



**HAL**  
open science

# Efficacité des couplages digestion anaérobie mésophile-réacteur thermophile pour la réduction de la production de boues, la production de biogaz et l'élimination des micropolluants

Mohammad Asadi

► **To cite this version:**

Mohammad Asadi. Efficacité des couplages digestion anaérobie mésophile- réacteur thermophile pour la réduction de la production de boues, la production de biogaz et l'élimination des micropolluants. Génie des procédés. Institut National des Sciences Appliquées - Toulouse, 2024. Français. NNT: . tel-04955695

**HAL Id: tel-04955695**

**<https://hal.science/tel-04955695v1>**

Submitted on 19 Feb 2025

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'INSA Toulouse

---

**Efficacité des couplages digestion anaérobie  
mésophile-réacteur thermophile pour la réduction de la  
production de boues, la production de biogaz et  
l'élimination des micropolluants**

---

Thèse présentée et soutenue, le 21 novembre 2024 par  
**Mohammad ASADI**

**École doctorale**

MEGEP - Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés

**Spécialité**

Génie des Procédés et de l'Environnement

**Unité de recherche**

TBI - Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

**Thèse dirigée par**

Etienne PAUL, Yolaine BESSIERE et Laetitia CAVAILLE

**Composition du jury**

M. Renaud ESCUDIE	DR INRAE, LBE Narbonne	- Rapporteur
M. Pierre FONTANILLE	PrU UCA, Polytech Clermont-Ferrand	- Rapporteur
Mme Annabelle COUVERT	PrU ENSCR, Rennes	- Examinatrice
Mme Claire ALBASI	DR CNRS, LGC Toulouse	- Examinatrice
M. Etienne PAUL	PrU INSA Toulouse, TBI	- Directeur de thèse
Mme Yolaine BESSIERE	MdC INSA Toulouse, TBI	- Co-directrice de thèse

**Membres invités**

Mme Laetitia CAVAILLE, Responsable BE-R&D Innovation, SAPOVAL

M. Matthieu PEYRE-LAVIGNE, IR CRITT GPTE INSA Toulouse

## Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes encadrants de thèse, Mme Yolaine BESSIERE, M. Etienne PAUL et Mme Laetitia CAVAILLE, pour leur soutien, leur accompagnement tout au long de ces années et pour tout ce qu'ils m'ont appris. Leur expertise, leurs conseils et leur engagement ont été essentiels à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens également à remercier M. Matthieu PEYRE-LAVIGNE pour son aide scientifique, particulièrement dans les aspects de modélisation, ainsi que pour son soutien amical, sa disponibilité et l'énergie qu'il m'a apportée.

Je remercie M. Erwan TROTOUX, dirigeant de l'entreprise SAOVAL, pour son soutien et l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Je remercie ensuite Mme Beatriz GONZALEZ VAZQUEZ, post-doctorant, pour son aide durant ce projet, ainsi que Mme Giovanna PEREIRA-PANTOJA et Mme Majda DKHISSI, stagiaires, pour leur collaboration tout au long de cette aventure scientifique.

Mes remerciements vont également à l'équipe technique, M. Simon DUBOS, M. Mansour BOUNOUBA et Mme Elisabeth MOYA-LECLAIR, pour leur soutien précieux dans les aspects techniques et expérimentaux.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du projet SAVE, spécifiquement à M. Van-Xuan NGUYEN et Mme Florence MOUCHET pour les tests d'écotoxicité, ainsi qu'à M. Christophe DAGOT pour les tests d'antibiorésistance.

Je remercie également mes rapporteurs et examinateurs de thèse, M. Renaud ESCUDIÉ, M. Pierre FONTANILLE, Mme Annabelle COUVERT et Mme Claire ALBASI, pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour leurs précieux conseils.

Mes plus sincères remerciements vont également à mes parents pour leur amour inconditionnel, leur soutien et leur confiance en moi, qui ont été une source constante d'énergie et de motivation.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de toutes ces personnes, et je leur suis profondément reconnaissant.

## Résumé

La thèse, menée dans le cadre du projet SAVE (financé par l'ADEME, la Région Occitanie ainsi que les agences de l'eau Adour garonne et Rhône Méditerranée Corse), a pour objectif de répondre à deux grands défis dans le traitement des eaux usées urbaines : l'amélioration de la biodégradation des micropolluants et la réduction de la production de boue. Cette recherche s'inscrit donc dans les priorités de la Commission Européenne, qui prépare une révision de la directive sur les eaux résiduaires urbaines pour intégrer les enjeux environnementaux actuels. La digestion anaérobie est un procédé qui a un rôle déterminant à jouer dans ce contexte, lorsque l'on s'intéresse à la chaîne complète de traitements des effluents urbains. Cependant, ce procédé présente des limites, notamment en ce qui concerne la biodégradation de la DCO particulaire et des micropolluants organiques, ce qui a suscité l'intérêt de l'entreprise SAPOVAL, partenaire du projet SAVE.

La configuration MAD-TAR combinant un digesteur mésophile avec un digesteur thermophile microaéré a été étudié lors de travaux précédents qui ont montré une réduction significative des boues et de certains micropolluants, par rapport au digesteur mésophile conventionnel. C'est pourquoi, ce travail de thèse s'est focalisé sur l'étude de ce procédé hybride visant une réduction de la production de boues, une production de biogaz, une élimination des micropolluants, ainsi qu'une diminution de l'impact environnemental des digestats en termes d'écotoxicité et d'antibiorésistance.

Dans une première partie, nous avons cherché à reproduire les résultats antérieurs (réduction de la production de boues) en pilote de laboratoire. En s'appuyant sur la comparaison entre trois configurations : une référence MAD (digestion mésophile), une configuration MAD-TAD (couplage avec un réacteur thermophile) et le MAD-TAR, nous avons cherché à comprendre quels processus biologiques, physiques ou chimiques permettaient d'expliquer les performances du MAD-TAR et la dynamique des concentrations des variables du procédé. A cette fin, un modèle des procédés basé sur le modèle ADM1 a été développé sur le logiciel Aquasim. Sur la base d'effets de la température, de la concentration en ammoniacque et de la concentration en oxygène, ce modèle a fait l'objet de modifications pour expliquer la dynamique des activités des populations microbiennes.

Les résultats expérimentaux des 3 configurations de pilote montre que la configuration MAD-TAR permet une amélioration significative de l'hydrolyse de la matière particulaire (14 %) contrairement au procédé MAD-TAD, suggérant un rôle clé de l'aération. Des changements dans la vitesse d'hydrolyse, des accumulations transitoires d'AGVs, ainsi que des variations de la production de biogaz ont été observés dans le MAD-TAD et le MAD-TAR en comparaison du MAD.

La modélisation a ensuite permis de tester deux hypothèses différentes : l'une liée à l'augmentation du taux de mortalité dans le compartiment thermophile, l'autre introduisant un shift de population entre des microorganismes thermosensibles (Ts) et des microorganismes thermorésistants (Tr). L'hypothèse introduisant deux types de populations microbiennes Ts et Tr a montré une meilleure capacité à représenter les données expérimentales (l'hydrolyse de la matière particulaire, production des AGV et de biogaz) dans le MAD-TAD. On peut donc supposer que des populations thermorésistantes s'implantent dans le procédé du fait des passages séquentiels à haute température. Concernant le MAD-TAR, les résultats de nos

modélisations ont montré que la fraction de DCO manquantes dans le bilan (21%) ne résulte pas d'une dégradation aérobie puisque la consommation d'azote pour la croissance n'est pas observée. La modélisation telle que proposée n'a pas permis non plus de confirmer une production anaérobie de méthane dans le TAR. Nous n'avons donc pas réussi à comprendre les mécanismes de cette dégradation accrue de la DCO particulaire dans le MAD-TAR. On pourrait proposer de reproduire l'expérience avec une quantification plus fine des flux de carbone qui sortent du TAR, par piégeage du CO<sub>2</sub> produit par exemple.

Dans la troisième partie de la thèse, quatre molécules ont été quantifiées : la ciprofloxacine (CIP), l'azithromycine (AZY), l'ofloxacine (OFL), et la carbamazépine (CBZ). Si les conditions opératoires n'ont pas influencé l'élimination de la CIP et de l'AZY, les configurations thermophiles ont permis une meilleure élimination de l'OFL, avec une légère amélioration supplémentaire dans le cas du MAD-TAR. La CBZ, en revanche, a vu sa dégradation améliorée dans les deux configurations thermophiles, sans distinction significative entre la présence ou non d'aération.

Outre l'amélioration de la dégradation des micropolluants, l'évaluation de la phytotoxicité des digestats a montré que les fractions liquides issues du procédé MAD-TAD étaient plus toxiques que celles des configurations MAD et MAD-TAR. Cette toxicité semble être liée à la concentration en azote ammoniacal, plus élevée dans le TAD en raison de l'absence d'aération, alors que l'aération dans le TAR permet de réduire cette concentration par stripping de l'ammoniac. Ces résultats soulignent l'importance de traiter la fraction liquide post-digestion pour éviter des impacts environnementaux négatifs, notamment une consommation accrue d'énergie pour la nitrification lors de la réintroduction dans les systèmes de traitement, voire l'intérêt de chercher à récupérer ce flux d'azote en vue de sa valorisation.

Concernant l'antibiorésistance, les résultats montrent un effet prometteur de la thermophilie, avec une réduction de la résistance aux aminoglycosides, bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour confirmer ces résultats, notamment en élargissant le panel d'échantillons étudiés à des effluents hospitaliers.

En conclusion, les résultats de cette thèse contribuent à une meilleure compréhension de la dynamique des populations dans les digesteurs hybrides. De plus, ils offrent des indicateurs permettant d'évaluer les impacts environnementaux des digestats.

Introduction générale .....	12
Chapitre I. Bibliographie .....	17
1 Introduction .....	18
2 Contexte des boues et de la digestion anaérobie dans le traitement des eaux .....	19
2.1 Diversité des boues d'épuration, traitements et destination finale.....	19
2.2 Focus sur la digestion anaérobie .....	20
2.2.1 Principes.....	20
2.2.2 Intérêts de la méthanisation .....	21
3 Défis de la digestion anaérobie.....	23
3.1 Procédés de digestion anaérobies avancés .....	23
3.2 Stabilité de fonctionnement.....	25
3.3 Modélisation de la digestion anaérobie .....	26
3.3.1 Modèle ADM1 .....	27
3.3.2 Les limites et les extensions possibles pour le modèle ADM1 .....	27
4 Les micropolluants dans la file boues.....	29
4.1 Sorption des micropolluants sur les boues .....	31
4.1.1 Mécanismes de sorption.....	31
4.1.2 Facteurs influençant les phénomènes de sorption.....	31
4.2 Mécanismes de biodégradation des micropolluants.....	38
4.2.1 Effet des paramètres opératoires .....	38
4.2.2 Activités enzymatiques et mécanismes de biotransformations associés.....	40
5 Conclusion et perspective de la thèse .....	43
Chapitre II. Matériels et méthodes .....	47
1 Introduction .....	48
2 Réacteurs continus .....	48
2.1 Description des installations pilotes.....	48
2.1.1 Pilotes de digestion anaérobie conventionnelle (MAD) .....	48
2.1.2 Pilotes de digestion anaérobie hybride (MAD-TAR/TAD).....	49
2.2 Mise en œuvre des campagnes expérimentales.....	50
2.2.1 Inoculum et boues d'alimentation.....	50
2.2.2 Conditions opératoires appliquées .....	51
3 Évaluation de la biodégradabilité anaérobie des boues d'alimentation en batch (BMP)..	53
4 Techniques analytiques.....	53
4.1 Prélèvements et fractionnement .....	53
4.2 Caractérisations chimiques.....	54

4.2.1	Matière organique .....	54
4.2.2	Formes azotées.....	54
4.2.3	Composition du Gaz .....	54
4.3	Détermination des distributions de taille des particules.....	55
4.4	Quantification des micropolluants .....	55
4.4.1	Liste des molécules .....	55
4.4.2	Réactifs analytiques .....	56
4.4.3	Protocole d'extraction et de purification.....	57
4.4.4	Analyse .....	58
4.5	Séquençage.....	59
5	Exploitations des données et bilans matières .....	59
6	Modélisation : modèle ADM1_B (Modifications apportées au modèle initial ADM1)...	60
6.1	Formation et dégradation de lactate et d'éthanol.....	61
6.2	Effet du pH sur l'hydrolyse .....	62
6.3	Influences de la température .....	62
6.4	Estimation des paramètres et validation du modèle .....	63
	RESULTATS.....	65
	Chapitre III. Etude expérimentale des performances de procédés combinés MAD-TAD et MAD-TAR et modélisation dynamique du MAD .....	67
1	Introduction .....	68
2	PARTIE UNE : Etude expérimentale des performances de procédés combinés MAD-TAD et MAD-TAD.....	69
2.1	Plan d'expérience .....	69
2.1.1	Présentation des objectifs.....	69
2.1.2	Conditions de l'expérimentation.....	70
2.2	Résultats .....	72
2.2.1	Performance de digestion de la référence MAD.....	72
2.2.2	Performance de digestion du MAD-TAD et MAD-TAR .....	76
2.2.3	Evolution des concentrations en AGVs dans les réacteurs .....	78
2.3	Conclusion de la partie 1 .....	80
3	PARTIE DEUX : Modélisation dynamique du MAD : rôle de l'inoculum .....	80
3.1	Introduction .....	80
3.2	Fractionnement de la matière organique (populations microbiennes et substrats) ...	82
3.3	Etude théorique de l'effet de la composition en biomasses actives sur la stabilité du digesteur lors du démarrage d'une installation .....	84
3.4	Conclusion de la partie 2.....	88

4	Conclusion du chapitre III .....	88
Chapitre IV. Utilisation de la modélisation dynamique pour l'étude de l'influence d'un procédé TAD ou TAR sur les dynamiques des activités microbiennes anaérobies .....		
1	Introduction .....	90
2	Partie 1 : Etude du procédé MAD-TAD .....	91
2.1	Présentation du procédé couplé MAD-TAD (modèle physique) .....	91
2.2	Résultats du modèle ADM1_B pour la modélisation du MAD-TAD .....	91
2.3	Voies d'optimisation du modèle ADM1_B .....	92
2.4	Propositions de modifications des activités microbiennes liées au passage dans le TAD .....	94
2.4.1	Enoncé des hypothèses mécanistiques .....	94
2.4.2	Description des scénarios de simulation .....	96
2.5	Simulations selon l'hypothèse 1 : désactivation de toutes les populations dans le compartiment TAD .....	97
2.5.1	Scénario S1 .....	97
2.5.2	Scénario S2 .....	98
2.5.3	Influence de la fréquence de traitement par le TAD .....	99
2.6	Simulations selon l'hypothèse 2 : shift entre populations Thermosensibles (Ts) et populations Thermorésistantes (Tr) .....	100
2.6.1	Scénario S3 .....	100
2.6.2	Scénario S4 .....	102
2.6.3	Scénario S5 .....	103
2.7	Conclusion .....	106
3	Partie 2 : Etude du procédé MAD-TAR .....	107
3.1	Présentation du modèle physique du procédé couplé MAD-TAR .....	107
3.2	Plan de l'expérience pour la modélisation du procédé couplé MAD-TAR .....	108
3.3	Eléments bibliographiques .....	109
3.3.1	Scénario S6 : production de biogaz dans le TAR ? .....	109
3.3.2	Scénario S7 : Une biodégradation aérobie dans le TAR ? .....	111
3.4	Conclusion sur le MAD-TAR .....	117
4	Conclusion du chapitre IV .....	118
Chapitre V. Etude de l'effet des couplages MAD-TAD et MAD-TAR sur la dégradation de micropolluants organiques et sur l'écotoxicité .....		
1	Introduction .....	120
2	Performances des procédés pour l'abattement des micropolluants .....	120
2.1	Caractéristiques de l'intrant .....	120

2.2	Taux d'abattement dans les trois campagnes continues.....	121
2.3	Partition des micropolluants.....	127
3	Caractérisations complémentaires des digestats.....	128
3.1	Effet des couplages MAD-TAD et MAD-TAR sur l'écotoxicité.....	128
3.2	Evaluation de l'antibiorésistance des digestats.....	131
3.2.1	Résultats des mesures d'intégrons.....	131
3.2.2	Résultats de caractérisation des résistomes dans les digestats.....	132
4	Conclusion du chapitre V.....	133
	Conclusion et perspectives.....	135
	Références.....	138
	Annexe 1 : Cométabolisme.....	152
	Annexe 2 : Modèle ADM1.....	155
	Annexe 3 : Effet de recirculation sur les résultats de simulation.....	156
	Annexe 4 : Etude de l'hydrolyse dans le MAD-TAD.....	157
	Annexe 5 : Calcul de la concentration d'azote ammoniacale.....	158
	Annexe 6 : Evaluation de l'écotoxicité des différentes boues.....	158
	Annexe 7 : Méthodes d'évaluation de l'antibiorésistance des digestats.....	160

## Nomenclature

Nomenclature	Description	Unité
STEP	Station d'épuration	
Micropolluants organiques	MPs	
DCO <sub>s</sub>	DCO soluble	$g_{DCO}/L$
DCO <sub>t</sub>	DCO total	$g_{DCO}/L$
DCO <sub>p</sub>	DCO particulaire	$g_{DCO}/L$
S <sub>va</sub>	Concentration totale de valérate	$g_{DCO}/L$
S <sub>prop</sub>	Concentration totale de propionate	$g_{DCO}/L$
S <sub>aa</sub>	Concentration totale d'amino acides	$g_{DCO}/L$
S <sub>ac</sub>	Concentration totale d'acétate	$g_{DCO}/L$
S <sub>bu</sub>	Concentration totale de butyrate	$g_{DCO}/L$
X	Concentration en cellules actives	$g_{DCO}/L$
<b>X<sub>Inoc</sub></b>	L'ensemble des organismes (biomasse microbienne) dans l'inoculum externe	$g_{DCO}/L$
<b>X<sub>A</sub></b>	L'ensemble des organismes (biomasse microbienne) dans l'alimentation	$g_{DCO}/L$
<b>X<sub>hy</sub></b>	Population hydrolytique	$g_{DCO}/L$
X <sub>aa</sub>	Organismes qui dégradent les amino acides	$g_{DCO}/L$
X <sub>ac</sub>	Organismes acétoclastes qui dégradent l'acide acétique (méthanogène)	$g_{DCO}/L$
X <sub>sao</sub>	Bactéries syntrophiques oxydantes d'acétate	$g_{DCO}/L$
X <sub>c4</sub>	Organismes qui dégradent butyrate et valérate	$g_{DCO}/L$
X <sub>fa</sub>	Organismes qui dégradent les acides gras à longue chaîne	$g_{DCO}/L$
X <sub>H2</sub>	Organismes qui dégradent le dihydrogène (méthanogène)	$g_{DCO}/L$

$X_{prop}$	Organismes qui dégradent le propionate	$g_{DCO}/L$
$X_{su}$	Organismes qui dégradent les monosaccharides	$g_{DCO}/L$
$X_{anaérobie}$	L'ensemble des organismes anaérobies	$g_{DCO}/L$
$X_{z_{ts}_i}$	Population 'z' thermosensible dans le scenario 'i'	$g_{DCO}/L$
$X_{z_{tr}_i}$	Population 'z' thermorésistante dans le scenario 'i'	$g_{DCO}/L$
$X_c$	Matière organique complexe	$g_{DCO}/L$
$X_0$	Quantité initiale de microorganismes	$g_{DCO}/L$
$I_{ac.X_{c4}}$	Inhibition de l'acétate sur les bactéries qui consomment butyrate et valérate ( $X_{c4}$ )	-
$K_{i_{O_2_X_{H_2}}}$	Constant d'inhibition de l'oxygène sur les hydrogénotrophes	$g_{DCO}/L$
$S$	Concentration du substrat dans la sortie	$g_{DCO}/L$
$S_e$	Concentration du substrat en entrée	$g_{DCO}/L$
$Y$	Rendement de production de cellule	$g_{DCO\ cellule}/g_{DCO\ substrat}$
$V$	Volume du réacteur	L
$\gamma_{hydrolyse}$	Rendement d'élimination de $DCO_p$ par rapport à $DCO_t$ entrée en cumulé	$g_{DCO\_hydrolysée}/g_{DCO\_entrée\ en\ cumulé}$
$\gamma_{CH_4}$	Rendement de production de méthane par rapport à $DCO_t$ entrée en cumulé	$g_{DCO\_CH_4}/g_{DCO\_entrée\ en\ cumulé}$
$\gamma_{élimination}$	Rendement d'élimination de $DCO_t$ dans le réacteur par rapport à $DCO$ entrée en cumulé	$g_{DCO\_éliminée}/g_{DCO\_entrée\ en\ cumulé}$
TAN	Somme de la concentration d'ammoniac et d'ammonium	mgN/L
FA	Concentration d'azote ammoniacale	mgN/L
SRT	Temps de séjour de boue	jour
Alim	Alimentation (boue ayant subi une acidogénèse)	

Inoculum externe	Inoc	
exp	Expérimental	
AGV	Acide gras volatil	
j		jour

## Introduction générale

La gestion et la valorisation des boues, sous-produit du traitement des eaux dans les stations d'épuration, constituent un défi majeur aujourd'hui. La grande quantité de boues produites, ainsi que la présence d'agents pathogènes et de micropolluants (MPs) adsorbés, soulèvent des problématiques importantes d'impacts sur les milieux et de risques sanitaires en particulier lorsqu'une valorisation agronomique des boues est envisagée.

La ville concentre les utilisations de molécules chimiques qui se retrouvent dans nos eaux usées et sont rejetées dans les milieux aquatiques avec de forts impacts sur le monde vivant. La problématique des micropolluants des eaux usées est donc particulièrement cruciale.

Face à ce défi, l'Union Européenne réfléchit à des moyens de lutter efficacement contre ces micropolluants (exemple : stratégie européenne de durabilité sur les produits chimiques, 2020). La Commission européenne a très récemment dévoilé sa proposition de révision de la directive sur les eaux résiduaires urbaines, attendue depuis la fin de l'année dernière (Directorate-General for Environment, 2022). Entre autres, figurent au programme : neutralité énergétique, micropolluants.

En France, c'est au travers du plan national santé-environnement que ce problème est pris en compte depuis plus de dix ans.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet SAVE (financé par l'ADEME, la Région Occitanie ainsi que les agences de l'eau Adour Garonne et Rhône Méditerranée Corse) qui propose des procédés avancés pour le traitement des eaux et des boues (cf. Figure 1). Ce programme propose d'évaluer une nouvelle filière de traitement des eaux usées qui, outre l'élimination de la pollution conventionnelle, cible l'élimination des micropolluants et de l'antibiorésistance tout en maximisant la production d'énergie par méthanisation. Dans ce programme, notre recherche s'est focalisée sur les performances de la digestion anaérobie.

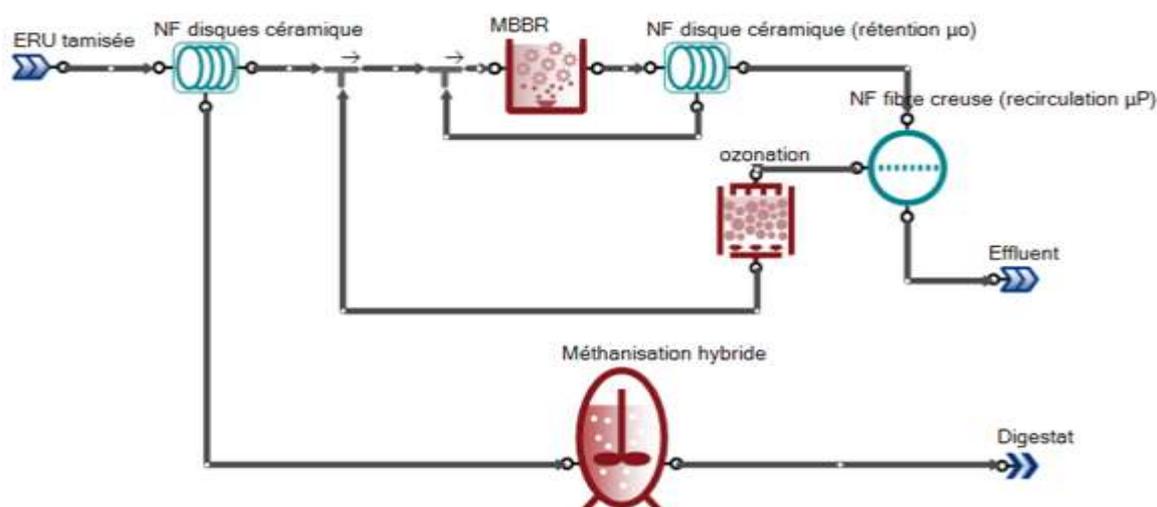


Figure 1. Schéma du projet SAVE

Si les recherches entreprises pour évaluer et améliorer l'élimination des micropolluants dans les filières « eau » sont nombreuses, le devenir des micropolluants dans les filières « boues » n'est que très peu étudié.

La digestion anaérobie offre un potentiel significatif pour réduire le volume de boues et éliminer les micropolluants (Gonzalez-Salgado et al., 2020). De plus, le biogaz, produit lors de la digestion anaérobie, est un sous-produit valorisable pouvant être injecté dans le réseau de gaz naturel ou utilisé comme carburant. La *Loi de Transition Énergétique pour la Croissance Verte* (LTECV) a fixé un objectif: atteindre 10 % de la consommation de gaz d'origine renouvelable d'ici 2030 (Jan et al., 2023).

Toutefois, la digestion conventionnelle (MAD : mesophilic anaerobic digester) ne parvient pas à hydrolyser l'ensemble de la matière organique particulaire, ni à biodégrader efficacement les micropolluants organiques. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux procédés de digestion, plus performants sur le plan des capacités de dégradation aussi bien de la matière organique particulaire que des micropolluants organiques. En contrat CIFRE avec l'entreprise SAPOVAL, nous avons proposé d'évaluer les performances d'un procédé hybride prometteur, le MAD-TAR, couplant une digestion conventionnelle mésophile (MAD) à un réacteur thermophile aéré (TAR).

Les procédés de digestion anaérobie thermophiles et/ou hybrides (qui associent un MAD à un digesteur thermophile aéré (TAR)) ont montré des améliorations concernant l'hydrolyse de la matière organique particulaire ainsi que l'élimination de certains micropolluants, bien que cela ne se traduise pas par une augmentation de la production de biogaz (Dumas et al., 2010; Gonzalez-Salgado et al., 2020).

Les études approfondies sur ces procédés hybrides manquent. Les raisons des performances observées sont méconnues. Par exemple, il demeure incertain si les améliorations de biodégradation des matières volatiles en suspension (MVS) et des micropolluants organiques sont attribuables à la température élevée et/ou à la présence d'oxygène dans le TAR. De plus, les phases de démarrage des procédés peuvent conduire à des accumulations d'acides gras volatiles et des dysfonctionnements. Il est donc important de comprendre l'influence du procédé hybride, ici le traitement thermophile aéré, sur les populations microbiennes et leurs activités. L'origine de la dégradation de certains micropolluants, observées dans l'étude de Gonzalez et al. (2020) n'est pas déterminée.

L'objectif de cette étude est donc d'apporter des connaissances sur le fonctionnement de ce procédé MAD-TAR. Nous examinerons et dissocierons l'impact de la température et de la microaération sur l'hydrolyse de la matière particulaire, la production de biogaz, ainsi que sur la mise en régime, qui englobe la dynamique des populations et la stabilité des réacteurs, et enfin sur la biodégradation des micropolluants.

Il convient de noter que notre étude se base sur une boue mixte ayant subi une étape de fermentation (acidogénèse), ce qui nous permettra de confronter nos résultats avec les observations issues d'études antérieures menées sur un autre type de boue.

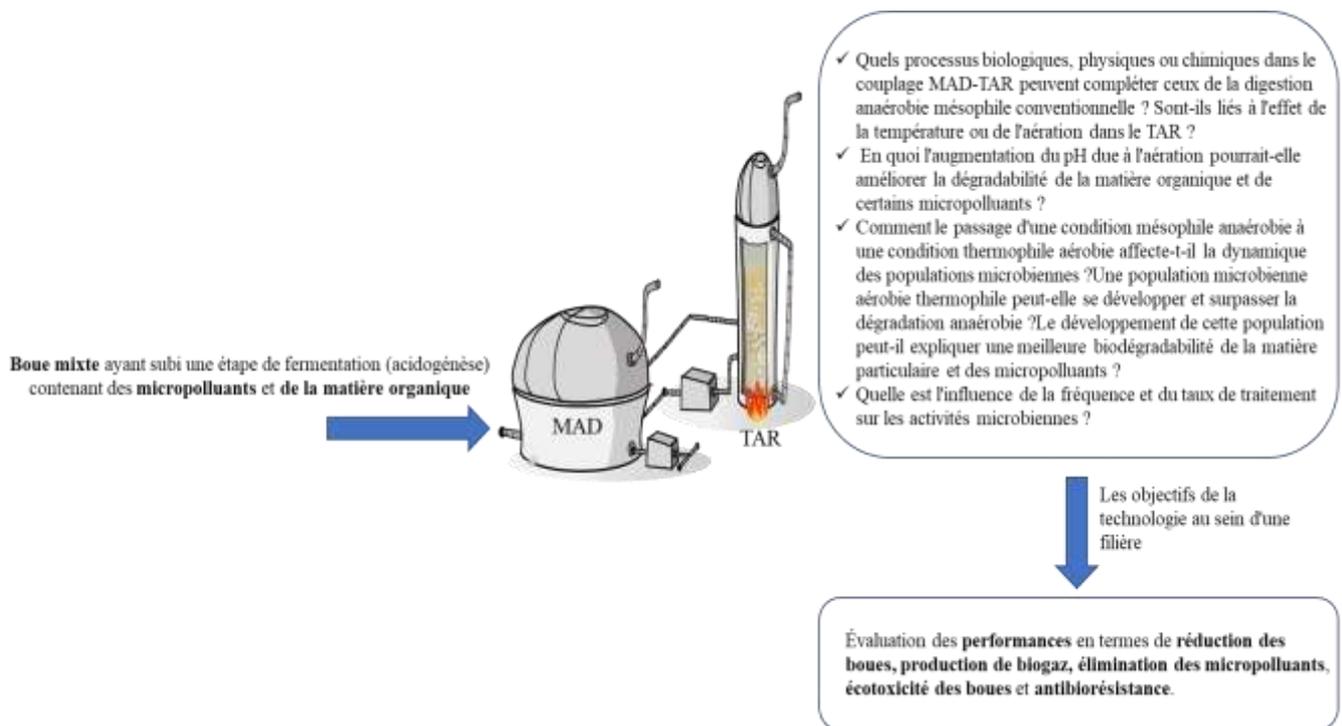
Notre étude s'agira donc :

- D'étudier la dégradation de micropolluants dans une technologie de digestion anaérobie couplée à un réacteurs aérobie thermophile. L'idée sous-jacente est que des processus

biologiques, physiques ou chimiques agissent de manière complémentaire à ceux présents en digestion anaérobie mésophile conventionnelle. Par exemple, des activités enzymatiques spécifiques des conditions thermophiles aérobies pourraient avoir lieu. De même, une augmentation du pH liée à l'aération pourrait avoir une action particulière sur la matière et améliorer la dégradabilité de certains micropolluants.

- D'analyser également l'élimination de l'antibiorésistance.

Avant d'aborder ces deux points, nous avons voulu comprendre le rôle du réacteur couplé (thermophile aérobie) sur les activités microbiennes. Nous nous sommes focalisés sur un point qui nous a paru très intéressant : l'influence d'un passage séquentiel d'une condition mésophile anaérobie à une condition thermophile aérobie sur la dynamique de population. Une population microbienne aérobie thermophile se développe-t-elle ? Prend-elle le dessus sur la dégradation anaérobie ? Son développement permet-il d'expliquer une biodégradabilité accrue de la matière particulaire et des micropolluants ? Y a-t-il d'autres mécanismes à prendre en compte ? Quelle influence de la fréquence de traitement et du taux de traitement sur les activités microbiennes ? La Figure 2 présente un résumé des questions scientifiques ainsi que l'applicabilité de notre étude au sein d'une filière.



**Figure 2. Résumé des questions scientifiques ainsi que l'applicabilité de notre étude au sein d'une filière**

Pour répondre à ces questions, l'approche s'est basée, tout d'abord, sur un travail expérimental sur des pilotes de laboratoire de taille significative (50 L). Ensuite, une modélisation des procédés utilisés dans différentes configurations a été développée. Cette modélisation a été utilisée pour simuler des hypothèses différentes de comportement des populations microbiennes vis-à-vis de la température et de l'aération.

L'organisation de ce travail de thèse est classique et comprend une revue de la littérature se focalisant notamment sur les réacteurs hybrides de digestion anaérobie et sur les mécanismes autour de la dégradation des micropolluants. A la suite du matériel & méthodes, la partie résultats sera découpée en trois chapitres : un premier, dédié à la présentation des résultats expérimentaux obtenus en pilotes, discute les performances de digestion de la matière observées pour trois configurations MAD, MAD-TAD et MAD-TAR. Un début de modélisation permet de représenter la référence MAD et d'étudier l'influence de l'inoculum sur la dynamique des variables étudiées. Le deuxième s'intéresse à étudier, en se basant sur l'outil de modélisation développé, différentes hypothèses de comportement des populations microbiennes sous contrainte d'un traitement séquentiel thermophile (et aérobie). Enfin, le troisième se focalisera sur l'étude de l'élimination des micropolluants pour les trois configurations de procédés. La conclusion synthétisera les résultats obtenus.



## **Chapitre I. Bibliographie**

# 1 Introduction

Le traitement des eaux usées produit à la fois une eau épurée et un résidu appelé « boues ». En 2016, les STEP françaises ont produit environ 1 million de tonnes de boues (en matière sèche), soit environ 7 à 8 millions de tonnes de matières brutes (Floriat, 2022). Elles sont généralement très riches en matières organiques (50 à 70% de la matière sèche) ce qui en font une matière valorisables que ce soit pour de la production de l'énergie renouvelable comme pour amender sols sous réserve de pré-traitement appropriés (Couturier, 2014). Ainsi, la digestion anaérobie est une solution qui permet de gérer les boues tout en les valorisant sous forme de biogaz, contribuant ainsi à réduire le réchauffement climatique. La méthanisation réduit de 40 % en moyenne les quantités de boues à traiter (Couturier, 2014).

Par ailleurs, les micropolluants organiques (MPs) adsorbés sur les boues sont devenus un problème ces dernières années en raison du risque qu'ils présentent sur l'environnement et sur la santé humaine. En effet, on les retrouve fréquemment dans les eaux usées à de faibles concentrations (de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$ ) et, certains d'entre eux étant hydrophobes, ils peuvent se retrouver dans la fraction de boue (Delgadillo-Mirquez et al., 2011). De nombreuses études ont mis en évidence que nombreuses sont les molécules qui, même à faibles concentrations, peuvent présenter des effets toxique, génotoxique, de perturbateurs endocriniens, etc. (Ben et al., 2018; J.-L. Liu & Wong, 2013). Leurs émissions sont d'origine agricole, industriel ou encore domestique. Un des objectifs de la thèse est d'améliorer la biodégradation des MPs au cours du traitement des boues.

Les procédés de méthanisation hybride, qui comprennent des techniques telles que le prétraitement thermique, le couplage avec un compartiment microaéré et thermophile, entre autres, sont devenus intéressants ces dernières années en raison de leurs améliorations dans la réduction des boues, la production de biogaz et la biodégradation des micropolluants.

Cependant, les micro-organismes responsables de la production de biogaz peuvent être inhibés dans certaines conditions et sont sensibles à certains composés tels que les acides gras volatils (AGV) et l'ammoniac. L'accumulation d'AGV a été identifiée comme l'une des principales causes de défaillance des digesteurs thermophiles en raison d'une diminution du pH qui inhibe l'activité méthanogène (Ryue et al., 2020). L'un des objectifs de ce chapitre bibliographique est d'identifier les conditions d'inhibition dans les digesteurs anaérobies.

En outre, la digestion anaérobie est un processus complexe impliquant divers microorganismes et réactions intermédiaires. La modélisation constitue un outil précieux pour approfondir notre compréhension des mécanismes induits par les conditions opératoires de notre étude. Toutefois, le modèle ADM1, présenté par Batstone (2002), présente des limitations dans l'analyse des procédés de méthanisation hybride (e.g. les couplages MAD-TAD et MAD-TAR dans lesquels les boues circulent séquentiellement dans un réacteur associé à un temps de rétention solide (SRT) réduit et à des températures élevées, avec ou sans oxygène). Ce chapitre vise également à identifier les points d'amélioration possibles pour le modèle ADM1. Cela nous permettra d'explorer, dans le chapitre IV, la dynamique des populations microbiennes au sein des couplages MAD-TAD et MAD-TAR à travers la modélisation des différents scénarios.

En ce qui concerne les micropolluants, ils sont généralement considérés biodisponibles (i.e. librement disponible pour traverser une membrane cellulaire de l'organisme pour être biodégradé) lorsqu'ils sont situés dans la phase aqueuse, c'est-à-dire adsorbés à la matière

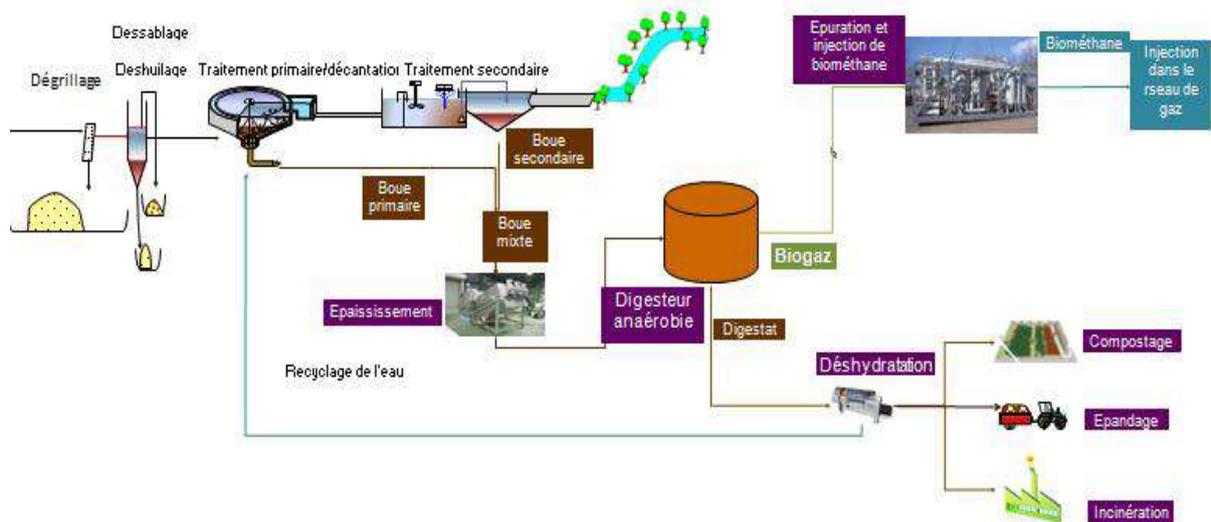
colloïdale et dissoute (DCM) ou bien dissous (Maialen Barret et al. 2010 ; Delgadillo-Mirquez et al. 2011). Ainsi, il est essentiel de comprendre les mécanismes de sorption qui régissent la répartition des composés entre les différentes phases et leur relation avec la biodégradation. De plus, les mécanismes de biodégradation des MPs, tels que le rôle des populations microbiennes, les réactions enzymatiques et le phénomène du cométabolisme (cf. Annexe 1 : Cométabolisme), font également l'objet d'études. Il convient de noter que l'effet de la température et de la présence d'oxygène sur la sorption et la biodégradation des MPs est également étudié.

## 2 Contexte des boues et de la digestion anaérobie dans le traitement des eaux

### 2.1 Diversité des boues d'épuration, traitements et destination finale

En France, on compte plus de 22 700 stations de traitement des eaux usées qui représentaient en 2022 une capacité épuratoire de 105,8 millions d'EqH (Cellarier, 2022). Diverses catégories de boues sont générées au sein des filières de traitement des eaux usées et sont présentées (cf. Figure 3) :

- 1) Boues primaires résultant de la décantation primaire.
- 2) Boues secondaires résultant du traitement biologique.
- 3) Boues mixtes : mélange entre les boues primaires et secondaires.
- 4) Les boues tertiaires issues d'un traitement généralement physico-chimique des effluents contenant des colloïdes et matières réfractaires



*Figure 3. Schéma d'une station d'épuration et des différents types de boues produites (Theobald, 2014)*

Les stations d'épuration française produisent ainsi plus d'un million de tonne de boues (en matière sèche) dont les destinations finales se répartissent en trois catégories :

- 1) Le retour au sol, que ce soit par épandage agricole ou utilisation de compost comme amendement organique

2) Incinération

3) Mise en décharge dans les installations de stockage de déchets (ISD). Cette solution reste très minoritaire et utilisée dans le cas de non conformités ou de problèmes sur les autres filières de gestion des boues

D'après les données disponibles (Syprea, 2016), la valorisation agricole concernerait environ 73 % du tonnage des boues totales, suivi par l'incinération (18%) et la mise en décharge des boues (9%).

La digestion anaérobie, ou méthanisation, est généralement la première phase de traitement des boues (décantées et/ou épaissies) quelle que soit la destination finale (voir la Figure 4).

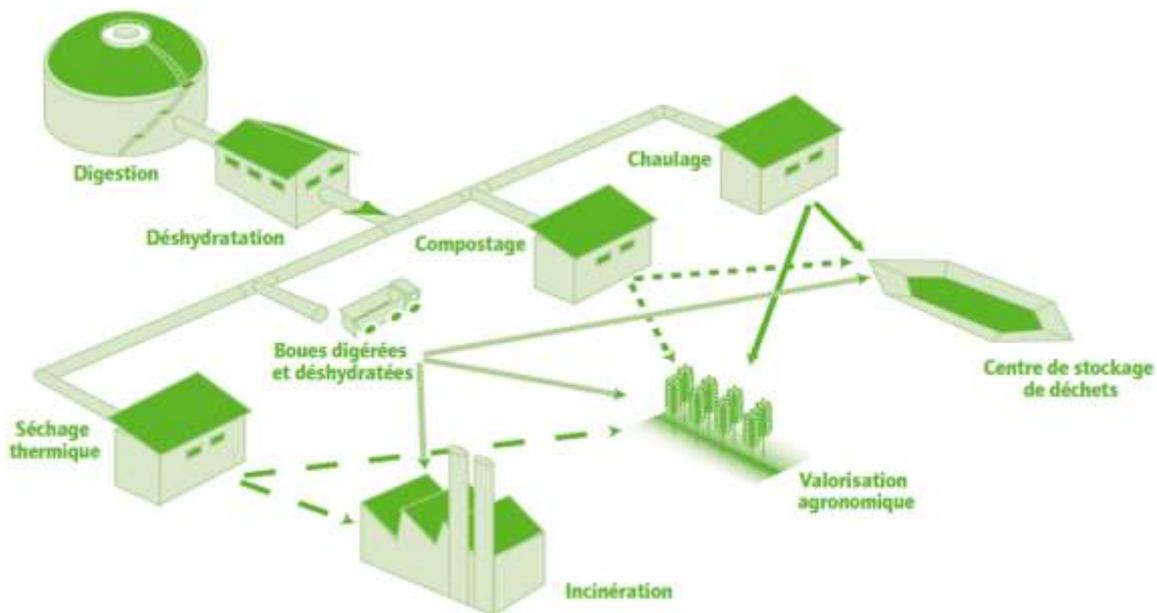


Figure 4. Etapes du traitement des boues (Couturier, Berger, et Meiffren 2001)

## 2.2 Focus sur la digestion anaérobie

### 2.2.1 Principes

La digestion anaérobie, ou méthanisation, est un procédé constitué de 4 étapes principales (Figure 5): hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse, méthanogénèse. Cet enchainement de processus biologiques anaérobies permet la conversion de la matière organique en biogaz composé majoritairement de méthane ainsi qu'en un sous-produit valorisable : le digestat (Couturier, 2014).

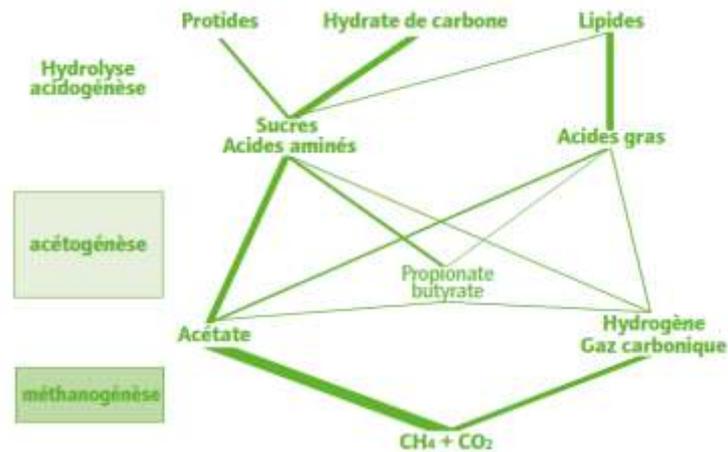


Figure 5. Etapes de la digestion anaérobie (Couturier et al., 2001)

Durant la première étape, les bactéries hydrolytiques convertissent la matière organique en monomères plus simples, comme les sucres simples, les acides aminés ou encore les acides gras. Lors de l'acidogénèse, les monomères préalablement formés sont transformés en acides gras volatils (AGV), acides organiques et alcools qui sont à leur tour utilisés par les bactéries acétogènes pour produire de l'acétate, de l'hydrogène et du  $\text{CO}_2$ . Finalement des bactéries acétoclastes et hydrogéntrophes utilisent ces composés pour former du méthane.

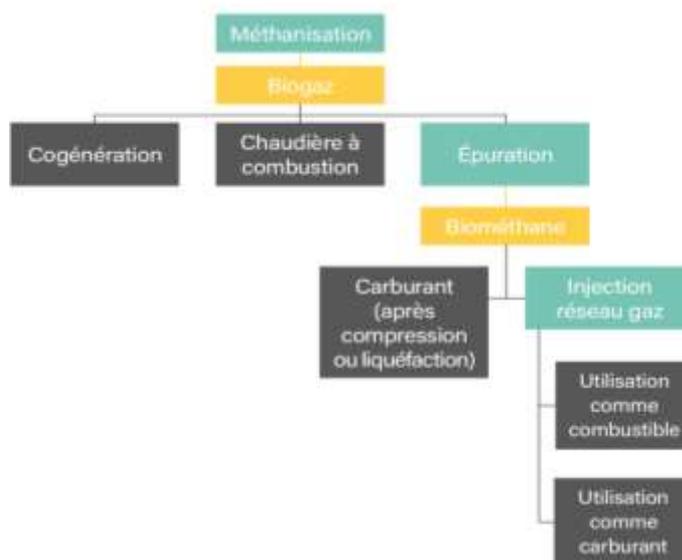
### 2.2.2 Intérêts de la méthanisation

Il semble pertinent de promouvoir l'utilisation des boues d'épandage en agriculture, en conformité stricte avec les réglementations en vigueur, tout en assurant la préservation de l'environnement et la protection de la santé publique. Dans ce cadre, la digestion anaérobie avant épandage présente des impacts positifs significatifs (Couturier et al., 2001):

- 1) Réduire les nuisances olfactives et les agents pathogènes.
- 2) Rendre des boues plus riches en éléments fertilisants comme le phosphore, le calcium et azote.
- 3) Avoir un bilan de gaz à effet de serre en général positif par rapport aux émissions des déjections brutes du fait du ratio gaz à effet de serre évités/gaz à effet de serre générés de l'ordre de 5 à 10 (Couturier, 2014)

La méthanisation permet également de réduire les quantités de boues à gérer et donc des économies substantielles en termes de transport et par là même d'impact environnemental.

La méthanisation, en plus de la valorisation agronomique, permet de réaliser une valorisation énergétique. En effet, le biogaz produit est composé généralement de méthane ( $\text{CH}_4$ , 65% environ) et de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ , 35% environ) et des traces de l'hydrogène sulfuré ( $\text{H}_2\text{S}$ , 0,4% environ, gaz toxique, corrosif). Le pouvoir calorifique Inférieur (PCI) du biogaz est  $23,3 \text{ MJ/Nm}^3$  (Couturier et al., 2001) et diverses voies de valorisation, nécessitant une épuration plus ou moins poussées sont alors envisageables comme présentées sur la Figure 6.



**Figure 6. Voies de valorisation du biogaz (Jan et al., 2023)**

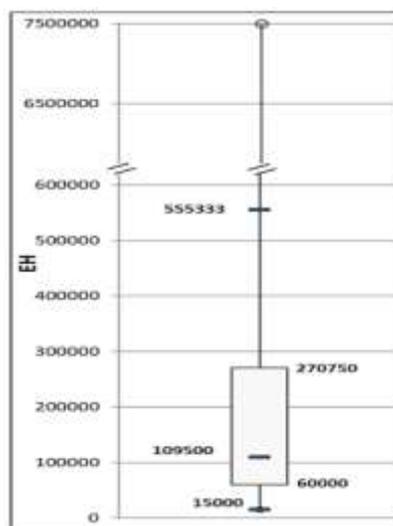
En 2014, l'ANSES a permis l'autorisation de l'injection dans le réseau GRDF de biométhane produit sur les STEP, ce qui a favorisé le développement de projets de méthaniseurs de boues urbaines (Thomann, 2020). La Figure 7 présente cette évolution au cours des dernières années et en janvier 2024, ce sont 47 STEP concernées pour une capacité de production de 565 GWh/an (Jan et al., 2023).



**Figure 7. Evolution du nombre de STEP en injection et capacité totale d'injection de biométhane de 2015 à 2023 (Jan et al., 2023).**

Par comparaison, selon les *Chiffres clés des énergies renouvelables – Édition 2023* publiés par le Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires (2023), la consommation française d'énergie renouvelable en 2022 était de 345 TWh soit 20,7% de la consommation globale. On voit donc que la méthanisation a un rôle à jouer pour atteindre l'un des objectifs de la loi relative à l'énergie et au climat de 2019 qui fixe à 33% la part d'énergies renouvelables. Selon un article publié par SEFE Energy (2020), les boues de STEP ne concernent qu'une faible proportion des intrants de méthaniseurs (7% en 2017, (Sefe, 2020)) et leur contribution à la production d'énergie renouvelable pourrait donc augmenter sous réserve d'améliorer les performances des méthaniseurs et d'abaisser ainsi le seuil de rentabilité de telles installations. Dans les faits, la capacité nominale moyenne des stations équipées de digesteur

en France est de 109500 eqH comme illustré sur la Figure 8. Pour abaisser ce seuil, une orientation du flux de matière organique entrant dans les STEP vers la file boue peut être un levier et l'un des lots du projet SAVE porte sur un traitement primaire avancé qui pourrait augmenter significativement ce flux.



*Figure 8. Capacités nominales des stations équipées de digesteurs pour les stations recensées en France en 2019 (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, 2021).*

### 3 Défis de la digestion anaérobie

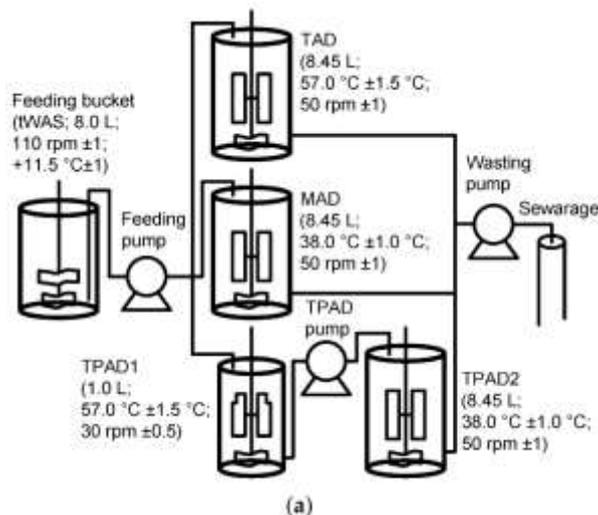
Une part significative des éléments constitutifs d'une boue, qu'elle soit primaire, secondaire ou mixte, reste réfractaire à toute attaque biologique. En effet, les substrats à hydrolyser doivent subir des processus qui sont liés à leur structure chimique, mais aussi à leur disponibilité souvent réduite du fait de la conformation sous forme de floccs des boues. Ainsi, des prétraitements sont proposés pour favoriser la dégradation. Ils peuvent être mécaniques (broyage, ultrasons), chimiques (variation de pH ou utilisation d'oxydants chimiques) ou encore thermiques mais peuvent parfois générer la formation de composés réfractaires dont l'impact environnemental reste à évaluer. Une autre stratégie consiste à la mise en place de procédés hybrides (cf. §3.1) visant à améliorer l'hydrolyse que ce soit par des effets physiques (solubilisation directe) ou biologique via le développement de biomasse, et par là-même de capacités enzymatiques, complémentaires. Dans tous les cas, cela nécessite l'implantation d'une flore bactérienne équilibrée, et les instabilités susceptibles d'intervenir dans des procédés doivent faire l'objet d'une attention particulière.

#### 3.1 Procédés de digestion anaérobies avancés

Pour améliorer la dégradation de la matière difficilement dégradable dans le processus de méthanisation, l'une des approches consiste à utiliser un prétraitement ou à combiner le digesteur avec un autre procédé. Le Tableau 1 présente une synthèse des approches rencontrées dans la littérature récente.

**Tableau 1. Procédés de digestion anaérobies avancés**

Procédé	Substrat	Avantages/inconvénients	Référence
TAD, TPAD et MAD (voir la Figure 9)	Boue activée	Réduction de boue : TPAD 5% meilleur que TAD et 6% meilleur que MAD Déshydratabilité : 8,1–9,8% moins bonne que TAD et 6,2–12,0% meilleure que MAD	(Lanko et al., 2021)
MAD avec micro-aération	-	Favoriser la diversité et l'abondance des bactéries hydrolytiques en général. Ces bactéries sécrètent davantage d'enzymes hydrolytiques extracellulaires telles que les cellulases, xylanases et lipases, ce qui conduit finalement à une meilleure hydrolyse de biomasses complexes comme la lignocellulose et les lipides.	(S. Fu et al., 2022)
Le couplage d'un réacteur anaérobie avec un réacteur thermophile micro-aéré (MAD-TAR)	Boue secondaire	Une amélioration significative du rendement de dégradation de la matière organique, avec une amélioration de 9,1 % en termes de DCO <sub>t</sub> par rapport au digesteur mésophile conventionnel (MAD).	(Dumas et al., 2010)
MAD-TAR	Boue primaire	Une amélioration significative du rendement de dégradation de la matière organique d'une boue primaire, avec une amélioration de 26,2 % en termes de DCO <sub>t</sub> par rapport au digesteur mésophile conventionnel (MAD). En outre, l'élimination de certains MPs a également été améliorée. Par exemple, Oxazépam et Ofloxacine ont été dégradé 25% et 35% plus dans le MAD-TAR par rapport au MAD.	(Gonzalez-Salgado et al., 2020)
AD avec ozonation (Batch)	Un mélange de boues primaires et secondaires	L'injection d'ozone dans un digesteur anaérobie à hauteur d'environ 10 mgO <sub>3</sub> /VS peut rendre la matière organique difficilement dégradable accessible aux microorganismes	(Catenacci et al., 2022)
Bioréacteur à membrane anaérobie (AnMBR)	Déchets alimentaires	Ce procédé maintient la biomasse microbienne dans le digesteur, tandis que la phase liquide des effluents s'écoule à travers la membrane, augmentant ainsi le temps de séjour de biomasse microbienne. Un problème majeur est le colmatage de la membrane	(Jiang et al., 2021)



*Figure 9. Schéma de l'étude de Lanko et al. 2021*

Dans le Tableau 1, on observe que la digestion anaérobie en régime thermophile, qu'elle soit réalisée en présence de microaération ou non, et en combinaison avec un digesteur conventionnel (TPAD et MAD-TAR) ou non, peut conduire à des améliorations en termes de réduction des boues et/ou de déshydratabilité du digestat.

Cette thèse se concentre sur l'étude des combinaisons MAD-TAR et MAD-TAD avec en particulier l'ambition d'évaluer les contributions respectives de l'aération et de la température sur les rendements observés. Toutefois, les phases de démarrage de ces procédés ne sont pas détaillées dans les études référencées. Pour bien étudier les procédés hybrides avancés présentés dans cette thèse, il est également crucial d'étudier les facteurs susceptibles d'affecter la dynamique des populations microbiennes et donc la stabilité et la fiabilité du procédé de méthanisation.

### **3.2 Stabilité de fonctionnement**

Les microorganismes méthanogènes sont sensibles et peuvent être inhibés par l'accumulation d'AGVs, un pH non optimal et par une concentration d'ammoniac trop élevée :

- Le propionate et l'acétate ont un effet toxique et inhibiteur sur les méthanogènes, en particulier les acétoclastes (Yuan & Zhu, 2016). L'accumulation d'acétate et de propionate est souvent observée dans les digesteurs thermophiles instables. La principale raison invoquée dans la revue bibliographique de (Ryue et al., 2020) pour expliquer l'instabilité des digesteurs anaérobies thermophiles est l'utilisation d'un inoculum non acclimaté aux conditions thermophiles. Cela met en évidence l'importance de la mise en route d'un digesteur anaérobie.
- Dans la revue bibliographique de (2020), la limite présentée avant la défaillance du digesteur était de 5 g/L d'acétate, de 0,9 g/L de propionate et de 600 mgN-NH<sub>3</sub>/L. Les seuils d'inhibition rapportés varient en fonction des conditions de fonctionnement. Cette revue nous présente les seuils d'inhibition de l'ammoniac rapportés pour la digestion anaérobie (voir le Tableau 2).

