

OPTIMIZATION OF ACID-HEAT PRE-TREATMENT TO ENHANCE ABATEMENT OF PATHOGENIC BACTERIA DURING ANAEROBIC DIGESTION

DELMON CEDRIC ^{1*}, PROROT AUDREY ¹, CASELLAS-FRANÇAIS MAGALI ¹,
LEPRAT PATRICK ¹

¹Université de Limoges, Laboratoire PEIRENE, 123 Avenue Albert Thomas 87060 Limoges

Abstract: In Europe, anaerobic digestion is a sector in full development. The solid product of this anaerobic digestion is used as a fertilizer. In terms of health, it is essential to ensure the safety of the digestate spread on agricultural land. Treatments upstream of anaerobic digestion could potentiate the hygienizing effect of anaerobic digestion. Acid and heat pretreatments were tested in this study. These resulted in more or less significant reductions in the concentration of *Escherichia coli*, enterococci and spores of *Clostridium perfringens*. The combination of different pre-treatments would be interesting to study in future research.

Keywords: agricultural anaerobic digestion, pre-treatment, digestate, indicator bacteria

1. INTRODUCTION

Le procédé de méthanisation permet un recyclage de la biomasse et constitue une source d'énergie renouvelable. Le résidu solide issu du procédé, ou digestat, est utilisé dans le domaine de l'agriculture. Il peut être épandu sur des terres cultivables et constitue un engrais naturel, riche en divers nutriments. Cependant, l'épandage des digestats peut générer des risques sanitaires en raison de la présence de nombreux micro-organismes pathogènes susceptibles de contaminer les sols.

C'est pourquoi, des traitements, situés en amont de la méthanisation, sont développés afin de potentialiser l'effet hygiénisant de la méthanisation pour obtenir un digestat renfermant une faible teneur en agents pathogènes. Divers pré-traitements ont été testés et ont montré des résultats fluctuants suivant le type de traitement considéré et les micro-organismes étudiés.

Un pré-traitement par ultrasons n'a montré aucun effet sur l'abattement de la concentration en *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, entérovirus et spores de *Clostridium sp.* (1). A l'inverse, un pré-traitement thermique à 135° C a entraîné une inactivation de ces mêmes agents pathogènes.

D'autres recherches ont utilisé plusieurs gammes de temps et de températures. Ces gammes variaient de trente à quatre-vingt-dix minutes d'incubation avec des températures comprises entre 70 et 90° C. Lors de ces travaux, la caractérisation microbiologique portait sur *Salmonella sp.*, les coliformes fécaux et les œufs d'helminthes. Il a été montré que le traitement pouvant engendrer le plus important abattement de la concentration en micro-organismes est un pré-traitement thermique à 90° C durant quatre-vingt-dix minutes (2).

Par ailleurs, des pré-traitements thermiques couplés à un mélange équimolaire d'Acides Gras Volatils (AGV) ont été expérimentés par une équipe de recherche canadienne (3). Cette dernière a pu mettre en évidence que le couplage de la température et des AGV diminue la concentration en *Clostridium perfringens*. Cependant, le mécanisme d'action de ce pré-traitement n'a pas été élucidé. Il semblerait qu'un milieu acide couplé à la chaleur empêcherait la sporulation des formes végétatives (4) et limiterait ainsi la concentration en *Clostridium perfringens*.

Pour appréhender les propriétés bactéricides d'un traitement, il est important de sélectionner les micro-organismes à étudier. Ces derniers doivent être représentatifs d'un plus grand nombre de type de pathogènes. Les méthodes pour étudier ces micro-organismes indicateurs sont tenues d'être peu coûteuses (5) et facilement

* Corresponding author, courriel: cedric.delmon@unilim.fr

reproductibles. De plus, les micro-organismes indicateurs doivent être présents en grande quantité, spécifiques et suffisamment résistants dans le milieu extérieur afin de les manipuler en laboratoire.

Dans le cadre de cette étude, les micro-organismes étudiés sont *Escherichia coli*, les entérocoques et *Clostridium perfringens* sous forme sporulée.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les potentialités d'un pré-traitement acido-thermique à augmenter l'effet hygiénisant de la digestion anaérobie et ainsi améliorer la qualité sanitaire des digestats et pérenniser la filière d'épandage. Il s'inscrit dans une logique de valorisation des matières organiques recyclables.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons prélevés sont les matières de vidange car elles renferment la concentration la plus importante en *Clostridium perfringens* parmi les intrants issus d'une unité de méthanisation agricole. Ces échantillons ont été traités car *C. perfringens* est particulièrement résistant dans l'environnement grâce à sa capacité de sporuler. Le terme « matières de vidange » désigne un mélange de résidus de fosse septique couplé à des graisses de restauration collective.

2.2. Caractérisation microbiologique

Les matières de vidange ont été caractérisées microbiologiquement à partir des méthodes spécifiques de caractérisation des micro-organismes d'intérêt.

