

## MICROBIOLOGICAL MAPPING OF AN AGRICULTURAL BIOGAS PLANT TO STUDY THE HYGIENISING POTENTIAL OF ANAEROBIC DIGESTION

DELMON CEDRIC <sup>1\*</sup>, PROROT AUDREY <sup>1</sup>, CASELLAS-FRANÇAIS MAGALI <sup>1</sup>,  
LEPRAT PATRICK <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Limoges, Laboratoire PEIRENE, 123 Avenue Albert Thomas 87060 Limoges

**Abstract:** Agricultural anaerobic digestion is a booming business in Europe. The digestate, solid product of the methanization used as a fertilizer, is intended to be spread on agricultural land. It is therefore important to ensure the safety of the digestate from a health point of view. The inputs and products of an agricultural biogas plant have been characterized microbiologically. The study demonstrated that anaerobic digestion has no impact on *Clostridium perfringens*. However, anaerobic digestion led to a reduction in the concentration of certain pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* or enterococci.

**Keywords:** agricultural anaerobic digestion, hygienisation, digestate, indicator bacteria

### 1. INTRODUCTION

Le procédé de méthanisation permet un recyclage de la biomasse et constitue une source d'énergie renouvelable. Les deux produits obtenus à partir de la méthanisation sont le biogaz et le digestat (1). Le biogaz, qui constitue la partie gazeuse de la digestion anaérobie, peut être transformé en chaleur et en électricité, au même titre que le gaz naturel. Le résidu solide issu du procédé, ou digestat, est utilisé dans le domaine de l'agriculture. Il peut être épandu sur des terres cultivables et constitue un engrais naturel, riche en divers nutriments. Cependant, l'épandage des digestats peut générer des risques sanitaires en raison de la présence de nombreux micro-organismes pathogènes susceptibles de contaminer les sols (2). Il est donc essentiel d'assurer la qualité sanitaire des digestats afin de minimiser le risque de dissémination des micro-organismes pathogènes (3) sans altérer le rendement énergétique de l'installation de méthanisation.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les potentialités de la méthanisation à entraîner un effet hygiénisant de la matière organique afin d'améliorer la qualité sanitaire des digestats en vue de la pérenniser. Cette cartographie d'une unité de méthanisation agricole permet d'établir un état des lieux microbiologique et s'inscrit donc dans une logique de valorisation des matières organiques recyclables.

### 2. MATERIEL ET METHODES

#### 2.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons étudiés sont issus d'une installation de méthanisation agricole. L'installation de méthanisation de l'exploitation repose sur une technologie à alimentation semi-continue. Initialement, l'installation a été dimensionnée pour traiter annuellement 5700 tonnes de substrats bruts. Sept échantillons ont été sélectionnés, prélevés et caractérisés (Figure 1). Le fumier, les céréales, les matières de vidange ont été étudiés ainsi qu'un mélange de deux intrants composé d'un tiers de fumier et de deux tiers de céréales nommé mélange trémie. Le cinquième échantillon, nommé contenu du digesteur, est constitué d'un mélange de trois intrants (fumier, céréales, matières de vidange). Il constitue le produit brut de cette méthanisation en procédé infiniment mélangé et a été prélevé à la sortie du digesteur. Enfin, les digestats solide et liquide, obtenus par séparation de phase, ont aussi été étudiés.

