestion : DCO, pH, TAC, AV	132
2.9.5/ Commentaire	132
2.10/ CONCLUSIONS	133
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	136
<u>TABLEAUX</u> : 16 à 29	137
<u>FIGURES</u> : 19 à 44	151
<u>ANNEXE</u> : LA DIGESTION : PROCEDES ET APPLICATIONS	166
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	185

R E S U M E

La présence de sulfates dans les milieux de fermentation anaérobie engendre plusieurs phénomènes qui perturbent le processus de digestion.

Cette étude a pour but de déterminer la nature des interactions biologiques qui lient les deux "groupes" bactériens respectivement impliqués dans la fermentation méthanique et la réduction de sulfates.

Après une étude approfondie sur le plan bibliographique, la recherche des facteurs susceptibles d'influencer telle voie métabolique plutôt que telle autre a débouché sur le choix d'un mode d'action et d'expériences jouant sur l'activation de la méthanogénèse, sur l'inhibition de la sulfato-réduction, ou sur les deux à la fois.

I - ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA DIGESTION A FAIBLE CHARGE VOLUMIQUE SOUS L'EFFET DES SULFATES

Un digesteur contact anaérobie de 9 l est alimenté de façon semi-continue par une liqueur de synthèse simulant une eau résiduaire de distillerie de betterave (sans sulfate).

Concentration en DCO = 31 000 mg/l ;

Charge volumique # $0,1 \text{ kg DCO m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$;

Temps de séjour # 230 jours.

Des doses croissantes de sulfate sont ajoutées au cours de l'alimentation.

La production de gaz reste assez constante mais le rendement de gazéification diminue de façon caractéristique et la teneur en H_2S dans le biogaz augmente pour dépasser les 2 % lorsque la quantité de sulfate ajoutée totalise plus de 20 g (en 90 jours).

II - ETUDE DE L'INFLUENCE DE 5 COMPOSES ET DU TAUX DE MATIERES VOLATILES EN SUSPENSION SUR LA DIGESTION DE FERMENTEURS BATCH

Le même digesteur rempli à 10 l est alimenté avec le même substrat dans les mêmes conditions pour adapter des boues de station d'épuration.

Charge volumique # $2 \text{ kg DCO m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$;

Temps de séjour # 18 jours.

Après 30 jours les boues sont ensuite prélevées et chargées dans des fermenteurs de 1 l alimentés en une seule fois avec le même substrat correspondant à une charge volumique moyenne de $1,6 \text{ kg DCO m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ plus une dose de sulfate 24 mM et une ou plusieurs doses des 5 composés à tester. On conserve un témoin sans sulfate et un témoin avec sulfate, tous deux non traités. Chaque cycle dure une semaine.

Le Sulfate seul provoque une inhibition de la production globale de biogaz (- 36 % en moyenne) avec une modification de sa composition qui s'accroît au cours du temps :

le 1er jour : - 8 % en CH_4
+ 7 % en CO_2

le 7ème jour : - 31 % en CH_4
+ 200 % en CO_2

La teneur globale en H_2S est de 3 à 10 fois plus importante qu'avec les témoins sans sulfate, selon les essais.

Dans le surnageant des boues, les concentrations en DCO résiduelle et en acides volatils sont en moyenne respectivement 2,4 fois et 3,5 fois plus élevées que sur les témoins.

1. Le Méthanobac (activateur biologique de méthanisation).

Son emploi n'a pas produit d'effet particulier dans les conditions expérimentales de digestion batch (dose emploi : 71 mg/l).

2. Le chromate de sodium (inhibiteur de dissimilation des sulfates).

A la dose 11,76 mM il y a blocage presque total de la méthanisation sans supprimer la formation de sulfures.

A la dose 3,92 mM il y a inhibition parallèle de la formation d' H_2S et de biogaz, donc pas d'effet sélectif.

3. Le Mercapto-2-benzothiazole (inhibiteur métabolique des bactéries sulfato-réductrices). Aux doses où il est nécessaire pour inhiber la sulfato-réduction (2,6 mM), on enregistre un effet également néfaste sur la méthanisation, donc pas d'effet sélectif.