**Tableau 2. Résumé des seuils d'inhibition de l'ammoniac rapportés pour la digestion anaérobie thermophile (Ryue et al., 2020)**

Substrate	Operating mode/ temperature	TAN conc.	FAN critical conc.	Major findings/impacts	Reference
Pig manure	Semi-continuous/51 °C	4.6–11 g-N/L	1450 mg-N/L	50% inhibition of methanogenesis at 11.0 g NH <sub>4</sub> -N/L	Nakakubo et al. (2008)
Sewage Sludge	Continuous/55 °C	1-3 g-N/L	600 mg-N/L	Unstable methane production and COD removal at > 2 g TAN/L	Hidaka et al. (2013)
OFMSW	Continuous/55 °C	1.75–3 g-N/L	660 mg-N/L	Methane yield decreased by 63% at 432 mg-N/L of FAN	Karthikeyan et al. (2012)
Glucose	Batch/52 °C	2-7 g-N/L	620 mg-N/L	21% decrease in biogas production at 620 mg N/L of FAN	Siles, Brekelmans, Martín, Chica, and Martín (2010)
Slaughter-house wastes	Semi-continuous/55 °C	1.6–5.6 g-N/L	635 mg-N/L	50% inhibition of methane production at 5.6 g N/L	Bayr et al. (2012)
OFMSW	Batch/55 °C	1.7–5.6 g/L	468 mg/L	50% methane inhibition at specified TAN and FAN levels	Hadij, Astals, Gali, Mace, and Mata-Avarez (2009)
Non-fat dry milk	Continuous/55 °C OLR = 4 kg COD/m <sup>3</sup> -d	0.4–5.77 g/L	–	TAN of 4.92 and 5.77 g/L caused methane production to drop by 39% and 64%, respectively.	Sung and Liu (2003)
WAS	Semi-continuous/55 °C	Up to 7.6 g/L	–	Methane production ceased at 7.6 g TAN/L	Nakashimada and Ohshima (2008)
Paper and yard waste	Semi-continuous/54-60 °C	0.75–2.5 g-N/kg	–	50% reduction in CH <sub>4</sub> at 1.5 g-N/kg -Complete failure of digester at 2.5 g-N/kg	Kayhanian (1994)

- Les stratégies visant à atténuer les instabilités dans le processus de digestion anaérobie thermophile sont : 1) le développement d'un microbiome robuste 2) la codigestion de substrats complémentaires. 3) l'intégration de digesteurs avec l'amendement d'additifs conducteurs comme le charbon actif, le biochar, le graphène, les fibres de carbone, la magnétite, etc. Ces additifs améliorent le transfert d'électrons au sein des communautés microbiennes (Ryue et al., 2020). Cette stratégie est effectivement prometteuse, mais elle en est encore majoritairement au stade de la recherche.
- Un autre type d'inhibition est la limitation thermodynamique due à l'accumulation du produit réactionnel. Par exemple, les réactions de consommation du butyrate et du propionate peuvent être inhibées par les produits réactionnels tels que l'acétate et l'hydrogène (Li et al., 2020).

En résumé, le bon fonctionnement d'un méthaniseur repose sur un équilibre délicat entre les différentes populations microbiennes et la régulation des composés qui peuvent devenir toxiques en excès. Une accumulation de substances comme les AGV, l'ammoniac, l'hydrogène ou les sulfures peut affecter sévèrement les méthanogènes et les acétogènes, réduisant ainsi la production de méthane et perturbant l'ensemble du processus de méthanisation. Par conséquent, la prévision et la régulation des processus de digestion anaérobie sont essentielles pour optimiser la conception et le fonctionnement du système. Dans ce contexte, les outils de modélisation peuvent permettre de comprendre les processus mis en jeu dans les dynamiques de populations, de prédire la production de biogaz voire de proposer des voies d'optimisation des procédés de digestion anaérobie.

### 3.3 Modélisation de la digestion anaérobie

L'objectif de cette section est d'étudier les bases de la modélisation pour les digesteurs anaérobies hybrides. Pour cela, nous partirons du modèle ADM1 proposé pour la digestion conventionnelle (Batstone, 2002). Ensuite, nous étudierons ses limites.

### 3.3.1 Modèle ADM1

Le modèle de digestion anaérobie n° 1 (ADM1) de l'International Water Association (IWA) est actuellement le modèle de digestion anaérobie structuré le plus couramment utilisé (D.J. Batstone, 2002). Le modèle ADM1 contient les processus de désintégration, d'hydrolyse, d'acidogénèse, d'acétogénèse et de méthanogénèse. Chaque population est modélisée avec des paramètres de croissance spécifiques (taux de croissance maximal, constante de demi-saturation, inhibition par l'ammoniac ou l'acidité, etc.) (voir Annexe 2 : Modèle ADM1). L'intrant est composé de diverses matières organiques (protéines, glucides, lipides, composés inertes) et leurs fractions correspondantes (solides particulaires ou solubles). De plus, ce modèle prend en considération les phénomènes suivants :

- 1) Processus liquide-liquide (processus rapide) : ADM1 prend en compte les équilibres chimiques entre les formes dissociées et non dissociées de certains composés (ammonium/ammoniac, bicarbonate/CO<sub>2</sub>) pour modéliser correctement les concentrations et le pH du milieu. Le pH est déterminé en utilisant la concentration de [H<sup>+</sup>] qui est recalculée en utilisant les équilibres chimiques acido-basiques. Cette estimation est importante puisque le pH affecte à la fois la solubilité du CO<sub>2</sub>, la concentration en ammoniac ainsi que l'activité microbienne.
- 2) Procédés liquide-gaz : ADM1 prend en compte leur transfert entre la phase liquide et la phase gazeuse, ce qui est essentiel pour estimer correctement les flux de biogaz (rapide/moyen)

Cependant ce modèle doit subir quelques modifications lorsque des substrats très différents de celui sur la base duquel il a été développé sont utilisés. En effet, le substrat utilisé dans ADM1, est principalement constitué de boues municipales primaires et secondaires avec une composition uniformément répartie en glucides, protéines et lipides. Selon la composition biochimique des substrats, les voies métaboliques impliquées ne sont pas entièrement identiques en raison de la nature des enzymes et des populations microbiennes impliquées. Pour les substrats de composition différente de celle des boues mixtes, le fractionnement du substrat en glucides, protéines et lipides est d'une importance primordiale pour la prédiction des métabolites produits lors de la digestion anaérobie.

### 3.3.2 Les limites et les extensions possibles pour le modèle ADM1

L'un des objectifs de cette thèse étant d'étudier la dynamique des populations microbiennes dans les couplages MAD-TAD et MAD-TAR, nous étudierons un résumé des extensions possibles pour le modèle ADM1 (voir le Tableau 3).

**Tableau 3. Résumé des modifications et extensions possibles pour le modèle ADMI**

1	Simplification effectuée dans ADM1	Modifications proposée	Référence
2	Les produits de désintégration dans l'ADM1 d'origine sont présentés sous forme de variables groupées ( $X_{ch}$ , $X_{pr}$ et $X_{ij}$ ), et ils sont également supposés être homogènes, avec une seule voie d'hydrolyse pour chacun d'eux	Séparer chaque produit de désintégration biodégradable en deux fractions, c'est-à-dire les fractions facilement biodégradables et les fractions lentement biodégradables	(Mo et al., 2023)
3	Le lactate et l'éthanol sont exclus de l'ADM1 en raison de leur faible production dans la plupart des systèmes AD	Intégrer ces produits intermédiaires dans le modèle	(Mo et al., 2023)
4	La réduction des nitrates ( $NO_3^-$ ) en oxydes d'azote et finalement en $N_2$ n'ont pas été pris en compte	Intégrer ces processus	(Mo et al., 2023)
5	Transformations du phosphore, du fer et du soufre n'ont pas été pris en compte	Afin d'optimiser le processus de microaération pour la désulfuration du biogaz, il faut intégrer un processus supplémentaire d'oxydation du sulfure en soufre élémentaire par des bactéries oxydant le sulfure.	(Mo et al., 2023)
6	Oxydation syntrophique de l'acétate ( $X_{SAO}$ ) n'est pas prise en compte	Intégrer cette voie possible en cas de concentrations élevées d'ammoniac ou de température élevée	(Mo et al., 2023)
7	L'activité ionique et l'appariement d'ions (à l'exception de l'appariement acide-base) n'ont pas été inclus.	Ajouter des processus comme $Na^+ + CO_3^{2-} \leftrightarrow NaCO_3^-$ et la formation de struvite $MgNH_4PO_4$	(Mo et al., 2023)
8	L'hydrolyse est supposée être des cinétiques de premier ordre, qui étaient indépendantes de l'activité microbienne et proportionnelles à la concentration du substrat	Pour les processus dans lesquels le substrat est complexe, la charge d'alimentation est élevée ou la concentration des enzymes hydrolytiques est inférieure aux sites d'adsorption accessibles (nécessitant une colonisation du substrat par les populations microbiennes). Dans ces conditions, l'hydrolyse ne peut pas être considérée d'ordre zéro par rapport au biomasse, comme dans le cas de l'ADM1 simple, et de nouvelles populations devraient être impliquées dans la désintégration et l'hydrolyse (modèle Contois).	(Vavilin et al., 2008)

9	Shifts de populations ne sont pas pris en compte dans des conditions particulières telles que le cas où la concentration en propionate est élevée	Han et al. (2020) ont effectué des tests en batch sur un substrat composé de mélange de déchets alimentaires et de fumier, dans lesquels des concentrations initiales de propionate différentes (entre 0,5 et 4,2 g/L) ont été ajoutées. Un changement de population d'acétoclastes (dans l'inoculum) à des hydrogénotrophes (à la fin du lot) a été observé. De plus, un temps de latence a été observé dans la production de biogaz, ce qui démontre l'effet inhibiteur du propionate sur les $X_{ac}$ .	(Han et al., 2020)
---	---	--	--------------------

Compte tenu des caractéristiques des boues d'alimentation et de notre procédé avec un réacteur thermophile couplé, nous avons pris en compte les propositions de modification des cas 3, 6, 8 et 9 pour les modélisations effectuées dans notre étude (cf. chapitre III et IV).

#### À retenir

Le contexte de la gestion des boues dans les STEP a été exposé. Il est évident que la part de l'énergie produite par la méthanisation est en augmentation, mais reste encore relativement faible par rapport aux autres sources d'énergies renouvelables. Les défis liés à la digestion anaérobie ont également été mis en avant. Ainsi, il est crucial d'approfondir la recherche sur les processus hybrides afin d'améliorer les performances de la digestion anaérobie et d'en accroître l'utilisation. La digestion avancée en MAD-TAR a montré des améliorations en termes de réduction des boues et de biodégradation des MPs. Cependant, les aspects liés à la mise en régime, à la stabilité et aux effets individuels de la température et de l'oxygène n'ont pas été suffisamment étudiés. Les modifications proposées dans la littérature pour le modèle ADM1 ont été résumées. Cela nous aidera à modéliser les couplages MAD-TAD et MAD-TAR.

## 4 Les micropolluants dans la file boues

Nous avons jusqu'à présent évoqué la valorisation (matière et énergie) des boues. Cependant, celles-ci contiennent également une grande variété de micropolluants dont la présence et les effets, y compris à faibles teneurs, peuvent remettre en question les voies de valorisation agricole. Comparée à la file eau, relativement peu d'études s'intéressent à leur devenir dans la file boue, qui est souvent écartée des bilans réalisés sur les STEP qui s'intéressent essentiellement aux rejets directs dans le milieu. Des études sur les micropolluants dans les STEP ont cependant montré leur forte présence dans les matrices boues (projet AMPERES 2006-2009, projet SMS 2014-2018). Actuellement, les boues contiennent donc une part non négligeable de la micropollution issue des effluents qui n'est aujourd'hui pas quantifiée (hormis pour les métaux qui le sont dans le cadre des plans d'épandage). Les résultats présents dans la littérature mettent en évidence une efficacité contrastée de la digestion anaérobie pour

abattre les micropolluants, avec des composés très bien dégradés comme le sulfaméthoxazole par exemple (Narumiya et al., 2013) alors que d'autres sont totalement réfractaires, à l'image de la carbamazépine (Gonzalez-Gil, Mauricio-Iglesias, Serrano, et al., 2018). Une valorisation optimale des boues nécessite cependant des améliorations dans le traitement et divers procédés sont développés dans ce sens. Pour ce faire il est nécessaire d'appréhender les facteurs clés dans le devenir des micropolluants ; la biodégradation est généralement reportée comme étant liée à la disponibilité de ceux-ci, aussi cette section va s'attacher à décrire les phénomènes de sorption ainsi que les mécanismes impliqués dans la biodégradation.

Dans le cadre du projet SAVE, 19 molécules de différentes propriétés physico-chimiques ont été sélectionnées (cf. Tableau 4). Les constantes de Henry correspondantes étant faibles la volatilisation est négligeable et ne sera pas évoquée dans la suite de ce travail.

*Tableau 4. Molécules sélectionnées dans le projet SAVE (PubChem)*

<b>Molécule</b>	<b>Catégorie</b>	<b>H<sub>H</sub> (Constante de Henry à 25 °C) (atm m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub></b>	<b>pK<sub>a</sub></b>
<b>Sulfaméthazine</b>	Santé (Antibiotique)	1,93×10 <sup>-10</sup>	0,14	2,65-7,65
<b>Sulfaméthoxazole</b>	Santé (Antibiotique)	6,4×10 <sup>-13</sup>	0,89	1,6-5,7
<b>Ofloxacin</b>	Santé (Antibiotique)		-0,39	5,97-9,28
<b>Ciprofloxacine</b>	Santé (Antibiotique)		0,28	6,16-8,62
<b>Erythromycine</b>	Santé (Antibiotique)		3,06	8,8
<b>Azithromycine</b>	Santé (Antibiotique)		4,02	8,5
<b>Carbamazépine</b>	Santé (excepte antibiotique)	1,1×10 <sup>-10</sup>	2,45	13,9
<b>Cyclophosphamide</b>	Santé (excepte antibiotique)	1,4×10 <sup>-11</sup>	0,63	
<b>Kétoprofène</b>	Santé (excepte antibiotique)		3,2	3,98
<b>Metformine</b>	Santé (excepte antibiotique)	7,6×10 <sup>-16</sup>		12,4
<b>Paracétamol</b>	Santé (excepte antibiotique)	8,9×10 <sup>-10</sup>	0,46	9,38
<b>Carbendazime</b>	Phytoprotecteurs	1,5×10 <sup>-12</sup>	1,52	4,2
<b>Chlorthalidon</b>	Phytoprotecteurs	1,4×10 <sup>-10</sup>	2,41	
<b>Imidaclopride</b>	Phytoprotecteurs		0,57	1,56-11,12
<b>Métaldéhyde</b>	Phytoprotecteurs	5,2×10 <sup>-5</sup>	0,12	
<b>Pirimicarbe</b>	Phytoprotecteurs	8,4×10 <sup>-10</sup>	1,7	4,53
<b>Propyzamide</b>	Phytoprotecteurs			
<b>Terbutylazine</b>	Phytoprotecteurs	2,3×10 <sup>-8</sup>	3,4	2,0
<b>Diuron</b>	Phytoprotecteurs	5,0×10 <sup>-10</sup>	2,68	

## **4.1 Sorption des micropolluants sur les boues**

### **4.1.1 Mécanismes de sorption**

La sorption des micropolluants sur les boues va régir la distribution et le devenir de ces substances dans les STEP. Elle désigne l'ensemble des mécanismes par lesquels les micropolluants sont fixés sur la phase solide des boues, incluant à la fois l'adsorption (fixation à la surface) et l'absorption (pénétration dans la matrice solide).

#### *Interactions hydrophobes*

Des interactions hydrophobes (absorption) se produisent entre les groupes aliphatiques et aromatiques d'un composé avec la membrane cellulaire lipophile des micro-organismes ou les fractions lipidiques des matières en suspension (Verlicchi et al., 2012). Les micropolluants hydrophobes, tels que certains pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et perturbateurs endocriniens, tendent ainsi à se fixer sur les particules organiques des boues. Le coefficient de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ) est souvent utilisé pour estimer la tendance des substances hydrophobes à s'adsorber : plus le  $K_{ow}$  est élevé, plus la substance a tendance à être adsorbée.

#### *Interactions électrostatiques*

Les micropolluants peuvent se fixer sur les boues par des forces électrostatiques : Les boues ont souvent des charges négatives en raison de la présence de composés tels que les acides humiques et des interactions électrostatiques vont alors avoir lieu entre les groupements fonctionnels des molécules chargés positivement et les surfaces chargées négativement des micro-organismes (Verlicchi et al., 2012).

#### *Ponts hydrogène et interactions de Van der Waals*

Des micropolluants polaires ou faiblement polaires, comme certains pharmaceutiques, peuvent former des liaisons hydrogène avec les composants organiques des boues. De plus, des interactions de type Van der Waals (forces de dispersion) peuvent intervenir, notamment pour des micropolluants faiblement polaires ou non polaires qui interagissent avec les matières organiques présentes dans les boues.

#### *Autres types d'interactions*

On peut également rencontrer des interactions liées à la cationicité : le pontage cationique qui consiste en la formation d'un complexe de sphère interne entre un cation échangeable à la surface du sorbant et un groupe fonctionnel anionique sur le sorbat. L'échange cationique : l'attraction d'un cation vers un site chargé négativement où un échange d'un cation pour un autre a lieu au site de liaison (Xu et al., 2021).

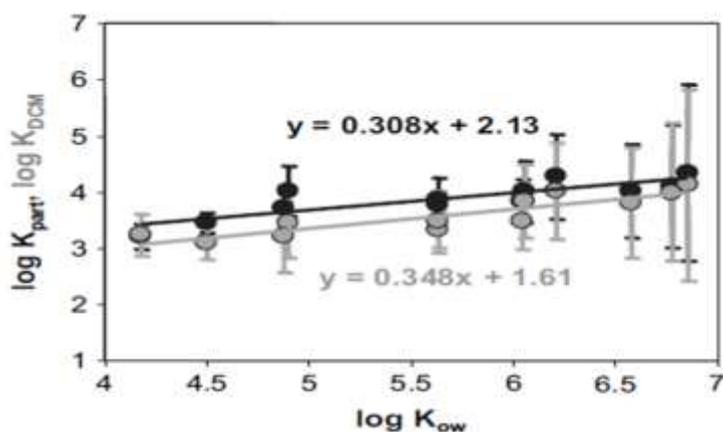
### **4.1.2 Facteurs influençant les phénomènes de sorption**

La variété de mécanismes et types de liaisons potentiellement impliqués dans les phénomènes de sorption induit aussi une grande variété de facteurs susceptibles de jouer un rôle sur la répartition des micropolluants. Ceux-ci concernent tant les molécules, que les propriétés des boues ou encore les conditions environnementales.

### Propriétés des micropolluants

- Hydrophobicité

Les MPs ayant un  $\log K_{OW} > 4$  (hydrophobe) comme les HAP (Hydrocarbures aromatiques polycycliques) présentent un potentiel de sorption plus élevé, alors que ceux qui ont un  $\log K_{OW} < 2,5$  indiquent souvent une probabilité de sorption plus faible (s'ils ne sont pas chargés). Ainsi la Figure 10 met en évidence le lien étroit entre le coefficient de partage (sur les particules,  $\log K_p$ , ou sur la matière colloïdale,  $\log K_{DCM}$ ) et l'hydrophobicité ( $\log K_{OW}$ ) dans le cas des HAPs.



**Figure 10.**  $\log K_{part}$  (ronds noirs) et  $\log K_{DCM}$  (ronds gris) en fonction des HAP  $\log K_{ow}$  (Barret, Patureau, et al., 2010)

Cette tendance n'a, à notre connaissance, pas été reportée pour les molécules pharmaceutiques ou les pesticides. Ainsi les interactions hydrophobes ne sont pas les seules à régir la partition des MPs.

- Effet de la charge et de l'ionisation des MPs

D'autres types d'interactions comme les interactions électrostatiques peuvent impacter leurs distributions (e.g. ionique) (Wunder et al., 2011). Comme évoqué précédemment, la charge des boues biologiques est généralement négative (essentiellement du fait des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui sont constituées de groupements anioniques comme  $COO^-$ ,  $SH^-$  et  $SO_4^-$ ). Les groupes fonctionnels des composés, par exemple amine aromatique et sulfonamide pour SMX (Figure 11), déterminent leurs  $pK_a$  (la valeur du pH pour laquelle 50% d'une substance est dissociée et par conséquent entre deux  $pK_a$ , une forme ionique du composé est majoritaire), 1,6 et 5,7 dans le cas de SMX.

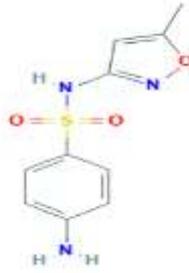


Figure 11. Structure chimique de Sulfamethoxazole (PubChem)

La Figure 12 présente le diagramme de prédominance pour quelques antibiotiques. On peut ainsi s'intéresser à la proportion des différentes formes ioniques des composés (qui dépendent donc du  $pK_a$ ) en fonction du pH du milieu.

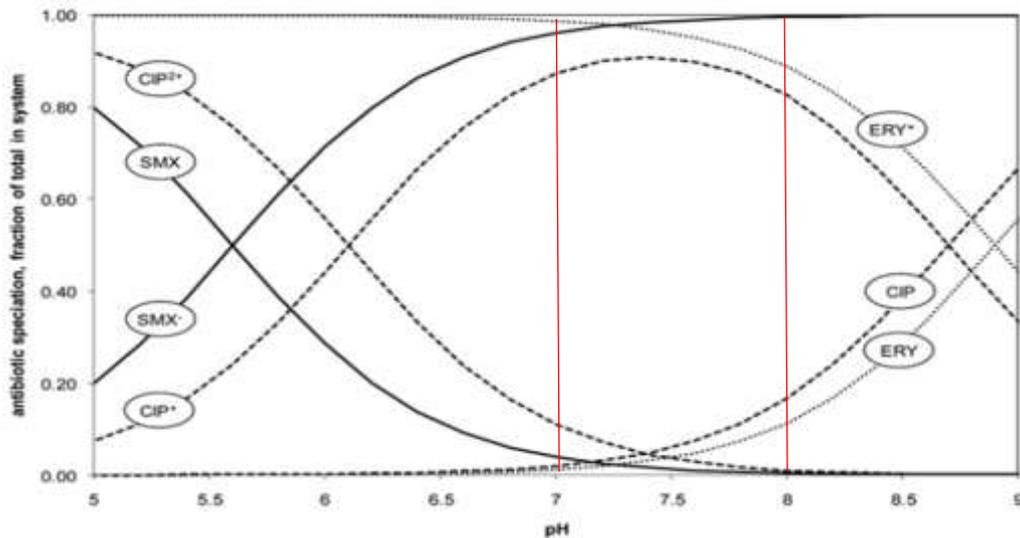


Figure 12. Diagramme de prédominance (spéciation) de trois antibiotiques (Wunder et al., 2011)

Ainsi, en considérant en digestion anaérobie, un pH entre 7 et 8 (précisé par les lignes verticales sur la Figure 12), on peut anticiper le comportement de ces composés :

- 1) SMX est majoritairement anionique au-dessus de pH 5,6. Une interaction répulsive entre le SMX et la boue est donc attendue.
- 2) Entre pH 6,1 et 8,7, CIP est principalement cationique. On peut s'attendre donc à une adsorption de ce composé sur la boue.
- 3) ERY a un seul  $pK_a$  de 8,9 et est principalement cationique à pH 7,5. Là encore une affinité forte pour la boue est attendue.

- Structure moléculaire

La structure de la molécule et les groupes fonctionnels en présence va régir les types d'interactions possible. Une analyse des groupes fonctionnels de la molécule CIP (Figure 13), qui peut proposer différents types d'interactions, est réalisée à titre d'exemple.

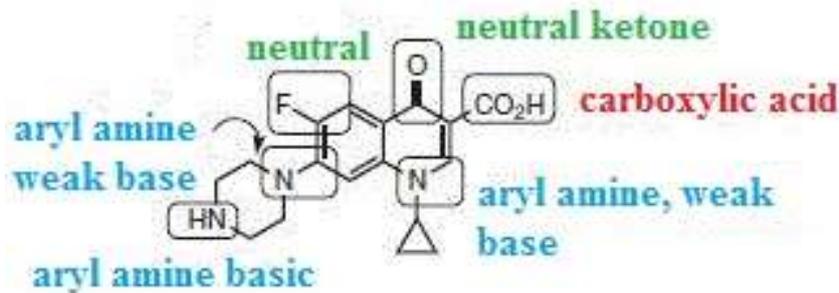


Figure 13. Structure chimique de Ciprofloxacin (PubChem)

Au vu de la structure chimique de la Ciprofloxacin, on peut envisager :

- 1) Les liaisons hydrogènes entre le fluor et l'hydrogène de l'amine d'EPS.
- 2) L'échange cationique de l'amine protoné  $\text{NH}_3^+$  avec les cations  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  sur les EPS.
- 3) Le pontage cationique entre carboxyle anionique et  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  sur les EPS.

### Caractéristiques des boues

- Composition organique des boues

Les EPS sont présentes en quantité significatives dans les boues biologiques et peuvent jouer un rôle sur les mécanismes de sorption des MPs (J. Xu et al., 2013) . Outre les interactions hydrophobes déjà évoquées, d'autres interactions peuvent entrer en jeu en fonction des groupements fonctionnels respectifs des EPS et des MPs (Oberoi et al., 2019). Comme les EPS sont constitués de groupes carboxyle, hydroxyle, amine, etc., la dissociation et la protonation de ces groupes dans le milieu peut créer la charge sur les EPS (négatif pour carboxyle et hydroxyle et positif pour protonation d'amine). En considérant une forme sphérique pour les particules et la matière colloïdale des boues, la surface spécifique (rapport rayon/volume) est inversement proportionnelle au rayon et par conséquent une diminution de la taille des particules, conduit à augmenter la surface disponible pour la sorption (et donc défavoriser la biodégradation car les MPs seront alors moins biodisponible). Cette tendance a été reportée dans la littérature pour  $17\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2), un stéroïde synthétique hydrophobe ( $\log K_{ow} = 3,67$ ) susceptible de provoquer des perturbations endocriniennes. En effet, (Yi & Harper, 2007) ont mis en évidence que le coefficient de partage est plus élevé (i.e. une sorption plus élevée) pour les particules plus petites dans les bioréacteurs pour les quantités identiques de matière en suspension (cf. Figure 14).

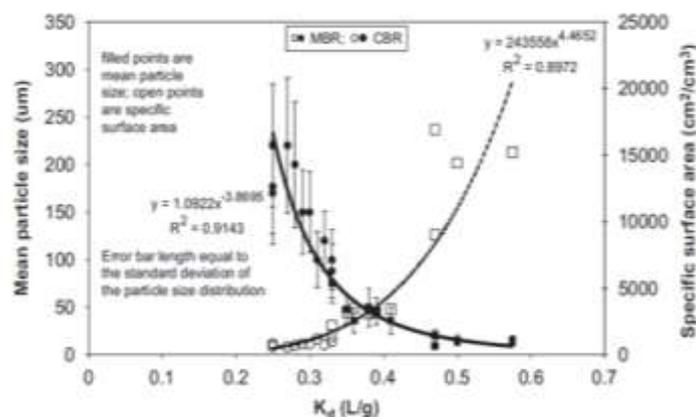


Figure 14. Effet de la taille moyenne des particules et de la surface spécifique sur le coefficient de partage de EE2 (Yi & Harper, 2007)

- Teneur en matière particulaire et colloïdale

Dans une étude (Barret, Patureau, et al., 2010), on peut voir que pour les quantités plus élevées de DCM (matière colloïdale et dissoute, définie comme le surnageant de boue centrifugé (12 000g, 20 min, 35 °C) et filtré à 1,2 mm), le coefficient de partage diminue (cf. Figure 15) traduisant un transfert des MPs vers la phase aqueuse avec un potentiel impact sur leur biodisponibilité.

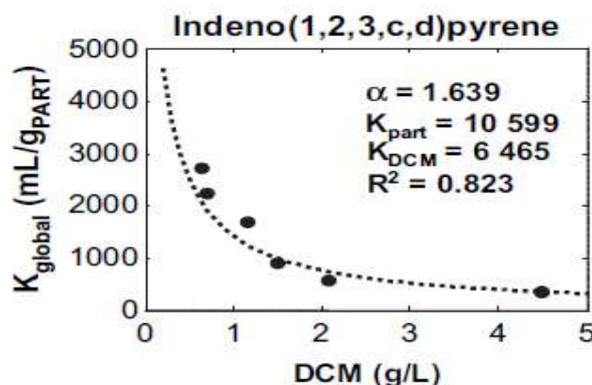


Figure 15.  $K_{global}$  en fonction de la teneur an matière colloïdale (Barret, Patureau, et al., 2010)

Il faut cependant noter que cette étude est sur les HAP dont la partition est régie majoritairement par les interactions hydrophobes. Cette tendance serait à vérifier pour les composés pour lesquels la sorption avec la matière particulaire des boues biologiques est régie par d'autres types d'interactions (électrostatique ou ionique par exemple).

Par ailleurs, il est important de souligner qu'une valeur unique de  $\text{Log } K_d$  ne peut suffire pour indiquer la partition d'un composé. En effet, la fraction de micropolluant dans le liquide dépend fortement de la concentration en MES :

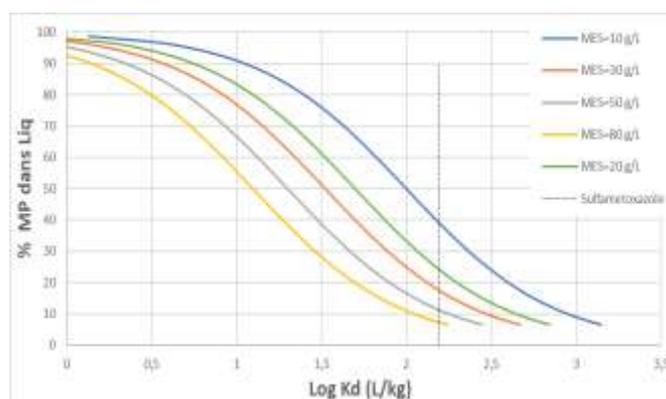
$$K_d = \frac{C'_p / \text{MES}}{C_{liq}}$$

Où  $C'_p$  ( $\mu\text{g/L}$ ) est la concentration des MPs dans la phase particulaire,  $C_{liq}$  ( $\mu\text{g/L}$ ) est celle dans la phase aqueuse et MES ( $\text{kg/L}$ ) sont les matières en suspension.

En définissant la fraction des MPs dans la phase aqueuse par l'équation suivante :

$$\% \text{ liquide} = \frac{C_{liq}}{C_{liq} + C'_p}$$

On peut représenter alors l'effet de MES sur la fraction de MPs solubles en fonction de  $K_d$  (cf. Figure 16).



**Figure 16. Effet de la concentration en matières en suspension (MES) sur la fraction dans le liquide en fonction de  $\text{Log}(K_d)$  – en pointillé, le  $\text{log}K_d$  du SMX d'après (Huang et al., 2019)**

Si on prend l'exemple de Sulfaméthoxazole pour lequel le  $\text{log}K_d$  a été estimé à 2,19 sur des boues secondaires (Huang et al., 2019), la fraction de composé soluble varie de 8% à 40% pour une gamme de MES de 80 à 10 g/L (cf. ligne verticale Figure 16).

Ainsi, un procédé de digestion anaérobie permettant de diminuer significativement les MES devrait rendre les MPs plus disponibles pour la dégradation. Cette tendance est effectivement retrouvée pour certains composés comme oxazépam, propranolol et ofloxacine qui sont plus biodégradés en MAD-TAR, un procédé pour lequel la solubilisation de la matière organique est plus importante que dans le MAD (Gonzalez-Salgado et al., 2020). Mais la publication montre que certaines molécules comme Carbamazépine ne sont pas bien éliminées en MAD-TAR (avec une concentration plus élevée en digestat que la boue primaire) malgré une accessibilité a priori plus importante. Ainsi la disponibilité semble ne pas être le seul facteur jouant sur le devenir des MPs.

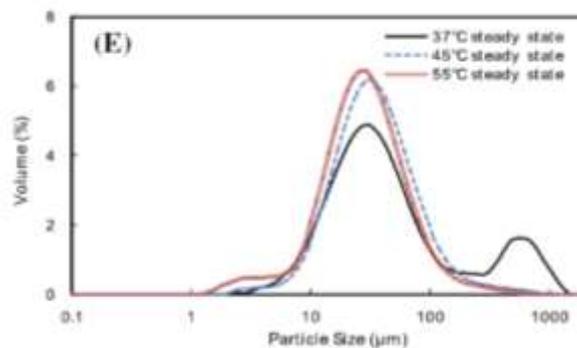
#### Conditions environnementales

- Effet de température sur la partition des MPs

La température joue un rôle direct sur les phénomènes de sorption que l'on peut appréhender par une approche thermodynamique. Pour une surface donnée, augmentation de température défavorise la sorption car  $|\Delta G^\circ|$  de l'équilibre de sorption diminue en augmentant la température (Huang et al., 2019). De plus, l'augmentation de la température augmente probablement la mobilité et la solubilité des molécules adsorbées, réduisant les forces de van der Waals entre elles et diminue la capacité d'adsorption (Zhang et al., 2018).

La température peut également jouer un rôle indirect. En effet nous avons vu précédemment que la teneur en solide influence grandement la répartition des MPs dans les phases. Or la teneur en solide lors d'une digestion anaérobie varie significativement avec la température : le changement de la température modifie la population microbienne et la biodégradation de matière organique qui en résulte. Une élimination supplémentaire de 30% de la demande chimique en oxygène (DCO) en mode MAD-TAR par rapport à MAD a été obtenue (Dumas et al., 2010).

Cette solubilisation peut également conduire à diminuer la taille des particules. Dans une étude sur la performance et la structure de la communauté microbienne d'un bioréacteur à membrane anaérobie immergée (Gao et al., 2011), des distributions granulométriques ont été réalisées pour différentes températures (cf. Figure 17). La taille moyenne des particules diminue dans les températures plus élevées, avec en particulier l'apparition d'une population d'objets de l'ordre de quelques  $\mu\text{m}$ .



**Figure 17. Distribution de la taille des particules de boue à 37°C, 45°C et 55 °C en régime permanent (Gao et al., 2011)**

Il peut donc y avoir deux conséquences antagonistes associées à cet effet indirect de la température : d'une part une diminution de la teneur en matières en suspension qui favorise l'accessibilité des MPs et d'autre part, une diminution de la taille des objets qui augmente la surface spécifique disponible pour la sorption.

### **À retenir**

- La taille de la matière particulaire régit la surface spécifique ; ainsi une diminution de taille augmente la surface spécifique et favorise donc la sorption.
- Une augmentation de la matière dissoute et colloïdale (DCM) défavorise la sorption et améliore donc la biodisponibilité des micropolluants.
- L'augmentation de température conduit généralement à une diminution des tailles des particules. Le mécanisme identifié est a priori une augmentation de la biodégradation du fait d'un changement de population microbienne.
- Les interactions électrostatiques sont plus importantes pour les micropolluants peu hydrophobe ( $\text{Log}K_{ow} < 2.5$ )

- Les coefficients de partage ne sont pas des paramètres suffisants pour évaluer la fraction de micropolluants dissous (et donc biodisponibles) ; l'estimation de cette fraction doit également prendre en considération la quantité de matière en suspension.

## 4.2 Mécanismes de biodégradation des micropolluants

L'un des objectifs de cette thèse est d'évaluer l'effet de procédés hybrides sur la biodégradation des MPs, ainsi que de comprendre l'effet de la température et de la présence d'oxygène sur ce processus. Pour atteindre cet objectif, plusieurs aspects seront étudiés, notamment :

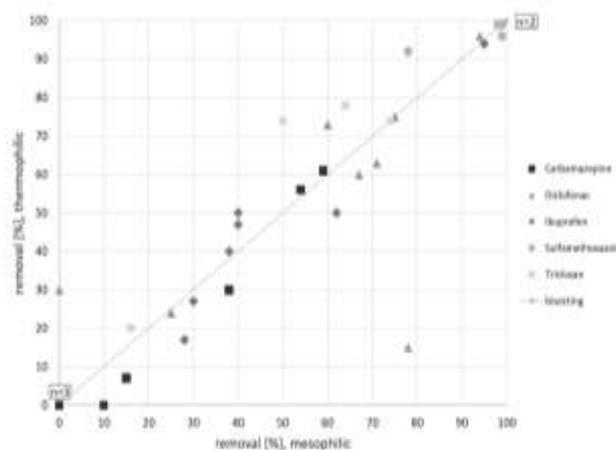
- 1) L'effet des paramètres opératoires, de la température, du temps de séjour (SRT) et de l'aération
- 2) Les réactions enzymatiques, ainsi que les types d'enzymes essentiels à la biodégradation des MPs, sont importants. Il est également essentiel de considérer l'effet de la réversibilité de ces réactions, pouvant conduire à une biodégradation incomplète, voire négative, de certains MPs, comme observé dans des études antérieures.

### 4.2.1 Effet des paramètres opératoires

Les paramètres opératoires les plus importants sont la température, le pH ainsi que les temps de séjour hydraulique (HRT) qui affecte le temps de contact entre le substrat et la biomasse, ou des boues (SRT) qui affecte la croissance microbienne.

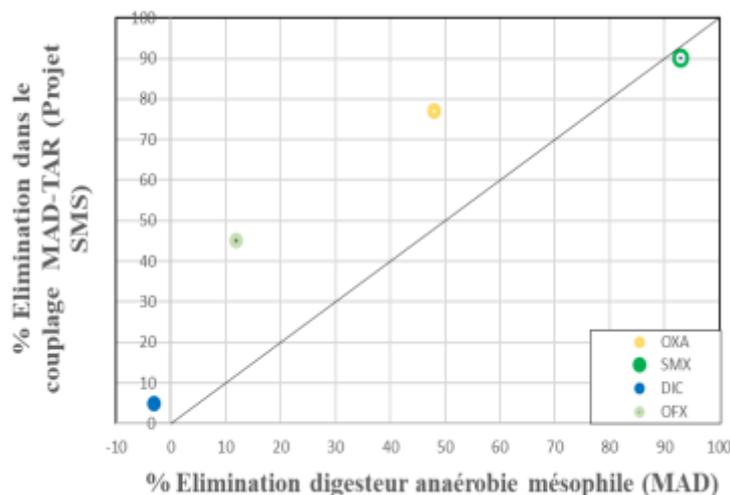
#### *Température*

Généralement, au-delà de 40 °C, on dénature les enzymes mais certains microorganismes thermophiles vivent dans de l'eau à 70 °C ou 80 °C et leurs enzymes fonctionnent donc à cette température (Henry Weil, 2001). Les conditions thermophiles peuvent favoriser l'activité microbienne et le taux de croissance des microorganismes. On pourrait donc s'attendre à ce que des conditions thermophiles favorisent la biodégradation (Carballa et al., 2006; Stasinakis, 2012; Suárez et al., 2008). La Figure 18 résume l'effet de régime thermophile en condition anaérobie dans 7 études (obtenu d'une revue bibliographique, (Hammer & Palmowski, 2021)). Il s'avère que l'amélioration en conditions thermophiles n'est pas systématique.



**Figure 18. Comparaison d'élimination des MPs en régime thermophile par rapport à un régime mésophile (Hammer & Palmowski, 2021)**

Dans une autre étude réalisée sur un couplage de réacteur mésophile avec un réacteur thermophile micro-aéré, on peut voir l'amélioration des taux de dégradations (cf. Figure 19), notamment pour l'oxazepam et l'ofloxacine. Cette amélioration peut être le résultat de micro-aération ou la synergie entre les deux réacteurs (Gonzalez-Salgado et al., 2020).



**Figure 19. Comparaison d'élimination des MP dans un couplage mésophile thermophile micro-aéré par rapport à un digesteur conventionnel (Gonzalez-Salgado et al., 2020)**

#### *Effet de l'aération sur l'élimination des MP ainsi que sur des populations méthanogènes*

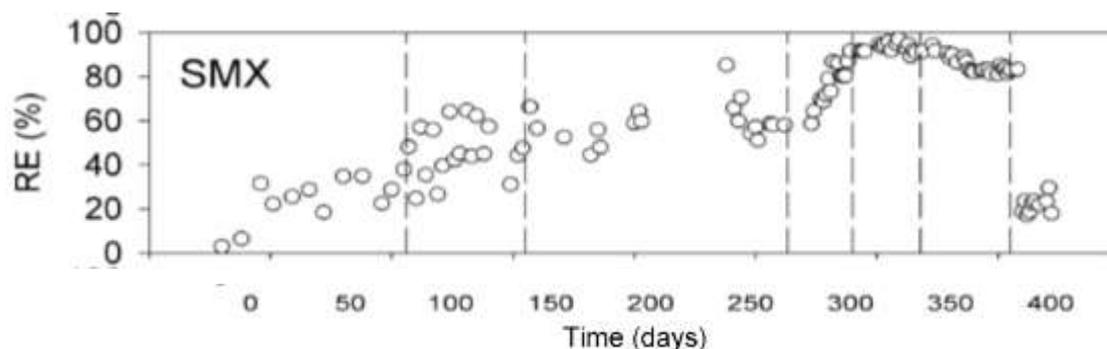
L'aération, généralement appliquée de façon à être en très faible concentration en oxygène de façon à éviter un impact négatif sur les méthanogènes, permet le développement de populations complémentaires.

Do Nascimento et al. (2021) ont réalisé un réacteur de type UASB (upflow anaerobic sludge blanket) de 3,5 L et inoculé par un digestat mésophile (50 gVSS/L). L'alimentation est un mélange synthétique de l'eau dopé en quelques MP (200 µg/L) et en présence de 1 gDCO/L d'éthanol. Le HRT est de 7,4 h et le pH est maintenu à 7. Après inoculation, le réacteur a été suivi sous divers régimes d'aération (cf. Tableau 5) (do Nascimento et al., 2021).

**Tableau 5. Débit d'aération dans l'étude (do Nascimento et al., 2021)**

Période	I	II	III	IV	V	VI	VII
Fin de période (jour)	106	155	263	290	318	355	372
Micro-aération (ml/min)	-	1	2	4	6	1	-

La Figure 20 présente le taux de biodégradation de Sulfaméthoxazole (SMX) dans chaque période :



**Figure 20. Taux de dégradation de Sulfaméthoxazole au cours des phases d'aération (do Nascimento et al., 2021)**

On constate clairement une amélioration de la biodégradation du Sulfaméthoxazole après une période de 300 jours d'aération, soulignant ainsi l'efficacité de l'aération pour la dégradation de cette molécule. Cependant, en l'absence d'un réacteur de référence sans aération réalisé durant la même période dans cette étude, il est difficile de tirer une conclusion définitive sur l'effet direct de l'aération par les auteurs.

Les auteurs ont évalué l'évolution de la diversité microbienne sous ces divers régimes d'aération ; si une augmentation de populations supposées microaérophiles a été observée, leur rôle direct dans la dégradation des MPs n'a pas été clairement démontré. De façon générale, au vu des faibles flux en micropolluant par rapport à la matière organique éliminée dans des digesteurs, il sera extrêmement difficile d'identifier des populations spécifiques par séquençage.

#### **4.2.2 Activités enzymatiques et mécanismes de biotransformations associés**

La biotransformation consiste en une large séquence de réactions et les MPs peuvent subir diverses stratégies d'élimination impliquant une vaste gamme d'activités enzymatiques extracellulaires ou intracellulaires si la taille de la molécule permet un transfert au travers de la paroi membranaire.

Dans cette section, les enzymes et les mécanismes associés à la biotransformation des MPs dans les différentes conditions biologiques (anaérobie et anaérobie en présence de microaération qui concerne le TAR) seront présentés.

##### *Condition anaérobie*

Sur la base des résultats rapportés au cours des dernières années, la plupart des classes d'enzymes semblent être impliquées dans la biotransformation anaérobie des MPs, sont des oxydoréductases (e.g., la carbonyl réductase ; EC 1.-), transférases (e.g., kinases, méthyltransférases et acétyltransférases; EC 2.-), hydrolases (e.g., protéases et amidases ; EC 3.-), lyases (e.g., décarboxylases; EC 4.-) et des ligases (e.g., LCFA-CoA ligase ; EC 6.-) (Gonzalez-Gil et al., 2020; Kennes-Veiga et al., 2022).

De plus, Il a été démontré que l'acétate kinase, enzyme transférase clé de la méthanogénèse acétolactique, est capable de transformer de manière réversible (dans le sens inverse et produire

la molécule mère) certains MPs comme triclosan avec des groupes carboxyliques et hydroxyles probablement par phosphorylation (Gonzalez-Gil et al., 2020).

Les réactions les plus pertinentes pour la transformation des MPs étant multifonctionnels sont des déshalogénations réductrices et le clivage des liaisons éther. En outre, réductions des doubles liaisons cycliques (e.g. carbamazépine) ont été observés mais ce n'est pas fréquent (Ghattas et al., 2017). Le Tableau 6 présente les réactions enzymatiques dans la biodégradation anaérobie des molécules de SAVE. Le fonctionnement des enzymes sur les liaisons est présenté pour le cas de Sulfaméthoxazole (cf. Figure 21).

**Tableau 6. Réaction enzymatique dans la biodégradation anaérobie des molécules de SAVE**  
(Ghattas et al. 2017; Kennes-Veiga et al. 2022)

<b>Molécule</b>	<b>Réaction enzymatique</b>	<b>Enzymes impliqués</b>
<b>Sulfaméthoxazole</b>	Réduction de N-O dans le cycle isoxazole, le groupe Sulfonamide ne change pas	Protéines membranaires comme cytochrome c, Ferrédoxine hydrogénase (EC 1.12.7.2), enzyme oxydoréductase
<b>Erythromycine</b>	Clivage des cladinose	Glycosylases (EC 3.2.-) (étant intracellulaire et extracellulaire) (Kennes-Veiga et al., 2022)
<b>Triclosan</b>	1) Phosphorylation 2) Déchloration 3) Clivage d'éther	1) Acyl transférase 2) Acétate kinase (EC 2.7.2.1) (transférase intracellulaire) 3) Réductrice PcbA1 (EC 1.21.-) exprimé par phylum Chloroflexi, e.g. Déhalococcoides mccartyi strain CG1 4) O-déméthylase (EC 1.14.14.1)
<b>Acétaminophène</b>	1) Désacétylation/hydrolyse secondaire d'amide 2) Activation de carboxyle ou des groupes hydroxyle avec Acyl-CoA	1) Arylamine N-acétyltransférase (EC 2.3.1.5) / Hydrolases de C-N non peptidique liaison (EC 3.5.1.-) 2) AGV à longue chaîne -CoA ligase (EC 6.2.1.3)
<b>Aromatiques mono et polycycliques</b>	1) Carboxylation 2) Hydroxylation	1) Carboxylase 2) Déhydrogénase

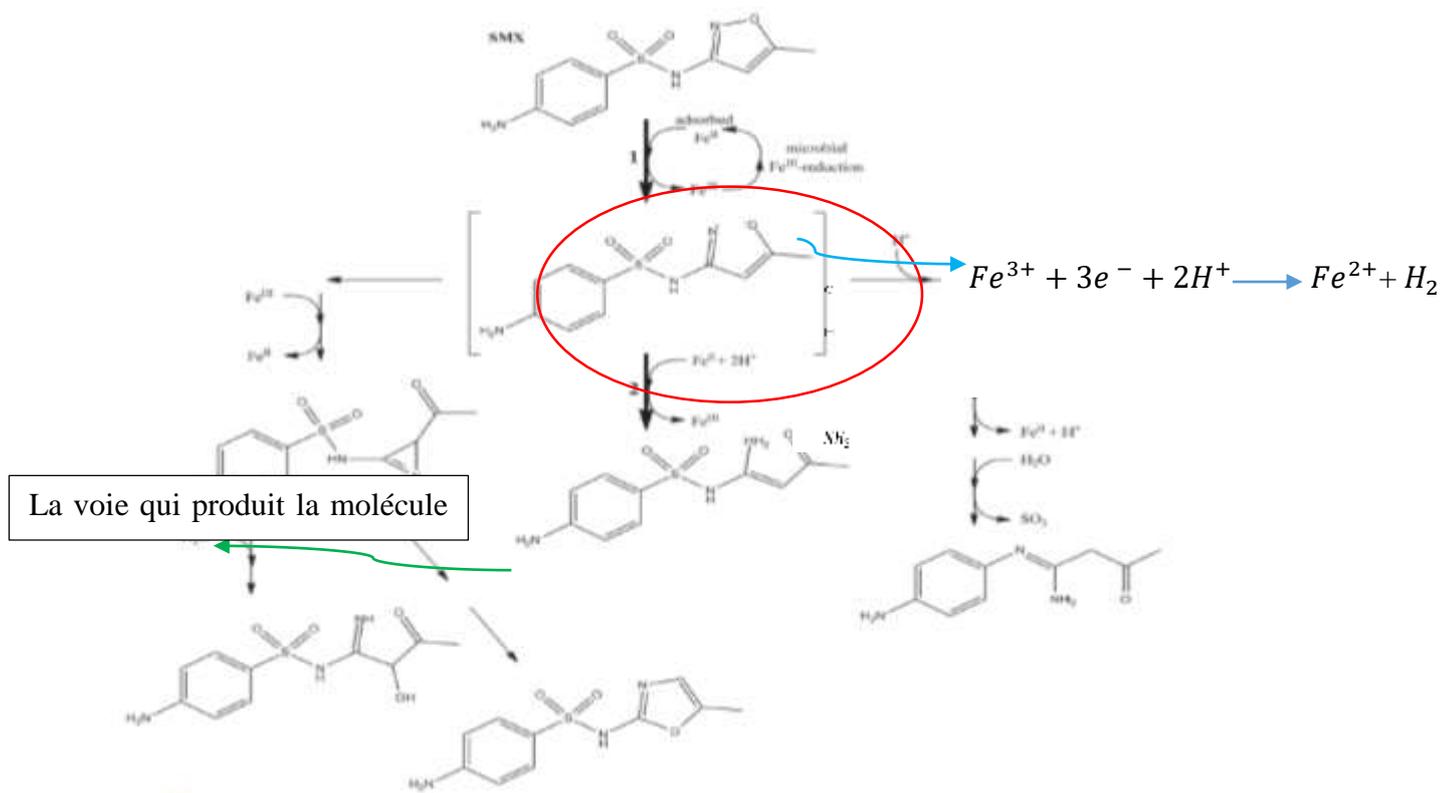


Figure 21. Dégradation microbienne du SMX et autres réactions abiotiques dans des conditions de réduction du fer (Ghattas et al., 2017; Henry Weil, 2001)

De plus, la réaction de type substitution électrophile aromatique est la réaction principale de dégradation des cycles aromatiques qui existe dans certaines molécules choisies. La cinétique de réaction dépend forcément de type des groupes fonctionnels. La Figure 22 résume l'effet de différents groupes fonctionnels :

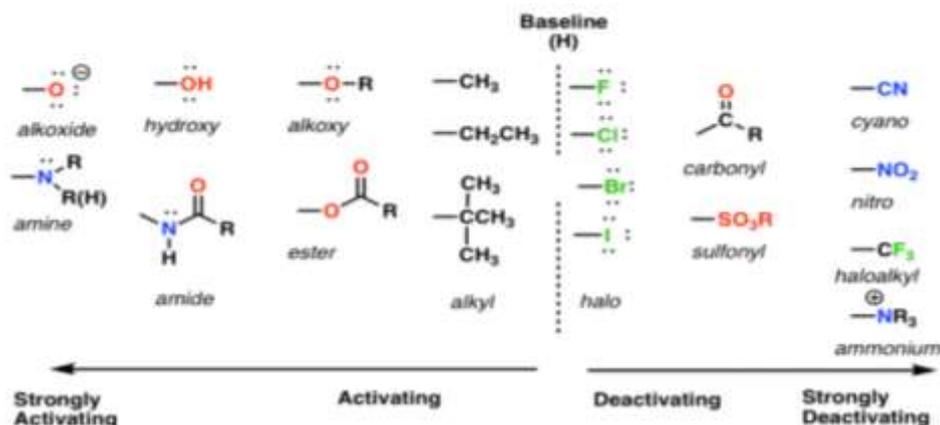


Figure 22. Groupes d'activations et désactivation ('Activating and Deactivating Groups In Electrophilic Aromatic Substitution', 2017)

A notre connaissance, il n'y a pas d'étude spécifique qui étudie l'effet des groupes fonctionnels de molécules différentes (mais avec les autres propriétés comme  $K_d$  similaires) dans un digesteur et qui relie cet effet au taux d'élimination et la cinétique de biodégradation.

### *Condition anaérobie en micro-aération*

La micro-aération utilisé dans notre réacteur TAR est une stratégie efficace pour améliorer l'élimination des MPs (Gonzalez-Salgado et al., 2020). Dans cette condition, l'oxygène n'est pas l'accepteur finale d'électron. L'oxygène est utilisé par les monooxygénases (enzyme oxydoréductase et intracellulaire) pour les réactions d'hydroxylations dont les intermédiaires vont être dégradé par les anaérobies (do Nascimento et al., 2021; Gonzalez-Gil, Mauricio-Iglesias, Serrano, et al., 2018).

C'est bien de noter qu'il y a des différentes possibilités pour les attaques enzymatiques et celles qui sont dans ce rapport ne sont pas les seules voies métaboliques.

### *Biodégradation incomplète ou négative de certaines molécules*

La biodégradation de certains molécule est incomplète c'est-à-dire qu'ils ne se biodégradent pas totalement et la vitesse de biodégradation diminue au cours du temps (Gonzalez-Gil, Mauricio-Iglesias, Carballa, et al., 2018). Il y a des cas pour lesquels la concentration finale est plus élevée que celle initiale dans un digesteur anaérobie (le taux de biodégradation négatif), comme Diclofénac et 2-hydroxyibuprofène, (Gonzalez-Salgado et al., 2020).

Une étude (Gonzalez-Gil, Mauricio-Iglesias, Carballa, et al., 2018) a été réalisé pour tester 5 modèles différents, afin de trouver les phénomènes qui empêchent les MPs à être biodégradés complètement. La conclusion est que la biodégradation est limitée par des phénomènes thermodynamiques (réversibilité des réactions enzymatiques ainsi que séquestration des MP par les particules) plutôt que par la cinétique et l'inhibition.

### **À retenir**

Ce travail bibliographique nous a permis de classifier les paramètres influençant l'élimination des MPs.

Les mécanismes de biodégradation des MPs ont été abordés. L'effet positif de la microaération a été démontré dans le cas d'un UASB. De plus, l'amélioration apportée par la configuration MAD-TAR sur le taux de biodégradation de certains MPs a été exposée.

Il a été observé que la réversibilité des réactions enzymatiques et la séquestration des MPs dans les floccs sont présentées comme des raisons potentielles d'une biodégradation limitée des MPs.

## **5 Conclusion et perspective de la thèse**

L'état de la méthanisation en France a été présenté. Nous avons observé les améliorations apportées par les procédés de méthanisation hybride, améliorations confirmées par deux études réalisées dans des conditions (type de boues et taille d'installation) très différentes. La configuration MAD-TAR présente de meilleures performances par rapport à la configuration MAD en termes de réduction des boues et de biodégradation des MPs mais pas de production de méthane. Nous nous questionnons sur les processus responsables d'une élimination accrue de la DCO particulaire mais aussi de certains micropolluants. Des zones d'ombre persistent dans cette configuration novatrice et il ressort les besoins suivants :

- 1) La nécessité d'étudier la mise en régime, la stabilité du fonctionnement et le rôle de l'inoculum
- 2) Déterminer si cette amélioration est due à la température ou à l'aération.
- 3) Comprendre les mécanismes sous-jacents à ces améliorations observées

Ce travail bibliographique nous a permis de lister les questions scientifiques auxquelles nous tenterons de répondre à l'aide des expériences et des modèles mis en œuvre dans le cadre de cette thèse :

- Le couplage de conditions mésophile et thermophile pose la question de la sélection de populations microbiennes capables de fonctionner dans les deux conditions. En effet, une température de 55°C est en principe létale pour un microorganisme mésophile dans son état végétatif. Comment se fait cette sélection ? Avec quelle dynamique se fait-elle ? Quel rôle de l'inoculum initial et apporté par l'alimentation en boues ? Pour répondre à ces questions, nous proposerons d'utiliser un modèle dynamique du procédé et de le confronter aux évolutions des grandeurs mesurées au cours du temps (concentrations des substrats et produits) tenant compte des analyses microbiologiques issues du séquençage des populations.
- Le rôle d'une aération du réacteur TAR n'est pas claire. La présence d'oxygène, permet-elle d'initier des activités enzymatiques particulières qui permettraient d'expliquer une dégradation accrue de la DCO particulaire et des micropolluants ? Est-ce un effet physique de ventilation qui affecte des conditions d'environnement dans le TAR comme le pH, la concentration en ammoniacque, ... et entraîne des modifications chimiques des matières à dégrader ? Pour répondre à cette question, nous proposons de comparer les performances entre un procédé MAD-TAR et un procédé MAD-TAD. Ce dernier se distingue du procédé MAD-TAR par le fait qu'aucune aération n'est réalisée dans le compartiment thermophile qui devient TAD (digesteur anaérobie thermophile).

