

Faculté de Pharmacie

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 3 juillet 2018

Par Cédric DELMON

Né le 4 mai 1991 à Biarritz (64)

**Optimisation d'un pré-traitement thermique
en vue d'améliorer l'abattement des bactéries pathogènes
au cours de la méthanisation**

Thèse dirigée par Dr. Nathalie PESTOURIE et Dr. Audrey PROROT

Examineurs :

Pr. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Faculté de Pharmacie de Limoges	Présidente
Dr. Nathalie PESTOURIE, PH, Laboratoire d'hygiène du CHU de Limoges	Juge
Dr. Audrey PROROT, MCF, ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge
Pr. Jean-Luc DUROUX, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Limoges	Juge
Pr. Patrick LEPRAT, Directeur de l'ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge
Pr. Christophe DAGOT, PU, ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge
Dr. Magali CASELLAS-FRANÇAIS, MCF-HDR, ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge



Faculté de Pharmacie

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 3 juillet 2018

Par Cédric DELMON

Né le 4 mai 1991 à Biarritz (64)

**Optimisation d'un pré-traitement thermique
en vue d'améliorer l'abattement des bactéries pathogènes
au cours de la méthanisation**

Thèse dirigée par Dr. Nathalie PESTOURIE et Dr. Audrey PROROT

Examineurs :

Pr. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Faculté de Pharmacie de Limoges	Présidente
Dr. Nathalie PESTOURIE, PH, Laboratoire d'Hygiène du CHU de Limoges	Juge
Dr. Audrey PROROT, MCF, ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge
Pr. Jean-Luc DUROUX, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Limoges	Juge
Pr. Patrick LEPRAT, Directeur de l'ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge
Pr. Christophe DAGOT, PU, ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge
Dr. Magali CASELLAS-FRANÇAIS, MCF-HDR, ENSIL-ENSCI, Limoges	Juge



Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE (Renouvelé jusqu'au 1 ^{er} novembre 2018)
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE (1 ^{er} novembre 2016 pour 2 ans)

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE



CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE



ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BONNET Julien	PHARMACOLOGIE (01.10.2016 au 31.08.2018)
LAVERDET Betty	(1.09.2016 au 31.08.2017) PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques	(jusqu'au 30/09/2019)
DREYFUSS Gilles	(jusqu'au 30/09/2019)
MOESCH Christian	(1 ^{er} janvier 2017 - 1 ^{er} janvier 2019)



Tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais

Xavier Dolan



Remerciements

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ,

Pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury de thèse,
Pour l'attention que vous avez portée à ce travail.

A Madame le Docteur Nathalie PESTOURIE,

Pour avoir accepté d'être co-directrice de cette thèse,
Pour tes conseils avisés et ton aide précieuse.

A Madame le Docteur Audrey PROROT,

Pour avoir co-dirigé cette thèse,
Pour m'avoir supporté six mois et pour me supporter encore trois ans.

A Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX,

Pour l'honneur que vous me faites de faire partie de ce jury,
Pour votre bienveillance au cours de toutes ces années d'études.

A Monsieur le Professeur Patrick LEPRAT,

Pour l'honneur que vous me faites de faire partie de ce jury,
Pour votre sympathie et l'attention que vous avez portée à cette thèse.

A Monsieur le Professeur Christophe DAGOT,

Pour avoir accepté d'être membre de ce jury,
Pour votre aide au cours de ces derniers mois.

A Madame le Docteur Magali CASELLAS-FRANÇAIS,

Pour avoir accepté d'être membre de ce jury,
Pour ta disponibilité et tes conseils précieux.



A mes parents,

Maman, Papa, vous avez toujours été là pour moi et je ne saurai comment vous remercier. Une page se tourne enfin mais d'autres vont s'écrire. Soyez sûrs que je serai toujours à vos côtés et que je vous rendrai fiers. Je vous aime.

A Elsa,

Tu vas enfin pouvoir supprimer ce que tu avais écrit dans ta thèse : « l'éternelle distance » n'existe plus. Je ne saurai également comment te remercier pour toutes ces années (avec ou sans distance). Je t'aime.

A Stéphanie et Fabien,

Merci d'avoir été là et de m'avoir soutenu. Ce fut un long parcours où vous avez toujours été présents. Je vous en suis reconnaissant et espère encore partager de nombreux moments avec vous.

A Marie-Pauline,

Nos parcours « similaires » m'ont permis de mieux te connaître. Merci pour ton soutien au cours de ces derniers mois.

A Lyvia, Lise, Marine, Sébastien, Alexandre

Merci d'avoir été présents toutes ces années, à la fac et en dehors.

A Florian,

Merci pour ton soutien sans faille.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations	13
Généralités.....	17
I. Contexte bibliographique.....	18
I.1. La méthanisation, une filière en développement	18
I.1.1. Généralités	18
I.1.1.1. Etat des lieux	18
I.1.1.2. Principe général de la méthanisation	18
I.1.1.3. Ressources disponibles pour la méthanisation.....	19
I.1.2. Processus biochimiques et microbiologiques de la digestion anaérobie	21
I.1.2.1. Les différentes phases	21
I.1.2.2. Produits de la méthanisation	25
I.1.2.2.1. Le biogaz	25
I.1.2.2.2. Le digestat	26
I.1.3. Paramètres influençant la méthanisation	27
I.1.3.1. pH.....	27
I.1.3.2. Teneur en matière sèche.....	28
I.1.3.3. Température	28
I.1.3.4. Mode d'alimentation du méthaniseur	28
I.2. Aspects sanitaires de la digestion anaérobie : contexte réglementaire et enjeux environnementaux	29
I.2.1. Valorisation du digestat	29
I.2.2. Digestat en logique « déchet ».....	30
I.2.3. Digestat en logique « produit ».....	31
I.2.4. Avenir du digestat.....	33
I.3. Potentiel d'hygiénisation de la méthanisation	34
I.3.1. Principaux micro-organismes présents	34
I.3.2. Choix des micro-organismes indicateurs de traitement.....	36
I.3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	36
I.3.2.2. Entérocoques	37
I.3.2.3. <i>Clostridium sp.</i>	37
I.3.3. Paramètres permettant la réduction des agents pathogènes.....	39
I.4. Les co-traitements	39
I.4.1. Post-traitement ou traitement du digestat	40
I.4.2. Pré-traitement ou traitement des intrants	40
II. Optimisation d'un pré-traitement thermique en vue d'améliorer l'abattement des bactéries pathogènes au cours de la méthanisation	42
II.1. Objectifs.....	42
II.2. Matériel et méthodes	42
II.2.1. Prélèvements des échantillons.....	42
II.2.1.1. L'unité de méthanisation agricole	42



II.2.1.2. Les échantillons	43
II.2.2. Caractérisation microbiologique des échantillons prélevés	45
II.2.2.1. Entérocoques (microplaques MUD/EC Biokar Diagnostics®).....	45
II.2.2.2. <i>Escherichia coli</i> (microplaques MUG/EC Biokar Diagnostics®).....	45
II.2.2.3. Bactéries anaérobies sulfite-réductrices (BASR)	46
II.2.2.4. <i>Clostridium perfringens</i>	47
II.2.2.5. Calcul des abattements	47
II.2.3. Caractérisation physico-chimique et biochimique	48
II.2.3.1. pH	48
II.2.3.2. Matières Sèches (MS) et Matières Sèches Volatiles (MSV).....	48
II.2.3.3. Tests BMP (Biochemical Methan Potential)	48
II.2.4. Pré-traitements : Acides Gras Volatils et/ou Température.....	49
II.3. Résultats.....	51
II.3.1. Etat des lieux microbiologiques du site A.....	51
II.3.1.1. Cartographie microbiologique de l'unité de méthanisation.....	51
II.3.1.2. Pouvoir hygiénisant de l'unité de méthanisation sur les bactéries indicatrices	54
II.3.2. Analyse individuelle du potentiel d'hygiénisation de la méthanisation pour les différents intrants	55
II.3.3. Caractérisation microbiologique des effets d'un pré-traitement sur un intrant.....	57
II.3.3.1. Pré-traitement acide	57
II.3.3.2. Pré-traitement thermique	59
II.4. Discussion.....	60
Conclusion.....	66
Références bibliographiques	67
Annexes	71
Serment De Galien	77



Liste des abréviations

° C : degré Celsius

% : pour cent

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

AGV : Acide Gras Volatil

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BASR : Bactérie Anaérobie Sulfito-Réductrice

BMP : Biochemical Methan Potential

CH₃COOH : acide acétique

CH₄ : méthane

CO₂ : dioxyde de carbone

ERG : Entérocoques Résistants aux Glycopeptides

g : gramme

H₂ : dihydrogène

H₂O : eau

H₂S : sulfure de dihydrogène

ICPE : Installation Classée pour la Protection de l'Environnement

kg : kilogramme

kW : kilowatt

L : litre

Log : logarithme décimal

m³ : mètre cube

MFSC : Matières Fertilisantes et Supports de Culture

mg : milligramme

mL : millilitre

MS : Matières Sèches

MSV : Matières Sèches Volatiles

MUD : 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucoside

MUG : 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide

N₂ : diazote

Na₂CO₃ : carbonate de sodium



NPP : Nombre le Plus Probable

O₂ : dioxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

TSN : Tryptone-Sulfite-Néomycine

UFC : Unité Formant Colonie

μL : microlitre

UV : ultraviolet

VBNC : Viable But Non Culturable

VF : Viande-Foie



Table des illustrations

Figure 1 : Exemple d'une unité de méthanisation.....	19
Figure 2 : Etapes biochimiques de la méthanisation.....	21
Figure 3 : Aspects sanitaires du digestat.....	26
Figure 4 : Echantillons prélevés sur l'unité de méthanisation.....	44
Figure 5 : Fonctionnement général de l'unité de méthanisation du site A.....	44
Figure 6 : Réactions enzymatiques des milieux MUD et MUG.....	46
Figure 7 : Caractérisation microbiologique des différents intrants et produits de l'unité de méthanisation.....	52
Figure 8 : Concentrations en entérocoques, <i>Escherichia coli</i> (a) et <i>Clostridium perfringens</i> (formes totales et sporulées) (b) des substrats du site A.....	53
Figure 9 : Concentrations en agents pathogènes en entrée et sortie du digesteur du site A.....	54
Figure 10 : Abattement des concentrations en bactéries indicatrices après des tests BMP sur les céréales, le fumier et les matières de vidange.....	56
Figure 11 : Abattement de la concentration en <i>Escherichia coli</i> , entérocoques et spores de <i>Clostridium perfringens</i> après application d'une concentration croissante d'AGV sur les matières de vidange par rapport à l'échantillon non traité.....	58
Figure 12 : Abattement des concentrations en <i>Escherichia coli</i> , entérocoques et spores de <i>Clostridium perfringens</i> après application d'un traitement thermique à 70° C sur les matières de vidange de Tx à Tx+24 par rapport à l'échantillon non traité.....	59



Table des tableaux

Tableau 1 : Exemples de sous-produits animaux.....	20
Tableau 2 : Bactéries participant à la méthanisation.....	24
Tableau 3 : Composition du biogaz issu de la méthanisation à la ferme.....	25
Tableau 4 : Normes Européennes microbiologiques pour les digestats en « logique déchet »...31	
Tableau 5 : Teneur maximale en micro-organismes des MFSC destinés à être homologués.....	32
Tableau 6 : Réglementation sanitaire d'un amendement organique.....	33
Tableau 7 : Principaux micro-organismes présents dans les effluents d'élevage et le digestat...35	
Tableau 8 : Conditions opératoires du pré-traitement acide.....	50
Tableau 9 : Conditions opératoires du pré-traitement thermique.....	50
Tableau 10 : Caractérisation physico-chimique et potentiel méthanogène des intrants.....	55



Généralités

En France, environ 400 unités de méthanisation ont été construites afin de valoriser les matières organiques issues de différentes sources. Les intrants pouvant être utilisées dans le processus de méthanisation sont nombreux. Par exemple, les déchets ménagers, les déchets de restauration collective, les boues de station d'épuration, le fumier sont potentiellement méthanisables. Ainsi, ce procédé permet un recyclage de la biomasse et constitue une source d'énergie renouvelable.

Les deux produits obtenus à partir de la méthanisation sont le biogaz et le digestat. Le biogaz, qui constitue la partie gazeuse de la digestion anaérobie, peut être transformé en chaleur et en électricité, au même titre que le gaz naturel. Le résidu solide issu du procédé, ou digestat, est utilisé dans le domaine de l'agriculture. Il peut être épandu sur des terres cultivables et constitue un engrais naturel, riche en divers nutriments. Cependant, l'épandage des digestats peut générer des risques sanitaires en raison de la présence de nombreux micro-organismes pathogènes susceptibles de contaminer les sols. Il est donc essentiel d'assurer la qualité sanitaire des digestats afin de minimiser le risque de dissémination des micro-organismes pathogènes sans altérer le rendement énergétique de l'installation de méthanisation. D'un point de vue économique, l'acquisition du statut de produit de certains digestats serait facilitée par une meilleure maîtrise de la qualité sanitaire des résidus de la digestion anaérobie. Pour tenter de diminuer le taux de micro-organismes pathogènes dans les produits de la méthanisation, des post-traitements peuvent être appliqués. Cependant, bien qu'hygiénisant, ils présentent un certain nombre d'inconvénients, tels qu'une recontamination possible ou une perte d'azote par volatilisation. Le développement de procédés de traitement en amont de la digestion anaérobie apparaît comme une alternative intéressante.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de recherche avec l'évaluation du potentiel d'un pré-traitement « acido-thermique » à augmenter l'effet hygiénisant de la méthanisation pour améliorer la qualité sanitaire des digestats.



I. Contexte bibliographique

I.1. La méthanisation, une filière en développement

I.1.1. Généralités

I.1.1.1. Etat des lieux

La méthanisation agricole est un processus recyclant la biomasse pour permettre la production d'énergie et d'engrais naturels. L'Allemagne, pays Européen où le développement de la filière est le plus important, compte plus de 9000 méthaniseurs (1). La méthanisation est en plein essor en France. Les secteurs économiques agricole et industriel voient dans le procédé de méthanisation une technologie permettant de répondre à des problématiques liées au recyclage de déchets issus de leur activité. De plus, la transition écologique s'opérant de nos jours, pose des questionnements sur la quantité de ressources disponibles et l'accès de celles-ci à la population. Les pouvoirs publics tentent de trouver des solutions à l'épuisement des ressources et à l'accroissement de la production de déchets (2). Ils souhaitent aussi trouver une alternative à l'énergie nucléaire et aux énergies fossiles. La digestion anaérobie est un atout pour la transition énergétique qui s'accomplit actuellement. Il existe de nombreuses substances potentiellement méthanisables. Le fumier, les boues de station d'épuration, les déchets de restauration collective et les déchets ménagers sont des exemples de matières organiques destinées à la digestion anaérobie. La méthanisation peut être considérée comme une solution d'énergie renouvelable permise par le recyclage de la biomasse.

I.1.1.2. Principe général de la méthanisation

La méthanisation ou digestion anaérobie utilise une grande diversité de matières organiques, appelées intrants, afin de produire du biogaz et du digestat (Figure 1). Les matières organiques exploitées pour entrer dans un processus de méthanisation sont des déchets issus de la collectivité ou bien des déchets issus d'activités agricoles ou industrielles. Le biogaz, constitué principalement de méthane, permet la cogénération de chaleur et d'électricité utilisables sur le site de l'unité de méthanisation. Ce biogaz peut aussi être utilisé en tant que



carburant pour des voitures ou bien alimenter des réseaux de gaz naturel. Quant au digestat, ce produit solide-liquide est destiné à être utilisé comme engrais sur des terres agricoles. Il est ainsi épandu sur des cultures afin d'améliorer la nutrition des sols et des végétaux.

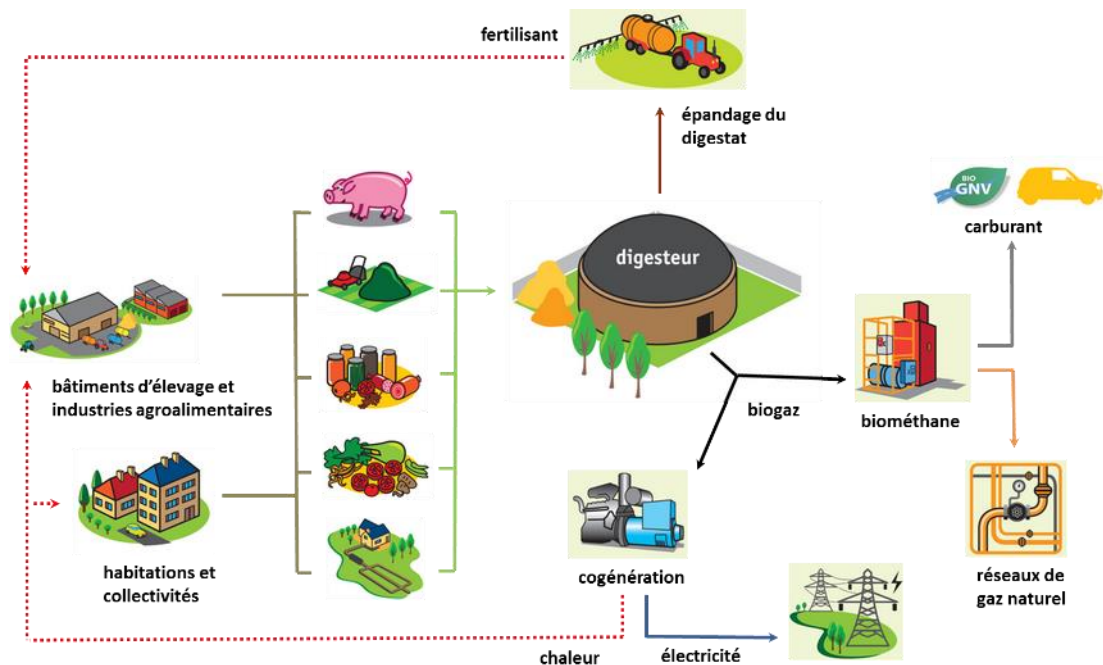


Figure 1 : Exemple d'une unité de méthanisation (d'après le site national des chambres d'agriculture (3))

I.1.1.3. Ressources disponibles pour la méthanisation

La méthanisation de la matière organique peut s'effectuer à plus ou moins grande échelle. L'ADEME (1) distingue différents types de méthanisation. Elles sont fonction de la capacité de production du méthaniseur. Si la puissance produite par l'unité est supérieure à 500 kW électriques, il s'agit alors d'une unité « territoriale ». A l'inverse, la « méthanisation à la ferme » se définit par une capacité de production du méthaniseur inférieure à 500 kW électriques. Les matières entrantes sont également différentes en fonction du type d'unité. En effet, il est important de garder une charge en intrants constante et équilibrée pour obtenir une qualité et un rendement de méthanisation optimaux.