4. L'acétate de sodium (Activateur de la méthanogénèse).

A la dose 1,5 mM on ne note pas d'influence particulière sur la production de biogaz, mais une légère augmentation de la teneur en CH_4 en tout début de fermentation ou à faible charge massique. L'inhibition de la sulfato-réduction est mal caractérisée, et l'acétate ajouté semble plutôt employé comme substrat par les bactéries sulfato-réductrices, surtout à faible charge massique.

La dose 3,8 mM ne provoque pas d'écart caractéristique .

5. Le chlorure ferreux (Activateur de la méthanogénèse).

Son emploi améliore quantitativement (de 4,6 à 18,5 mM) la production de biogaz et modifie sa composition en CH_4 en stimulant les deux voies de formation du CH_4 . De plus, il favorise l'élimination des acides volatils et de la DCO en général. Il diminue la teneur en H_2S dans le biogaz, vraisemblablement par précipitation des sulfures en présence de fer, mais aussi en relevant la production de biogaz. Son effet direct sur la sulfato-réduction n'est pas clairement établi mais il est probable qu'en stimulant la méthanogénèse et en levant l'inhibition causée par les sulfures, il permet aux bactéries méthanogènes une meilleure utilisation de l'acétate et de l'hydrogène aux dépens de la réduction des sulfates.

6. Influence de la teneur en matières volatiles en suspension (inverse de la charge massique).

L'augmentation de la charge massique moyenne provoque, au-delà de 0,37 kgDCO/kgMV.j, une chute de la production de biogaz, et au-delà de 0,17 kg une diminution du taux de sulfato-réduction (2 fois moins environ qu'en dessous de cette valeur).

L'effet de surcharge pourrait être plus sensiblement ressenti par les bactéries sulfato-réductrices, probablement à cause de l'accumulation d'un intermédiaire métabolique non identifié et serait lié aux conditions batch de fermentation.

VI - CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de cette étude, motivée au départ par le souci d'éliminer la "nuisance" que constitue la présence des sulfates dans le processus de digestion anaérobie, nous avons été conduits à déterminer les interactions biologiques entre les deux "groupes" bactériens que représentent les micro-organismes réducteurs du sulfate et méthanogènes.

La recherche des facteurs susceptibles d'influencer telle voie métabolique plutôt que telle autre, a débouché sur le choix d'un mode d'action et d'expériences jouant sur l'activation de la méthanogénèse, sur l'inhibition de la sulfato-réduction ou sur les deux à la fois.

- l'influence de la faible charge volumique n'a pas donné les résultats escomptés puisqu'elle ne limite pas suffisamment la production d'hydrogène sulfuré,
- l'influence d'une forte charge massique a permis de limiter la formation d' H_2S mais dans le cadre d'une digestion à milieu non renouvelé,
- parmi les composés étudiés : Méthanobac , Chromate, Mercapto-2-Benzothiazole, Acétate et Chlorure ferreux, seuls le dernier nous apparaît intéressant d'emploi.

Il faut cependant replacer ces essais dans les limites de leur cadre et concevoir maintenant de nouvelles approches en fonction du but recherché et du niveau expérimental sur lequel on souhaite intervenir.

A une échelle microscopique

L'étude du facteur retenu, le fer, doit être conduite pour connaître son rôle exact comme intervenant dans la fermentation anaérobie et la sulfato-réduction, et pour cerner toutes ses possibilités, en adoptant toute une série d'expériences destinées à son observation.

Elle nécessite un retour à la pratique des cultures de souches pures et de co-cultures mais aussi à la mise en oeuvre d'analyses fines comme l'établissement de bilans précis de carbone et de soufre.

A une échelle macroscopique

L'utilisation de ces produits doit être envisagée sur le plan de leur faisabilité technique et économique avec des essais sur pilotes industriels alimentés de façon continue avec de vrais rejets, en travaillant avec des boues bien adaptées, sur des durées suffisamment longues.