La suite du manuscrit va être organisée comme décrit dans le Tableau 7:

*Tableau 7. Organisation du manuscrit de thèse*

	Questions
Chapitre III	<p>Ce chapitre vise à présenter les performances des procédés conduits sous les trois configurations :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ MAD : digestion mésophile conventionnelle. Ce procédé nous sert de référence.</li> <li>○ MAD-TAD : couplage MAD et digestion anaérobie thermophile. En confrontation avec le procédé MAD-TAR, cette configuration nous permet de dissocier le rôle thermique de celui de l'aération.</li> <li>○ MAD-TAR : couplage MAD et digestion aérobie thermophile. Cette configuration est celle étudiée pour les performances observées lors d'études antérieures.</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les performances seront analysées en termes de réduction de la production de boues, de production de biogaz et d'accumulation d'AGVs. Cela nous permettra de faire le point sur les différences entre les trois configurations et de vérifier la reproductibilité de la meilleure élimination de la DCO particulaire dans la configuration MAD-TAR.</li> <li>- Nous modifierons légèrement un modèle ADM et étudierons l'influence de l'inoculum sur la dynamique des paramètres afin d'analyser si l'inoculation peut expliquer certaines des dynamiques observées, notamment l'accumulation d'AGVs dans les configurations MAD-TAD et MAD-TAR.</li> </ul>
Chapitre IV	<p>Dans ce chapitre, nous tenterons de comprendre les effets de la température et de l'aération sur les activités et leur dynamique temporelle.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La modélisation ADM des procédés hybrides sera développée afin de simuler leurs performances dans différentes conditions.</li> <li>- Des hypothèses sur le comportement des populations face à une augmentation séquentielle de la température nous amènera à proposer différentes modélisations dont la représentativité sera évaluée par confrontation aux résultats expérimentaux.</li> </ul> <p>Ce chapitre est organisé en trois parties traitant successivement du MAD-TAD, puis du MAD-TAR et ensuite la comparaison des deux configurations.</p>
Chapitre V	<p>Enfin, les résultats concernant le devenir des MPs seront présentés.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'effet de la température et de l'aération sur l'élimination des MPs dans les couplages MAD-TAD et MAD-TAR</li> <li>- L'effet des couplages MAD-TAD et MAD-TAR sur la qualité des digestats en termes d'écotoxicité et d'antibiorésistance</li> </ul>



## **Chapitre II. Matériels et méthodes**

# 1 Introduction

Ce chapitre vise à présenter le matériel et les techniques analytiques utilisées au cours de l'étude.

Dans un premier temps, les réacteurs utilisés en continu (essais pilotes) seront décrits ainsi que les origines et caractéristiques des boues utilisées.

Ensuite, les méthodes de caractérisation analytique des fluides seront détaillées : il s'agira de décrire les analyses menées (physico-chimiques, micropolluants, population microbiennes) susceptibles d'amener des éléments d'interprétation concernant les performances des procédés.

Pour finir, nous présenterons les outils de modélisation et le modèle utilisé, en mettant l'accent sur les spécificités liées à la modification du modèle simple ADM1.

## 2 Réacteurs continus

### 2.1 Description des installations pilotes

#### 2.1.1 Pilotes de digestion anaérobie conventionnelle (MAD)

La Figure 23 présente le pilote de digestion anaérobie thermophile, MAD.

Le réacteur est une cuve étanche, en acier inoxydable, d'un volume de 10 L, disposant d'une sonde température (thermocouple pt100 fournit par Radiospares) et de pH (HAMILTON EasyFerm) dans la phase liquide. Il est équipé d'un agitateur et d'une double enveloppe permettant le maintien du milieu réactionnel à la température de 35°C.

Le système est alimenté/purgé une fois par jour : une pompe péristaltique (Sirem type R 3 426 H1 2 B) permet d'introduire les boues à traiter (cf. §2.2.1) par le bas de la cuve et de purger par le haut via une tubulure plongeant à une hauteur permettant le maintien du volume de liquide à 8 L.

Le biogaz produit dans le réacteur passe dans un condenseur avant d'être caractérisé en ligne par un analyseur (Rosemount™ X-STREAM Gas Analyzers) disposant d'un capteur infrarouge non dispersif (ou capteur NDIR). Un compteur de gaz à tambour (Ritter) permet de suivre le volume cumulé de biogaz produit.

Les divers actionneurs (pompes, agitateur) sont pilotés par un automate Siemens Simatic s7-1200 (CPU 1214C DC/DC/RLY6ES7 214-1HE30-OXBO) et les valeurs des divers capteurs sont enregistrées au cours du temps.

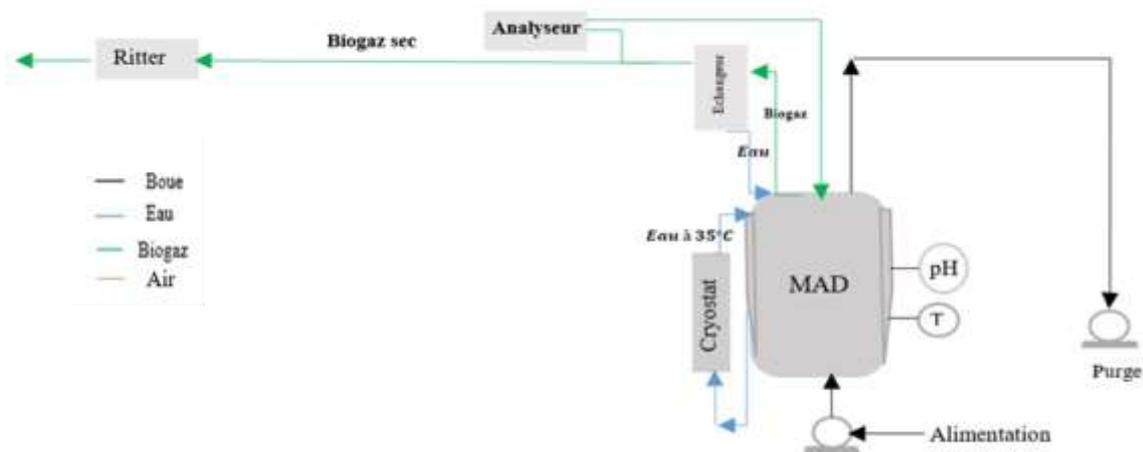


Figure 23. Réacteur MAD

### 2.1.2 Pilotes de digestion anaérobie hybride (MAD-TAR/TAD)

La Figure 24 présente le pilote de digestion hybride, la même installation ayant été utilisée pour les campagnes MAD-TAR et MAD-TAD.

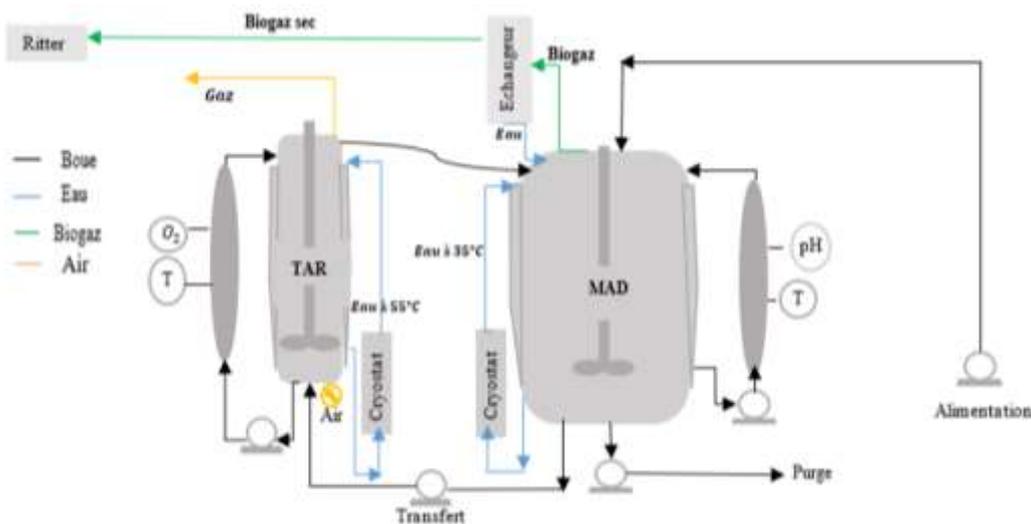


Figure 24. Pilotes MAD-TAR/D

Le pilote est constitué de deux cuves en acier inoxydable : un digesteur anaérobie mésophile (MAD) et une cuve thermophile aérée (TAR) ou non (TAD). Le MAD, d'un volume total de 55,9 L (dont 44,7 L de liquide), est équipé d'un agitateur et d'une double enveloppe permettant le maintien à la température de 35°C.

Le compartiment thermophile (TAR ou TAD), d'un volume de 11,3 L (dont 7,6 L de volume liquide) est lui aussi équipé d'un agitateur et d'une double enveloppe de façon à assurer le maintien de ce compartiment à 55°C.

De façon à faciliter la maintenance des capteurs en lignes, ceux-ci sont positionnés sur des nourrices, parallèles aux cuves, dont la circulation de liquide est assurée en continu par une pompe péristaltique (Albin type ALH10). La cuve MAD est ainsi équipée d'une sonde de température (Radiospares type thermocouple pt100) et une sonde pH (HAMILTON EasyFerm), alors que la cuve TAD/TAR est quant à elle équipée d'une sonde de température (thermocouple pt100 fourni par Radiospares) et une sonde d'oxygène (capteur optique Visiferm ARC 120, Hamilton).

Le fond du compartiment thermophile est équipé de diffuseurs connectés à une arrivée d'air comprimé elle-même pilotée par une électrovanne lorsque l'aération est nécessaire. La plage d'oxygène dissous autorisée dans cette étude était de 0,2-0,5 mg O<sub>2</sub>/L. Lorsque la mesure d'oxygène dissous est inférieure au seuil bas de 0,2 mg O<sub>2</sub>/L, l'électrovanne asservie à l'aération s'ouvre et un débitmètre massique (Bronkhorst, F-201CV-2K0-AGD-22-V) contrôle le débit d'air à 0,79 NL/min (valeur nominale). Au-dessus du seuil haut de 0,5 mg O<sub>2</sub>/L, l'aération est coupée. Ce débit d'air permet de maintenir une aération spécifique dans le TAR de  $6,2 L_{air} L_{TAR}^{-1} h^{-1}$ . Cependant des contraintes expérimentales liées aux phénomènes de moussage dans le TAR pendant la campagne n'ont pas permis de travailler avec un ratio d'aération constant, celui-ci a été ajusté à des valeurs comprises entre 4,0 et  $6,2 L_{air} L_{TAR}^{-1} h^{-1}$ .

Le système est alimenté/purgé une fois par jour à l'aide de pompes péristaltiques (Albin type ALH10) fonctionnant en même temps de façon à limiter l'entrée d'air du fait de variation de volume : l'alimentation se fait par la partie supérieure de la cuve MAD alors que la purge s'effectue dans la partie inférieure de ce même compartiment. Les deux cuves sont reliées entre elles et une pompe péristaltique permet de transférer le contenu de la cuve MAD vers la cuve TAD/TAR. La cuve TAD/TAR est placée à une hauteur élevée par rapport à la cuve MAD, ce qui permet le retour de la boue par gravité de la cuve TAD/TAR vers la cuve MAD. Pour éviter tout risque de contaminer le MAD en oxygène, ce retour est équipé d'un florentin et d'une électrovanne qui sera fermée en permanence sauf lors d'un transfert.

Le gaz de chacune des cuves est collecté par des réseaux indépendants. Dans chaque réseau le gaz traverse un échangeur de chaleur. L'eau contenu dans le gaz est alors condensée et retombe dans la cuve alors que le gaz traverse finalement un compteur à gaz de type tambour (Ritter type TG05/5) avant son rejet à l'extérieur. Des prélèvements journaliers sont réalisés et analysés par chromatographe en phase gazeuse (HP 5890 Series II, Hewlett Packard) équipé d'un détecteur à conductivité thermique (TCD). Le gaz vecteur était l'argon, à une pression de 3,5 bars. Il est à noter que le gaz issu du compartiment thermophile n'est pas caractérisé en configuration aérée (TAR) du fait de débit et dilution importants.

Les pompes et les électrovannes sont commandées depuis l'ordinateur grâce à l'automate. Une interface permet de programmer le fonctionnement des actionneurs et d'acquérir les données des capteurs au cours du temps.

## **2.2 Mise en œuvre des campagnes expérimentales**

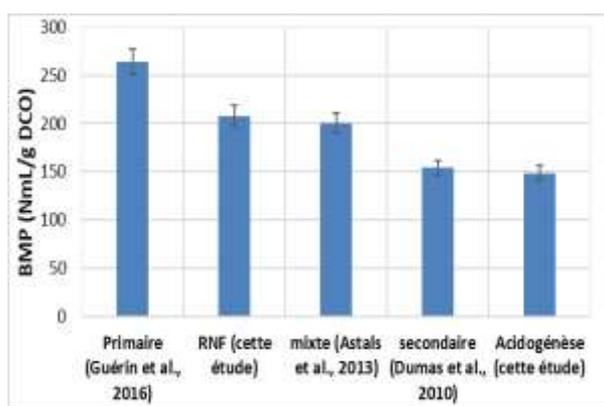
### **2.2.1 Inoculum et boues d'alimentation**

Les campagnes MAD et MAD-TAD ont été inoculées avec un digestat issu de la station d'assainissement de Toulouse-Ginestous. Ce digestat ( $28,7 \pm 0,1$  g<sub>MES</sub>/L ;  $18,0 \pm 0,1$  g<sub>MVS</sub>/L) est issue de la méthanisation des boues issues du traitement des eaux usées épaissies par

décantation et centrifugé pour être déshydratées. Le réacteur de la campagne MAD-TAD a quant à lui été inoculé avec le digestat obtenu en fin de campagne MAD-TAD ( $34,7 \pm 0,1 \text{ g}_{MES}/L$  et  $20,4 \pm 0,1 \text{ g}_{MVS}/L$ ).

L'ensemble des campagnes expérimentales a été réalisé avec une même boue d'alimentation de façon à s'affranchir au mieux d'une variabilité éventuelle de l'intrant. Il s'agit d'une boue mixte de station d'épuration ayant subi une première étape de fermentation acidogène (temps de séjour de 10 jours). La fraction soluble générée, dont les acides gras volatils, a été séparée au moyen d'un filtre à presse précédé d'une étape de coagulation/floculation. Les résidus solides de la digestion acidogène ont été récupérés et conservés à  $-21^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation dans cette étude. Les conséquences attendues de l'origine de cette boue concernant les micropolluants sont (i) des micropolluants principalement sorbés sur le particulaire et (ii) des micropolluants difficilement biodégradable puisque persistant après une première digestion.

De façon générale, cette boue étant passée par une étape de fermentation acidogène, sa biodégradabilité est moindre qu'une boue brute. La Figure 25 présente le potentiel méthanogène de cette boue d'acidogénèse par rapport aux valeurs reportées dans la littérature sur des boues primaires, secondaires ou mixte. Le substrat RNF (rétentat de nano filtration d'une boue primaire) caractérisé lors des tests batch est également reporté.



**Figure 25. Potentiel méthanogène des différents types de boue (Astals et al., 2013; Dumas et al., 2010; Guérin et al., 2016)**

Pour la préparation de l'alimentation, des aliquots de substrat brut sont décongelés progressivement puis homogénéisés par Ultra Turrax (2 minutes à 22000 rpm) avant d'être dilués dans de l'eau du robinet afin d'obtenir une concentration d'environ  $40 \text{ g}_{MES}/L$  (charge nominale). La préparation est maintenue sous agitation et conservée à  $4^\circ\text{C}$  et renouvelée tous les 2 à 3 jours.

### 2.2.2 Conditions opératoires appliquées

Les réacteurs ont été rempli par l'inoculum pour le premier jour. Pendant les 6 premiers jours, la charge organique de l'alimentation a été montée progressivement de 15% à 100% de valeur finale (cf. Tableau 8) afin d'adapter l'inoculum aux nouvelles conditions et de stabiliser le système.

#### Conditions stabilisées

En conditions stabilisées le volume d'alimentation journalier est de 0,55 L pour la campagne MAD et 3,45 L pour les campagnes MAD-TAR et MAD-TAD. Par ailleurs, le transfert (3 fois par jour) entre les réacteurs MAD et TAR ou TAD est réalisé avec un couple débit/durée assurant un temps de séjour de 1 jour dans le compartiment thermophile. Les temps de séjour sont définis comme indiqué dans les équations suivantes :

$$\text{Equation 1 : } SRT_{MADTAR} = \frac{V_{MAD} + V_{TAR}}{Q_{out}} = SRT_{MAD} + \frac{V_{TAR}}{Q_{out}}$$

$$\text{Equation 2: } SRT_{TAR} = \frac{V_{TAR}}{Q_{transfert}}$$

$$\text{Equation 3: } SRT_{MADTAR} = SRT_{MAD} + SRT_{TAR} \times \frac{Q_{transfert}}{Q_{out}}$$

Le taux de traitement aérobie, définit comme le rapport entre le débit de transfert et celui de purge, est de 2,2 comme suggéré dans de précédentes études (Dumas et al., 2010; Gonzalez-Salgado et al., 2020).

Les caractéristiques principales de chaque campagne sont décrites dans le Tableau 8:

**Tableau 8. Caractéristiques des réacteurs- campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR**

	MAD	MAD-TAD	MAD-TAR
Charge organique (en état stationnaire) $kg_{DCO} m^{-3} j^{-1}$	3,3	3,7	4,0
Temps de séjour (j)	17,1	14,7(MAD) 1 (TAD)	14 ± 1 (MAD) 1(TAR)
Volume (L)*	8	44 (MAD) 7 (TAR)	44(MAD) 7 (TAR)
pH	7,1	7,0	7,1 (MAD) 8,9-9,8 (TAR)

\* les volumes dans le tableau sont les quantités de liquide. Le ciel gazeux est 20% de volume totale de chaque réacteur

Quelques définitions de paramètres importants sont données, pour exemple, dans le cas du MAD-TAR

La **fréquence de passage** des boues ( $f_p$ ) dans l'unité de traitement est définie par  $\frac{\text{Quantité BA stressées (g/j)}}{\text{Quantité BA système (g)}}$  exprimée en  $j^{-1}$ . On peut donc écrire :

$$f_p (j^{-1}) = \frac{Q_{alim.TAR} \cdot [MES]_{TAR}}{V_{système} \cdot [MES]_{MAD}} \quad (1)$$

où  $V_{système}$  est le volume du procédé global (L),  $[MES]_{MAD}$ , la concentration en MES dans le MAD (g/L),  $Q_{alim.TAR}$  le débit d'alimentation de l'unité TAR (L/j) et  $[MES]_{TAR}$  la concentration en MES des boues soumises au traitement TAR (g/L). En général, les concentrations MES sont

identiques dans le TAR et dans le MAD. La fréquence  $f_p$  est donc le rapport entre le débit d'alimentation du TAR et le volume du MAD.

$$f_p (j^{-1}) = \frac{Q_{\text{alim.TAR}}}{V_{\text{systeme}}}$$

La valeur de  $f_p$  est donc d'environ  $0,16 j^{-1}$ .

Le **temps de contact** moyen des boues ( $t_c$ ) est calculé par l'équation suivante :

$$t_c = \frac{V_{\text{TAR}}}{Q_{\text{alim.TAR}}}$$

La valeur de  $t_c$  est donc d'environ 1j.

**Taux de traitement.** Le couple [ $f_p \times \text{SRT}_{\text{MAD-TAR}}$ ] traduit le nombre moyen de passage d'une même boue via l'unité de traitement TAR sur une durée égale au temps de séjour des boues. La fréquence de passage des boues dans l'unité est donc exprimée sur la durée SRT global et fournit le taux de traitement.

Le SRT pour le MAD-TAR étant de 14 j, la valeur du taux de traitement est autour de 2,2.

### Fréquence de traitement

La fréquence de traitement en TAD peut être décrit par l'équation suivante :

$$f_T = \frac{Q_{\text{alim.TAR}}}{Q_{\text{alim.MAD}}}$$

## 3 Évaluation de la biodégradabilité anaérobie des boues d'alimentation en batch (BMP)

La fraction de DCO biodégradable de l'alimentation en conditions anaérobies a été déterminée de manière indirecte à l'aide d'un test de potentiel méthanogène biologique (BMP) réalisé à 35°C. Les essais ont été menés dans des flacons de 500 mL, avec un rapport substrat/inoculum de 0,5 gMV/gMV. Le potentiel méthanogène a été calculé en fonction de la pression et de la composition du gaz, mesurées par chromatographie en phase gazeuse, conformément à la méthode décrite par (Holliger et al., 2016). L'équivalent en DCO obtenu permet ensuite d'évaluer la biodégradabilité.

## 4 Techniques analytiques

La caractérisation des effluents liquides et gazeux est indispensable à la réalisation des bilans matières et donc à l'évaluation des performances des procédés mis en œuvre.

### 4.1 Prélèvements et fractionnement

De façon à assurer la représentativité des échantillons de boue (alimentation et digestat), les prélèvements ont été réalisés sous agitation à l'aide de pipettes en verre dont l'embout était de grand diamètre (0,5 cm).

Les échantillons solubles ont été obtenues par deux centrifugations successives de 20 minutes et 15 minutes à 4°C et 7197 g (Beckman Coulter J-S avec un rotor de JS 5.3).

## 4.2 Caractérisations chimiques

### 4.2.1 Matière organique

#### Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La DCO a été mesurée, sur les échantillons totaux et solubles, à l'aide de kits DCO permettant l'analyse sur une gamme de 0 à 1500 mgDCO/L (COD MR Reagent HI93754B-0, HANNA Instruments). Les dilutions adéquates, selon la matrice considérée, ont été réalisées préalablement à la mesure.

#### Matières en Suspension (MES) et Matières Volatiles en Suspension (MVS)

La teneur en matières en suspension (MES) a été mesurée par pesée après séchage à 105°C pendant 24 heures du culot de centrifugation d'un volume d'échantillon connu. La teneur en matière minérales en suspension est obtenue par pesée après calcination à 550°C Les matières volatiles en suspension (MVS) sont obtenues par différence des deux précédents paramètres.

#### Acides Gras Volatils (AGV)

La quantification des AGVs a été réalisée à partir de 1 ml de la fraction soluble après filtration à 0.45 µm. L'échantillon ainsi obtenu est mélangé à 0.5 ml étalon interne (acide éthyl-2-butyrique 1g/L dans H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%). Une précipitation (protéines) et/ou un moussage (libération de CO<sub>2</sub>) peut se produire. Aussi l'échantillon est à nouveau centrifugé à 9250 g pendant 10 minutes) et filtré à 0,2µm avant analyse. L'analyse s'effectue par chromatographie en phase gazeuse, CPG (VARIAN SERIE 3900) : le chromatographe est équipé d'une colonne DB-WAX (Agilent) d'une longueur de 30 m et de diamètre interne 0.53 mm, et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est du di-azote, à un débit de 25 mL/min. Les AGVs quantifiés par cette méthode étaient les acides acétique, propionique, butyrique, iso-butyrique, valérique, iso-valérique et caproïque.

### 4.2.2 Formes azotées

L'azote total Kjeldahl (NTK) et l'azote ammoniacal ( $NH_4^+$ ) ont été mesuré sur l'échantillon total par distillation avec et sans minéralisation préalable respectivement (NF T 90 015-1 et NF T 90 015-1 respectivement).

### 4.2.3 Composition du Gaz

Dans la campagne MAD le CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub> ont été mesurés en ligne par un analyseur Rosemount™ X-STREAM Gas Analyzers disposant d'un capteur infrarouge non dispersif (ou capteur NDIR). Une analyse externe a permis de vérifier que les teneurs en H<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S dans le biogaz produit était négligeable et ne perturbait donc pas la quantification.

Pour les campagnes MAD-TAD, MAD-TAR et les tests BMP le gaz a été analysé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (HP 5890 Series II, Hewlett Packard) équipé d'un détecteur à conductivité thermique (TCD). Le gaz vecteur était l'argon, à une pression de 3.5 bars.

### **4.3 Détermination des distributions de taille des particules**

La distribution granulométrique des particules contenues dans les diverses matrices a été mesurée par un granulomètre laser Malvern mastersizer 3000. Le principe de cette technique est basé sur la capacité des matériaux à diffracter la lumière : les objets éclairés par un laser diffractent la lumière dans toutes les directions. Des détecteurs permettent, pour un angle donné, de quantifier l'intensité de diffraction, elle-même liée à la taille des objets.

En pratique, un échantillon de boue diluée, maintenu sous agitation douce, est introduit dans la cellule de mesure à l'aide d'une pompe péristaltique située en sortie de la cellule de mesure de façon à éviter que les particules ne soient soumises à un cisaillement avant leur caractérisation.

Les résultats fournis correspondent à la moyenne de 6 mesures sur un même échantillon. Le logiciel intégré à l'analyseur permet d'obtenir les répartitions granulométriques en volume, nombre et surface.

### **4.4 Quantification des micropolluants**

La quantification des micropolluants ciblés a été réalisée sur la partie totale et soluble des échantillons à l'aide d'une méthode QuEChERS modifiée suivie d'une UHPLC-MS-MS.

#### **4.4.1 Liste des molécules**

Afin d'avoir des molécules avec des propriétés contrastées et de ce fait susceptibles d'être détectées aux divers endroits de la filière envisagée dans le projet SAVE, 19 molécules ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- 1) Possibilité Analytique
- 2) Catégorie des molécules
- 3) Hydrophobicité ( $K_{ow}$ )
- 4) Concentration dans les ERU
- 5) Le partage entre la phase solide et liquide
- 6) Ecotoxicité

Le Tableau 9 présente les molécules choisies :

**Tableau 9. Liste des micropolluants choisis pour notre étude**

Antibiotique	Formule Etalon interne associé	Santé (à part l'exception des antibiotiques)	Formule Etalon interne associé	Phytoprotecteurs	Formule Etalon interne associé
Sulfaméthazine (SMZ) (C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S)	C <sub>6</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	Carbamazépine (CBZ) (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O)	C <sub>7</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	Carbendazime (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	C <sub>8</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> D <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Sulfaméthoxazole (SMX) (C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S)	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> D <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	Cyclophosphamide (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P)	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> D <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P	Chlortoluron (C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O)	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> D <sub>6</sub> ClN <sub>2</sub> O
Ofloxacin (OFL) (C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	C <sub>17</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> D <sub>3</sub>	Kétoprofène (KTP) (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> )	C <sub>10</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	Imidaclopride (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> )	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> D <sub>4</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
Ciprofloxacine (CIP) (C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> )	C <sub>17</sub> H <sub>10</sub> D <sub>8</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	Metformine (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> )	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> D <sub>6</sub> N <sub>5</sub>	Métaldéhyde (C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> )	C <sub>8</sub> D <sub>16</sub> O <sub>4</sub>
Erythromycine (ERY) (C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub> )	C <sub>36</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>64</sub> D <sub>3</sub>	Paracétamol (PCT) (C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> )	C <sub>2</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Pirimicarbe (C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> D <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Azithromycine (AZY) (C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> )	C <sub>37</sub> <sup>13</sup> CH <sub>69</sub> D <sub>3</sub>			Propyzamide (C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O)	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> D <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> NO
				Terbutylazine (C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub> )	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> D <sub>5</sub> ClN <sub>5</sub>
				Diuron (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O)	C <sub>3</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O

#### 4.4.2 Réactifs analytiques

Des standards et étalons internes des molécules sélectionnées avec une pureté  $\geq 98\%$  ont été achetés auprès de SigmaAldrich (Saint Quentin Fallavier, France), à l'exception du Sulfaméthoxazole, qui a été fourni par Alsachim (Illkirch Graffenstaden, France).

Les solutions mères d'étalons internes (EI) de chaque molécule (cf. Tableau 9) ont été préparées à 100  $\mu\text{g/mL}$  dans du méthanol à l'exception de Ciprofloxacine, Ofloxacin et Pirimicarbe qui ont été préparées à 20  $\mu\text{g/mL}$  du fait de leur moindre solubilité dans ce solvant. Pour chaque campagne d'extraction, une solution cocktail d'EI a été préparée à partir de ces solutions mères dans une solution  $H_2O/ACN$  5% (v/v) pour avoir une concentration de 300  $\text{ng/mL}$  de chaque molécule.

Les solutions standards (dans  $H_2O/ACN$  5% (v/v)) de chaque molécule (cf. Tableau 9) ont été préparées à 100  $\mu\text{g/mL}$  dans du méthanol à l'exception de Ciprofloxacine qui a été préparé à 20  $\mu\text{g/mL}$ . Pour chaque campagne d'extraction, dix solutions standard ont été préparées à partir de solutions mères dans un mélange de  $H_2O/ACN$  5% (v/v), dans lequel 200  $\mu\text{L}$  d'EI ont été

ajoutés. Ces dix solutions couvrent une plage de concentrations allant de 0,3 à 300 ng/mL pour chaque molécule.

#### **4.4.3 Protocole d'extraction et de purification**

Extraction : l'extraction mise en œuvre est une méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). On introduit 2,5 ml d'échantillon à caractériser dans un tube Falcon en polypropylène (PP) de 50 ml. La quantification des analytes a été effectuée par méthode avec étalonnage interne et de ce fait, un volume de 0,2 mL de solution d'étalon interne (EI) est ajouté. Les falcons sont agités pendant 2 h (MultiReax Heidolph) pour assurer l'homogénéité de l'échantillon, et l'adsorption de l'étalon interne dans la boue. Ensuite, 1,25 mL d'EDTA (75 g/L), 1,25 mL de tampon citrate (232 g/L Na<sub>3</sub>Cit,2H<sub>2</sub>O et 115,2 g/L Cit,1H<sub>2</sub>O), 5 mL d'ACN acidifié (2%) et 4 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont ajoutés dans des tubes qui sont immédiatement vortexés (Heidolph™ Multi Reax VortexMixer de Fisher Scientific) à vitesse maximum pendant 1 min puis centrifugé à 7100 g pendant 5 min.

Purification : une extraction dispersive en phase solide (dSPE) est réalisée afin d'éliminer les interférents de la phase organique issue de l'extraction QuEChERS. On transfère le surnageant obtenu précédemment dans un falcon de 15 mL contenant 0,0375 g PSA et 0,0375 g de C18. On fait une minute de vortex suivi de 5 minutes de centrifugation à 7100 g.

Concentration et récupération : on met notre échantillon à évaporer dans sous vide à 45 °C pendant 5 heures en utilisant le programme Low BP du EZ-2 Envisystème (Génévac). Ensuite on ajoute 1 mL du solvant d'HPLC (eau/ACN (95/5, v/v) et on vortexe. Enfin, on filtre à 0.2 µm et on transfère dans les vials de HPLC.

Le Tableau 10 récapitule l'ensemble de ces étapes (Cavaillé et al., 2021).

*Tableau 10. Conditions opératoires des étapes de la chaîne analytique de quantification des micropolluants*

<b>1. EXTRACTION</b>
<b>2,5 mL de matrice dans un falcon PP 50 mL</b>
<b>Ajout 0,2 mL de solution cocktail d'étalon interne (à 300 ng/mL)</b>
<b>Absorption des molécules pendant 2 h sous agitation</b>
<b>1,25 mL EDTA (EDTA, 2 H<sub>2</sub>O à 75 g/L)</b>
<b>1,25 mL tampon citrate</b>
<b>(Ac. Citrique, 1 H<sub>2</sub>O à 115,2 g/L + Na<sub>3</sub>Citrate, 2 H<sub>2</sub>O à 232 g/L)</b>
<b>5 mL ACN acidifié à 2 % acide acétique</b>
<b>4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>
<b>Vortex automatique 1 min vitesse max</b>
<b>Centrifugation 5 min 7 100 g</b>
<b>2. PURIFICATION</b>
<b>Phase organique dans falcon PP 15 mL contenant 0,075 g sorbants (mélange PSA et C18 ratio 1/1)</b>
<b>Vortex automatique 1 min vitesse max</b>
<b>Centrifugation 5 min 7 100 g</b>
<b>3. CONCENTRATION</b>
<b>Evaporation sous vide 7 h à 45°C</b>
<b>4. RECUPERATION</b>
<b>1 mL eau/ACN (95/5, v/v)</b>
<b>5. FILTRATION</b>
<b>Filtration avec filtre acétate de cellulose 0,2 µm</b>
<b>6. ANALYSE</b>
<b>Sous-traitance ICT Toulouse (conditions analytiques décrites §4.4.4)</b>

#### **4.4.4 Analyse**

Enfin, l'analyse, par UHPLC-MS-MS en ionisation positive, est sous-traitée à la plateforme de spectrométrie de masse à l'Institut de Chimie de Toulouse. La quantification est réalisée par la méthode d'étalonnage interne (ajout d'étalons interne en début de la chaîne analytique) et avec une gamme d'étalonnage comprise entre 0 et 300 ng/mL et suis le protocole décrit dans (Gonzalez-Salgado et al., 2020).

La chromatographie liquide a été réalisée en utilisant un système Ultimate 3000 UHPLC de Dionex (France). 10 µL d'échantillon sont été injectés sur une colonne ACQUITY UPLC HSS (High Strength Silica) T3 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) de Waters. La température a été maintenue à 35°C et le débit était de 0,6 ml min<sup>-1</sup>. La phase mobile était composée du solvant 1 (HCOOH 0,1% dans l'eau pure) et du solvant 2 (HCOOH 0,1% dans l'ACN) avec le gradient suivant : 0–0,5 min 95/5, 0,5–7 min 95 /5 à 0/100, 7–8 min 0/100, 8–8,2 min 0/100 à 95/5 et 8,2–9,5 min 95/5 (rapports exprimés en rapports solvant 1/ solvant 2). La détection a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse triple quadripôle linéaire hybride Applied Biosystems Sciex QTRAP® (Foster City, États-Unis) équipé d'une interface Turbolon-Spray.

## 4.5 Séquençage

Des échantillons critiques ont été identifiés pour le séquençage de l'ADN. L'ADN a été extrait à l'aide du kit 'Fast DNA spin kit for soil' combinant des méthodes mécaniques et chimiques, suivant la procédure du fabricant. Deux cycles de TissueLyzer II (Qiagen) ont été effectués (3 min à 30 Hz avec 5 min de refroidissement sur glace entre les deux). Les amorces 515F-Y 5' GTGYCAGCMGCCGCGGTAA et 926R 5' CCGYCAATTYMTTTRAGTTT ont été utilisées pour amplifier la région hypervariable V4-V5 de l'ARNr 16S bactérien et archéen. Système torrent ionique S5 a été utilisé pour effectuer un séquençage à haut débit, conformément aux instructions du fabricant. Les séquences brutes ont été traitées et analysées. Ces analyses ont été réalisées par la plateforme Get-BioPuces.

## 5 Exploitations des données et bilans matières

Les performances des procédés sont comparées avec la campagne référence MAD pour évaluer l'intérêt d'un co-traitement thermophile anaérobie ou aérobie. Cela suppose que les mesures soient suffisamment précises et que les bilans DCO soient vérifiés (cf. Equation 4). De plus, la dégradation aérobie éventuelle en MAD-TAR peut être évaluée en traçant la somme  $DCO_{boue_{sortie}}$ ,  $DCO_{CH_4}$  et  $DCO_{Accumulé}$  (dans le réacteur) en fonction de  $DCO_{boue_{entrée}}$  (cf. la Figure 26). Compte tenu du mode d'alimentation discontinue et des variations de quantité d'alimentation, les données sont cumulées sur l'ensemble de la période d'essai.

Notons que l'évaporation est prise en compte seulement pour MAD-TAR qui avait le maximum de l'évaporation à cause de l'aération. La valeur maximum estimée est 10 g/j en supposant que le gaz sortant du réacteur est saturé d'eau et le condenseur ne fonctionne pas (cf. Equation 6).

$$\text{Equation 4 : } g DCO_{boue_{entrée}} = g DCO_{boue_{sortie}} + g DCO_{CH_4} + g DCO_{Accumulé}$$

$$\text{Equation 5 : } g DCO_{Accumulé} = \frac{V_{i+1}[Purege_{i+1}] - [Purge_i]V_i}{(i+1)-i}$$

$$V_{i+1} = V_i + V_{entrée} - V_{évaporé} - V_{sortie}$$

$$Y = \frac{p_w}{p_t} = \frac{N_w}{N_s + N_w}$$

Où  $Y$ ,  $p_w$ ,  $p_t$ ,  $N_w$  et  $N_s$  sont la fraction molaire d'eau dans le gaz sorti, la pression partielle de vapeur d'eau, la pression totale, les moles d'eau et les moles de gaz sec respectivement.

$$\text{Equation 6 : } Flux_{évaporé en MAD-TAR.max} = Débit_{aération} \times Y / (1-Y)$$

$$Y \text{ à } 20 \text{ °C (sortie de condenseur)} = 0,023$$

A titre de validation, la Figure 26 permet de visualiser le bilan DCO pour les campagnes MAD (Figure 26a) et MAD-TAD (Figure 26b) en présentant la somme des sorties en fonction de la somme des entrées.

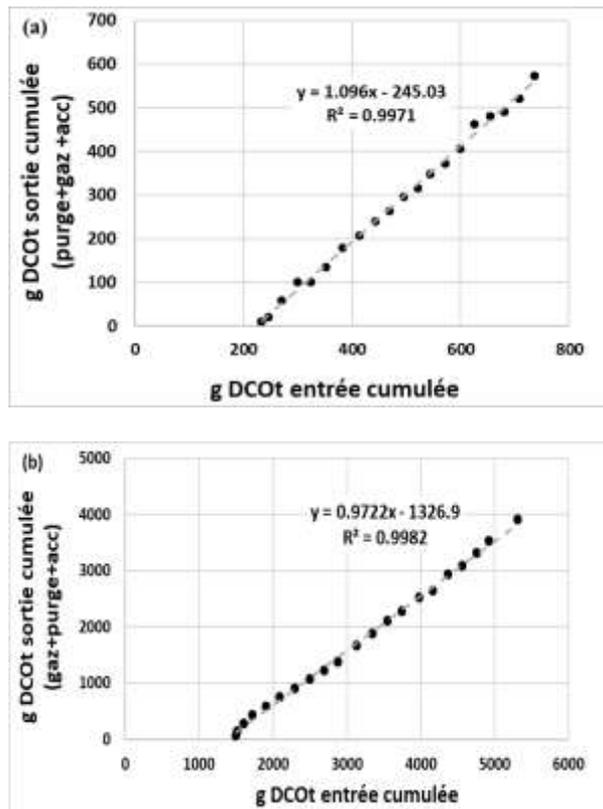


Figure 26. Bilan DCO- campagne MAD (a), MAD-TAD (b)

L'erreur observée sur les campagnes MAD et MAD-TAD (cf. Figure 26), campagne pour lesquelles toutes les sorties sont quantifiables, est inférieure à 10% et permet de valider les méthodes de caractérisations mises en œuvre au cours de cette étude.

## 6 Modélisation : modèle ADM1\_B (Modifications apportées au modèle initial ADM1)

Cette section a pour objectif de présenter le modèle utilisé comme base pour la modélisation des réacteurs expérimentaux, en utilisant AQUASIM®, un outil qui permet de simuler les processus de manière flexible. Nous avons apporté des modifications le rendant plus adapté pour la modélisation de la digestion d'une boue ayant subi une étape d'acidogénèse.

Bien que le modèle ADM1 (cf. Annexe 2 : Modèle ADM1 ) intègre le processus d'acidogénèse (Batstone et al., 2002), il a été développé essentiellement pour prédire la production de méthane. Dans notre étude, une partie de la modélisation concerne le réacteur d'acidogénèse qui produit l'alimentation pour nos réacteurs, sous forme de boue ayant subi une étape d'acidogénèse. Il était donc nécessaire de disposer d'un modèle adapté à la fois pour la modélisation de la fermentation jusqu'à l'étape d'acidogénèse, ainsi que pour les réacteurs anaérobies où les processus biologiques se déroulent entièrement jusqu'à la production de méthane. L'application d'ADM1 à des systèmes non méthanogènes nécessite des modifications (Antonopoulou et al., 2012).

Dans les sections suivantes, les modifications apportées au modèle simple ADM1 et ayant conduit au modèle ADM1\_B utilisé dans cette étude sont présentées.

## 6.1 Formation et dégradation de lactate et d'éthanol

De nombreux auteurs ont modifié ADM1 pour l'adapter aux substrats ou à la fermentation acidogène. L'inclusion de lactate et d'éthanol a déjà été utilisée avec succès pour décrire la fermentation acidogène à partir de biodéchets (Antonopoulou et al., 2012; Mazeghrane et al., 2013). L'inclusion de lactate pourrait être bénéfique dans la simulation de substrats complexes riches en glucides (Satpathy et al., 2016). En effet, de nombreuses études ont affirmé que les déchets alimentaires pourraient constituer un substrat potentiel pour la fermentation lactique en raison de leur teneur élevée en amidon (Li et al., 2015; Ye et al., 2008).

Le lactate et l'éthanol ont ainsi été intégrés dans le modèle en tant que nouveau produit de l'assimilation des glucides (cf. Figure 27).

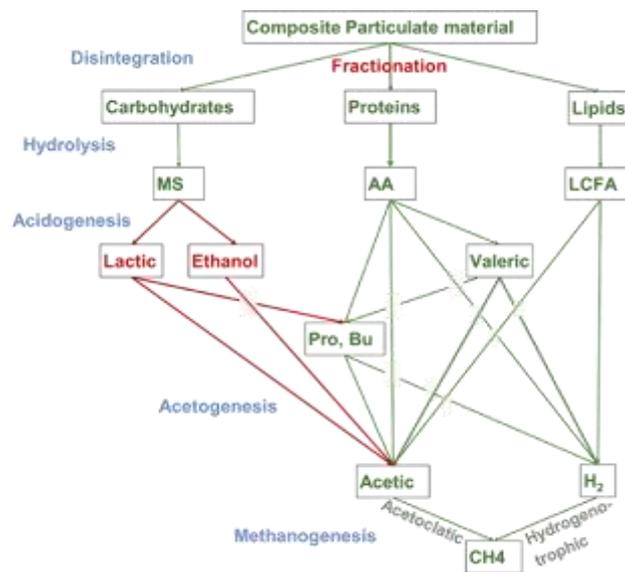
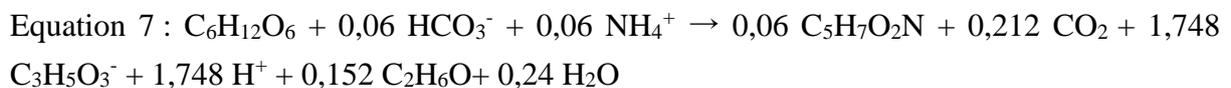
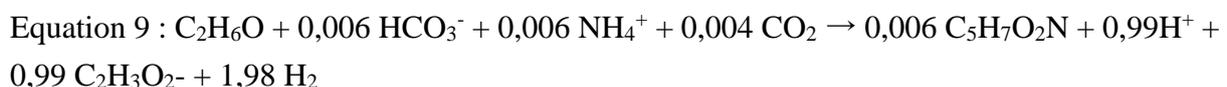
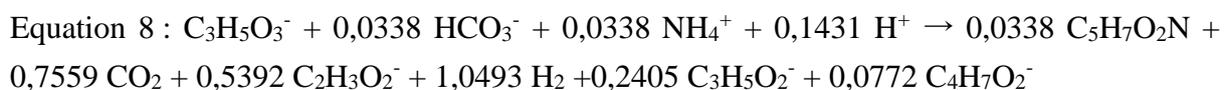


Figure 27. Flux de DCO dans ADM1\_B avec inclusion de lactate, d'éthanol et de ses produits de dégradation

La dégradation des glucides ( $C_6H_{12}O_6$ ) est ensuite modélisée à l'aide d'une stœchiométrie donnant six produits, comme le montre l'Equation 7 où  $C_5H_7O_2N$  représente la biomasse microbienne.



Lors de la dégradation du lactate, du dioxyde de carbone, de l'hydrogène, de l'acétate, du propionate et du butyrate se forment (Equation 8). La dégradation de l'éthanol produit de l'acétate et du H<sub>2</sub> (Equation 9). De nouvelles populations bactériennes sont ajoutées dans le modèle d'assimilation du lactate et de l'éthanol (respectivement  $X_{la}$  et  $X_{eth}$ ).



Les rendements de biomasse des populations  $X_{su}$ ,  $X_{la}$  et  $X_{eth}$  et les rendements des produits d'assimilation de sucres, de lactate et d'éthanol sont estimés pour maintenir les mêmes proportions stœchiométriques d'ADM1 pour la biomasse ( $X_{su\_ADM1} = X_{su} + X_{la} + X_{eth}$ ).

Les paramètres cinétiques d'assimilation du lactate et de l'éthanol sont présentés dans le Tableau 12. Pour les autres réactions métaboliques, les paramètres cinétiques de l'ADM1 ont été utilisés (cf. Annexe 2 : Modèle ADM1).

## 6.2 Effet du pH sur l'hydrolyse

L'effet du pH sur les activités microbiennes est pris en compte dans le modèle ADM1\_B. Il a également été ajouté pour les populations nouvellement implémentées ( $X_{la}$  et  $X_{eth}$ ) avec les mêmes fonctions. Le taux d'hydrolyse est également fonction du pH, un pH presque neutre entraînant une meilleure hydrolyse que des conditions acides (voir équation 10) (Zhang et al., 2005).

$$\text{Equation 10 : } f(pH_{hyd}) = \begin{cases} \text{if } pH < 7: & 0.05 + (1 - 0.05) \cdot \exp\left(-3 \cdot \left(\frac{pH-7}{7-5.5}\right)^2\right) \\ \text{if } pH > 7: & 1 \end{cases}$$

## 6.3 Influences de la température

- Sur les équilibres Gaz/Liquide : l'influence de T est prise en compte via l'effet de la température sur la constante de Henry ( $K_H$ )

$$Q_i = k_L a (S_{liq} - K_H p_{gaz})$$

$Q_i$  : Taux de transfert de masse spécifique du gaz i ( $\text{mol L}^{-1} \text{j}^{-1}$ )

$k_L a$  : Coefficient de transfert de masse global multiplié par la surface de transfert spécifique ( $\text{j}^{-1}$ )

$K_{H, \text{composé}} = (a/1,013) \times (\exp(\Delta H_0_{K_H, \text{composé}} \times ((-1/298,15) + (1/T_{K_{liq}})))) \times R_g \times T_{K_{liq}}$  (voir le Tableau 11).

**Tableau 11. Paramètres des constantes de Henry ( $K_H$ )**

Composé	a	$\Delta H_0_{K_H, \text{composé}}$ (J)
CH <sub>4</sub>	0,0014	1700
CO <sub>2</sub>	0,034	2400
H <sub>2</sub>	0,00078	500
NH <sub>3</sub>	61	4200

- Sur les équilibres chimiques : l'influence de T est prise en compte sur les  $pK_a$  des équilibres acide/base des couples CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>, etc.

Par exemple:

$$K_a = [H^+] \times [HCO_3^-] / [CO_2]_{eq}$$

$$K_{a,CO_2} = 10^{-(6.583-12.3 \times (T_{c,liq}/1000) + (163.5 \times (T_{c,liq}/1000)^2 - (646 \times (T_{c,liq}/1000)^3))}$$

$$K_{a,NH_3} = 10^{-(10.019 - 0.0302 \times T_{c,liq})} \quad (\text{Musvoto et al., 2000})$$

#### 6.4 Estimation des paramètres et validation du modèle

Les paramètres concernant le modèle ADM1\_B modifié pour mieux inclure l'étape acidogénèse (l'ajout de lactate et éthanol) ont été calibrés à l'aide de données expérimentales provenant d'expériences en usine pilote semi-industrielle continue traitant des biodéchets.

La validation du modèle ADM1\_B a été réalisée à l'aide des données expérimentales de réacteurs conduits en laboratoire. Le modèle a donc été confronté à différentes valeurs de pH et fractionnements de l'intrant, notamment des pH acides (jusqu'à 4,9) comme peuvent l'être des boues issues d'acidogénèse. Cela correspond à l'objectif de modification de l'ADM1 afin de le rendre plus adaptable aux substrats présentant de telles conditions.

Les concentrations de substrat, le pH de l'alimentation et les débits ont été saisis comme vecteurs temporels pour représenter la variabilité du substrat et du HRT tout au long de l'opération, en fonction des données opérationnelles. Les conditions initiales (biomasse microbienne active initiale par exemple) ont été fixées aux mêmes valeurs pour toute l'expérience.

Tous les changements dans les paramètres cinétiques de l'ADM1 sont résumés dans le Tableau 12.

Notons que ce modèle pourrait être utilisé pour différents types de substrats à condition que le fractionnement de la matière organique soit spécifié. Ainsi ADM1\_B sera validé sur notre boue acidogénèse en comparant les résultats de la simulation avec ceux expérimentaux dans le chapitre III.

**Tableau 12. Liste des paramètres stoechiométriques de ADMI\_B**

Paramètres	Description	Valeur	Source
$K_{S,la}$	Constante de demi-saturation	0,3 gCOD/L	
$K_{S,eth}$	Constante de demi-saturation	0,5 gCOD/L	
$Y_{la}$	Rendement de conversion du substrat en biomasse	0,056 gCODx/gCODla	
$Y_{eth}$	Rendement de conversion du substrat en biomasse	0,01 gCODx/gCODeth	
$K_{dec, Xla}$	Constante de décès	0,02 d <sup>-1</sup>	(Batstone et al., 2002)
$K_{dec, Xeth}$	Constante de décès	0,02 d <sup>-1</sup>	
$K_{a, la}$	Coefficient d'équilibre acido-basique	$1,3804 \times 10^{-4}$	
$K_{a, eth}$	Coefficient d'équilibre acido-basique	$1,2589 \times 10^{-16}$	
$f_{ac\_la}$	Rendement de production d'acétate à partir de lactate	0,3809 gCODac/gCODla	Calibration
$f_{pro\_la}$	Rendement de production de propionate à partir de lactate	0,2973 gCODpro/gCODla	Calibration
$f_{bu\_la}$	Rendement de production de butyrate production à partir de lactate	0,1364 gCODbu/gCODla	Calibration
$f_{la\_su}$	Rendement de production de lactate production à partir de sucre	0,92 gCODla/gCODsu	Calibration
$f_{CO2\_la}$	Rendement de production de CO <sub>2</sub> production à partir lactate	0,7221 molCO <sub>2</sub> /molla	Calibration
$f_{H2\_la}$	Rendement de production de H <sub>2</sub> production à partir de la lactate	0,1853 gCODH <sub>2</sub> /gCODla	Calibration
$f_{ac\_eth}$	Rendement de production d'acétate production à partir de l'éthanol	0,6667 gCODac/gCODeth	Calibration
$f_{H2\_eth}$	Rendement de production de H <sub>2</sub> production à partir de l'éthanol	0,3333 gCODH <sub>2</sub> /gCODeth	Calibration
$f_{CO2\_eth}$	Rendement de production de CO <sub>2</sub> production à partir de l'éthanol	- 0,01 molCO <sub>2</sub> /moleth	Calibration
$C_{la}$	teneur en carbone	0,03125 molC/gCODla	
$C_{eth}$	teneur en carbone	0,02083 molC/gCODeth	
$\mu_{max\_Xac}$	Taux de croissance maximal des méthanogènes acétoclastes	0,2 d <sup>-1</sup>	Calibration

## **RESULTATS**



# **Chapitre III. Etude expérimentale des performances de procédés combinés MAD-TAD et MAD-TAR et modélisation dynamique du MAD**

# 1 Introduction

Dans les différentes approches visant à augmenter la biodégradation de matière organique, le prétraitement thermique à une température d'environ 65 °C a été identifié comme une stratégie prometteuse. Par exemple, l'étude de Héry et al. (2010) a démontré les effets bénéfiques de ce prétraitement sur l'activité de biodégradation, notamment grâce à la sélection de bactéries hydrolytiques thermophiles. Ainsi, le prétraitement thermique est un moyen de perturber les liaisons complexes de molécules réfractaires de boue qui nécessitent beaucoup d'énergie pour être hydrolysées et ainsi d'améliorer l'accessibilité des composés organiques pour les microorganismes (Gahlot et al., 2022).

Notons qu'un prétraitement thermique conduit entre 140-200 °C génère des molécules solubles réfractaires indésirables (e.g. mélanoïdines, composés issus de réactions de Maillards, etc.) (Faixo et al., 2021).

Hasegawa et al. (2000) propose, sur une boue stérilisée à 120 °C pendant 15 minutes, un prétraitement aérobie à 0,4 vvm (volume d'air/volume du réacteur/minute) ou microaérobie à 0,08 vvm de 24h avant la digestion. Si aucun effet bénéfique n'a été constaté lors de la digestion de la boue prétraitée en condition aérobie (0,4 vvm), dans le cas de la microaération (0,08 vvm) une production de biogaz de 300 mL/gMV a été observée au bout de 10 jours de digestion anaérobie, soit une augmentation de 50% par rapport au témoin sans prétraitement.

L'idée de générer une synergie entre l'activité des micro-organismes thermophiles aérobies et celle des micro-organismes anaérobies a été mise en œuvre dans un système combiné, appelé MAD-TAR (Dumas et al., 2010; Gonzalez-Salgado et al., 2020). Dans cette configuration, une boue digérée dans le compartiment anaérobie mésophile conventionnel (MAD) est envoyée dans un réacteur thermophile aéré (TAR) avec un temps de séjour court, puis recirculée dans le MAD pour que la dégradation anaérobie se poursuive. La configuration MAD-TAR générerait un effet combiné de la température et de l'oxygène améliorant la biodégradabilité intrinsèque de la boue. Dans ces deux études, on observe une amélioration significative du rendement de dégradation de la matière organique (9,1% et 26,2% d'amélioration en termes de DCO<sub>t</sub>) en procédé hybride MAD-TAR par rapport au digesteur mésophile conventionnel (Dumas et al., 2010; Gonzalez-Salgado et al., 2020). L'étude dans le cadre du projet SMS menée par (Gonzalez-Salgado et al., 2020) a ainsi vérifié l'efficacité de cette combinaison MAD-TAR observée précédemment à échelle de laboratoire, sur une boue primaire de station d'épuration urbaine à une échelle pilote industriel de volume total 16 fois supérieur à celui de l'étude de Dumas et al. (2010).

Les performances des procédés de digestion dépendent des populations microbiennes en présence. Yu et al. (2014) a révélé que les Méthanosæta (une population acétoclaste importante) ne peuvent pas se développer dans un milieu avec une concentration de propionate supérieure à 16 ppm. Par conséquent, il est essentiel de suivre la concentration des AGVs.

L'objet de ce chapitre est d'étudier le potentiel de réduction de la production de boues d'un réacteur combinant un digesteur de boues conventionnel (mesophilic anaerobic digester ou MAD) avec un traitement thermophile microaérophile (thermophilic micro-aerobic reactor ou TAR). Pour comprendre si l'aération présente un intérêt, un couplage MAD-TAD (thermophilic anaerobic digester ou TAD) est également étudié. Ainsi, nous avons cherché à

examiner l'effet individuel de la température et de la présence d'oxygène sur la phase de la mise en régime et la phase stable pour étudier les performances des couplages de processus.

Une des spécificités de notre étude, est d'utiliser comme intrant du digesteur une boue mixte de station d'épuration ayant subi une première étape de fermentation acidogène (temps de séjour de 10 jours) et dont la fraction soluble générée, dont les acides gras volatils font partie, a été enlevée pour être valorisée en tant que tel. Il en résulte qu'une partie facilement biodégradable est déjà éliminée. Il s'agit alors de caractériser le potentiel méthanogène de la fraction solide résiduelle mais surtout d'étudier le potentiel du procédé hybride pour réduire la fraction résiduelle et pour surproduire du biogaz.

Ainsi, ce chapitre est divisé en deux parties :

- Une première partie qui analysera les observations expérimentales obtenues sur trois procédés : un réacteur mésophile de digestion anaérobie (MAD) qui servira de témoin ; un procédé hybride couplant un réacteur thermophile anaérobie (TAD) au réacteur MAD pour étudier l'effet d'un passage à une température de 55 °C ; un procédé hybride couplant un réacteur thermophile aérobie (TAR) au réacteur MAD pour étudier l'effet température/aération.
- Une deuxième partie s'attachera à préciser le fonctionnement dynamique de la référence MAD. Il est en effet important de prendre en compte les caractéristiques de l'inoculum utilisé puisque celui-ci est apporté en quantité non négligeable lors du démarrage du procédé. De même, il est important de qualifier l'alimentation particulière apportée (boues de digestion acidogène). Ce travail sera réalisé par modélisation utilisant le modèle ADM1\_B (voir chapitre II, §6). Il permettra donc de distinguer le devenir de la matière organique de l'alimentation de la dynamique de celle de l'inoculum.