Les intrants majeurs retrouvés dans le cadre d'une méthanisation agricole sont les sous-produits animaux et les déchets verts. Les sous-produits animaux sont des cadavres entiers ou parties d'animaux. Ils peuvent aussi être des produits d'origine animale ou d'autres produits obtenus à partir d'animaux, qui ne sont pas destinés à la consommation humaine, y compris les ovocytes, les embryons et le sperme. Il existe 3 catégories de sous-produits animaux (4) (5). Les sous-produits de catégorie 1 doivent être éliminés et non méthanisés. Les sous-produits de catégorie 2 et 3 sont, quant à eux, autorisés comme intrants destinés à la digestion anaérobie (Tableau 1). Les sous-produits animaux destinés à la digestion anaérobie sont des carcasses d'animaux ou des produits d'animaux non destinés à la consommation humaine tels que le lisier. Les déchets verts sont des résidus de végétaux issus, par exemple, de l'entretien des terres agricoles.

Tableau 1 : Exemples de sous-produits animaux (d'après le Parlement Européen (4))

Sous-produits animaux	Exemples	Méthanisation
Catégorie 1	Cadavres d'animaux sauvages susceptibles d'être infectés par une maladie transmissible	NON
Catégorie 2	Lisier, contenu de l'appareil digestif	OUI
Catégorie 3	Carcasses propres à la consommation humaine et sans signe de maladie	OUI



I.1.2. Processus biochimiques et microbiologiques de la digestion anaérobie

I.1.2.1. Les différentes phases

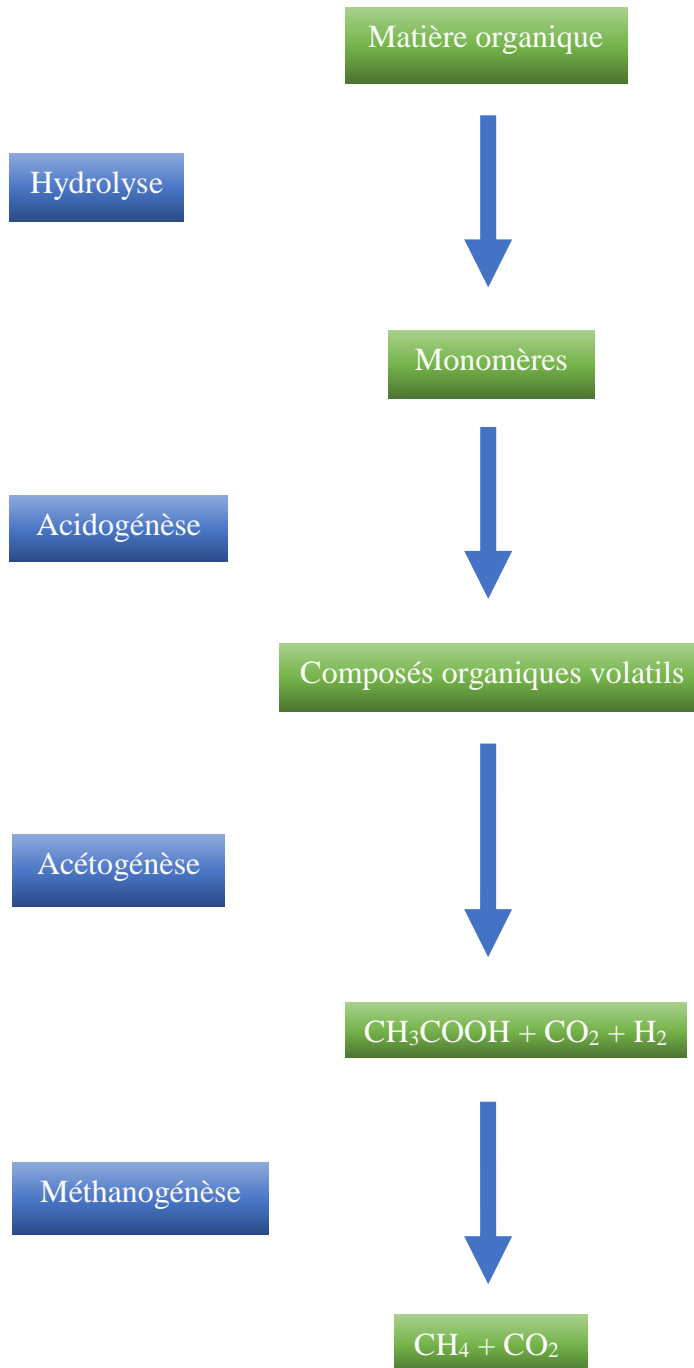


Figure 2 : Etapes biochimiques de la méthanisation (d'après Escudie *et al.* (6))

La méthanisation se décompose en 4 principales réactions (6) : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Figure 2).

Tout d'abord, la matière organique fraîche insérée dans le méthaniseur est dégradée par des bactéries hydrolytiques. Ces bactéries produisent des exo-enzymes à l'origine de l'hydrolyse des polysaccharides, lipides et protéines en monomères simples. L'étape d'hydrolyse est réalisée par plusieurs groupes de bactéries anaérobies strictes et facultatives dont les principales espèces appartiennent au genre *Bacillus*, *Clostridium* ou *Ruminococcus* (Tableau 2).

Les monomères issus de l'étape d'hydrolyse sont ensuite métabolisés par des micro-organismes fermentaires en acides gras volatils, en alcool, en acides organiques et en hydrogène et dioxyde de carbone. Les bactéries qui participent à cette phase d'acidogénèse peuvent être anaérobies strictes ou facultatives. Les bactéries du genre *Propionibacterium* ainsi que des entérobactéries participent à la formation d'alcools et d'acides gras volatils lors de l'acidogénèse.

Puis, l'acétogénèse permet la formation de dioxyde de carbone (CO_2), d'acide acétique (CH_3COOH) et de dihydrogène (H_2) qui constituent les précurseurs directs du méthane. Les bactéries participant à cette étape de méthanisation sont les bactéries acétogènes non syntrophes et les bactéries productrices obligées d'hydrogène. Les bactéries acétogènes sont divisées en deux groupes. Le premier groupe constitué majoritairement de *Clostridium* est le groupe des « homo-acétogènes ». Le second groupe comporte plusieurs genres de bactéries tels que *Desulfovibrio* ou *Desulfobacter*. Les bactéries productrices obligées d'hydrogène ou syntrophes sont, par exemple, *Syntrophobacter* ou *Syntrophomonas*. Ce sont des bactéries incapables de dégrader des composés seules. Elles ont besoin d'une seconde famille de bactéries pour dégrader la matière. Dans le cadre de la méthanisation, elles sont associées aux bactéries acétogènes. Le dihydrogène formé lors de cette troisième étape est un composé toxique car il inhibe l'acétogénèse entraînant l'arrêt de la méthanisation.



Les archées, bactéries anaérobies strictes, permettent l'élimination du dihydrogène et la formation de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone lors de la méthanogénèse. Les archées méthanogènes sont constituées d'un groupe hydrogénotrophe et d'un groupe acétotrophe. Le groupe hydrogénotrophe utilise le dihydrogène produit lors de l'acétogénèse et il est composé de bactéries du genre *Methanobacterium* ou *Methanogenium*. Le groupe acétotrophe composé de *Methanosaeta* et *Methanosarcina* utilise l'acétate produit lors de l'acétogénèse pour produire du méthane et du dioxyde de carbone.



Tableau 2 : Bactéries participant à la méthanisation (d'après Escudie *et al.* et Metheor (6) (7))

Etapas de la méthanisation	Bactéries impliquées	Genres
Hydrolyse	Bactéries hydrolytiques et fermentatives	<i>Bacillus sp</i> <i>Butivibrio sp</i> <i>Clostridium sp</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Propionibacterium sp</i> <i>Ruminococcus sp</i>
Acidogénèse		<div data-bbox="1129 745 1471 1077"> <p>Bactéries homoacétogènes</p> <p><i>Acetoanaerobicum sp</i> <i>Acetobacterium sp</i> <i>Acetogenium sp</i> <i>Clostridium sp</i> <i>Pelobacter sp</i> <i>Sporomusa sp</i></p> </div> <div data-bbox="1129 1077 1471 1245"> <p>Bactéries syntrophes</p> <p><i>Syntrophobacter sp</i> <i>Syntrophomonas sp</i> <i>Syntrophus sp</i></p> </div> <div data-bbox="1129 1245 1471 1464"> <p>Bactéries sulfato-réductrices</p> <p><i>Desulfobacter sp</i> <i>Desulfomonas sp</i> <i>Desulfotomaculum sp</i> <i>Desulfovibrio sp</i></p> </div>
Acétogénèse	Bactéries syntrophes	<i>Syntrophobacter sp</i> <i>Syntrophomonas sp</i> <i>Syntrophus sp</i>
	Bactéries sulfato-réductrices	<i>Desulfobacter sp</i> <i>Desulfomonas sp</i> <i>Desulfotomaculum sp</i> <i>Desulfovibrio sp</i>
Méthanogénèse	Bactéries hydrogénotrophes	<i>Methanobacterium sp</i> <i>Methanobrevibacter sp</i> <i>Methanogenium sp</i> <i>Methanospirillum sp</i>
	Bactéries acétotrophes	<i>Methanosaeta sp</i> <i>Methanosarcina sp</i>



I.1.2.2. Produits de la méthanisation

La digestion anaérobie est un procédé permettant la transformation de la matière organique. L'objectif de la méthanisation est d'obtenir des produits pouvant être valorisés dans différents domaines. En effet, les deux produits obtenus à la sortie de l'unité de méthanisation sont le biogaz et le digestat (8).

I.1.2.2.1. Le biogaz

Le biogaz constitue la partie gazeuse de la digestion anaérobie. Le biogaz, constitué en majorité de méthane (Tableau 3), est utilisé pour produire de la chaleur et/ou de l'électricité. Le biogaz est généralement valorisé sur site par combustion directe (chaudière) ou par cogénération (production de chaleur et d'électricité). Si ce biogaz est majoritairement utilisé sur le site même du méthaniseur pour ses propres besoins, il peut également être injecté dans un réseau de gaz ou produire du biocarburant.

Tableau 3 : Composition du biogaz issu de la méthanisation à la ferme (d'après Martin-Diaz *et al.* (9))

Méthane (CH ₄)	45-70 %
Dioxyde de carbone (CO ₂)	30-55 %
Vapeur d'eau (H ₂ O)	1-5 %
Diazote (N ₂)	0-5 %
Dioxygène (O ₂)	0-2 %
Dihydrogène (H ₂)	0-1 %
Sulfure de dihydrogène (H ₂ S)	0,005-0,5 %



I.1.2.2.2. Le digestat

La dégradation de la matière organique conduit également à la production d'un résidu, appelé digestat, potentiellement valorisable comme fertilisant pour l'agriculture et dont la valeur agronomique serait supérieure à celle du déchet avant digestion. Après une digestion anaérobie de plusieurs dizaines de jours, ce résidu contient la fraction non dégradée de la matière organique initiale ainsi que l'ensemble des matières minérales. Il constitue donc un engrais naturel, riche en divers nutriments qui peut être épandu sur des terres cultivables (10). Ce digestat peut alors être valorisé de deux manières différentes. Soit il suivra une logique « déchet », soit une logique « produit » (Figure 3).

Dans le cas de la logique « déchet », il pourra être épandu sur des cultures car il possède des propriétés agronomiques non négligeables. Si ce digestat est dans une logique « produit », il devra, non seulement, améliorer la nutrition des végétaux et les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols mais également ne présenter aucun risque pour la santé humaine et animale (11). Un cahier des charges strict sur le plan sanitaire devra donc être établi afin de démontrer l'innocuité de ce produit

Le digestat se présente sous des formes différentes résultant du type de méthanisation appliqué sur les intrants. La méthanisation par voie humide donne des digestats solides et liquides contrairement à la méthanisation par voie sèche engendrant des digestats uniquement solides (12).

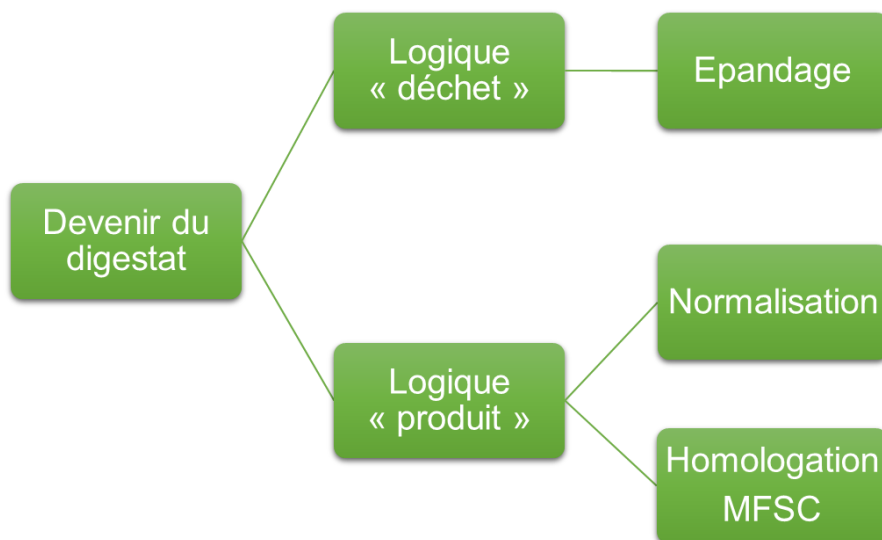


Figure 3 : Aspects sanitaires du digestat (d'après ministère de l'agriculture (11))

I.1.3. Paramètres influençant la méthanisation

Les paramètres physico-chimiques agissant sur la méthanisation sont nombreux. Le pH, la teneur en matière sèche, la température et le mode d'alimentation des unités de méthanisation sont les paramètres les plus influents (8).

I.1.3.1. pH

Le pH est un paramètre important pour permettre un rendement optimal de chaque étape de la méthanisation. Les étapes d'hydrolyse et d'acidogénèse doivent s'effectuer à pH acide (entre 4,5 et 6,3) tandis que les étapes d'acétogénèse et de méthanogénèse se déroulent à pH neutre aux alentours de 7.

Ce facteur est donc primordial pour permettre une succession rapide et efficace des étapes de la digestion anaérobie (13). Si le pH augmente (supérieur à 7) lors de la méthanisation, dû à un excès de substrats riches en protéines, alors il y a alcalose et les bactéries acidogènes et acétogènes sont inhibées. Ceci entraîne un ralentissement de la méthanisation et une diminution de la production de biogaz. Pour réduire cette alcalose, il est important de limiter l'apport de substrats riches en protéines.

A l'inverse, si le pH diminue, dû à un apport trop important de matières organiques dans le digesteur, alors il y a acidose. En effet, les premières étapes de la méthanisation ont lieu mais les étapes d'acétogénèse et de méthanogénèse sont inhibées dû à l'acidification du milieu. Une accumulation d'acides gras volatils s'opère avec de l'acide propionique en excès. Ainsi, la production de méthane diminue mais la production de dioxyde de carbone augmente. Pour éviter l'acidose, il est possible d'incorporer, dans le digesteur, du bicarbonate de sodium afin de tamponner le milieu.



I.1.3.2. Teneur en matière sèche

Les matières organiques insérées dans le méthaniseur, appelées intrants, sont diverses et variées. Des graisses animales, des boues de stations de traitement des eaux usées, des déchets non dangereux issus d'ordures ménagères peuvent être méthanisés (14). Concernant la méthanisation « à la ferme », les intrants les plus courants sont les lisiers et fumiers de bovins, porcins et volailles. Ces effluents d'élevage peuvent être plus ou moins liquides. Ainsi, selon leur teneur en matière sèche, la méthanisation par voie sèche ou humide sera employée. La méthanisation par voie sèche concerne les intrants composés de 15 à 40 % de matière sèche. La méthanisation par voie humide concerne les intrants composés de moins de 15 % de matière sèche (8).

I.1.3.3. Température

La digestion anaérobie peut être réalisée à différentes températures (15). La méthanisation mésophile se déroule à une température de 35-37° C environ. La méthanisation thermophile a lieu à 55° C environ. La digestion anaérobie mésophile est la plus courante car elle est moins coûteuse d'un point de vue énergétique, même si, les rendements et surtout les cinétiques de dégradation, sont un peu moins importants.

I.1.3.4. Mode d'alimentation du méthaniseur

On distingue 3 types de procédés de méthanisation : continu, discontinu ou semi-continu. La plupart des digesteurs d'effluents et de boues sont à alimentation continue. L'alimentation et la vidange du digesteur se font en continue avec une quantité entrante équivalente à la quantité sortante. Ce type d'alimentation convient particulièrement au traitement des déchets liquides, tels que les effluents d'élevage car ils doivent directement entrer



dans un processus de méthanisation. Aucun stockage n'est, à l'heure actuelle, possible sans une perte importante du pouvoir méthanogène de ces effluents. Par ailleurs, ils permettent une automatisation du processus et s'adaptent donc à des projets de grande ampleur.

Un autre mode d'alimentation du digesteur est le procédé discontinu. Il consiste à alimenter le digesteur dès que la production de biogaz diminue voire disparaît (8). Enfin, dans le cas des procédés semi-continus, le digesteur est progressivement rempli par des charges successives réparties dans le temps. La vidange est effectuée lorsque le volume utile du digesteur est atteint et que la production de biogaz devient insuffisante.

I.2. Aspects sanitaires de la digestion anaérobie : contexte réglementaire et enjeux environnementaux

I.2.1. Valorisation du digestat

Comme évoqué précédemment, le digestat possède de nombreuses qualités nutritives pour les sols. Par exemple, ce dernier est composé de phosphore. Ce minéral est indispensable à la photosynthèse des plantes et donc pour leur croissance (16). Le digestat est un produit pouvant être valorisé dans le secteur agricole mais de nombreux inconvénients apparaissent au fil des années et des recherches sur cette matière.

Certains composés chimiques comme l'azote posent actuellement des interrogations (17). Après la méthanisation, le digestat obtenu renferme une quantité importante de cet élément chimique. Ceci constitue une valeur fertilisante importante du digestat. Mais une grande partie de cet azote est, soit transformée en azote ammoniacal, soit volatilisée dans l'air sous forme d'ammoniac. Par conséquent, une acidification du digestat se produit et la valeur fertilisante de celui-ci diminue.