La concentration en *Escherichia coli* a été estimée selon la méthode NF EN ISO 9308-3 avec des tests en microplaques quatre-vingt-seize puits « MUG/EC Biokar Diagnostics® ».

Des tests en microplaques quatre-vingt-seize puits « MUD/SF Biokar Diagnostics® » selon la méthode NF EN ISO 7899-1 sont utilisés pour dénombrer les entérocoques.

Les microplaques sont incubées pendant soixante-douze heures à 44° C. Le dénombrement des agents pathogènes est permis par le calcul du NPP (Nombre le Plus Probable) déterminé par la loi de Poisson.

Pour dénombrer *Clostridium perfringens*, des dilutions successives décimales sont effectuées dans de l'eau distillée stérile additionnée de NaCl à 0.9 %. De plus, un chauffage au bain-marie à 80° C durant 10 minutes est nécessaire pour comptabiliser uniquement les spores et éliminer ainsi les formes végétatives. Un millilitre de chaque dilution est introduit dans des tubes contenant du milieu « Tryptone-Sulfite-Néomycine (TSN) Biokar Diagnostics® » en duplicat. Puis, ces tubes sont incubés pendant vingt-quatre heures à 37° C. *Clostridium perfringens* peut réduire le sulfite présent dans le milieu TSN en sulfure de fer formant ainsi un précipité noir caractéristique. Par conséquent, la lecture s'effectue par dénombrement de colonies rondes et noires.

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

Le traitement acide visant à améliorer le potentiel hygiénisant de la méthanisation est un mélange équimolaire d'acides acétique, propionique et butyrique (Tableau 1) (3). Un traitement thermique à 70° C est également étudié (Tableau 2) (6).

Tableau 1. Conditions opératoires du pré-traitement acide

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

Tableau 2. Conditions opératoires du pré-traitement thermique

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

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les traitements acide et thermique ont été expérimentés sur des matières de vidange afin d'étudier le potentiel d'hygiénisation de ces pré-traitements.

La figure 1 montre un très faible abattement des concentrations de spores de *C. perfringens* à la suite du traitement avec les AGV. Il n'apparaît pas significatif dans le sens où cet abattement ne varie ni en fonction de la concentration, ni du temps d'incubation.

Le traitement acide semble n'avoir que peu d'effets sur l'abattement de la concentration en entérocoques. La concentration de 3 g/L avec un temps d'incubation de vingt-quatre heures est l'expérimentation entraînant l'abattement le plus important sur la concentration en entérocoques (Figure 1b). Cependant, aucun effet significatif du traitement acide n'émerge car, comme pour les spores de *Clostridium perfringens*, l'abattement ne varie ni en fonction du temps d'incubation ni de la concentration.

En outre, le traitement acide n'engendre aucun effet sur l'abattement de la concentration en *Escherichia coli* (Figure 1). Il paraît normal que le mélange équimolaire d'AGV seuls n'entraîne peu ou pas d'effet bactéricide suite au traitement. Cette caractérisation initiale des effets du pré-traitement acide est indispensable dans le cadre de cette étude. Cependant, les AGV constituent un paramètre important influençant la réduction des pathogènes au cours de la digestion anaérobie (4). Ces effets ne peuvent être réellement évalués qu'en couplage avec la méthanisation.

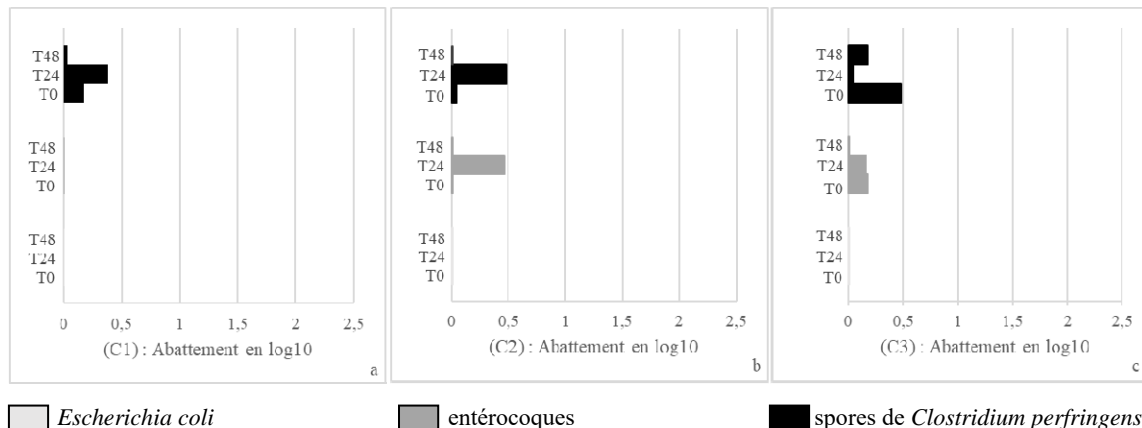


Figure 1. Abattement de la concentration en *Escherichia coli*, entérocoques et spores de *Clostridium perfringens* après application d'une concentration croissante d'AGV sur les matières de vidange

A l'inverse, comme la Figure 2 le souligne, le traitement thermique engendre un abattement total de la concentration en *E. coli* (supérieur à 2,5 logs) et ce, quel que soit le temps de traitement considéré. Ces effets du traitement thermique sont en adéquation avec des travaux effectués par Pourcher *et al.* (6).