## **2 PARTIE UNE : Etude expérimentale des performances de procédés combinés MAD-TAD et MAD-TAD**

### **2.1 Plan d'expérience**

#### **2.1.1 Présentation des objectifs**

Dans le cas des digesteurs hybrides, la boue est acheminée vers un compartiment thermophile, que ce soit sans (MAD-TAD) ou avec (MAD-TAR) l'injection d'oxygène dans le compartiment associé. Les performances, sur notre boue spécifique (prédigérée pour extraire les AGVs), d'un MAD, d'un MAD-TAD et d'un MAD-TAR sont étudiées, évaluées et comparées sur les critères suivants :

- 1) Élimination de matière organique entrée ( $DCO_t$ ) et degré d'hydrolyse de la matière organique.
- 2) Production du méthane.
- 3) Solubilisation de matière organique particulaire.
- 4) Robustesse de la phase de démarrage vis-à-vis de l'accumulation d'AGVs ou de  $NH_3$ .

La campagne de digestion mésophile conventionnelle, MAD, est utilisée comme référence dans notre étude.

Ainsi, nous comparerons nos résultats avec des études antérieures réalisées lors du post-doc de Claire Dumas (Dumas et al., 2010) et au cours du programme de recherche SMS (Gonzalez-Salgado et al., 2020). Ces comparaisons nous permettront de vérifier la transposabilité des résultats sur cette boue qui, étant déjà en partie dégradée pendant la phase d'acidogénèse, est moins biodégradable.

Dans la partie suivante, nous décrivons les conditions opératoires, l'origine des substrats et des inocula.

### **2.1.2 Conditions de l'expérimentation**

Le résumé de conditions opératoires, des caractéristiques de l'alimentation et de l'inocula, dans notre étude (SAVE) ainsi que dans les études précédentes, (Dumas et al., 2010) et SMS (Gonzalez-Salgado et al., 2020), est présenté dans le Tableau 13.

Tableau 13. Conditions opératoires de notre étude (SAVE) et des études précédentes

Paramètre		SAVE			(Dumas et al., 2010)		SMS	
		MAD	MAD-TAD	MAD-TAR	MAD	MAD-TAR	MAD	MAD-TAR
Température (°C)		35	35 (MAD) 50 (TAD)	35 (MAD) 55 (TAR)	35	35 (MAD) 65 (TAR)	35	35 (MAD) 60 (TAR)
Temps de séjour (j)		17,1	14,7 (MAD) 1,0 (TAD)	14 ± 1 (MAD) 1,0 (TAR)	21 et 42	21 et 42 (MAD) 1,0 (TAR)	19,6	22,4 (MAD) 0,9 (TAR)
Volume Liquide (L)		8	44 (MAD) 7 (TAD)	44 (MAD) 7 (TAR)	18	16 (MAD) 2 (TAR)	300	260 (MAD) 40 (TAR)
Alimentation	Origine	Boue mixte ayant subi une acidogénèse			Boue secondaire générée sur une boue activée de laboratoire		Boue primaire de station d'épuration	
	Biodégradabilité (tests BMP)	42%			44%		n.d.	
	$DCO_t$ (gO <sub>2</sub> /L)	52,8 ± 1,5	56,8 ± 4,2	52,9 ± 6,5	52,9 ± 4,7	8,6 ± 7,5	24,2 ± 4,6	20,2 ± 4,6
	$DCO_s$ (gO <sub>2</sub> /L)	3,1 ± 0,4	2,6 ± 0,5	2,7 ± 0,6	2,6 ± 0,3	0,05 ± 0,03	0,63 ± 0,12	0,45 ± 0,15
	MVS/MES	0,63	0,63	0,62	0,82	0,83	0,84	0,82
Origine de l'inoculum		Digestat mésophile issu de la station d'assainissement de Toulouse-Ginestous		digestat obtenu en fin de campagne MAD-TAD	-		digestat issu du démonstrateur SOLIDIA et des boues secondaires (v/v 50/50)	digestat obtenu en fin de campagne MAD
Charge organique (état stationnaire) $kg_{DCO}m^3j^{-1}$		3,3	3,7	4,0	0,41	0,41	1,2	0,9

## 2.2 Résultats

Les performances des digesteurs MAD, MAD-TAD et MAD-TAR sur la boue spécifique ayant subi une pré-digestion en acidogénèse sont présentées en termes d'évolutions temporelles de  $DCO_t$ ,  $DCO_p$  (afin de mettre en évidence la solubilisation ou l'hydrolyse de matière particulaire) et de la production de biogaz (Figure 28 à Figure 31).

L'analyse des résultats obtenus en digestion conventionnelle (§2.2.1) permet de poser les bases de comparaisons avec les procédés hybrides (§b), notamment en ce qui concerne la dynamique de mise en régime. Enfin l'ensemble des performances en régime stationnaire sera discuté pour évaluer les conséquences directes et indirectes de la température et de la présence ou non d'aération (§2.3).

### 2.2.1 Performance de digestion de la référence MAD

Les Figure 28 et Figure 29 présentent les évolutions temporelles de  $DCO_t$  et  $DCO_p$ . De plus, la Figure 30 présente d'une part la production du méthane et d'autre part toute la matière sortie ou accumulée dans le réacteur et ce en données cumulées pendant la durée de la campagne. L'étude de la production de biogaz en fonction de la  $DCO_t$  cumulée alimentée en phase stabilisée (cf. Figure 31) ainsi que le calcul des proportions des éléments solubles et particuliers pendant cette période nous permettent d'analyser le devenir de la matière organique (voir la Figure 32). Le Tableau 14 résume les performances du réacteur.

La Figure 28 et la Figure 31 montrent qu'au bout de 30 jours, la variation de la concentration en matière organique en sortie et de la vitesse de la production du biogaz sont négligeables. De plus, la vitesse de production de biogaz reste constante tout au long de la campagne (voir Figure 31). On peut donc considérer que le réacteur MAD est dans une phase stabilisée, tout du moins d'un point de vue macroscopique, à partir du 30<sup>ème</sup> jour. Environ 27% de la matière particulaire est solubilisée et 30% de la matière organique de l'alimentation est éliminée et convertie en biogaz dans la phase stabilisée (voir Figure 32 et Tableau 14).

La concentration totale des AGVs dans le surnageant est restée inférieure à 0,2 g/L pendant la phase stabilisée et aucune accumulation d'AGVs n'a été observée. Le pH est resté stable (entre 7 et 7,2) au cours de la campagne.

La production de méthane lors de la digestion mésophile de cette boue ( $229 \text{ m}^3 \text{ CH}_4$  par tonne de MVS) est sensiblement inférieure aux valeurs usuelles moyennes reportées pour la dégradation obtenue pour une boue mixte ( $395 \text{ m}^3 \text{ CH}_4$  par tonne de MV) (Couturier et al., 2001). De plus, un travail de synthèse réalisé à Irstea sur les données des différentes études sont présentés sous forme de boîtes à moustaches sur la Figure 33 (Jean-Marc Perret, 2020).

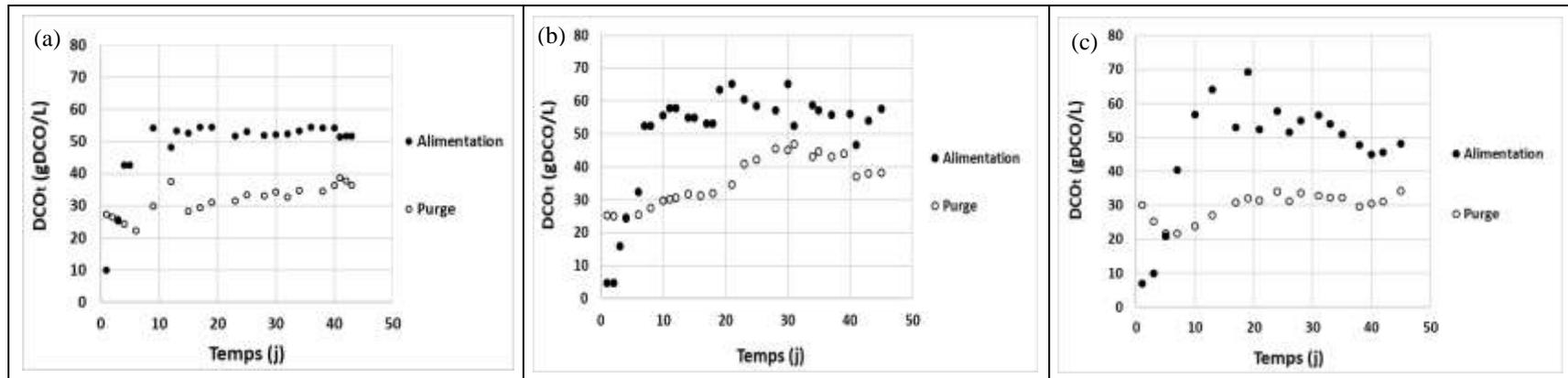


Figure 28 : Concentrations de la matière organique totale en entrée et dans la purge, exprimées en  $gDCO_t/L$  – (a) campagne MAD, (b) campagne MAD, (c) campagne MAD-TAR.

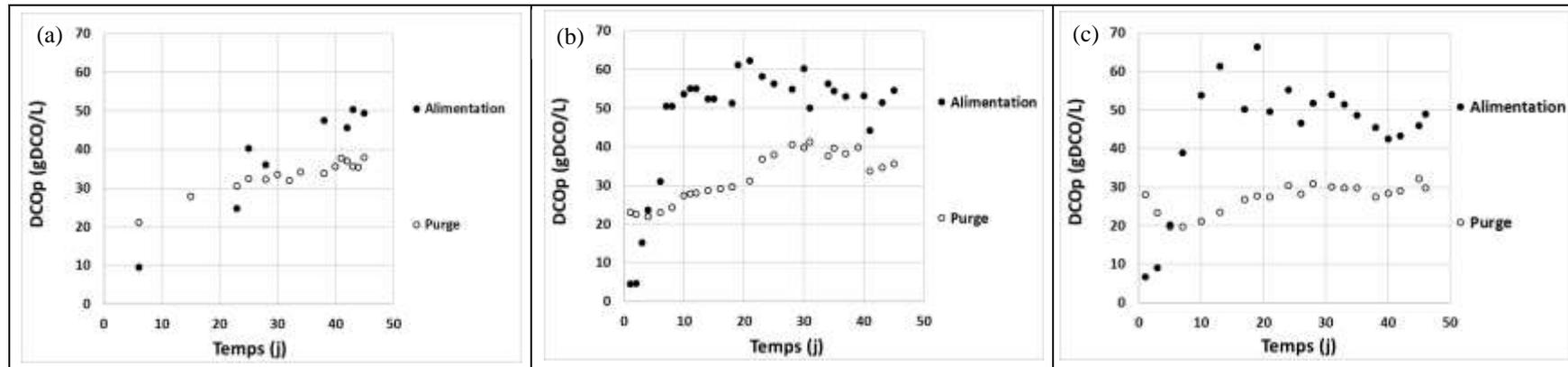


Figure 29 : Concentrations de la matière particulaire en entrée et dans la purge, exprimées en  $gDCO_p/L$  – (a) campagne MAD, (b) campagne MAD, (c) campagne MAD-TAR.

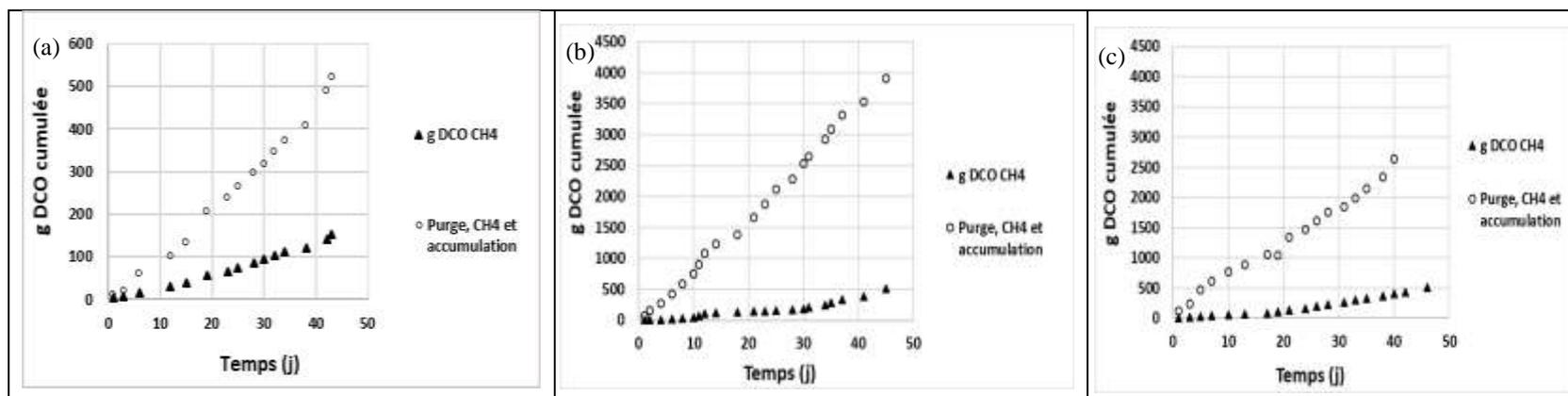


Figure 30 : Masse cumulée de DCO totale sortie (intégrant la masse accumulée ou pas dans le réacteur en régime transtoire) et contribution du méthane à ce flux - (a) campagne MAD, (b) campagne MAD, (c) campagne MAD-TAR.

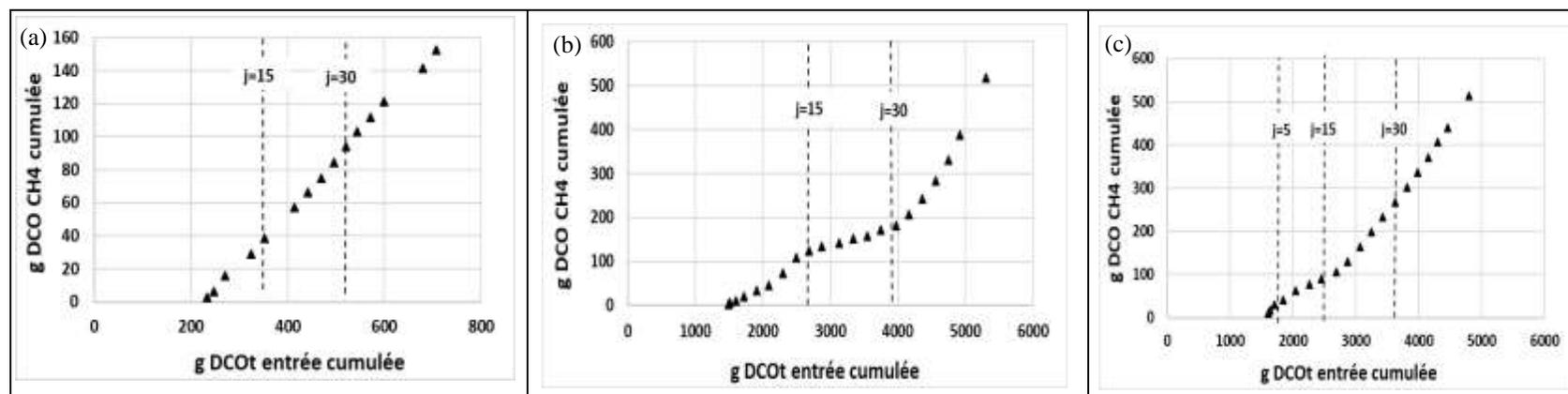


Figure 31 : Production cumulée de biogaz exprimée en DCO en fonction de la DCO totale entrant- (a) campagne MAD, (b) campagne MAD-TAD, (c) campagne MAD-TAR. N.B.1 : l'abscisse à l'origine (supérieure à zéro) correspond à la quantité de DCO, introduite via l'inoculum. N.B.2 : les périodes de 15 jours ont été marquée en pointillé pour faciliter la mise en correspondance avec les informations temporelles

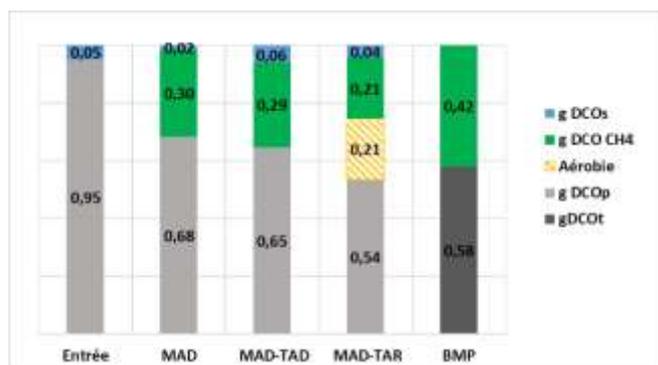


Figure 32. Devenir de 1 g DCO<sub>t</sub> de l'alimentation en phase stabilisée dans notre étude (SAVE – boue mixte après acidogénèse) - la dégradation aérobie est estimée par le bilan DCO et marquée en hachuré

Tableau 14. Performance des digesteurs en %- campagne MAD, MAD-TAD et MAD-TAR

Campagne	MAD	MAD-TAD	MAD-TAR
$\gamma_{\text{hydrolyse}}$ (gDCO <sub>p</sub> /gDCO <sub>t</sub> )	27 %	30 %	41 %
$\gamma_{\text{CH}_4}$ (gDCO <sub>CH4</sub> /gDCO <sub>t</sub> )	30 %	29 %	21 %
$\gamma_{\text{élimination}}$ (gDCO/gDCO <sub>t</sub> )	30 %	29%	42%

Il est clair sur la Figure 33 que le potentiel méthanogène des boues primaires est bien plus élevé que celle des boues mixtes. Notre boue ayant subi une étape de prédigestion acidogénèse s'apparente plus, en termes de potentiel méthanogène, aux boues biologiques qui résultent d'un traitement aérobie. Il sera donc important de prendre en compte cette spécificité lors de la comparaison des résultats (§b) avec l'étude SMS, dans laquelle une boue primaire a été utilisée comme substrat.

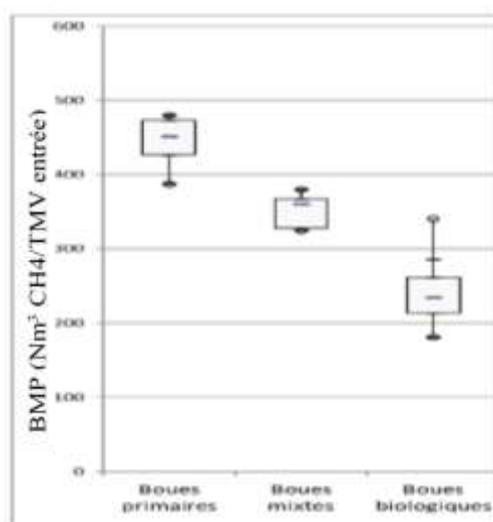


Figure 33. Représentation statistique de type « boîtes à moustaches » des résultats de tests BMP réalisés sur différents types de boues d'épuration (Boues primaires N=6 ; Boues mixtes N=9 ; Boues biologiques N=15)(Jean-Marc Perret, 2020)

## 2.2.2 Performance de digestion du MAD-TAD et MAD-TAR

### a) Devenir de la matière organique

L'analyse des performances des réacteurs MAD-TAD et MAD-TAR se fait de la même façon que pour le réacteur MAD, au travers des Figure 28, Figure 29, Figure 30, Figure 31 et Figure 32.

En ce qui concerne les évolutions temporelles des grandeurs mesurées, les points de différences avec le MAD sont les suivants :

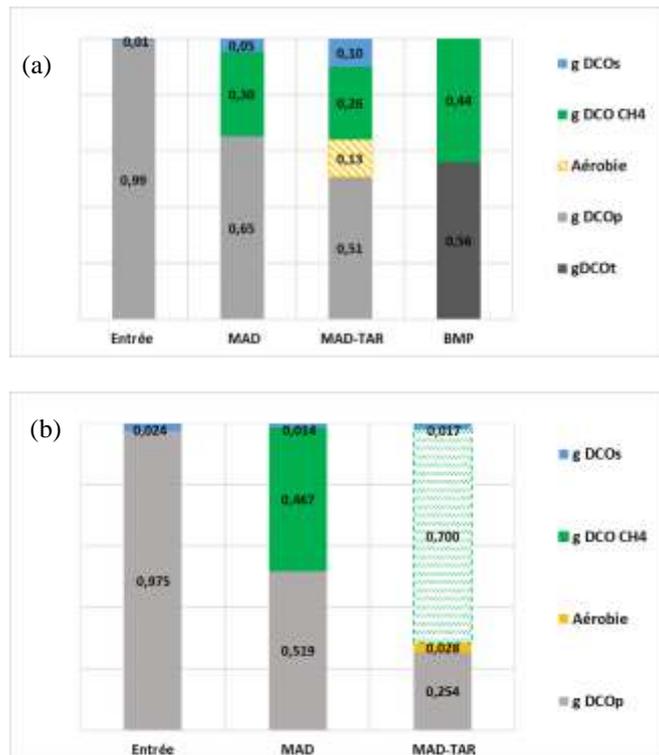
Alors que la vitesse de production du biogaz reste constante dans le cas du MAD, des variations sont visibles dans les campagnes MAD-TAD et MAD-TAR (voir la Figure 31).

La Figure 32 présente le devenir de la DCO pour le MAD, le MAD-TAD et le MAD-TAR ainsi que pour un BMP. Lorsqu'on étudie le résiduel de DCO particulaire, on constate tout d'abord que la configuration MAD conduit à une dégradation inférieure à celle du BMP. On observe également que le procédé combiné MAD-TAR élimine significativement plus de DCO<sub>p</sub> que les autres procédés. Le résiduel de DCO<sub>p</sub> pour le MAD-TAD est seulement légèrement inférieur à celui du MAD et supérieur à celui du BMP. En revanche, lorsqu'on étudie la conversion de la DCO en méthane, le MAD-TAR montre la plus faible valeur. Cela est dû à une élimination d'une part de la DCO dans le compartiment aérobie. Cela peut être une consommation aérobie et/ou une volatilisation de méthane. Cette volatilisation est très difficile à mesurer du fait du débit important d'air qui dilue cette émission potentielle. On remarque aussi un peu plus de DCO soluble pour les deux procédés combinés.

On retient donc que le MAD-TAR permet une dégradation avancée de la matière organique particulaire mais qui ne se traduit pas par une augmentation de la production de méthane dans notre cas et même engendre une diminution du méthane récupérée dans le digesteur anaérobie. La configuration MAD-TAD améliore faiblement la solubilisation de la matière particulaire, cependant elle ne permet d'une dégradation avancée par rapport au MAD.

### b) Comparaison avec des résultats antérieurs

La Figure 32 présente le devenir d'un gramme de DCO<sub>t</sub> de l'alimentation dans notre étude et les Figure 34a et b proposent le même mode de représentation respectivement pour les études de Dumas et al. (2010) et SMS (Gonzalez-Salgado et al., 2020) en phase stabilisée.



**Figure 34. Devenir de 1 gDCOt de l'alimentation en phase stabilisée dans l'étude de (a) (Dumas et al., 2010) et (b) SMS (la production de biogaz est calculée par le bilan DCO et représenté en hachuré) (Gonzalez-Salgado et al., 2020)**

En analysant ces résultats nous pouvons calculer les améliorations apportées par les procédés hybrides par rapport à la configuration MAD, comme indiqué dans le Tableau 15.

**Tableau 15. Amélioration des couplages MAD-TAR et MAD-TAD par rapport au MAD (référence) dans notre étude et les études précédentes**

Etude	MAD-TAD (SAVE)	MAD-TAR (SAVE)	MAD-TAR (SMS)	MAD-TAR (Dumas et al., 2010)
% Amélioration de $\gamma_{hydrolyse}$	3	14	26,5	14
% Amélioration de $\gamma_{élimination}$	-1	12	26,2	9
% Amélioration de $\gamma_{CH4}$	-1	-9	23,3*	-4

\* estimé par bilan matière

En ce qui concerne la configuration MAD-TAR :

- 1) L'aération et par conséquent la dégradation aérobie et/ou une synergie entre populations et/ou phénomènes physico-chimiques ont permis d'améliorer l'hydrolyse de la matière particulaire. Notons que pour l'étude SMS (Gonzalez et al. 2020), le taux de consommation d'oxygène mesuré au niveau du TAR était de  $7,5 \pm 0,8 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , ce qui correspond seulement à 3,9 % de la DCO totale éliminée qui a été dégradée en conditions aérobies. Cette valeur est à comparer avec les 26,5% d'amélioration de la

dégradation du matériel particulaire. Clairement, le bilan ne bouclait pas, sans doute lié à des problèmes de mesure et quantification.

- 2) Nous avons observé une diminution de 9% de la production de biogaz dans le MAD-TAR par rapport au MAD. Cette baisse confirme les résultats précédemment obtenus dans l'étude menée par Dumas et al. (2010). Toutefois, notre étude montre une diminution plus significative de la production de biogaz (9% au lieu de 4% pour Dumas et al. (2010)).

Dans la partie suivante, les processus intervenant au sein des procédés vont être analysés pour tenter de comprendre les différences observées dans les performances. Les profils de concentrations en AGVs et du pH seront analysés tout d'abord. Puis nous ferons un focus sur les processus intervenant au sein du TAD et du TAR.

### **2.2.3 Evolution des concentrations en AGVs dans les réacteurs**

Les graphiques de pH et les concentrations en AGV au cours du temps sont représentés sur la Figure 35.

On peut constater sur la Figure 35 que lors de la campagne MAD, le pH demeure constant et qu'aucune accumulation d'AGV n'est notée. A contrario, on observe une accumulation importante d'AGVs pour le MAD-TAD (pic au 28<sup>ème</sup> jour) et pour le MAD-TAR (pic au 20<sup>ème</sup> jour). Ces accumulations sont associées à une baisse de pH concomitantes, le pH atteignant des valeurs voisines de 6,7. Les AGVs les plus concentrés en MAD-TAD et MAD-TAR sont l'acétate, le propionate, le butyrate et l'iso-valérate. En revanche, seul l'acétate est détecté dans le MAD et ce, en très faible concentration. Notons que pendant la période d'accumulation des AGVs, la vitesse de production de biogaz est ralentie (voir les Figure 31 et Figure 35). L'accumulation d'acétate et de propionate est souvent observée dans les digesteurs thermophiles instables (Ryue et al., 2020). La principale raison invoquée dans la revue bibliographique de Ryue et al. (2020) pour expliquer l'instabilité des digesteurs anaérobies thermophiles est l'utilisation d'un inoculum non acclimaté aux conditions thermophiles. D'autres effets sont possibles dans le couplage d'un traitement thermophile ou thermophile microaéré. La température et l'aération modifient en effet plusieurs équilibres : l'équilibre entre les formes de CO<sub>2</sub> et donc le pH, qui lui-même impacte l'équilibre des formes ammoniacales, etc.

Pour comprendre les effets du traitement combiné, ces processus devront être étudiés. Cela fera l'objet du prochain chapitre en utilisant une modélisation dynamique.

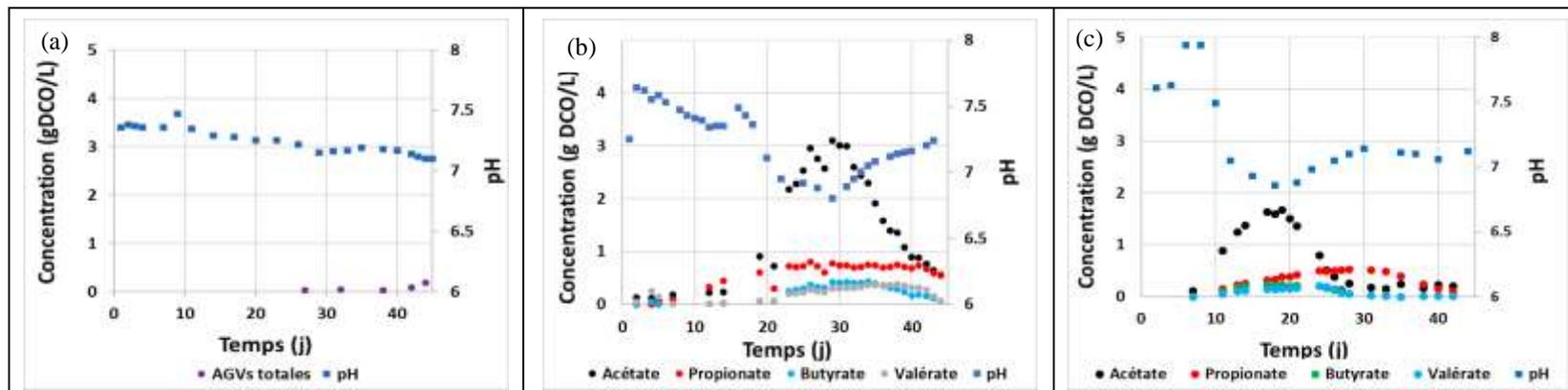


Figure 35. Evolution de pH et des concentrations des AGVs- campagne MAD (a), MAD-TAD (b) et MAD-TAR (c)

## **2.3 Conclusion de la partie 1**

Dans ce chapitre, nous avons présenté les performances obtenues en digestion anaérobie pour les trois configurations : MAD, MAD-TAD et MAD-TAR. Ces configurations ont pour but d'étudier le couplage d'une digestion mésophile (MAD) avec un procédé thermique sans (TAD) ou avec microaération (TAR). Nous avons pour objectif de vérifier les résultats obtenus en laboratoire et sur site lors d'autres études. Notons que dans chacune de ces études, des boues à traiter différentes ont été utilisées (boues secondaires, boues primaires et boues mixtes ayant subi déjà une acidogénèse).

Après analyse des résultats, nous pouvons établir les conclusions suivantes :

- L'amélioration de l'hydrolyse de la matière particulaire a été confirmée dans la configuration MAD-TAR. Elle n'est cependant pas observée dans la configuration MAD-TAD. On peut donc vraisemblablement conclure que l'aération joue un rôle majeur dans l'amélioration du rendement d'hydrolyse de la matière particulaire. Nous ne pouvons pas conclure à ce stade si ce rôle est direct (effet de l'oxygène permettant de développer une activité microbienne aérobie) ou indirect (effet de l'aération sur le pH ou autre facteur).
- La production de méthane est affectée par la configuration MAD-TAR mais pas par la configuration MAD-TAD. Le MAD-TAD présente des performances similaires au MAD. La présence du TAR peut induire une activité biologique aérobie spécifique. Le flux d'air peut également induire une perte de méthane qui, de par la dilution, n'est pas quantifiable dans nos conditions expérimentales.
- Pour les configurations MAD-TAD et MAD-TAR, une accumulation transitoire d'AGVs est observée qui peut conduire à une défaillance de la digestion. Aucune accumulation significative n'est observée sur le MAD. Ces accumulations indiquent que l'effet du TAD et du TAR perturbent les populations indigènes. Nous essaierons de comprendre ces rôles grâce à une étude de modélisation théorique développée dans le chapitre IV. Cette modélisation abordera les questionnements d'un couplage de procédés et l'impact sur la flore microbienne de chacune des étapes de la digestion anaérobie.
- La température peut jouer un rôle dans les phénomènes physiques, notamment sur le transfert gaz-liquide et la solubilité même si l'effet de ces processus sur les transformations microbiennes reste à confirmer. Ce questionnement fera l'objet du prochain chapitre (chapitre IV).

## **3 PARTIE DEUX : Modélisation dynamique du MAD : rôle de l'inoculum**

### **3.1 Introduction**

Les résultats du chapitre précédent ont mis en évidence des comportements dynamiques pour les activités microbiennes entraînant pour le MAD-TAD et le MAD-TAR des accumulations

transitoires d'AGVs. Ces comportements sont liés certainement à une dynamique des concentrations cellulaires des différentes populations microbiennes. Celles-ci peuvent résulter d'une part des populations, que l'on va qualifier d'exogènes, provenant de l'inoculum ajouté initialement et de l'alimentation apportée régulièrement et, d'autre part, des croissances nettes (incluant décès et purge) des microorganismes au sein du réacteur. Avant de considérer l'influence des procédés couplés (MAD et TAD/TAR) sur les populations microbiennes, il nous a semblé intéressant d'analyser l'influence de l'inoculum et de l'alimentation sur les réponses de produits formés. Cela permettra de découpler les effets d'apports de cellules exogènes des effets des traitements imposés par le réacteur couplé, MAD- TAD ou TAR.

***Base de notre réflexion :***

Un bilan sur un substrat donné pour un réacteur homogène en régime permanent conduit à :

$$Q \times (S_e - S) = r_s \times V = \frac{\mu}{Y} \times X \times V$$

On voit donc, au travers de cette simple équation, que le flux éliminé dépend de X, la concentration en cellules actives pour le substrat S.

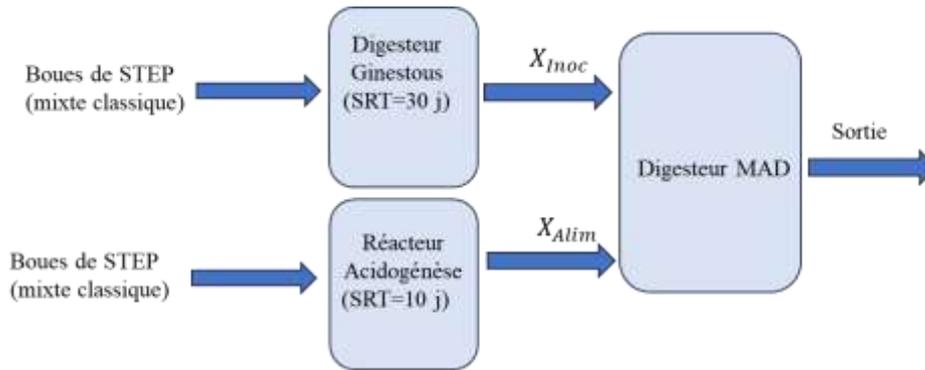
Cet aspect est particulièrement crucial lors du démarrage d'une installation. Les cellules proviennent soit de l'alimentation, soit d'un apport externe (inoculum).

Nous allons donc étudier l'effet de la quantité de ce X\_actif pour chaque population microbienne identifiée dans notre modèle, dans les conditions d'un procédé dont le substrat entrant a subi un prétraitement (dark fermentation).

Le modèle ADM1\_B présenté dans le chapitre II (§6) va être utilisé ici, sur notre boue spécifique dans la campagne MAD. La séquence suivante va être adoptée :

- Le modèle ADM1\_B va tout d'abord être utilisé pour établir la composition de l'inoculum en populations microbiennes telles que supposées dans ce modèle. Le digesteur ayant fourni l'inoculum est simulé en régime permanent et la composition des populations est alors récupérée. Elle sera utilisée pour la modélisation du MAD.
- Le modèle ADM1\_B va ensuite être utilisé pour établir la composition microbienne de l'alimentation. Le digesteur ayant fourni cette alimentation est lui aussi simulé en régime permanent et la composition de sortie de ce réacteur est utilisée pour l'alimentation du MAD.
- On effectue la simulation du MAD avec les compositions de l'inoculum et de l'alimentation (déterminées dans les étapes précédentes) avec le modèle ADM1\_B. On pourra comparer les résultats simulés avec ceux issus de l'expérience.
- On profitera de cette démarche pour indiquer la concentration minimale en cellules de l'inoculum devant être apportée pour assurer un démarrage sans problème du digesteur anaérobie.

La Figure 36 présente le schéma de la filière considérée.



**Figure 36. Illustration de la démarche utilisée pour estimer les concentrations des populations microbiennes présentes dans l'inoculum exogène et dans l'alimentation pour la modélisation d'un digesteur conventionnel « MAD »**

### 3.2 Fractionnement de la matière organique (populations microbiennes et substrats)

Nous allons utiliser le modèle ADM1\_B, tel que décrit dans le chapitre II (§6). Les paramètres cinétiques et stœchiométriques sont les paramètres estimés sur un substrat acide de type biodéchet (chapitre II, §6.4). Nous allons donc focaliser notre travail sur la qualification des entrées.

Les principales questions qui se posent pour la modélisation dynamique du réacteur MAD concernent :

- La composition en populations microbiennes de l'inoculum apporté (le reste de la matière organique de l'inoculum est négligé du fait d'une biodégradabilité faible, voir Tableau 16).
  - La composition de l'alimentation, à la fois en substrats et en micro-organismes
- a) Estimation de la concentration des espèces de la boue activée ( $X_{Inoc\_MAD}$ ) et des fractions biochimiques de la DCO\_substrats.

Pour obtenir la composition de la biomasse microbienne de l'inoculum externe (digesteur de Ginestous) du cas réel, le modèle ADM1\_B a été utilisé, en prenant en compte une boue mixte classique contenant 50 gDCO/L. La composition moyenne de cette boue comprend 43,5% de protéines, 30,6% de lipides et 25,9% de sucres, avec une biodégradabilité de 62% (Astals et al., 2013). Cette modélisation a été réalisée pour un réacteur ayant un temps de séjour hydraulique (HRT) et donc un âge de boue (SRT) de 30 jours et un pH de 7,2. Le Tableau 16 présente la composition de biomasse microbienne de la boue obtenue à la sortie de ce réacteur.

- b) Estimation de la concentration des espèces microbiennes de l'alimentation ( $X_{Alim}$ )

L'alimentation du réacteur MAD consiste en une boue mixte ayant subi une étape d'acidogénèse dans un réacteur anaérobie avec un temps de rétention hydraulique (HRT) de 10 jours, le modèle ADM1\_B a été utilisé pour estimer les concentrations des microorganismes à l'équilibre (voir le Tableau 16). La composition de la boue a été estimée à 85% de sucre et 15% de protéine. La modélisation a été réalisée en utilisant des données expérimentales de DCO<sub>t</sub> de l'alimentation, avec une biodégradabilité de 42%, comme déterminé par quantification du BMP.

**Tableau 16. Composition de biomasse microbienne de l'alimentation et de l'inoculum externe du MAD**

Origine de boue	X <sub>ac</sub> (g DCO/L)	X <sub>c</sub> *	X <sub>prop</sub> (g DCO/L)	X <sub>H2</sub> (g DCO/L)	X <sub>c4</sub> (g DCO/L)	X <sub>fa</sub> (g DCO/L)	X <sub>aa</sub> (g DCO/L)	X <sub>su</sub> (g DCO/L)	Biodégradabilité
Inoculum externe (X <sub>Inoc_MAD</sub> )	0,62	-	0,097	0,282	0,255	0,35	0,659	0,2482	10%
Alimentation (X <sub>Alim</sub> )	1,59×10 <sup>-12</sup>	-	4,3×10 <sup>-12</sup>	0,127	1,35×10 <sup>-7</sup>	0,255	0,51	0,188	42%

\* mis en place pour avoir l'homogénéité avec le tableau suivant

Le Tableau 17 présente les résultats concernant la modélisation de MAD (pour valider notre modèle avec les paramètres par défaut) :

**Tableau 17. Résultats de la simulation du cas réel (MAD)**

$\gamma_{\text{hydrolyse}}$	$\gamma_{\text{CH4}} \text{ OU } \gamma_{\text{élimination}}$
26,3 %	29,6 %

La comparaison des performances obtenues dans le premier cas (Tableau 17) avec les résultats de l'expérience (cf. Tableau 14) nous confirme la concordance du modèle établi pour représenter les résultats du réacteur. La Figure 37 présente l'évolution temporelle des biomasses microbiennes, des AGV et de la production de biogaz dans la modélisation du cas réel. La présence de biomasse microbienne, apportée par l'alimentation et/ou l'inoculum externe (ginestous), est suffisante pour maintenir un processus stable, sans accumulation d'AGV, et avec une population microbienne équilibrée. Cela correspond aux observations expérimentales pendant la campagne MAD.

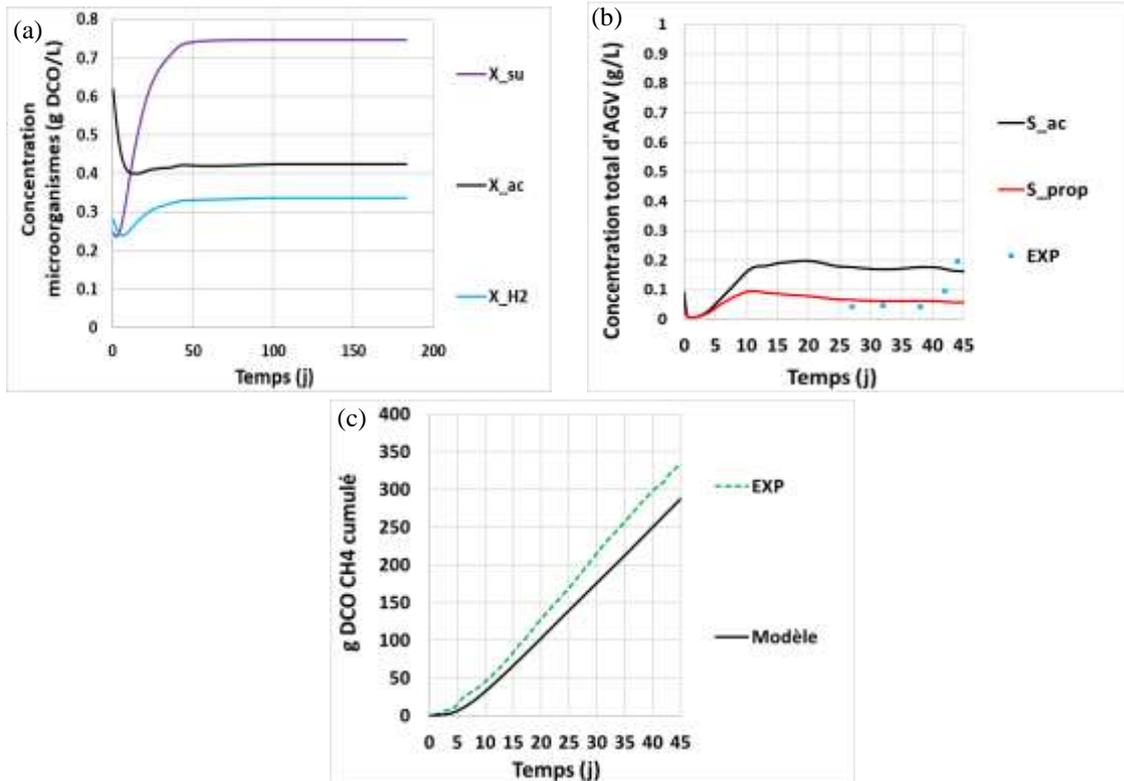


Figure 37. Évolution temporelle des concentrations des biomasses microbiennes (a), des AGVs (b) et de la production cumulée de biogaz (c) dans la modélisation du cas référence (MAD)

### 3.3 Etude théorique de l'effet de la composition en biomasses actives sur la stabilité du digesteur lors du démarrage d'une installation

Nous étudierons alors 4 cas (le schéma de la filière est présenté sur la Figure 36) :

Cas 1 : aucun inoculum externe n'est apporté.

Cas 2 : Pas de biomasse microbienne dans l'alimentation.

Cas 3 : détermination de l'apport minimum d'inoculum pour que le MAD démarre à la charge souhaitée sans accumulation d'AGV.

Cas 4 : détermination de la dynamique de l'augmentation de la charge (la concentration d'alimentation) pour un démarrage stable (voir la Figure 40), lors d'un apport très faible d'inoculum.

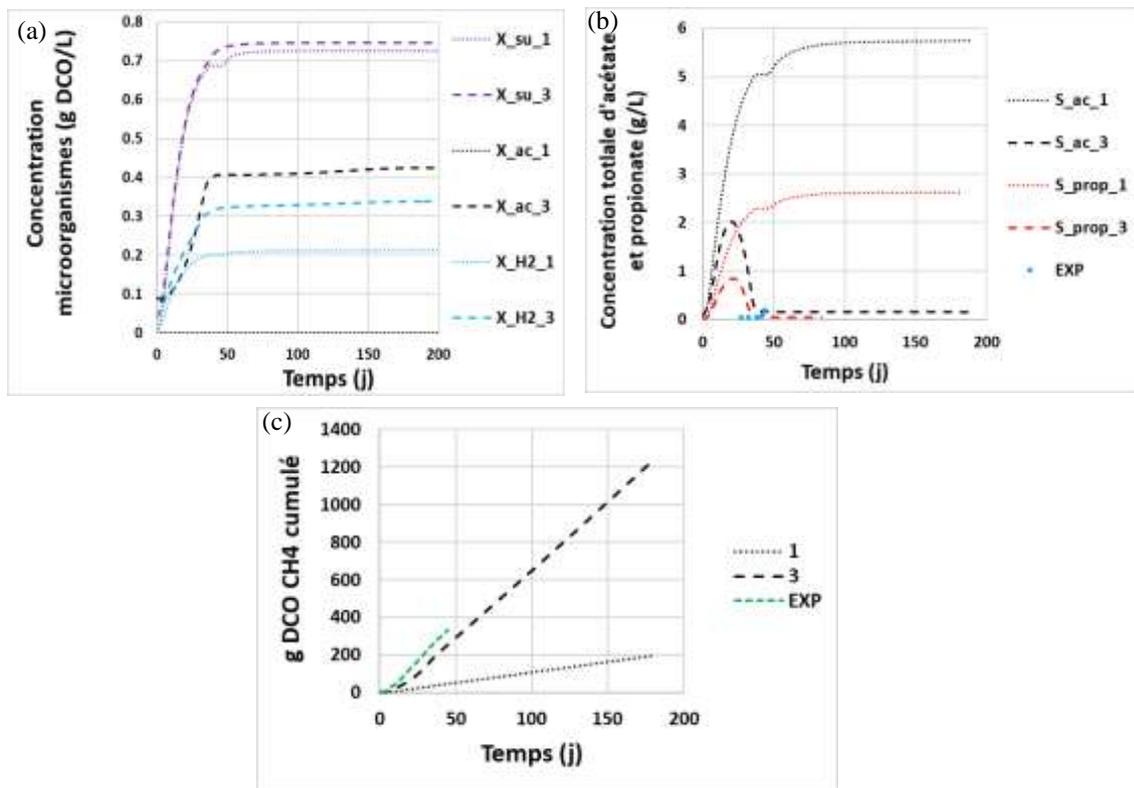
A noter qu'une concentration de 0,9 g/L pour le propionate est considérée comme une valeur limite pour avoir un digesteur stable (Wang et al., 2009). Cette valeur est utilisée pour tester différents scénarios afin de construire les modèles des cas 3 et 4.

Pour simuler ces différents cas, la composition des biomasses microbiennes dans l'inoculum externe ( $X_{Inoc}$ ) et l'alimentation ( $X_A$ ) est ajustée dans chaque simulation. Cette composition est présentée dans le Tableau 18. Il convient de souligner que la diminution des quantités de microorganismes est compensée par la matière complexe ( $X_c$ ).

**Tableau 18. Composition de biomasse microbienne de l'inoculum externe dans les scénarios différents**

Origine de boue/ scénario	X_ac (g DCO/L)	X_c	X_prop (g DCO/L)	X_H2 (g DCO/L)	X_c4 (g DCO/L)	X_fa (g DCO/L)	X_aa (g DCO/L)	X_su (g DCO/L)
X <sub>Inoc_cas 2</sub>	0,62	-	0,097	0,282	0,255	0,35	0,659	0,2482
X <sub>Inoc_cas 3</sub>	0,09	2,1	0,02	0,04	0,04	0,09	0,09	0,04
X <sub>Inoc_cas 4</sub>	0,023	2,4	0,004	0,010	0,009	0,013	0,024	0,009

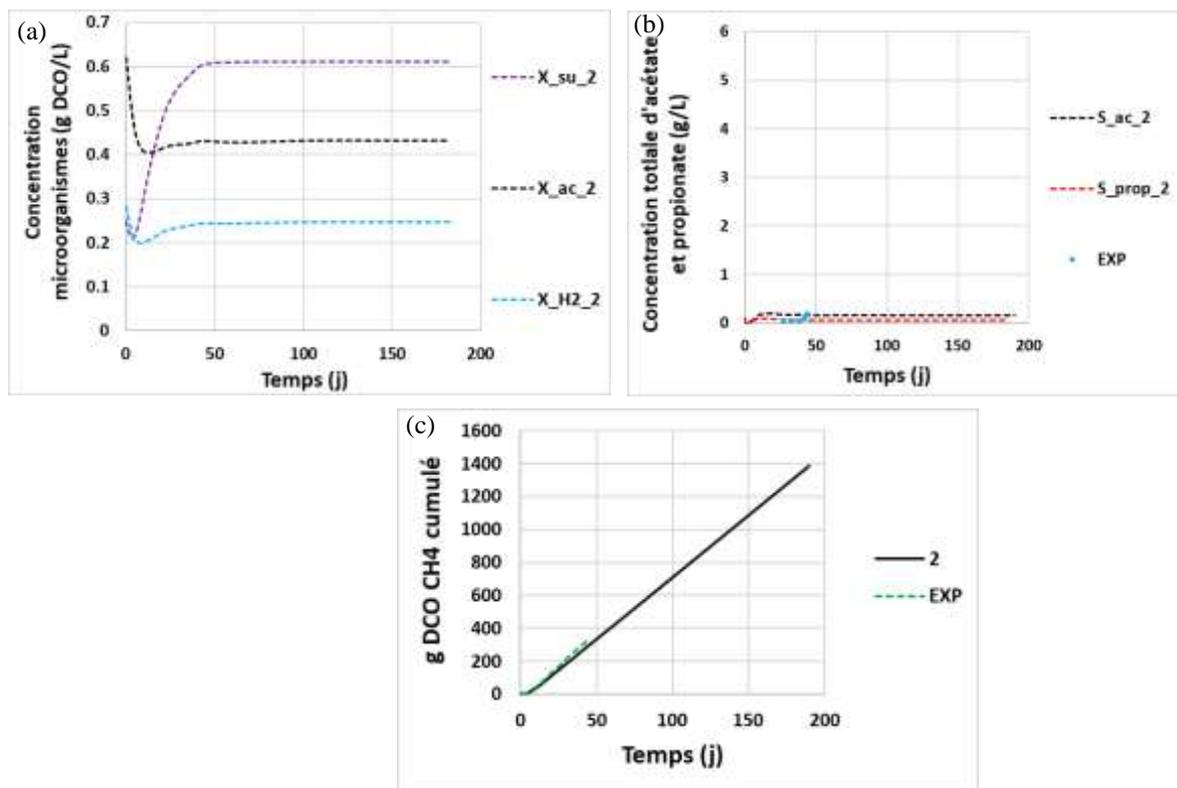
La Figure 38 présente les résultats du scénario1 en termes de répartition des populations microbiennes, d'AGV et de production de méthane.



**Figure 38. Evolution temporelle de : Quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (a) concentration en AGVs (b) et production de biogaz (c) dans les scénarios 1 et 3**

On peut bien constater une accumulation d'AGV sur la Figure 38 dans le scénario '1'. Cette accumulation peut conduire à une défaillance du système du fait de l'inhibition par les AGVs. Cela confirme bien l'effet crucial de l'inoculum externe pour le démarrage d'une installation.

La Figure 39 présente les résultats de modélisation du deuxième scénario.

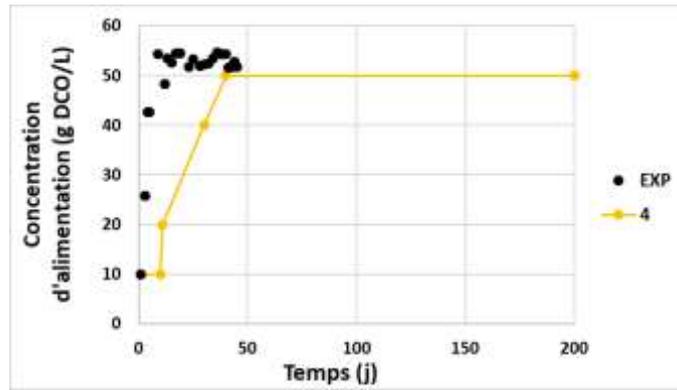


**Figure 39. Evolution temporelle de : Quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (a) concentration en AGVs (b) et production de biogaz (c) dans le scénario 2**

La comparaison des résultats du deuxième scénario (voir la Figure 39) avec ceux du cas réel (voir la Figure 37) montre que la biomasse microbienne présente dans l'alimentation n'a pas d'effet important sur le système puisque l'apport d'inoculum est suffisant pour éviter l'accumulation d'AGV.

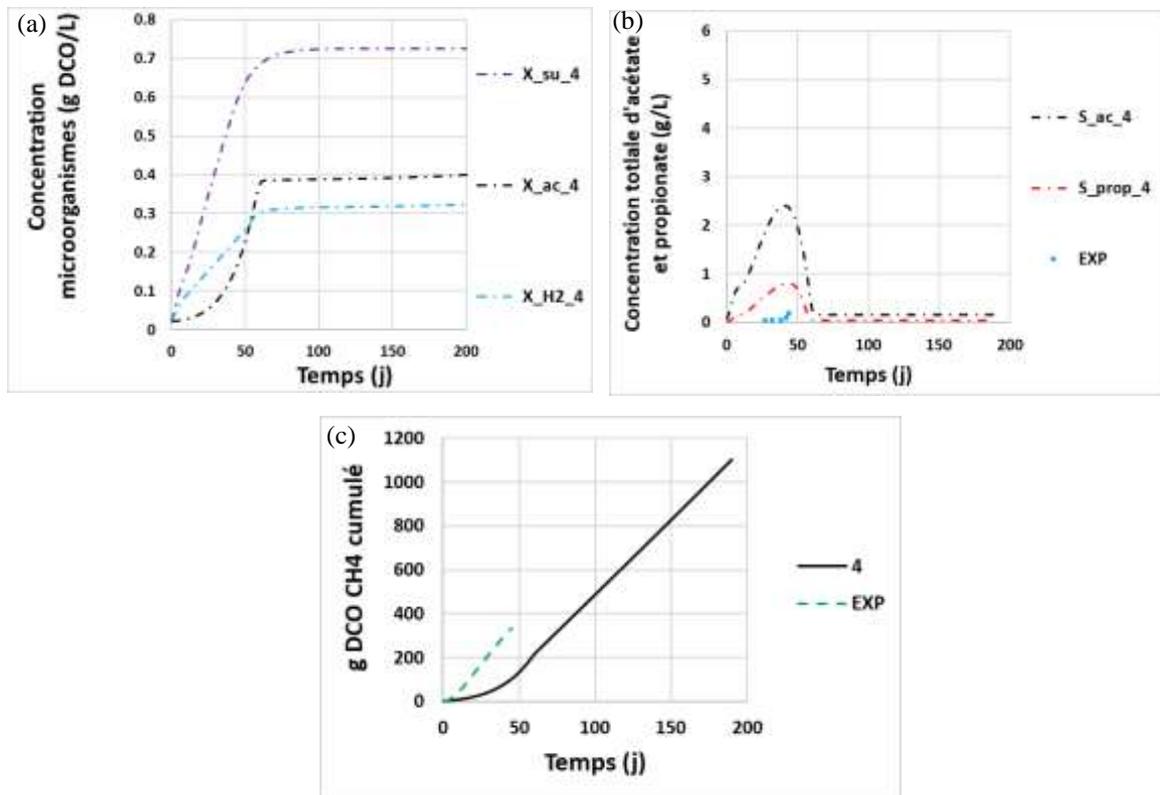
Les résultats du scénario '3' (voir la Figure 38) montrent que les quantités de biomasse testées (7 fois moins que celles du cas réel, cf. la Figure 37 et le Tableau 18) peuvent être considérées comme la valeur minimale pour éviter les instabilités dans le réacteur, étant donné que la concentration de propionate (0,85 g/L) est proche de la valeur critique (0,9 g/L). Notons que la valeur de la concentration critique peut varier en fonction des conditions opératoires et du substrat utilisé.

La Figure 40 présente la charge organique appliquée dans le scénario 4 (augmentation progressive) par rapport au cas réel. Cette augmentation a été obtenue en testant différentes augmentations de charge afin d'avoir le nombre minimum de jours nécessaire pour atteindre la charge réelle et d'éviter une concentration de 0,9 g/L de propionate.



**Figure 40. Concentration d'alimentation pendant la campagne MAD (cas réel) et celle appliquée dans le scénario '4'**

La Figure 41 présente les résultats de modélisation du 4<sup>ème</sup> scénario.



**Figure 41. Evolution temporelle de : Quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (a) concentration en AGVs (b) et production de biogaz (c) dans le scénario 4**

Dans le scénario 4, le temps d'établissement des populations microbiennes n'est pas long pour mettre en place une installation (près de 60 jours pour les méthanogènes, voir la Figure 41). Il est intéressant de constater dans le scénario "4" (Figure 41) que la croissance nous conduit à des concentrations en microorganismes obtenues en régime permanent similaires à celles du cas réel (voir Figure 37a).

### **3.4 Conclusion de la partie 2**

On retient pour cette partie les éléments suivants :

La modélisation du procédé MAD a été mise en place. Le modèle ADM1\_B, résultant de l'adaptation de ADM1, a été utilisé, pour qualifier la composition de l'inoculum et de l'alimentation. Il a également été utilisé pour simuler les variables au cours du temps pour le procédé MAD. Nous avons pu alors montrer que :

- L'apport d'un inoculum externe provenant d'un digesteur anaérobie de boues permet un démarrage du réacteur sans accumulation d'AGVs.
- La quantité d'inoculum apporté lors de notre expérience est en excès par rapport au besoin pour un démarrage stable. Nous aurions pu ajuster cette quantité.
- Pour palier un défaut d'ajout d'inoculum externe, une séquence de montée en charge organique peut être définie. La mise en régime d'un réacteur est alors 60 j, ce qui rend cette stratégie incompatible avec le travail de recherche dans le cadre d'une thèse mais peut-être compatible pour mettre en place une installation.