Une valorisation optimale du digestat passe donc par une qualité et une efficacité maximale de l'installation de méthanisation. Surtout, la qualité du digestat dépend du type d'intrants, de la technologie utilisée, ainsi que des traitements. Aujourd'hui, le retour au sol du



digestat est encadré par la législation Française et Européenne selon deux options : la « logique déchet » qui aboutit à une valorisation du digestat par épandage et la « logique produit » qui conduit à une commercialisation après une homologation ou normalisation.

I.2.2. Digestat en logique « déchet »

Actuellement, la majorité des digestats sont considérés comme des « déchets » (8). La réglementation Européenne impose une teneur maximale en *Escherichia coli* ou entérocoques à la sortie du méthaniseur (18) (Tableau 4). De plus, les conditions d'épandage sont aussi fonction du type d'intrants. Par exemple, si des sous-produits animaux de catégorie 2 sont méthanisés, ils doivent subir une étape de transformation (4) avant d'être méthanisés puis épandus à l'exception du lisier, du lait ou produits à base de lait, des œufs ou produits à base d'œufs, du colostrum, de l'appareil digestif et son contenu. En revanche, les sous-produits animaux de catégorie 3 ne nécessitent pas d'étape de transformation (4) avant d'être méthanisés selon la réglementation Européenne.

La réglementation Française énonce certaines conditions d'autorisation d'épandage du digestat. Ces conditions sont fonction du type d'unité de méthanisation. Les méthaniseurs sont considérés comme des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE). Elles peuvent être soumises à autorisation, enregistrement ou déclaration envers le législateur. Une réglementation plus ou moins stricte des conditions d'épandage est alors appliquée. Par exemple, pour des unités de méthanisation soumises à autorisation (19), certains éléments chimiques ne doivent pas excéder des valeurs-limites. A titre d'exemple, la quantité de mercure dans le digestat ne doit pas excéder 10 mg/kg de matière sèche (20). Le digestat peut également être valorisé et mis sur le marché. Il obtiendra ainsi le statut de produit.



Tableau 4 : Normes Européennes microbiologiques pour les digestats en « logique déchet » (d'après le règlement Européen de 2011 (18))

Micro-organismes	Normes
<i>Escherichia coli</i> ou Entérocoques	m = 1000/g M = 5000/g n = 5 c = 1

m = valeur-seuil ; M = valeur maximale ; n = nombre d'échantillons à tester ; c = nombre d'échantillons dans lequel le nombre de bactéries peut se situer entre m et M

I.2.3. Digestat en logique « produit »

L'homologation du digestat est une alternative au statut de déchet (21). Pour être homologué et commercialisé, l'entrepreneur soumet à l'ANSES un dossier démontrant l'innocuité et la valeur ajoutée apportée par le digestat. Le législateur, après avis de l'ANSES, peut ainsi autoriser la mise sur le marché du digestat. Le digestat est donc classé dans la catégorie des MFSC : Matières Fertilisantes et Supports de Culture. Le dossier de demande d'homologation doit respecter certains seuils à ne pas dépasser. En effet, la concentration de plusieurs micro-organismes doit tenir compte des valeurs de référence énoncées par l'ANSES (22) (Tableau 5).



Tableau 5 : Teneur maximale en micro-organismes des MFSC destinés à être homologués (d'après ANSES, 2013 (22))

Micro-organismes	Cultures					
	Grandes cultures	Arboriculture Viticulture Petits fruits	Gazons Prairies	Sylviculture Pépinières ornementales	Cultures florales	Légumes Fraises
Entérocoques	<10 000/g					<100/g
<i>Escherichia coli</i>	<1 000/g					<100/g
<i>Clostridium perfringens</i> (spores et formes végétatives)	m = 100 M = 1°000 n = 3 c = 1	m = 10 M = 100 n = 3 c = 1	m = 100 M = 1°000 n = 3 c = 1	m = 10 M = 100 n = 3 c = 1	m = 10 M = 100 n = 3 c = 1	m = 10 M = 100 n = 3 c = 1
<i>Salmonella</i>	Absence dans 1 g					Absence dans 25 g
<i>Staphylococcus aureus</i> ou à coagulase +	<10/g					
<i>Listeria monocytogenes</i>			Absence dans 25 g (prairies)	Absence dans 25 g		
Œufs ou larves de nématodes	Absence dans 1 g				Absence dans 25 g	

m = valeur de référence M = seuil limite d'acceptabilité ; n = nombre minimal d'échantillons à analyser ; c = nombre d'échantillons pouvant être compris entre m et M

Ainsi, en 2014 (23), l'agence donna un avis défavorable à l'homologation du digestat issu d'une unité de méthanisation. Les critères d'innocuité n'étaient pas respectés car la bactérie *Clostridium perfringens* (bactérie indicatrice) était présente en quantité importante. Par ailleurs, le choix fait par certaines unités de méthanisation pour commercialiser le digestat est d'obtenir le statut d'amendement organique du produit. Pour être mis sur le marché, le digestat doit, à la sortie du méthaniseur, subir un compostage. Ainsi, cette matière fertilisante obtient le statut



d'amendement organique et est réglementé par la réglementation Européenne de 2009 (4) et la norme NFU 44-051 (24).

Cette norme impose l'absence de *Salmonella* et d'œufs d'helminthes viables au sein de l'amendement organique. Si l'amendement est destiné à la culture maraîchère, les œufs d'helminthes et *Salmonella* doivent respectivement être absents dans 1,5 g et 25 g de matière. Si celui-ci est destiné à toute autre culture, les œufs et *Salmonella* doivent respectivement être absents dans 1,5 g et 1 g de matière (Tableau 6). Les entérocoques et *Escherichia coli* peuvent être comptabilisés mais ils n'ont que le statut « d'indicateur de traitement ». Ils n'entraînent donc pas une remise en cause de l'utilisation de la matière fertilisante destinée à être mise sur le marché. Cependant, chaque Etat membre de l'Union Européenne peut attribuer des dérogations tout en préservant une réglementation sanitaire stricte.

En avril 2018 (25), la France a ainsi permis aux unités de méthanisation utilisant des sous-produits animaux en tant qu'intrants d'appliquer un traitement thermique moins important sur ces sous-produits lorsque le digestat est destiné à devenir du compost commercialisé sur le territoire Français.

Tableau 6 : Réglementation sanitaire d'un amendement organique (d'après norme NFU-44051)

Agents pathogènes	Amendement organique	
	Sur cultures maraîchères	Sur autres cultures
Œufs d'helminthes	Absent dans 1,5 g de matière	
<i>Salmonella</i>	Absent dans 25 g de matière	Absent dans 1 g de matière

I.2.4. Avenir du digestat

Lorsque le digestat est considéré comme un produit, il doit avoir une composition invariable dans le temps. Par conséquent, il est censé répondre à des critères de sécurité et de stabilité précis. Ceci est difficile à mettre en place car le digestat est le résultat de la méthanisation de matières organiques. La composition de ces dernières peut fluctuer. Ainsi, le



digestat obtenu pourrait évoluer et ne respecterait plus les exigences sanitaires. Une réglementation avec des autorisations d'épandage propre à chaque site et chaque digestat seront instituées dans les années à venir. En effet, de nos jours, des normes relatives aux engrais et amendements organiques sont soumises à révision. Par conséquent, il est primordial de développer et d'évaluer, dès aujourd'hui, des traitements efficaces afin d'éliminer les micro-organismes présents dans le digestat.

I.3. Potentiel d'hygiénisation de la méthanisation

La méthanisation présente des pouvoirs hygiénisants sur la matière organique permettant ainsi une diminution de la concentration en agents pathogènes.

I.3.1. Principaux micro-organismes présents

Les effluents d'élevage et, par conséquent, le digestat, peuvent potentiellement poser des soucis sanitaires car ils peuvent renfermer des micro-organismes pathogènes pour l'Homme et l'animal. Ils peuvent donc provoquer des zoonoses. Une zoonose est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (26) comme une maladie pouvant se transmettre naturellement de l'animal à l'Homme. Les bactéries ainsi épandues sur des cultures par l'intermédiaire du digestat peuvent aussi résister dans les sols et être présentes à la surface de certains fruits et légumes (27) (28). Ces derniers sont destinés à la consommation humaine et animale. Par conséquent, ils peuvent entraîner des Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) (29) et poser un réel problème de santé publique.



Tableau 7 : Principaux micro-organismes présents dans les effluents d'élevage et le digestat (d'après Benoît *et al.* et ANSES (29) (30))

Micro-organismes	TIAC	Zoonose
<i>Salmonella sp</i>	X	X
<i>Listeria monocytogenes</i>	X	X
<i>Yersinia enterocolitica</i>	X	X
<i>Campylobacter jejuni</i>	X	X
<i>Escherichia coli</i>	X	X
<i>Cryptosporidium parvum</i>	X	X
<i>Giardia intestinalis</i>	X	X
Helminthes	X	X
Entérovirus		
Hépatite E	X	X
<i>Clostridium difficile</i>		
<i>Clostridium perfringens</i>	X	X

La majorité des pathogènes retrouvés dans les effluents d'élevage ou dans le digestat sont des agents vecteurs de zoonoses et/ou de TIAC. Seuls les entérovirus et *Clostridium difficile* (Tableau 7) ne sont pas des pathogènes considérés comme des agents responsables de zoonoses ou de TIAC. Dans la nature, les bactéries, virus et parasites résistent plusieurs semaines voire plusieurs mois mais disparaissent avec le temps (31). Les bactéries du genre *Clostridium* peuvent résister dans l'environnement grâce à leur capacité de sporuler. Des traitements sont donc indispensables à l'abattement du taux de micro-organismes présents dans les produits de la méthanisation.



I.3.2. Choix des micro-organismes indicateurs de traitement

Pour définir la qualité d'un mode de traitement, il est important de sélectionner les micro-organismes à étudier. Ces derniers doivent être représentatifs d'un plus grand nombre de type de pathogènes. Les méthodes pour étudier ces micro-organismes indicateurs sont tenues d'être peu coûteuses (32) et facilement reproductibles. De plus, les micro-organismes indicateurs doivent être présents en grande quantité, spécifiques et suffisamment résistants dans le milieu extérieur afin de les manipuler en laboratoire (33). L'étude des micro-organismes « indicateurs » ne doit pas se limiter à un seul agent pathogène. Il est préférable d'en étudier plusieurs pour permettre ainsi une étude microbiologique plus exhaustive. Par exemple, les indicateurs de contamination fécale les plus courants sont les coliformes et les entérocoques. Des méthodes de référence sont disponibles pour rechercher et quantifier ces bactéries (34). La standardisation des méthodes permet ainsi de comparer différents travaux de recherche sur une même base scientifique.

I.3.2.1. Escherichia coli

Concernant la méthanisation à la ferme, un des principaux agents étudiés est *Escherichia coli* (27). *Escherichia coli* appartient à la famille des entérobactéries. Ce bacille Gram négatif, non sporulé et non capsulé, peut être responsable d'infections intestinales telles que des diarrhées, ou extra-intestinales telles que des infections urinaires voire des septicémies (35). *E. coli* est une espèce commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux. Cette bactérie peut se développer en absence ou présence d'oxygène car son métabolisme respiratoire est aéro-anaérobie facultatif pour ainsi résister dans le milieu extérieur. Cependant, *E. coli* ne résiste pas, par exemple, à la pasteurisation. La transmission des infections intestinales dues à *E. coli* est féco-orale liée au péril fécal, par manque d'hygiène. Cette transmission peut être directe, de façon manuportée, ou indirecte par contamination fécale des aliments et de l'eau. Les diarrhées résultant d'un déséquilibre au niveau des entérocytes sont pour la majorité de type aqueuses. Concernant les infections extra-intestinales engendrées par *E. coli*, ces dernières sont



principalement des infections urinaires. En effet, *E. coli* est le premier germe responsable d'infections urinaires communautaires et nosocomiales (35).

I.3.2.2. Entérocoques

Les entérocoques sont également des indicateurs de contamination fécale pouvant être recherchés au cours de la méthanisation agricole (36). Ce sont des cocci Gram positif en chaînettes pouvant être responsables d'infections urinaires, de surinfections de plaies voire de bactériémies chez l'Homme. De plus, les entérocoques sont des bactéries commensales du tube digestif et des voies génitales féminines responsables également d'infections nosocomiales. Les principales espèces retrouvées chez l'Homme sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ces bactéries sont plus résistantes dans l'environnement que *E. coli*. En effet, elles peuvent être naturellement résistantes à la pasteurisation (37). De plus, l'emploi, de façon massive et déraisonnée, d'antibiotiques leur a permis d'acquérir un certain nombre de résistances (38). Ces entérocoques, résistants aux antibiotiques de la famille des glycopeptides, sont appelés des Entérocoques Résistants aux Glycopeptides ou ERG. Ils constituent un réel problème de santé publique car ces ERG peuvent être présents en milieu hospitalier mais également au sein d'exploitations agricoles. Ainsi, la prise en charge est de plus en plus complexe et nécessite une surveillance accrue.

I.3.2.3. Clostridium sp.

Des bactéries résistantes dans l'environnement sont aussi recherchées. Parmi ces bactéries indicatrices, les *Clostridium* ont une place particulière. Ce sont des bactéries qui se développent naturellement dans les milieux organiques riches, anaérobies et à 37° C. Elles sont donc parfaitement adaptées aux conditions des digesteurs anaérobies. Elles peuvent être présentes sous deux formes : la forme végétative qui est la forme permettant la croissance et la multiplication de la bactérie et la forme sporulée qui est la forme de résistance dans l'environnement.



Les bactéries du genre *Clostridium* possèdent une capacité importante d'adaptation à l'environnement dans lequel elles vivent. Lorsqu'elles sont privées de nutriments pour leur permettre de vivre de façon optimale, elles résistent sous forme de spores. Elles sont constituées d'un noyau contenant le génome bactérien protégé par une paroi sporale. Ce protoplaste ou partie centrale est enveloppé par des tuniques interne et externe. Enfin, la couche la plus externe est une membrane lipoprotéique appelée exosporium.

De plus, les spores possèdent un complexe composé de dipicolinate de calcium et de petites protéines acido-solubles localisé au centre de celles-ci. Cette association, absente des cellules végétatives, leur permet de résister à la chaleur, aux rayonnements ultra-violets. Il induit également une déshydratation du contenu de la spore. Ceci inhibe les effets dénaturants du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) lorsqu'il est utilisé comme traitement chimique d'élimination des *Clostridium*. Par ailleurs, les spores se forment à partir de cellules végétatives.

Il existe huit étapes de la sporulation notées de 0 à VII. Lors du stade 0, il y a répllication puis condensation de l'ADN. Deux patrimoines génétiques sont ainsi créés. Puis, lors du stade I, ce patrimoine s'étend sur toute la longueur du cytoplasme bactérien pour former un filament chromatique axial. Un des deux génomes se place à un pôle de la bactérie et un septum de sporulation, lors du stade II, cloisonne l'ADN situé à ce pôle. Le septum disparaît et la préspore composée d'une membrane externe et d'une membrane interne se forme lors du stade III. Ensuite, l'exosporium apparaît lors du stade IV. Le stade V est marqué par la synthèse de petites protéines acido-solubles et d'acide dipicolinique. Enfin, le stade VI permet la maturation de la spore et elle est libérée lors du stade VII par lyse de la bactérie. Cet état de sporulation peut durer plusieurs dizaines d'années. Le processus inverse, appelé germination, a lieu lorsque les conditions de croissance s'améliorent pour laisser croître de façon idéale *Clostridium* (39).

La forme sporulée de cette bactérie est très souvent étudiée lorsque l'effet d'un traitement sur de la matière organique est recherché. En effet, la diminution du nombre de spores de *Clostridium perfringens* après application d'un traitement antibactérien témoigne de l'efficacité notable de ce traitement car les spores sont des formes bactériennes difficiles à détruire. Par exemple, l'incubation de lisier de porc durant plusieurs heures avec application d'un traitement thermique a permis de diminuer efficacement le nombre de spores de *C. perfringens* (40). Ce traitement est ainsi considéré comme pertinent car il a détruit des formes de résistance bactérienne.



I.3.3. Paramètres permettant la réduction des agents pathogènes

La méthanisation a des propriétés hygiénisantes (41) sur les intrants et l'abattement du taux de micro-organismes peut être important en fonction des conditions opératoires du méthaniseur. Le temps de séjour des intrants dans le méthaniseur, la température ainsi que la teneur en Acides Gras Volatils (AGV) appliqués lors de la digestion anaérobie sont des paramètres influençant la survie des agents pathogènes. Lors de l'étude menée par Chen *et al.*, des boues de station d'épuration ont séjourné dans le méthaniseur pendant 11, 16 et 25 jours (42). Il a été démontré que, plus le temps de rétention était important, plus *Salmonella sp.* et *Escherichia coli* présentaient une concentration faible. L'abattement était en moyenne de 3 logs. Une forte température lors de la digestion anaérobie permet aussi la diminution des agents pathogènes. En effet, la méthanisation thermophile (55° C) présente une meilleure réduction du nombre de micro-organismes que la méthanisation mésophile (35° C). L'abattement du taux de coliformes fécaux est de 2,5 logs environ lors de la méthanisation mésophile alors qu'il est de plus de 5 logs lors de la méthanisation thermophile (43). Elle permet une diminution de la population de bactéries et de spores de *C. difficile* (44). Toutefois, même avec une augmentation de la température de méthanisation, *C. perfringens* résiste sous formes de spores (31). Parfois, la digestion anaérobie mésophile et même thermophile se révèlent ainsi insuffisante pour éliminer les pathogènes dans certains digestats. Par exemple, la concentration en *Clostridium perfringens*, dans du lisier de porc après méthanisation, reste stable (17) (45). Enfin, la concentration en AGV permet la réduction des agents pathogènes au cours de la digestion anaérobie. Ces acides entraînent une acidité du milieu ce qui engendre un stress des bactéries et ainsi leur destruction (46).

I.4. Les co-traitements

Afin d'améliorer l'hygiénisation lors de la digestion anaérobie, des traitements en amont ou après méthanisation peuvent être mis en place. En fonction de ce choix, la finalité de ces traitements n'est pas tout à fait identique. Alors qu'un post-traitement a pour objectif



d'améliorer la qualité du digestat, les pré-traitements ont pour but d'hydrolyser la matière organique entrante et ainsi améliorer la production de biogaz.