Le traitement thermique engendre un abattement moyen de 0,5 log et ce, quel que soit le temps de traitement considéré (Figure 2). Cet abattement ne peut être significatif car il est bien inférieur à 1 log (1 log représentant un abattement de 90 % de la concentration en agents pathogènes).

Le traitement thermique entraîne un abattement croissant des spores de *C. perfringens* lorsque la durée du traitement augmente. L'abattement est de 1,3 log après vingt-quatre heures d'incubation des matières de vidange à 70° C (Figure 2). Cet abattement peut être considéré comme significatif si d'autres expériences sont menées et montrent un abattement similaire. Dans ces mêmes conditions de traitement, Pourcher *et al.* (6) montrent un abattement supérieur à 3 logs de la concentration en spores de *C. perfringens* dans du lisier de porc.

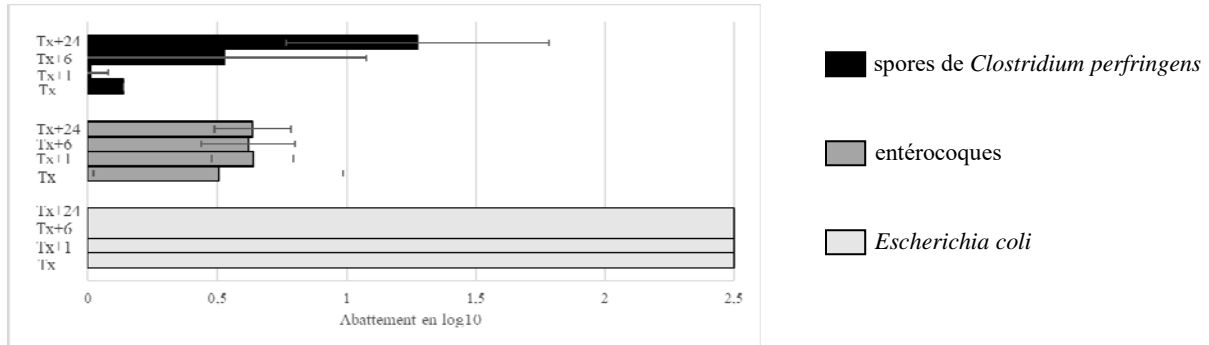


Figure 2. Abattement des concentrations en *Escherichia coli*, entérocoques et spores de *Clostridium perfringens* après application d'un traitement thermique à 70° C sur les matières de vidange de Tx à Tx+24

4. CONCLUSION

Le pré-traitement thermique appliqué sur les matières de vidange entraîne un effet sur la réduction du nombre de spores de *C. perfringens*. Quant au pré-traitement acide, les différentes concentrations et temps d'incubation des acides avec les matières de vidange ne présentent pas d'effet significatif sur les bactéries indicatrices. Si les résultats n'ont pas mis en évidence un abattement très marqué suite au pré-traitement, ces effets ne peuvent être réellement évalués qu'en couplage avec la méthanisation et donc avec des tests de potentiel méthanogène (BMP) en laboratoire.

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

RÉFÉRENCES

1. Levantesi C, Beimfohr C, Blanch AR, Carducci A, Gianico A, Lucena F, et al. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research*. mai 2015;22(10):7237-47.
2. Ruiz-Espinoza JE, Méndez-Contreras JM, Alvarado-Lassman A, Martínez-Delgadillo SA. Effect of low temperature thermal pre-treatment on the solubilization of organic matter, pathogen inactivation and mesophilic anaerobic digestion of poultry sludge. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. oct 2012;47(12):1795-802.
3. Salsali H, Parker WJ, Sattar SA. The effect of volatile fatty acids on the inactivation of *Clostridium perfringens* in anaerobic digestion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. mai 2008;24(5):659-65.
4. ANSES. Avis de l'ANSES relatif aux conclusions de l'autosaisine sur la méthodologie de l'évaluation qualitative des risques liés à la présence de *Clostridium perfringens* dans les Matières Fertilisantes et Supports de Culture. Maisons-Alfort: ANSES; juin 2012, 25 p.
5. Besson M, Moletta R. Aspects sanitaires de l'épandage de digestats issus de méthanisation à la ferme. *L'Eau, l'industrie, les nuisances*. 2010;(335):85-89.
6. Pourcher A-M, Burton C, Ziebal C, De-Guardia A. Impact of temperature-time combinations on enteric bacteria in separated solids from pig manure. :5 p.