## **4 Conclusion du chapitre III**

Trois procédés, MAD, MAD-TAD et MAD-TAR ont été mis en œuvre au laboratoire et le suivi analytique a permis de caractériser les performances de chacun de ces procédés. On a pu constater des différences dans le degré d'hydrolyse de la matière, dans les dynamiques d'accumulation des AGVs lors de la phase de démarrage des procédés et dans les productions de méthane. Ces différences résultent de modifications d'activités biologiques, modifications que nous souhaitons mieux comprendre pour identifier l'intérêt du couplage de réacteurs.

Une modélisation avec ADM1\_B a été mise en place. Elle permet, entre autres, de dissocier l'évolution de la matière particulaire de l'alimentation de celle de l'inoculum. Elle a permis de vérifier le bon fonctionnement du procédé conventionnel MAD.

Nous pouvons désormais nous intéresser à la modélisation des deux systèmes hybrides le MAD-TAD et le MAD-TAR (Chapitre IV) avec pour but de comprendre les dynamiques de populations lors de la mise en régime des réacteurs. En particulier, l'effet d'un passage des cellules transitoirement à 55 °C en présence ou absence d'une aération sera étudié.

## **Chapitre IV. Utilisation de la modélisation dynamique pour l'étude de l'influence d'un procédé TAD ou TAR sur les dynamiques des activités microbiennes anaérobies**

# 1 Introduction

Les campagnes qui ont mis en œuvre les procédés sous les configurations MAD-TAD et MAD-TAR ont révélé des différences significatives par rapport au procédé MAD en termes d'accumulation d'AGV et de stabilité du réacteur (voir chapitre III). Des différences ont également été mises en évidence sur les processus d'hydrolyse et les productions de méthane. Ces différences sont intéressantes à analyser pour comprendre les influences probables des procédés combinés. Y a-t-il un effet spécifique, sur les activités microbiennes, de l'exposition séquentielle à une température plus élevée ? Est-ce un effet direct ou indirect de la température ?

Les résultats du chapitre III ont mis en évidence que la quantité d'inoculum et l'équilibre de ses populations apportées lors de notre expérience sont *a priori* suffisants pour éviter, en condition mésophile (MAD), une accumulation d'AGVs. L'augmentation de la biodégradabilité intrinsèque de la matière dans le cas du MAD-TAR, confirmée pour toutes les études réalisées par le laboratoire sur cette technologie (Dumas, SMS et ce travail) est aussi à remarquer. On peut donc penser que le couplage de procédés réalisés, incluant un passage à une température thermophile en condition aérobie ou non, modifie, en dynamique, les activités des populations microbiennes.

Au début de ce travail de thèse, nous avons fait le choix de comparer l'effet d'un couplage entre le MAD et un réacteur uniquement thermophile (MAD-TAD) pour évaluer de manière dissociée l'effet d'un TAD de celui d'un TAR (thermophile et microaérobie). On visait à découpler les effets températures de ceux de l'injection d'air.

Dans ce chapitre, nous proposons successivement une modélisation de chacun de ces deux procédés couplés : MAD-TAD et MAD-TAR. Cette modélisation a pour objectif d'aider à analyser les causes possibles des différences d'observation faites par rapport au MAD. Cet aspect sera traité dans la première partie de ce travail pour le MAD-TAD et dans une deuxième partie pour le MAD-TAR. Dans la troisième partie de ce chapitre, une comparaison entre les deux procédés MAD-TAD et MAD-TAR tentera de caractériser les effets propres de la température et de dissocier cet effet température des effets combinés température et apport d'air.

Une même méthodologie va être appliquée pour les deux premières parties de ce chapitre :

- Construction d'un modèle pour le procédé combiné MAD-TAD puis MAD-TAR.
- Calibration de ce modèle sur nos données expérimentales.
- Elaboration de scénarios permettant d'expliquer les observations expérimentales.
- Proposition d'interprétation des effets du couplage sur les activités microbiennes.

Un point très important doit être pris en compte : dans notre cas d'étude, nous travaillons sur un démarrage d'installation (50 jours). Nous sommes donc dans un régime d'adaptation transitoire des bactéries aux nouvelles conditions opératoires. La modélisation du MAD réalisée dans le chapitre précédent doit donc être prise en compte et nous permettre d'identifier, par comparaison, les effets du procédé couplé.

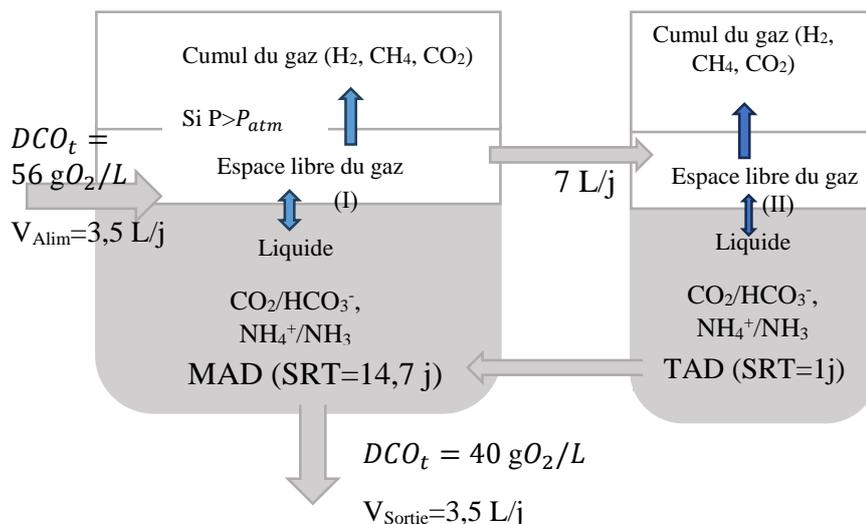
Lorsqu'on étudie un effet température dans les travaux de la littérature, les auteurs travaillent en principe en réacteur continu après régime stabilisé. Les différences de températures sont analysées soit pour des réacteurs en parallèle, soit des réacteurs en série (exemple : le procédé Temperature phased anaerobic digestion (TPAD), combine un réacteur thermophile à court SRT (1–3 jours, 50–70 °C) pour maximiser l'hydrolyse à un réacteur de digestion anaérobie

conventionnel (10–20 jours, 35 °C)) (Lanko et al., 2021). Il faut retenir que, dans notre cas, le passage à température élevée (55°C) est séquentiel et intervient plusieurs fois lors d'un temps de séjour des solides (SRT). Notre procédé et ses effets n'ont donc pas été étudiés dans la littérature.

## 2 Partie1 : Etude du procédé MAD-TAD

### 2.1 Présentation du procédé couplé MAD-TAD (modèle physique)

La configuration du procédé couplé MAD-TAD (cf. chapitre II, §2.1.2), utilisée dans Aquasim, sur laquelle le modèle mathématique a été appliqué, est présentée dans la Figure 42.



**Figure 42. Schéma de la structure du réacteur MAD-TAD**

Comme présenté sur la Figure 42, chaque réacteur est composé d'une partie liquide et de 2 espaces gazeux, l'un servant à définir les transferts gaz-liquide et l'autre permettant l'accumulation (et par là même, la comptabilisation) du biogaz produit. L'espace libre du gaz est considéré comme un gaz idéal et parfaitement mélangé.

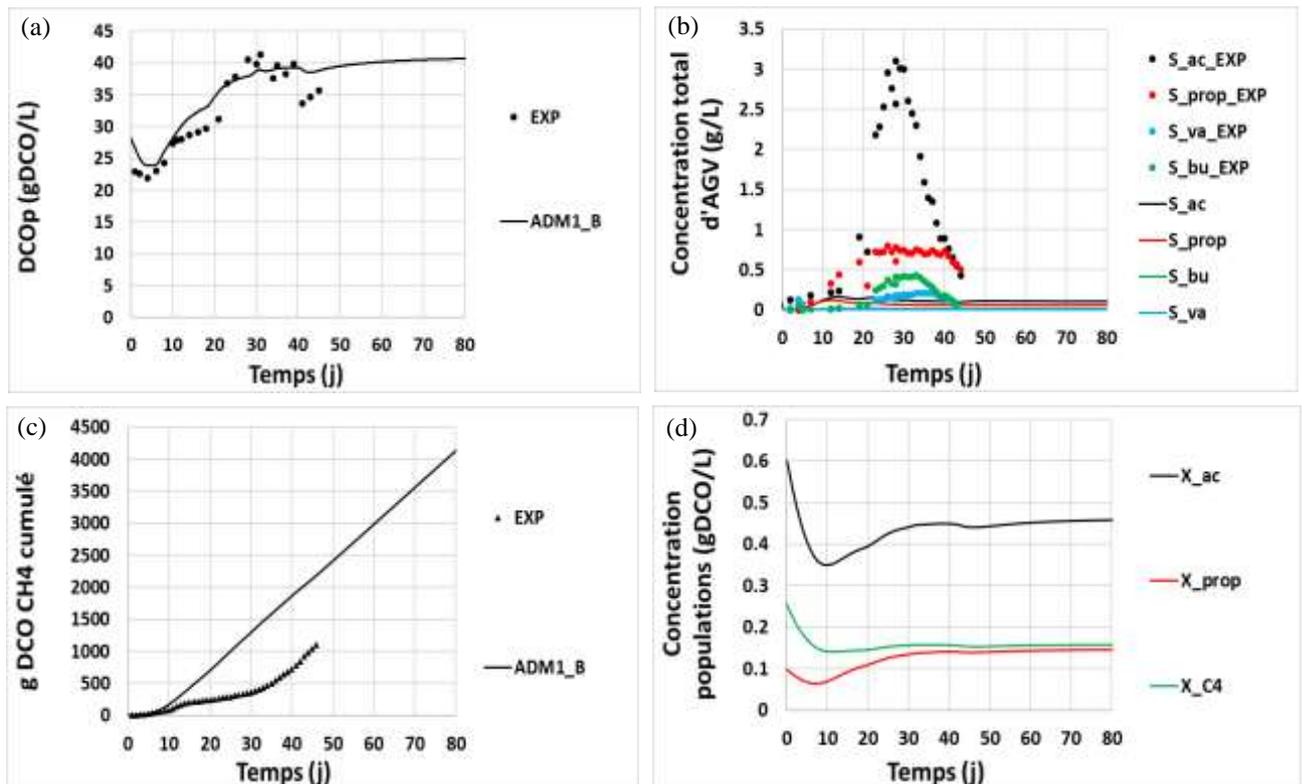
Numériquement, les simulations ont été réalisées avec une recirculation continue, tout en respectant les temps de séjour dans chaque compartiment, de façon à limiter le temps de calcul. La comparaison de cette recirculation continue avec une configuration contenant trois recirculations séquentielles par jour, telles qu'elles étaient réalisées dans l'expérience, ont permis de valider cette adaptation (voir Annexe 3 : Effet de recirculation sur les résultats de simulation).

### 2.2 Résultats du modèle ADM1\_B pour la modélisation du MAD-TAD

Dans cette partie, le modèle ADM1\_B présenté dans le chapitre II (§6) est utilisé comme base de modélisation du procédé MAD-TAD pour évaluer sa capacité à représenter les transformations observées expérimentalement. Le Tableau 19 présente les valeurs des taux de mortalité et de croissance des populations clés du modèle ADM1\_B. Les résultats de ce modèle sont présentés sur la Figure 43.

**Tableau 19. Rappel des valeurs des taux de mortalité et de croissance des populations clés du modèle ADM1\_B**

Population	$K_{m,MAD}$ $K_{m,TAD}$ (gDCO. gDCOx <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	$k_{d,MAD}$ $k_{d,TAD}$ (d <sup>-1</sup> )	$X_0$ (gDCO/L)
$X_{ac}$	5,8	0,02	0,60
$X_{pro}$	10	0,02	0,10
$X_{hy}$	Aucune population hydrolytique	-	-
$X_{c4}$	15,4	0,02	0,25



**Figure 43. Evolution temporelle de : l'hydrolyse de la matière particulaire ( $DCO_p$ ) (a), la concentration en différents AGVs (b), la production cumulée de biogaz (c). Résultats obtenus par simulation avec le modèle ADM1\_B en prenant en compte l'effet de la température sur les équilibres chimiques et les transferts G/L dans le compartiment TAD.**

Sur la Figure 43, la modélisation du procédé MAD-TAD, basée sur le modèle ADM1\_B, ne permet pas de représenter les tendances expérimentales observées surtout en termes d'accumulation d'AGV et de production du biogaz. Nous devons donc faire évoluer ce modèle.

### 2.3 Voies d'optimisation du modèle ADM1\_B

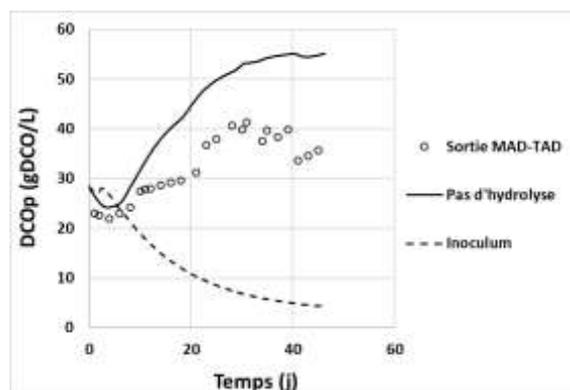
Le Tableau 20 rappelle de manière résumée les observations expérimentales singulières faites au cours de la campagne MAD-TAD (cf. chapitre III, §2.2.2 et 2.2.3) et qui devront être représentées.

**Tableau 20. Résumé des observations expérimentales (notées O1 à O8) au cours de la campagne MAD-TAD**

	Observations expérimentales entre 20 <sup>ème</sup> j ( $\approx$ 3 passages dans TAD) et 30 <sup>ème</sup> j	Observations expérimentales entre 30 <sup>ème</sup> et 45 <sup>ème</sup> j
Hydrolyse de DCO <sub>p</sub>	O1) Diminution de la cinétique d'hydrolyse (voir la Figure 44)	O5) Accélération de la cinétique d'hydrolyse
Propionate, butyrate et valérate	O2) Pic d'accumulation au 30 <sup>ème</sup> jour	O6) reconsommation
Acétate	O3) Pic d'accumulation au 30 <sup>ème</sup> jour	O7) reconsommation
Production de CH <sub>4</sub>	O4) Diminution de production par rapport à 10 premiers jours	O8) Accélération de production

La première étape d'hydrolyse de la matière particulaire conditionne les étapes suivantes. Comme nous travaillons avec un apport d'inoculum important, nous proposons tout d'abord de décrire cette étape et de dissocier l'évolution de la DCO<sub>p</sub> liée à l'inoculum initial de la dégradation de la DCO<sub>p</sub> de l'alimentation.

La Figure 44 présente en parallèle de l'évolution de la concentration en DCO particulaire mesurée expérimentalement, celle de la concentration en DCO<sub>p</sub> si aucune réaction n'intervenait dans le réacteur (courbe qui résulte de l'accumulation de DCO<sub>p</sub> liée à l'alimentation et de la purge de DCO<sub>p</sub> par soutirage), et celle de la DCO<sub>p</sub> de l'inoculum si aucune alimentation n'était réalisée. Cette figure nous permet de constater que l'influence de la DCO<sub>p</sub> de l'inoculum est faible à partir d'environ 20 jours et que les points expérimentaux confirment bien une activité d'hydrolyse biologique. Cette dernière montre une dynamique qui suggère une adaptation progressive des activités au substrat particulaire.



**Figure 44. Evolution temporelle de : la DCO<sub>p</sub> expérimentale dans le réacteur MAD-TAD (soit aussi en sortie du réacteur puisque le réacteur est parfaitement mélangé), de la DCO<sub>p</sub> si aucune hydrolyse n'a lieu et de la DCO<sub>p</sub> de l'inoculum si l'alimentation ne contient pas de DCO<sub>p</sub>.**

Entre le 20<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour, la concentration en DCO<sub>p</sub> augmente avec quasiment la pente du cas où il n'y a pas d'hydrolyse. Cependant, entre le 30<sup>ème</sup> et le 45<sup>ème</sup> jour, l'augmentation de la cinétique d'hydrolyse conduit à une diminution de la DCO<sub>p</sub>. Cette dynamique devra être mieux comprise par la suite et donc analysée plus en détails.

Dans le modèle ADM1\_B, l'hydrolyse est d'ordre 1 par rapport à la concentration en DCO particulaire biodégradable mais d'ordre zéro par rapport à la concentration en cellules impliquées dans l'hydrolyse. Il n'est donc pas possible de représenter un effet thermique sur ces populations. Par conséquent, nous avons ajouté une population hydrolytique ( $X_{hy}$ ) dans le modèle. Des scénarios d'étude de l'hydrolyse sont présentés en Annexe 4 : Etude de l'hydrolyse dans le MAD-TAD.

On peut donc conclure que le modèle élaboré, basé sur ADM1\_B, n'est pas capable de représenter les processus intervenant dans le MAD-TAD. Les effets d'un passage séquentiel à une température élevée doivent être pris en compte.

## 2.4 Propositions de modifications des activités microbiennes liées au passage dans le TAD

Le couplage MAD-TAD étant un procédé innovant et du fait qu'il n'existe pas d'autre étude sur ce sujet, nous nous appuyons sur nos résultats expérimentaux et des constats faits par des auteurs de la littérature pour proposer différentes hypothèses pouvant expliquer l'impact du passage des boues dans le réacteur couplé (TAD).

### 2.4.1 Enoncé des hypothèses mécanistiques

Deux hypothèses principales sont étudiées successivement par l'outil de modélisation :

#### **H1. Augmentation du taux de mortalité au sein du traitement thermophile (Batstone et al., 2002).**

Cette mortalité est tout à fait plausible puisque des microorganismes mésophiles devraient présenter une cinétique de désactivation rapide dans la zone de température thermophile. Par exemple, le taux de décès des *Escherichia coli* est 15 fois plus élevé à 52°C ( $2,00 \text{ j}^{-1}$ ) qu'à 37°C ( $0,13 \text{ j}^{-1}$ ) (Pandey & Soupir, 2011).

La relation  $\log N = f(t)$  est appelée courbe de survie ou cinétique de destruction microbienne. La relation est logarithmique décroissante et on peut écrire :

$\text{Log}(N/N_0) = -(1/D_T) \times t$  où  $N_0$  et  $N$  sont les nombres de microorganisme respectivement initiaux et à l'instant  $t$ .  $D_T$  est le temps de réduction décimale, avec  $T$  la température appliquée. Pour les bactéries non sporulées, les levures et les moisissures, le  $D_{65}$  est inférieur à 30 sec. Même si notre réacteur fonctionne à 55°C, un même ordre de grandeur de valeur pour  $D$  est attendu à cette température. Comme le temps de séjour dans le TAD est de 1 jour, une réduction très significative du nombre de microorganisme viable est probable. On peut ajouter que le taux de traitement, qui est le produit entre la fréquence de traitement et le temps de séjour des microorganismes dans le procédé, est de 2,2. Cette valeur montre que le potentiel de désactivation de l'ensemble des microorganismes dans le procédé couplé est important.

*Par conséquent, pour notre première hypothèse, nous fixerons une valeur de mortalité dans le réacteur TAD élevée et nous étudierons si la re-croissance des différentes populations microbiennes dans le MAD permet de stabiliser leurs concentrations dans le réacteur et si les observations dynamiques sur les variables peuvent être fidèlement représentées.*

## **H2. Prise en compte de deux types de populations pour certains microorganismes : l'une thermo-sensible (Ts) et l'autre thermo-résistante (Tr)**

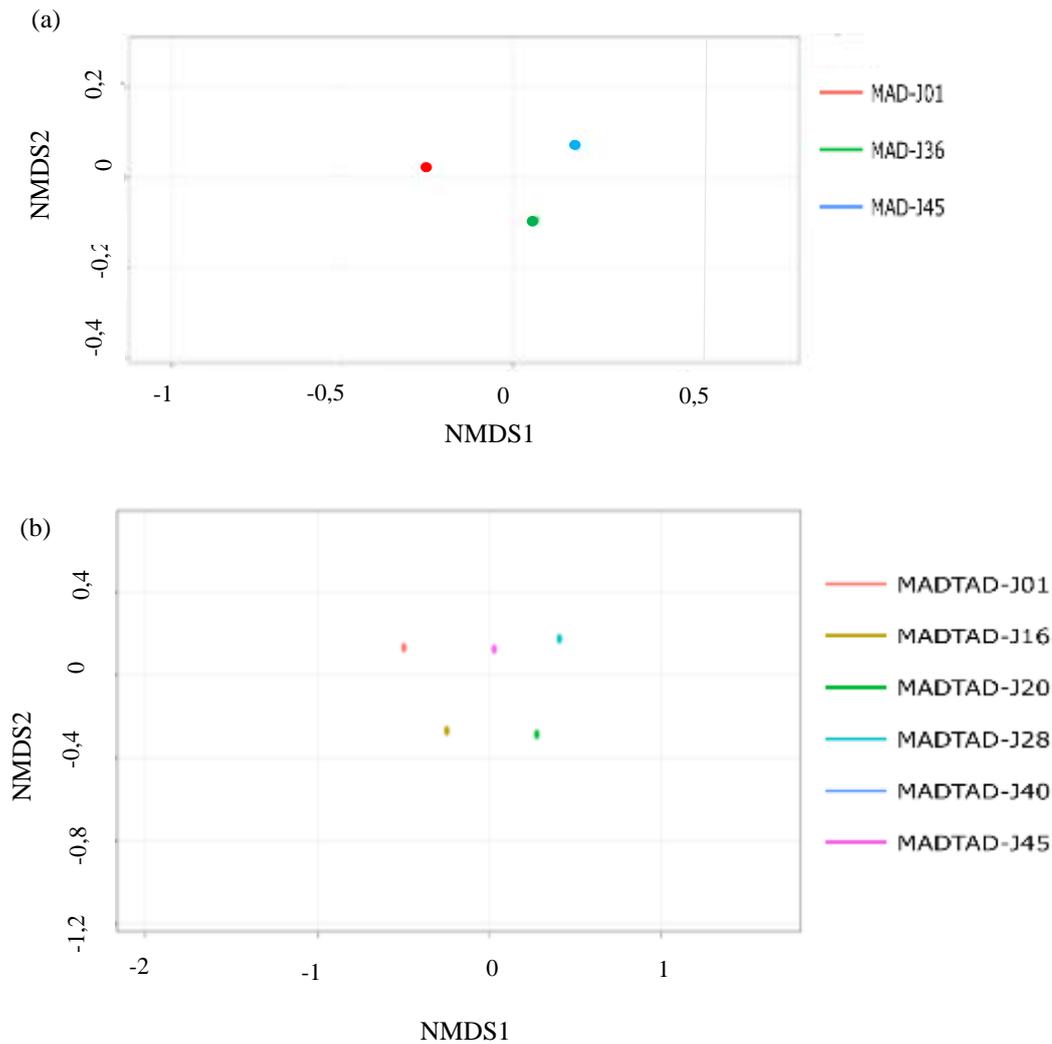
Etant donné cette forte capacité de désactivation mais du fait d'un temps de séjour élevé dans le compartiment MAD, nous avons envisagé une deuxième hypothèse : l'élimination de toutes ou partie des populations existantes et la croissance de nouvelles populations thermorésistantes. Cette hypothèse répond au principe énoncé par Baas Becking (1934) « everything is everywhere: but the environment selects ».

Les bactéries thermosensibles sont majoritaires initialement puisque notre inoculum provient d'un digesteur mésophile. Elles seraient remplacées par des bactéries dites thermorésistantes au fur et à mesure de l'avancement de la réaction.

Notons que derrière la notion de thermosensibilité (ou thermorésistance), peut exister tout un tas d'effets, notamment indirects, liés à une variation de température. Par exemple, plus la température et le pH sont élevés, plus l'équilibre entre l'ammonium et l'ammoniac est déplacé vers l'ammoniac. Prenant en compte l'effet de la température, du pH et de la quantité initiale d'azote dans l'inoculum, nous avons calculé que la concentration d'ammoniac est plus de 3 fois supérieure dans le compartiment TAD que dans le compartiment MAD de la campagne MAD-TAD (résultat obtenu par la modélisation et Annexe 5 : Calcul de la concentration d'azote ammoniacale). Notons que la littérature indique que les deux genres méthanogènes (*Methanosaeta* et *Methanosarcina*) qui transforment l'acétate en méthane, sont sensibles à la toxicité provoquée par  $NH_3$  (Montecchio et al., 2017).

Le temps de séjour de 1 jour dans le compartiment TAD peut laisser supposer une croissance de bactéries thermorésistantes. La limitation proviendrait alors certainement du flux de substrat biodégradable puisqu'une grande part de cette fraction aura été dégradée dans le MAD. Cependant, au fil du temps, ces nouvelles populations thermorésistantes s'imposeraient.

Cet effet de la température sur un changement de populations microbiennes est conforté par nos analyses de la diversité microbienne réalisées après séquençage de l'ADN 16S. Ces résultats montrent que, contrairement au MAD, un changement dans la Beta diversité pour la phase pseudo-stabilisée du MAD-TAD par rapport aux premiers jours de la campagne est observé (voir la Figure 45).



**Figure 45. Analyse de la bêta-diversité des populations microbiennes dans le réacteur au fil des jours, représentée en mode NMDS2 dans les campagnes MAD (a) et MAD-TAD (b)**

A noter que ce changement de populations n'est pas imputable à l'alimentation puisque celle-ci est la même pour les deux procédés.

Ainsi, les scénarios relevant de l'hypothèse 2 considéreront des populations thermosensibles (Ts), présentes au départ dans l'inoculum mais incapables de se maintenir dans le réacteur, et des populations thermorésistantes (Tr), capables de croître dans les conditions opératoires du procédé MAD-TAD. Il est ainsi supposé que le taux spécifique de croissance des populations sensibles à la température est très faible dans le TAD (presque  $10^4$  fois inférieur à celui du MAD) et qu'elles n'arrivent pas à s'y développer. Le taux de décès est considéré plus élevé en TAD qu'en MAD (presque 250 fois plus élevé que celui du MAD) pour ces populations.

#### 2.4.2 Description des scénarios de simulation

En se basant sur les deux hypothèses développées dans le paragraphe précédent, nous proposons les scénarios décrits dans le Tableau 21.

**Tableau 21. Modifications apportées par rapport au modèle ADM1\_B dans les scénarios étudiés pour la modélisation du MAD-TAD**

Scénario	Objectif par rapport à l'observation expérimentale (voir le Tableau 20)	Modifications apportées par rapport au modèle ADM1_B
H1 : Augmentation du taux de mortalité au sein du traitement thermophile		
S1	O1-O8	Augmentation du taux de mortalité de toutes les populations en TAD et voir si les populations parviennent à s'adapter même avec cette mortalité élevée en TAD (en tenant compte du taux de croissance et des ratios de SRT en MAD et TAD)
S2	O1-O8	S1 avec un taux de mortalité moins élevé pour les méthanogènes
H2 : Shift de populations Ts → Tr		
S3	O1, O2, O3, O5, O6, O7	Définir deux populations pour les microorganismes directement liés à ces observations ( $X_{hy}$ , $X_{C4}$ , $X_{prop}$ , $X_{ac}$ )
S4	O2 et O6 (butyrate)	Une population, $X_{C4}$ , inhibée par l'acétate
S5	O4	Intégration des populations syntrophiques oxydantes d'acétate (SAO)

En conclusion, dans les sections suivantes, nous allons tester les 2 hypothèses principales : H1 décès ou H2 shift de populations sur toutes les réactions pour avoir une vision plus claire de la pertinence de ces propositions.

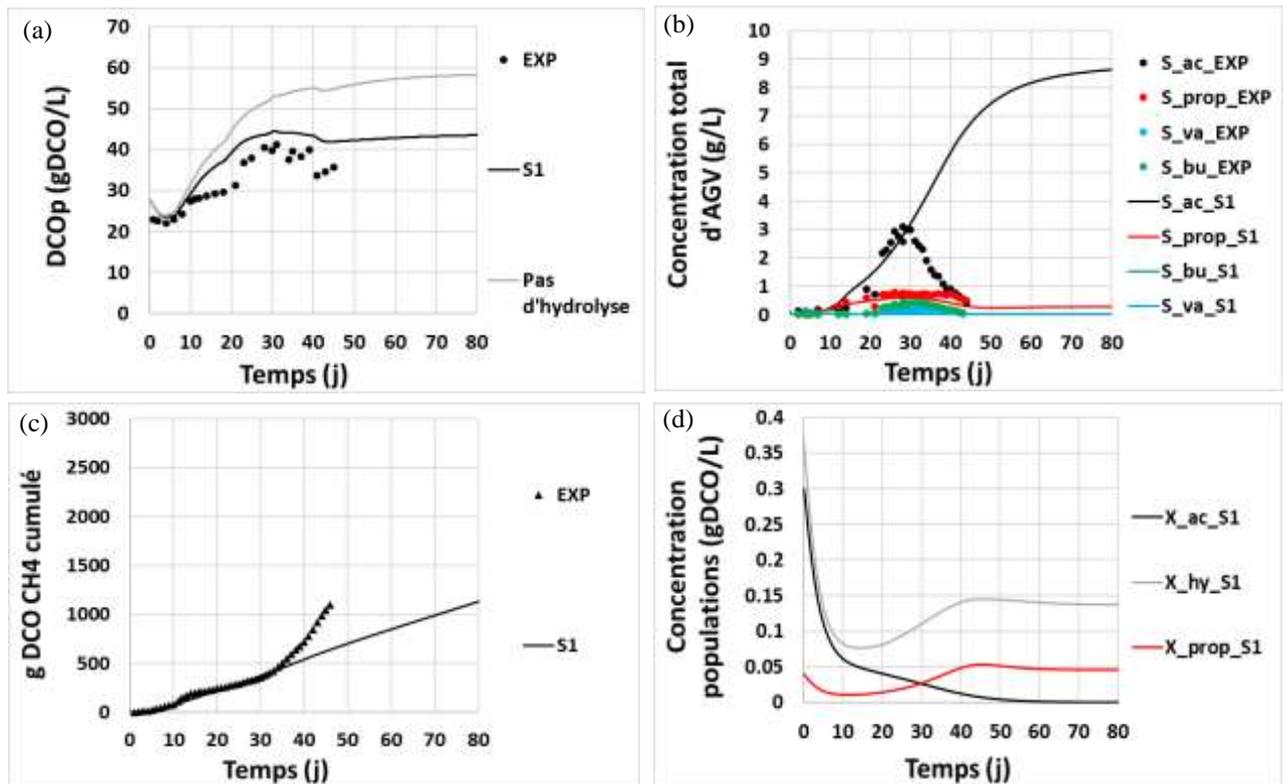
Les conditions opératoires feront apparaître des concentrations en AGVs et en ammoniac transitoirement élevées. Ces concentrations sont alors dans la gamme des valeurs de concentration inhibitrices pour certaines populations. Nous avons donc intégré des modèles d'inhibition sur les cinétiques des populations microbiennes concernées. La même forme d'inhibition par l'acétate et le propionate sur  $X_{ac}$  est incluse dans tous nos scénarios.

## **2.5 Simulations selon l'hypothèse 1 : désactivation de toutes les populations dans le compartiment TAD**

### **2.5.1 Scénario S1**

Dans ce scénario S1, on suppose un taux de décès de  $5 \text{ j}^{-1}$  pour toutes les populations dans le compartiment TAD contrairement à une valeur de  $0,02 \text{ j}^{-1}$  dans le compartiment MAD, pour voir si on peut représenter les observations expérimentales (voir le Tableau 20).

Les résultats de simulation de ce scénario sont présentés sur la Figure 46:



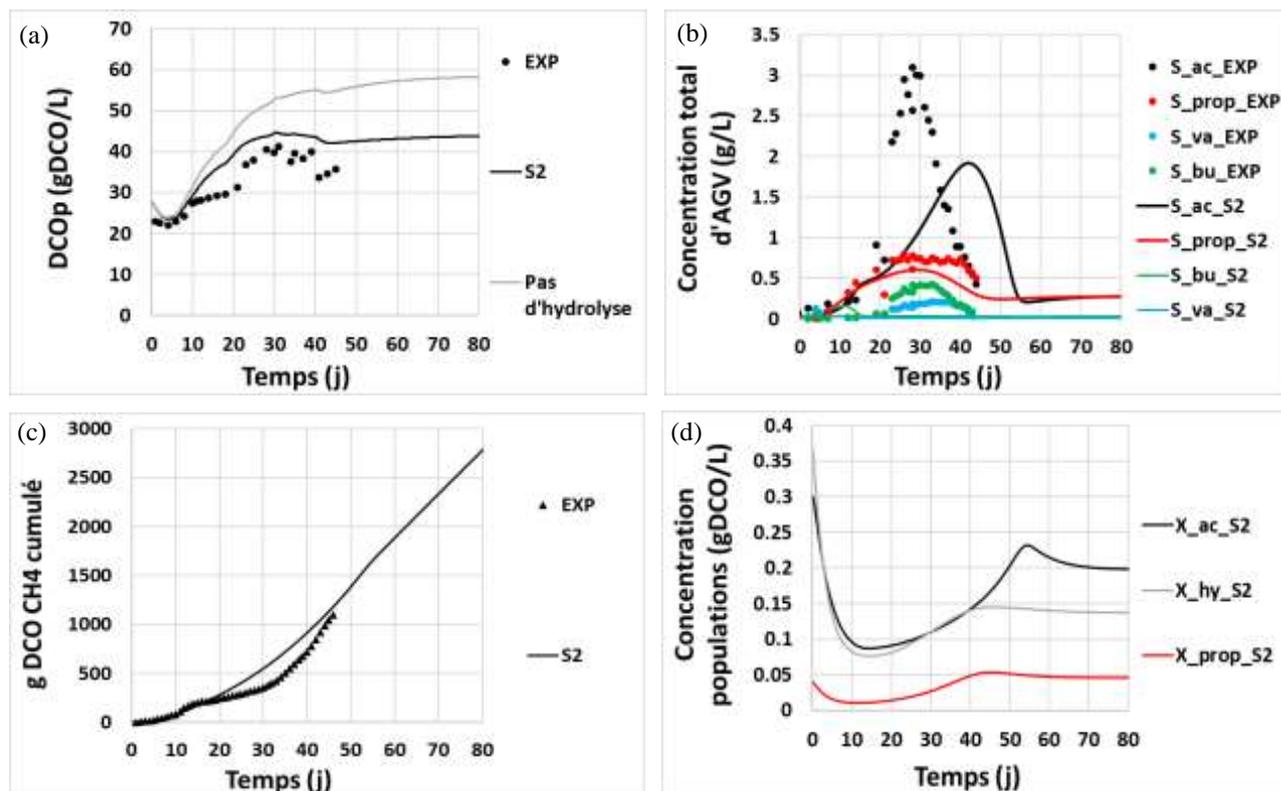
**Figure 46.** Evolution temporelle de : l'hydrolyse de la matière particulaire  $DCO_p$  (a), de la concentration en AGVs (b), de la production de biogaz (c), de la concentration en microorganismes fonctionnels présente dans le réacteur (d), dans le scénario S1

L'accumulation des AGV (à l'exception du propionate) présentée sur la Figure 46(b) se poursuit au-delà de 30 jours contrairement à ce qui est observé expérimentalement. De même, la production de biogaz ne correspond pas avec celle expérimentale. On peut donc conclure que la désactivation élevée des populations méthanogènes lors du passage dans le TAD n'est pas compensée par une croissance suffisamment rapide dans le MAD, ce qui conduit à un lessivage de cette population en moins de 60 jours.

## 2.5.2 Scénario S2

Dans le scénario S2, on suppose un taux de décès de  $5 \text{ j}^{-1}$  pour toutes les populations sauf les méthanogènes (avec une valeur inférieure,  $1 \text{ j}^{-1}$ ) dans le compartiment TAD contrairement à une valeur de  $0,02 \text{ j}^{-1}$  dans le compartiment MAD. Cette proposition est confortée par des résultats de la littérature montrant une résistance élevée des archaées méthanogènes à des températures élevées. Les résultats de Ziemińska-Buczyńska et al. (2014) montrent qu'un groupe de méthanogènes, riche en GC (Guanine (G) ou Cytosine (C)), est relativement insensible aux changements de température. Il est capable de s'adapter rapidement aux changements de température et de réaliser la digestion anaérobie de manière efficace.

Les résultats de simulation de ce scénario sont présentés sur la Figure 47.



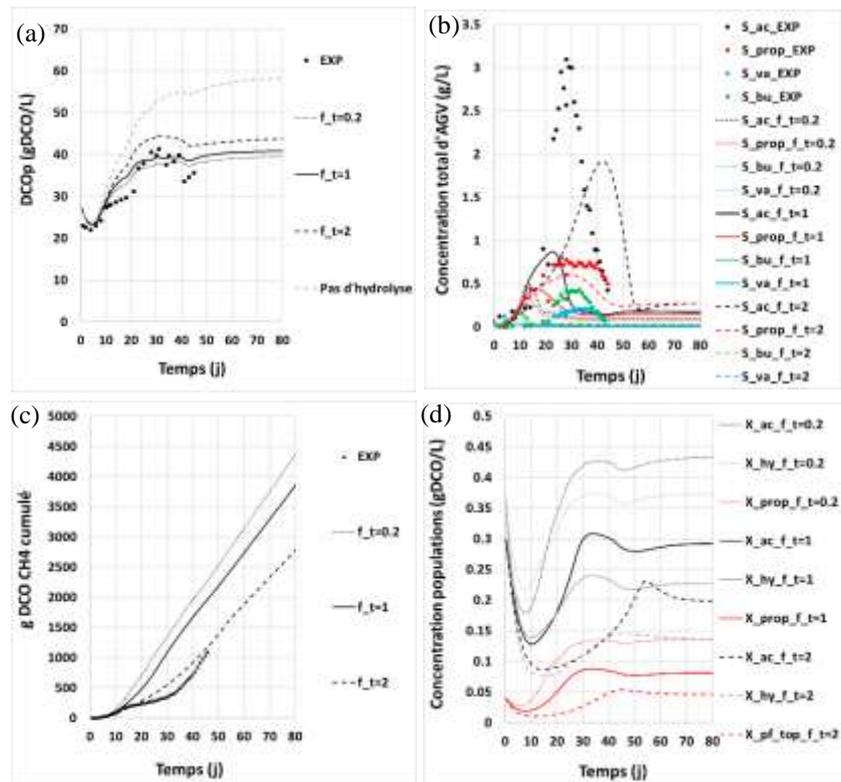
*Figure 47. Evolution temporelle de la DCOp qui caractérise l'hydrolyse de la matière particulaire (a) de la concentration en AGVs (b) de la production de méthane (c) des concentrations des populations microbiennes fonctionnelles dans le réacteur (d) dans le scénario S2*

On peut constater que :

- Ce scénario permet de représenter une succession d'accumulation puis consommation d'acétate et de propionate.
- Néanmoins, il surestime la  $DCO_p$  après le 40<sup>ème</sup> jour.
- Le pic d'accumulation d'acétate n'est pas clairement mis en évidence en termes ni de temps d'apparition, ni d'amplitude.
- Les pics d'accumulation de butyrate et d'iso-valérate ne sont pas présentés.
- Les tendances de production de méthane ne sont pas présentées.

### 2.5.3 Influence de la fréquence de traitement par le TAD

Il est intéressant d'étudier l'effet de la fréquence de traitement (chapitre II, §2.2.2) des boues en TAD (sur le scénario S2). Lorsque la fréquence de traitement augmente, le temps de contact ( $t_c$ ) réduit et les microorganismes passent plusieurs fois dans le TAD. Le taux de traitement augmente et donc il y a plus de décès thermique. La Figure 48 présente les résultats de S2 pour différents  $f_t$ :



**Figure 48.** Evolution temporelle de la DCO<sub>p</sub> qui caractérise l'hydrolyse de la matière particulaire (a) de la concentration en AGVs (b) de la production de méthane (c) des concentrations des populations microbiennes fonctionnelles dans le réacteur (d) dans le scénario S2 pour les  $f_t=0,2, 1$  et 2.

On peut constater que :

- Plus le  $f_t$  est élevé, moins l'hydrolyse dans le réacteur est importante.
- Plus le  $f_t$  est bas, plus la production de méthane est importante.
- Il y a certainement un lien mathématique entre le taux de traitement dans le TAD et le taux de décès imposé.

Ainsi les résultats de notre première hypothèse ne sont pas cohérents avec nos observations expérimentales. Dans la section suivante, nous étudierons notre deuxième hypothèse, H2.

## 2.6 Simulations selon l'hypothèse 2 : shift entre populations Thermosensibles (Ts) et populations Thermorésistantes (Tr)

### 2.6.1 Scénario S3

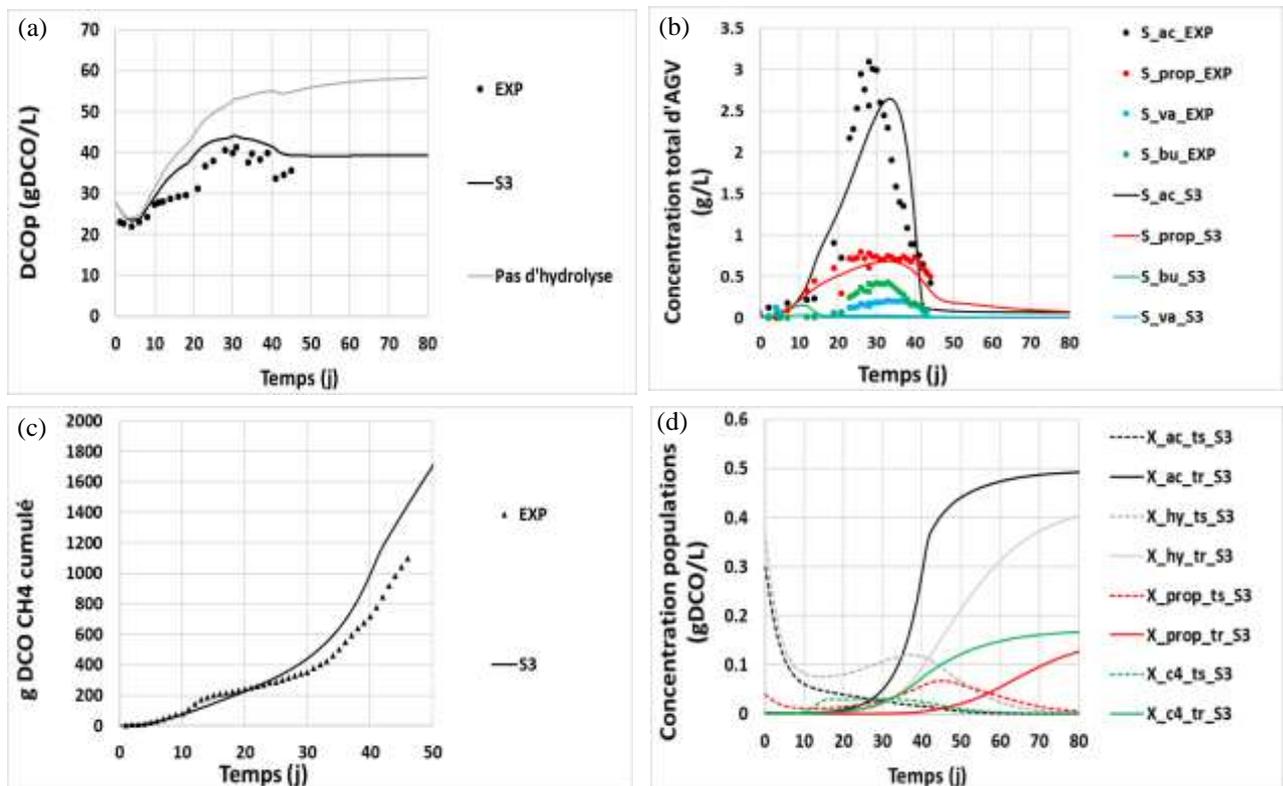
Le Tableau 22 présente les modifications appliquées dans le scénario S3 par rapport au modèle ADM1\_B :

**Tableau 22. Modifications appliquées dans le scénario S3 par rapport au modèle ADM1\_B (en bleu dans le tableau)**

Population	$K_{m\_ts,MAD}$ $K_{m\_tr,MAD}$ $K_{m\_tr,TAD}$ (gDCO. gDCOx <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	$K_{m\_ts,TAD}$ (gDCO. gDCOx <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	$k_{d\_ts,MAD}$ $k_{d\_tr,MAD}$ $k_{d\_tr,TAD}$ (d <sup>-1</sup> )	$k_{d\_ts,TAD}$ (d <sup>-1</sup> )	$X_{0\_ts}$ (gDCO/L)	$X_{0\_tr}$ (gDCO/L)	$I$	Ki_Ac_Xac	Ki_Pro_Xac
$X_{ac}$	5,8	0,001	0,02	5	0,2	0,002	$\frac{Ki\_prop\_Xac\_ts}{Ki\_prop\_Xac\_ts + S_{prop}} \times \frac{Ki\_ac\_Xac\_ts}{Ki\_ac\_Xac\_ts + S_{ac}}$	10	6
$X_{pro}$	10	0,001	0,02	5	0,04	10 <sup>-5</sup>	1		
$X_{hy}$	15,5	0,004	0,02	5	0,37	0,001	1		
$X_{c4}$	15,4	0,001	0,02	5	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	1		

Nous voyons dans ce tableau, que le taux de mortalité est fortement augmenté pour les populations sensibles dans le TAD et que la croissance de ces populations dans ce compartiment est très lente. Les bactéries thermorésistantes sont présentes initialement mais en très faibles concentrations.

Les résultats de simulation de ce scénario sont présentés sur la Figure 49. Notons que les constantes d'inhibition et les taux de décès sont calibrés par rapport aux résultats expérimentaux.



**Figure 49. Evolution temporelle de la DCO<sub>p</sub> qui caractérise l'hydrolyse de la matière particulaire (a) de la concentration en AGVs (b) de la production de méthane (c) des concentrations des populations microbiennes fonctionnelles dans le réacteur (d) dans le scénario S3**

On peut constater sur la Figure 49 que :

- La courbe simulée de la DCO<sub>p</sub> dans le réacteur est assez proche des résultats expérimentaux.
- Les pics d'accumulation d'acétate et de propionate sont correctement représentés.
- Le pic d'accumulation de butyrate n'est pas clairement mis en évidence en termes ni de temps d'apparition, ni d'amplitude. Comme cela a été observé dans la littérature, l'accumulation de butyrate est le résultat de l'accumulation de produits tels que l'acétate (d'un point de vue thermodynamique de la réaction) (Tonanzi et al., 2021), dans le scénario S4, nous introduisons une inhibition par l'acétate.
- Il y a une légère déviation dans la production cumulée de méthane.
- On constate bien le déclin des populations thermosensibles au profit des populations thermorésistantes. Le régime transitoire entre ces deux types de populations se caractérise par une dynamique de croissance des populations hydrolytiques et productrice de propionate et butyrate.

On constate que l'hypothèse 2 (populations Ts et Tr) permet de mieux expliquer nos observations par rapport à l'hypothèse 1. Dans ce qui suit, nous étudierons donc les éventuelles inhibitions et/ou les populations Tr présentées dans la littérature pour améliorer le scénario S3.

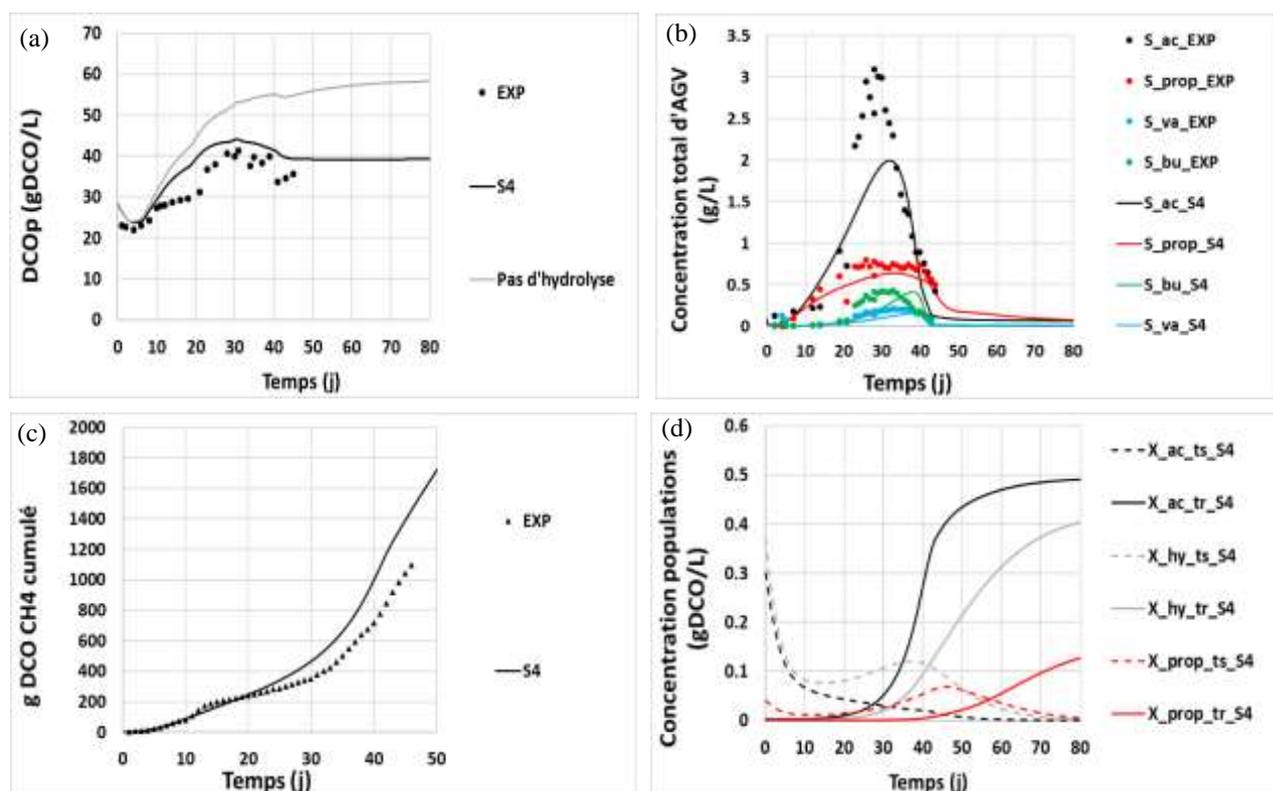
## 2.6.2 Scénario S4

Un effet d'inhibition par l'acétate sur X<sub>C4</sub> est introduit dans le modèle. Le Tableau 23 présente les modifications appliquées dans le scénario S4 par rapport au modèle ADM1\_B :

**Tableau 23. Modifications appliquées dans le scénario S4 (en bleu dans le tableau par rapport au modèle ADM1\_B et en gras par rapport au scénario précédent)**

Population	$K_{m,ts,MAD}$ $K_{m,tr,MAD}$ $K_{m,tr,TAD}$ (gDCO. gDCOx <sup>-1</sup> , d <sup>-1</sup> )	$K_{m,ts,TAD}$ (gDCO. gDCOx <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	$k_{d,ts,MAD}$ $k_{d,tr,MAD}$ $k_{d,tr,TAD}$ (d <sup>-1</sup> )	$k_{d,ts,TAD}$ (d <sup>-1</sup> )	$X_{0,ts}$ (gDCO/ L)	$X_{0,tr}$ (gDCO/L)	I	Ki_Ac_X	Ki_Pro_X
X <sub>ac</sub>	5,8	0,001	0,02	5	0,2	0,002	$\frac{Ki_{prop\_Xac\_ts}}{Ki_{prop\_Xac\_ts} + S_{prop}}$ $\times \frac{Ki_{ac\_Xac\_ts}}{Ki_{ac\_Xac\_ts} + S_{ac}}$	10	6
X <sub>pro</sub>	10	0,001	0,02	5	0,04	10 <sup>-5</sup>	1		
X <sub>hy</sub>	15,5	0,004	0,02	5	0,37	0,001	1		
X <sub>c4</sub>	15,4	0,001	0,02	5	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	$\frac{Ki_{ac\_Xc4}}{Ki_{ac\_Xc4} + S_{ac}}$	0,5	-

Les résultats de simulation de ce scénario sont présentés sur la Figure 50 :



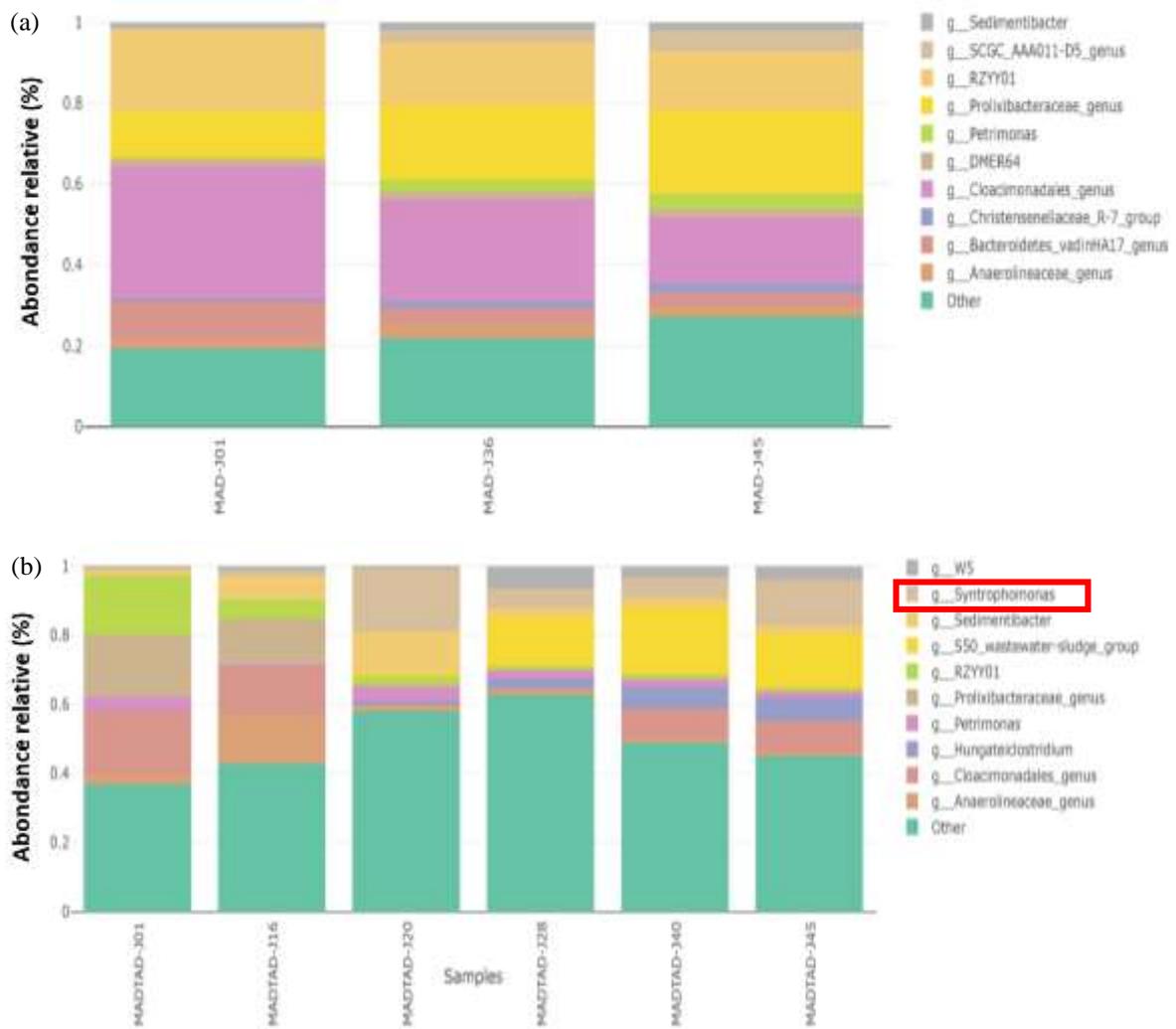
**Figure 50.** Evolution temporelle de : Hydrolyse de matière particulaire (a) concentration en AGVs (b) production de biogaz (c) quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (d) dans le scénario S4

On peut constater sur la Figure 50 que :

- Les tendances présentées sur l'hydrolyse sont cohérentes avec les résultats expérimentaux.
- Concernant la production des AGV, on voit bien que ce modèle permet de représenter de façon satisfaisante les tendances observées, que ce soit sur les dynamiques comme sur l'amplitude des pics.
- Cependant la vitesse de production du biogaz est plus élevée entre le 15<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour par rapport aux valeurs expérimentales. Nous allons donc améliorer notre modèle en prenant en compte des résultats des tests de séquençage ainsi que des études précédentes. Une idée est de remplacer le  $X_{ac}$  par des bactéries syntrophiques oxydant l'acétate, car la voie métabolique de ces bactéries permet de consommer l'acétate tandis que le  $CH_4$  est produit avec un retard (cf. §2.6.3).