I.4.1. Post-traitement ou traitement du digestat

En sortie de digestion anaérobie, le post-traitement constitue une étape classique et couramment utilisée pour permettre une diminution du taux de micro-organismes. Les différents post-traitements sont la pasteurisation, le compostage ou le chaulage (32). Lors de la pasteurisation, le digestat est chauffé à 70° C pendant 1 heure. La température lors de ce processus est supérieure à celle appliquée lors de la méthanisation thermophile. Elle permet donc une diminution du taux de pathogènes dans le digestat. Cependant, la pasteurisation (47) montre une grande variabilité d'efficacité sur le fléchissement du nombre de bactéries du genre *Escherichia coli*. Le compostage consiste à stocker le digestat en présence d'oxygène et d'humidité. Ceci permet de diminuer la charge en micro-organismes anaérobies car ce traitement s'opère en atmosphère aérobie (37). Par exemple, le compostage en andains (ou en longs tas étroits) permettrait de diminuer la concentration en bactéries pathogènes dans le digestat (31). Enfin, un mélange de chaux et de digestat est réalisé pour effectuer le chaulage et ainsi diminuer la charge en *Salmonella* par exemple (13). Un traitement alcalinisant associé à une déshydratation du digestat a été réalisée en 2014 (48) mais *Clostridium difficile* a résisté à ce protocole. Le stockage ou bien la séparation des phases liquide et solide du digestat (49) n'ont également aucun impact positif sur l'abaissement de la population de *Clostridium perfringens* car ils entraînent une reprise de la croissance de la bactérie.

I.4.2. Pré-traitement ou traitement des intrants

Un traitement des intrants est possible afin de rendre la matière organique plus biodégradable et ainsi obtenir un meilleur rendement de méthanisation (9). L'effet du stockage avant méthanisation pendant plusieurs mois à 18° C a été étudié (45). Ceci permet une



diminution de plus de 6 logs de la concentration en coliformes et streptocoques mais il n'y a aucun effet sur *Clostridium*.

Les traitements appliqués sur la matière organique peuvent aussi diminuer la concentration en agents pathogènes. L'utilisation de procédés chimique et/ou thermique peut être utile. Par exemple, un traitement alcalin appliqué sur les intrants permet l'arrêt de la croissance des coliformes mais n'a, lui non plus, aucun effet sur *Clostridium sp.* (9). Un traitement thermique, en chauffant la matière organique à 135° C, permet une diminution de la concentration en *Clostridium perfringens* (50). En revanche, l'utilisation d'un procédé par ultrasons n'entraîne aucune diminution de la concentration de cette bactérie (50).

Une étude a exploré les effets conjugués d'une forte concentration d'acides gras volatils et d'un pH acide sur *Shigella dysenteriae* (51). Ce pré-traitement a permis de diminuer la concentration de l'agent pathogène retrouvé dans les excréments humains. Ces déchets fécaux ont ensuite été introduits dans un digesteur pour mimer l'effet de la digestion anaérobie. Au bout de 18 jours de séjour dans le méthaniseur, *Shigella dysenteriae* n'était plus détectable dans les matières fécales humaines. Par ailleurs, un milieu acide composé d'acides gras volatils permet également une décroissance bactérienne de *Clostridium perfringens* (46). L'étude a évalué l'influence d'un mélange équimolaire d'acide propionique, butyrique et acétique avec des températures pouvant être appliquées lors de la méthanisation. Puis, indépendamment de la première recherche, l'effet de la température associée à un pH précis a été mesuré. Ainsi, une incubation de 24 heures d'un mélange, constitué d'acides et de boues d'une station d'épuration, à une température de 49 ou 55° C entraîne une diminution de la concentration de *C. perfringens*. De plus, un milieu à un pH de 4,5 associé à une température de 55° C permet une décroissance importante de cet agent pathogène.



II. Optimisation d'un pré-traitement thermique en vue d'améliorer l'abattement des bactéries pathogènes au cours de la méthanisation

II.1. Objectifs

L'objectif final de ce travail est d'évaluer les potentialités d'un pré-traitement acido-thermique à augmenter l'effet hygiénisant de la digestion anaérobie et ainsi améliorer la qualité sanitaire des digestats et pérenniser la filière d'épandage.

Dans un premier temps, une cartographie microbiologique de l'installation de méthanisation agricole choisie est réalisée. A partir de cet état des lieux général, les effets hygiénisants de la digestion anaérobie sur les micro-organismes indicateurs de traitement de différents intrants sont évalués individuellement.

Dans un second temps, les essais seront de nouveau effectués en associant les conditions déterminées dans ce travail. Les effets de chaque pré-traitement sur l'abattement des bactéries permettent d'envisager les conditions optimales d'un couplage AGV-température.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Prélèvements des échantillons

II.2.1.1. L'unité de méthanisation agricole

Les échantillons étudiés sont issus d'une installation de méthanisation agricole nommée A (Figures 4 et 5). L'installation de méthanisation de l'exploitation repose sur une technologie à alimentation semi-continue. Initialement, l'installation a été dimensionnée pour traiter annuellement 5700 tonnes brutes de substrat. Ces substrats proviennent essentiellement de déjections animales majoritairement produites sur site. A cela s'ajoutent des co-substrats : matières de vidange, graisses de restauration ainsi que des céréales.



Chaque jour, 18 m³ de mélange trémie alimentent le digesteur du site. Puis, pour obtenir un processus de méthanisation infiniment mélangé, il convient d'apporter des intrants liquides. Un volume de 12 m³ de « matières de vidange » constitué de matières de vidange et de graisses de restauration est donc ajouté quotidiennement au mélange de la trémie dans le digesteur (Figures 4 et 5).

Le biogaz produit est transformé en électricité dans un module de cogénération d'une puissance de 100 kW électriques. L'électricité est injectée sur le réseau électrique local et la chaleur est valorisée sur le site pour les besoins de fonctionnement propres de l'installation et le chauffage des bâtiments.

Enfin, le digestat brut subit une séparation de phase par presse à vis et est ainsi divisé en deux fractions : le digestat liquide et le digestat solide stocké sur une aire béton avant son épandage.

II.2.1.2. Les échantillons

Sept échantillons ont été sélectionnés, prélevés et caractérisés (Figure 4). Le fumier, les céréales, les matières de vidange ont été étudiés ainsi qu'un mélange de deux intrants composé d'un tiers de fumier et de deux tiers de céréales nommé mélange trémie. Le cinquième échantillon, nommé contenu du digesteur, est constitué d'un mélange de trois intrants (fumier, céréales, matières de vidange). Il constitue le produit brut de cette méthanisation en procédé infiniment mélangé et a été prélevé à la sortie du digesteur. Enfin, les digestats solide et liquide obtenus par séparation de phase ont aussi été étudiés. Après leur prélèvement, les échantillons sont stockés à 4° C.



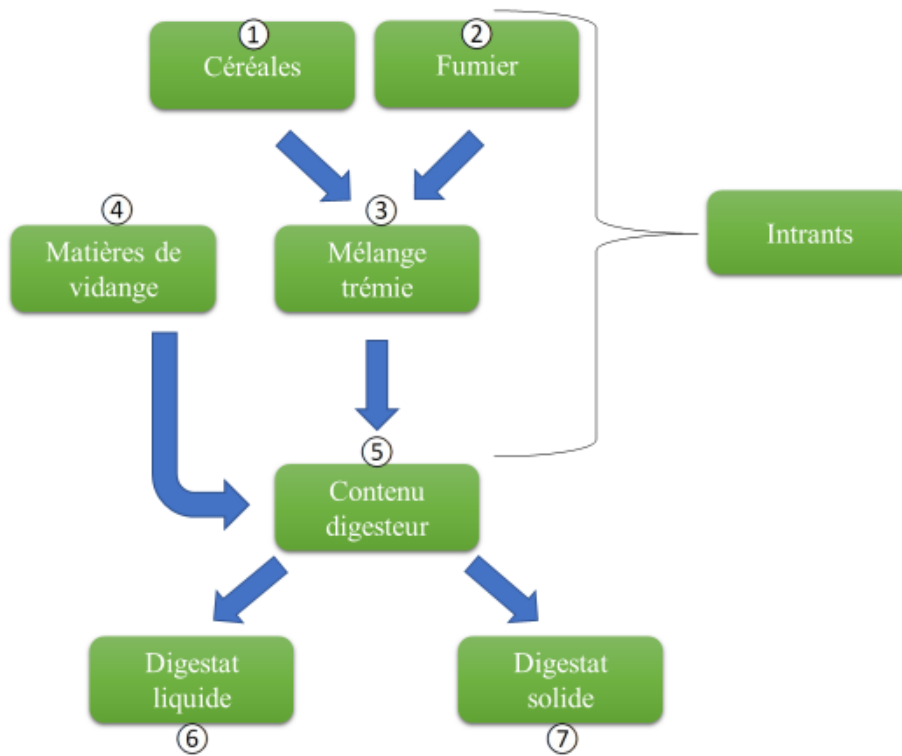


Figure 4 : Echantillons prélevés sur l'unité de méthanisation



Figure 5 : Fonctionnement général de l'unité de méthanisation du site A (d'après ADEME (21))

II.2.2. Caractérisation microbiologique des échantillons prélevés

En vue de leur caractérisation microbiologique, 10 grammes de chaque échantillon solide sont dilués dans 90 mL d'eau distillée stérile et plusieurs bactéries indicatrices sont étudiées.

II.2.2.1. Entérocoques (microplaques MUD/EC Biokar Diagnostics®)

Des tests en microplaques 96 puits ont été réalisés pour dénombrer les entérocoques. La méthode utilisée pour le dénombrement des entérocoques suit la norme NF EN ISO 7899-1. Chaque échantillon à analyser est dilué au préalable à 6 reprises dans du sel marin synthétique. La première dilution effectuée est une dilution au 1/2 puis les dilutions suivantes sont des dilutions décimales. Un volume de 200 µL d'échantillon est inséré dans chaque puits contenant un milieu de culture déshydraté. Ce milieu de culture contient notamment du 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucoside aussi appelé MUD. Les entérocoques hydrolysent le MUD grâce à la β-D-glucosidase en glucose et 4-méthylumbelliférone. Ce dernier émet une fluorescence bleue (puits positif) sous lampe UV à 366 nm après soixante-douze heures d'incubation à 44° C. Le comptage est déterminé par la loi statistique de Poisson avec le calcul du Nombre le Plus Probable (NPP) en comptabilisant les puits diffusant une fluorescence bleue (Annexe 1).

II.2.2.2. *Escherichia coli* (microplaques MUG/EC Biokar Diagnostics®)

Le dénombrement de *E. coli* suit la méthode de la norme NF EN ISO 9308-3. La préparation des échantillons est identique à la recherche des entérocoques. Le milieu de culture au fond des puits contient du 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide ou MUG. *E. coli* présente une enzyme (la β-D-glucuronidase) capable d'hydrolyser MUG en 4-méthylumbelliférone et glucuronide. Le 4-méthylumbelliférone émet une fluorescence bleue sous lampe UV à 366 nm



ce qui entraîne la positivité du puits (Figure 6). Le calcul du NPP peut ainsi être réalisé (Annexe 1).

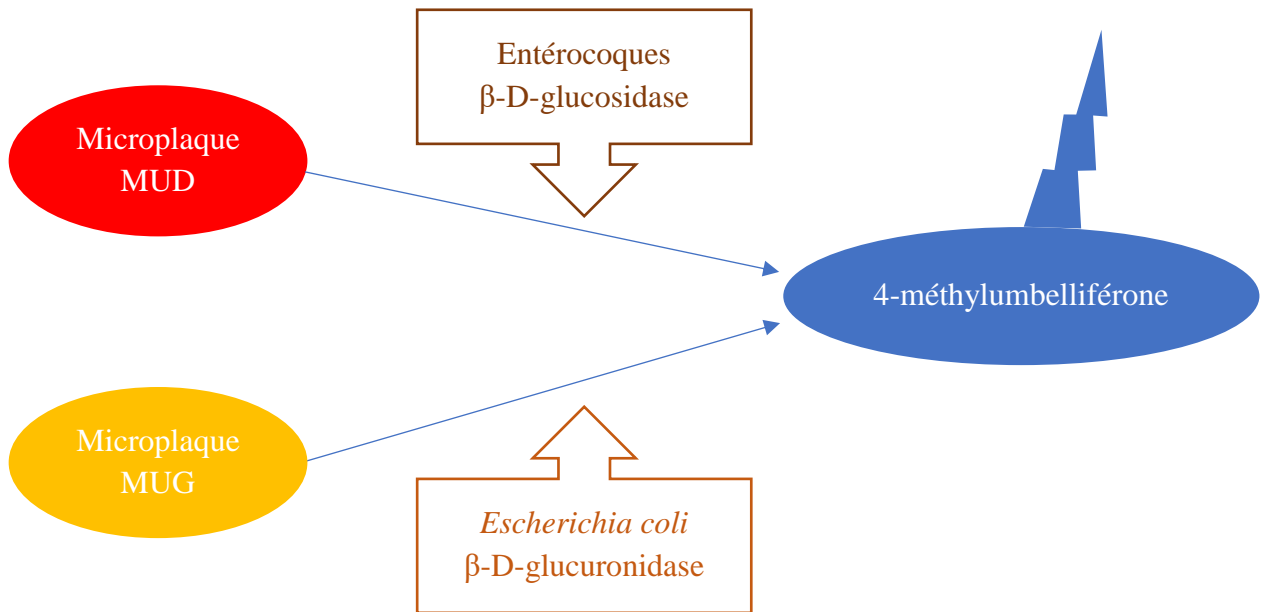


Figure 6 : Réactions enzymatiques des milieux MUD et MUG

II.2.2.3. Bactéries anaérobies sulfito-réductrices (BASR)

Le dénombrement des formes végétatives et des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices a été réalisé par dilutions décimales successives et ensemencement de géloses « Glucose Viande-Foie (VF) Biokar Diagnostics® » en tubes, en duplicat. Les dilutions successives décimales sont réalisées pour chaque échantillon dans de l'eau distillée stérile additionnée de NaCl à 0.9 %. Les dilutions destinées à dénombrer les spores de BASR sont chauffées au bain-marie à 80° C pendant 10 minutes avant d'être ensemencées en tubes. Un millilitre de chaque dilution est introduit dans chacun des tubes. Ces tubes sont ensuite incubés à 37° C pendant vingt-quatre heures. La lecture s'effectue par dénombrement de colonies noires et rondes. En effet, les bactéries anaérobies sulfito-réductrices ont la capacité de réduire le sulfite présent dans le milieu VF en sulfure de fer formant ainsi un précipité noir caractéristique.

II.2.2.4. *Clostridium perfringens*

Le dénombrement de *Clostridium perfringens* (formes végétatives et spores) a été réalisé grâce à un ensemencement de géloses « Tryptone-Sulfite-Néomycine (TSN) Biokar Diagnostics® » en tubes, en duplicat. Des dilutions successives décimales sont réalisées pour chaque échantillon dans de l'eau distillée stérile additionnée de NaCl à 0.9 %. Un chauffage au bain-marie à 80° C est nécessaire si les spores de *C. perfringens* sont recherchées. Un millilitre de chaque dilution est introduit dans chacun des tubes. Ces tubes sont ensuite incubés à 37° C pendant vingt-quatre heures. Puis, les tubes sont incubés à 37° C pendant vingt-quatre heures. La lecture s'effectue par dénombrement de colonies noires et rondes. *C. perfringens* fait partie de la famille des BASR. Ainsi, il s'agit de la même réaction de réduction du sulfite en sulfure de fer que pour le dénombrement en milieu VF.

II.2.2.5. Calcul des abattements

Un calcul de l'abattement des différents micro-organismes étudiés est effectué pour connaître l'effet hygiénisant de la méthanisation et l'effet des différents pré-traitements appliqués.

Calcul de l'abattement : $\text{Abattement} = \log (C_i/C_f)$

Avec C_i : concentration initiale bactérienne (UFC par gramme de matière fraîche)

Et C_f : concentration bactérienne finale (UFC par gramme de matière fraîche)



II.2.3. Caractérisation physico-chimique et biochimique

II.2.3.1. pH

La mesure du pH des différents intrants est réalisée afin de savoir si la méthanisation est optimale avec ces échantillons. De plus, le pH est aussi mesuré après ajout de concentrations croissantes d'Acides Gras Volatils (AGV).

II.2.3.2. Matières Sèches (MS) et Matières Sèches Volatiles (MSV)

Environ 100 g d'échantillon sont introduits dans un creuset en porcelaine. Le creuset respectivement vide (masse 1) et rempli (masse 2) est pesé. Ce creuset rempli est placé dans une étuve à 105° C pendant une nuit puis placé dans un dessiccateur pendant 1 heure. Il est ensuite pesé (masse 3).

Grâce à ces 3 pesées, le pourcentage de MS peut être calculé :

$$MS = [(3-1)/(2-1)]*100$$

Il suffit de calciner dans un four à 550° C pendant 2 heures le creuset rempli après mesure de la masse 3 pour obtenir la masse 4 et ainsi calculer la teneur en MSV :

$$MSV = [(3-4)/(2-1)]*100$$

II.2.3.3. Tests BMP (Biochemical Methan Potential)

Les tests BMP sont des expériences effectuées en laboratoire permettant de mesurer le volume de biogaz produit par un échantillon ainsi que sa cinétique de production. Soixante-quinze pour cent des matières volatiles introduites dans un flacon proviennent de l'échantillon



à analyser. Les vingt-cinq pour cent restants proviennent de l'inoculum nécessaire au bon fonctionnement de l'expérience. De plus, une solution tampon de carbonate de sodium (Na_2CO_3) est ajoutée afin de maintenir le pH du test BMP à 9. Ce pH est favorable aux bactéries responsables de la production de méthane. Les flacons sont incubés à 37°C durant trois à quatre semaines en moyenne, jusqu'à ce que la production de biogaz soit nulle. La production de biogaz est mesurée quotidiennement en dégazant les fioles hermétiques à l'aide d'une seringue reliée à une éprouvette graduée. Une analyse qualitative de la composition du biogaz produit, par chromatographie en phase gazeuse, est également réalisée régulièrement. Un témoin négatif, contenant uniquement de l'inoculum, est préparé en parallèle des échantillons étudiés. Il permet de connaître la production de biogaz liée à l'inoculum présent dans l'ensemble des échantillons. Cette production est ensuite soustraite lors du calcul du volume de biogaz produit par chaque échantillon. Ainsi, le volume réel de biogaz, lié à l'échantillon seul, est connu de façon précise.