---

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

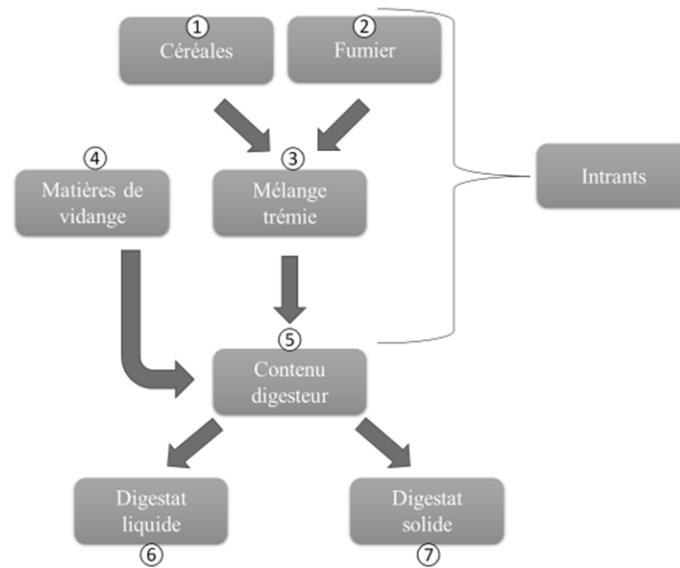


Figure 1. Échantillons prélevés sur l'unité de méthanisation

## 2.2. Caractérisation microbiologique des échantillons prélevés

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

Des tests en microplaques quatre-vingt-seize puits « MUG/EC Biokar Diagnostics® » ont été réalisés pour dénombrer *E. coli* selon la méthode NF EN ISO 9308-3.

Les entérocoques ont été comptabilisés par des tests en microplaques quatre-vingt-seize puits « MUD/SF Biokar Diagnostics® » selon la méthode NF EN ISO 7899-1.

Les microplaques (Figure 2) 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.

Le dénombrement de *Clostridium perfringens* (formes végétatives et spores) a été réalisé grâce à un ensemencement de géloses « Tryptone-Sulfite-Néomycine (TSN) Biokar Diagnostics® » en tubes, en duplicat (Figure 2). Des dilutions successives décimales sont réalisées pour chaque échantillon dans de l'eau distillée stérile additionnée de NaCl à 0.9 %. Un chauffage au bain-marie à 80° C est nécessaire si les spores de *C. perfringens* sont recherchées. Un millilitre de chaque dilution est introduit dans chacun des tubes. Ces tubes sont ensuite incubés à 37° C pendant vingt-quatre heures. La lecture s'effectue par dénombrement de colonies noires et rondes. En effet, *Clostridium sp.* a la capacité de réduire le sulfite présent dans le milieu TSN en sulfure de fer formant ainsi un précipité noir caractéristique.



Figure 2. Microplaque et tubes TSN utilisés lors des expérimentations

## 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de cette caractérisation microbiologique mettent en évidence une importante hétérogénéité des concentrations en bactéries indicatrices de traitement en fonction de l'intrant ou du produit considéré.

En effet, même si les entérocoques et *E. coli* sont apportés essentiellement à partir du fumier (noté numéro 2 sur la Figure 1 avec respectivement  $4,4 \cdot 10^6$  UFC/g0 et  $2,5 \cdot 10^5$  UFC/g de matière fraîche), le mélange trémie (numéro 3) présente une concentration en entérocoques ( $4,7 \cdot 10^7$  UFC/g de matière fraîche) et *E. coli* ( $2,5 \cdot 10^6$  UFC/g de matière fraîche) encore plus importante que le fumier. Une explication peut résider dans la très forte hétérogénéité de l'intrant numéro 2 (structure, temps de stockage) impliquant probablement un manque de reproductibilité des concentrations mesurées dans ce substrat.

La Figure 3 montre que le produit de la méthanisation (numéro 5 sur la Figure 1) présente une concentration de  $3,5 \cdot 10^4$  UFC de *C. perfringens* par gramme de matière fraîche. La concentration de *C. perfringens* dans les matières de vidange (numéro 4) est de  $5,5 \cdot 10^4$  UFC/g alors que le mélange de la trémie (numéro 3) renferme  $7 \cdot 10^1$  UFC de *C. perfringens* par gramme de matière fraîche. On peut en déduire que la concentration en *C. perfringens* dans le digestat est essentiellement apportée par l'intrant numéro 4.

Par ailleurs, les profils microbiologiques des digestats liquide et solide (respectivement numéros 6 et 7) sont similaires au profil du contenu du digesteur (numéro 5). Ceci montre que la séparation de phases par presse à vis n'a pas d'effet sur la répartition des bactéries indicatrices dans les phases liquide et solide du digestat.

Les matières de vidange sont les intrants présentant la plus grande quantité de *C. perfringens* (formes totales ou spores). Il apparaît donc que la majorité des *C. perfringens* sont issus de l'intrant numéro 4. Grâce à la caractérisation microbiologique effectuée sur le site A, il est possible de comparer la concentration en agents pathogènes avant et après digestion anaérobie et ainsi évaluer le potentiel hygiénisant à l'échelle du procédé (Figure 3).