### 2.6.3 Scénario S5

Les résultats des tests de séquençage de l'ADN 16S nous montrent l'émergence d'une nouvelle population 'Syntrophomonas' en MAD-TAD (voir la Figure 51), qui est une population syntrophique oxydante d'acétate (Nikitina et al., 2023).



**Figure 51. Abondance relative au niveau du genre dans les campagnes MAD (a) et MAD-TAD (b)**

Montecchio et al. (2017) ont étudié la digestion d'une boue activée dans un réacteur à deux étages avec une première phase de digestion mésophile avec un SRT de 3 jours tandis que la phase thermophile a un SRT de 10 jours. Partant d'un inoculum issu d'une digestion purement mésophile, ils ont observé que les archées acétoclastes ont été remplacées par des bactéries syntrophiques oxydantes d'acétate ( $X_{sao}$ ) dans la phase thermophile d'un digesteur en deux phases, contrairement à la phase mésophile. Dans ce cas là la voie de production de biogaz est la voie hydrogénotrophique. Cette population  $X_{sao}$  a donc été intégrée dans le modèle. La réaction d'oxydation syntrophique de l'acétate est présentée ci-dessous (Dyksma et al., 2020):



La Figure 52 montre le schéma du modèle ADM1\_B modifié pour le scénario S5 après l'intégration des  $X_{sao}$ .

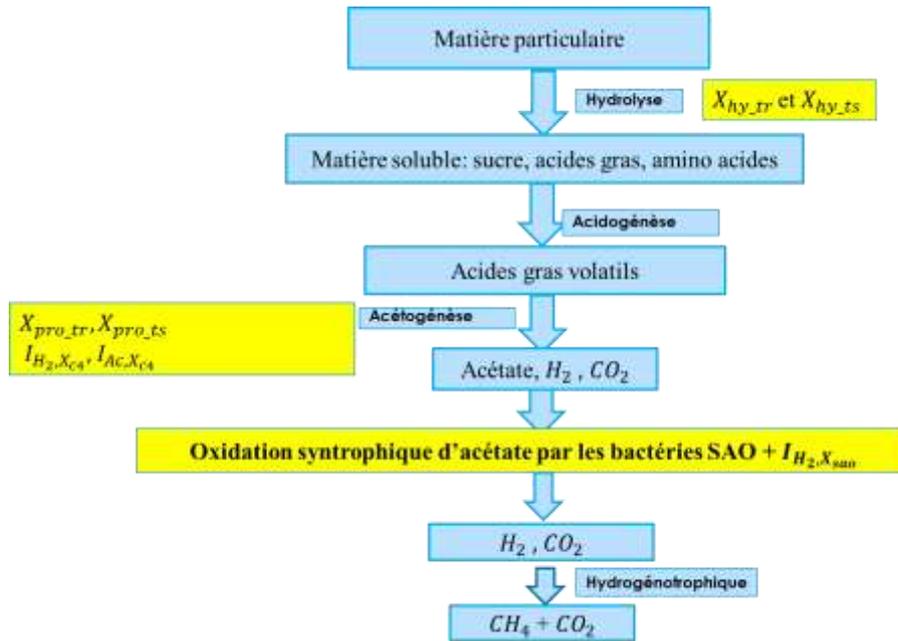


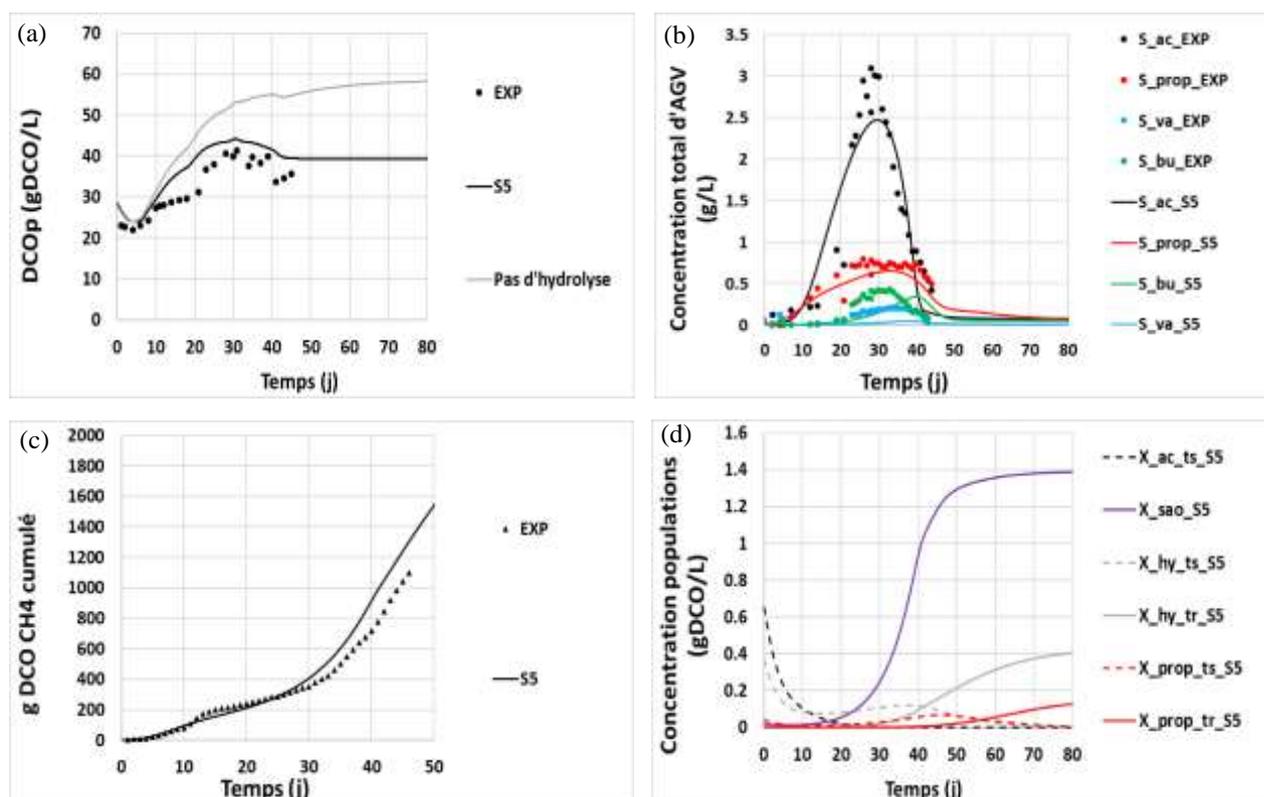
Figure 52. Scénario S5 proposé pour le couplage MAD-TAD (les modifications apportées par rapport au modèle ADM1\_B sont en jaune)

Le Tableau 24 présente les modifications appliquées dans le scénario S5 par rapport au modèle ADM1\_B :

Tableau 24. Modifications appliquées dans le scénario S5 (en bleu dans le tableau par rapport au modèle ADM1\_B et en bleu gras par rapport au scénario précédent)

Population	$K_{m,ts,MAD}$ $K_{m,tr,MAD}$ $K_{m,ts,TAD}$ $K_{m,tr,TAD}$ (gDCO. gDCOx <sup>-1</sup> , d <sup>-1</sup> )	$K_{m,ts,TAD}$ (gDCO. gDCOx <sup>-1</sup> , d <sup>-1</sup> )	$k_{d,ts,MAD}$ $k_{d,tr,MAD}$ $k_{d,ts,TAD}$ $k_{d,tr,TAD}$ (d <sup>-1</sup> )	$k_{d,ts,TAD}$ (d <sup>-1</sup> )	$X_{0,ts}$ (gDCO/L)	$X_{0,tr}$ (gDCO/L)	1	Ki_Ac_X	Ki_Pro_X	Ki_H2_X
$X_{ac}$	5,8	0,001	0,02	5	0,2	-	$\frac{K_{i,prop,Xac,ts}}{K_{i,prop,Xac,ts} + S_{prop}} \times \frac{K_{i,ac,Xac,ts}}{K_{i,ac,Xac,ts} + S_{ac}}$	0,4	6	
$X_{pro}$	10	0,001	0,02	5	0,04	10 <sup>-5</sup>	1			
$X_{hy}$	15,5	0,004	0,02	5	0,37	0,001	1			
$X_{c4}$	15,4	0,001	0,02	5	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	$\frac{K_{i,ac,Xc4}}{K_{i,ac,Xc4} + S_{ac}} \times \frac{K_{i,H2,Xc4}}{K_{i,H2,Xc4} + S_{H2}}$	0,5	-	8 × 10 <sup>-7</sup>
$X_{SAO}$	2 (une population)	-	0,02	-	0,02	-	$\frac{K_{i,H2,XSAO}}{K_{i,H2,XSAO} + S_{H2}} I_{pH} I_{IN}$			3 × 10 <sup>-5</sup>

Les résultats de simulation de ce scénario sont présentés sur la Figure 53 :



**Figure 53. Evolution temporelle de : Hydrolyse de matière particulaire (a) concentration en AGVs (b) production de biogaz (c) quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (d) dans le scénario S5**

On peut constater sur la Figure 53 que :

- Les tendances présentées sur l'hydrolyse sont cohérentes avec les résultats expérimentaux.
- Concernant la production d'AGV (Figure 53c), on voit clairement que ce modèle peut présenter les tendances, le temps et l'amplitude des pics observés à l'exception du pic d'iso-valérate qui n'est pas présenté.
- Il y a une amélioration de la représentation de la production de biogaz par rapport au scénario S4 que ce soit pendant la phase transitoire ou la phase stabilisée.

En ce qui concerne le pic d'iso-valérate, on peut penser que l'hydrogène est bien consommé par les  $X_{SAO}$  et les  $X_{H_2}$ , ce qui signifie qu'il n'y a pas d'inhibition de l'hydrogène sur le  $X_{C_4}$ . La modélisation, en l'absence de cette inhibition, montre des résultats aussi bons que ceux du scénario S5, ainsi que le pic d'iso-valérate. Ce modèle est choisi comme modèle final du MAD-TAD et constitue la base de modélisation pour le MAD-TAR.

## 2.7 Conclusion

Dans cette première partie du chapitre IV, nous avons proposé deux hypothèses pour modéliser les réponses dynamiques des activités microbiennes lors du démarrage du procédé MAD-TAD. Les modèles correspondants ont été élaborés. Une calibration de ces modèles, incluant aussi les notions d'inhibitions décrites pour certains composés, a été réalisée.

Les résultats montrent que l'hypothèse 1 ne permet de représenter la production de méthane que si les populations méthanogènes sont plus résistantes à des passages séquentiels à plus haute température que les autres populations microbiennes. De plus, ce modèle ne permet pas de représenter les accumulations transitoires des différents AGVs.

L'introduction de l'hypothèse 2 permet une représentation plus fidèle de l'ensemble des courbes expérimentales. Ce résultat conforte l'hypothèse d'un effet important d'un passage séquentiel à une température élevée sur la nature des populations microbiennes. Une modification des populations a donc vraisemblablement lieu avec apparition de populations thermorésistantes.

Il aurait été intéressant de vérifier que la dynamique d'adaptation est bien dépendante du taux de traitement et de la température du TAD. Nous aurions pu aussi étudier plus précisément ces populations microbiennes plus résistantes (dépendance à la température, ratio GC, etc.).

Ayant une vision plus claire de l'effet TAD dans le procédé, nous allons pouvoir maintenant étudier le procédé MAD-TAR et donc l'introduction d'une aération dans le procédé couplé.

### 3 Partie 2 : Etude du procédé MAD-TAR

#### 3.1 Présentation du modèle physique du procédé couplé MAD-TAR

La configuration du procédé couplé MAD-TAR (cf. chapitre II, §2.1.2), utilisée dans Aquasim, sur laquelle le modèle mathématique a été appliqué, est présentée dans la Figure 54.

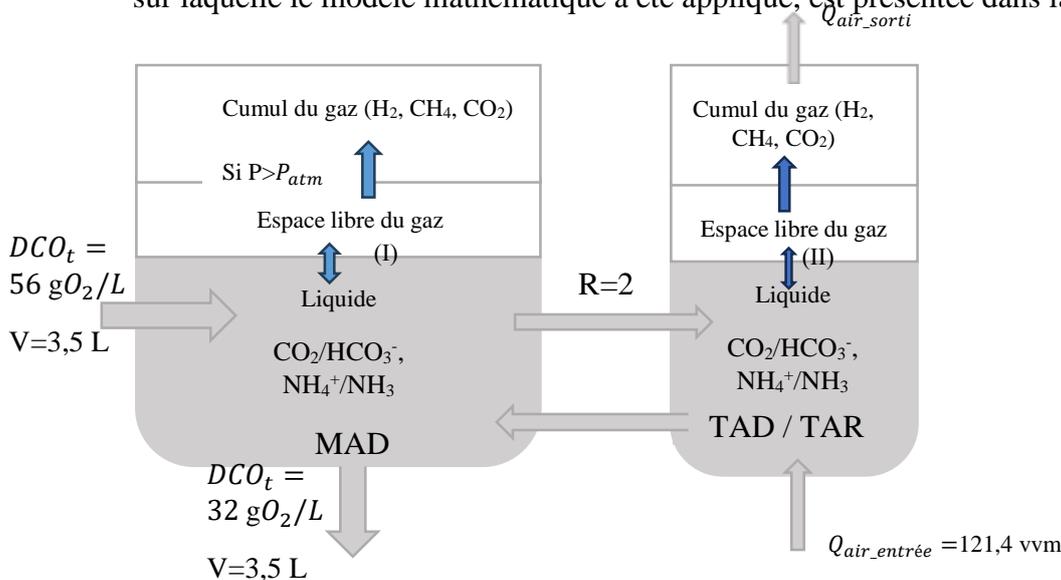


Figure 54. Schéma de la structure du réacteur MAD-TAR

Le transfert d'oxygène :  $Q_{O_2\_entrée} - Q_{O_2\_sorti} = k_L a (S_{liq} - K_H p_{gaz})$ ,  $k_L a = 100 \text{ j}^{-1}$  (MAD et TAR)

- Constante de Henry  $K_{H,O_2} = (0,0013/1,013) \times (\exp(\Delta H_0_{K_H,O_2} \times ((-1/298,15) + (1/T_{K\_liq})))) \times R_g \times T_{K\_liq}$
- L'impact de l'oxygène potentiellement sur les populations microbiennes anaérobies : une inhibition de la forme :  $I_{O_2 \cdot X_{H_2}} (\text{gO}_2/\text{L}) = \frac{K_{i,O_2 \cdot X_{H_2}}}{K_{i,O_2 \cdot X_{H_2}} + S_{O_2}}$
- L'air est considéré comme un gaz idéal

- L'espace libre du gaz est considérée parfaitement mélangée

### **3.2 Plan de l'expérience pour la modélisation du procédé couplé MAD-TAR**

L'objectif de cette section est d'étudier le procédé MAD-TAR et l'impact spécifique de la présence d'oxygène sur la dynamique des populations microbiennes dans le TAR ou bien, nous le verrons dans un deuxième temps, de l'effet de l'injection d'air sur les équilibres physico-chimiques qui peuvent avoir une influence sur les processus de transformation de la matière particulaire.

Nos observations expérimentales (cf. chapitre III, §2.2.2 et 2.2.3) nous amènent à devoir représenter les spécificités suivantes :

- Production de biogaz moins élevée (9%) dans le procédé MAD-TAR par rapport aux configurations MAD et MAD-TAD.
- Moindre accumulation d'AGVs par rapport au MAD-TAD.
- Une fraction de DCO de sortie non mesurée : le bilan sur la DCO montre une fraction de DCO de 21 % non mesurée. Le gaz sortant du réacteur couplé (TAR) n'a pas été analysé en raison de sa forte dilution par l'aération. On peut donc suspecter soit une consommation aérobie avec production de CO<sub>2</sub>, soit une consommation anaérobie avec production de méthane.
- Biodégradabilité significativement plus élevée de la matière particulaire. Dans notre étude, le procédé MAD-TAR améliore l'hydrolyse de DCO<sub>p</sub> de 14 % par rapport au MAD. Ce résultat concorde avec l'étude de Dumas *et al.* (2010) mais aussi avec l'étude de SMS (Gonzalez-Salgado *et al.*, 2020).

Deux scénarios sont à envisager pour augmenter la biodégradabilité :

Le premier correspond à une diminution de la fraction réfractaire de la DCO dans l'alimentation. L'augmentation concerne alors à la fois les activités aérobies et anaérobies. Les résultats de modélisation montrent que cette hypothèse entraîne une surproduction de biogaz dans le MAD (en raison du temps de séjour plus long dans le MAD par rapport au TAR), ce qui n'est pas cohérent avec les observations expérimentales. Le deuxième scénario correspond à une dégradation spécifique dans le TAR, où l'augmentation ne concerne que les activités hydrolytiques aérobies.

Nous testons deux hypothèses (scénarios S6 et S7) : la première est que cette DCO non expliquée est due à une production de biogaz dans le TAR ; la deuxième est qu'une biodégradation aérobie de la DCO a lieu dans le TAR.

Le procédé MAD-TAR a étéensemencé par un inoculum provenant du MAD-TAD. On pouvait donc penser que les populations microbiennes seraient acclimatées à l'effet température. Or comme vu dans le chapitre III (cf. 2.2.3), il a été observé une période d'accumulation d'AGVs et de diminution de production de biogaz en MAD-TAR, tout comme en MAD-TAD.

### 3.3 Eléments bibliographiques

#### *Effet d'une micro-aération et d'une concentration en oxygène non nulle*

La littérature fournit quelques éléments sur l'effet de l'oxygène sur la digestion anaérobie dont les éléments en lien avec notre étude sont détaillés ici.

Fu et al. (2022) ont réalisé une revue sur l'effet de la microaération dans la digestion anaérobie, mentionnant que celle-ci améliore l'hydrolyse du substrat et le stabilise par oxydation partielle des AGVs par respiration aérobie ou oxydation sélective de l'acétate par des bactéries oxydantes, ou encore par la promotion de la relation syntrophique entre les bactéries facultatives (des microbes qui peuvent survivre tant dans des environnements riches en oxygène que ceux pauvres en oxygène) et les méthanogènes hydrogénotrophes.

En revanche, selon (Chen et al., 2020), la présence d'oxygène peut avoir un effet inhibiteur sur les méthanogènes.

#### *Effet d'un pH alcalin sur l'hydrolyse des protéines*

Yang et al. (2015) ont montré que les glucides étaient dégradés avant les protéines lors de la digestion anaérobie des boues. Liu et al. (2012) ont observé qu'un pH alcalin entraînait une meilleure dégradation des protéines

#### 3.3.1 Scénario S6 : production de biogaz dans le TAR ?

Nous reprenons l'hypothèse de 2 types de populations (Tr et Ts) pour modéliser le MAD-TAR et en particulier le modèle du scénario S5 du MAD-TAD. L'inoculum est composé par les populations de fin de MAD-TAD puisque c'est cette matrice qui a été utilisée pour ensemercer le MAD-TAR.

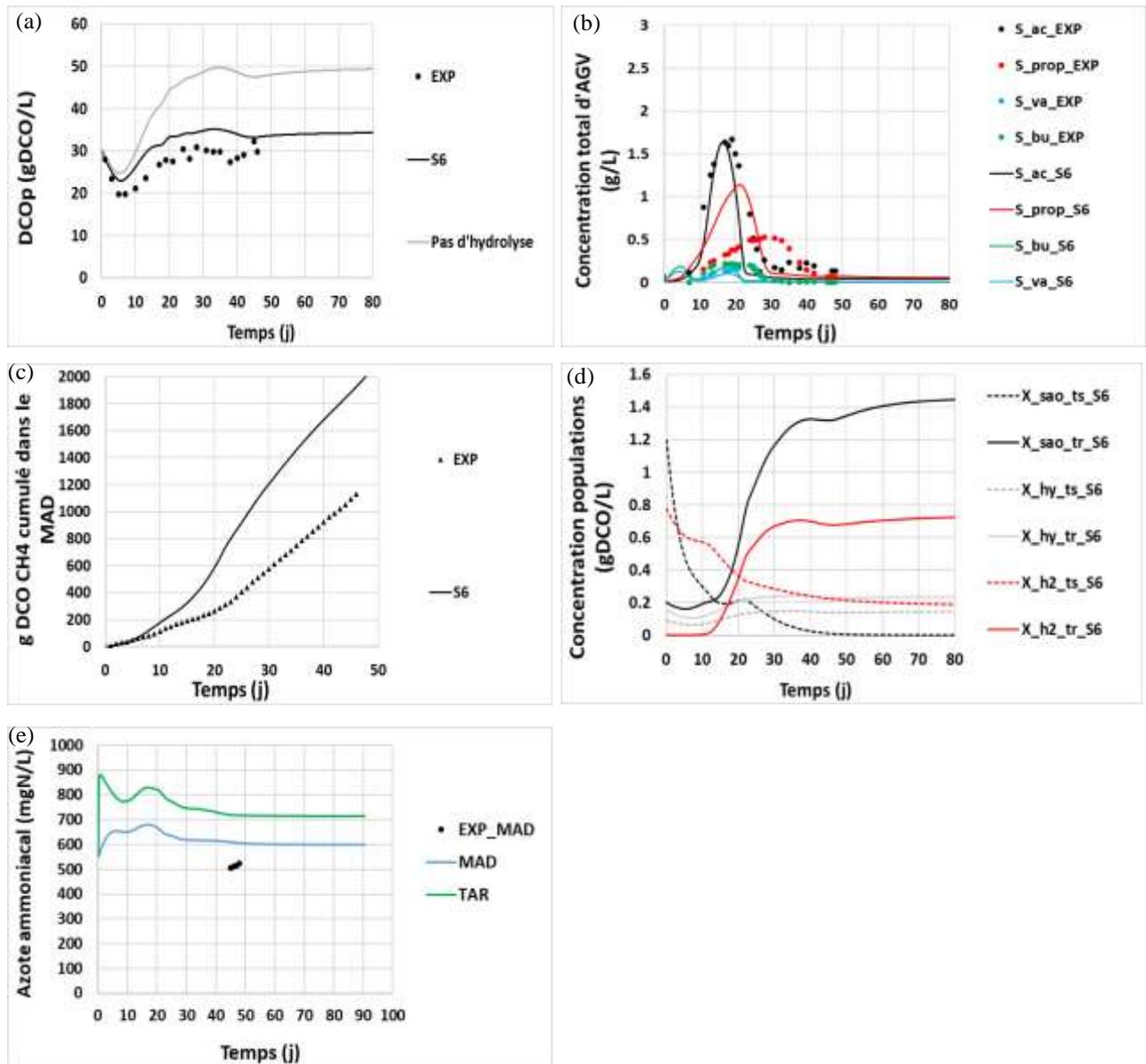
Dans ce scénario, nous supposons que les populations anaérobies ne sont pas affectées par la concentration d'oxygène observée lors de nos expériences, et que le pH supérieur à 8 (mesuré pendant les tests) dans le TAR favorise une hydrolyse accrue des protéines dans ce compartiment. Cela nous permet de calculer la quantité maximale de biogaz pouvant être produite dans le TAR et d'évaluer si cela peut expliquer la fraction de DCO non identifiée. L'hypothèse serait que ce méthane produit dans le TAR est volatilisé et, comme non mesurable, expliquerait la différence dans le bilan DCO.

Une hydrolyse des protéines, considérées comme inertes dans les conditions du MAD, est supposée dans le TAR.

$X_{i, \text{protéine}} \longrightarrow S_{aa}$  (Acide aminé soluble biodégradable par les anaérobies)

La vitesse de cette réaction suit une cinétique de type Monod par rapport au substrat et d'ordre zéro par rapport à la biomasse, comme dans le modèle ADM1. De plus, le développement des

populations aérobies dans le TAR n'est pas supposé dans ce cas. Les résultats de ce scénario sont présentés sur la Figure 55 :



**Figure 55. Evolution temporelle de : Hydrolyse de matière particulaire (a) concentration en AGVs (b) production de biogaz (c) quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (d) et concentration de l'azote ammoniacal (e) dans le scénario S6**

On peut constater sur la Figure 55 que :

- Le rendement d'hydrolyse atteint selon ce scénario permet d'atteindre une DCO<sub>p</sub> résiduelle qui est en accord avec les mesures expérimentales.
- Néanmoins, cette dégradation de DCO supplémentaire engendre une surproduction de biogaz dans le MAD par rapport à nos mesures expérimentales, aussi bien pendant la phase transitoire (les 30 premiers jours) que pendant la phase stabilisée. Cela montre que, compte tenu du temps de séjour 15 fois plus élevé dans le MAD, une amélioration

de l'hydrolyse dans le TAR entraîne surtout une augmentation de la production de biogaz dans le MAD, et non dans le TAR.

- Le traitement des flux cumulés de DCO montre que la conversion de la DCO en biogaz dans le TAR reste faible (6,6 %), tandis que 25,2 % est convertie en biogaz dans le MAD.
- La modélisation nous montre que le flux de DCO-CH4 éliminée par le flux gazeux du TAR est faible.

On peut donc conclure que la différence de DCO non expliquée n'est pas due à une production de biogaz dans le TAR, si, bien sûr, nos mesures tant de DCO<sub>p</sub> et de CH<sub>4</sub> sont justes.

### 3.3.2 Scénario S7 : Une biodégradation aérobie dans le TAR ?

#### o Choix des modèles biologiques et construction du scénario 'S7'

On ajoute dans le modèle une population aérobie capable de fonctionner en TAR. Cette population est capable d'hydrolyser une partie de la matière organique réfractaire (DCO<sub>Xi</sub>) et de consommer aussi le biodégradable.

Ainsi, nous supposons qu'une partie de la matière non dégradée en MAD devient dégradée dans le TAR par les populations  $X_{oho}$  ( $X_i \longrightarrow X_{hydrolysable}$ , la vitesse de réaction :  $\frac{dX_i}{dt} = 0,1 X_i$ ).

De plus, cette population  $X_{oho}$  peut dégrader les substrats les plus facilement dégradables tels que la matière particulaire biodégradable, l'acétate, le propionate et le sucre. Les réactions aérobies et les caractéristiques (cf. Tableau 25) des populations associées ( $X_{oho}$ ) sont comme suit :

- Acétate:  $CH_3COO^- + 0,75 O_2 + 0,25 NH_4^+ + 0,75 H^+ \longrightarrow 0,25 C_5H_7NO_2 + 0,75 CO_2 + 1,5 H_2O$
- Propionate:  $C_3H_5O_2^- + 2,24 O_2 + 0,25 NH_4^+ + 0,75 H^+ \longrightarrow 0,25 C_5H_7NO_2 + 1,74 CO_2 + 2,5 H_2O$
- Sucre:  $C_6H_{12}O_6 + 2,22 O_2 + 0,756 NH_4^+ \longrightarrow 0,756 C_5H_7NO_2 + 2,22 CO_2 + 4,48 H_2O + 0,75 H^+$
- Matière particulaire biodégradable :  
 $C_{10}H_{20,6}N O_9 + 4,39 O_2 + 1,25 NH_4^+ \longrightarrow 1,25 C_5H_7NO_2 + 3,74 CO_2 + 7,8 H_2O + 1,25 H^+$

Tableau 25. Caractéristiques de population aérobie (Pokorna-Krayzelova et al., 2017)

$K_{s. oho}$ (mol/L)	$\mu_{oho}$ ( $j^{-1}$ )	$K_{dec. oho}$ ( $j^{-1}$ )
0,0003	6	0,02

Nous distinguons deux types de populations pour les  $X_{sao}$  et  $X_{H2}$ . Un type peut se développer dans des conditions thermophiles aérobies, tandis que l'autre ne le peut pas.

○ **Résultats du Scénario S7**

Les résultats de ce scénario sont présentés sur la Figure 56 :

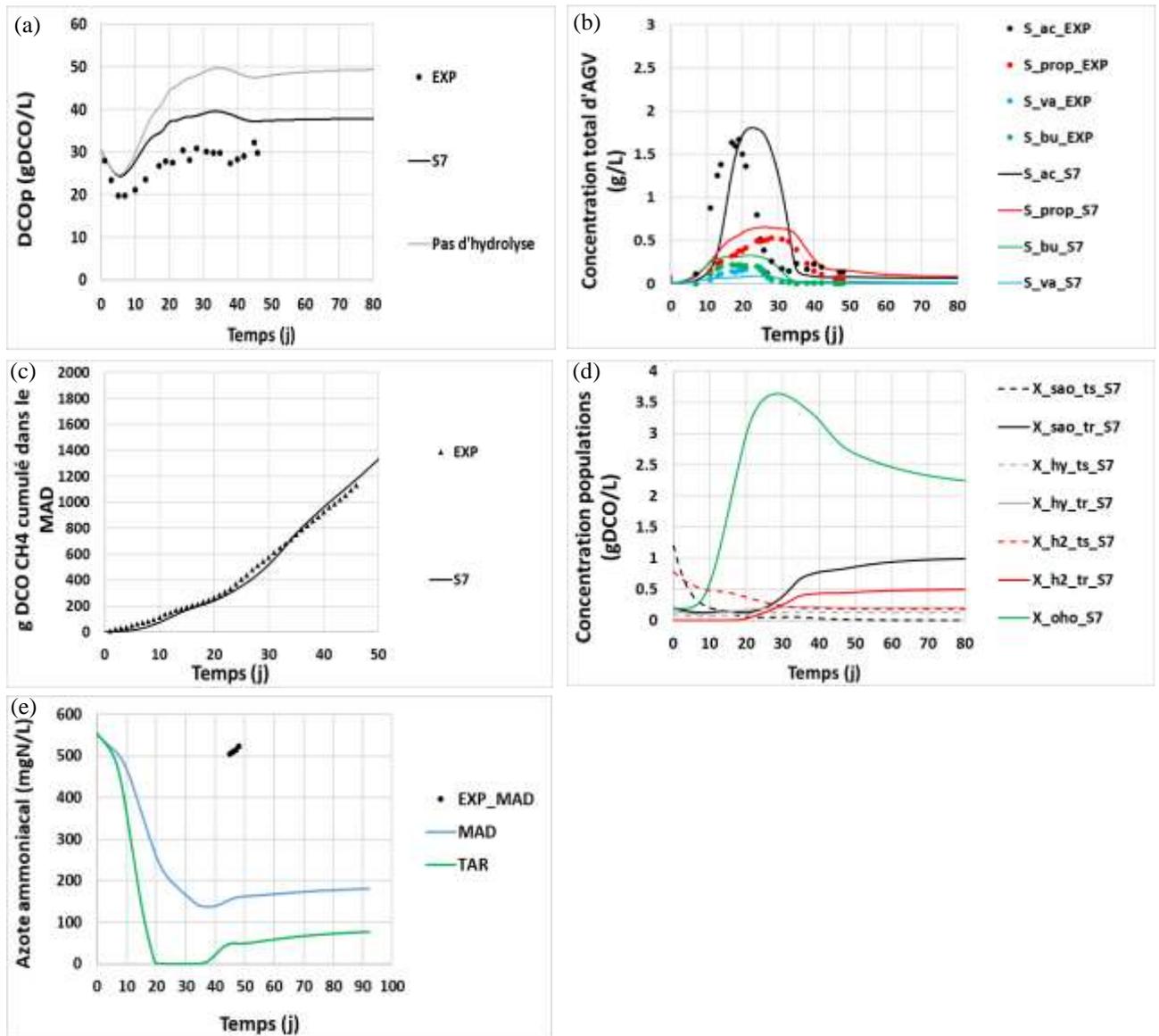


Figure 56. Evolution temporelle de : Hydrolyse de matière particulaire (a) concentration en AGVs (b) production de biogaz (c) quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (d) et concentration de l'azote ammoniacal (e) dans le scénario S7

On peut constater sur la Figure 56 que :

- L'hydrolyse n'est pas aussi bien présentée dans ce scénario par rapport au scénario S6.
- Concernant la production des AGVs (Figure 56c), les tendances, le temps et l'amplitude des pics observés sont acceptables.
- La production de biogaz (dans le MAD), que ce soit pendant la phase transitoire (30 premiers jours), ou pendant la phase stabilisée est bien représentée.

Cependant, comme on peut le voir sur la Figure 57 et dans le Tableau 26, la biodégradation aérobie représente seulement 3 % de la DCO entrée dans le réacteur, ce qui est bien inférieur aux 21 % de DCO non expliquée. Augmenter cette part de dégradation aérobie entrainera des divergences avec les évolutions des grandeurs mesurées comme le méthane produit.

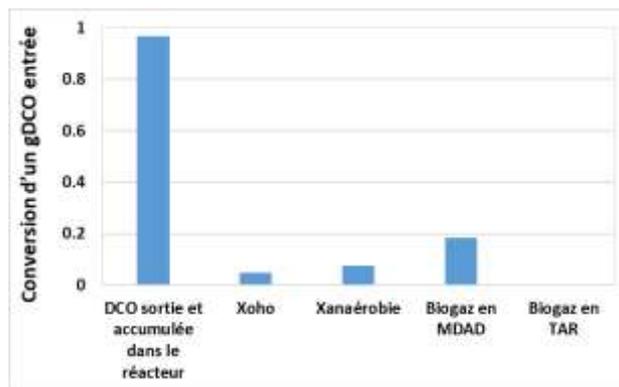


Figure 57. Conversion d'un gDCO entrée (présentée en cumulée pour 90 j de simulation)

Tableau 26. Flux de DCO entrée, de la consommation de l'azote et de l'oxygène par les populations pendant la phase stabilisée

	Flux (g/j)
Alimentation (DCO)	179,2
O <sub>2</sub> consommé par les aérobies en TAR	6,1
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consommé par les aérobies en TAR	0,76
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consommé par les anaérobies dans les 2 réacteurs	0,18

De plus, le Tableau 26 montre que les populations aérobies consomment plus de quatre fois la quantité d'ammonium (0,76 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) par rapport aux anaérobies. Cette observation, ainsi que la

Figure 56 présentant la concentration d'azote ammoniacal dans les compartiments MAD et TAR, indiquent que les populations aérobies se retrouvent en compétition avec les anaérobies pour la consommation d'azote. Notons que nous avons mesuré la consommation d'azote ammoniacal dans le TAR pendant 6 heures, après une recirculation de boue du réacteur MAD vers le TAR et avant une nouvelle recirculation. La différence de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pendant cette période est de 0,01 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ce qui correspond à l'erreur de nos mesures. Par conséquent, puisque cette consommation d'azote n'a pas été observée expérimentalement, une biodégradation aérobie n'est pas réaliste. La Figure 56(e) souligne que, dans les conditions de nos expériences

(notamment en ce qui concerne l'alimentation), la réaction aérobie est limitée par la disponibilité de l'azote, et même une hydrolyse plus élevée ne peut pas induire une augmentation significative de la biodégradation aérobie.

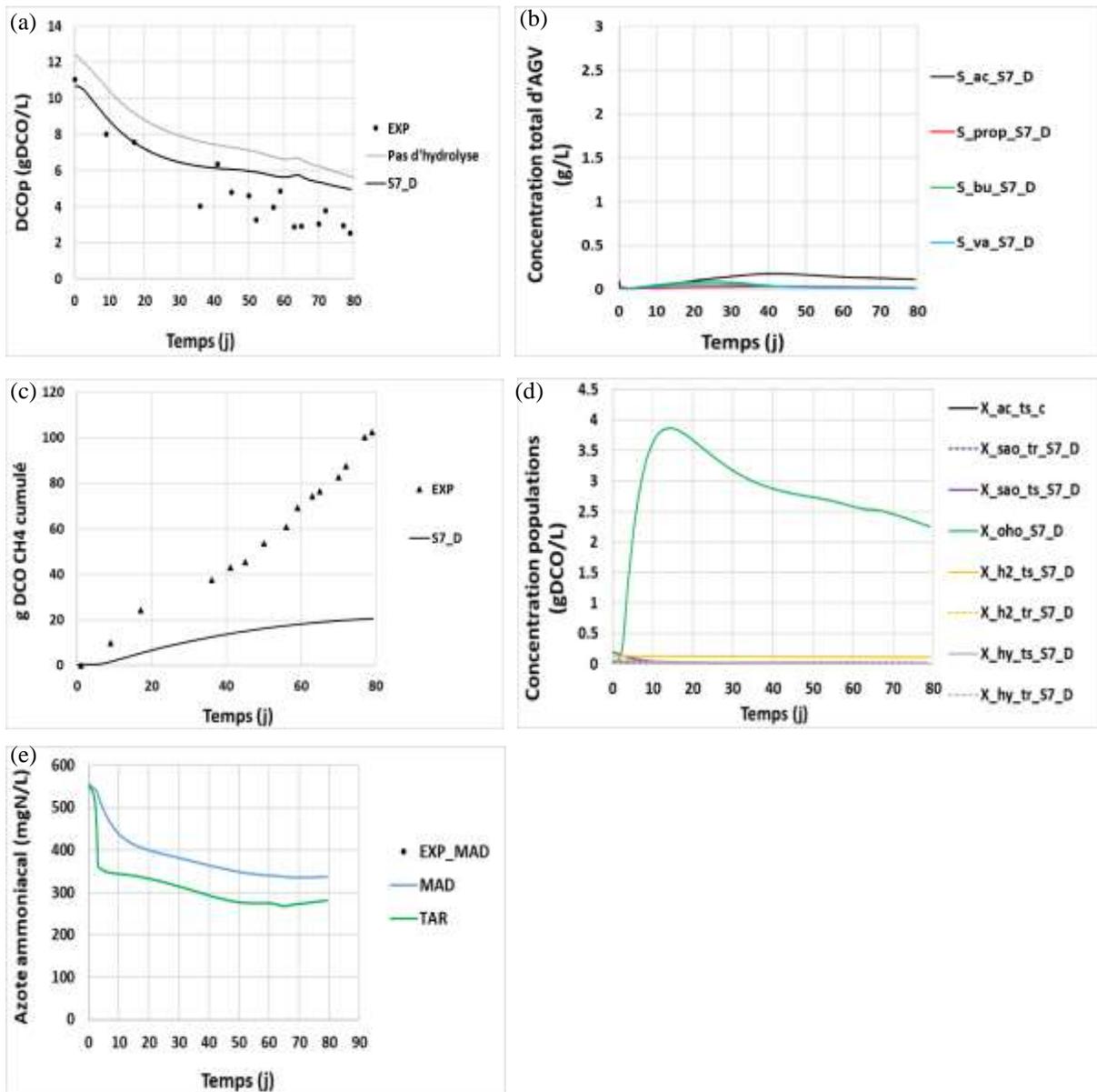
○ **Résultats du scénario S7 par rapport à l'étude de Dumas et al. (2010)**

Il est intéressant de confronter ce modèle (scénario 10) à l'étude de Dumas et al. (2010) dans laquelle une boue activée est utilisée pour alimenter et inoculer la configuration MAD-TAR. Cette boue, ayant une concentration en matière organique 7 fois inférieure à celle utilisée dans notre étude, présente un ratio DCO/N plus faible. Cette modélisation nous permet ainsi d'observer les résultats du scénario S7 dans un cas où l'azote ne devrait pas être un facteur limitant.

Pour cette modélisation, nous avons ajusté les caractéristiques de l'alimentation et la charge du réacteur (SRT de 21 j, DCO et biodégradabilité de l'alimentation, le volume des réacteurs, voir Tableau 13). Les populations microbiennes dans l'inoculum sont supposées être les mêmes que celles du MAD-TAD.

Les résultats du modèle, dans sa forme actuelle, montrent que l'hydrolyse est très faible comparée aux observations expérimentales. Afin d'augmenter l'hydrolyse de la matière particulaire et de se rapprocher des valeurs expérimentales, le taux de conversion de la matière inerte en matière biodégradable dans le compartiment TAR a été ajusté et calibré spécifiquement pour cette étude ( $\frac{dX_i}{dt} = 4 X_i$ ). Une raison justifiant cette modification du modèle MAD-TAR pourrait être la différence de substrats entre notre étude et celle de Dumas et al. (2010) (voir le Tableau 13). Les résultats de ce scénario (S7\_D) sont présentés sur les

Figure 58 et Figure 59 et le Tableau 27 :



**Figure 58. Evolution temporelle de : Hydrolyse de matière particulaire (a) concentration en AGVs (b) production de biogaz (c) quantité de biomasse microbienne présente dans le réacteur (d) et concentration de l'azote ammoniacal (e) dans le scénario S7\_D**

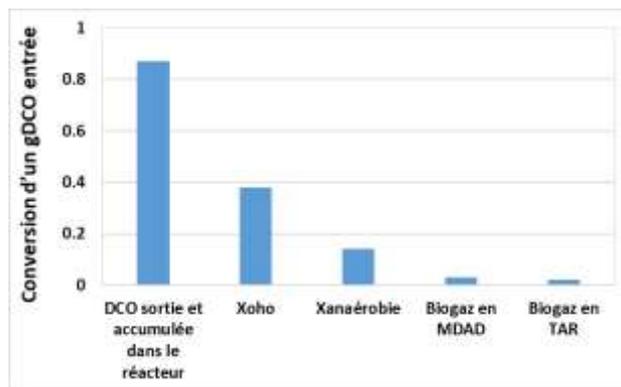


Figure 59. Conversion d'un gDCO entrée (présentée en cumulée pour 90 j de simulation)

Tableau 27. Flux de DCO entrée, de la consommation de l'azote et de l'oxygène par les populations pendant la phase stabilisée

	Flux (g/j)
Alimentation (DCO)	6,13
O <sub>2</sub> consommé par les aérobies en TAR	0,89
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consommé par les aérobies en TAR	0,11
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consommé par les anaérobies dans les 2 réacteurs	-0,02 (produit à cause d'une alimentation riche en azote)

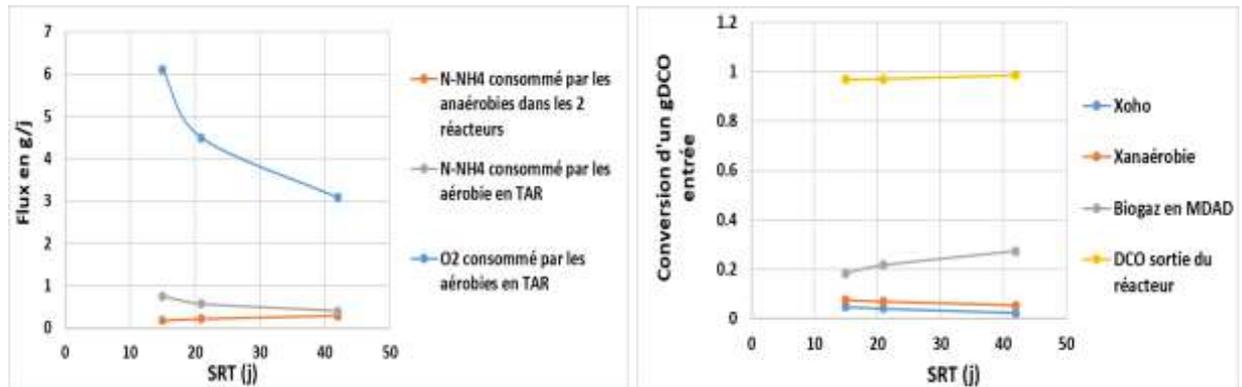
On peut constater, à partir du Tableau 27, que dans un cas sans limitation par l'azote, les populations aérobies dominent la compétition, et que la part de la biodégradation aérobie (13 %) atteint une valeur presque 4 fois supérieure à celle observée dans notre étude (scénario S7). La production de méthane devient faible et la valeur simulée par le modèle ne représente pas la valeur mesurée expérimentalement au cours du temps.

En conclusion, la disponibilité de l'azote et donc le ratio DCO/N de l'alimentation conditionne la proportion de DCO consommée par les bactéries aérobies. Si l'azote n'est pas limitant, la dégradation aérobie prend le dessus même si le ratio de volume entre les deux réacteurs aérobie et anaérobie est faible.

○ **Effet de SRT sur les populations anaérobies et aérobies dans le scénario S7 (notre étude)**

Comme nous l'avons constaté dans la section précédente, il existe une compétition entre les populations anaérobies et aérobies pour la consommation de l'azote. Cette compétition dépend du taux de traitement et donc de la fréquence de traitement et du SRT. Dans cette section, nous allons étudier l'effet du SRT (et donc également du taux de traitement par le TAR) sur la biodégradation anaérobie et aérobie (en supposant la présence de cette dernière), ainsi que sur les populations associées (voir Figure 60). Il est à noter que dans

notre modèle, le SRT a été modifié en ajustant le débit tout en maintenant une charge de boue constante.



**Figure 60. Effet de SRT sur la biodégradation anaérobie et aérobie ainsi que sur les populations associées**

On peut constater sur la Figure 60 qu'en augmentant le SRT (et donc en augmentant le taux de traitement par le TAR), la biodégradation aérobie diminue tandis que la production de biogaz dans le MAD augmente. Par conséquent, la consommation d'azote par les populations anaérobies augmente, alors qu'elle diminue pour les populations aérobie.

Il est également important de noter que l'augmentation du SRT entraîne une diminution des populations anaérobies et aérobie, en raison d'un niveau de mortalité supérieure dans les SRT élevés.

### 3.4 Conclusion sur le MAD-TAR

A l'aide d'une modélisation dynamique, nous avons tenté de comprendre comment expliquer, pour un pilote sous configuration MAD-TAR, une biodégradabilité significativement plus élevée de la matière particulaire, une moindre production de méthane qu'en configuration MAD-TAD et une accumulation moindre d'AGVs en régime transitoire. On se devait d'expliquer la partie de DCO non retrouvée dans le bilan et de répondre aux questions suivantes :

- Une dégradation aérobie explique-t-elle ces observations ?

Ou bien

- Une augmentation de la biodégradabilité de la matière est-elle capable d'expliquer une consommation anaérobie dans le TAR et une production de CH<sub>4</sub> qui serait volatilisée et non mesurée dans l'évent du TAR.

L'hypothèse de deux types de populations (Tr et Ts) employée pour modéliser le MAD-TAD a été appliquée pour modéliser le MAD-TAR, en intégrant des réactions aérobie et une amélioration de la biodégradabilité de la matière dans le TAR. Les résultats de nos modélisations ont montré que les 21% de DCO non expliqués ne sont ni le résultat d'une production de biogaz non mesurée dans le TAR, ni à une biodégradation aérobie. L'analyse de la consommation en azote et la modélisation des flux maximum transformés par le TAR sont explicites.

Dans le scénario où une dégradation aérobie est supposée dans le TAR, une forte consommation d'ammonium par les populations aérobies a été mise en évidence par la modélisation. Cela n'est cependant pas cohérent avec nos mesures de  $N-NH_4^+$  effectuées lors des cycles de recirculation dans le TAR (néanmoins peu de mesures ont été faites). De plus, une compétition entre les populations aérobies et anaérobies pour la consommation d'azote a été mise en évidence par le modèle. L'augmentation du SRT, et donc la réduction du taux de traitement par le TAR, a entraîné une augmentation de la production de biogaz et une diminution de la part de biodégradation aérobie.

Pour expliquer nos observations, une erreur dans nos mesures pourrait alors être soupçonnée. Cependant, une erreur systématiquement commise dans des études aussi différentes que celle menée en laboratoire par Dumas et al. (2010) lors de l'étude SMS sur un pilote de grande taille puis de nouveau lors de notre étude en laboratoire mais sur pilote de plus grande taille que celui utilisé par Dumas et al. (2010) est surprenante. La seule hypothèse que nous pouvons émettre est une fraction de DCO particulaire qui s'accumulerait dans le réacteur dans une zone morte.

Nous n'avons pas trouvé d'autres hypothèses pour expliquer nos observations et il serait nécessaire de refaire des expérimentations en implémentant des mesures sur le gaz de sortie du TAR ( $CO_2$  et  $CH_4$ ).

## 4 Conclusion du chapitre IV

Le modèle proposé qui considère pour certaines activités microbiennes, 2 populations distinctes ( $T_s$  et  $T_r$ ) permettent de bien représenter les observations expérimentales des campagnes MAD-TAD et MAD-TAR.

- L'impact indirect de la température dans le TAD semble avoir été identifié : une augmentation de la concentration de  $NH_3$  pourrait entraîner la disparition des  $X_{ac}$ , plus sensibles à l'ammoniac, tandis que les  $X_{sao}$ , thermo-ammoniaques tolérants, pourraient croître. Cependant, cette hypothèse nécessite des recherches supplémentaires pour être confirmée. Cette dynamique des populations, potentiellement au détriment des  $X_{ac}$  et en faveur des  $X_{sao}$ , pourrait favoriser la production de biogaz par la voie hydrogénotrophe dans le MAD-TAD. Selon la littérature, les populations de  $X_{sao}$ , sont généralement présentes dans les digestions thermophiles. Ici, nous avons démontré que leur implantation dans un procédé hybride MAD-TAD, qui n'est pas entièrement thermophile, est possible.
- Etant donné que les hydrogénotrophes sont moins sensibles à l'ammoniaque, le procédé MAD-TAD pourrait donc être mieux adapté aux substrats riches en protéines que le MAD, tout en étant moins énergivore qu'un procédé purement thermophile. Une partie de la matière non dégradée dans le MAD semble pouvoir être dégradée dans le TAR.

La modélisation du MAD-TAR a montré qu'il n'y a ni production de biogaz (moins de 0,5 % de la DCO entrante), ni biodégradation aérobie dans le TAR. Un autre mécanisme expliquant une disparition de la DCO dans le TAR ne nous est pas venu à l'esprit. Une inexactitude dans nos mesures de DCO particulaire pourrait expliquer cette DCO non identifiée bien que là aussi, nous avons un doute notamment puisque le bilan DCO est satisfait pour le MAD-TAD (cf. Figure 26 b), réacteur ayant quasiment la même configuration.

**Chapitre V. Etude de l'effet des couplages MAD-TAD et MAD-TAR sur la dégradation de micropolluants organiques et sur l'écotoxicité**

# 1 Introduction

Les micropolluants organiques présents dans les eaux de surface ont un impact négatif sur les écosystèmes aquatiques et les ressources en eau. Comme expliqué dans le chapitre bibliographique (voir mécanismes de sorption), une partie de ces MPs s'adsorbent sur la boue dans les procédés de traitement d'eau (Narumiya et al., 2013).

Comme nous l'avons vu, l'épandage agricole concerne 73 % de la destination finale des boues (cf. chapitre I, §2.1). L'ajout de digestat au sol permet aux agriculteurs de réduire l'utilisation d'engrais minéraux. Cependant, son impact sur l'environnement et la santé humaine doit être évalué et des analyses d'écotoxicité des digestats avant leur utilisation en agriculture peuvent être pertinents pour évaluer la nécessité de traitements complémentaires. Solé-Bundó et al. (2017) ont examiné le potentiel d'épandage agricole du digestat issu de la digestion anaérobie de microalgues, ainsi que de la co-digestion de ce digestat prétraité à 75 °C pendant 10 heures avec une boue primaire (25 % - 75 % VS respectivement). Des tests d'écotoxicité ont été conduits sur *Lepidium sativum*. Les résultats ont montré que les digestats ne présentaient pas de phytotoxicité résiduelle lorsqu'ils étaient correctement dilués, le digestat de co-digestion affichant la phytotoxicité la plus faible.

De plus, la découverte des antibiotiques a prolongé l'espérance de vie, mais a aussi entraîné une résistance bactérienne croissante et inquiétante, d'abord détectée en milieu clinique, puis observée dans divers environnements (eau, sol, sédiments). Ainsi, en France, selon La Santé au Quotidien (2024), l'antibiorésistance provoque 5 500 décès par an et pourrait devenir une des premières causes de mortalité d'ici 2050. Une approche "one-health" intégrant l'homme, l'animal et l'environnement permet de mieux comprendre la dynamique de dissémination entre les différents secteurs. Les eaux usées urbaines transportent divers contaminants, y compris des antibiotiques et des bactéries résistantes, vers les stations d'épuration, qui ne traitent qu'une partie de ces polluants avant leur rejet dans l'environnement. Plus important encore, plus de 99 % des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) finissent par s'accumuler dans les boues des stations d'épuration des eaux usées, devenant ainsi une source majeure d'ARG dans l'environnement (Zhang et al., 2022).

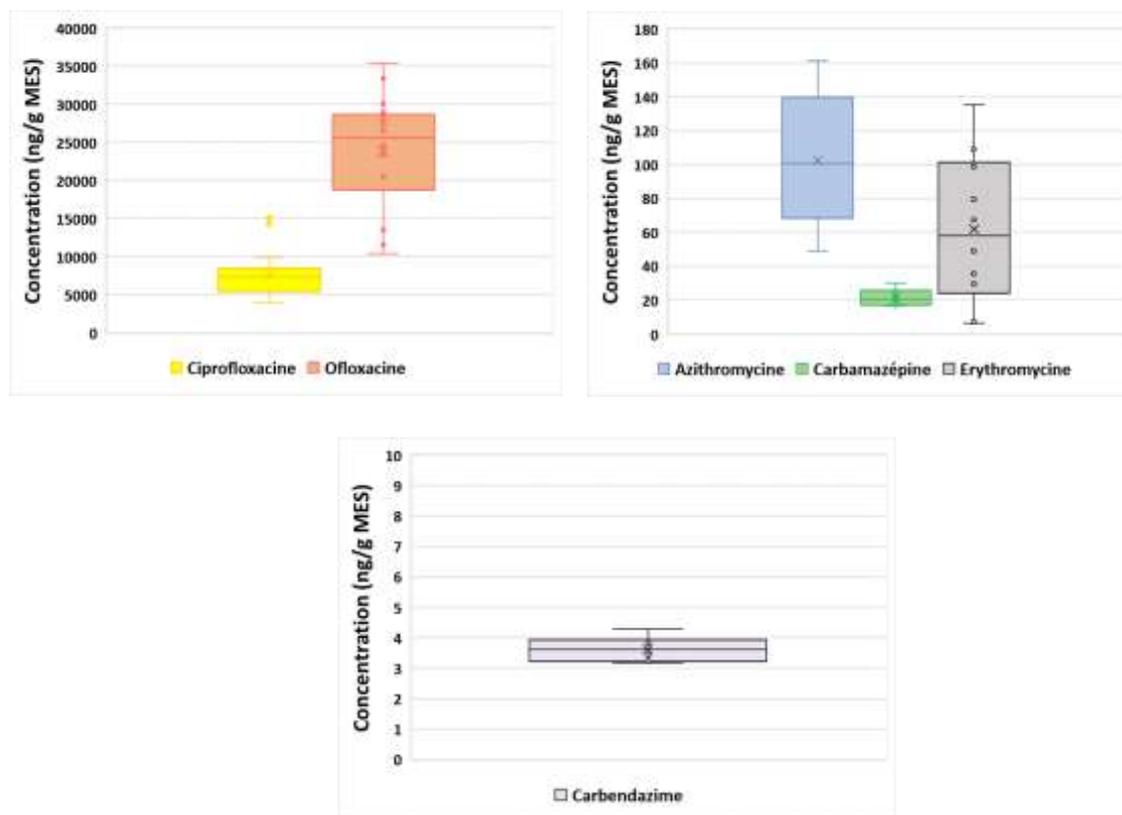
L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'efficacité des couplages MAD-TAD et MAD-TAR par rapport à la campagne de référence MAD, en ce qui concerne la biodégradation des micropolluants, l'écotoxicité et l'antibiorésistance du digestat, afin d'évaluer le potentiel de sa valorisation agronomique. L'effet spécifique de la température et de la microaération sera étudié en comparant les résultats des trois campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR.

## 2 Performances des procédés pour l'abattement des micropolluants

### 2.1 Caractéristiques de l'intrant

Rappelons ici que notre étude a été réalisée avec une alimentation spécifique, à savoir des boues mixtes ayant subi une étape d'acidogénèse et dont la fraction liquide a été retirée. Cette spécificité induit, a priori, la présence de molécules ayant une interaction forte avec la fraction solide ( $\log K_d$  élevé) et une biodégradabilité, tout du moins en condition anaérobie, faible à modérée.

Sur les dix-neuf molécules ciblées dans le cadre du projet, 13 n'ont pas été détectées ou quantifiées (signal sur bruit <10). Les concentrations retrouvées dans l'alimentation sont synthétisées sur la Figure 61.



**Figure 61. Concentrations des micropolluants dans l'alimentation**

Les fluoroquinolones (OFL et CIP) sont retrouvées en grandes concentrations, respectivement  $23000 \pm 5000 \frac{ng}{gMES}$  et  $6000 \pm 1500 \frac{ng}{gMES}$ . On retrouve ensuite des molécules dans des concentrations de l'ordre du  $20 \frac{ng}{gMES}$  (CBZ) et de  $100 \frac{ng}{gMES}$  (AZI). Ces valeurs sont inférieures aux valeurs mentionnées dans la littérature qui sont respectivement de  $655 \frac{ng}{gMS}$  et  $50 \frac{ng}{gMS}$  pour AZY (sur un mélange de boues primaires et secondaires) et CBZ (sur une boue secondaire) (Abbott et al., 2021; H. Budzinski et al., 2009).

On voit clairement sur la Figure 61 que la variation de concentration d'ERY est supérieure à celle des autres molécules, avec un rapport écart type/concentrations moyennes de plus de 45 %. De plus, la concentration de Carbendazime est si faible qu'il existe un risque élevé d'erreurs dans le calcul des taux d'élimination. En conséquence, dans la suite, seuls les résultats concernant les molécules AZY, CIP, OFL et CBZ seront exploités.