II.2.4. Pré-traitements : Acides Gras Volatils et/ou Température

Le traitement acide visant à améliorer le potentiel hygiénisant de la méthanisation est un mélange équimolaire d'acides acétique, propionique et butyrique. Des concentrations croissantes de ce mélange sont appliquées en pré-traitement (Tableau 8). Les concentrations varient de 1,5 g/L à 6 g/L (46). Les matières de vidange sont mises en contact avec les acides gras volatils pendant différents temps d'incubation : 0 à 48 heures. Un traitement thermique à 70°C est également étudié. Différents temps d'incubation, de 0 à 24 heures, sont appliqués (Tableau 9). Enfin, un traitement acido-thermique est testé sur les matières de vidange.



Tableau 8 : Conditions opératoires du pré-traitement acide

		Temps d'incubation		
		T0 : 0 heure	T24 : 24 heures	T48 : 48 heures
Concentration d'Acides Gras Volatils	C1 : 1,5 g/L	C1 à T0	C1 à T24	C1 à T48
	C2 : 3 g/L	C2 à T0	C2 à T24	C2 à T48
	C3 : 6 g/L	C3 à T0	C3 à T24	C3 à T48

Tableau 9 : Conditions opératoires du pré-traitement thermique

Temps d'incubation
Tx : Temps de montée en température à 70° C
Tx+1 : 1 heure à 70° C
Tx+6 : 6 heures à 70° C
Tx+24 : 24 heures à 70° C

L'effet de ces pré-traitements est étudié sur les entérocoques, *Escherichia coli* et *Clostridium perfringens*.



II.3. Résultats

II.3.1. Etat des lieux microbiologiques du site A

II.3.1.1. Cartographie microbiologique de l'unité de méthanisation

Les échantillons de l'unité de méthanisation du site A ont été caractérisés d'un point de vue microbiologique. La cartographie microbiologique s'est focalisée sur les entérocoques, *Escherichia coli*, les BASR (formes totales et sporulées) et *Clostridium perfringens* (formes totales et sporulées). Les intrants caractérisés sont les céréales, le fumier ainsi que le mélange d'alimentation du digesteur (mélange trémie) composé d'un tiers de fumier et deux tiers de céréales. Les matières de vidange, substrat liquide injecté séparément, ont également fait l'objet d'une caractérisation microbiologique. Enfin, la concentration en agents pathogènes dans les produits de l'unité de méthanisation du site A a été déterminée. Compte tenu du mode de mise en œuvre du procédé (digestion en voie humide avec séparateur de phase), 3 types de sortants ont été analysés : le digestat brut ou contenu digesteur, le digestat solide et le digestat liquide (Figure 4).

Les résultats de cette caractérisation, présentés sur la figure 7, mettent en évidence une importante hétérogénéité des concentrations en bactéries indicatrices de traitement en fonction de l'intrant ou du produit considéré. En effet, même si les entérocoques et *E. coli* sont apportés essentiellement à partir du fumier (respectivement $4,4 \cdot 10^6$ UFC/g de matière fraîche et $2,5 \cdot 10^5$ UFC/g), le mélange trémie présente une concentration en entérocoques ($4,7 \cdot 10^7$ UFC/g) et *E. coli* ($2,5 \cdot 10^6$ UFC/g) encore plus importante que ce dernier. Une explication peut résider dans la très forte hétérogénéité du fumier (structure, temps de stockage) impliquant probablement un manque de reproductibilité des concentrations mesurées dans ce substrat. Enfin, d'après la figure 7, le produit de la méthanisation, noté contenu du digesteur, présente une concentration de $3,5 \cdot 10^4$ UFC de *C. perfringens* par gramme de matière fraîche. La concentration de *C. perfringens* dans les matières de vidange est de $5,5 \cdot 10^4$ UFC/g alors que le mélange de la trémie renferme $7 \cdot 10^1$ UFC de *C. perfringens* par gramme de matière fraîche. On peut en déduire que la concentration en *C. perfringens* dans le digestat est essentiellement apportée par les matières de vidange. Par ailleurs, les profils microbiologiques des digestats liquide et solide sont similaires au profil du contenu du digesteur. Ceci montre que la séparation de phases par presse à vis n'a pas d'effet sur la répartition des bactéries indicatrices dans les phases liquide et solide du digestat.



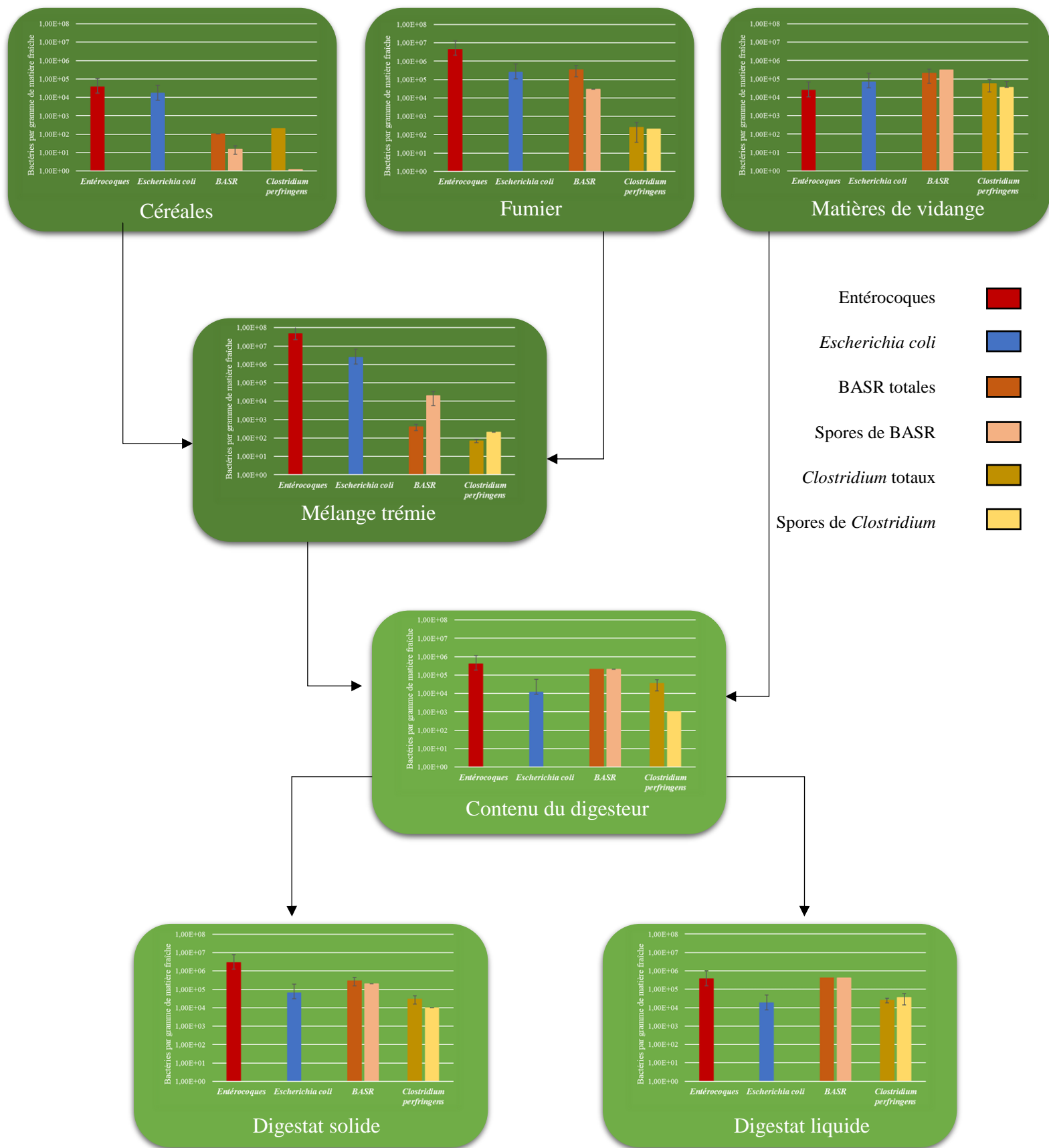


Figure 7 : Caractérisation microbiologique des différents intrants et produits de l'unité de méthanisation



Pour mettre plus clairement en évidence l'implication des deux principaux intrants (mélange trémie et matières de vidange) de l'unité de méthanisation sur l'origine des bactéries indicatrices dénombrées dans le digesteur, une comparaison de la composition microbiologique du mélange trémie et des matières de vidange est présentée sur la figure 8. Le mélange trémie (substrat solide) du site A, constitué de céréales et de fumier, renferme une concentration de $4,7 \cdot 10^7$ UFC d'entérocoques par gramme de matière fraîche et $2,5 \cdot 10^6$ UFC d'*Escherichia coli* par gramme de matière fraîche. Les matières de vidange (substrat liquide) présentent des concentrations en entérocoques ($2,5 \cdot 10^4$ UFC/g) et *E. coli* ($7 \cdot 10^4$ UFC/g) beaucoup moins importantes que dans le substrat solide (Figure 8a). Ces résultats montrent que le mélange trémie présente une concentration en entérocoques mille fois plus importante ainsi qu'une concentration en *E. coli* cent fois plus élevée que les matières de vidange. Les entérocoques et *E. coli* présents au niveau du digesteur sont donc majoritairement issus du mélange trémie et donc des substrats solides.

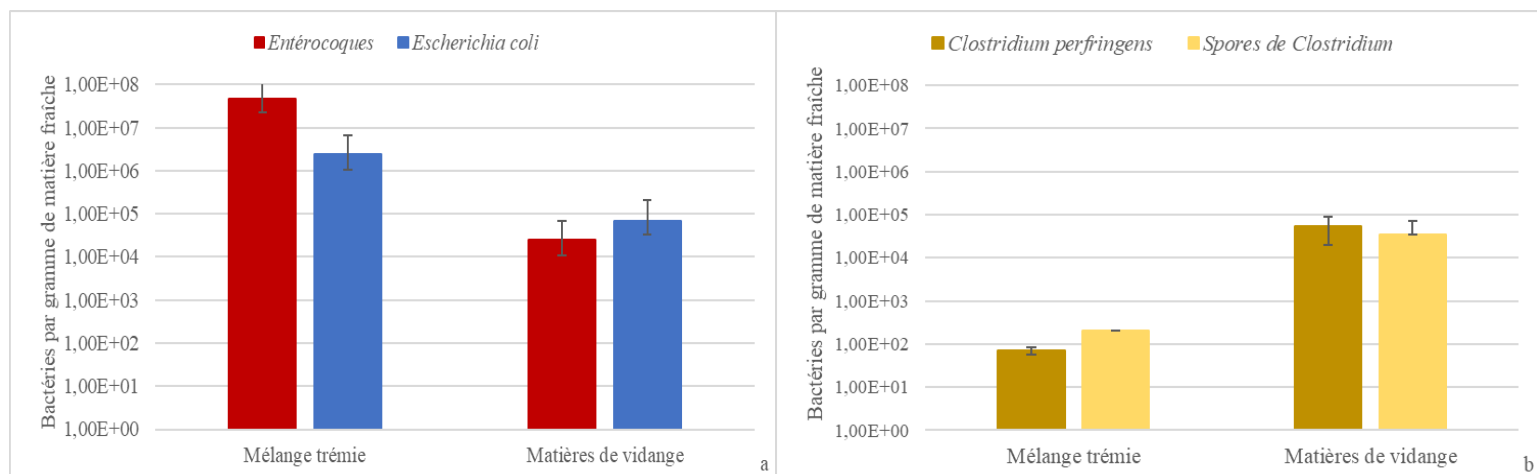


Figure 8 : Concentrations en entérocoques, *Escherichia coli* (a) et *Clostridium perfringens* (formes totales et sporulées) (b) des substrats du site A

A l'inverse, le nombre de colonies de *C. perfringens* dans le mélange trémie est moins important que le nombre d'entérocoques ou d'*E. coli*. Les matières de vidange sont les intrants présentant la plus grande quantité de *C. perfringens* (formes totales ou spores) (Figure 8b). Il apparaît donc que la majorité des *C. perfringens* sont issus des matières de vidange.

II.3.1.2. Pouvoir hygiénisant de l'unité de méthanisation sur les bactéries indicatrices

Grâce à la caractérisation microbiologique effectuée sur le site A, il est possible de comparer la concentration en agents pathogènes avant et après digestion anaérobie et ainsi évaluer le potentiel hygiénisant à l'échelle du procédé sans avoir appliqué de pré-traitement.

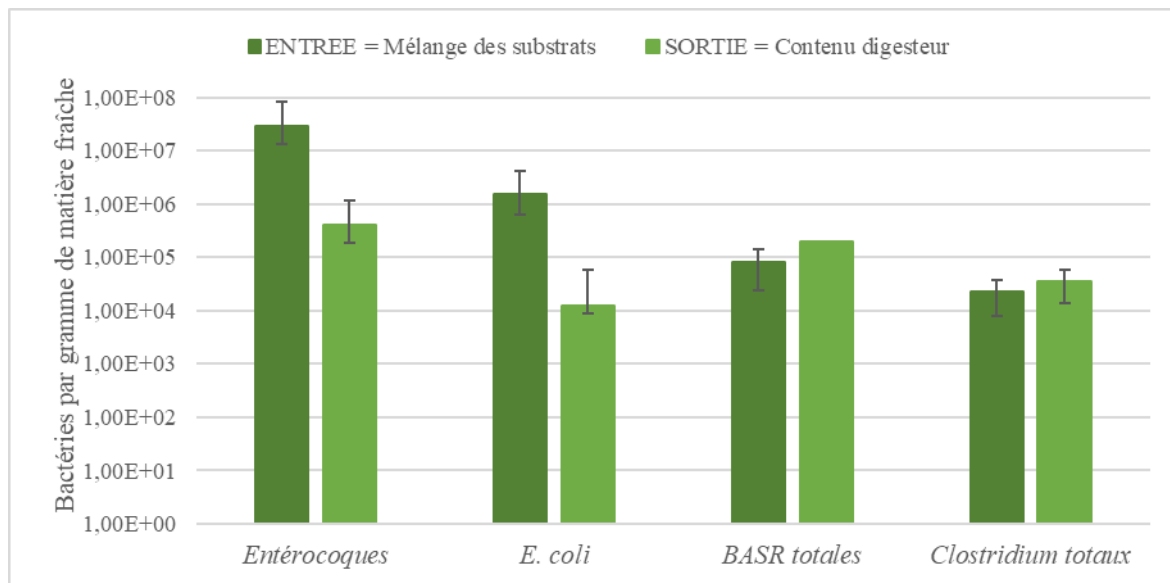


Figure 9 : Concentrations en agents pathogènes en entrée et sortie du digesteur du site A

Chaque jour, le méthaniseur est alimenté par le mélange d'une trémie (substrat solide) à hauteur de 60 % du volume quotidien introduit et des matières de vidange (substrat liquide) à hauteur de 40 %. C'est pourquoi la concentration en bactéries indicatrices a été étudiée en prenant en compte ce pourcentage d'alimentation du méthaniseur. Les résultats présentés sur la figure 9 montrent que la méthanisation permet une diminution de la teneur en entérocoques et *E. coli*. En effet, l'abattement des entérocoques est de 1,8 log et de 2,1 pour *E. coli*. En revanche, ces résultats montrent que la concentration en BASR et *Clostridium perfringens* en entrée et sortie de digestion anaérobie est identique.



II.3.2. Analyse individuelle du potentiel d'hygiénisation de la méthanisation pour les différents intrants

L'état des lieux du site A a mis en évidence des différences notables quant à la composition microbiologique des différents intrants. Ainsi, de manière originale, des tests standards de caractérisation du potentiel méthanogène ont été réalisés. Ces tests sont usuellement utilisés pour mesurer la capacité maximale de production de méthane et de dioxyde de carbone d'un substrat donné dans les conditions d'une digestion anaérobie. Dans cette étude, en plus de la production de biogaz, l'abattement des bactéries indicatrices a aussi été mesuré.

Les céréales, le fumier, les matières de vidange du site A ont subi un test de potentiel méthanogène à l'échelle du laboratoire afin de déterminer le volume de méthane produit par chaque échantillon (Tableau 10). Ces tests ont duré 45 jours en régime mésophile (37° C). La caractérisation microbiologique a été réalisée au début et à la fin des tests BMP (Figure 10).

Tableau 10 : Caractérisation physico-chimique et potentiel méthanogène des intrants

Intrants	pH	Concentration en MS (%)	Concentration en MSV (%)	Volume de méthane produit (mL/g de MSV)
Céréales	5,92	73,9	62,5	10,1
Fumier	8,6	35,3	28,7	34,8
Matières de vidange	5,32	2,9	2,3	71,2

Le tableau 10 montre que les pourcentages de matières sèches et de matières sèches volatiles sont différents suivant l'intrant considéré. Les intrants solides, tels que les céréales et le fumier, présentent une concentration en MS et MSV plus importantes que les matières de vidange (intrant liquide). De plus, la nature biochimique des intrants étant relativement différente, les volumes de méthane produits sont logiquement différents d'un échantillon à l'autre et varient de 10,1 mL/g de MSV pour les céréales à 71,2 mL/g de MSV pour le fumier.