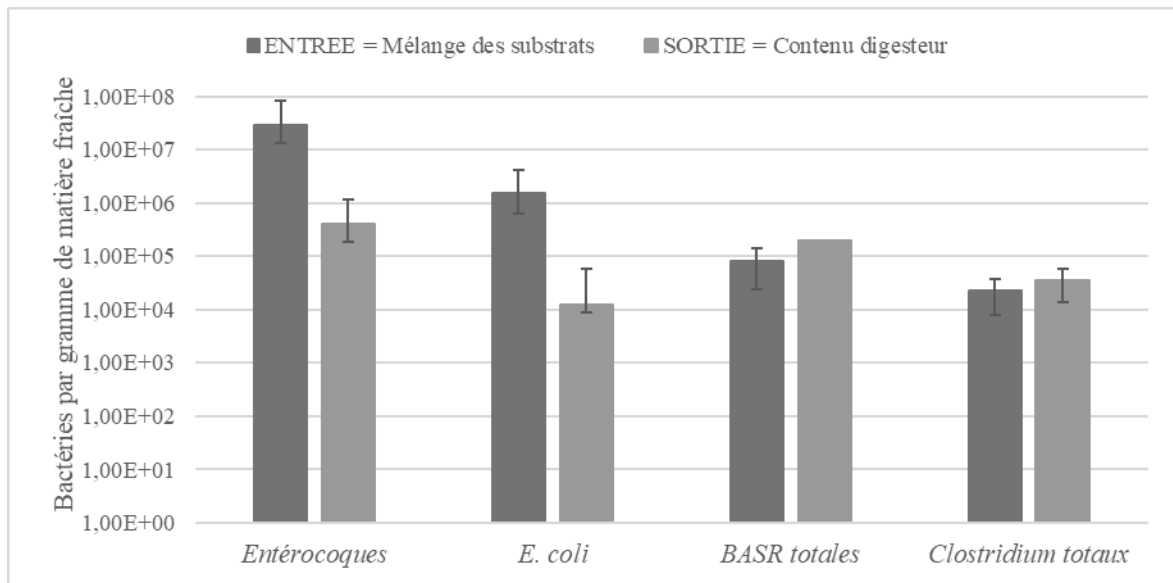


Figure 3. Concentrations en agents pathogènes en entrée et sortie du digesteur du site A

Les résultats obtenus ont mis en évidence que la majorité des *C. perfringens* dénombrés en sortie de digesteur sont issus des matières de vidange. La concentration dans les matières de vidange s'élève à  $5,5 \cdot 10^4$  UFC/g. Dans le fumier, elle est de  $2,5 \cdot 10^2$  UFC/g. Enfin, dans les céréales, elle est de  $2 \cdot 10^2$  UFC/g. Les résultats ont également montré que, la digestion anaérobie, seule, ne permettrait pas de diminuer cette charge.

Le dénombrement des bactéries indicatrices avant et après méthanisation sur site montre bien que, dans ces conditions, si la digestion anaérobie possède des propriétés hygiénisantes sur *E. coli* et les entérocoques (Figure 3), elle n'a pas d'effet sur l'abattement des bactéries capables de sporuler.

#### 4. CONCLUSION

La méthanisation agricole est en plein développement en France et en Europe. Cependant, des problématiques sanitaires apparaissent avec la perspective d'une valorisation de l'ensemble des produits de la digestion anaérobie. Cette caractérisation microbiologique globale sur site, menée individuellement sur chaque intrant et

produit, a permis d'établir une cartographie microbiologique d'une unité de méthanisation agricole. La caractérisation microbiologique a aussi permis de sélectionner un intrant sur lequel des pré-traitements acide et thermique seront testés lors de futures investigations. Les intrants, présentant la charge en *Clostridium perfringens* la plus importante, sont les matières de vidange. Ainsi, plusieurs concentrations en acides gras volatils ainsi que plusieurs temps de pré-traitement thermique seront appliqués sur ces intrants. Cette étude aura pour but d'optimiser ces pré-traitements en vue d'améliorer l'abattement des bactéries pathogènes au cours de la méthanisation.

### RÉFÉRENCES

1. Moletta R. La méthanisation. Paris: Éd. Tec & doc : Lavoisier; 2015.
2. Pourcher A-M, Druilhe C. Impact de la digestion anaérobie sur les bactéries indicatrices et les micro-organismes pathogènes. 2016 févr 10; Limoges.
3. 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.