## 2.2 Taux d'abattement dans les trois campagnes continues

Les analyses des concentrations des MPs (cf. chapitre II, §4.4.3 pour les méthodes employées) nous ont permis d'estimer les taux d'élimination des MPs dans les campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR.

Les inocula étant variables et différents de l'alimentation, l'évaluation de la dégradation doit prendre en compte cette concentration initiale. En effet, on va alors rencontrer deux configurations selon le rapport de concentration entre l'inoculum et l'alimentation :

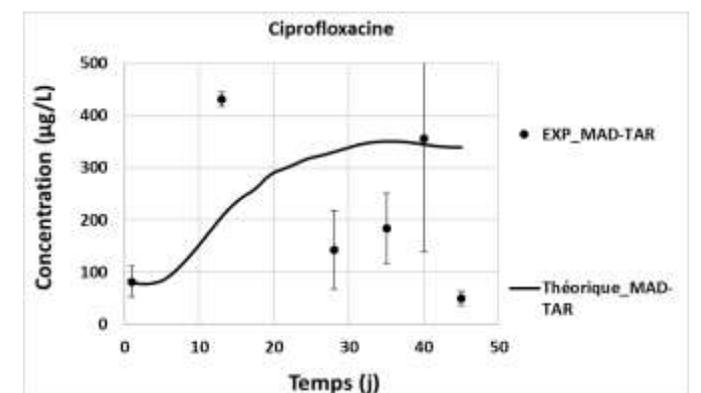
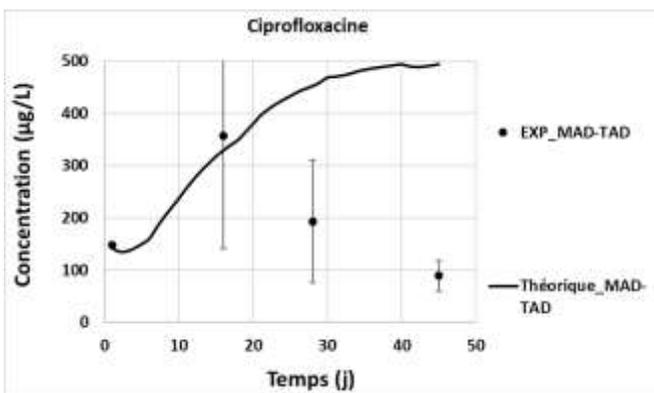
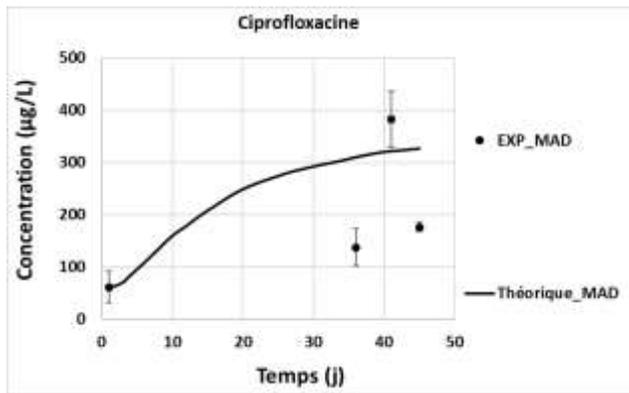
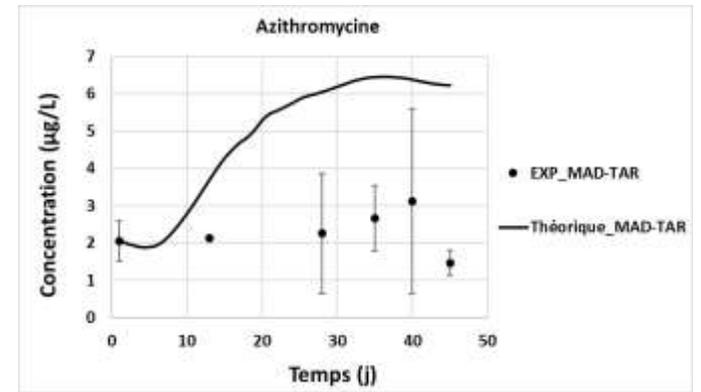
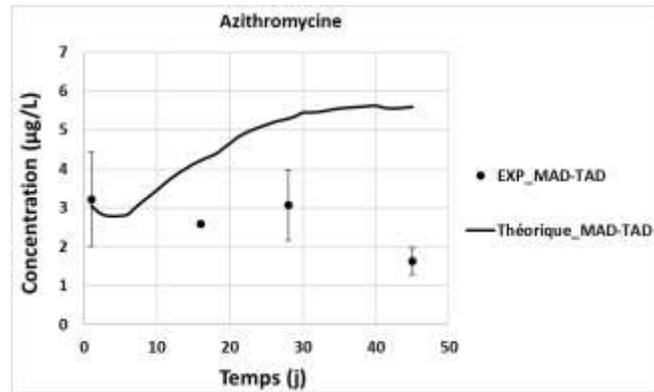
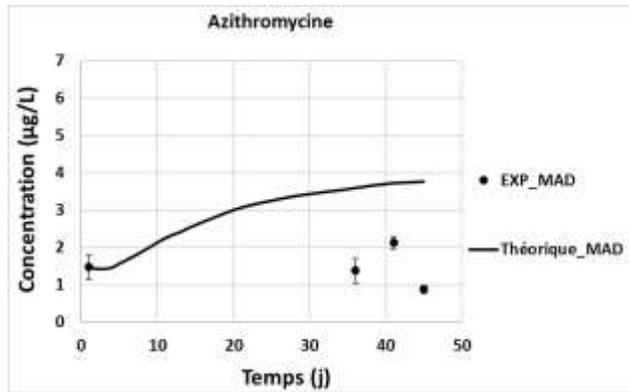
- Si  $C_{alim} < C_{inoc}$ , alors un effet de dilution se produit et la concentration (théorique) en l'absence de dégradation diminue au cours du temps. Seule CBZ présente cette évolution.
- Si  $C_{alim} > C_{inoc}$ , alors, à l'inverse, la concentration en l'absence de dégradation augmente au cours du temps. Cette évolution concerne AZY, OFL et CIP.

Les taux d'élimination des MPs ont donc été calculés en considérant la concentration théorique qui serait observée s'il n'y avait pas de dégradation. Cette concentration a été estimée par bilan matière au cours du temps :

$$\text{Equation 11: } C_{t.abiot} = \frac{(C_{t-1} \cdot V_{t-1} - C_t \cdot Q_{out.t} \cdot (t - (t - 1))) + C_{in} \cdot Q_{in.t} \cdot (t - (t - 1))}{V_t}$$

Où  $C_{t.abiot}$  est la concentration théorique de MP au jour t en l'absence de biodégradation en  $\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$ ,  $C_{in}$  est la concentration de MP dans l'alimentation en  $\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$ ,  $Q_{in}$  est le flux d'alimentation en  $\frac{\text{L}}{\text{j}}$  et V le volume du réacteur en L.

L'ensemble des comparaisons entre concentrations abiotiques théoriques et concentrations expérimentalement mesurées sont présentées sur la Figure 62.



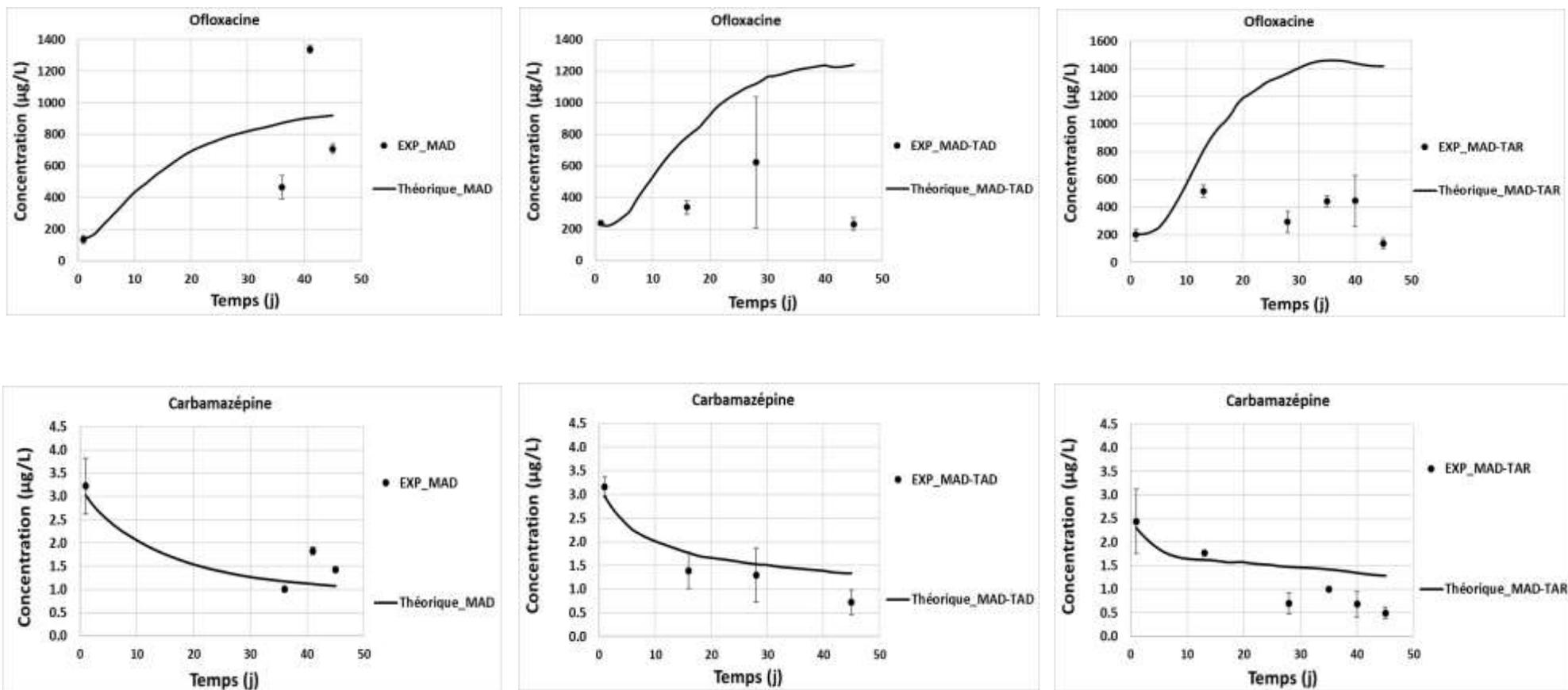


Figure 62. Évolutions temporelles des concentrations théoriques abiotiques (trait-plein) et expérimentales (carrés noirs) au cours des trois campagnes.

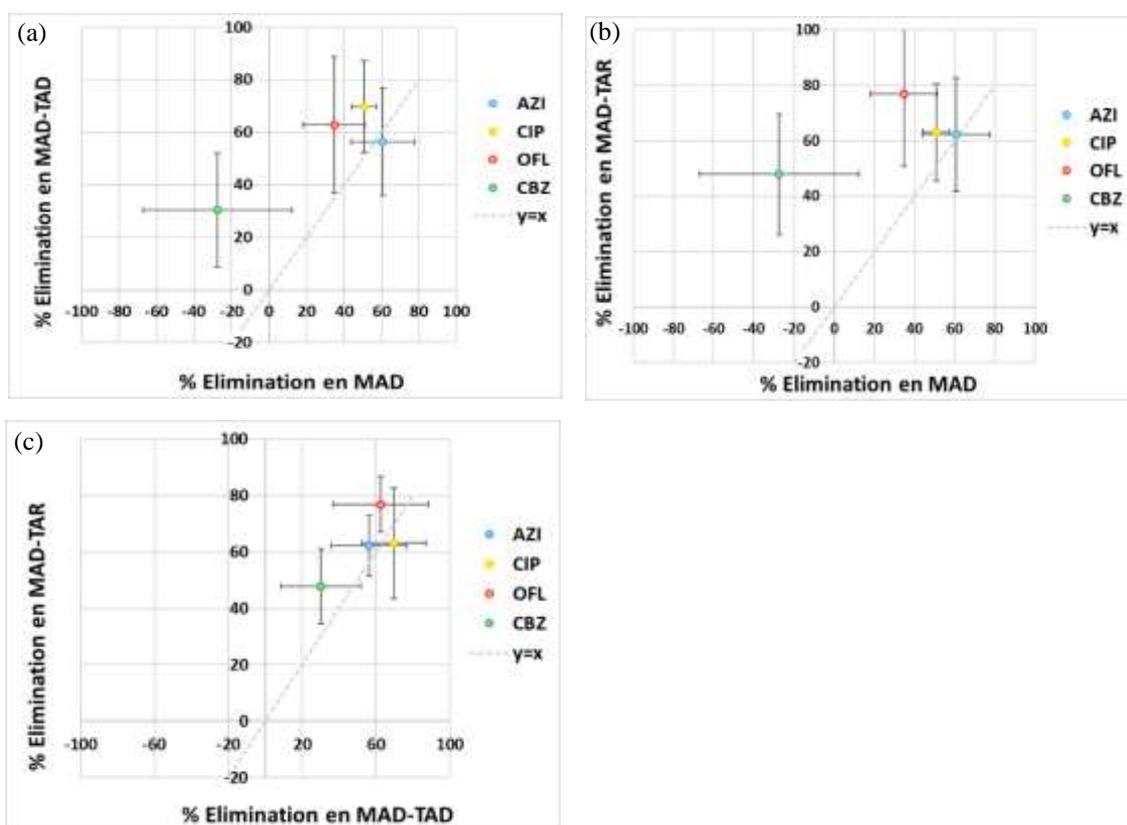
La dispersion des résultats, que ce soit sur des dates différentes ou entre répliquats de prélèvements d'un même jour (voir Figure 62) nous amène à considérer avec beaucoup de précautions les résultats obtenus.

Le rendement d'élimination a été classiquement estimé :

$$\text{Equation 12: } \% \text{ Elimination} = \frac{C_{t,abiot} - C_t}{C_{t,abiot}} \times 100$$

Où  $C_t$  est la concentration mesurée au temps  $t$ .

Pour dissocier les effets respectifs de la température et de l'oxygène sur la biodégradation des MPs, les taux de biodégradations sont comparés deux-à-deux sur la Figure 63. Sur ce mode de représentation, les molécules situées au-dessus de la bissectrice (matérialisée par la ligne en pointillé) présentent une élimination meilleure par le procédé représenté sur l'axe des ordonnées.



**Figure 63. Comparaisons des éliminations des MPs : MAD vs MAD-TAD (a) ; MAD vs MAD-TAR (b) MAD-TAD vs MAD-TAR (c)**

La Figure 63b met en évidence que les éliminations de CIP, OFL et CBZ semblent améliorées en MAD-TAR par rapport à MAD. On peut également constater ces améliorations sur la Figure 63a et de manière moins significative sur la Figure 63c (sauf CIP). Ces observations permettent de dissocier l'effet de la température et de l'oxygène en mettant en évidence que l'effet de la température semble être un paramètre plus impactant que la présence d'oxygène.

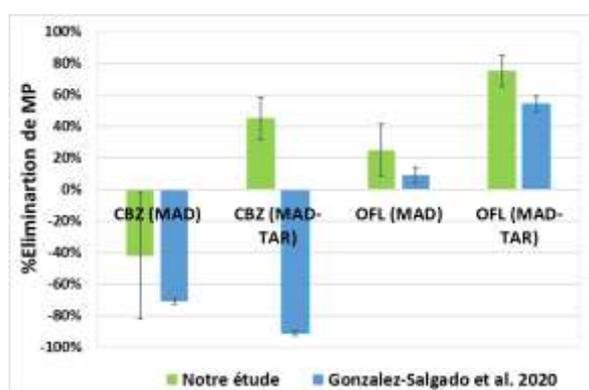
En raison des erreurs élevées observées sur la Figure 63, une étude statistique a été menée pour évaluer dans quelle mesure les différents procédés conduisent à des éliminations

significativement différentes. Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée à l'aide de MATLAB pour calculer la signification, notée p, des différences observées entre les conditions opératoires malgré les écarts-types élevés observés sur les taux d'élimination. Les résultats sont présentés dans le Tableau 28.

**Tableau 28. Valeur p pour chaque molécule ; comparaison deux-à-deux des campagnes MAD/MAD-TAD, MAD-TAD/MAD-TAR et MAD/MAD-TAR**

Molécule	MAD/ MAD-TAD	MAD/MAD-TAR	MAD-TAD/ MAD-TAR
AZY	0,995	0,805	0,774
CIP	0,237	0,555	0,654
OFL	<b>0,032</b>	<b>0,002</b>	0,693
CBZ	0,127	<b>0,001</b>	0,134

D'après les résultats présentés dans le Tableau 28, l'amélioration est significative (p-value < 0,05) pour CBZ uniquement dans la configuration MAD-TAR vis-à-vis du MAD, ainsi que pour OFL où l'amélioration est avérée lors de l'application d'une zone thermophile sans (MAD-TAD) ou avec (MAD-TAR) aération vis-à-vis du procédé référence (MAD). La comparaison des procédés MAD-TAD et MAD-TAR ne permet pas quant à elle de valider une quelconque différence entre ces deux procédés hybrides. La Figure 64 permet de comparer nos résultats avec l'étude de Gonzalez-Salgado et al. (2020), dont deux molécules étaient communes à celles de notre étude, dans laquelle l'efficacité du couplage MAD-TAR a été évaluée.



**Figure 64. Comparaison des taux d'élimination des MPs dans notre étude avec l'étude de Gonzalez-Salgado et al. (2020)**

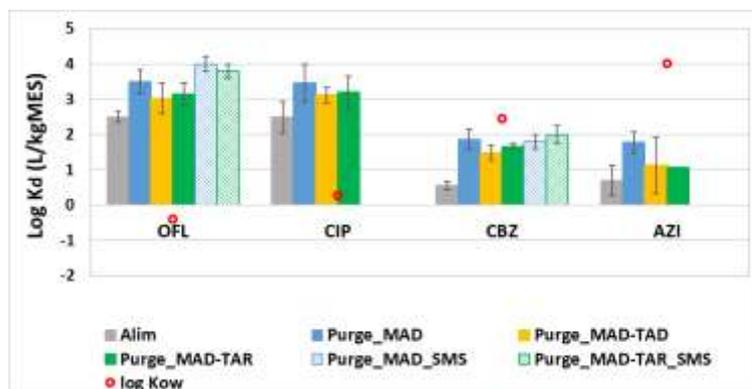
On peut constater que la biodégradation du CBZ en MAD est négative dans les deux études (voir la Figure 64). La raison d'une biodégradation négative a été expliquée dans le chapitre I §4.2.2. De plus, la biodégradation de CBZ en MAD-TAR dans notre étude est positive contrairement au résultat de l'étude de Gonzalez-Salgado et al. (2020). Une des raisons pourrait être les caractéristiques différentes des boues utilisées dans cette étude (boue primaire) et la nôtre (boue mixte ayant subi une étape d'acidogénèse). L'analyse de la partition des MPs peut mettre en évidence cette hypothèse (voir §2.3).

On peut bien constater sur la Figure 64, l'amélioration de la biodégradation de OFL dans le MAD-TAR par rapport au MAD dans les deux études et donc l'effet positif du réacteur couplé TAR.

### 2.3 Partition des micropolluants

La distribution des composés a été évaluée sur la base des concentrations mesurées dans le total et le soluble après centrifugation.

La Figure 65 présente le log  $K_d$  pour l'ensemble des molécules classées par log ( $K_{ow}$ ) croissant dans notre étude et l'étude de Gonzalez-Salgado et al. (2020).

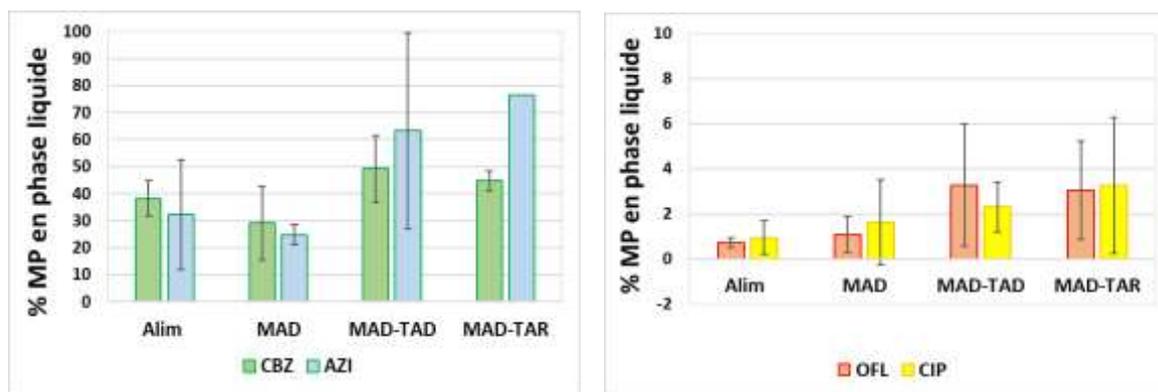


*Figure 65. Log du coefficient de partition solide/eau ( $K_d$ ) dans l'effluent en entrée et le digestat dans notre étude et dans le projet SMS (Gonzalez-Salgado et al., 2020), Molécules classées par Log  $K_{ow}$  croissant.*

La Figure 65 met en évidence que les interactions hydrophobes ne permettent pas à elles seules d'expliquer les mécanismes d'adsorption. En effet, pour AZI, bien que la valeur de log  $K_{ow} = 4$  les prédisposeraient à être largement retrouvées sur les particules, cette molécule présente un log  $K_d$  faible ( $<1,9$ ). A l'inverse, OFL présente une très forte tendance à s'adsorber sur les boues malgré une valeur de log  $K_{ow}$  négative. Ces observations laissent donc penser que les mécanismes d'adsorption sont gouvernés principalement par des forces électrostatiques plus que par des interactions hydrophobes.

Par ailleurs, on peut voir que le Log  $K_d$  de OFL et CBZ est similaire dans notre étude et dans celle de Gonzalez-Salgado et al. (2020). Ainsi les différents types de boue utilisés n'entraînent pas une modification significative des interactions avec les MPs et les différences observées dans l'élimination de CBZ dans ces deux études (voir Figure 64) ne sont donc pas attribuables à une différence de biodisponibilité.

Les  $K_d$  dans le MAD, MAD-TAD et MAD-TAR sont proches. Par conséquent, les réacteurs couplés (TAD et TAR) n'ont pas modifié les partitions des MPs dans les digestats par rapport au MAD. La Figure 66 présente la partition de chaque MP dans la phase liquide, cette fraction dépendant non seulement du  $K_d$  mais aussi de la teneur en matières en suspension (cf. chapitre I, §4.1.2).



**Figure 66. Répartition des MP en phases particulières et liquides**

On peut constater sur la Figure 66 que moins de 5% des OFL et CIP se trouvent dans la partie liquide du digestat. A l'inverse plus de 40 % des AZI et CBZ se trouvent dans la partie liquide.

On peut voir sur la Figure 66 que le CBZ et l'AZY sont plus solubilisés dans les réacteurs hybrides que le MAD. Cependant, on ne peut pas observer de tendance à la solubilisation des OFL et CIP selon la configuration du réacteur.

De plus, Nous ne pouvons pas lier le taux de biodégradation à la répartition des MP. Par exemple, AZY et CIP ont des taux de biodégradation similaires (voir la Figure 63) alors que leur fraction dans la phase liquide est très différente (voir la Figure 66).

### 3 Caractérisations complémentaires des digestats

Le paragraphe précédent a montré que les différences entre configurations sont peu marquées, et ce du fait (i) des écart-types importants observés dans la quantification des micropolluants, difficultés fréquemment observées lors de l'études de matrices chargées comme le sont les boues biologiques et les digestats, et (ii) des effets limités observés des procédés hybrides sur les paramètres macroscopiques (biodégradation, solubilisation), comme évoqué dans le chapitre III. Si une valorisation des digestat est envisagée, il est intéressant de s'intéresser à d'autres paramètres spécifiques susceptibles de traduire des effets des rejets dans l'environnement. Ainsi, dans cette section, nous étudierons les résultats des tests d'écotoxicité, la concentration des métaux lourds en phase liquide et l'antibiorésistance des digestats.

#### 3.1 Effet des couplages MAD-TAD et MAD-TAR sur l'écotoxicité

Des essais d'écotoxicité ont été menés par le Centre de Recherche sur la Biodiversité et l'Environnement (CRBE, CNRS, Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse INP, IRD), voir Annexe 6 : Evaluation de l'écotoxicité des différentes boues.

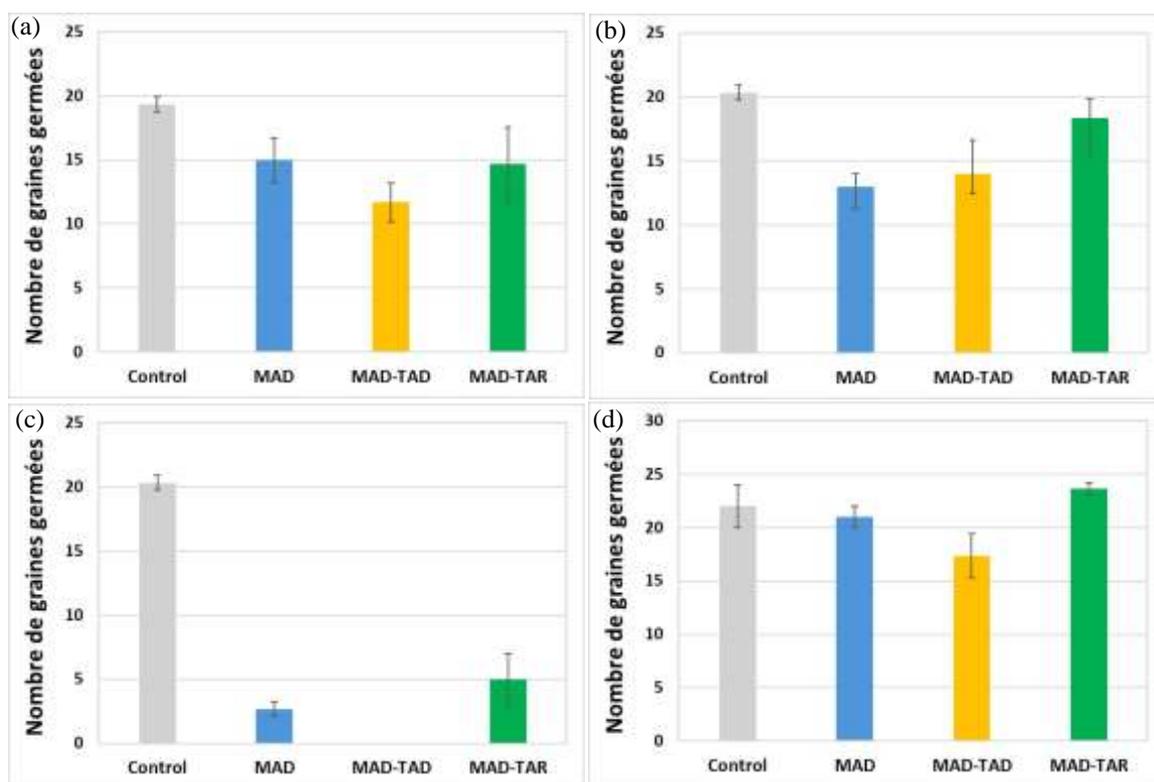
Un test de toxicité vis-à-vis de *Daphnia magna* (ISO 6341) a été réalisé sur le lixiviat de la fraction solide des digestats. Aucune différence significative n'a été observée entre les trois campagnes expérimentales qui ont toutes montré une absence de toxicité aigüe sur cet organisme.

Des essais de germination de cresson via le test normalisé FD U44-165 ont également été menées. Ce test permet d'évaluer la phytotoxicité et repose sur le dénombrement des graines

émergées (test en boîte de pétri et sur sol amendé) ainsi que sur l'étude de la partie aérienne des plantules émergées (test sur sol amendé).

Les tests sur sol amendé n'ont, eux non plus, pas mis en évidence de différence significative entre les configurations traduisant la capacité du sol (argileux) à fixer les éléments toxiques. A l'inverse, les tests menés en boîte de pétri ont permis de mettre en évidence des différences significatives : sur le digestat brut (cf. Figure 67a), on constate une diminution du taux de germination en MAD-TAD alors que les procédés MAD et MAD-TAR ne présente quant à eux pas de différences significatives par rapport au contrôle.

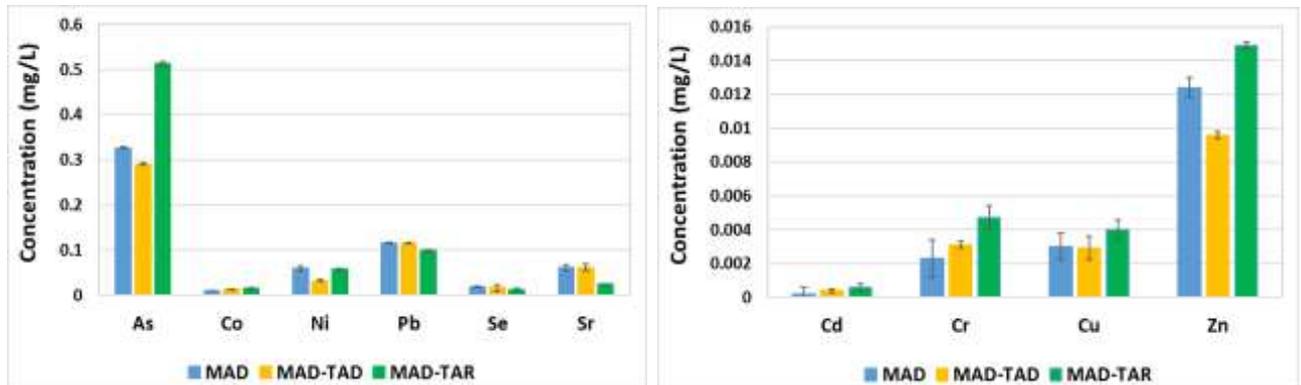
De façon à identifier la localisation de cette toxicité, diverses fractions ont été caractérisées : la fraction solide (Figure 67b), la fraction liquide (Figure 67c) ainsi que le lixiviat issu de la fraction solide (Figure 67d). Si une phytotoxicité légèrement plus importante dans les configurations MAD et MAD-TAD que dans le MAD-TAR (qui ne présentait pas de différence significative avec le contrôle) a été observée sur la fraction solide (Figure 67b), il apparait de façon évidente que la fraction liquide concentre les effets phytotoxiques (Figure 67c) pour toutes les configurations, le digestat du procédé MAD-TAD ayant même conduit à une absence totale de germination.



**Figure 67. Résultats des tests d'écotoxicité sur : le digestat brut (a) la fraction solide (b) liquide (c) et le lixiviat de la fraction solide (d) des campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR**

La phytotoxicité est une problématique complexe et elle peut être influencée par divers facteurs. Il est bien sûr très difficile d'en identifier un responsable principal. Notamment la quantification des micropolluants n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux configurations comprenant une partie thermophile.

Une autre hypothèse pourrait être la présence de métaux lourds. En effet, Hospido et al. (2010) ont démontré que les émissions directes de métaux lourds dans le sol sont prédominantes dans les catégories d'impact liées à la toxicité humaine et à l'écotoxicité terrestre, représentant plus des deux tiers de l'impact total. La Figure 68 présente les concentrations de certains métaux lourds dans la phase liquide des digestats des trois campagnes.



**Figure 68. Concentration des métaux lourds en phase liquide dans les campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR**

La comparaison des concentrations en métaux lourds dans la phase liquide des digestats des trois campagnes nous montre qu'il n'y a pas d'effet spécifique des couplages MAD-TAD et MAD-TAR (voir la Figure 68).

Une autre hypothèse pourrait être la concentration élevée en ions ammonium (Tigini et al., 2016). Hanajima et al. (2007) ont mené des tests batchs sur un mélange de digestat de fumier et de déchets (volume du digestat=3 L) obtenu par un digesteur avec SRT de 9 jours à une température contrôlée de 30°C. Une aération faible ou élevée ( $100$  ou  $400 \frac{mL}{min}$ ) a été ajoutée pendant la période d'aération de 14 jours. Des graines de Komatsuna (*Brassica campestris*) ont été utilisées pour les tests de germination. Un taux d'aération élevé (étant 11 fois plus que l'aération appliquée dans le cas du TAR dans notre étude) a amélioré l'indice de germination (IG) de 5,7 % à près de 80 %, alors qu'une aération à faible taux d'aération ( $100 \frac{mL}{min}$ ) n'y est pas parvenue. La quantité totale d'azote Kjeldhal (NTK) passe à  $1800 \frac{mgN}{L}$  contre une quantité de  $2800 \frac{mgN}{L}$  au démarrage en cas de forte aération alors qu'il n'y a quasiment aucun changement en cas de faible aération.

Donc dans le cas de notre étude, cette différence d'écotoxicité entre les campagnes pourrait être due à une concentration plus élevée d'ammoniac dans le TAD ( $20 \text{ mgN-NH}_3$  obtenue par la modélisation et cette quantité est presque 3 fois plus que les réacteurs MAD) en raison de la température élevée. Une partie de l'ammoniac est éliminée par aération en MAD-TAR ( $0,1 \text{ gNH}_3 \text{ j}^{-1}\text{L}^{-1}$ ), ce qui pourrait expliquer la toxicité moindre du digestat issu du MAD-TAR par rapport au MAD-TAD. Cela met en évidence l'effet positif de l'aération dans le TAR du procédé MAD-TAR, tandis que l'effet seul de la température élevée dans le TAD ne semble pas diminuer la toxicité du digestat, et pourrait même l'aggraver.

## **3.2 Evaluation de l'antibiorésistance des digestats**

Le laboratoire RESINFIT, UMR INSERM 1092 de l'Université de Limoges a été chargé d'évaluer la présence d'indicateurs environnementaux de résistance, de gènes de résistances et d'éléments mobiles lors des expérimentations menées sur les campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR.

Deux types d'approche ont été menées : d'une part la recherche des intégrons, considérés comme marqueurs de l'antibiorésistance dans la littérature scientifique et, d'autre part, de cibler certains gènes de résistance et des gènes codant pour des éléments génétiques mobiles, notamment des séquences d'insertions. Les méthodes de quantification employées dans le cadre de ces approches sont détaillées en Annexe 7 : Méthodes d'évaluation de l'antibiorésistance des digestats.

### **3.2.1 Résultats des mesures d'intégrons**

Le ratio entre quantité d'intégrons et de gènes 16S (nombre de copie de rARN 16S par litre, équivalent à une concentration bactérienne) définit l'abondance relative utilisée comme marqueur de l'antibiorésistance. Les intégrons sont des éléments génétiques bactériens (plateforme) capables de promouvoir l'acquisition et l'expression de gènes constitué d'une partie constante (plateforme fonctionnelle : Intégrase, site de recombinaison, promoteur de cassette) et d'une partie variable (Unité fonctionnelle : cassettes) (Barraud et al. 2011). La plupart des gènes de cassette code pour une résistance, notamment aux antibiotiques et donc joue un rôle dans la dissémination de la résistance. On distingue 3 classes principales d'intégrons (classe 1, 2 et 3) différents par leur structure génétique, leur mécanisme d'acquisition de cassettes, et leur fréquence. L'intégron de classe 1 (Int1), intégron clinique, comme indicateur simple et global de résistance aux antimicrobiens dans l'environnement (Gillings (2014)). Les intégrons de classe 2 sont catalogués comme plus présents chez les animaux et les classes 3 dans l'environnement. Dans 3 échantillons, nous avons signalés la présence d'intégrons de classe 3 mais leur quantité est juste au-dessus de la limite de quantification et ne sont pas réellement significatifs. La Figure 69 présente l'évaluation de l'abondance relative des intégrons de classe 1, 2 et 3 dans les différents échantillons des campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR.

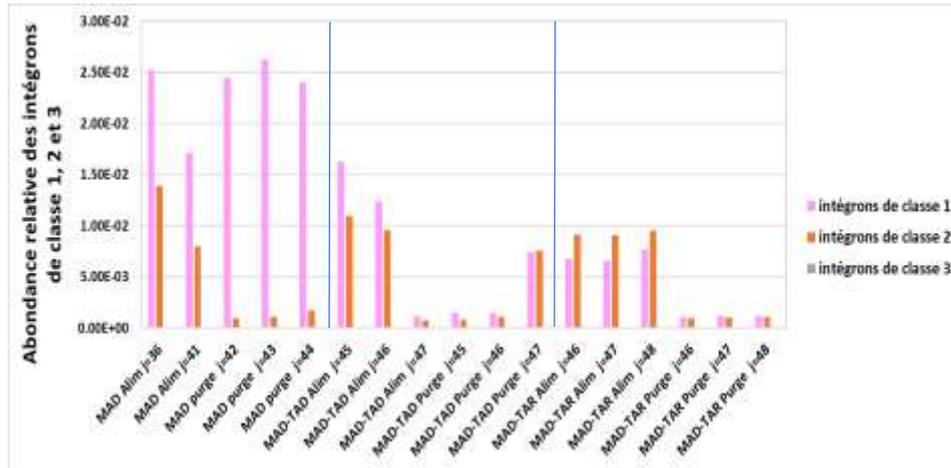


Figure 69. Évaluation de l'abondance relative des intégrons de classe 1, 2 et 3 dans les différents échantillons. La ligne verticale bleue sépare les 3 procédés. Les échantillons correspondant à l'alimentation précèdent ceux de la purge pour chaque cas

La Figure 69 montre une baisse significative de l'abondance relative dans les deux systèmes intégrant un réacteur thermophile, le MAD-TAD et le MAD-TAR, sans distinction entre ces deux procédés. Cela indique que c'est la température élevée, et non la présence d'oxygène, qui est le facteur déterminant.

### 3.2.2 Résultats de caractérisation des résistomes dans les digestats

Les caractéristiques des résistomes obtenus à partir des ADN collectés dans les échantillons sont reporté dans la Figure 70 et la Figure 71 . Les traitements appliqués, et particulièrement les traitements thermophiles, entraînent une certaine réduction du résistome et une modification de son abondance relative et proportionnelle.

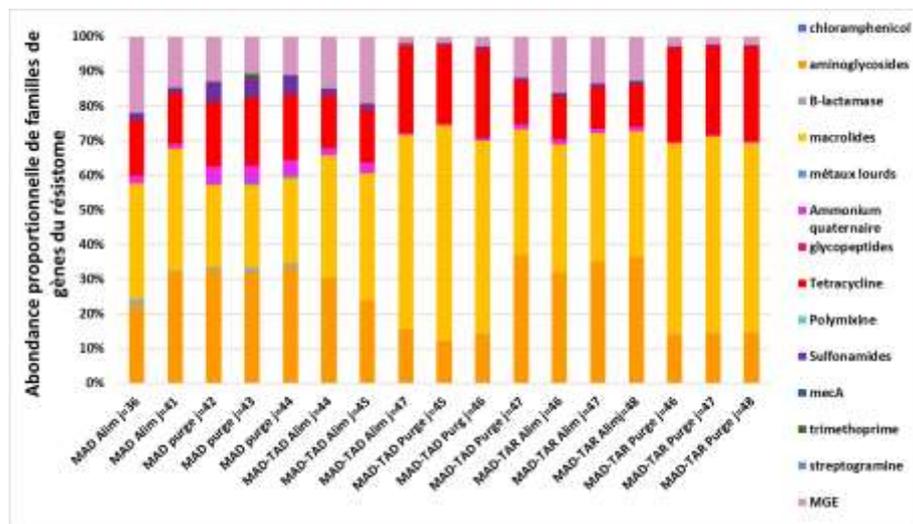
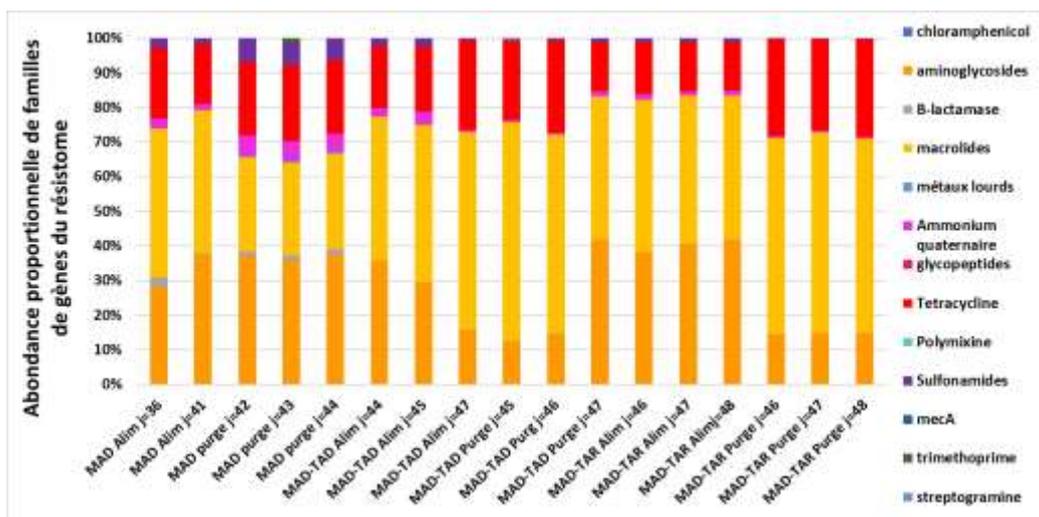


Figure 70. Abondance proportionnelle de familles de gènes du résistome dans les alimentations et les purges (digestats) pour les 3 principes de traitements



*Figure 71. Abondance proportionnelle de familles de gènes du résistome dans les alimentations et les purges (digestats) pour les 3 principes de traitements sans éléments génétiques mobiles*

On peut constater la diminution des éléments génétiques mobiles et de la résistance aux aminoglycosides dans les procédés MAD-TAD et MAD-TAR (voir la Figure 70), ainsi que la persistance relative des résistances aux macrolides et aux tétracyclines (voir la Figure 71).

## 4 Conclusion du chapitre V

Les performances des campagnes MAD, MAD-TAD et MAD-TAR ont été évaluées en termes de biodégradation des MPs et de la toxicité du digestat. OFL est mieux biodégradé en MAD-TAD et MAD-TAR par rapport à MAD. De plus, on ne constate pas de différence entre MAD-TAD et MAD-TAR pour cette molécule. Ceci souligne l'effet positif de la température élevée du TAD/TAR sur la biodégradation de cette molécule. De plus, nous observons que la biodégradation du CBZ est plus efficace dans le MAD-TAR que dans le MAD. Cela montre l'effet positif de la présence d'une aération dans le TAR.

De plus, nous avons observé que les interactions électrostatiques jouent un rôle beaucoup plus important que l'hydrophobicité dans la répartition des molécules entre la phase liquide et solide, tout du moins pour les molécules quantifiées. Par exemple, bien qu'AZI soit hydrophobe, il a été retrouvé à plus de 80% dans la phase liquide.

En ce qui concerne la toxicité des digestats, on constate que le digestat brut et la fraction liquide de MAD-TAD sont plus phyto-toxiques que ceux de MAD et MAD-TAR, tandis que les fractions solides et liquides de MAD-TAR sont moins toxiques. De plus, les résultats nous montrent que les composés responsables de cette phyto-toxicité ont tendance à être transférés vers la phase liquide.

La comparaison des concentrations de métaux lourds et de MPs nous montre que les différences observées ne sont pas directement corrélables aux teneurs de ces composés. Une hypothèse est que l'ammoniac serait à l'origine de ces différences observées en termes d'écotoxicité. Ceci souligne l'effet positif de la présence d'aération (stripping de l'ammoniaque) dans le TAR et le

fait qu'une température élevée à elle seule ne diminue pas la toxicité du digestat et peut même l'aggraver en augmentant la concentration en ammoniac.

Les résultats d'écotoxicité, associés aux concentrations de métaux lourds dans la phase liquide, peuvent servir d'informations pour déterminer la destination du digestat (épandage, incinération ou stockage), tout en envisageant également la nécessité d'un procédé de valorisation de la fraction liquide chargée en azote, par exemple par de la chemisorption transmembranaire comme étudié dans notre laboratoire (Gonzalez-Salgado et al., 2023). En effet les conséquences d'un retour en tête, d'un effluent chargé en azote ammoniacal sont lourdes de conséquences, sur la file eau (besoins en aération et en carbone organique pour assurer respectivement la nitrification et la dénitrification) et ce renvoi doit donc être évité.

En ce qui concerne l'antibiorésistance, le suivi des intégrons, et notamment de l'abondance relative des intégrons de classe 1, nous a permis d'estimer le niveau d'antibiorésistance. Dans ce contexte, il a été possible d'observer l'impact des procédés hybrides (MAD-TAD et MAD-TAR) sur la réduction de la quantité de cet indicateur, ce qui suggère, par extrapolation, une diminution du risque de dissémination via les rejets de digestats. Il est important de noter que cette amélioration semble liée à la température élevée dans les réacteurs couplés, sans impact spécifique de la présence d'oxygène. Cependant, cette observation nécessiterait confirmation par l'augmentation du nombre d'échantillons. L'analyse du résistome de ces mêmes échantillons confirme la réduction de l'abondance relative, en particulier de la proportion des éléments génétiques mobiles et de la résistance aux aminoglycosides, bien que les résistances aux macrolides et aux tétracyclines persistent relativement.

## Conclusion et perspectives

Les enjeux de réduire les micropolluants et de maximiser la production d'énergie à partir de la DCO des eaux usées urbaines ont conduit à proposer le programme SAVE. Ces préoccupations s'inscrivent parfaitement dans les orientations de la Commission Européenne qui prépare une modification de la directive sur les eaux résiduaires urbaines.

La digestion anaérobie constitue un élément clé de la filière permettant de transformer la DCO en CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub> tout en conservant les nutriments. C'est donc une voie de valorisation très attractive. Néanmoins, dans ce procédé, des limites de biodégradabilité de la DCO particulaire et de micropolluants organiques sont constatées. C'est pourquoi, l'entreprise SAPOVAL était intéressée pour évaluer et, éventuellement, développer un procédé qui permettrait de repousser les limites de biodégradabilité de la digestion anaérobie conventionnelle ; cette dégradation ciblant la DCO particulaire et les micropolluants. Si des travaux existent sur les techniques d'augmentation de la dégradation de la DCO en digestion anaérobie, peu utilisent des procédés couplés susceptibles de s'attaquer aussi aux micropolluants organiques. Ma thèse s'est inscrite dans ce contexte.

Dans ce cadre du traitement et de la valorisation des boues de stations d'épuration par méthanisation, cette étude avait pour objectif d'examiner des procédés hybrides combinant un digesteur anaérobie conventionnel (MAD) avec un digesteur thermophile, avec (TAR) ou sans (TAD) aération et d'apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes d'adaptation des activités microbiennes et de dégradation afin, notamment, de fiabiliser le démarrage des installations.

D'un point de vue des performances, ce travail visait à vérifier :

- La reproductibilité, au regard des deux études antérieures, du niveau de réduction de la production de boues pour le MAD-TAR en comparaison du MAD ; ce niveau de réduction se faisant sans augmentation de la production de méthane.
- Une meilleure élimination de certains micropolluants et de l'antibiorésistance dans la configuration MAD-TAR par rapport à celle du MAD.

D'un point de vue des connaissances, ce travail a voulu comprendre :

- L'effet de la température et du couplage température / aération sur les dynamiques des différentes populations microbiennes anaérobies et éventuellement aérobies (ou aérobies facultatives) dans les phases de démarrage du procédé hybride.
- Le lien entre conditions opératoires (TAR ou TAD) sur la dégradation des micropolluants et de l'antibiorésistance.

Notre approche a cherché à intégrer à la fois des expériences et de la modélisation dynamique pour favoriser la compréhension des processus en jeu dans ces procédés.

D'un point de vue performances, nos résultats ont permis, de nouveau, d'observer une réduction substantielle de la production de boue par le MAD-TAR en comparaison des deux autres configurations. A ce stade nous en avons conclu, comme nos prédécesseurs, que ce couplage permet d'accroître la dégradation de la matière particulaire. Une partie de la DCO

n'étant pas retrouvée, une dégradation aérobie ou anaérobie dans le TAR a été supposée. Le flux d'air peut induire une perte de méthane qui, de par la dilution, n'est pas quantifiable dans nos conditions expérimentales.

Nous nous sommes intéressés aux signaux dynamiques et notamment à l'accumulation transitoire d'AGVs pour confronter des hypothèses permettant d'expliquer les évolutions des activités des populations microbiennes sous configurations MAD-TAD et MAD-TAR. L'enjeu était de comprendre l'adaptation de populations microbiennes aux environnements physiques et/ou chimiques changeants provoqués par l'ajout du TAD ou TAR. En particulier, l'effet d'un passage des cellules transitoirement de 35°C à 55 °C en présence ou absence d'une aération a été étudié.

Pour les configurations MAD-TAD et MAD-TAR, une accumulation transitoire d'AGVs est observée qui peut conduire à une défaillance de la digestion. Aucune accumulation significative n'est observée sur le MAD. Ces accumulations indiquaient que l'effet du TAD et du TAR perturbent les populations indigènes.

Des modifications du modèle de base (ADM1\_B) nous ont permis de tester plusieurs hypothèses à l'aide de scénarios. Nous avons tout d'abord pu observer que l'hypothèse qui permet une meilleure représentation des évolutions dynamiques observées se base principalement sur un décès des populations thermosensibles présentes initialement et la croissance de populations thermorésistantes en remplacement. Cette hypothèse est cohérente avec un passage séquentiel d'une température mésophile à une température thermophile avec un temps de contact élevé, induisant certainement une mortalité forte chez des microorganismes non adaptés. Cette hypothèse doit cependant être complétée par d'autres considérations pour permettre une bonne adéquation entre les résultats de simulation et ceux de l'expérience. Par exemple, une augmentation de la concentration de NH<sub>3</sub> pourrait entraîner la disparition des X<sub>ac</sub>, plus sensibles à l'ammoniac, tandis que les X<sub>sao</sub>, thermo-ammoniaques tolérants, pourraient croître. Cependant, cette hypothèse nécessite des recherches supplémentaires pour être confirmée. Cette dynamique des populations, potentiellement au détriment des X<sub>ac</sub> et en faveur des X<sub>sao</sub>, pourrait favoriser la production de biogaz par la voie hydrogénotrophe dans le MAD-TAD.

Pour expliquer la dégradation accrue de la DCO particulière en configuration MAD-TAR, deux hypothèses ont été avancées : une dégradation aérobie issue de la croissance d'une population hétérotrophe aérobie ou une augmentation de la biodégradabilité avec consommation anaérobie dans le TAR et une production de CH<sub>4</sub> qui serait volatilisée et non mesurée dans l'évent du TAR. Le modèle à deux types de populations (Tr et Ts) a été appliquée pour modéliser le MAD-TAR, en intégrant tout d'abord des réactions aérobies et une amélioration de la biodégradabilité de la matière dans le TAR. Les résultats de nos modélisations ont montré que les 21 % de DCO manquantes dans le bilan ne résultent pas d'une dégradation aérobie puisque la consommation de l'azote pour la croissance n'est pas observée. La modélisation telle que proposée n'a pas permis non plus de confirmer une production anaérobie dans le TAR. Un problème de bilan matière qui serait répété systématiquement sur trois études différentes et sur trois types de réacteurs serait surprenant ; d'autant plus que le bilan DCO sur le MAD-TAD est satisfait. Nous n'avons donc pas réussi à comprendre les mécanismes de cette dégradation accrue de la DCO particulière. On pourrait proposer de reproduire l'expérience avec une quantification plus fine des flux de carbone qui sortent du TAR. On peut proposer de piéger le CO<sub>2</sub> produit par

exemple. Le piégeage du méthane semble difficile à mettre en œuvre. On pourrait aussi proposer de conduire un MAD-TAR en injectant du N<sub>2</sub> au lieu de l'air. Cela permettrait d'avoir les mêmes coefficients de ventilation sans présence d'oxygène.

L'enjeu prioritaire de ce travail portait sur l'amélioration de l'élimination des micropolluants par le système hybride MAD-TAR. Cette élimination accrue avait été déjà observée dans l'étude SMS précédente, même si elle ne concernait qu'une partie des micropolluants testés. Il s'agissait ici d'identifier si de la température ou de l'oxygène l'un a un rôle majeur ou bien si c'est un effet synergique des deux paramètres qui conduit à une amélioration. Les difficultés inhérentes à la quantification de micropolluants dans des matrices chargées comme des boues primaires ou des digestats ont été rencontrées, notamment signal sur bruit faible et dispersion des résultats importantes. Sur les 19 molécules recherchées 4 ont pu faire l'objet d'une comparaison sur les trois systèmes et les tendances observées diffèrent d'une molécule à l'autre : si aucun effet significatif des conditions opératoires n'a été observé pour AZY et CIP, les conditions thermophiles séquentielles ont amélioré significativement l'élimination pour OFL et la présence d'aération a amené une plus-value additionnelle non significative d'un point de vue statistique. La thermophilie a également permis une dégradation accrue de CBZ sans distinction significative liée à la présence ou non d'aération. Bien sûr, nous aimerions avoir des démonstrations pour relier les améliorations observées sur la dégradation de MPs et celles sur l'hydrolyse : il est probable que des enzymes communes aux MPs et à la matière organique difficilement biodégradable s'expriment et il serait intéressant d'identifier lesquelles sont actives en conditions thermophiles et selon la présence d'aération.

Les analyses ciblées permettent d'avoir des informations sur les performances de procédés. Cependant certains polluants et métabolites importants (en termes de concentration et/ou d'effet) sont omis ce qui nous a poussé, avec les partenaires du projet SAVE, à mener une évaluation comparative de la phytotoxicité, caractérisation intégrative par excellence. Le digestat brut et la fraction liquide de MAD-TAD sont plus phytotoxiques que ceux des configurations MAD et MAD-TAR, tandis que les fractions solides et liquides de MAD-TAR sont moins toxiques. L'effet ne semble pas être corrélé aux concentrations en MPs ou en métaux lourds ce qui suggère que d'autres facteurs sont impliqués. Un rôle de la teneur en azote ammoniacal est probable quand on se penche sur les effets observés : d'une part, la température élevée dans le TAD conduit à une concentration en ammoniac plus élevée ; d'autre part l'aération dans le TAR conduit au stripping de l'ammoniac. De façon plus générale, les résultats nous montrent que les composés responsables de cette phytotoxicité ont tendance à être transférés vers la phase liquide. Cela souligne que cette fraction post-digestion doit être traitée, et si possible via des technologies permettant la récupération de l'azote plutôt qu'en privilégiant un retour en tête de station qui aurait pour conséquence directe une consommation accrue d'énergie (aération pour les microorganismes dénitrifiants) voire un dysfonctionnement si le flux de DCO n'est pas suffisant pour assurer la dénitrification. Les résultats concernant l'antibiorésistance sont encourageants avec un effet significatif de la thermophilie, notamment sur la résistance aux aminoglycosides, mais ceux-ci devront être renforcés de façon à augmenter le nombre d'échantillons mais aussi à vérifier ces observations sur des typologies d'effluents différents (on peut penser en particulier aux effluents hospitaliers).