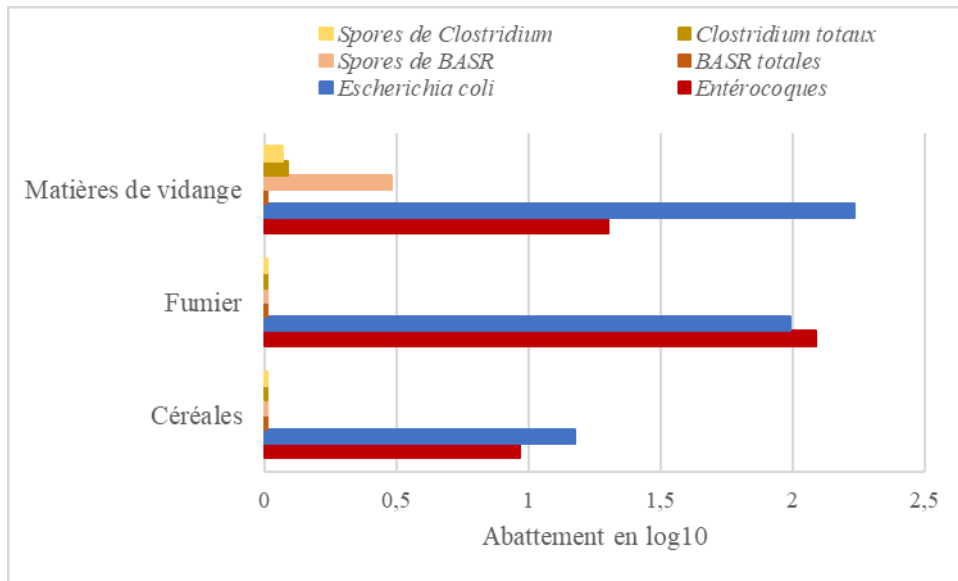


Figure 10 : Abattement des concentrations en bactéries indicatrices après des tests BMP sur les céréales, le fumier et les matières de vidange

L'effet hygiénisant de la digestion anaérobie sur les entérocoques et *Escherichia coli* est confirmé par le calcul des abattements présenté sur la figure 10. L'abattement varie de 1 à 2 logs en fonction de l'intrant considéré. En effet, il est environ 2 fois plus important sur des entérocoques et *E. coli* présents dans le fumier ou les matières de vidange que dans les céréales. Par ailleurs, l'abattement des BASR et de *Clostridium perfringens* dans les trois échantillons après réalisation des tests BMP est inférieur ou égal à 0,5 log. Ceci confirme que la méthanisation n'a pas d'effet sur l'abattement des BASR et de *Clostridium perfringens* (formes totales et sporulées). Ces résultats sont en corrélation avec la caractérisation microbiologique du site A (Figure 9). La digestion anaérobie ne permet pas de réduire le nombre de bactéries capables de sporuler. Il apparaît donc pertinent de tester un pré-traitement sur le substrat présentant la plus forte concentration en *C. perfringens* : les matières de vidange.

II.3.3. Caractérisation microbiologique des effets d'un pré-traitement sur un intrant

L'objectif de cette partie est d'évaluer les potentialités d'un pré-traitement afin d'améliorer la qualité sanitaire du digestat issu de la digestion anaérobie. L'hypothèse est que le pré-traitement « acido-thermique » pourrait potentialiser l'effet hygiénisant de la digestion anaérobie et entraîner un abattement des bactéries résistantes et capables de sporuler. Les matières de vidange, contenant en large majorité des formes sporulées de *Clostridium perfringens* (Figure 8), ont été choisies comme substrat sur lequel un pré-traitement est appliqué. L'effet du pré-traitement est donc étudié, d'un point de vue microbiologique, sur les spores de *C. perfringens*. Afin d'avoir des éléments de comparaison, les effets de ce pré-traitement seront également évalués sur les entérocoques et *E. coli*.

Un pré-traitement acide est appliqué sur les matières de vidange indépendamment du pré-traitement thermique. A partir de ces résultats, un traitement « acido-thermique optimal » pourra être entrepris.


II.3.3.1. Pré-traitement acide


Des concentrations croissantes d'AGV associées à différents temps d'incubation ont été étudiées. Les concentrations des mélanges équimolaires d'acides acétique, propionique et butyrique varient de 1,5 à 6 g/L. Cette gamme de concentrations a été choisie à partir des travaux de Salsali *et al.* (46). Les temps d'incubation appliqués sont 0, 24 et 48 heures. Les abattements (en log) ont été calculés par rapport à la concentration en agents pathogènes présente dans les matières de vidange non pré-traitées.



T0 = Incubation AGV + matières de vidange pendant 0 heure ; T24 = Incubation pendant 24 heures ;

T48 = Incubation pendant 48 heures

 *Escherichia coli*

 entérocoques

 spores de *Clostridium perfringens*

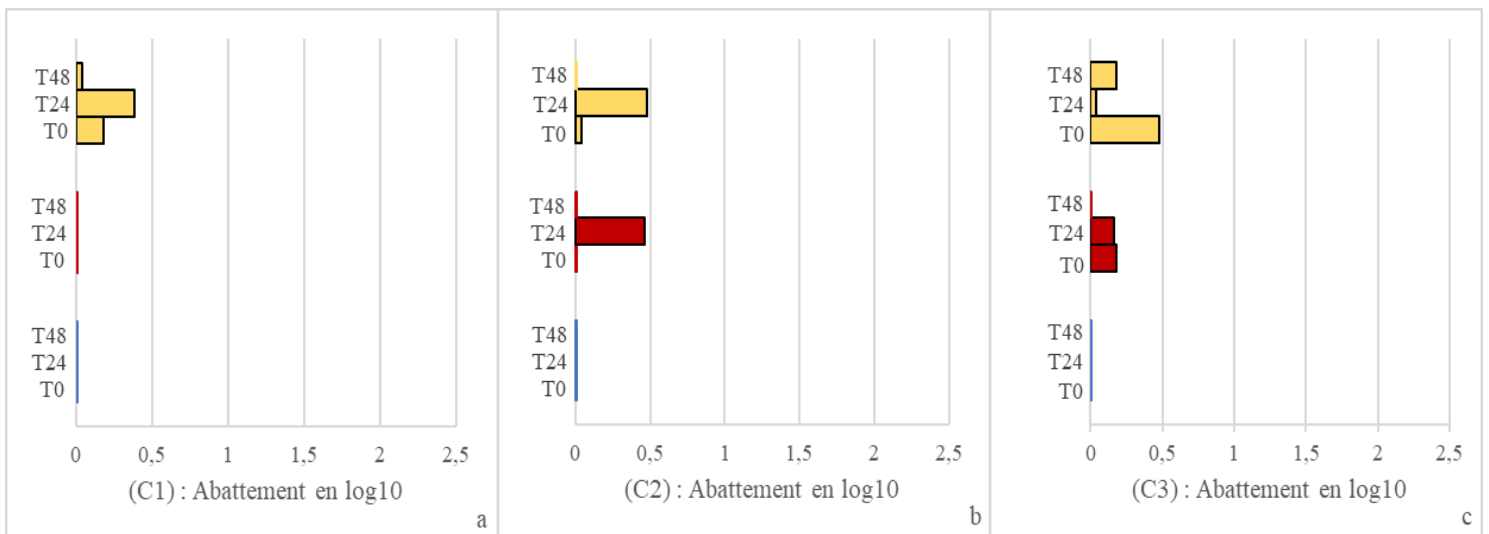


Figure 11 : Abattement de la concentration en *Escherichia coli*, entérocoques et spores de *Clostridium perfringens* après application d'une concentration croissante d'AGV sur les matières de vidange par rapport à l'échantillon non traité

D'après les graphiques a, b et c de la figure 11, l'abattement ne varie pas en fonction des concentrations en acides appliquées (inférieur ou égal à 0,5 log en moyenne). L'augmentation croissante de la concentration en AGV n'entraîne pas d'abattement de la concentration en *Escherichia coli*. Le mélange équimolaire d'AGV avec une concentration C1 (Figure 11a) n'a pas non plus d'effet sur les entérocoques. Les concentrations C2 et C3 (Figures 11b et 11c) engendrent un abattement inférieur à 0,5 log sur la concentration en entérocoques. Enfin, bien qu'on remarque un très faible abattement des concentrations des spores de *C. perfringens* à la suite du traitement avec les AGV, il n'apparaît pas significatif dans le sens où cet abattement ne varie ni en fonction de la concentration, ni du temps d'incubation.

Par ailleurs, le temps d'incubation des AGV avec les matières de vidange ne permet pas de diminuer la concentration en bactéries indicatrices. Le mélange équimolaire d'acides associé à différents temps d'incubation n'a aucun effet sur *Escherichia coli* quelle que soit la concentration considérée. De plus, l'abattement des entérocoques, avec le temps d'incubation le plus important (T48), est nul. Enfin, l'augmentation du temps d'incubation des AGV



n'entraîne pas d'effet significatif sur les spores de *C. perfringens* car l'abattement est inférieur à 0,5 log entre 0 et 48 heures.

II.3.3.2. Pré-traitement thermique

Parallèlement à l'étude des effets d'un pré-traitement acide sur les matières de vidange, les effets d'un pré-traitement thermique à 70° C, correspondant à la température de pasteurisation, pendant 1, 6 et 24 heures (Tx+1 à Tx+24) sur les bactéries présentes dans les matières de vidange ont été étudiés. Tx correspondant au temps de montée en température de l'échantillon. Les bactéries quantifiées pour étudier l'effet de la température sont *Escherichia coli*, les entérocoques et les spores de *Clostridium perfringens*. Les abattements (en log) ont été calculés par rapport à la concentration en agents pathogènes présente dans les matières de vidange non pré-traitées.

Tx = Temps de montée en température de l'échantillon ; Tx+1= Pré-traitement de 1 heure ;

Tx+6 = Pré-traitement de 6 heures ; Tx+24 = Pré-traitement de 24 heures

■ *Escherichia coli* ■ entérocoques ■ spores de *Clostridium perfringens*

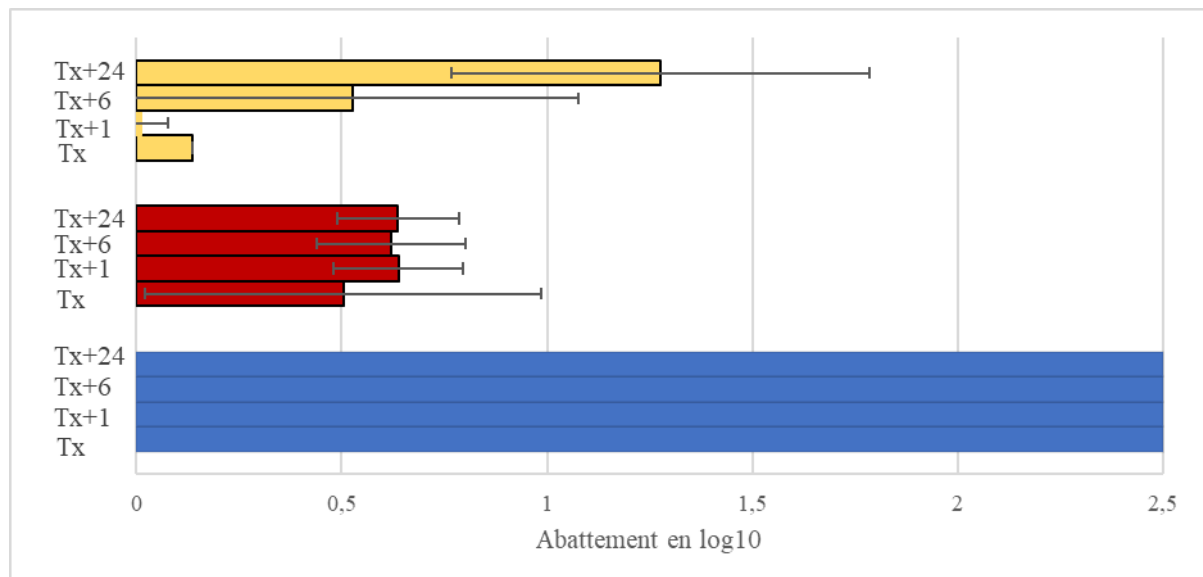


Figure 12 : Abattement des concentrations en *Escherichia coli*, entérocoques et spores de *Clostridium perfringens* après application d'un traitement thermique à 70° C sur les matières de vidange de Tx à Tx+24 par rapport à l'échantillon non traité



La figure 12 montre que le pré-traitement thermique entraîne un abattement total d'*Escherichia coli*. En revanche, ce pré-traitement présente un effet moins prononcé sur les entérocoques. Le pré-traitement thermique engendre, en moyenne, le même abattement de 0,5 log sur les entérocoques quel que soit la durée du traitement. Enfin, le pré-traitement thermique entraîne un abattement croissant des spores de *C. perfringens* lorsque la durée du traitement augmente. En effet, l'abattement est de 0,1 log environ à Tx+1 puis est supérieur à 1 log à Tx+24.

L'étude individuelle des effets des pré-traitements acide et thermique permet de déterminer les conditions d'un potentiel couplage pouvant entraîner un abattement des bactéries indicatrices présentes dans les matières de vidange au cours de la méthanisation et d'améliorer ainsi la qualité sanitaire du digestat. Les conditions de pré-traitement thermique présentant l'effet le plus important sur l'abattement des spores de *C. perfringens* est un traitement d'une durée de 24 heures à 70° C. Ce sont donc ces conditions qui devront être choisies pour les essais avec couplage du traitement acide et du traitement thermique.

II.4. Discussion

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'effet d'un pré-traitement « acido-thermique » afin de potentialiser l'effet hygiénisant de la digestion anaérobie. La caractérisation microbiologique de l'unité de méthanisation permet d'établir une cartographie du site A. La concentration en *C. perfringens* dans le digestat solide est de $3 \cdot 10^4$ UFC/g (Figure 7). La méthanisation ne présente donc aucun pouvoir hygiénisant sur les bactéries capables de sporuler.

Le dénombrement des bactéries indicatrices avant et après méthanisation sur site montre bien que, dans ces conditions, si la digestion anaérobie possède des propriétés hygiénisantes sur *E. Coli* et les entérocoques, elle n'a pas d'effet sur l'abattement des bactéries capables de



sporuler. Ceci permet d'affirmer que ce digestat brut ne pourrait pas obtenir d'homologation afin d'être mis sur le marché car la quantité de *C. perfringens* est nettement supérieure à 100 UFC par gramme de matière fraîche (22). La qualité sanitaire du digestat devient un enjeu majeur car la réglementation s'intéresse, en plus des bactéries indicatrices couramment étudiées telles que les entérocoques et *E. coli*, à des bactéries ayant la capacité de sporuler telles que *C. perfringens*.

C. perfringens est quantifiée dans les différents intrants grâce aux expériences effectuées pour établir la cartographie du site A. Les résultats obtenus ont mis en évidence que la majorité des *C. perfringens* dénombrés en sortie de digesteur sont issues des matières de vidange. La concentration dans les matières de vidange s'élève à $5,5 \cdot 10^4$ UFC/g (Figure 7). Dans le fumier, elle est de $2,5 \cdot 10^2$ UFC/g. Enfin, dans les céréales, elle est de $2 \cdot 10^2$ UFC/g. Les résultats ont également montré que, la digestion anaérobie, seule, ne permettrait pas de diminuer cette charge. Le dénombrement des bactéries indicatrices avant et après méthanisation sur site montre bien que, si la digestion anaérobie possède des propriétés hygiénisantes sur *E. coli* et les entérocoques, elle n'a pas d'effet sur l'abattement des bactéries capables de sporuler. Par conséquent, la réglementation des digestats en logique « produits », imposant une concentration en *C. perfringens* inférieure à 100 UFC/g, ne serait pas respectée pour l'installation de méthanisation considérée.

Actuellement, le choix des intrants est principalement guidé par les gisements disponibles à proximité de l'unité de méthanisation et par le potentiel méthanogène de chacun des substrats. En effet, les matières de vidange, constituées en partie de graisses de restauration, constituent un substrat intéressant en raison de leur fort potentiel méthanogène (21). Cependant, les résultats, présentés sur la cartographie microbiologique, montrent également que ce substrat renferme la teneur en *C. perfringens* la plus importante par comparaison aux substrats solides. Au vu de ces résultats, et dans une potentielle optique d'homologation du digestat, la prise en compte des teneurs en micro-organismes pathogènes des intrants apparaît judicieuse.



Une caractérisation microbiologique des intrants avant et après des tests BMP est réalisée (Figure 10). L'abattement des entérocoques et d'*E. coli* est supérieur à 1 log pour l'ensemble des intrants. Ceci confirme que la digestion anaérobie présente un effet hygiénisant (41).

En effet, suite à la méthanisation, l'abattement de la concentration en coliformes fécaux dans cette étude est environ de 5 logs. Toutefois, pour notre étude, dans le fumier, l'abattement des entérocoques après un test BMP est de 2 logs alors qu'il est seulement de 1 log dans les céréales. Ces résultats montrent que la réduction du nombre de pathogènes est différente suivant la matrice considérée.

Par ailleurs, les tests BMP ne montrent pas d'abattement sur les BASR ni *C. perfringens*. La température appliquée lors de ces tests BMP est de 37° C et s'apparente donc à un régime de méthanisation mésophile. Le régime thermophile (55° C) aurait un impact plus important sur la réduction du nombre d'agents pathogènes (43) (44). En effet, la température de 37° C n'aurait pas ou peu d'effet sur l'abattement de la concentration en spores de *C. perfringens* alors que le régime thermophile pourrait entraîner un abattement de 5 logs sur la teneur en spores.

Les tests BMP menés lors de ce travail permettent d'observer la réduction du nombre d'agents pathogènes due à l'effet hygiénisant de la méthanisation. Ces tests sont, en principe, destinés à mesurer la production de biogaz propre à chaque intrant. Leur finalité est détournée mais ces tests s'avèrent utiles pour observer si les pré-traitements appliqués sur les intrants permettent une augmentation du potentiel hygiénisant de la méthanisation.

Le pré-traitement d'acides gras volatils ne montre pas d'abattement sur les entérocoques, *Escherichia coli* et les spores de *Clostridium perfringens* (Figure 11). L'abattement est inférieur à 0,5 log. Ainsi, les concentrations en AGV, variant de 1,5 à 6 g/L, n'ont pas d'impact sur les micro-organismes présents dans les matières de vidange alors que ces dernières sont les principales sources d'apport de *C. perfringens*.

De plus, les temps d'incubation des AGV avec les matières de vidange n'engendrent pas de réduction du nombre d'agents pathogènes. Il paraît normal que le mélange équimolaire d'AGV seuls n'entraîne peu ou pas d'effet bactéricide suite au traitement. Cette caractérisation



initiale des effets du pré-traitement acide est indispensable dans le cadre de cette étude. Cependant, les AGV constituent un paramètre important influençant la réduction des pathogènes au cours de la digestion anaérobie (46) (51). Ces effets ne peuvent être réellement évalués qu'en couplage avec la méthanisation et donc des tests BMP qui sont actuellement toujours en cours.

Le pré-traitement thermique appliqué sur les matières de vidange montre un abattement total de *E. coli*. Ceci est en adéquation avec les publications démontrant que *E. coli* ne résiste pas à une température supérieure ou égale à 70° C (37).

De plus, la figure 12 montre un abattement moyen de 0,5 log des entérocoques dans les matières de vidange. Ces expériences doivent être reproduites à plusieurs reprises afin d'évaluer si cet abattement est significatif. Ceci représente un faible effet de la température sur ces bactéries indicatrices. D'autres études montrent un abattement total des entérocoques dans du lisier de porc (40) à une température de 70° C dès 1 heure d'incubation. A l'inverse, Besson (37) précise que le pré-traitement thermique à 70° C durant 24 heures n'a pas d'influence sur la réduction du nombre d'entérocoques présents dans du lisier de bovin.

Le type de matrice utilisée pourrait donc avoir une influence sur l'abattement des bactéries indicatrices. En outre, les spores de *C. perfringens* issues des matières de vidange présentent l'abattement le plus important après 24 heures de pré-traitement thermique à 70° C. L'abattement est de 1,3 log. Cet abattement peut être considéré comme significatif si d'autres expériences sont menées et montrent un abattement similaire. *Clostridium perfringens* est reconnue pour être une bactérie particulièrement résistante sur laquelle la température entraîne un faible abattement. En effet, le pré-traitement à 70° C pendant 24 heures, sur du lisier de bovin, entraîne un abattement inférieur à 1 log (37). Cependant, dans ces mêmes conditions de traitement, Pourcher *et al.* montrent un abattement supérieur à 3 logs de la concentration en spores de *C. perfringens* dans du lisier de porc.

Il est important de préciser que le pré-traitement « acido-thermique » a pour but d'hydrolyser la matière organique afin de faciliter sa dégradation lors de la méthanisation mais



surtout, pour notre étude, d'hygiéniser le digestat. Ce pré-traitement doit ainsi être étudié en relation avec la digestion anaérobie. Il potentialiserait l'effet hygiénisant de la méthanisation à travers deux effets additionnels.

Le traitement thermique à 70°C, correspondant aux conditions de pasteurisation, permettrait un premier abattement significatif des micro-organismes pathogènes, comme le montrent les résultats obtenus dans cette étude. Cet effet pourrait être amplifié par l'ajout des AGV.

Ces acides, présents naturellement lors de la méthanisation, sont un des paramètres-clés de la réduction des pathogènes au cours du processus de digestion anaérobie (51). Par ailleurs, les travaux de Salsali *et al.* (46) appliquent des températures similaires à celles utilisées lors de la digestion anaérobie. En effet, elles varient de 35 à 55° C et s'assimilent à des températures utilisées en régime mésophile et thermophile. Cependant, cette étude n'effectue pas de tests BMP. Elle ne prend donc pas en compte l'interaction entre les bactéries participant à la méthanisation et celles présentes dans la matière organique.

Ce pré-traitement « acido-thermique » serait sans intérêt s'il n'est pas corrélé à l'étude du potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie. Il est nécessaire d'effectuer en laboratoire des tests BMP après avoir pré-traité, de manière couplée, les matières de vidange. Enfin, il est important de rappeler que le but premier de la digestion anaérobie est de produire du méthane destiné à être valorisé. Le pré-traitement envisagé devra donc permettre d'améliorer la qualité sanitaire du digestat tout en préservant le rendement de production de biogaz.

Des dénombrements de différentes bactéries indicatrices sont réalisés afin d'observer un abattement suite à l'application d'un pré-traitement « acido-thermique » associé à la digestion anaérobie. Il est donc important de choisir une méthode pertinente en fonction des objectifs recherchés. La quantification des agents pathogènes est réalisée par techniques culturales classiques. Les tests en microplaques pour quantifier *E. coli* et les entérocoques mesurent l'activité enzymatique des bactéries. Les milieux VF et TSN mesurent la capacité de multiplication des BASR et de *C. perfringens*. Ces méthodes nécessitent peu de matériel, sont peu coûteuses, simples et reproductibles. Cependant, les tests en microplaques et ces milieux de culture peuvent présenter certaines limites. En effet, les microplaques n'ont pas la capacité



de quantifier l'ensemble des bactéries viables au sein d'un échantillon. Il en est de même pour les milieux VF et TSN. Les bactéries viables non cultivables ou VBNC en anglais (Viable But Non Culturable) ne peuvent être quantifiées par ces techniques culturales classiques. Les VBNC peuvent être présentes lorsqu'elles sont soumises à des conditions stressantes dans leur environnement. D'autres techniques seraient plus sensibles. Elles permettraient de dénombrer et d'observer ces VBNC. On peut citer, parmi ces techniques, la cytométrie en flux (52). Cette technique pourrait ainsi être utilisée dans le cadre de notre étude pour l'énumération des spores de *Clostridium perfringens* après application d'un pré-traitement. En effet, si les conditions de multiplication des bactéries ne sont pas optimales (milieu acide par exemple), la proportion des VBNC pourrait augmenter au sein de l'échantillon et la cytométrie en flux serait une technique en adéquation totale avec nos expérimentations pour dénombrer l'ensemble des agents pathogènes.

Certaines études utilisent d'autres techniques. Au Brésil, des recherches ont été menées sur des boues de stations de traitement des eaux usées (28). Une autre étude au Canada recherchait *Clostridium* (48). Ces bactéries ont été identifiées par PCR. L'identification par PCR n'est pas forcément le reflet de la viabilité de *Salmonella* ou de *Clostridium* dans les boues. La technique de PCR est basée sur la présence d'ADN et le patrimoine génétique d'un micro-organisme peut être présent dans l'environnement alors que la bactérie n'est plus viable. L'identification microbiologique, qui est fonction des techniques utilisées, montrerait donc certaines limites. L'étude que j'ai effectuée cherche à quantifier et évaluer la viabilité des micro-organismes et non détecter la présence d'agents pathogènes. En effet, seuls les micro-organismes viables sont capables de transmettre des infections.



Conclusion

La méthanisation agricole est en plein essor. Cependant, des problématiques sanitaires apparaissent avec la perspective d'une valorisation de l'ensemble des produits de la digestion anaérobie.

L'objectif de mon travail de recherche a été d'évaluer l'efficacité d'un pré-traitement à potentialiser l'effet hygiénisant de la digestion anaérobie en vue d'améliorer la qualité sanitaire du digestat. Pour cela, la quantification des bactéries indicatrices présentes dans les intrants et produits d'une unité de méthanisation agricole a été réalisée. Cette caractérisation microbiologique globale sur site, couplée à des tests BMP menés individuellement sur chaque intrant, a permis de sélectionner un intrant sur lequel le pré-traitement a été testé. Les intrants, présentant la charge en *Clostridium perfringens* la plus importante, sont les matières de vidange. Ce substrat a donc été choisi pour tester les différents pré-traitements. Le pré-traitement thermique appliqué sur les matières de vidange permet de montrer un abattement total de la concentration en *Escherichia coli*. Toutefois, la température de 70° C entraîne un effet moins important sur la réduction du nombre d'entérocoques et de spores de *C. perfringens*. Quant au pré-traitement acide, les différentes concentrations et temps d'incubation des acides avec les matières de vidange ne présentent pas d'effet significatif sur les bactéries indicatrices. Si les résultats n'ont pas mis en évidence un abattement très marqué suite au pré-traitement, ces effets ne peuvent être réellement évalués qu'en couplage avec la méthanisation et donc avec des tests BMP en laboratoire.

Le pré-traitement acido-thermique a pour but de potentialiser l'effet hygiénisant de la méthanisation. C'est pourquoi, à l'avenir, ce pré-traitement doit être réalisé en couplage avec des tests de potentiel méthanogène (BMP) pour suivre la cinétique de production de méthane mais surtout suivre l'évolution des bactéries indicatrices. Enfin, dans un cadre plus global, il doit pouvoir être appliqué à l'échelle d'une unité de méthanisation au sein de laquelle différents intrants, ayant des profils microbiologiques différents, sont utilisés afin d'être digérés.



Références bibliographiques

1. ADEME. Méthanisation, feuille de route stratégique [Internet]. 2017 [cité 8 janv 2018]. 40 p. Disponible sur: http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/methanisation_fr_2017.pdf
2. LOI n° 2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte. 2015-992 août 17, 2015.
3. France C d'agriculture. La méthanisation agricole [Internet]. Chambres d'agriculture. 2018 [cité 13 juin 2018]. Disponible sur: <https://chambres-agriculture.fr/exploitation-agricole/developper-des-projets/economie-et-production-denergies/la-methanisation-agricole/>
4. Règlement (CE) no 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) no 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux). :33.
5. Leboucher A. 2016. Journées Recherche Industrie biogaz méthanisation, Limoges. Méthanisation : la réglementation sanitaire des sous- produits animaux. 10 février 2016, 9 p.
6. Escudie R, Cresson R. Méthanisation de la biomasse. Ref TIP140WEB - Bioprocédés [Internet]. 10 oct 2017 [cité 28 déc 2017]; Disponible sur: <https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.unilim.fr/base-documentaire/42161210-bioprocédés-dans-les-domaines-de-l-energie-et-de-l-environnement/download/bio5100/methanisation-de-la-biomasse.html>
7. La méthanisation – Association Metheor [Internet]. [cité 4 janv 2018]. Disponible sur: <https://metheor.org/comprendre/la-methanisation/>
8. Bastide G. Méthanisation (fiche technique) [Internet]. 2015 [cité 28 déc 2017]. Disponible sur: <http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/fiche-technique-methanisation-201502.pdf>
9. Martín-Díaz J, Ruiz-Hernando M, Astals S, Lucena F. Assessing the usefulness of clostridia spores for evaluating sewage sludge hygienization. *Bioresour Technol.* 1 févr 2017;225(Supplement C):286-92.
10. APESA, SET Transfert, Ifrée. Collectivités et méthanisation. Mars 2018, 15 p.
11. Ordonnance n° 2015-615 du 4 juin 2015 relative à la mise sur le marché et à l'utilisation des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture.
12. Ingremeau C. 2013. Pollutec Horizons, Villepinte. Avancées réglementaires et techniques sur les digestats. 3 décembre 2013, 22 p.
13. Elhabti A, Lalanne M. rapport_biologie_digesteur_ademe.pdf [Internet]. 2014 [cité 3 janv 2018]. Disponible sur: http://www.bourgogne.ademe.fr/sites/default/files/files/Domaines%20d%27intervention/EnR/Biogaz/rapport_biologie_digesteur_ademe.pdf
14. Ministère de la Transition écologique et solidaire. Biogaz [Internet]. Ministère de la Transition écologique et solidaire. 2017 [cité 3 janv 2018]. Disponible sur: <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/biogaz#e3>



15. Lambert F-M, Rohfritsch S. N° 1169 - Rapport d'information de M. François-Michel Lambert et Mme Sophie Rohfritsch déposé en application de l'article 145 du règlement, par la commission du développement durable et de l'aménagement du territoire, en conclusion des travaux d'une mission d'information sur la biomasse au service du développement durable [Internet]. Assemblée nationale: Assemblée nationale; 2013 juin [cité 2 janv 2018] p. 117. Report No.: 1169. Disponible sur: http://www.assemblee-nationale.fr/14/rap-info/i1169.asp#P256_36753
16. Sanchez J-M. Phosphore indispensable en agriculture | Agriculture Nouvelle [Internet]. 2015 [cité 2 janv 2018]. Disponible sur: <https://www.agriculture-nouvelle.fr/phosphore-fertilisation-indispensable/>
17. Quideau P, Morvan T, Guiziou F, Daumer M-L, Pourcher A-M, Béline F. Les effets et conséquences de la méthanisation sur la matière organique et l'azote des lisiers de porc. *Sci Eaux Territ.* 25 oct 2013;Numéro 12(3):66–71.
18. Règlement (UE) no 142/2011 de la Commission du 25 février 2011 portant application du règlement (CE) no 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et portant application de la directive 97/78/CE du Conseil en ce qui concerne certains échantillons et articles exemptés des contrôles vétérinaires effectués aux frontières en vertu de cette directive Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. :254.
19. Arrêté du 10 novembre 2009 fixant les règles techniques auxquelles doivent satisfaire les installations de méthanisation soumises à autorisation en application du titre Ier du livre V du code de l'environnement [Internet]. Code de l'Environnement nov 10, 2009. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021334497>
20. Arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation | Legifrance [Internet]. févr 2, 1998. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000005625281>
21. ADEME. Méthanisation à la ferme : guide pratique pour les projets d'une puissance électrique inférieure à 500 kWe [Internet]. 2011 sept [cité 10 janv 2018] p. 19. Disponible sur: https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/78866_7201methanisation_a_la_ferme.pdf
22. ANSES. Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des MFSC. 2013 août p. 127.
23. Mortureux M. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux éléments complémentaires transmis par METHALANDES suite à l'avis de l'Anses n° 2013-0698 du 18 avril 2014 concernant la demande d'homologation pour le digestat de méthanisation ORGALAND [Internet]. Maisons-Alfort: ANSES; 2014 déc [cité 10 janv 2018] p. 6. Report No.: 2014-SA-0230. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MFSC2014sa0230.pdf>
24. AFNOR. Amendements organiques : dénominations, spécifications et marquage. NF U 44-051; 2006. 17 p.
25. Arrêté du 9 avril 2018 fixant les dispositions techniques nationales relatives à l'utilisation de sous-produits animaux et de produits qui en sont dérivés, dans une usine de production de biogaz, une usine de compostage ou en « compostage de proximité », et à l'utilisation du lisier. avr 24, 2018 p. 9.



26. OMS | Zoonoses et environnement [Internet]. WHO. [cité 9 avr 2018]. Disponible sur: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/zoonose/fr/
27. Murphy S, Gaffney MT, Fanning S, Burgess CM. Potential for transfer of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Senftenberg from contaminated food waste derived compost and anaerobic digestate liquid to lettuce plants. *Food Microbiol.* 1 oct 2016;59(Supplement C):7-13.
28. Krzyzanowski F, Zappellini L, Martone-Rocha S, Dropa M, Matté MH, Nacache F, et al. Quantification and characterization of *Salmonella* spp. isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture. *BMC Microbiol.* 2014;14:263.
29. Benoît P, Chatelet A, Générmont S, Giamberini L, Mougin C, Nguyen C, Patureau D, Pourcher A-M, Rychen G, Smolders E, Topp E, Viguié C. 2014. Conséquences de l'épandage de Mafor en termes de contamination de l'environnement. 568-772. In : ESCo, Matières fertilisantes d'origine résiduaire.
30. ANSES. Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. 2016 [cité 10 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/les-toxi-infections-alimentaires-collectives-tiac>
31. Xu C, Wang D, Huber A, Weese SJ, Warriner K. Persistence of *Clostridium difficile* in wastewater treatment-derived biosolids during land application or windrow composting. *J Appl Microbiol.* févr 2016;120(2):312-20.
32. Besson M, Moletta R. Aspects sanitaires de l'épandage de digestats issus de méthanisation à la ferme. *Eau Ind Nuis.* 2010;(335):85–89.
33. Demay F. Microbiologie-Flores d'altération de la qualité sanitaire [Internet]. [cité 10 avr 2018]. Disponible sur: <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A2/microbiologie/chapitre3/FloreDAAlteration.pdf>
34. Rodier J, Legube B, Merlet N. L'analyse de l'eau. Paris: Dunod; 2009.
35. Bianchi V, El Anbassi S, Duployez N. Bactériologie, virologie. Bruxelles: De Boeck; 2013.
36. Pourcher A-M, Françoise P-B, Virginie F, Agnieszka G, Vasilica S, Gérard M. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Appl Soil Ecol.* mars 2007;35(3):473-9.
37. Besson M. La méthanisation en zones AOC Savoyardes. Connaissance et maîtrise des aspects sanitaires liés à l'épandage de digestat. Université de Savoie; 2010, 37 p.
38. Kahn LH. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 juin 2017;111(6):255-60.
39. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM. Brock, Biologie des micro-organismes. Paris: Pearson Education; 2007.
40. Pourcher A-M, Burton C, Ziebal C, De-Guardia A. 2008. 13th RAMIRAN International Conference, Albena Bulgaria, 11-14 juin 2008 Impact of temperature-time combinations on enteric bacteria in separated solids from pig manure. 5 p.
41. Scaglia B, D'Imporzano G, Garuti G, Negri M, Adani F. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci Total Environ.* janv 2014;466-467:888-97.



42. Chen Y, Fu B, Wang Y, Jiang Q, Liu H. Reactor performance and bacterial pathogen removal in response to sludge retention time in a mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. *Bioresour Technol.* févr 2012;106:20-6.
43. Pourcher A-M, Druilhe C. 2016. Journées Recherche Industrie biogaz méthanisation. Impact de la digestion anaérobie sur les bactéries indicatrices et les micro-organismes pathogènes. Limoges, 10 février 2016, 57 p.
44. Xu C, Salsali H, Weese S, Warriner K. Inactivation of *Clostridium difficile* in sewage sludge by anaerobic thermophilic digestion. *Can J Microbiol.* janv 2016;62(1):16-23.
45. Costa A, Gusmara C, Gardoni D, Zaninelli M, Tambone F, Sala V, et al. The effect of anaerobic digestion and storage on indicator microorganisms in swine and dairy manure. *Environ Sci Pollut Res.* nov 2017;24(31):24135-46.
46. Salsali H, Parker WJ, Sattar SA. The effect of volatile fatty acids on the inactivation of *Clostridium perfringens* in anaerobic digestion. *World J Microbiol Biotechnol.* mai 2008;24(5):659-65.
47. Pascual-Benito M, García-Aljaro C, Casanovas-Massana S, Blanch AR, Lucena F. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *J Appl Microbiol.* févr 2015;118(2):412-8.
48. Xu C, Weese JS, Flemming C, Odumeru J, Warriner K. Fate of *Clostridium difficile* during wastewater treatment and incidence in Southern Ontario watersheds. *J Appl Microbiol.* sept 2014;117(3):891-904.
49. Orzi V, Scaglia B, Lonati S, Riva C, Boccasile G, Alborali GL, et al. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Sci Total Environ.* sept 2015;526:116-26.
50. Levantesi C, Beimfohr C, Blanch AR, Carducci A, Gianico A, Lucena F, et al. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environ Sci Pollut Res.* mai 2015;22(10):7237-47.
51. Kunte DP, Yeole TY, Ranade DR. Effect of volatile fatty acids on *Shigella dysenteriae* during anaerobic digestion of human night soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 16 (6). 20 juin 2000. pp. 519-522.
52. Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Punnapuzha A, Philip S, Mundkur L. Rapid assessment of viable but non-culturable *Bacillus coagulans* MTCC 5856 in commercial formulations using Flow cytometry. Dao M, éditeur. *PLOS ONE.* 23 févr 2018;13(2):e0192836.