## Références

- Abbott, T., Kor-Bicakci, G., & Eskicioglu, C. (2021). Examination of single-stage anaerobic and anoxic/aerobic and dual-stage anaerobic-anoxic/aerobic digestion to remove pharmaceuticals from municipal biosolids. *Science of The Total Environment*, 791, 148237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148237>
- Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse. (2021). <https://www.eaurmc.fr/>
- Alvarino, T., Suárez, S., Garrido, M., Lema, J. M., & Omil, F. (2016). A UASB reactor coupled to a hybrid aerobic MBR as innovative plant configuration to enhance the removal of organic micropollutants. *Chemosphere*, 144, 452-458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.016>
- Alvarino, T., Suarez, S., Lema, J. M., & Omil, F. (2014). Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactors. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 506-513. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.031>
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Lyberatos, G. (2012). Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 191-208. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.081>
- Astals, S., Esteban-Gutiérrez, M., Fernández-Arévalo, T., Aymerich, E., García-Heras, J. L., & Mata-Alvarez, J. (2013). Anaerobic digestion of seven different sewage sludges : A biodegradability and modelling study. *Water Research*, 47(16), Article 16. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.019>
- Barret, M., Carrère, H., Delgadillo, L., & Patureau, D. (2010). PAH fate during the anaerobic digestion of contaminated sludge : Do bioavailability and/or cometabolism limit their

- biodegradation? *Water Research*, 44(13), 3797-3806.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.031>
- Barret, M., Patureau, D., Latrille, E., & Carrère, H. (2010). A three-compartment model for micropollutants sorption in sludge : Methodological approach and insights. *Water Research*, 44(2), 616-624. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.029>
- Ben, W., Zhu, B., Yuan, X., Zhang, Y., Yang, M., & Qiang, Z. (2018). Occurrence, removal and risk of organic micropollutants in wastewater treatment plants across China : Comparison of wastewater treatment processes. *Water Research*, 130, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.057>
- Carballa, M., Omil, F., Alder, A. C., & Lema, J. M. (2006). Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Science and Technology*, 53(8), 109-117. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.241>
- Catenacci, A., Peroni, M., Gievers, F., Mainardis, M., Pasinetti, E., & Malpei, F. (2022). Integration of sludge ozonation with anaerobic digestion : From batch testing to scenario analysis with energy, economic and environmental assessment. *Resources, Conservation and Recycling*, 186, 106539. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106539>
- Cavaillé, L., Kim, C., Bounouba, M., Zind, H., Claparols, C., Riboul, D., Pinelli, E., Albasi, C., & Bessiere, Y. (2021). Development and validation of QuEChERS-based extraction for quantification of nine micropollutants in wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(20), Article 20. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03489-z>

- Cellarier, N. (2022). *Portail sur l'assainissement collectif*.  
<https://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/>
- Chen, Q., Wu, W., Qi, D., Ding, Y., & Zhao, Z. (2020). Review on microaeration-based anaerobic digestion : State of the art, challenges, and perspectives. *Science of The Total Environment*, 710, 136388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136388>
- Chiffres clés des énergies renouvelables*. (2023). Données et études statistiques pour le changement climatique, l'énergie, l'environnement, le logement, et les transports.  
<https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/chiffres-cles-des-energies-renouvelables-edition-2023>
- Coladon, M. (2024, septembre 17). Antibiotiques : La résistance responsable de 39 millions de morts d'ici 2050. *La Santé Au Quotidien*. <https://lasanteauquotidien.com/actualite-sante/antibiotiques-la-resistance-responsable-de-39-millions-de-morts-dici-2050/>
- Couturier, C. (2014). *La méthanisation rurale, outil des transitions énergétique et agroécologique*. SOLAGRO.
- Couturier, C., Berger, S., & Meiffren, I. (2001). *La digestion anaérobie des boues urbaines*. SOLAGRO.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lardon, L., Steyer, J.-P., & Patureau, D. (2011). A new dynamic model for bioavailability and cometabolism of micropollutants during anaerobic digestion. *Water Research*, 45(15), 4511-4521. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.047>
- Directorate-General for Environment. (2022). *Proposal for a revised Urban Wastewater Treatment Directive—European Commission*.  
[https://environment.ec.europa.eu/publications/proposal-revised-urban-wastewater-treatment-directive\\_en](https://environment.ec.europa.eu/publications/proposal-revised-urban-wastewater-treatment-directive_en)
- D.J. Batstone. (2002). *Anaerobic Digestion Model No. 1*. IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes.

- do Nascimento, J. G. da S., Silva, E. V. A., Dos Santos, A. B., da Silva, M. E. R., & Firmino, P. I. M. (2021). Microaeration improves the removal/biotransformation of organic micropollutants in anaerobic wastewater treatment systems. *Environmental Research*, 198, 111313. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111313>
- Dumas, C., Perez, S., Paul, E., & Lefebvre, X. (2010). Combined thermophilic aerobic process and conventional anaerobic digestion : Effect on sludge biodegradation and methane production. *Bioresource Technology*, 101(8), 2629-2636. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.065>
- Dyksma, S., Jansen, L., & Gallert, C. (2020). Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste. *Microbiome*, 8(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00862-5>
- Faixo, S., Gehin, N., Balayssac, S., Gilard, V., Mazeghrane, S., Haddad, M., Gaval, G., Paul, E., & Garrigues, J.-C. (2021). Current trends and advances in analytical techniques for the characterization and quantification of biologically recalcitrant organic species in sludge and wastewater : A review. *Analytica Chimica Acta*, 1152, 338284. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338284>
- Floriat, M. (2022). *Gestion des boues urbaines Quelle méthodologie pour élaborer une stratégie territoriale dans un contexte réglementaire mouvant*. Amorce.
- Fu, S., Lian, S., Angelidaki, I., & Guo, R. (2022). Micro-aeration : An attractive strategy to facilitate anaerobic digestion. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.09.008>
- Gahlot, P., Balasundaram, G., Tyagi, V. K., Atabani, A. E., Suthar, S., Kazmi, A. A., Štěpanec, L., Juchelková, D., & Kumar, A. (2022). Principles and potential of thermal hydrolysis of sewage sludge to enhance anaerobic digestion. *Environmental Research*, 214, 113856. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113856>

- Gao, W. J., Leung, K. T., Qin, W. S., & Liao, B. Q. (2011). Effects of temperature and temperature shock on the performance and microbial community structure of a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, *102*(19), 8733-8740. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.095>
- Ghattas, A.-K., Fischer, F., Wick, A., & Ternes, T. A. (2017). Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. *Water Research*, *116*, 268-295. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.001>
- Gonzalez-Gil, L., Carballa, M., & Lema, J. M. (2020). Chapter 16—Removal of organic micropollutants by anaerobic microbes and enzymes. In S. Varjani, A. Pandey, R. D. Tyagi, H. H. Ngo, & C. Larroche (Éds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (p. 397-426). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819594-9.00016-4>
- Gonzalez-Gil, L., Mauricio-Iglesias, M., Carballa, M., & Lema, J. M. (2018). Why are organic micropollutants not fully biotransformed? A mechanistic modelling approach to anaerobic systems. *Water Research*, *142*, 115-128. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.032>
- Gonzalez-Gil, L., Mauricio-Iglesias, M., Serrano, D., Lema, J. M., & Carballa, M. (2018). Role of methanogenesis on the biotransformation of organic micropollutants during anaerobic digestion. *Science of The Total Environment*, *622-623*, 459-466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.004>
- Gonzalez-Salgado, I., Bounouba, M., Dubos, S., Mengelle, E., Guigui, C., & Sperandio, M. (2023). Influence of feed salinity on ammonia recovery from high-strength effluents in transmembrane chemical absorption process. *Journal of Membrane Science*, *687*, 122086. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2023.122086>

- Gonzalez-Salgado, I., Cavallé, L., Dubos, S., Mengelle, E., Kim, C., Bounouba, M., Paul, E., Pommier, S., & Bessiere, Y. (2020). Combining thermophilic aerobic reactor (TAR) with mesophilic anaerobic digestion (MAD) improves the degradation of pharmaceutical compounds. *Water Research*, *182*, 116033. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116033>
- Guérin, S., Azimi, S., Bernier, J., Rocher, V., Mottelet, S., & Pauss, A. (2016). Le pouvoir méthanogène des boues urbaines Cartographie des boues de STEP et réduction du temps de mesure par un couplage « expérimentation en réacteur/modélisation ». *Eau, l'Industrie, les Nuisances*.
- H. Budzinski, C. Soulier, M. Esperanza, C. Miège, M. Coquery, & J.-M. Choubert, S. Martin-Ruel, A. Bruchet. (2009, novembre 26). *Concentrations et flux de micropolluants dans les eaux usées et les boues de stations d'épuration*.
- Hammer, L., & Palmowski, L. (2021). Fate of selected organic micropollutants during anaerobic sludge digestion. *Water Environment Research*, *93*(10), 1910-1924. <https://doi.org/10.1002/wer.1603>
- Han, Y., Green, H., & Tao, W. (2020). Reversibility of propionic acid inhibition to anaerobic digestion : Inhibition kinetics and microbial mechanism. *Chemosphere*, *255*, 126840. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126840>
- Hanajima, D., Kuroda, K., Fukumoto, Y., Yasuda, T., Suzuki, K., & Haga, K. (2007). Effect of aeration in reducing phytotoxicity in anaerobic digestion liquor of swine manure. *Animal Science Journal*, *78*(4), 433-439. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00458.x>
- Hasegawa, S., Shiota, N., Katsura, K., & Akashi, A. (2000). Solubilization of organic sludge by thermophilic aerobic bacteria as a pretreatment for anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, *41*(3), 163-169. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0068>

- Henry Weil, J. (2001). *Biochimie générale.. 9ème édition.*  
<https://www.decitre.fr/livres/biochimie-generale-9782100055739.html>
- Héry, M., Sanguin, H., Perez Fabiel, S., Lefebvre, X., Vogel, T. M., Paul, E., & Alfenore, S. (2010). Monitoring of bacterial communities during low temperature thermal treatment of activated sludge combining DNA phylochip and respirometry techniques. *Water Research*, *44*(20), 6133-6143. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.003>
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Lacroix, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, *74*(11), 2515-2522. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>
- Hospido, A., Carballa, M., Moreira, M., Omil, F., Lema, J. M., & Feijoo, G. (2010). Environmental assessment of anaerobically digested sludge reuse in agriculture : Potential impacts of emerging micropollutants. *Water Research*, *44*(10), 3225-3233. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.004>
- Huang, Y., Guo, J., Yan, P., Gong, H., & Fang, F. (2019). Sorption-desorption behavior of sulfamethoxazole, carbamazepine, bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials*, *368*, 739-745. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.063>
- Jan, M., BOUVET, A., & AUBEUT-CHOJNACKI, L. (2023). *Injection de biomethane\_Retour d'experience des stations d'epuration urbaines (STEU).* Synteau.
- Jean-Marc Perret, E. F. (2020). La digestion des boues de station d'épuration : État de l'art et paramètres clés. *INRAE*.
- Jiang, M., Wu, Z., Yao, J., M. Wandera, S., Algapani, D. E., Dong, R., & Qiao, W. (2021). Enhancing the performance of thermophilic anaerobic digestion of food waste by

- introducing a hybrid anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 341, 125861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125861>
- Kennes-Veiga, D. M., Gonzalez-Gil, L., Carballa, M., & Lema, J. M. (2021). The organic loading rate affects organic micropollutants' cometabolic biotransformation kinetics under heterotrophic conditions in activated sludge. *Water Research*, 189, 116587. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116587>
- Kennes-Veiga, D. M., González-Gil, L., Carballa, M., & Lema, J. M. (2022). Enzymatic cometabolic biotransformation of organic micropollutants in wastewater treatment plants: A review. *Bioresource Technology*, 344, 126291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126291>
- Lanko, I., Hejnic, J., Říhová-Ambrožová, J., Ferrer, I., & Jenicek, P. (2021). Digested Sludge Quality in Mesophilic, Thermophilic and Temperature-Phased Anaerobic Digestion Systems. *Water*, 13(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/w13202839>
- Li, Q., Liu, Y., Yang, X., Zhang, J., Lu, B., & Chen, R. (2020). Kinetic and thermodynamic effects of temperature on methanogenic degradation of acetate, propionate, butyrate and valerate. *Chemical Engineering Journal*, 396, 125366. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125366>
- Li, X., Chen, Y., Zhao, S., Chen, H., Zheng, X., Luo, J., & Liu, Y. (2015). Efficient production of optically pure l-lactic acid from food waste at ambient temperature by regulating key enzyme activity. *Water Research*, 70, 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.049>
- Liu, H., Wang, J., Liu, X., Fu, B., Chen, J., & Yu, H.-Q. (2012). Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: Effect of pH. *Water Research*, 46(3), 799-807. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.047>

- Liu, J.-L., & Wong, M.-H. (2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environment International*, 59, 208-224. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012>
- Mazeghrane, S., Latrille, E., Jung, D., Vedrenne, F., Chenu, D., Bizet, A., Trably, E., & Steyer, J. (2013). *Modelling of dark fermentation from household organic waste based on modified ADM*.
- Mo, R., Guo, W., Batstone, D., Makinia, J., & Li, Y. (2023). Modifications to the anaerobic digestion model no. 1 (ADM1) for enhanced understanding and application of the anaerobic treatment processes – A comprehensive review. *Water Research*, 244, 120504. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120504>
- Moerland, M. J., Bruning, H., Buisman, C. J. N., & van Eekert, M. H. A. (2021). Advanced modelling to determine free ammonia concentrations during (hyper-)thermophilic anaerobic digestion in high strength wastewaters. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), 106724. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106724>
- Montecchio, D., Esposito, G., Gagliano, M. C., Gallipoli, A., Gianico, A., & Braguglia, C. M. (2017). Syntrophic acetate oxidation during the two-phase anaerobic digestion of waste activated sludge: Microbial population, Gibbs free energy and kinetic modelling. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.09.017>
- Musvoto, E. V., Wentzel, M. C., Loewenthal, R. E., & Ekama, G. A. (2000). Integrated chemical–physical processes modelling—I. Development of a kinetic-based model for mixed weak acid/base systems. *Water Research*, 34(6), 1857-1867. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00334-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00334-6)
- Narumiya, M., Nakada, N., Yamashita, N., & Tanaka, H. (2013). Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge

- digestion. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 305-312.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.032>
- Nikitina, A. A., Kallistova, A. Y., Grouzdev, D. S., Kolganova, T. V., Kovalev, A. A., Kovalev, D. A., Panchenko, V., Zekker, I., Nozhevnikova, A. N., & Litt, Y. V. (2023). Syntrophic Butyrate-Oxidizing Consortium Mitigates Acetate Inhibition through a Shift from Acetoclastic to Hydrogenotrophic Methanogenesis and Alleviates VFA Stress in Thermophilic Anaerobic Digestion. *Applied Sciences*, 13(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.3390/app13010173>
- Oberoi, A. S., Jia, Y., Zhang, H., Khanal, S. K., & Lu, H. (2019). Insights into the Fate and Removal of Antibiotics in Engineered Biological Treatment Systems : A Critical Review. *Environmental Science & Technology*, 53(13), Article 13.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01131>
- Oliveira, B. M., Zaiat, M., & Oliveira, G. H. D. (2019). The contribution of selected organic substrates to the anaerobic cometabolism of sulfamethazine. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(4), 263-270. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1553909>
- Pandey, P. K., & Soupir, M. L. (2011). Escherichia coli inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express*, 1(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>
- Pokorna-Krayzelova, L., Mampaey, K. E., Vannecke, T. P. W., Bartacek, J., Jenicek, P., & Volcke, E. I. P. (2017). Model-based optimization of microaeration for biogas desulfurization in UASB reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 171-179.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.06.009>
- PubChem. (s. d.). *Sulfamethoxazole*. Consulté 30 mars 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5329>

- Ryue, J., Lin, L., Kakar, F. L., Elbeshbishy, E., Al-Mamun, A., & Dhar, B. R. (2020). A critical review of conventional and emerging methods for improving process stability in thermophilic anaerobic digestion. *Energy for Sustainable Development*, 54, 72-84. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2019.11.001>
- Satpathy, P., Biernacki, P., Cypionka, H., & Steinigeweg, S. (2016). Modelling anaerobic digestion in an industrial biogas digester: Application of lactate-including ADM1 model (Part II). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 51(14), 1226-1232. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1212559>
- Sefe. (2020, août 12). *Méthanisation : Quel est l'état de la production de biométhane en France en 2020 ?* <https://www.sefe-energy.fr/gazmagazine/2020/08/production-biomethane-france-2020>
- Solé-Bundó, M., Cucina, M., Folch, M., Tàpias, J., Gigliotti, G., Garfí, M., & Ferrer, I. (2017). Assessing the agricultural reuse of the digestate from microalgae anaerobic digestion and co-digestion with sewage sludge. *Science of The Total Environment*, 586, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.006>
- Stasinakis, A. S. (2012). Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 121, 432-440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.074>
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., & Lema, J. M. (2008). How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 125-138. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9130-2>
- Syprea. La valorisation des boues d'épuration. Retrieved January 3, 2025, from [https://www.fnade.org/ressources/\\_pdf/2/3517-La-valorisation-des-boues-d-epurati.pdf](https://www.fnade.org/ressources/_pdf/2/3517-La-valorisation-des-boues-d-epurati.pdf).

- Theobald, O. (2014). *Évaluation du potentiel de production de biométhane à partir des boues issues des stations d'épuration des eaux usées urbaines*. ADEME.
- Thomann, C. (2020). *Quelles solutions pour valoriser les boues d'épuration ?*  
<https://amorce.asso.fr/publications/quelles-solutions-pour-valoriser-les-boues-d-epuration-eat05>
- Tonanzi, B., Gallipoli, A., Gianico, A., Montecchio, D., Pagliaccia, P., Rossetti, S., & Braguglia, C. M. (2021). Elucidating the key factors in semicontinuous anaerobic digestion of urban biowaste : The crucial role of sludge addition in process stability, microbial community enrichment and methane production. *Renewable Energy*, 179, 272-284. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.07.049>
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J., & Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material : An overview. *Waste Management*, 28(6), 939-951. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.03.028>
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., & Meng, L. (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, 33(5), 848-853. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.007>
- Wunder, D. B., Bosscher, V. A., Cok, R. C., & Hozalski, R. M. (2011). Sorption of antibiotics to biofilm. *Water Research*, 45(6), 2270-2280. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.013>
- Xu, J., Sheng, G.-P., Ma, Y., Wang, L.-F., & Yu, H.-Q. (2013). Roles of extracellular polymeric substances (EPS) in the migration and removal of sulfamethazine in activated sludge system. *Water Research*, 47(14), Article 14. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.009>
- Xu, Y., Yu, X., Xu, B., Peng, D., & Guo, X. (2021). Sorption of pharmaceuticals and personal care products on soil and soil components : Influencing factors and mechanisms.

- Science of The Total Environment*, 753, 141891.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141891>
- Yang, G., Zhang, P., Zhang, G., Wang, Y., & Yang, A. (2015). Degradation properties of protein and carbohydrate during sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 192, 126-130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.076>
- Ye, Z.-L., Lu, M., Zheng, Y., Li, Y.-H., & Cai, W.-M. (2008). Lactic acid production from dining-hall food waste by *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(11), 1541-1550. <https://doi.org/10.1002/jctb.1968>
- Yi, T., & Harper, W. (2007). The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17  $\alpha$ -ethinylestradiol. *Water research*, 41, 1543-1553. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.023>
- Yu, D., Kurola, J. M., Lähde, K., Kymäläinen, M., Sinkkonen, A., & Romantschuk, M. (2014). Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. *Journal of Environmental Management*, 143, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.025>
- Yuan, H., & Zhu, N. (2016). Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 429-438. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.261>
- Zhang, B., Zhang, L.-L., Zhang, S.-C., Shi, H.-Z., & Cai, W.-M. (2005). The Influence of pH on Hydrolysis and Acidogenesis of Kitchen Wastes in Two-phase Anaerobic Digestion. *Environmental Technology*, 26(3), 329-340. <https://doi.org/10.1080/09593332608618563>

- Zhang, X., Zheng, M., Wang, L., Lou, Y., Shi, L., & Jiang, S. (2018). Sorption of three synthetic musks by microplastics. *Marine Pollution Bulletin*, *126*, 606-609. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.09.025>
- Zhang, Z., Li, X., Liu, H., Zamyadi, A., Guo, W., Wen, H., Gao, L., Nghiem, L. D., & Wang, Q. (2022). Advancements in detection and removal of antibiotic resistance genes in sludge digestion: A state-of-art review. *Bioresource Technology*, *344*, 126197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126197>
- Ziemińska-Buczyńska, A., Banach, A., Bacza, T., & Pieczykolan, M. (2014). Diversity and variability of methanogens during the shift from mesophilic to thermophilic conditions while biogas production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(12), 3047-3053. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1731-z>

## Annexe 1 : Cométabolisme

Des preuves de l'occurrence du co-métabolisme des sulfamides lors de la digestion anaérobie ont été observées dans des études où plus de disponibilité de sources de carbone dégradables était associée à une meilleure élimination des sulfamides (Oliveira et al., 2019). La Figure 72 présente le schéma de la biotransformation métabolique et cométabolique.

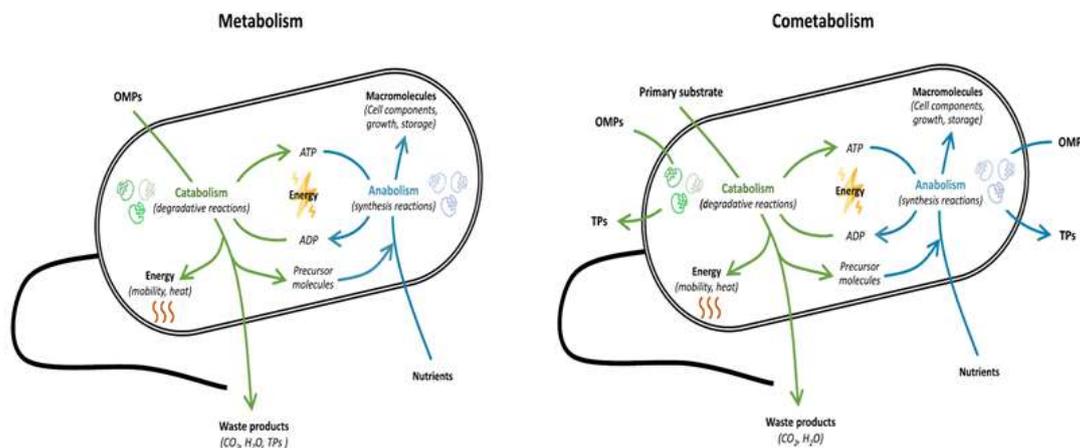


Figure 72. Représentation de la biotransformation métabolique et cométabolique des MPs (Kennes- Veiga et al., 2022)

On peut constater sur la Figure 72 que, dans le cas d'une biotransformation métabolique, les MP constituent le substrat principal. En revanche, dans le cas d'un cométabolisme, l'énergie fournie par les MP n'est pas suffisante pour soutenir la croissance cellulaire, ce qui pousse la cellule à utiliser un autre substrat en plus des MP.

Une étude a été menée sur deux réacteurs anaérobies alimentés par une boue primaire (PS) et une boue secondaire (SS), inoculés avec un digestat mésophile, avec une charge organique de  $1,2 \pm 0,2$  (Delgadillo-Mirquez et al. 2011). Les chercheurs ont réalisé des tests expérimentaux et effectué des simulations sur Matlab-Simulink afin d'étudier si l'intégration du cométabolisme pouvait mieux expliquer les observations expérimentales. Ils ont utilisé la méthode des moindres carrés non linéaires pour estimer les paramètres ( $T_c$ ,  $k_c$  et  $K_{SC}$ ) dans l'équation de cométabolisme (voir Equation 13) :

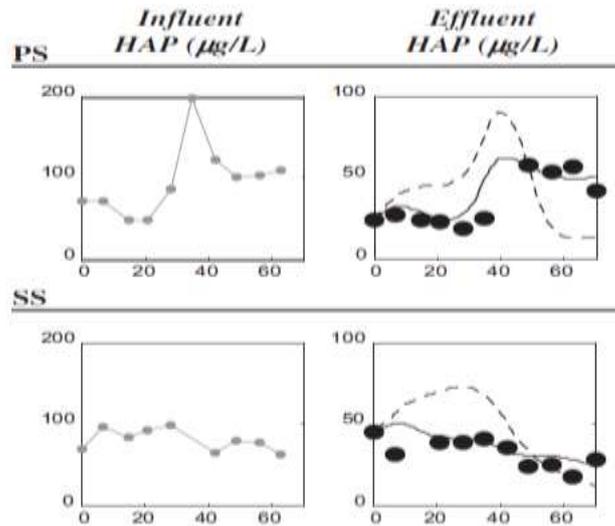
$$\text{Equation 13 : } r_{bio} = (T_c \frac{\mu}{Y} + k_c) \times \frac{C_{disponible}}{C_{disponible} + K_{SC}} X$$

dans laquelle  $T_c$  ( $\frac{\mu g MP}{\mu g DCO-substrat}$ ) est la capacité de transformation de MP,  $k_c$  est la vitesse spécifique maximale de biodégradation des MP en l'absence de substrat primaire ( $\frac{\mu g pollutant}{\mu g DCO-X}$ ) et  $K_{SC}$  c'est la demi saturation constante des MP ( $\frac{\mu g MP}{L}$ ).

De plus, la cinétique classique c'est-à-dire la cinétique Monod c'est :

$$r_{bio} = \mu_{max} \frac{C_{polluant}}{C_{polluant} + K_S}$$

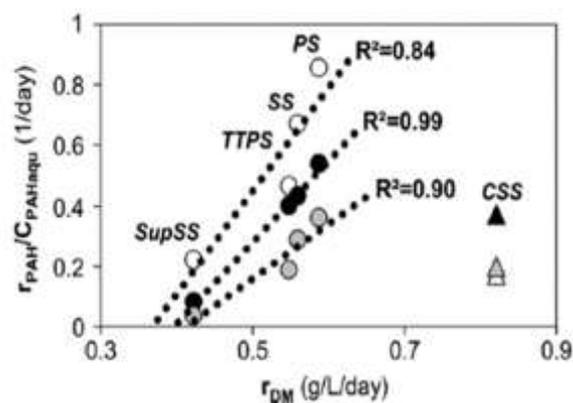
La Figure 73 représente le comportement du fluoranthène en montrant les valeurs expérimentales ainsi que par le modèle de cométabolisme et un modèle de métabolisme classique en considérant la partie soluble comme biodégradable (Delgadillo-Mirquez et al. 2011).



**Figure 73.** Comportement du fluoranthène dans les réacteurs PS et SS : (ligne grise) concentration de HAP dans l'influent, (cercles noirs) données expérimentales, (ligne noire) modèle avec cométabolisme et (ligne pointillée) modèle à métabolisme classique (Delgadillo-Mirquez et al. 2011)

En effet, comme illustré dans la Figure 73, le modèle qui intègre le phénomène de cométabolisme pour la biodégradation des MPs se rapproche davantage des données expérimentales.

Une étude menée par (Barret, Carrère, et al., 2010) a porté sur quelques HAPs en utilisant différents types de substrats. Les résultats ont montré que la biodégradation des MPs est une fonction linéaire du taux de biodégradation du substrat primaire (cf. Figure 74).



**Figure 74.** Dégradation en concentration normalisée à aqueuse taux de phénanthrène (blanc), de benzo(k)fluoranthène (noir) et benzo(g,h,i)pérylène (gris) en fonction de la taux d'élimination matière sèche ( $r_{DM}$ ) (Barret, Carrère, et al., 2010)

Ainsi, il est clair sur la Figure 74 que plus le taux d'élimination de la matière organique est élevé, plus le taux d'élimination des MPs l'est également. De plus, il apparaît nécessaire qu'il y

ait une dégradation minimale de la matière organique pour permettre la biodégradation des MPs.

En ce qui concerne les produits pharmaceutiques, le Tableau 29 et la Figure 75 présentent ces études.

**Tableau 29. Etudes sur le cométabolismes des produits de soin et pharmaceutiques**

N°	Référence	Molécules/substrat	Procédé	Observation
1	(Alvarino et al., 2014)	SMX, TMP(trimethorpin) Influent synthétique contenant du chlorure d'ammonium, de l'acétate de sodium et du bicarbonate de sodium	Réacteur UASB HRT=0,5-1 j	Relation linéaire entre l'élimination des MPs et le taux d'activité méthanogène
2	(Alvarino et al., 2016)	TMP, ERY des eaux usées synthétiques ont été préparées en utilisant du lait écrémé dilué comme source de matière organique complexe	UASB couplé à réacteur aérobie à membrane	Relation linéaire entre l'élimination des MPs et l'activité des hétérotrophe ou nitrifiant
3	(Gonzalez-Gil, Mauricio-Iglesias, Serrano, et al. 2018)	SMX, ERY, TCS, FLX, CBZ, etc. mélange synthétique d'AGV	Réacteur méthanogène HRT=SRT=20j	Aucune différence n'a été observée dans l'élimination des MPs lorsque l'activité méthanogène a été doublée. Une hypothèse est que les valeurs d'activité méthanogène sont déjà à un niveau tel que la biodégradation des MPs n'est pas impactée
4	(Kennes-Veiga et al., 2021)	SMX, ERY, TCS mélange synthétique d'acétate de sodium et d'acide acétique comme source de carbone, chlorure d'ammonium	Réacteur aérobie, HRT= 1h , SRT<8 j	Amélioration de biodégradation de MP en augmentant l'activité méthanogène

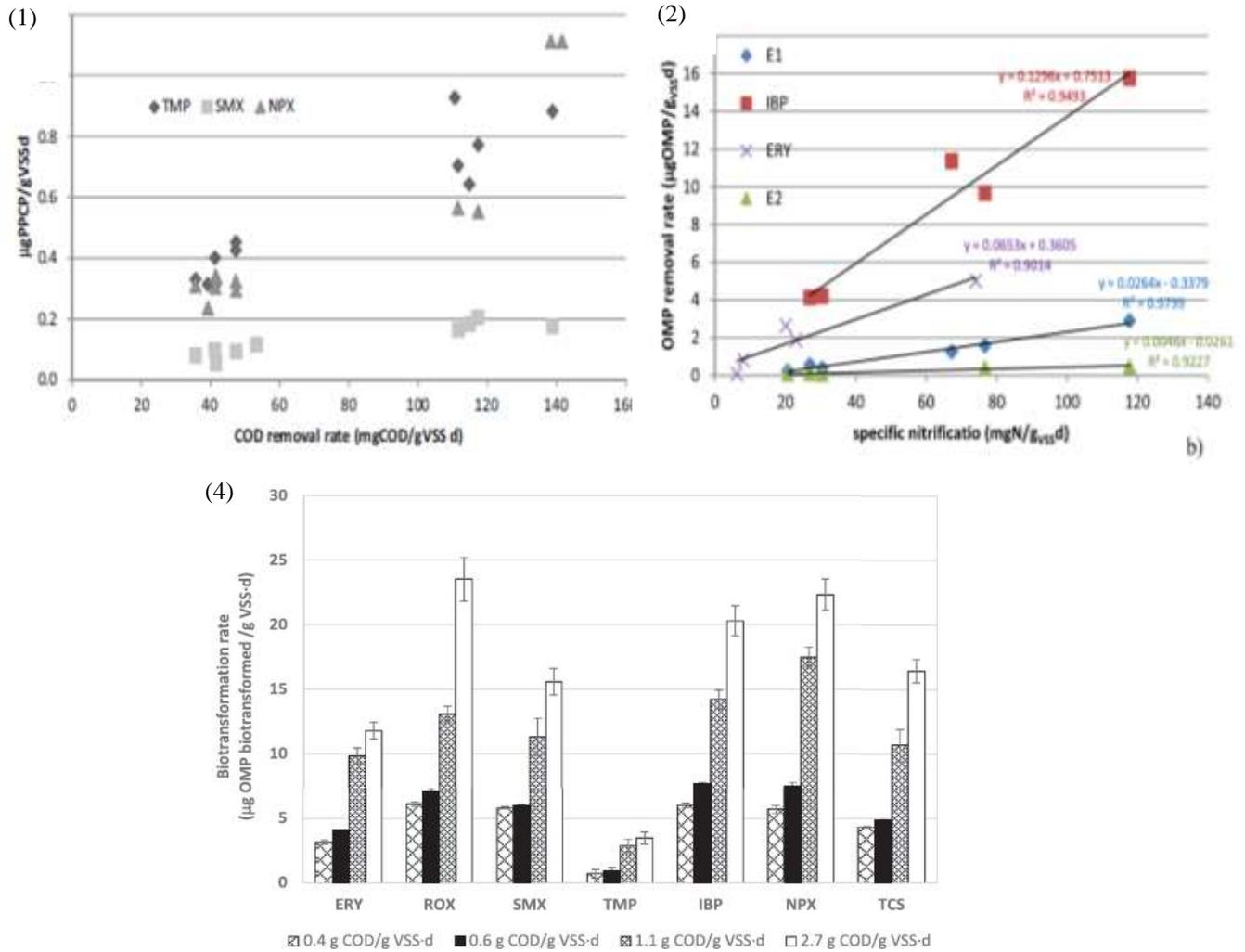


Figure 75. Résultats des études '1', '2' et '4' de Tableau 29

La conclusion principale des auteurs est que le taux d'élimination des MPs est linéaire par rapport à dégradation du substrat. Il convient de noter qu'il y a une subtilité dans ces études que les auteurs n'ont pas correctement observée. Ils ont cherché à normaliser la quantité de micro-organismes présente dans le milieu à l'aide du VSS. Cependant, le VSS ne se compose pas uniquement de micro-organismes, mais également de matières inertes et complexes. Par conséquent, la composition des cellules peut varier d'une charge à l'autre. Notons que le phénomène de cométabolisme a été bien étudié pour les molécules de HAP, alors que les études sur le cométabolisme des produits pharmaceutiques en digesteur anaérobie sont encore insuffisantes.

## Annexe 2 : Modèle ADM1

Le modèle de digestion anaérobie 1 (ADM1) proposé par le groupe de travail IWA pour la modélisation mathématique des processus de digestion anaérobie est l'un des modèles les plus complets. Les Tableau 30 présente la matrice de Gujer des réactions biologiques de ce modèle.

Tableau 30. Matrice de Gujer des réactions biologiques d'ADMI

Component →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Rate (g <sub>g</sub> COD <sub>ad</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
Process ↓	S <sub>10</sub>	S <sub>11</sub>	S <sub>12</sub>	S <sub>13</sub>	S <sub>14</sub>	S <sub>15</sub>	S <sub>16</sub>	S <sub>17</sub>	S <sub>18</sub>	S <sub>19</sub>	S <sub>20</sub>	S <sub>21</sub>		
1 Disintegration												$f_{dis}$	$k_d X_{10}$	
2 Hydrolysis Carbohydrates	1												$\frac{k_{hyd} X_{10}}{K_1 + S_{10}}$	
3 Hydrolysis of Proteins		1											$\frac{k_{hyd} X_{10}}{K_1 + S_{11}}$	
4 Hydrolysis of Lipids	$f_{L1}$		$f_{L2}$										$\frac{k_{hyd} X_{10}}{K_1 + S_{12}}$	
5 Uptake of Sugars	-1				$(1-Y_{5a}) f_{5a}$	$(1-Y_{5b}) f_{5b}$	$(1-Y_{5c}) f_{5c}$	$(1-Y_{5d}) f_{5d}$		$-\sum_{i=1}^4 C_i Y_{5i}$	$-(Y_{5a}) N_{5a}$		$k_{5a} = \frac{S_{10}}{K_1 + S_{10}} X_{10} f_5$	
6 Uptake of Amino Acids		-1			$(1-Y_{6a}) f_{6a}$	$(1-Y_{6b}) f_{6b}$	$(1-Y_{6c}) f_{6c}$	$(1-Y_{6d}) f_{6d}$		$-\sum_{i=1}^4 C_i Y_{6i}$	$N_{6a} (Y_{6a}) N_{6a}$		$k_{6a} = \frac{S_{11}}{K_1 + S_{11}} X_{10} f_6$	
7 Uptake of LCFA			-1					$(1-Y_{7a}) 0.7$	$(1-Y_{7b}) 0.3$				$k_{7a} = \frac{S_{12}}{K_1 + S_{12}} X_{10} f_7$	
8 Uptake of Valerate				-1				$(1-Y_{8a}) 0.34$	$(1-Y_{8b}) 0.31$	$(1-Y_{8c}) 0.15$			$k_{8a} = \frac{S_{13}}{K_1 + S_{13}} X_{10} f_8 \frac{1}{1 + S_{13}/K_{8a}}$	
9 Uptake of Butyrate					-1			$(1-Y_{9a}) 0.8$	$(1-Y_{9b}) 0.2$				$k_{9a} = \frac{S_{14}}{K_1 + S_{14}} X_{10} f_9 \frac{1}{1 + S_{14}/K_{9a}}$	
10 Uptake of Propionate						-1	$(1-Y_{10a}) 0.57$	$(1-Y_{10b}) 0.43$					$k_{10a} = \frac{S_{15}}{K_1 + S_{15}} X_{10} f_{10}$	
11 Uptake of Acetate									$(1-Y_{11})$				$k_{11a} = \frac{S_{16}}{K_1 + S_{16}} X_{10} f_{11}$	
12 Uptake of Hydrogen									-1	$(1-Y_{12})$			$k_{12a} = \frac{S_{17}}{K_1 + S_{17}} X_{10} f_{12}$	
13 Decay of X <sub>10</sub>													$k_{13a} X_{10}$	
14 Decay of X <sub>11</sub>													$k_{14a} X_{11}$	
15 Decay of X <sub>12</sub>													$k_{15a} X_{12}$	
16 Decay of X <sub>13</sub>													$k_{16a} X_{13}$	
17 Decay of X <sub>14</sub>													$k_{17a} X_{14}$	
18 Decay of X <sub>15</sub>													$k_{18a} X_{15}$	
19 Decay of X <sub>16</sub>													$k_{19a} X_{16}$	
		Monosaccharides (gCOD m <sup>-3</sup> )	Amino Acids (gCOD m <sup>-3</sup> )	Long chain fatty acids (gCOD m <sup>-3</sup> )	Total organic (gCOD m <sup>-3</sup> )	Total lipids (gCOD m <sup>-3</sup> )	Total proteins (gCOD m <sup>-3</sup> )	Total acids (gCOD m <sup>-3</sup> )	Hydrogen gas (gCOD m <sup>-3</sup> )	Methane gas (gCOD m <sup>-3</sup> )	Inorganic Carbon (gCOD m <sup>-3</sup> )	Inorganic nitrogen (gCOD m <sup>-3</sup> )	Soluble inert (gCOD m <sup>-3</sup> )	Inhibition factors (3.7): $I_1 = I_{p1} I_{n1} I_{s1}$ $I_2 = I_{p2} I_{n2} I_{s2}$ $I_3 = I_{p3} I_{n3} I_{s3} I_{m3} I_{c3}$

Component →	1	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Rate (g <sub>g</sub> COD <sub>ad</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Process ↓	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>	X <sub>16</sub>	X <sub>17</sub>	X <sub>18</sub>	X <sub>19</sub>	X <sub>20</sub>	X <sub>21</sub>	X <sub>22</sub>	
1 Disintegration													$f_{dis}$	$k_d X_{10}$
2 Hydrolysis Carbohydrates	-1													$\frac{k_{hyd} X_{10}}{K_1 + S_{10}}$
3 Hydrolysis of Proteins			-1											$\frac{k_{hyd} X_{10}}{K_1 + S_{11}}$
4 Hydrolysis of Lipids				-1										$\frac{k_{hyd} X_{10}}{K_1 + S_{12}}$
5 Uptake of Sugars						$Y_{5a}$								$k_{5a} = \frac{S_{10}}{K_1 + S_{10}} X_{10} f_5$
6 Uptake of Amino Acids							$Y_{6a}$							$k_{6a} = \frac{S_{11}}{K_1 + S_{11}} X_{10} f_6$
7 Uptake of LCFA								$Y_{7a}$						$k_{7a} = \frac{S_{12}}{K_1 + S_{12}} X_{10} f_7$
8 Uptake of Valerate									$Y_{8a}$					$k_{8a} = \frac{S_{13}}{K_1 + S_{13}} X_{10} f_8 \frac{1}{1 + S_{13}/K_{8a}}$
9 Uptake of Butyrate										$Y_{9a}$				$k_{9a} = \frac{S_{14}}{K_1 + S_{14}} X_{10} f_9 \frac{1}{1 + S_{14}/K_{9a}}$
10 Uptake of Propionate											$Y_{10a}$			$k_{10a} = \frac{S_{15}}{K_1 + S_{15}} X_{10} f_{10}$
11 Uptake of Acetate												$Y_{11a}$		$k_{11a} = \frac{S_{16}}{K_1 + S_{16}} X_{10} f_{11}$
12 Uptake of Hydrogen													$Y_{12a}$	$k_{12a} = \frac{S_{17}}{K_1 + S_{17}} X_{10} f_{12}$
13 Decay of X <sub>10</sub>		1				-1								$k_{13a} X_{10}$
14 Decay of X <sub>11</sub>			1				-1							$k_{14a} X_{11}$
15 Decay of X <sub>12</sub>				1				-1						$k_{15a} X_{12}$
16 Decay of X <sub>13</sub>					1				-1					$k_{16a} X_{13}$
17 Decay of X <sub>14</sub>						1				-1				$k_{17a} X_{14}$
18 Decay of X <sub>15</sub>							1				-1			$k_{18a} X_{15}$
19 Decay of X <sub>16</sub>								1				-1		$k_{19a} X_{16}$
		Composés (gCOD m <sup>-3</sup> )	Carbohydrates (gCOD m <sup>-3</sup> )	Proteins (gCOD m <sup>-3</sup> )	Lipids (gCOD m <sup>-3</sup> )	Sugar degradation (gCOD m <sup>-3</sup> )	Amino acid degradation (gCOD m <sup>-3</sup> )	LCFA degradation (gCOD m <sup>-3</sup> )	Valerate and butyrate degradation (gCOD m <sup>-3</sup> )	Propionate degradation (gCOD m <sup>-3</sup> )	Acetate degradation (gCOD m <sup>-3</sup> )	Hydrogen degradation (gCOD m <sup>-3</sup> )	Particulate inert (gCOD m <sup>-3</sup> )	Inhibition factors (3.7): $I_1 = I_{p1} I_{n1} I_{s1}$ $I_2 = I_{p2} I_{n2} I_{s2} I_3$ $I_3 = I_{p3} I_{n3} I_{s3} I_{m3} I_{c3}$

### Annexe 3 : Effet de recirculation sur les résultats de simulation

La Figure 76 présente les résultats de la simulation de réacteur MAD-TAD effectuée avec les conditions opératoires de MAD (mésophile dans les 2 compartiment) avec une recirculation continue en comparaison avec celle réalisée avec trois recirculations par jour (comme l'expérience).

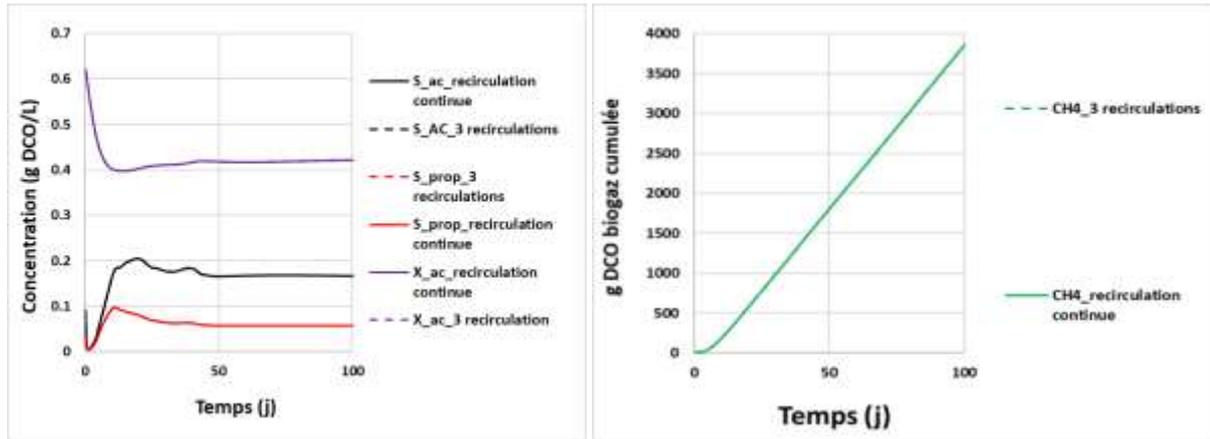


Figure 76. Comparaison des résultats des simulations effectuées avec une recirculation continue et 3 recirculations par jour

Nous pouvons clairement constater que les résultats de la simulation avec une recirculation continue se superposent à ceux de la simulation avec trois recirculations par jour. Étant donné que les simulations avec une recirculation continue nécessitent moins de temps, nous réalisons nos simulations dans ces conditions.

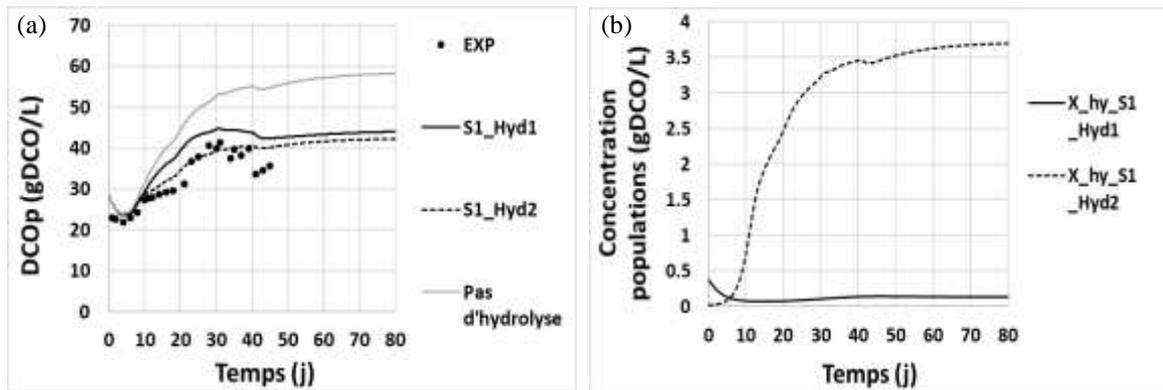
#### Annexe 4 : Etude de l'hydrolyse dans le MAD-TAD

Les modèles et les valeurs de paramètres qui peuvent permettre de représenter l'effet de passage de boue dans le TAD sur l'activité hydrolytique sont présentées sur la Figure 77:

Figure 77. Formes d'équations testées pour la croissance des populations hydrolytiques

Modèles d'hydrolyse	Forme de l'équation	Taux de décès	Modifications apportées par rapport au modèle ADM1_B
Hyd1	Monod	$k_{d\_Xhy\_TAD} (5j^{-1}) > k_{d\_Xhy\_MAD} (0,02 j^{-1})$	Rendre l'hydrolyse dépendante de la concentration cellulaire pour pouvoir la réduire lors du passage dans le TAD en augmentant le taux de décès (et voir si la croissance permet de représenter O5)
Hyd2	Contois : $\frac{dDCO_p}{dt} = \frac{DCO_p}{K_{s\_hyd}X_{hy} + DCO_p} X_{hy}$	$k_{d\_Xhy\_TAD} = k_{d\_Xhy\_MAD} = 0,02 j^{-1}$	Modifier l'hydrolyse par une forme Contois (avec $X_{hy,0} \ll 1$ ) pour prendre en compte une désactivation puis l'adaptation cellulaire au substrat (colonisation de la $DCO_p$ par les bactéries hydrolytiques)

Les résultats de simulation de ces scénarios sont présentés sur la Figure 78:



*Figure 78. Evolution temporelle de la DCO<sub>p</sub> qui caractérise l'hydrolyse de la matière particulaire (a) de la concentration des populations microbiennes hydrolytiques dans le réacteur dans le scénario1Hyd. On rappelle la courbe de la DCO<sub>p</sub> si aucune hydrolyse n'a lieu pour permettre de visualiser le taux de biodégradation de la DCO<sub>p</sub>.*

Globalement, les deux modèles d'hydrolyse permettent de représenter l'allure globale de la DCO<sub>p</sub> du réacteur. L'introduction d'un  $k_a$  plus élevé dans le compartiment TAD peut reproduire les tendances observées sur l'hydrolyse mais sur-estime la DCO<sub>p</sub> sur l'ensemble de l'expérience. Le modèle de Contois améliore très légèrement la représentation des 40 premiers jours grâce à une meilleure description de la colonisation microbienne de la DCO<sub>p</sub> qui est fonction du ratio biomasse/substrat. Cette meilleure représentation peut montrer que les populations hydrolytiques ne sont pas en excès et qu'il existe un besoin d'adaptation des bactéries hydrolytiques à leur substrat. Malgré cette amélioration, nous avons préféré garder le modèle d'hydrolyse Hyd1 pour sa simplicité. Nous l'utilisons donc dans la simulation du scénario S1.

## Annexe 5 : Calcul de la concentration d'azote ammoniacale

La concentration de FA peut être calculée à l'aide des équations suivantes : (Moerland et al., 2021) :

$$\text{Équation 1 : } K_a = 10^{-pka} = \frac{[NH_3][H^+]}{[NH_4^+]}$$

$$\text{Équation 2 : } K_a(T) = K_{a,25^\circ C} e^{\frac{51965}{R} \left( \frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right)}$$

$$\text{Équation 3 : } [NH_3] = \frac{[TAN]}{1 + 10^{pka - pH}}$$

$$R = 8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$$

$$K_{a,25^\circ C} = 6,31 \times 10^{-10}$$

## Annexe 6 : Evaluation de l'écotoxicité des différentes boues

La Figure 79 reprend la démarche mise en œuvre pour évaluer l'écotoxicité des différentes boues issues de la filière. Trois matrices ont été étudiées : MAD, MAD-TAD et MAD-TAR.

Deux types de tests ont été utilisés :

- un test de phytotoxicité sur *Lepidium sativum*
- un test de toxicité aigüe sur *Daphnia magna*

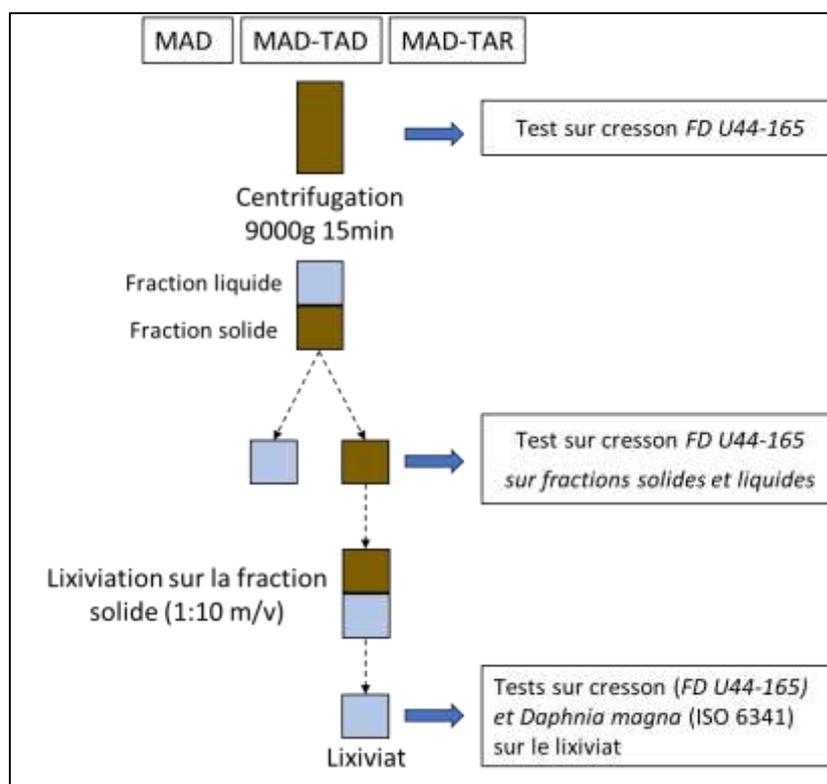


Figure 79. Schéma de la démarche mise en œuvre

#### Germination du Cresson alénois (*Lepidium sativum*)

Le cresson alénois (*Lepidium sativum*) est fréquemment utilisé pour évaluer la phytotoxicité (Visioli et al. 2014 ; Masarovičová et Kráľová 2017). Il est particulièrement tolérant à la salinité, à la sécheresse et aux fortes concentrations de métaux lourds et de métalloïdes (Masarovičová et Kráľová 2017 ; Praveen et al. 2017). Les avantages d'utiliser le cresson dans les tests de phytotoxicité incluent sa croissance rapide, sa large disponibilité, la facilité d'obtention de ses graines et la simplicité de mise en œuvre (Masarovičová et Kráľová 2017). *Lepidium sativum* a notamment été utilisé pour évaluer la phytotoxicité des sols (Mekki et Sayadi 2017 ; Manas et De las Heras 2018), des boues d'épuration (Fuentes et al. 2006), des composts (Aslam et al. 2008) et des déchets industriels (Bożym 2020 ; Bożym et al. 2021 ; Kicińska et Wikar 2021).

Le test de germination a été réalisées en triplicat dans des boîtes de Petri (10\*10cm). 20 graines ont été semées sur du papier absorbant puis 25 ml de boue ou de lixiviat a été ajouté. Lorsque le test a été réalisé sur la fraction solide, un volume équivalent a été déposé sur le papier absorbant et les graines ont été déposés au contact du substrat. Les boîtes de Pétris sont ensuite placées à l'obscurité dans une enceinte thermostatée à 25°C pendant 72h. Chaque jours le nombre de graines germées est comptabilisée. Un contrôle négatif avec de l'eau déminéralisé a été effectué pour attester de la qualité de germination des graines.

Ce test de germination a également été réalisé en triplicat sur un sol amendé avec de la boue. Pour cela, la capacité de rétention maximale en eau a été déterminée pour la terre utilisée. Chaque pot à ensuite été arrosé à 70% de la capacité de rétention avec un ratio boue/eau différent (100, 80, 60, 40, 20,0%).

#### Test de toxicité aigüe sur *Daphnia magna*

Les daphnies font parties des organismes modèles les plus anciens et les plus couramment utilisés dans la recherche biologique (Ebert, 2005) et l'évaluation de la toxicité des composés chimiques (Villegas-Navarro et al., 2003). La Daphnie présente de nombreux avantages pratiques, notamment : la simplicité de leur culture dans des conditions de laboratoire, un cycle de vie court, une manipulation facile et un faible coût de maintenance (Bownik, 2019). De plus, les tests sur les daphnies incluent les principes des 3R (remplacement, réduction et raffinement).

Pour évaluer la toxicité aiguë des lixiviats non dilués issus des trois boues différentes, un test d'immobilisation de 48 heures sur *Daphnia magna* a été réalisé. Des Daphnies âgées de moins de 24 heures ont été sélectionnées. Cinq néonates ont ensuite été placés dans des cristallisoirs en verre contenant chacun 25ml de lixiviat non dilué. Chaque condition a été réalisé avec 4 réplicats pour un total de 20 Daphnies. Les cristallisoirs ont été maintenus à une température constante de  $20 \pm 2$  °C, sous un cycle lumineux de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Les Daphnies ont été observées à des intervalles de 24 et 48 heures, et le nombre d'individus immobilisés (incapables de nager pendant 10 secondes après une légère agitation du récipient) a été enregistré. Le pourcentage d'immobilisation a été calculé pour chaque échantillon, permettant ainsi de comparer la toxicité relative des trois boues.

#### Préparation des analyses pour ICP-OES

Les échantillons ont été agités 24h puis centrifugés 15min à 9000g. Le surnageant a été acidifié à l'acide nitrique (1%) pour solubiliser les éléments avant l'analyse à l'ICP-OES. Afin d'assurer la qualité des analyses, des standards internes ont été utilisés. Les analyses ont été effectuées en triplicat.

## **Annexe 7 : Méthodes d'évaluation de l'antibiorésistance des digestats**

Les extractions d'ADN des échantillons de digestat MAD, MAD-TAD et MAD-TAR ont été réalisés à l'aide du kit FastDNA spin kit for feces développé par MP Biomedical. Il permet d'extraire les ADN totaux à partir notamment de boues liquides comme les échantillons à notre disposition. Le principe de ce kit est le suivant :

- Les échantillons subissent dans un premier temps une lyse chimique puis une lyse physique permettant le relargage des ADN dans la solution. Une centrifugation permet de séparer les ADN des déchets de digestat qui se retrouvent dans le culot et sont donc éliminés.
- Les protéines sont alors éliminées par l'ajout d'une solution commerciale (FastDNA spin kit for feces)
- L'ADN ainsi libéré est filtré sur colonne.

- Deux étapes de lavage par une solution tampon et élution suivent cette filtration permet de récupérer l'ADN

L'ADN total (ADN plasmidique et chromosomique) est dosé par une méthode spectrophotométrique.

### **Etude du résistome**

Lors de l'étude du résistome différents gènes codant pour des résistances à différentes familles d'antibiotiques (macrolides, bêta-lactamines, fluoroquinolones et autres), à différents composés pouvant être impliqués dans des phénomènes de cosélections (biocides, métaux lourds...) ainsi que des gènes codant pour des éléments mobiles (Séquences d'Insertion (IS), intégrons...) ont été ciblés.

La méthode de caractérisation du résistome est la qPCR haut débit (High throughput qPCR Fluidigm®) pour la recherche et le dosage relatif de marqueurs moléculaires de la résistance. 2 µL d'ADN extrait de l'échantillon, si possible à 10ng d'ADN/µL, sont déposés dans les puits d'une plaque à 96 puits (3 extraits par échantillons : triplicat technique). Sur la plaque, un pool de référence est également déposé (Résistome de référence du laboratoire). Une seconde plaque rassemble les différentes amorces sélectionnées (Tableau 1 et annexe 1). 5µL d'amorce sens et reverse à 100 µmolaires sont disposés dans la plaque et dilués selon les protocoles standards (1,2).

Les gènes ciblés, regroupés en 16 classes de gènes de résistance, comprennent :

- Les gènes le plus souvent détectés dans le microbiote intestinal des individus en bonne santé (3,4),
- Les gènes cliniquement pertinents (y compris les gènes codant pour les β-lactamases à spectre étendu (BLSE), les carbapénémases et la résistance à la vancomycine),
- Les gènes codant pour la résistance aux métaux lourds et aux composés d'ammonium quaternaire, qui favoriseraient la sélection croisée et la co-sélection des ARG dans l'environnement (5,6).
- Les éléments génétiques en tant que familles de gènes de transposase importantes (7) et gènes d'intégrase de classe 1, 2 et 3 (par des amorces décrites précédemment (8), qui sont des vecteurs importants pour la résistance en clinique et souvent utilisés comme proxy de la pollution anthropique (9).
- Des amorces ciblant l'ADN codant pour 16SrRNA.

L'analyse PCR en temps réel a été réalisée à l'aide du 96.96 BioMark™ Dynamic Array for Real-Time PCR (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA) comme décrit précédemment (1,2). Les cycles thermiques et l'imagerie en temps réel ont été réalisés à la Plateforme Génomique de IP Tours et les valeurs Ct ont été extraites à l'aide du logiciel d'analyse BioMark Real-Time PCR.