Annexes

Annexe 1. Table statistique pour le dénombrement des entérocoques et *Escherichia coli*.....72



Annexe 1. Table statistique pour le dénombrement des entérocoques et *Escherichia coli*



BIOKAR DIAGNOSTICS

ANNEXE 3

Dénombrement d'*Escherichia coli* et des entérocoques dans les eaux usées par la méthode en microplaques pour la détermination du NPP

Produit	MUG/EC pour <i>Escherichia coli</i>	MUD/SF pour les entérocoques
Code produit	BT00108	BT00308
Référence normative	NF EN ISO 9308-3 : mars 1999	NF EN ISO 7899-1 : mars 1999
Indice de classement AFNOR	T90-433	T90-432

PRESENTATION

EXEMPLE DE CALCUL

Nombre caractéristique à 3 chiffres : 107/0

$NPP/100mL = 152 \times \text{Facteur de conversion}^*$

Dilution (la 1 ^{ère} du triplet)	Volume/puits	Facteur de conversion*
1/2	200 μ L	10
1/20	200 μ L	100
1/200	200 μ L	1000
1/2000	200 μ L	10000

$LI/100mL = 92 \times \text{Facteur de conversion}^*$

$LS/100mL = 251 \times \text{Facteur de conversion}^*$

Intervalle de confiance = 95 %

Révision 2004/05/14
Copie non gérée

Biokar Diagnostics - Rue des Quarante Mines - ZAC de Ther - Allonne - B.P. 10245 - F60002 BEAUVAIS CEDEX - FRANCE - Tél. : 03 44 14 33 33 - Fax : 03 44 14 33 34
Siège Social : Solabia S.A. - 29, rue Delizy - F93500 PANTIN - FRANCE - Société Anonyme au capital de 5 798 060 Euros - 316 743 095 R.C.S. Bobigny - NAP 244 A



Eaux usées :
Calcul du NPP en
Microplaques



BIO-RAD DIAGNOSTICS

Entérocoques AFNOR T90-432
Escherichia coli AFNOR T90-433

NC	NPP	LI	LS	NC	NPP	LI	LS	NC	NPP	LI	LS
0 0 1	6	1	40	5 1 2	53	27	107	8 1 0	68	35	132
0 0 2	11	3	45	5 2 0	47	22	99	8 1 1	76	40	142
0 1 0	6	1	40	5 2 1	54	27	108	8 1 2	84	46	153
0 1 1	11	3	45	5 2 2	60	31	117	8 1 3	92	51	164
1 0 0	6	1	41	5 3 0	54	27	108	8 2 0	76	40	143
1 0 1	12	3	46	5 3 1	61	31	117	8 2 1	84	46	154
1 0 2	17	4	54	5 3 2	67	36	126	8 2 2	92	52	164
1 1 0	12	3	47	5 4 0	61	31	117	8 2 3	100	57	175
1 1 1	17	4	54	5 4 1	68	36	127	8 3 0	84	46	154
1 1 2	23	9	62	5 5 0	68	36	127	8 3 1	92	52	165
1 2 0	17	4	54	5 5 1	75	41	136	8 3 2	100	58	175
1 2 1	23	9	62	5 6 0	75	41	136	8 4 0	93	52	165
2 0 0	12	3	48	6 0 0	41	18	92	8 4 1	101	58	176
2 0 1	18	6	56	6 0 1	48	23	102	8 4 2	109	64	187
2 0 2	24	9	64	6 0 2	55	27	111	8 5 0	101	58	177
2 1 0	18	6	56	6 1 0	48	23	102	8 5 1	110	64	188
2 1 1	24	9	64	6 1 1	55	28	112	8 5 2	118	70	199
2 1 2	30	12	72	6 1 2	63	32	121	8 6 0	110	64	188
2 2 0	24	9	64	6 2 0	56	28	112	8 6 1	118	70	199
2 2 1	30	13	72	6 2 1	63	32	121	8 7 0	119	70	200
2 3 0	30	13	73	6 2 2	70	37	131	9 0 0	71	36	138
2 3 1	36	16	81	6 3 0	63	33	122	9 0 1	79	42	149
3 0 0	19	6	57	6 3 1	70	37	131	9 0 2	87	48	160
3 0 1	25	9	66	6 3 2	77	43	141	9 0 3	96	53	171
3 0 2	31	13	74	6 4 0	70	38	132	9 1 0	79	42	149
3 1 0	25	9	66	6 4 1	78	43	141	9 1 1	88	48	161
3 1 1	31	13	75	6 4 2	85	48	151	9 1 2	96	54	172
3 1 2	37	17	83	6 5 0	78	43	142	9 1 3	105	60	183
3 2 0	31	13	75	6 5 1	85	48	151	9 2 0	88	48	161
3 2 1	37	17	83	6 6 0	86	48	152	9 2 1	96	54	173
3 2 2	44	21	92	7 0 0	50	24	106	9 2 2	105	60	184
3 3 0	37	17	84	7 0 1	57	28	116	9 2 3	114	66	196
3 3 1	44	21	92	7 0 2	65	33	126	9 3 0	97	54	173
3 4 0	44	21	92	7 1 0	58	29	116	9 3 1	105	60	185
3 4 1	50	25	101	7 1 1	65	34	126	9 3 2	114	66	196
4 0 0	26	10	68	7 1 2	73	39	136	9 3 3	123	73	208
4 0 1	32	13	77	7 1 3	80	44	146	9 4 0	106	60	186
4 0 2	38	17	86	7 2 0	65	34	127	9 4 1	115	67	197
4 1 0	32	13	77	7 2 1	73	39	137	9 4 2	124	73	209
4 1 1	39	17	86	7 2 2	80	44	147	9 5 0	115	67	198
4 1 2	45	21	95	7 3 0	73	39	137	9 5 1	124	73	210
4 2 0	39	17	86	7 3 1	81	44	147	9 5 2	133	80	222
4 2 1	45	21	95	7 3 2	88	50	157	9 6 0	125	74	211
4 2 2	52	26	104	7 4 0	81	44	148	9 6 1	134	80	223
4 3 0	45	22	95	7 4 1	89	50	158	9 7 0	134	81	224
4 3 1	52	26	104	7 4 2	96	55	168	9 7 1	143	87	236
4 3 2	58	30	113	7 5 0	89	50	158	9 8 0	144	88	237
4 4 0	52	26	104	7 5 1	97	56	168	10 0 0	83	44	157
4 4 1	59	30	113	7 6 0	97	56	169	10 0 1	92	50	169
4 5 0	59	30	113	7 6 1	105	61	179	10 0 2	101	56	181
5 0 0	33	14	80	7 7 0	105	62	180	10 0 3	110	62	193
5 0 1	40	18	89	8 0 0	60	30	121	10 1 0	92	50	169
5 0 2	46	22	98	8 0 1	68	35	131	10 1 1	101	56	182
5 1 0	40	18	89	8 0 2	75	40	142	10 1 2	110	63	194
5 1 1	47	22	98	8 0 3	83	46	152	10 1 3	119	69	206

16 puits 6 dilutions
1/2, 1/20, 1/200, 1/2000,
1/20000, 1/200000

ANNEXE 3

1



Eaux usées :
Calcul du NPP en
Microplaques



Entérocoques AFNOR T90-432
Escherichia coli AFNOR T90-433

NC	NPP	LI	LS	NC	NPP	LI	LS	NC	NPP	LI	LS						
10	2	0	101	56	182	12	0	1	123	69	219	13	4	2	214	129	355
10	2	1	111	63	195	12	0	2	134	77	234	13	4	3	228	139	376
10	2	2	120	69	207	12	0	3	145	84	249	13	4	4	244	149	397
10	2	3	129	76	220	12	1	0	124	70	220	13	5	0	201	120	337
10	3	0	111	63	196	12	1	1	135	77	235	13	5	1	215	130	357
10	3	1	120	70	208	12	1	2	146	85	251	13	5	2	230	140	379
10	3	2	130	77	221	12	1	3	157	93	266	13	5	3	245	150	400
10	3	3	140	83	233	12	2	0	155	77	237	13	6	0	217	130	360
10	4	0	121	70	209	12	2	1	147	85	252	13	6	1	232	141	382
10	4	1	131	77	222	12	2	2	158	93	268	13	6	2	247	151	404
10	4	2	140	84	235	12	2	3	170	101	284	13	6	3	263	162	426
10	4	3	150	91	248	12	3	0	147	86	253	13	7	0	233	142	385
10	5	0	131	77	223	12	3	1	159	94	269	13	7	1	249	152	407
10	5	1	141	84	236	12	3	2	171	102	286	13	7	2	265	163	430
10	5	2	151	91	249	12	3	3	183	110	302	13	7	3	282	175	453
10	6	0	141	85	237	12	4	0	160	94	271	13	8	0	251	153	410
10	6	1	151	92	250	12	4	1	171	102	287	13	8	1	267	164	434
10	6	2	161	99	263	12	4	2	184	111	304	13	8	2	284	176	457
10	7	0	152	92	251	12	4	3	196	120	321	13	9	0	269	166	437
10	7	1	162	99	264	12	5	0	172	103	289	13	9	1	286	177	462
10	8	0	163	100	266	12	5	1	185	111	306	13	9	2	304	190	487
11	0	0	97	52	179	12	5	2	197	120	323	13	10	0	288	179	466
11	0	1	106	59	192	12	5	3	210	129	341	13	10	1	306	191	491
11	0	2	116	66	205	12	6	0	184	112	308	14	0	0	155	87	277
11	0	3	126	73	218	12	6	1	198	121	325	14	0	1	169	96	297
11	1	0	107	59	193	12	6	2	211	130	343	14	0	2	183	106	318
11	1	1	116	66	206	12	6	3	224	139	361	14	0	3	198	116	340
11	1	2	126	73	219	12	7	0	199	122	327	14	1	0	170	97	299
11	1	3	137	80	233	12	7	1	212	131	345	14	1	1	185	106	321
11	2	0	117	66	207	12	7	2	226	140	363	14	1	2	200	116	343
11	2	1	127	73	221	12	8	0	214	132	348	14	1	3	215	127	366
11	2	2	137	80	234	12	8	1	227	141	366	14	1	4	232	138	390
11	2	3	148	88	248	12	8	2	241	151	385	14	2	0	186	107	323
11	3	0	128	74	222	12	9	0	229	142	369	14	2	1	201	117	346
11	3	1	138	81	236	12	9	1	243	152	388	14	2	2	217	128	369
11	3	2	148	88	250	13	0	0	132	73	236	14	2	3	234	138	394
11	3	3	159	96	264	13	0	1	144	82	253	14	2	4	251	150	420
11	4	0	139	81	237	13	0	2	156	90	270	14	3	0	203	118	349
11	4	1	149	89	251	13	0	3	168	98	288	14	3	1	219	128	373
11	4	2	160	96	265	13	1	0	144	82	254	14	3	2	235	139	398
11	4	3	171	104	280	13	1	1	157	90	272	14	3	3	253	151	424
11	5	0	150	89	252	13	1	2	169	99	290	14	3	4	271	163	451
11	5	1	161	97	267	13	1	3	182	108	308	14	4	0	220	129	376
11	5	2	172	105	282	13	2	0	158	91	274	14	4	1	237	140	401
11	5	3	183	113	297	13	2	1	170	99	292	14	4	2	255	152	428
11	6	0	161	97	268	13	2	2	184	108	311	14	4	3	273	164	455
11	6	1	172	105	283	13	2	3	197	118	330	14	4	4	292	177	484
11	6	2	184	113	298	13	2	4	211	127	350	14	5	0	239	141	405
11	7	0	173	106	285	13	3	0	171	100	294	14	5	1	257	153	432
11	7	1	185	114	300	13	3	1	185	109	313	14	5	2	276	165	460
11	7	2	196	122	315	13	3	2	198	118	332	14	5	3	295	178	489
11	8	0	186	114	302	13	3	3	212	128	352	14	5	4	315	192	519
11	8	1	197	123	317	13	3	4	227	138	373	14	6	0	259	154	436
11	9	0	198	123	319	13	4	0	186	110	315	14	6	1	278	166	465
12	0	0	113	62	204	13	4	1	200	119	335	14	6	2	298	180	494

16 puits 6 dilutions
1/2, 1/20, 1/200, 1/2000,
1/20000, 1/200000

ANNEXE 3

2



Eaux usées :
Calcul du NPP en
Microplaques



BDKAR DIAGNOSTICS

Entérocoques AFNOR T90-432
Escherichia coli AFNOR T90-433

NC	NPP	LI	LS	NC	NPP	LI	LS				
16	10	4	1228	711	2123	16	15	4	2806	1596	4934
16	10	5	1331	783	2263	16	15	5	3087	1758	5420
16	10	6	1437	858	2407	16	15	6	3400	1937	5967
16	10	7	1545	935	2554	16	15	7	3750	2136	6584
16	10	8	1656	1014	2704	16	15	8	4144	2359	7279
16	11	0	982	532	1811	16	15	9	4588	2613	8056
16	11	1	1084	601	1956	16	15	10	5090	2905	8918
16	11	2	1189	672	2104	16	15	11	5654	3241	9863
16	11	3	1298	747	2255	16	15	12	6284	3627	10887
16	11	4	1409	824	2410	16	15	13	6985	4070	11990
16	11	5	1524	904	2569	16	15	14	7761	4570	13178
16	11	6	1643	987	2733	16	16	0	2398	1295	4440
16	11	7	1765	1073	2902	16	16	1	2682	1446	4975
16	11	8	1891	1162	3076	16	16	2	3009	1614	5611
16	11	9	2021	1254	3256	16	16	3	3392	1802	6384
16	12	0	1145	631	2080	16	16	4	3849	2019	7340
16	12	1	1260	707	2243	16	16	5	4408	2277	8534
16	12	2	1378	787	2411	16	16	6	5100	2598	10013
16	12	3	1500	871	2585	16	16	7	5962	3015	11787
16	12	4	1627	957	2765	16	16	8	7022	3569	13818
16	12	5	1758	1047	2951	16	16	9	8299	4282	16083
16	12	6	1895	1141	3145	16	16	10	9818	5166	18658
16	12	7	2036	1239	3347	16	16	11	11634	6232	21718
16	12	8	2184	1341	3557	16	16	12	13864	7517	25570
16	12	9	2338	1447	3776	16	16	13	16740	9102	30788
16	12	10	2498	1558	4004	16	16	14	20795	11148	38790
16	13	0	1342	747	2409	16	16	15	2726	13984	54974
16	13	1	1472	834	2600						
16	13	2	1608	924	2799						
16	13	3	1751	1019	3007						
16	13	4	1899	1118	3226						
16	13	5	2055	1223	3456						
16	13	6	2219	1332	3698						
16	13	7	2392	1447	3953						
16	13	8	2573	1568	4223						
16	13	9	2765	1696	4508						
16	13	10	2967	1831	4809						
16	13	11	3181	1974	5128						
16	14	0	1587	888	2836						
16	14	1	1742	988	3071						
16	14	2	1905	1093	3322						
16	14	3	2079	1204	3589						
16	14	4	2263	1322	3876						
16	14	5	2460	1447	4184						
16	14	6	2671	1580	4515						
16	14	7	2898	1723	4873						
16	14	8	3141	1876	5260						
16	14	9	3405	2041	5678						
16	14	10	3689	2220	6131						
16	14	11	3998	2415	6618						
16	14	12	4332	2627	7142						
16	15	0	1912	1064	3439						
16	15	1	2108	1182	3759						
16	15	2	2320	1310	4111						
16	15	3	2552	1447	4500						

16 puits 6 dilutions
1/2, 1/20, 1/200, 1/2000,
1/20000, 1/200000

ANNEXE 3

4



Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



Optimisation d'un pré-traitement thermique en vue d'améliorer l'abattement des bactéries pathogènes au cours de la méthanisation

La méthanisation à la ferme ou digestion anaérobie agricole est une activité en plein essor en France. Les produits de la méthanisation sont destinés à être valorisés. En vue de son épandage sur des terres agricoles, le digestat, produit solide, doit suivre des règles sanitaires strictes. Il est donc important d'étudier les caractéristiques microbiologiques des intrants destinés à la méthanisation et d'améliorer l'hygiénisation de ces derniers afin d'assurer l'innocuité du digestat. Dans un premier temps, l'objectif de cette étude a été de caractériser, d'un point de vue microbiologique, les différents substrats et produits d'une unité de méthanisation agricole : le fumier, les céréales, le mélange de la trémie d'incorporation des substrats solides, les matières de vidange, le contenu du digesteur, les digestats liquide et solide. Les bactéries anaérobies sulfito-réductrices, les entérocoques, *Escherichia coli* ainsi que *Clostridium perfringens* ont été étudiées car elles présentent un intérêt sanitaire dans le cadre de l'épandage du digestat. Cette caractérisation de l'unité de méthanisation a confirmé que la digestion anaérobie permettait un certain abattement des bactéries pathogènes. Ensuite, un pré-traitement thermique et/ou acide a été appliqué sur un intrant. La caractérisation microbiologique après l'application du pré-traitement a montré que le pré-traitement acide n'avait pas d'effet sur les agents pathogènes. Quant au pré-traitement thermique, celui-ci a entraîné une légère diminution des agents pathogènes. De futures recherches seraient intéressantes afin d'étudier l'effet du couplage de ces deux pré-traitements sur le potentiel méthanogène des intrants.

Mots-clés : *Clostridium perfringens*, méthanisation agricole, pré-traitement, digestat, bactéries indicatrices

Optimization of a thermal pre-treatment to improve the reduction of pathogenic bacteria during methanization

Methanization on the farm or agricultural anaerobic digestion is an activity in full development in France. Methanization products are meant to be valued. In order to be spread on agricultural lands, the digestate has to meet strict health specifications. Therefore, it is important to study the microbiological characteristics of the feedstocks intended for methanization and to improve their hygienisation to ensure the safety of digestate. At first, the objective of this study was to characterize, from a microbiological point of view, the different substrates and products of an agricultural biogas plant; manure, cereals, mix of solid substrates, draining materials, content of the digester, liquid and solid digestates. Anaerobic sulphito-reducing bacteria, enterococci, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* were studied because they present a health interest in the context of the spreading of the digestate. This characterization of the anaerobic digestion unit confirmed that the anaerobic digestion allowed to reduce pathogenic bacteria to some extent. Then, either thermal and/or acid pre-treatment was applied on one feedstock. Microbiological characterization after the application of the pre-treatment showed that the acid pre-treatment had no effect on the pathogens. The thermal pre-treatment resulted in a slight decrease of pathogens. Future research would be interesting to study the effect of the combination of these two pre-treatments on the methanogenic potential of the feedstocks.

Keywords : *Clostridium perfringens*, agricultural methanization, pre-treatment, digestate, indicator bacteria,

